



**A humán prion fehérje (103 – 112) fragmens fémion-  
katalizált oxidációját befolyásoló tényezők**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

**Bodnár Nikolett**

Témavezető: **Dr. Kállay Csilla**, egyetemi docens

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2025

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács **Kémiai 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, 2025.*

.....  
*a jelölt aláírása*

*Tanúsítom, hogy **Bodnár Nikolett** doktorjelölt **2018-2022** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/2** programjának keretében irányítással 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, 2025.*

.....  
*a témavezető aláírása*

**A HuPrP (103 – 112) fragmens fémion-katalizált oxidációját  
befolyásoló tényezők vizsgálata**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a Kémia tudományágban

Írta: **Bodnár Nikolett**, okleveles vegyész

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

Témavezető: **Dr. Kállay Csilla**, egyetemi docens

Az értekezés bírálói:

Dr. ....  
Dr. ....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. ....  
tagok: Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....  
Dr. ....

Az értekezés védésének időpontja: 2025. .... .

## Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni *Prof. Dr. Gáspár Attila* egyetemi tanárnak és tanszékvezetőnek, hogy lehetővé tette számomra, hogy a doktori értekezésemet a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken készítsem el.

Szeretném kifejezni őszinte hálámat és köszönetemet témavezetőm, *Dr. Kállay Csilla* egyetemi docens felé a szakmai segítségéért, támogatásáért, iránymutatásáért és nem utolsósorban türelmes és lelkiismeretes témavezetéséért.

Köszönettel tartozom *Hőgyéné Dr. Grenács Ágnes Juditnak*, aki BSc-s éveim alatt bevezetett a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport munkájába, és megismertette velem a koordinációs kémiát, továbbá *Dr. Csire Gizellának*, aki MSc-s éveimben segített a folyadékkromatográfiás vizsgálatok elsajátításában.

Köszönet illeti *Dr. Farkas Etelka* professor emeritát, *Dr. Sóvágó Imre* professor emeritust, *Prof. Dr. Várnagy Katalin* egyetemi tanárt és *Prof. Dr. Buglyó Péter* egyetemi tanárt, akik a felmerülő kérdések megválaszolásával és tanácsaikkal támogatták a munkámat a kutatócsoportban.

Köszönöm *Dr. Nagy Lajos* egyetemi docensnek a tömegspektroszkópiás mérésekben, spektrumok felvételében nyújtott segítségét.

Továbbá köszönettel tartozom még a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport minden egykori és jelenlegi tagjának a segítőkész, befogadó, baráti légkörért és segítségükért, amire mindig lehetett számítani. Külön szeretném megköszönni *Dr. Balogh Bettina Diána* és *Székely Enikő* doktorandusz sorstársaimnak a támogatásukat, akik mellett öröm volt eltölteni a négy évet. Köszönet illeti még *Bogdányi-Fekete Orsolyát* és *Dancs Grétát*, akiknek a laboratóriumban a segítségére mindig lehetett számítani. Szeretném megköszönni *Silyéné Madarasi Enikőnek*, akinek vidám hangulatára és barátságára mindig számíthatok, mind az egyetemen belül és kívül.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak, szüleimnek és testvéreimnek, hogy az egyetemi évek és a doktori képzésem alatt végig támogattak.

## Tartalomjegyzék

1. Bevezetés .....	1
2. Irodalmi áttekintés.....	2
2.1. Oxidatív stressz az élő szervezetben .....	2
2.2. Az aszkorbinsav .....	5
2.3. Az aminosavak és fehérjék oxidációja .....	6
2.4. A prion betegség és a prion fehérje .....	13
2.4.1. A metionin oxidációja a prion fehérjében.....	19
2.5. Kelátorok.....	22
2.5.1. Aroil-hidrazonok .....	23
2.5.2. Szalán típusú vegyületek .....	24
2.6. A cink és réz koordinációs kémiája és biológiai jelentősége.....	25
2.6.1. A réz .....	25
2.6.2. A cink .....	26
3. Kísérleti körülmények és alkalmazott módszerek.....	27
3.1. A mérésekhez használt vegyszerek .....	27
3.2. Vizsgált vegyületek.....	28
3.3. pH-potenciometria.....	29
3.4. UV-Vis spektrofotometria.....	32
3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia .....	33
3.6. Oxidációs kísérletek .....	34
3.7. Tömegspektrometria (ESI-TOF-MS).....	36
3.8. Ciklikus voltammetria (CV).....	37
3.9. Aszkorbát fogyasztás kísérlet .....	38
4. Kísérleti eredmények .....	40
4.1. Az Ac-SPKTNMKHA-NH <sub>2</sub> mutáns oxidációs vizsgálata.....	40
4.2. Az X1THIO és X1FUR aroil-hidrazonok kölcsönhatásai a HuPrP (103-112) fragmenssel Cu(II)- és Zn(II)ionok jelenlétében .....	53
4.2.1. Az X1THIO és X1FUR aroil-hidrazonok és réz(II)- és cink(II)-komplexeik .	53
4.2.2. A HuPrP (103-112) és aroil-hidrazonok vegyes ligandumú rendszerei réz(II)ionnal.....	57

4.2.3. A HuPrP (103-112) és aroil-hidrazonok vegyes ligandumú rendszerei cink(II)ionnal.....	64
4.3. Módosított szalán típusú vegyületek oldategyensúlyi vizsgálata réz(II)- és cink(II)ionokkal.....	66
4.3.1. Szalán típusú vegyületek vizsgálata víz és dimetil-szulfoxid elegyben réz(II)- és cink(II)ionnal.....	67
4.3.2. Vízben oldódó szalán típusú vegyületek vizsgálata réz(II)- és cink(II)ionokkal .....	70
4.3.2.1. A Salpyran és módosított változatainak oldategyensúlyi vizsgálata réz(II)- és cink(II)ionokkal.....	70
4.3.2.2. Az AEtQ és ACyQ vegyületek oldategyensúlyi vizsgálata réz(II)- és cink(II)ionnal .....	75
4.3.2.3. A HuPrP (103-112) és az AEtQ és ACyQ vegyes ligandumú rendszerek vizsgálata réz(II)- és cink(II)ionnal .....	77
4.4. A HuPrP (103-112) fragmens és mutánsának fémion katalizált oxidációjának vizsgálata fémion-fehérje kölcsönhatást gyengítő molekulák jelenlétében .....	80
4.4.1. A HuPrP (103-112) M12A mutánssal végzett oxidációs kísérletek .....	82
4.4.2. A HuPrP (103-112) fragmensének oxidációs vizsgálata .....	86
5. Összefoglalás .....	94
6. Summary .....	96
7. Irodalomjegyzék.....	101
8. Függelék.....	114

### Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

4CF <sub>3</sub> O-Salan	2-(((2-((2-hidroxibenzil)amino)etil)amino)metil)-4-(trifluorometoxi)fenol
4CF <sub>3</sub> O -Salpyran	2-(((2-((piridin-2-ilmetil)amino)etil)amino)metil)-4-(trifluorometoxi)fenol
4F-Salpyran	4-fluor-2-(((2-((piridin-2-ilmetil)amino)etil)-amino)metil)fenol
6F-Salpyran	6-fluor-2-(((2-((piridin-2-ilmetil)amino)etil)-amino)metil)fenol
a, b, c	a peptid fragmentálódása során keletkező termék ion, amely az N-terminális rész felőli molekularészletet tartalmazza
AA	aszorbinsav
Ac	acetilcsoport (védőcsoport)
ACyQ	2-(((2-aminociklohexil)amino)metil)kinolin-8-ol
AETQ	2-(((2-aminoetil)amino)metil)kinolin-8-ol
Ala, A	alanin
Asn, N	aszparagin
CD	cirkuláris dikroizmus
CNS	central nervous system, központi idegrendszer
CV	ciklikus voltammetria
Cys, C	cisztein
dMKHA	Ac-SKPCTNMKHA-NH <sub>2</sub>
dMKHM	Ac-SKPCTNMKHM-NH <sub>2</sub> , HuPrP (103-112) C- és N-terminálisan védett peptid fragmens
DMSO	dimetil-szulfoxid
di <i>t</i> b-Salan	2,4-di-terc-butil-6-(((2-((2-hidroxibenzil)amino)etil)amino)-metil)fenol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzimhez kötött immunszorbens assay (enzyme-linked immunsorbent assay)
ESI	elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization)
GC	gázkromatográfia
Gly, G	glicin
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav
His, H	hisztidin
HPCFUR	piridin-2-karboxaldehid 2-furoil-hidrazon (E)-N <sup>1</sup> -(piridin-2-ilmetilén)furán-2-karbohidrazid
HPCIH	piridin-2-karboxaldehid izonikotinoil-hidrazon (E)-N <sup>1</sup> -(piridin-2-ilmetilén)izonikotino-hidrazid
HPLC	nagyhatékonyságú-folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography)
HuPrP	humán prion fehérje

Lys, K	lizin
MCO	fémion-katalizált oxidáció (metal-catalysed oxidation)
MeCN	acetonitril
Met, M	metionin
MetO	metoxicsoport
MetO-Salpyran	4-metoxi-2-(((2-((piridin-2-ilmetil)amino)etil)amino)metil)-fenol
MPACs	fémion-fehérje kölcsönhatást gyengítő molekulák (metal-protein attenuating compounds)
MS	tömegspektroszkópia
Msr	metionin-szulfoxid reduktáz enzim, MsrA és MsrB
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid redukált formája
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája
NH <sub>2</sub>	aminocsoport
nMKHA	Ac-SPKTNMKHA-NH <sub>2</sub>
NMR	mágneses magrezonancia, (nuclear magnetic resonance)
Pro, P	prolin
PrP <sup>C</sup>	celluláris prion fehérje
PrP <sup>Sc</sup>	kóros szerkezetű prion fehérje
RNS	reaktív nitrogén származékok
ROS	reaktív oxigén származékok
Salan	2,2'-((etán-1,2-diilbisz(azanediil))bisz(metilén))difenol
Salpyran	2-(((2-((piridin-2-ilmetil)amino)etil)-amino)metil)fenol
Salquin	2-(((2-((izokinolin-3-ilmetil)amino)etil)amino)metil)fenol
Ser, S	szerin
TFA	trifluor-ecetsav
Thr, T	treonin
TOF	repülési idő (time-of-flight) analizátor
Trp, W	triptofán
UV-Vis	ultraibolya-látható spektroszkópia
Val, V	valin
x, y, z	a peptid fragmentálódása során keletkező termék ion, amely a C-terminális felőli molekularészletet tartalmazza
X1FUR	1-metil-1H-imidazol-2-karboxaldehyd-2-furanil hidrazon (E)-N'-((1-metil-1H-imidazol-2-il)metilén)furán-2-karbohidrazid
X1THIO	1-metil-1H-imidazol-2-karboxaldehyd-2-tiofenil hidrazon (E)-N'-((1-metil-1H-imidazol-2-il)metilén)tiofén-2-karbohidrazid

## 1.Bevezetés

Napjainkban a várható élettartam növekedésével egyre gyakrabban alakulnak ki neurodegeneratív betegségek. Ezen betegségek közé tartozik az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór és a különböző prion betegségek, mint a Creutzfeldt-Jakob-kór vagy a Gerstmann-Straussler-Scheinker-szindróma. Az idegrendszeri betegségek megjelenése és lefolyása összefügg a fehérjék konformációváltozásával és az azt követő aggregációval, úgynevezett amiloidplakkok kialakulásával. Ezen folyamatokban egyes fémionok, mint például a réz, a cink és a vas is szerepet játszanak, felhalmozódásuk az érintett agyszövetekben jól dokumentált. Ezen kölcsönhatásoknak szerkezeti, funkcionális és fiziológiai következményei vannak. Egyrészt koordinációjuk által, másrészt a réz(II)ion és vas(III)ion, mint redoxaktív fémionok, a reaktív oxigént tartalmazó részecskék képződésének elősegítése révén is hozzájárulnak az említett betegségek kialakulásához.<sup>1</sup>

A fémion-katalizált oxidáció oxidatív stresszt, a biológiai öregedés felgyorsulását és idegrendszeri betegségeket okozhat. A biomolekulák fémion-katalizált oxidációja során a vas(III)- vagy réz(II)ionok alkalmas elektrondonorral (például NADH, NADPH, glutation, aszkorbinsav) kölcsönhatásba lépve redukálódnak. A képződő vas(II)- vagy réz(I)ionok a peptidek specifikus fémkötőhelyeihez koordinálódva hidrogén-peroxiddal reagálnak, aminek eredményeként hidroxilgyök képződik. A hidroxilgyök képes oxidálni a fémionnal szomszédos fehérjeoldalláncot, ez a folyamat függ az oldallánc minőségétől. Ennek eredményeként a fehérje, illetve a peptid fémkötőhelye oxidálódik, de maga a peptidkötés hasadása is bekövetkezhet. Ezt a folyamatot nagymértékben befolyásolja az aminosavszekvencia is.<sup>2</sup>

Az egyik lehetséges terápiás útvonal a neurodegeneratív elváltozások bekövetkezése ellen, illetve azok visszaszorítására olyan hatóanyagok kifejlesztése, amelyek szerkezeti tulajdonságaik révén szelektíven csökkentik a fémion-fehérje kölcsönhatást anélkül, hogy maguk a molekulák vagy fémkomplexeik az emberi szervezetre káros hatással lennének. Ezen gyógyászati terápiára megfelelő MPACs (*metal-protein attenuating compounds*) fémion-fehérje kölcsönhatást gyengítő molekulák és kelátormolekulák tervezése, szintetizálása és tanulmányozása már több évtizede elkezdődött.<sup>3</sup> Habár néhányan a tudományos körökben kételkedve tekintenek ezen kutatási irány fenntarthatóságára,<sup>4</sup> sokak számára még a mai napig is aktuális feladat újabb, jobb tulajdonsággal rendelkező kelátormolekulák felkutatása és tanulmányozása.<sup>5,6</sup>

Épp ezért munkánk során vizsgáltuk a különböző védőmolekulák, mint a gyökfogóként ismert aszkorbinsav és a fémion-fehérje kölcsönhatást gyengítő

kismolekulák, - az aroil-hidrazon és szalán típusú vegyületek -, hatását. Elsődlegesen vizsgáltuk a natív fragmens modellpeptidjén keresztül a fémion-katalizált oxidációt befolyásoló tényezőket. Az oxidációs körülmények optimalizálása és az aminosav-szelektív oxidáció meghatározása mellett azt is vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolják a védőmolekulák az oxidáció lejárását. Tanulmányoztuk, hogy az említett vegyületcsoportok kompetícióba lépnek-e a réz(II)- és cink(II)ionokért, ezáltal védelmet nyújtva a peptidmodellek, illetve a fehérjék elváltozásával és az oxidációval szemben.

A fehérjék rossz vízoldhatósága miatt azok nehezen tanulmányozhatók, viszont az oldalláncukban különböző funkciós csoportokat tartalmazó peptidok jól modellezik a fehérjék koordinációs tulajdonságait, így a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban* elsődlegesen ezen peptidok koordinációs és oxidációs tulajdonságait vizsgáljuk. A dolgozatban a biológiai szempontból jelentős humán prion fehérje (103 – 112) peptid fragmens fémion-katalizált oxidációjára összpontosítottunk.

## **2. Irodalmi áttekintés**

### **2.1. Oxidatív stressz az élő szervezetben**

A sejten belül a pro-oxidáns és antioxidáns részecskék közötti egyensúly felborulását a pro-oxidáns vegyületek irányába oxidatív stressznek nevezzük. Az oxidatív stressz jellemzői a reaktív oxigén származékok (*ROS = reactive oxygen species*) mennyiségének jelentős növekedése, az elégtelen antioxidáns védekezés és a sejt redoxegyensúlyának nem megfelelő működése. Ez egyes biomolekulák megváltozásához vezet, ami meghatározza a fellépő betegséget is. Az oxidatív stresszt úgy is jellemezhetjük, mint a redox-jelátvitel és szabályozás zavara, illetve molekuláris károsodás.<sup>7</sup> Az egészséges emberi szervezetben a ROS a szerves peroxidok mitokondriális oxidatív metabolizmusa során, a sejtlegzés közben kis mennyiségben keletkeznek, és nélkülözhetetlenek az élethez.<sup>8</sup> Többek között szükségesek a sejt homeosztázis fenntartásához, a jelátvitelhez, a génexpresszióhoz, a receptorok aktiválásához, a patogén felismeréséhez és biztosítják a sejt életképességét, osztódását, szaporodását, migrációját és differenciálódását.<sup>9-12</sup> Tehát a ROS és a reaktív nitrogén részecskék (*RNS = reactive nitrogen species*) a sejt folyamatokat szabályozó enzimekben a reverzibilis redox változások útján jelző molekulákként viselkednek.<sup>13-15</sup>

A legjelentősebb nagy reaktivitású ROS és RNS gyökök vagy molekulák között szerepel a hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a szuperoxid gyökion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), a hidroxilgyök ( $\cdot\text{OH}$ ), a nitrogén-oxid gyök ( $\text{NO}\cdot$ ) és a peroxinitrition ( $\text{ONNO}^-$ ).<sup>16</sup> Az exogén oxidáns források közé sorolhatók továbbá a környezeti szennyezők. Ezek alatt értjük a dohányfüstöt, a mérgeanyagokat, a nehézfémeket, a különböző kémiai eredetű és hatású drogokat, a stresszt, az alkoholt, az allergiát, az elektromágneses sugárzást és az ionizáló sugárzást, mint például az ultraibolya, a látható és az infravörös-A sugárzást, illetve a táplálkozási szokások is befolyásolják az oxidatív stresszt.<sup>17-19</sup> A ROS és RNS mennyiségét az enzimek és kis molekulatömegű elektron donor és antioxidáns vegyületek alacsony szinten tudják tartani, de ezen részecskéket nem lehet teljesen eltávolítani a szervezetből, ugyanis kis mennyiségben létfontosságúak, viszont nagy feleslegben felhalmozódva oxidatív stresszként fejtik ki káros hatásukat.<sup>20</sup>

Az antioxidánsoknak több típusát különböztethetjük meg. Elsődleges antioxidánsoknak nevezzük a láncszakító antioxidánsokat. Ezek gyökfogóként működnek, és a reaktív gyököket stabilabb gyökké, anionokká vagy molekulává alakítják át. A másodlagos antioxidánsok kioltják a szinglett oxigént, lebontják a peroxidokat nemgyökös részecskékre, a pro-oxidáns fémionokkal kelátot képeznek, inhibítják az oxidatív enzimeket (pl. lipooxygenáz) vagy elnyelik az UV-sugárzást. A másodlagos antioxidánsok elsődleges antioxidánsokkal együtt szinergikus hatást mutathatnak. Savas környezetet kialakítva stabilizálják az elsődleges antioxidánsokat, vagy éppen regenerálják azokat hidrogéndonálással.<sup>21</sup>

Az antioxidánsok közül két nagy csoportot különböztethetünk meg: az enzimatisz antioxidánsokat (mint pl. a szuperoxid-diszmutáz, a kataláz és a glutation-peroxidáz enzimek) és a nem-enzimatisz antioxidánsokat (aszorbinsav, glutation, húgysav, ferritin, karotenoidok, tokoferolok, flavonoidok).<sup>7</sup> A szuperoxid-diszmutáz (SOD) enzim két lépéses folyamatban diszproporcionál két szuperoxid-gyökiont egy oxigén és egy hidrogén-peroxid molekulává. Az aktív centrumban elhelyezkedő fémiontól függően négy fajta szuperoxid-diszmutázt különböztethetünk meg: MnSOD, FeSOD, NiSOD, Cu,ZnSOD. Az emberi szervezet számára a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz a legjelentősebb. Az enzim két alegységből áll, és mindkét alegység aktív centrumában megtalálható a Cu(II) - és Zn(II)-ion. A SOD enzim képes szelektíven a szuperoxid-gyökiont diszproporcióját katalizálni, úgynevezett ping-pong mechanizmusban. Néhány SOD esetében a redukált SOD  $\text{H}_2\text{O}_2$ -dal reakcióba lépve képes irreverzibilisen inaktiválódni. Ez a peroxidatív reakció Fenton-típusú reakció eredménye, melyben az aktív centrumban levő redukált fémion redukálja a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot, ezáltal hidroxilgyököt képezve. Ennek következtében

a reaktív gyök a közeli aminosavakkal reakcióba lép. Az eukariótákban levő Cu,ZnSOD és a legtöbb FeSOD gyors reakcióba lép a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal, míg a MnSOD és a prokarióta Cu,ZnSOD nem. A NiSOD esetében a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> szintén képes inhibitalni az enzimet, azonban e reakció ebben az esetben reverzibilisnek mondható, hiszen a NiSOD enzim SOD aktivitása képes helyreállni.<sup>22, 23</sup>

A másik fontos enzimátikus antioxidánsként a kataláz enzimet tartják számon, amely a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bomlását képes katalizálni. Az enzim több mint 500 aminosavból felépülő négy polipeptidláncból álló tetramer fehérje. Négy Fe(III)-ion tartalmú hem molekulát tartalmaz, és az itt található vas(III)ion reagál a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal kétlépes diszproporciós reakcióban miközben a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot lebontja két H<sub>2</sub>O és egy O<sub>2</sub> molekulává. Bizonyos körülmények között a kataláz képes peroxidatív reakcióra is. A kataláz mellett a fő celluláris H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal reagáló enzimek a tioredoxin, peroxiredoxin, glutaredoxin, SOD és az aszkorbát/glutation ciklus enzimek (APX, monodehidroaszkorbát-reduktáz, dehidroaszkorbát-reduktáz, glutation-reduktáz), melyek szabályozzák az oxidáns felhalmozódást és kompartment-specifikus módú jelátvitelt. Együtt ezen redox-rendszerek felelősek a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> átalakításáért, ami kritikus a celluláris redox-egyensúly és intracelluláris jelátvitel fenntartásában.<sup>24</sup>

Az enzimátikus vagy nemenzimátikus antioxidánsok négy módon nyújtanak védekezést a reaktív oxigén származékok ellen.

1) A preventív antioxidánsok visszaszorítják a reaktív részecskék képződését.

2) A gyökfogyó antioxidánsok visszaszorítják a reakciólánc iniciálását elektrononálás által. Ilyenek például a hidrofil antioxidánsok: az aszkorbinsav, a glutation, a húgysav, és a lipofil  $\alpha$ -tokoferol és ubikinol.

3) A helyreállító antioxidánsok a szabad reaktív részecskék által okozott sérülések megjelenése után lépnek működésbe. Sérült DNS-szálat, lipidet és fehérjét helyreállító enzimek alkotják ezt a csoportot. Ezen antioxidánsok képesek lebontani és eltávolítani a sérült fehérjét, lipidet és DNS-szálat, ezzel meggátolva a sejten belüli felhalmozódásukat. A DNS-helyreállító enzimek közé tartozik a plomeráz, a glikolázok és a nukleázok, valamint a proteolitikus enzimek (peptidázok, proteázok és proteinázok), amelyek az emlős sejtekben mind a mitokondriumban, mind a citoszolban megtalálhatók.

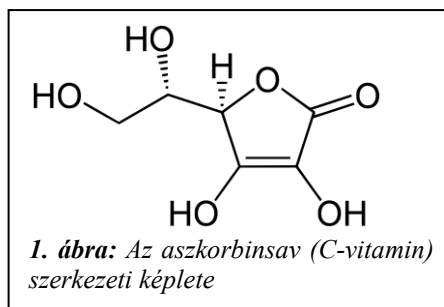
4) Az adaptációs mechanizmusra támaszkodó antioxidánsok megelőzik a szabad gyökök képződését vagy olyan reakciók lejátszódását, amelyekben szabad gyökök vesznek részt.<sup>7</sup>

A krónikus oxidatív stresszt alátámasztják a biomolekulákban bekövetkező poszt-transzlációs oxidatív módosítások: lipid-peroxidáció, fehérje karbonilezés, aldehid vagy keton karbonil-addukt képződés, nitrálás,

szulfoxidáció, DNS-károsodás, mint a szálszakadás, vagy a nukleobázis oxidációja. A fehérjék oxidatív támadása megváltoztatja azok konformációját, és ez a biokémiai működés veszteségéhez vezet. A lipidek peroxidációja telített és telítetlen karboniltermékeket eredményezhet, mint például a malondialdehidet és 4-hidroxi-2-nonenalt.<sup>25, 26</sup> A lipidből származó karbonilvegyületek nagy reaktivitású elektrofil molekulák, és képesek reagálni a nukleofil aminosavakkal.<sup>27-29</sup> A lipid-peroxidációból származó aldehidek és ketonok kölcsönhatásba léphetnek a fehérjékkel és nukleinsavakkal, ami kovalens addukt-képződéshez vezet. Ezen reakciók több mechanizmus szerint is lejátszódhatnak. A karbonil funkcióscsoportok attól függően, hogy milyen reakció megy végbe akár érintetlenek maradhatnak, ilyen eset a konjugált kettős kötésen keresztüli addíció is.<sup>30</sup> A fehérje karboniláció kifejezés olyan reakciót jelent, ami fehérjéhez kötött karbonilcsoportokat, mint például aldehid, keton és laktám képződését eredményezi.<sup>27, 31</sup> Ezen fehérjéhez kötött karbonilcsoportok különböző folyamatokat eredményezhetnek, elsődlegesen az aminosavak közvetlen oxidációját. Ilyen például a lizin  $\epsilon$ -aminocsoportjának oxidatív deaminizációja, ami aminoadipin szemialdehidet eredményez. Közvetlen fehérjemódosítás is végbe mehet, főleg lipidek vagy szénhidrogének oxidált termékeinek addíciójával. A legfontosabb ilyen típusú változások a lipid-peroxidációból származó  $\alpha,\beta$ -telítetlen karbonilvegyületek (például 4-hidroxi-2-nonenal) Michael-addíciója a cisztein vagy hisztidin aminosavakkal, vagy lizin és arginin aminosavak reakciója a lipid-peroxidációból vagy a glükóz autooxidációjából származó dikarbonilvegyületekkel.<sup>32-34</sup> Továbbá az arginin-, lizin-, prolin- és treonin oldalláncok karbonilezése intracelluláris fehérje keresztkötésekhez vezethet.<sup>35-37</sup> Mindezen poszt-transzlációs módosítások hosszú távon súlyos következményeket okozhatnak az életminőségben. Épp ezért az oxidatív stressz lefolyásának feltérképezése és megértése máig fontos téma a biokémiában.

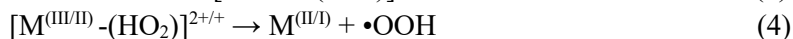
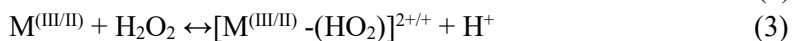
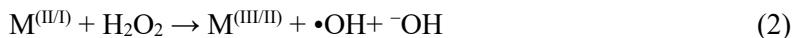
## 2.2. Az aszkorbinsav

Az aszkorbinsav, avagy a C-vitamin a vízoldható vitaminok és elsődleges antioxidánsok közé tartozik. Az emberek számára létfontosságú. Szerkezete az 1. ábrán látható. Legismertebb hiánybetegsége a skorbut. 1932-ben Szent-Györgyi Albert izolálta először, amiért 1937-ben az orvosi Nobel-díjjal jutalmazták. Szerepe van a szövetek



helyreállításában, a sebgyógyulásban, valamint a porc, a csontok és a fogak fenntartásában. Továbbá javítja a vasfelvételt és biztosítja a bőr, az ínak és inszalagok, illetve az erek működését. Kitűnő elektrondonor, ezáltal a gyököket stabil részecskékké képes átalakítani. Hatékony gyökfogóként viselkedik a reaktív oxigén és nitrogén részecskék ellen, mint például a szuperoxid-gyökanion, a hidroxilgyök, az alkoxigyök, a hidrogén-peroxid és a szinglett oxigén ellen. Semlegesíti a szabad gyököket, így védelmet nyújt a DNS, a fehérjék és a lipidek számára az oxidatív károsodással szemben. Megvédi a sejtkomponenseket a reaktív gyökök indukálta bomlástól. Annak ellenére, hogy elsődlegesen vizes fázisban van szerepe, képes regenerálni a tokoferol aktív antioxidáns formáját, ezáltal hozzájárul a lipid-védekezéshez. Elősegíti a kollagénszintézist és stabilizálja a kollagén harmadlagos szerkezetét. Inhibálja a karcinogén nitrózamin szintézisét és csökkenti egyes krónikus betegségek megjelenésének esélyét.

A reaktív oxigén részecskék ellen nyújtott védekezésének egyik fontos tényezője, hogy a reakció során képződő aszkorbilgyök-intermedier alacsonyabb potenciállal rendelkezik, mint a peroxil-, alkoxil- és alkilgyökök. Ez megmagyarázza, miért képes az aszkorbinsav hidrogéndonálással az oxidatív részecskéket kioltani, miközben ő maga dehidroaszkorbáttá oxidálódik. Az aszkorbinsav elektrondonorként képes fémionokat is redukálni, mint például a Fe(III)-iont Fe(II)-ionná, illetve a Cu(II)-iont Cu(I)-ionná. Ezen redukációs folyamat következtében Fenton-rendszer alakul ki, ami indukálja a szabad gyökök képződését a (1) – (4) egyenletek szerint.<sup>38, 39</sup> Épp ezért az aszkorbinsav pro-oxidáns hatással is rendelkezik.



### **2.3. Az aminosavak és fehérjék oxidációja**

A fehérjék a sejtekben, plazmában és a szövetekben nagy gyakorisággal fordulnak elő, és a nagy reakcióképességük miatt fontos célpontjai az oxidáló ágenseknek. A fehérjék kölcsönhatása a reaktív oxigén részecskékkel az aminosavoldalláncok vagy a fehérjelánc oxidációját, a karbonilcsoportból származó vegyületek képződését és fehérje-fehérje keresztkapcsolódást eredményezhet.<sup>40</sup> A fehérjék oxidációja során a nagy reaktivitású gyökök

támadásakor több oldallánc és a peptidváz károsodása is bekövetkezhet. Az aminosavak minőségétől és térbeli elhelyezkedésüktől függően a kevésbé reaktív részecskék támadásakor nagyobb szelektivitás érhető el az oxidációban. A módosulás nagyobb oldallánc-hidrofilitást, oldallánc- és fehérjeváz-hasadást, kovalens keresztkapcsolást okozhat, illetve hidrofób kölcsönhatások következtében aggregációt, a fehérje kitekeredését, megváltozott konformációt és más biomolekulákkal megváltozott kölcsönhatást eredményez.<sup>41</sup>

A biomolekulák károsodásának mértéke több tényezőtől függ. Ezek a target molekulák koncentrációja, az oxidálószer és a target molekula közötti reakció reakciósebessége, a biomolekula és az oxidálószer egymáshoz viszonyított helye, a másodlagos károsító események (beleértve a láncreakciók előfordulását), az intra- és intermolekuláris transzferreakciók, valamint a helyreállító és oxidálószer-megkötő reakciók lehetősége és mértéke. Ezen különböző tényezők relatív hozzájárulását nem lehet könnyen általánosítani és rangsorolni, azonban az első kettő, vagyis a target molekula koncentrációja és az oxidálószer és a molekula reakciójának reakciósebessége egyértelműen kritikus fontosságú. Mivel a legtöbb biológiai rendszerben a vízen kívül a fehérjék a fő komponensek, - a plazmában megközelítőleg 1–3 mM, a sejtekben körülbelül 5–10 mM koncentrációban lelhetők fel - így ezek a legvalószínűbb célpontjai az oxidálószereknek.<sup>42</sup>

A reaktív gyökök az aminosavakkal, peptidekkel és fehérjékkel képesek hidrogénelvonásra, elektrontranszferre, addíciós, fragmentációs, átrendeződéses, dimerizációs, diszproporciós és szubsztitúciós reakcióba lépni.<sup>41</sup> A fehérjéket alkotó 20 esszenciális aminosav szerkezeti sokfélesége, valamint a peptidváz, mint potenciális reakciópartner jelenléte következtében a fehérjéken számos reaktív gyök alakulhat ki. A szabad aminosavakkal is előfordulhat oxidatív reakció, de mivel a fehérjékhez képest ezek sokkal kisebb mennyiségben vannak jelen a szervezetben, így ezen reakciók kevésbé gyakoriak. A fehérje fémion-katalizált oxidáción is keresztülmehet átmenetifémionok jelenlétében, mint például a Fe(II)- és Cu(I)-ionokkal. Ezen fémionok a fehérje fémionkötőhelyéhez kötődnek, majd hidrogén-peroxiddal reagálva hidroxilgyököt képeznek, ami képes megtámadni a fémionkötőhelyhez közeli aminosavakat.<sup>2</sup> Ennek eredményeként a fehérjék oxidatív sérülése megváltoztathatja azok fizikai vagy kémiai tulajdonságait, mint az oldhatóságot, a szerkezetet és enzimaktivitást.<sup>43</sup>

A fehérjeoxidáció révén képződött termékek mennyiségének növekedését számos különböző betegség esetén tapasztalták, többek között az Alzheimer-kórnál, cukorbetegségnél és a szürkehályog esetében is.<sup>44-46</sup>

Az, hogy milyen gyök keletkezik a fehérjéken a támadó gyök reaktivitásától és természetétől függ. Az elektrofilgyökök, mint a hidroxilgyök és

más oxigéntartalmú gyökök, például az alkoxi- és a peroxilgyök, sokkal gyakoribbak *in vivo* a nukleofilgyököknél, illetve ezen gyökök elsődlegesen a molekula elektronban gazdag helyeit oxidálják. Az egyik fő útvonal a hidrogénatom elvonása a C-H vagy a cisztein esetében az S-H kötésről. Az aromás aminosavoldallancok esetében főleg a gyűrűn játszódik le addíció, míg a metionin és cisztein esetében a kénatomon képződik az addukt. A fehérjeváz oxidációjakor elsőként az aminosav és a reaktív gyök lép kölcsönhatásba egymással, ami egy hidrogénatom eltávolítását eredményezi az aminosav  $\alpha$ -szénatomjáról miközben egy szénközpontú gyök képződik. Ennek következtében egy O<sub>2</sub> addíciójával alkoxi-peroxil-gyök jön létre. Ekkor a szénközpontú gyök egy másik szénközpontú gyökkel reakcióba lépve, oxigén hiányában, fehérje-fehérje keresztkötést tud létesíteni. Egy másik reakció a fehérjék karbonilációja. Ez irreverzibilis, és a fehérjeaktivitás elvesztését okozhatja a megváltozott peptidlánc-szerkezet miatt.<sup>47</sup> A karbonilszármazékokat gyakran használják biomarkerként a fehérjék oxidatív károsodásának meghatározására. Tipikus reakciókörülmények esetén a hidroxilgyök elsődlegesen a fehérjék aminosavoldallancait támadja meg, mivel az  $\alpha$ -szénatom támadása sztérikusan gátolt. Azonban a fehérjelánc hasadása is bekövetkezhet a peptidváz  $\alpha$ -szénatomjának közvetlen támadásakor, illetve az oldalláncon levő reaktív gyök vándorlásakor.

A szabad aminosavak esetében az oldallancok károsodása jellemzőbb, mint az  $\alpha$ -szénatomon bekövetkező változás.<sup>48</sup> Az aminocsoport befolyása a távolsággal csökken, így a nagyobb oldalláncú aminosavaknál, mint a valin, a leucin és az izoleucin a károsodás a távolabb elhelyezkedő oldallancok felé irányul, amit az elérhető C-H kötések száma és a kialakuló szénközpontú gyök stabilitása is befolyásol.<sup>41, 49</sup> A támadás szelektivitása továbbá függ a funkciócsoportoktól, amelyek képesek stabilizálni vagy destabilizálni a képződő gyököket, vagyis a hidrogénatom-elvonás kedvezően a szerin és a treonin hidroxilcsoportok közelében fordul elő.<sup>50</sup> Ezzel ellentétben a lizin protonált aminocsoportú oldalláncán a C-2 pozícióban kedvezőtlen a támadás, a hidrogénatom-elvonás a C-4 és C-5 atomokat részesíti előnyben.<sup>51, 52</sup> Minden esetben ezen reakciók szénatomközpontú gyökökhöz vezetnek. Az addíciós reakciók tipikusan gyorsabban mennek végbe, mint a hidrogénatom elvonásával járó reakciók. A fenil, tirozin, triptofán és hisztidin aminosavak, illetve a kénatomot tartalmazó metionin esetében elsősorban ezen addíciós reakciók jellemzők.<sup>41, 42</sup>

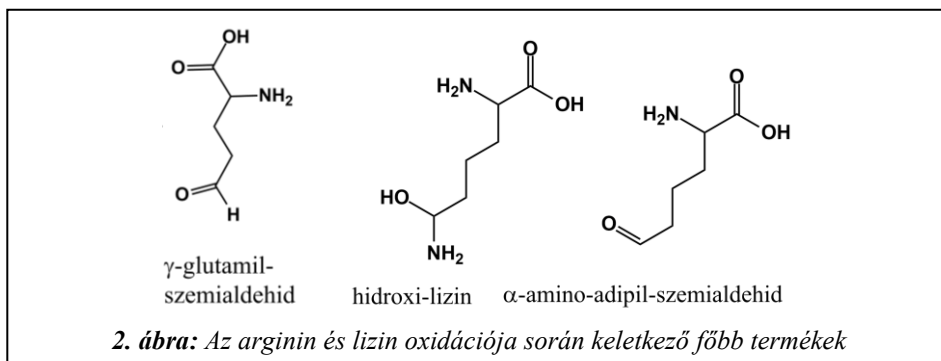
Alifás aminosavak esetén, mint például a valin, a leucin és az aszparagin, gyakori folyamat az alkoxigyökök  $\beta$ -hasítása. A reakció során formaldehid,

aceton, izobutiraldehid (2-metil-propanal) és glioxilsav karbonilvegyületek képződhetnek.<sup>53</sup> Az aszparagin, glutamin, treonin, illetve szerin aminosavak oxidációja szintén kevésbé jelentős, a hidroxilgyökkel szemben kis reaktivitást mutatnak. Míg a prolin oldallánc oxidációja bizonyítottan a peptidváz hasadását okozhatja.<sup>54</sup>

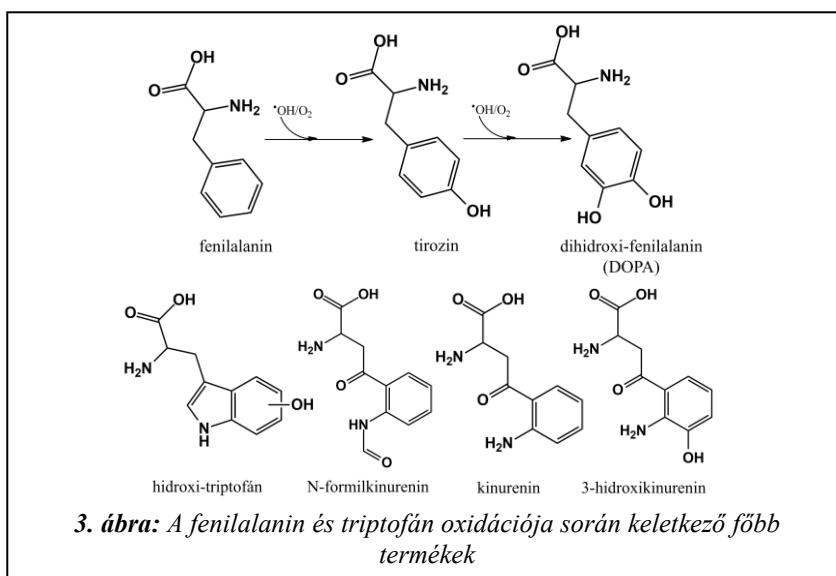
A fehérje- vagy peptid-alkoxygyökök képződése a molekula C-terminális részének dekarboxilációját eredményezheti. Hasonlóan a savas karakterű oldallánccal rendelkező aminosavakhoz, mint a glutaminsav és az aszparaginsav, a karboxilcsoport melletti szénatomoknál hidrogénatom-elvonás következtében az oldallánc dekarboxilációja következhet be, amely során a megfelelő karbonilvegyületek képződhetnek, illetve előfordulhat a peptidváz hasadása is.<sup>55</sup>

56

A bázikus aminosavoldallánccal rendelkező aminosavak oxidációját is tanulmányozták. Az arginin oxidációja során egy karakterisztikus oxidációs termék képződését mutatták ki. Az oxidáció során az ESI-MS spektrumon egy 43 Da-os vesztes figyelhető meg, ami az oxidált termék guanidino-csoportjának elvesztéséhez és az ezt követő  $\gamma$ -glutamil-szemialdehid képződéséhez köthető. Míg a lizin aminosavoldallancának fémion-katalizált vagy  $\gamma$ -radiolízissel végbemenő oxidációjakor a hidroxi-lizin és  $\alpha$ -amino-adipil-szemialdehid keletkezéséről számoltak be.<sup>51, 57, 58</sup> Példák a keletkező termékek szerkezetére a 2. ábrán láthatók. Alifás aminok esetében, mint ahogy a lizinnél is, vizes oldatban a hidroxilgyökkel végbemenő reakció erősen pH függő. Bázikus körülmények között az aminocsoport és az alifás amin  $\alpha$ -szénatomja a hidroxilgyökök elsődleges célpontjai a támadáskor, aminek következtében hidrogénelvonás történik. Ezzel ellentétben savas körülmények között az aminocsoport protonált, ezért az erős induktív effektus miatt csökken a mellette levő szénatom elektronsűrűsége, ami kedvezőtlenebbé teszi a hidroxilgyök okozta elektrofil sajátságú hidrogén elvonását, épp ezért inkább a távolabbi szénatomokon következik be reakció.<sup>48</sup>

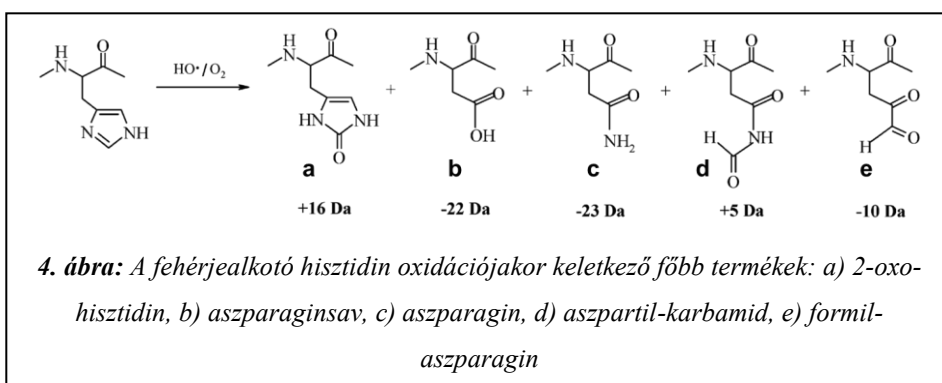


Az aromás oldalláncú aminosavak oxidációjánál a hidroxilgyök elsődlegesen az aromás gyűrűt támadja. ESI-MS méréseknél egy vagy több +16 Da-os tömegű termék keletkezését detektálták, ami oxigénaddíciónak felel meg. A képződő termékek szerkezetét a 3. ábra mutatja be. A fenilalanin esetében az oxidáció helyét tekintve nem szelektív. Az oxidációs körülményektől függően a fenilalaninból a tirozin különböző sztereoizomerei képződnek, illetve a többszörös hidroxiláció dihidroxi-fenilalanin (DOPA) vagy akár trihidroxi-fenilalanin (TOPA) képződését eredményezheti. A tirozin esetében az aromás gyűrűn a már meglévő hidroxilcsoport miatt szelektivebb az oxidáció. A fenilalaninhoz hasonló termékek képződnek, továbbá a termékek képesek egymással keresztkötést kialakítani a hidroxilcsoporton keresztül. Az előbb említett aminosavakkal szemben a triptofán oxidációja kevésbé feltérképezett és annál összetettebb. Szarvasmarha  $\alpha$ -krisztalin fehérjén elvégzett fémion-katalizált oxidációs kísérletek során hidroxitriptofán, N-formilkinurenin, kinurenin és 3-hidroxi-kinurenin képződését figyelték meg.<sup>59, 60</sup>



A hisztidin az egyik legjelentősebb aminosav a fehérjék és enzimek működése tekintetében. Hajlamos az oxidációra, mely során összetett termékek keletkezhetnek. A hisztidin oxidációja főleg fémion-katalizált oxidáció és II-es típusú fotooxidáció következtében megy végbe.<sup>61</sup> A hisztidin és az aminosavat tartalmazó peptidok oxidációját korábban többet is vizsgálták, elsődlegesen tandem tömegspektrometriával. A vizsgálatok során számos karakterisztikus terméket megfigyeltek, köztük a -22 Da veszteséssel járó aszparaginsav képződését a hisztidin átalakulása során, illetve egy +16 Da-os részecske megjelenését, ami a

2-oxo-hisztidin képződéséhez köthető, és megegyezik a hisztidin fémion-katalizált oxidációjának tanulmányozásakor megfigyelt elsődleges termékkel.<sup>60</sup> A hisztidin oxidációjának összetettségét bizonyítja, hogy még nem mindegyik oxidált termékét azonosították. A fő oxidált termékek a 2-oxo-hisztidin, az aszparagin és az aszparaginsav.<sup>54</sup> A hidroxilgyök kezdetben az imidazolgyűrű 2-es, 4-es vagy 5-ös pozíciójú szénatomját támadja meg, és egy stabilizált alliltípusú gyök képződik. Ezen gyökök képesek az oxigén megkötésére és további reakción mennek keresztül, ami számos különböző terméket eredményezhet a reakció körülményeitől függően.<sup>48</sup> A irodalomban javasolt fő termékek a hisztidin oxidációjakor a 4. ábrán láthatók.<sup>62</sup>

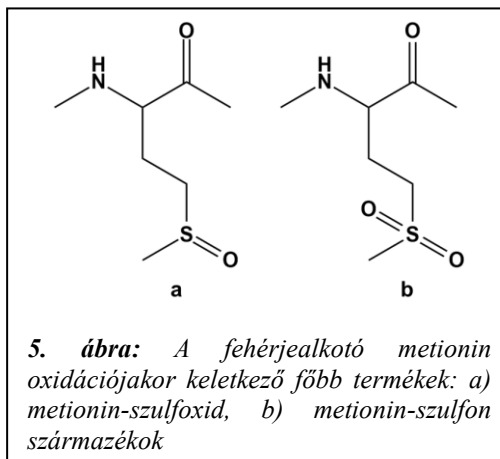


A hisztidin oxidációjának bekövetkezése és a képződő termékek jelentősen függenek a reakció körülményektől, azon belül is a pH-tól.<sup>61</sup> A fehérjékben és peptidekben bekövetkező oxidációját többen is igazolták, többek között a glutamin-szintetáz,<sup>63</sup> a humán növekedési hormon,<sup>64</sup> és a szarvasmarha Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim esetében.<sup>65</sup> Az amiloid- $\beta$  esetében megfigyelték, hogy a hidroxilgyök főleg az N-terminális aminos csoportot és a különböző hisztidin aminosavakat támadja meg, ami a rézion koordinációs szférájának módosulását okozza.<sup>66</sup> Korábban kimutatták, hogy a Cu(II)/aszorbát rendszerben oxidált rekombináns SHa(29 – 231) prion fehérjében a hisztidin oxidációja jellemzőbb volt, mint a metionin aminosav oxidációja, továbbá a 2-oxo-hisztidin képződése mellett a fehérje jelentős mértékű aggregációját is megfigyelték.<sup>67</sup>

A kétatomot tartalmazó cisztein és metionin a legreaktívabb aminosavak az oxidáció szempontjából. A cisztein az egyik legjelentősebb aminosav a fehérjék és enzimek működésében, valamint a fémionkötések kialakításában. Részt vesz számos enzim katalitikus aktivitásában, illetve a fehérjeszerkezetben fontos diszulfidhidak építésében. Könnyen oxidálódik. A szabad aminosav oxidációjakor összetett termékek keletkeznek, köztük szulfonsav (RSO<sub>3</sub>H),

szulfinsav ( $\text{RSO}_2\text{H}$ ), diszulfid ( $\text{RSSR}'$ ), illetve a szulfanilcsoport vesztésével a cisztein dehidroalaninná és szerinné képes átalakulni.<sup>62</sup> A fehérjékben a cisztein oxidációjakor kezdeti lépésként a reaktív oxigén származékok hidrogénelvonással  $\text{RS}\cdot$  gyököt alakítanak ki.<sup>68, 69</sup> Ezt két, egymással versengő reakció követi a molekuláris oxigén vagy tiolát részvételével, amelyben az oxigén és tiol koncentrációjától függően tiil-peroxil gyök ( $\text{RSOO}\cdot$ ) vagy konjugált diszulfidgyökanion képződik.<sup>70, 71</sup> A tiil-peroxil gyök a reakciók során a szulfénsav, szulfinsav, szulfonsav, diszulfid és szerin termékek prekursora.<sup>68</sup>

A kéntartalmú metionin a hidrofób aminosavak közé tartozik, épp ezért általában a fehérje szerkezetét tekintve a hidrofób belső részen található. A kénatom miatt az egyik legérzékenyebb aminosavnak számít az oxidáció szempontjából. Elsődlegesen metionin-szulfoxid a képződő termék, ami tovább oxidálható metionin-szulfonná. A metionin oxidációkor keletkező termékek



szerkezeti képlete az 5. ábrán látható. A reakció kezdetén a metionin kénatomján a hidroxilgyök addíciója hidroxil-szulfuranylgyök képződését okozza, ami valószínűleg egy  $\text{O}_2$ -molekula elvonásával, majd ezt követően egy hidroxilgyök vesztésével a metionin-szulfoxid képződéséhez vezet.<sup>48</sup> A metionin-szulfoxid erősebb körülmények között (pl. oxon) tovább oxidálódhat metionin-szulfonná. Metionint tartalmazó peptidok és fehérjék oxidációját tömegspektrometriával vizsgálva egy karakterisztikus 32 Da-os veszteséget figyeltek meg, mely egy aldehidtermék képződése következtében a  $\text{CH}_3\text{SOO}\cdot$ -molekula vesztéséhez köthető.

Az oxidatív stressz jelenlétét három különböző módon lehet vizsgálni: (1) ROS közvetlen mérése, (2) a biomolekulákban keletkező károsodás mérése, illetve (3) az antioxidáns szint detektálása.<sup>72</sup> Közvetlenül nehéz mérni a reaktív oxigén származékok szintjét, mivel számos részecske nagyon instabil. Emiatt a kutatások során a fehérjék, DNS, RNS, lipidek vagy más biomolekulákban bekövetkező károsodást mérik.<sup>73</sup> Annak ellenére, hogy ez egy közvetett módszer, sok oxidatív stresszmarker nagyon stabil, és így sokkal megbízhatóbb módszernek minősül. Egy másik megoldás az oxidatív stressz mérésére a sejtekben az antioxidáns enzimek és más redoxmolekulák szintjének mérése. Elérhetőek olyan

mérési módszerek, amelyek specifikus antioxidáns enzimek, mint például a kataláz vagy a szuperoxid-diszmutáz aktivitását mérik.<sup>72</sup>

A fehérjék oxidatív károsodása következtében a fehérjealkotó aminosavak változását különböző analitikai módszerekkel határozzák meg. Ezen módszerek közé tartozik a HPLC, a fluorometria és az LC-MS.<sup>74</sup> Egy másik oxidatív stressz-biomarker a kis molekulatömegű tiolok oxidációja. Például a glutation (GSH) több terméké is oxidálódhat, mint például glutation-diszulfidá (GSSG), vegyes diszulfidá vagy glutation-szulfonamidá. A glutation-reduktázok a diszulfidokat glutationná redukálják. Ez a változás spektrofotometriásan követhető.<sup>75</sup> Az aminosavak változásának meghatározásán kívül, a fehérjekarbonilok, a diszulfidok (-S-S-), a szulfínsav (-SO<sub>2</sub>H) és a szulfonsav (-SO<sub>3</sub>H) a leggyakrabban használt biomarkerek között szerepelnek a fehérjék oxidatív károsodásának meghatározására.<sup>76</sup>

Az oxidáció okozta fehérjemódosítás mennyiségi meghatározását az aminosavak vesztésével mérhetjük. Az instabil intermedierek képződése és a stabil termékek keletkezése miatt ezt leggyakrabban HPLC-MS, GC-MS kapcsolt technikákkal és Western blot/ELISA teszttel végzik.<sup>74</sup>

## 2.4. A prion betegség és a prion fehérje

A prion betegségek jelenleg gyógyíthatatlan, halálos kimenetelű, ritka idegrendszeri megbetegedések, melyek az emberre és az állatokra is veszélyt jelentenek. Ezen neurodegeneratív rendellenességeket általánosan fertőző szivacsos agyvelőgyulladásnak nevezik (TSE = *transmissible spongiform encephalopathy*), viszont a megbetegedés, illetve a fertőzés módja alapján több típusa is létezik. A juhok és kecskék esetében a betegséget surlókornak, a szarvasmarháknál a betegséget kergemarhakórnak vagy szivacsos agyvelőgyulladásnak nevezik (BSE = *bovine spongiform encephalopathy*). Az embereknél fellépő kór kialakulása és típusa alapján többféle prion betegséget különböztethetünk meg, többek között a kuru betegséget, a Creutzfeldt-Jakob-kórt (CJD = Creutzfeldt-Jakob disease), a Gerstmann-Straussler-Scheinker szindrómát (GSS = *Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome*) és a fatális familiáris inszomniát (FFI = *fatal familial insomnia*).<sup>77</sup> Elsőként a kuru betegséget fedezték fel 1957-ben Új-Guineában.<sup>78</sup>

A fertőzés oka egyetlen fehérjének, a celluláris prion fehérjének (PrP<sup>C</sup>) a rendellenes szerkezetváltozása (PrP<sup>Sc</sup> = *prion protein scrapie*) és az ezt követő aggregációja, amely amiloid plakkok kialakulását okozza. Az amiloid plakkok lerakódása az agyban és a gerincvelőben sejthalálhoz és szövetkárosodáshoz

vezet.<sup>79</sup> A celluláris prion fehérje egy sejtmembránhoz kötött glikoprotein. Számos szervben jelen van, de különösen gyakori a központi idegrendszerben, ahol a szinaptikus membránokhoz kötődik. Minden emlős szervezetében a fehérje egy glikozil-foszfátidil-inozitol (GPI)-horgonyon keresztül kötődik a gerincvelő és az agy gliasejtjeihez.<sup>80</sup> A prion betegségénél a fehérje aggregációs folyamatának kezdete és terjedése különböző módon mehet végbe. A sporadikus Creutzfeldt-Jakob-kór (cCJD) esetében az endogén módon expresszáldott prion fehérje spontán szerkezetátalakuláson és aggregáción megy keresztül, míg az öröklődő prion betegségek esetében, mint amilyen a fatális familiáris inszomnia (FFI), a betegséggel társított fehérjemutációk segítik elő az aggregációt. A fertőzéssel elkapott prion betegségek esetén, mint például a variáns Creutzfeldt-Jakob-kór (vCJD), a súrlós prion fehérje a táplálkozás által vagy egyéb külső úton keresztül iniciálja a normál prion fehérje aggregációs kaszkádját.<sup>81-83</sup>

A prion betegségek súlyos kognitív és motorikus funkciók károsodásához vezetnek. Az idegrendszer működésében játszott szerepe a PrP<sup>C</sup> fehérjének még nem teljesen ismert, de legnagyobb mennyiségben az agyban expresszáldódik, ezért a fehérje csökkenése jelentős idegrendszeri változásokat okozhat.<sup>84</sup> A betegségek fő jellemzője a súlyos idegsejtvesztés, melyhez további tünetek társulnak, és ez mind a központi idegrendszer (CNS) előrehaladott szivacsos degenerációját eredményezi.<sup>85</sup>

A prion fehérjék fertőző patogének, melyek molekulalakjukban tárolják az információt, amit képesek egyik molekuláról átadni egy másiknak. A fertőző PrP<sup>Sc</sup> ágensről végzett vizsgálatok, illetve korlátozott számú emberi prionon elvégzett kísérletek azt mutatják, hogy ezen patogének olyan kezeléseknél is ellenállnak, melyek inaktíválják a nukleinsavakat és vírusokat, mint például az alkohol, a formalin, az ionizáló sugárzás, a proteázok és nukleázok.<sup>86</sup> Azonban inaktíválhatók fehérjék működését zavaró kezeléssel, például fenollal, detergensekkel és extrém pH-körülmények alkalmazásával.<sup>87</sup>

A celluláris prion fehérjét a PRNP gén kódolja, és körülbelül 250 aminosav építi fel. A sejtmembránhoz a C-terminális rész irányából kapcsolódik a glikozil-foszfátidil-inozitol (GPI) horgonyon keresztül. A fehérje negyedleges szerkezete egy hosszú, rugalmas, rendezetlen N-terminális részből áll, amely a 23-as és 124-es aminosavak közötti tartományt foglalja magában, és egy globuláris, rendezett C-terminális részből. A C-terminális rész három  $\alpha$ -hélixet tartalmaz a (144 – 154), a (175 – 193) és a (200 – 219) aminosav-tartományokban, valamint két rövid antiparallel állású  $\beta$ -redőt, melyek a 128-tól 131-ig és 161-től 164-ig található aminosavaknál helyezkednek el.<sup>88, 89</sup> A két rövid antiparallel  $\beta$ -redő térben az első  $\alpha$ -hélix két oldalán helyezkedik el, így azt oldalról közre veszik és

megtámasztják.<sup>90, 91</sup> Emellett a fehérje tartalmaz egy metastabilis  $\beta$ -redős hajlammal rendelkező aldóment a (113 – 120) közötti aminosavrégióánál.<sup>92</sup> A fehérje fő fémionkötőhelye az N-terminális részen található négy úgynevezett oktarepeat tartomány a 61-es és 91-es aminosavszekvenciánál. Az oktarepeat tartomány a négyszer ismétlődő -PHGGGWGQ- peptid egységből áll, és az ezen szegmensekben található hisztidinek szolgálnak a fehérje fő fémionkötőhelyeként. Minden egyes oktarepeat régióban található hisztidin képes egy réz(II)ion megkötésére.<sup>93</sup> Továbbá a fehérje (90 – 111) aminosavszekvenciájában található még a His96 és His111, melyeket a prion fehérje oktarepeat régió kívüli, további két réz(II)ion kötőhelyeként tartanak számon. Az oktarepeat tartomány közelében található a (113 – 120) aminosavszekvenciánál az -AGAAAAGA- palindromikus motívum, melyről ismert, hogy képes a PrP<sup>C</sup> szerkezetátalakulását iniciálni. A fehérje C-terminális részén található egy diszulfidhíd is, amely a Cys179 és Cys214 aminosavakat köti össze, illetve a második és harmadik  $\alpha$ -hélixet.<sup>88, 89</sup> A fehérje szerkezetének tanulmányozásakor kimutatták, hogy a hajlékony N-terminális tartomány és a globuláris C-terminális rész között harmadlagos kölcsönhatás jön létre, amikor a PrP<sup>C</sup> réz(II)ionhoz vagy cink(II)ionhoz kötődik az oktarepeat tartományon keresztül.<sup>94</sup> Az N- és C-terminális közötti szerkezeti korrelációt az oktarepeat tartományon kívüli régió közvetíti, ami horgonyként szolgál a fehérje két része között.<sup>95</sup> A fehérjében továbbá két glikolizációs szakasz is található, melyeket diverz N-összekötött glikánok módosítanak.<sup>96</sup>

A prion réz(II)ionokhoz történő koordinációját már széles körben tanulmányozták és összefoglalták.<sup>97-99</sup> A réz(II)ion kötődése az oktarepeat tartományhoz három különböző koordinációs módon jöhet létre a réz(II)ion-koncentrációtól, illetve a pH-tól függően. Kis réz(II)ion-prion arány esetén a fémion három vagy négy hisztidinhez kötődik. Nagyszámú fémion-koordinációnál az oktarepeat tartományon belül minden hisztidin egy réz(II)ionhoz koordinálódik az imidazoliumcsoporton keresztül. További réz(II)ion megkötésére képes még az oktarepeat tartományon kívüli His96 és His111 is.<sup>100-104</sup> Kutatási eredmények alapján a réz(II)ion kötéséhez szükséges legrövidebb szakasz a (92 – 96) -GGGTH- aminosavszekvenciájú peptid. Fiziológias körülmények között a képződő réz(II)-komplexek koordinációs módja függ a pH-tól. A pH-tól függően az ekvatoriális geometriájú részecskék a hisztidin imidazolcsoportján, két amidnitrogénen és a peptidkötésen található egyik karbonilcsoport oxigénjén keresztül vagy még egy további amidnitrogén koordinációjával képződnek,  $[N_{im}, N^-, N^-, O]$  vagy  $[N_{im}, N^-, N^-, N^-]$  koordinációs módot kialakítva.<sup>103, 105</sup> A His111-nél a His96-hoz hasonló

koordinációs módok figyelhetők meg semleges pH-n, ahogy ezt a HuPrP (106 – 115)-KTNMKHMAGA- peptid fragmens tanulmányozásakor szerkezetvizsgálati módszerekkel is kimutatták.<sup>105</sup> Újabb kutatási eredmények alapján szerkezetvizsgálati módszerekkel két modellt javasolnak a réz(II)ion oktarepeat tartományon kívüli koordinációjára. A két modell közül az 1-es típusú koordináció úgynevezett „zárt” konformációt mutat. Az 1-es típusú koordinációban a réz(II)ion a 95-ös szerin, a 98-as glutamin, a 109-es metionin és a 111-es hisztidin aminosavdallancokhoz kötődik. Ez a modell a TSE-rezisztens részecskékkel hozható kapcsolatba, valószínűleg az oktarepeat kívüli régió nagyobb stabilitása miatt. A 2-es típusú réz(II)ion koordináció esetén egy vízmolekula lép be a koordinációs szférába, kizorítva ezzel a 95-ös szerint, így ez egy kevésbé rendezett és az oldószerhatásnak jobban kitett oktarepeat tartományon kívüli koordinációhoz vezet. A közlemény szerint a 2-es típus esetén az oktarepeat régióon kívüli nyitottabb konformáció sokkal hajlékonyabbá teszi az N-terminális részt, és a PrP<sup>C</sup> fehérje hajlamosabb lesz a kóros PrP<sup>Sc</sup> átalakuláshoz köthető szerkezeti átalakulásra.<sup>106</sup> Nemrégiben felfedezték, hogy a prion fehérje N- és C-terminális doménje között cisz kölcsönhatás van, aminek a megzavarása neurotoxicitáshoz vezet.<sup>94, 107, 108</sup> Elektron paramágneses rezonancia (EPR) szerkezetvizsgálati módszerrel igazolták, hogy az N-terminális és C-terminális domén közötti cisz kölcsönhatást a réz(II)ion stabilizálja. Újabb kutatások alapján a réz(II)ion a C-terminális részen levő His140 és His177 aminosavakhoz is képes kötődni. Arra a megállapításra jutottak, hogy a cisz kölcsönhatás stabilizálásában részt vevő C-terminális hisztidin nem axiálisan kötődik az ötödik koordinációs helyhez, hanem az egyik ekvatoriálisan elhelyezkedő N-terminális hisztidint szorítja ki.<sup>109</sup>

Tanulmányozták a fehérje patogén mutációinak hatását az oktarepeat tartományon kívüli réz(II)ion megkötésre és megállapították, hogy a megváltozott koordináció elősegíti *in vitro*, illetve sejtmódellekben a prion rendellenes szerkezetátalakulását.<sup>110, 111</sup> Továbbá megfigyelték, hogy a H96Y mutáció megváltoztatja a réz(II)ion koordinációját, és ez idegsejt-tenyésztett sejtekben a kóros PrP<sup>Sc</sup> fehérjéhez hasonló szerkezet képződéséhez vezet.<sup>111</sup> A patogén mutánsok vizsgálatával kimutatták, hogy a His96 és His111 aminosavaknak szerepe van a réz(II)ion kötésében. Továbbá a fémion betöltöttségének szerepe van ezen fehérjerész konformációjának meghatározásában azáltal, hogy lokális konformációváltozást idéz elő, illetve nagy valószínűséggel a C-terminális doménnel is kölcsönhatásban van.<sup>107</sup>

A normál, egészséges PrP<sup>C</sup> fehérje szerkezeti átalakulásának folyamata a kóros PrP<sup>Sc</sup> szerkezeti formává még tisztázatlan, de az ismert, hogy a kóros szerkezeti forma okozza a megbetegedést, illetve hogy a kóros PrP<sup>Sc</sup> templát

hatással kényszeríti a PrP<sup>C</sup> fehérjét a szerkezetváltozásra, így terjesztve a fertőzést. Ezen folyamatban a templátolt és a templált polipeptidek amino- és karbonilcsoportjai között létrejövő hidrogénkötések nagy valószínűséggel meghatározó szerepet játszanak,<sup>112, 113</sup> emellett számos környezeti tényező is hozzájárul a konformációváltozás indukálásához. Habár a kóros PrP<sup>Sc</sup> szerkezeti formának még nem sikerült feltérképezni a negyedleges szerkezetét, a jelenlegi bizonyítékok arra utalnak, hogy elsődlegesen a fehérje N-terminális részén történik a kóros forma kialakulásához vezető változás. Többek között az N-terminális rész (90 – 121) aminosavszekvenciájának a szerkezeti változása következhet be  $\beta$ -redővé, és feltételezhetően az első  $\alpha$ -hélix szakaszé, ahol a szerkezetátalakító folyamat során szintén  $\beta$ -redők alakulnak ki.<sup>114</sup> A két szerkezeti forma biokémiai tulajdonságaiban különbözik. Míg az egészséges PrP<sup>C</sup> jól oldható, proteázszenzitív,  $\beta$ -redőkben szegény, addig a PrP<sup>Sc</sup> konformáció oldhatatlan, hidrofób, részben proteázrezisztens, globuláris szerkezettel rendelkezik és  $\beta$ -redőkben gazdag.<sup>115</sup> A megnövekedett  $\beta$ -redő tartalom a (90 – 140) aminosavakat tartalmazó hidrofób tartomány nagy szerkezetátalakulásának köszönhető, feltételezhetően a fehérje negyedleges térszerkezetének változása okozza az ezt követő aggregációt, amely amiloid fibrillek kialakulásához vezet.<sup>116</sup>

A celluláris prion fehérje számos proteolitikus folyamaton megy keresztül az élő szervezetben. A fehérjében a Lys110 és His111 aminosavak között  $\alpha$ -hasítás mehet végbe. Ennek eredményeképp egy úgynevezett C1 C-terminális fragmens és a hozzá tartozó N1 N-terminális fragmens képződik. A prion fehérje szintén hasítható az oktarepeat tartományon belül vagy annak közelében a Trp89 és Gly90 között, és a megfelelő C2 C-terminális fragmens, illetve a hozzátartozó N2 N-terminális fragmens képződik. Ezt a hasítást  $\beta$ -hasításnak nevezik, és az eddigi eredmények alapján a hasításban a reaktív oxigén származékok (ROS) is részt vesznek.<sup>117, 118</sup> A  $\beta$ -hasítás az oktarepeat tartományt nem tartalmazó fehérje esetében nem megy végbe, illetve a  $\beta$ -hasítás nélkül nő a sejt érzékenysége a reaktív oxigén származékok iránt. Ez arra utal, hogy a PrP<sup>C</sup>  $\beta$ -hasítása fontos folyamat lehet a sejtek oxidatív stressz elleni védelmi mechanizmusában.<sup>119</sup> A  $\beta$ -hasítást patogén körülményekhez társították, mivel a C2 fragmenst nagy mennyiségben detektálták Creutzfeldt-Jakob-kórban elhunyt betegek agyszöveteiben.<sup>120-122</sup> A  $\beta$ -hasítás gátolja az  $\alpha$ -hasítást, ezáltal az N1 és C1 fiziológiás feladatait is, illetve ezáltal a PrP<sup>C</sup> bizonyos receptoraktivitásait is.<sup>123</sup> A hasítások során az N1 és N2 fragmensek az extracelluláris térbe és a testnedvekbe kerülnek. Újabban egy másik hasítási folyamatot is leírtak, a  $\gamma$ -hasítást. Ez a fehérje és a membrántípusú mátrix metalloproteázok közötti kölcsönhatásból ered és egy nagyobb N3 és kisebb C3 fragmenst eredményez. A hasítás

feltételezhetően a (170 – 200) aminosavak közötti tartományon belül játszódik le.<sup>124, 125</sup>

A Pr<sup>PC</sup> (111 – 115) peptid fragmenszen vizsgálták az  $\alpha$ -hasítás hatását a réz(II)ion koordinációjára. A hasítást követően a szabad aminosoport jelenléte a His111-nél nagyban befolyásolja a réz(II)ion kötését ezen koordinációs környezetben.<sup>126</sup> Szintén vizsgálták a  $\beta$ -hasítás hatását a réz(II)ion koordinációjára a (90 – 115) peptid fragmens védett és az N-terminális részen szabad aminosoportot tartalmazó molekula esetén, illetve a His96 és His111 jelenlétében, és külön-külön az egyik hisztidint nem tartalmazó mutánsokkal is. Az eredmények azt mutatták, hogy a His111 hiányában a szabad aminosoport részt vesz a fémion koordinációjában a His96-tal együtt, viszont a H96A mutáció esetén a szabad N-terminális aminosoport nem koordinálódik, és a His111 az egyedüli aminosavdallánc, ami részt vesz a koordinációban. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a  $\beta$ -hasítás nem befolyásolja a His111 réz(II)ion kötését, azonban ez a His96 esetében nem igaz.<sup>127</sup> A  $\beta$ -hasítás megváltoztatja az oktarepeat tartományon kívüli hisztidinek koordinációs preferenciáját. Míg a teljes Pr<sup>PC</sup> esetén a réz(II)ion koordinációs szempontból a His111-et részesíti előnyben a His96-hoz képest,<sup>102, 126</sup> addig a  $\beta$ -hasításon átesett fehérjének és a megmaradt C2 fragmensnek a szabad aminosoport jelenléte miatt pont ennek az ellenkezőjét mutatja, vagyis His96 > His111. Azonban fontos megjegyezni, hogy a koordinációs izomerek jelenléte nem zárható ki, viszont az alkalmazott kísérleti körülmények között ezen részecskék jelenlétét nem tapasztalták.<sup>127</sup>

Magának a prion fehérjének a feladata és funkciója egyelőre még tisztázatlan. Feltételezések szerint szerepet játszhat az alvásszabályozásban és a sejtadhézióban is. Kimutatták, hogy a Pr<sup>PC</sup> a szuperoxid-diszmutázhoz hasonló aktivitással rendelkezik, ami ahhoz a feltevéshez vezetett, hogy a fehérje szerepet játszhat a sejtek oxidatív válaszában, illetve az oxidatív stressz elleni védelemben. Az oxidatív stressznek a prion betegségekben is döntő szerepe lehet, mivel a szabad gyökök által okozott sérülések növekedését figyelték meg prion fertőzött agyszövetekben.<sup>128</sup> Az antioxidáns viselkedés kapcsolatban állhat a prion betegségek során létrejövő neurodegeneratív elváltozásokkal. A fehérjéről kimutatták, hogy a (23 – 27) és a (101 – 110) aminosavak közötti N-terminális régiók a DNS-sel és az RNS-sel is kölcsönhatásba lépnek, míg a fehérje C-terminális régiója csak a DNS-sel.<sup>129-131</sup> Egyesek szerint, mivel bizonyított a fehérje nagy affinitása a réz(II)ionhoz, szerepet játszhat a fémion szállításában. Azonban ez kevésbé tűnik valószínűnek, hiszen a szervezetben található más fehérjék, amelyeknek a réz(II)ion-szállítás az elsődleges feladata. A prion fehérjéhez kötött réz(II)ion funkciója sem egyértelmű. Meggyőző bizonyítékok

utalnak arra, hogy a prionnak Cu(II)-közvetített idegrendszeri védős szerepe lehet a S-nitroziláció és a szinaptikus plaszticitás modulátoraként.<sup>132</sup> Mások szerint a réz(II)ion szerepe a prion szerkezeti átalakulásának segítése vagy éppen annak mérséklése lehet.<sup>107, 133</sup> Továbbá az oktarepeat tartományon kívüli rész és a palindromikus motívum közelsége egymáshoz kapcsolatot sugall a réz(II)ion kötődése és a prionátalakulás között.<sup>134</sup> A fehérjéről szintén ismert, hogy a réz(II)ion koncentrációjától függően szabályozza az ionszatórnák működését a szervezetben.<sup>135, 136</sup> Kimutatták, hogy a sejtekhez szállított réz(II)ion részlegesen megvédi a sejteket a PrP<sup>C</sup> N- és C-terminális doménje közötti hidrofób szegmens deléciójából adódó toxicitástól.<sup>137</sup> Együttesen ezen eredmények arra utalnak, hogy a PrP<sup>C</sup> neuroprotektív szabályozását a réz(II)ion irányítja.

Kapcsolat lehet a prion fehérje és az amiloid- $\beta$  között is. Feltételezések szerint a prion fehérje közrejátszhat az amiloid- $\beta$  oligomerek kórokozó hatásában. A prion fehérje (95 – 110) aminosavszekvenciája meghatározónak bizonyult az amiloid- $\beta$  fehérjéhez való kötődésében.<sup>138</sup> További érdekesség, hogy az  $\alpha$ -szekretáz, ami az amiloid prekursor fehérje (APP) hasításával részt vesz az amiloid- $\beta$  képződésben, hasítja a prion fehérjét a 111-es és 112-es aminosavak között, így lehasítva a sejtmembránról a PrP<sup>C</sup> azon részét, amihez az amiloid- $\beta$  kötődik.<sup>139</sup> Kimutatták azt is, hogy a PrP<sup>C</sup> szubsztöchiometrikus mennyiségben gátolja az amiloid- $\beta$  polimerizációját, viszont ehhez a rendezett C-terminális domén szükséges.<sup>140</sup> Egy másik kutatás szerint a tubulin fehérje is kötődik a PrP<sup>C</sup> (106 – 126) aminosavrégióhoz.<sup>141</sup> Ezenfelül az A117V mutációjú, az öröklődő Creutzfeldt-Jakob-kórért és Gerstmann-Straussler-Scheinker szindrómáért felelős prion mutánsról, a *recPrP* (106 – 126) esetében kimutatták, hogy gátolja a mikrotubulusszintézist.<sup>142</sup>

#### 2.4.1. A metionin oxidációja a prion fehérjében

Számos környezeti hatásról bizonyították, hogy indukálja a prion fehérje destabilizációját és elősegíti a kezdeti szerkezetátalakulást. Fiziológiai körülmények között az oxidatív stresszt és a reaktív oxigén származékokat tartják az egyik felelősnek a PrP<sup>C</sup> destabilizációjának indukálásáért.<sup>143</sup> A megnövekedett ROS-termelést a prion betegségek, az Alzheimer-kór, a Huntington-kór és a Parkinson-kór egyik patológiai jellemzőjeként tartják számon.<sup>143-146</sup> A metionin egyedülállóan érzékeny a reaktív oxigén származékok okozta oxidációra. Az oxidáció során képződő metionin-szulfoxid a PrP<sup>C</sup> szerkezetátalakulásához és ezt követő aggregációjához vezethet.

A metionin oxidációja indirekt módon is közre játszhat a prion betegségek lefolyásában. A legtöbb fehérje az oxidatív károsodással szemben a reverzibilisen oxidálható metioninnal védekezik. Ezt egy speciális enzimrendszer, a metionin-szulfoxid reduktáz (Msr) enzimsalád segítségével teszi.<sup>147, 148</sup> A metionin-szulfoxid reduktáz sztereospecifikus módon redukálja az oxidáció során képződő metionin-szulfoxidot metioninná. A katalitikus aktivitásuk sztereospecifitása alapján két alcsalád létezik: az MsrA, amely a metionin-szulfoxid S-enantiomerét, illetve az MsrB, ami az R-enantiomert redukálja. A metionin-szulfoxid reduktáz elektrondonorként viselkedik, miközben a fehérjében levő metionin-szulfoxidot metioninná redukálja. A reakció terméke a metionin oldallánc és a metionin-szulfoxid reduktáz diszulfidos cisztein intermediere. Az oxidált enzim katalitikus aktivitását ezt követően a diszulfidos cisztein intermedier redukációjával a tioredoxin és tioredoxin-reduktáz állítja helyre. A folyamatban a NADPH terminális elektrondonorként vesz részt, miközben katalitikus ciklusonként egy molekula NAD<sup>+</sup> képződik.<sup>149</sup>

A metionin a második legtrikább aminosav a gerinces élőlényekben található fehérjékben, általánosan mindössze 1,8%-ban lelhető fel a proteomokban. Ennek ellenére az emberi prion fehérjének a többi proteomhoz képest szokatlanul magas a metionintartalma, hiszen összesen 12 metionin található benne.<sup>150</sup> Hét metionin aminosav található a rendezett C-terminális részen, amely a proteázrezisztens PrP<sup>Sc</sup> aggregátumok magját képezi. A hét metionin közül a M129, M134, M154 és M166 a fehérje negyedleges szerkezetének felületén található. Ezen aminosavak sokkal jobban ki vannak téve a ROS oxidációnak, míg a M205, M206 és M213 aminosavak részlegesen vagy teljesen fedettek.<sup>89</sup> A M112 és M129 polimorfikus az emberi prion szekvenciában, elsődlegesen metionin vagy valin aminosav foglalja el ezt a helyet. Egyéb emlősök és állatok prion fehérjéiben a 112-es és 129-es pozíciókban valin található.

A prion fehérjében található metionin aminosavak oxidációjának detektálása és a növekvő érdeklődés az oxidatív stressz és a neurodegeneratív betegségek kapcsolata között számos kutatást indított el a metionin oxidáció lehetséges szerepének feltérképezése érdekében.<sup>151</sup> Molekuláris dinamika kísérletek kimutatták, hogy a Met205 hidrofób karaktere miatt szükséges a fehérje első és harmadik  $\alpha$ -hélice közötti kölcsönhatás stabilizációjához. Továbbá a hidrogén-peroxid is enyhe változást okoz a prion fehérje termodinamikai stabilitásában. Elsődlegesen a metionin oxidációját figyelték meg metionin-szulfoxiddá, illetve azon egyéb aminosavakban történt változás, melyek a C-terminális hidrofób részen a módosult metioninok közelében helyezkedtek el. Képződő reaktív oxigén származékokhoz köthető szerkezeti változásokat

figyeltek meg 2D NMR analízissel réz(II)ion katalízis mellett hidrogén-peroxiddal kezelt PrP<sup>C</sup> fehérjénél. Szerkezetvizsgálatok kimutatták, hogy a Met206/213 oxidációját követően megnő a fehérje ezen részének rugalmassága.<sup>152</sup> A PrP<sup>C</sup> oxidációja hidrogén-peroxiddal és réz(II)ionnal erélyesebb körülmények között nagyon instabil, nagy  $\beta$ -redő tartalmú intermedier képződéséhez vezet, ami hajlamosabb oligomerek képződésére, mint a PrP<sup>Sc</sup>.<sup>153</sup>

Az örökletes Creutzfeldt-Jakob-kórral kapcsolatba hozott E200K prion fehérje mutánson elvégzett oxidációs kísérletek azt mutatták, hogy a felületen elhelyezkedő Met109/112/129/134/154/166 aminosavak hidrogén-peroxid hatására viszonylag rövid inkubációs időt követően oxidálódtak, míg a térben szerkezetileg belül elhelyezkedő Met205/206/213 aminosavak oxidációjára hosszabb idő szükséges. Ezen felül a  $\beta$ -redős harmadlagos szerkezet kialakulásához szükséges a nem felületi metioninok oxidációja is. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a felületi metioninok oxidációja a PrP<sup>C</sup> szerkezetváltozásának kezdeti lépéseit indukálhatja, majd a kezdeti szerkezetváltozással a térben belül elhelyezkedő metioninok elérhetőbbé válnak a reaktív oxigén származékok számára, majd ezek oxidációja, különösen a Met213 aminosavé, elegendő a fehérje teljes konformációváltozásához, illetve a mutáns PrP stabilitásának jelentős csökkenéséhez.<sup>154</sup>

A metionin oxidációja akár közvetlenül is hatással lehet a PrP<sup>C</sup> aggregációs útvonalára. Amiloidogén peptidekkel végzett kísérletek során megfigyelték, hogy a két felületi metionint (Met109, Met112) tartalmazó HuPrP (106 – 126) peptid fragmens amiloidogén tulajdonságai jelentősen csökkennek oxidáció hatására.<sup>155</sup> Egyes feltételezések szerint a réz(II)ionnal kötött prion fehérje antioxidáns mechanizmusában a kötőhelyhez közeli aminosavak fémion-katalizált oxidációja is részt vesz a folyamatban. A rendezetlen N-terminális doménban levő aminosavak közül a Met109/112 és a His96/111 lehet a legérzékenyebb a fémion-katalizált módosításra. Az egyik feltételezés szerint a PrP<sup>C</sup>-ben a metionin és hisztidin aminosavak oxidációja áldozati oxidánsként játszhat szerepet, ezáltal csökkentve a réz(II)ion által generált ROS diffúzióját és reaktivitását.<sup>156</sup>

Kutatócsoportunkban korábban vizsgálták a HuPrP (103 – 112) fragmens és mutánsainak fémion-katalizált oxidációját Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendszerben. A metionint nem, csak hisztidint tartalmazó mutáns peptid esetén fragmentálódást figyeltek meg, míg a metionint tartalmazó mutánsoknál a peptid oxidálódott és nem tapasztalták a peptidlánc hasadását. Az oxidáció következtében metionin-szulfoxid képződött termékként.<sup>157</sup> Továbbá vizsgálták az Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH<sub>2</sub> tridekapeptid fémion-katalizált oxidációját, amely

tartalmazza a prion fehérje His85, His96 és His111 kötési helyeit. A peptid fémion-katalizált oxidációjának vizsgálata során mind a metioninok, és mind a hisztidinek oxidációját kimutatták. Tömegspektrometriás vizsgálatok alapján a metioninok és hisztidinek egyszeres oxidációja mellett a hisztidinek többszörös oxidációját is tapasztalták. A kutatás során sikerült felállítani a hisztidinek oxidációjának tendenciáját. Kimutatták, hogy a His96 oxidációja a legkedvezőbb, amit a His85 oxidációja követ, és a His111 oxidációja csak csekély mértékben következik be. Érdekesség azonban, hogy ezzel ellentétben a peptid a réz(II)ion megkötésekor a His111 ~ His96 > His85 tendenciát követi.<sup>158</sup>

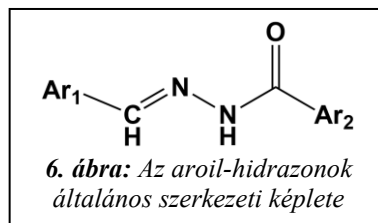
## **2.5. Kelátorok**

A fémhomeosztázis helyreállítására alkalmazott kémiai ágensek, mint a kelátorok is, alkalmasak lehetnek gyógyászati használatra. Az ismert kelátorok közé tartozik többek között a deferoxamin és a D-penicillamin is, amelyeket a vas- és a rézionfelesleg okozta hemokromatózis és Wilson-kór kezelésére alkalmaznak. Míg ezen kelátorok komplexek kialakításával képesek a felhalmozott fémionokat a szövetekből kiüríteni, addig azok a neurodegeneratív betegségek kezelésére nem feltétlenül alkalmazhatók. Ahhoz, hogy idegrendszeri betegségek kezelésére használható legyen egy fémkelátor, a molekulának át kell jutnia a vér-agy gáton, ami csak kis méretű hidrofób vegyületek számára átjárható.

A fémion-kelátor ágensek szerves vagy szervetlen molekulák, amelyek a fémionokhoz kötődnek és gyűrűs szerkezetű molekulák képződéséhez vezetnek. Donoratomok által kovalens és koordinációs kötések létrehozására képesek. Ezen donoratomok általában a kén-, a nitrogén- és az oxigénatomok, melyek leggyakrabban tiol-, diszulfid-, amino- és hidroxil- funkcióscsoportként találhatók meg a molekulában. Ahhoz, hogy a fémkelátor hatékony legyen, kis molekulatömegűnek kell lennie. Szükséges, hogy nagy szelektivitású legyen, és olyan tulajdonságokkal rendelkezzen, hogy át tudjon jutni a fiziológias és a membrán gáton keresztül a toxikus fémionokat koncentrált mennyiségben tartalmazó szövetekbe. A fémionnal komplexet képezve távolítja el a fémiont a felhalmozott területről. Fontos, hogy komplexe legyen ártalmatlan és más fémionok homeosztázisára ne legyen hatással.<sup>5</sup> A dolgozatom kutatási témájában aroil-hidrazonokat és módosított szalán típusú vegyületeket, mint fém-fehérje kölcsönhatást gyengítő kelátorokat vizsgáltunk.

### 2.5.1. Aroil-hidrazonok

Az aroil-hidrazonok olyan szerves Schiff-bázis ligandumok, melyek molekulaszervezetét az  $\text{-NH-N=CH-}$  csoport és a  $\text{>C=O}$  karbonilcsoport jellemzi, és funkciócsoportjaikhoz aromás szegmens kapcsolódik, általános szerkezeti képletük a 6. ábrán látható.



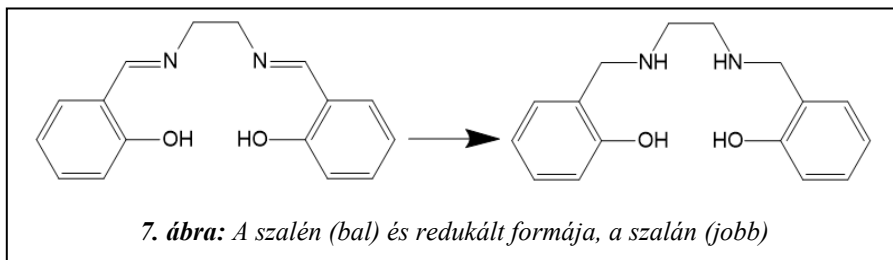
Általában egy savhidrazid és egy aldehid kondenzációs reakciójával állíthatók elő.<sup>159</sup> A ligandum az átmenetifémionokhoz két donoratomján, a karbonilcsoport oxigénatomján és a Schiff-bázis azometin nitrogénatomján keresztül kapcsolódik. A hidrazonhoz kapcsolódó szegmens további donoratomokat tartalmazhat, ami befolyásolja a ligandum kötődését a fémionhoz, ezáltal változatosabb koordinációs mód kialakítására is lehetőség van. Az átmenetifémiontól és a ligandumtól függően oktaéderes, tetraéderes és síknégyszeges geometriájú komplexek is kialakulhatnak.<sup>159, 160</sup> Ezenfelül az aroil-hidrazonok egyik érdekes tulajdonsága, hogy oldatokban keto-enol tautomeria jellemzi őket. Ez azt jelenti, hogy a hidrazin N-donoratomról képes egy proton a szomszédos karbonilcsoport O-donoratomjához vándorolni, amely során imidkötés alakul ki. A ligandum fémkomplexének tautomer formája függ a közeg pH-jától és a fémiontól, ez a komplex koordinációs módját is befolyásolja.<sup>161-163</sup> A tridentát aroil-hidrazonok hatékony fémion-kelátorok biológiai rendszerekben. Tipikusan biszkomplexeke képeznek, viszont monokomplexe kialakulása és izolálása sem példátlan.<sup>159, 164</sup> A kis molekulatömeg, a közepes lipofilitás és a fémionokhoz való nagy affinitás mind befolyásolja az aroil-hidrazon sejtmembránon keresztüli átjutását, illetve a fémionmegkötést. Ezen molekulák különböző biológiai felhasználhatósággal rendelkezhetnek. Többek között görcsoldó, vérálgátló, antidepresszáns, fájdalomcsillapító, antioxidáns, daganatellenes, antimikrobiális és vírusellenes hatásai is lehetnek.<sup>160, 165-167</sup> Újabban számos aroil-hidrazon analógot tanulmányoztak az oxidatív stressz csökkentése, illetve az Alzheimer-kór kialakulásáért felelősnek tartott amiloid- $\beta$  fémion-közvetített aggregáció gátlásának érdekében. Szintén ígéretesnek tűnnek idegrendszeri betegségek kezelésére, mint fémion-fehérje kölcsönhatást gyengítő molekulák (*metal-protein attenuating compounds* = MPACs). Az MPACs vegyületek olyan kelátorok, melyek mérsékelt affinitással rendelkeznek bizonyos fémionok felé, így az érintett szövetekben képesek a fémion akkumulációját megelőzni, illetve a képződő amiloid plakkok toxicitását csökkenteni, ezáltal megelőzve a betegség lefolyását. Az MPACs vegyületek a fiziológias fémionhomeosztázis helyreállítására törekednek, elsődlegesen a réz(II)- és

cink(II)ionok specifikus megkötése révén. Így lokálisan csökkentik az abnormális kölcsönhatást a fehérjével, megelőzve annak oligomerizációját és a ROS közvetítette toxicitást.<sup>165, 168-172</sup> Továbbá, az oxidációval szembeni nagy stabilitásuknak köszönhetően fémkomplexeik nagy potenciált mutatnak hatékony oxidációs katalizátorként is.<sup>159, 163, 173</sup>

## 2.5.2. Szalán típusú vegyületek

A szalán típusú vegyületek a széles körben ismert és alkalmazott szalén molekulák redukált formái. A szalén- és szalán-komplexeiket katalizátorként, gyógyászati felhasználásra, népszerű bioszervetlen modellvegyületekként és funkcionális enzim mimikumokként is alkalmazzák. Ezenfelül a biológiai aktivitásuk és gazdag fotofizikai tulajdonságaik miatt számos javaslat született felhasználásukról terápiás vegyületekként és bioszenzorként. Kutatások folynak alkalmazásukra kelátterápia céljából is, ezáltal bizonyos fémionok és biomolekulák közötti, potenciálisan toxikus kölcsönhatások megzavarására és a szervezetben a fémionok újra-eloszlásának és kiürülésének elősegítésére. Egyes komplexek *in vitro* antioxidáns és antimikrobiális aktivitással, daganatellenes tulajdonsággal rendelkeznek, illetve maga a ligandum is rendelkezhet szabadgyökfogyó sajátsággal.<sup>174-176</sup> A Schiff-bázis típusú szalén fémion-kötőhelyként két imin-N- és két fenolát-O-donoratómot tartalmaz. Ezen donoratómok minősége és elhelyezkedése felelős a jó kelátképző tulajdonságáért. Komplexeikben csatolt (5,6,5)-tagú kelátgyűrűt alakít ki.

Pozitív tulajdonságaik ellenére alkalmazhatóságukat korlátozza, hogy a Schiff-bázisok hajlamosak a hidrolízisre.<sup>177, 178</sup> Ezzel ellentétben a szalén redukált formája, a szalán (7. ábra), ami két amin-N-donoratómot tartalmaz az imin-N-atomok helyett, sokkal ellenállóbb a hidrolízissel szemben. Az imin-N-atomoknál bázikusabb amin-N-donoratómok jelenléte miatt a szalán vegyületek sokkal jobban kötődnek a fémionokhoz, ezáltal stabilabb és rugalmasabb szerkezetű komplexeket képesek kialakítani. Míg a szalén fémkomplexei planáris geometriával és transz konfigurációval rendelkeznek, addig a szalán komplexek oktaéderesek és általában cisz konfigurációjúak.<sup>174</sup>



## 2.6. A cink és réz koordinációs kémiája és biológiai jelentősége

### 2.6.1. A réz

A réz létfontosságú fémion a legtöbb élő rendszerben. Mennyisége átlagosan 80 és 120 milligramm közé tehető egy 70 kg-os felnőtt esetében. Az emberi szervezetben legnagyobb részt a májban, az epében, az agyszövetekben és a szívben található. Az emberi szervezetben a harmadik leggyakoribb átmenetifém a vas és a cink után. Mind a hiányához, és mind a felhalmozódásához betegségek köthetők. Több mint 15 mg felett heveny toxicitást okoz. A legismertebb rézanyagcseréhez köthető betegségek a Menkes-kór (rézhiány) és a Wilson-kór (rézfölösleg). A szervezetben a legnagyobb stabilitású komplexeket a fehérjékkel alkotja, és kizárólagosan réztartalmú fehérjékben fordulnak elő. A fehérjékhez elsődlegesen a hisztidin, cisztein és metionin oldalláncokon keresztül kapcsolódik.

Komplexeiben a réz főleg +2-es oxidációs formában van jelen. A réz(II)ion elektronszerkezete  $d^9$ , egy párosítatlan elektronnal rendelkezik, emiatt komplexei paramágneses tulajdonságúak és színesek. Színük függ a kapcsolódó donoratomok minőségétől és számától, de komplexei leggyakrabban kék színűek. Komplexei jellemzően tetragonálisan torzult oktaédes geometriájúak. Termodinamikailag stabil, nagy affinitású komplexeket képez mind az S-, N- és O-donoratomokkal, a donoratom preferencia  $S > N > O$  irányban csökken. Jellemzően a kelátképző és makrociklusos ligandumokat részesíti előnyben, míg erősen soft típusú ligandumokkal gyakran redoxireakciók is lejátszódhatnak. A +1-es oxidációs formája szintén előfordul az élő szervezetekben. A réz(I)ion elektronszerkezete  $d^{10}$ , komplexei színtelenek és diamágnesesek. A réz(I)ion erősen soft karakterű, épp ezért stabil komplexeket csak soft ligandumokkal alakít ki. Elsődlegesen lineáris, de trigonális és tetraédes geometriai elrendezésű komplexek is előfordulhatnak. Ritkán +3-as oxidációs formában, réz(III)ionként is előfordulhat. A Cu(III) elektronszerkezete  $d^8$  és diamágneses, komplexei jellemzően síknégyszetes koordinációs geometriájúak. Komplexei nagyon erélyes oxidálószerrek.

Az élő szervezetben a rézfehérjéknek számos funkciója lehet. Feladatuk lehet redoxifolyamatok katalízise, illetve részt vesznek az elektrontranszfer folyamatokban. Ezek közé sorolható a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz enzim, a citokróm c-oxidáz, a tirozináz és a plasztocianin fehérje. A puhatestűek esetében

a réztartalmú hemocianin felel az O<sub>2</sub> szállításáért és tárolásáért. A réz tárolásáért és szállításáért felel többek között a metallotioenin és a ceruloplazmin fehérje.

### **2.6.2. A cink**

A cink az élő szervezetek egyik létfontosságú fémionja, azon belül is az élő rendszerekben a második leggyakoribb nyomelem. Átlagosan egy 70 kg-os felnőtt ember szervezetében 2 és 4 gramm közötti mennyiségben van jelen, főleg az izomszövetekben és a csontokban található, illetve számos enzimekben és fehérjében is előfordul. Az enzimekben a cink elsődlegesen szerkezetalkító feladatot tölt be. A cinket tartalmazó enzimek közé tartozik többek között a Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz, a karboxi-peptidáz és a szénsav-anhidráz is. Mindemellett a cink egyik legfontosabb feladata a cink-ujj fehérje szerkezetének kialakítása. A fehérje feladata a DNS bázisszekvenciájának felismerése, továbbá a genetikai információ átadásának szabályozásában is részt vesz. Bizonyítottan szerepe van az idegrendszeri betegségek lefolyásában is. Kutatások kimutatták, hogy Alzheimer-kórban szenvedő betegek agyszöveteiben a cink normális értéknél nagyobb koncentrációban van jelen. Ezen eredmények szerint a cink felhalmozódása hozzájárul az amiloid- $\beta$  aggregációjához, az amiloid plakkok kialakulásához.

A cink az élő szervezetekben főleg komplexként van jelen. A cink d<sup>10</sup>-es elektronszerkezete következtében komplexei színtelenek és diamágnesesek, komplexekben +2-es oxidációs számmal található. Koordinációs geometriája nagyban függ a hozzá kapcsolódó ligandumoktól, mind oktaéderes, és mind tetraéderes geometriájú komplexek is kialakulhatnak. Kelátképző ligandumok esetén a komplexek geometriája torzulhat. Merev szerkezetű ligandumok esetében trigonális planáris geometriai elrendeződésű komplex is képződhet, valamint a ligandum szerkezetétől függően síknégyszetes geometriájú komplex kialakítására is képes. Termodinamikailag közepes stabilitású, kinetikailag labilis komplexek alkotója. Mind a hard, és mind a soft donoratomokhoz egyaránt jól kötődnek.

### 3. Kísérleti körülmények és alkalmazott módszerek

#### 3.1. A mérésekhez használt vegyszerek

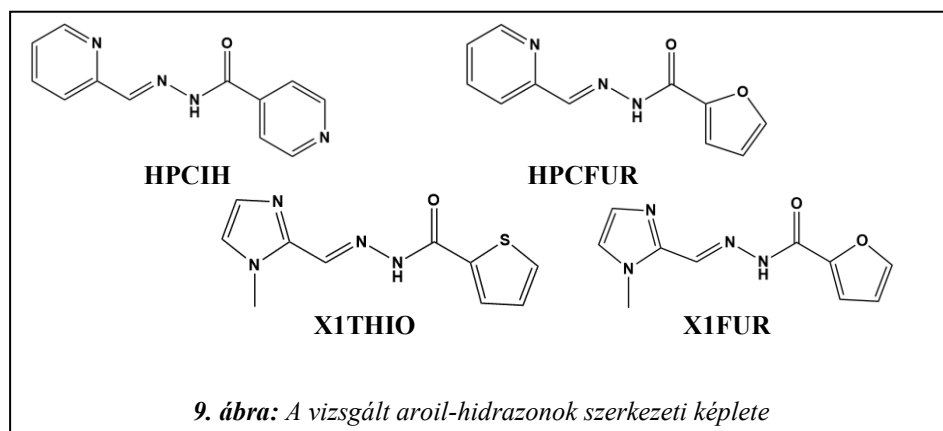
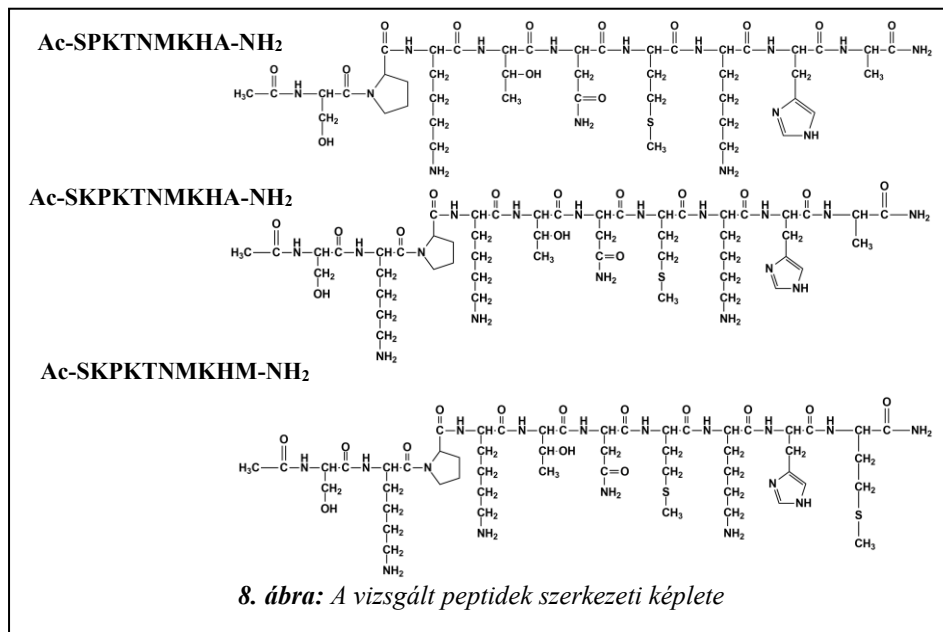
A kísérletek során analitikai tisztaságú vegyszereket használtunk fel. A pH-potenciometriás mérésekhez használt KOH-, KCl-, illetve a pH-állításhoz használt kálium-hidrogén-ftalát oldat szilárd vegyszerekből készült, míg a HCl-oldat tömény sav hígításával, melyet háromszor ioncserélt vízzel végeztünk. A mérésekhez használt KOH- és HCl-oldatok pontos koncentrációját potenciometriás titrálás alapján határoztuk meg.

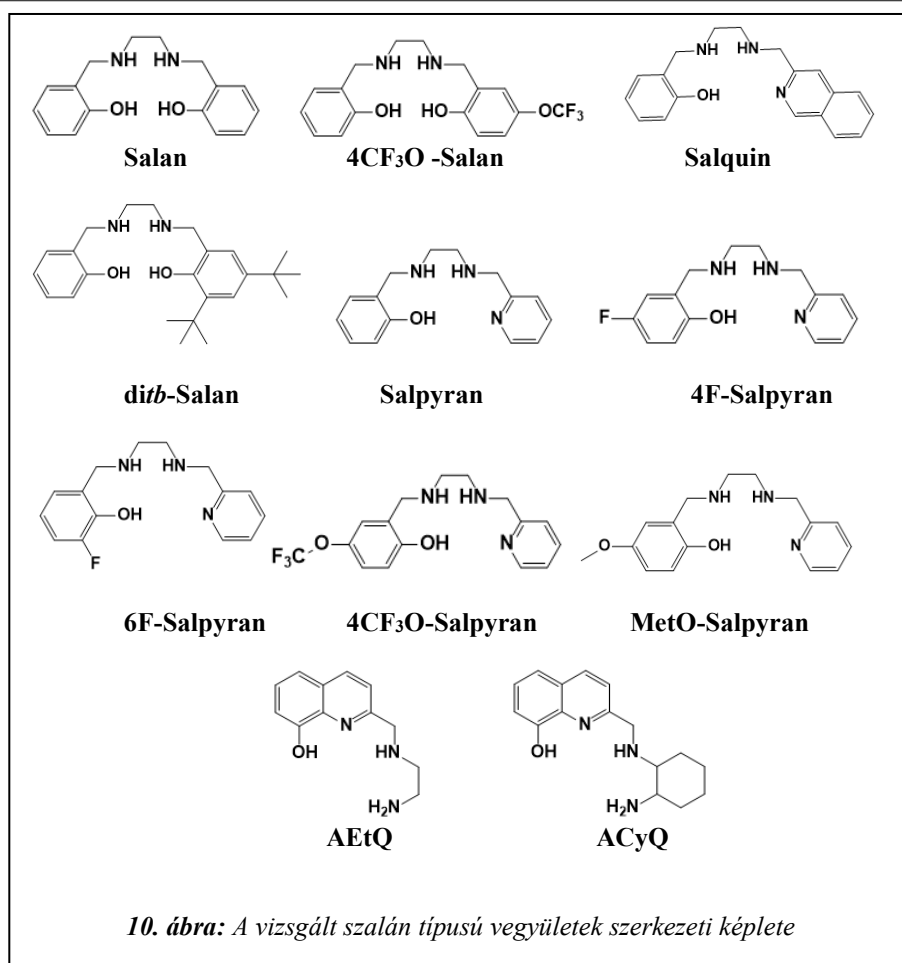
Az oldategyensúlyi vizsgálatokhoz használt  $\text{CuCl}_2$  és  $\text{ZnCl}_2$  oldatok és az oxidációs kísérleteknél használt  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  és  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  oldatok a Reanal Finomvegyszer Zrt. vegyszereiből készültek háromszor ioncserélt vízben oldva. A  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  és  $\text{FeCl}_3$  oldatok koncentrációját gravimetriásan határoztuk meg. A KOH, KCl, aszkorbinsav és HEPES puffer szilárd vegyszereket a Merck Kft. gyártotta. Az oxidációs kísérleteknél használt tömény  $\text{H}_2\text{O}_2$  oldat a Molar Chemicals Kft. cégtől származik. A kísérletek során felhasznált kálium-hidrogén-ftalát, dimetil-szulfoxid, acetonitril, trifluorecetsav és 37 % -os tömény HCl vegyszereket a VWR International Kft. forgalmazza.

Az oxidációs vizsgálatokhoz használt Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub>, Ac-SKPKNMKHA-NH<sub>2</sub> és Ac-SKPKNMKHM-NH<sub>2</sub> szekvenciájú peptideket a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában állították elő. A peptidek szerkezeti képlete a 8. ábrán látható.

A 9. ábrán feltüntetett aroil-hidrazon vegyületeket Nicolas Rey (Pontificia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazília) kutatócsoportja szintetizálta, míg a 10. ábrán látható módosított szalán és szalán típusú vegyületeket George Kostakis (University of Sussex, Brighton, Egyesült Királyság) kutatócsoportjában szintetizálták. A vizsgált vegyületeket nemzetközi együttműködés keretein belül használatunkra bocsátották.

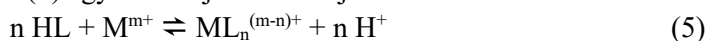
### 3.2. Vizsgált vegyületek



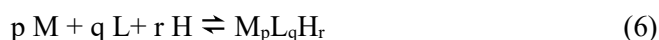


### 3.3. pH-potenciometria

A módszer segítségével meghatározhatóak a ligandumok protonálódási állandói és a fémionnal képződő komplexeik stabilitási állandói. A H<sup>+</sup>-ion és a fémion (M<sup>m+</sup>) között lejátszódó komplexképződés során fellépő kompetitív reakciót általánosan az (5) egyenlettel jellemezhetjük:



Míg vizes oldatokban a komplexképződési folyamat bruttó egyenletét (6) a következő összefüggés írja le (a könnyebb kezelhetőség érdekében a részecskék töltése nincs feltüntetve):



ahol M: fémion, L: teljesen deprotonált ligandum, H: proton, p, q, r: sztöchiometriai együtthatók.

Az egyenlet alapján a képződő komplexek stabilitási szorzata:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_p L_q H_r]}{[M]^p [L]^q [H]^r} \quad (7)$$

A kísérleti adatokból a PSEQUAD<sup>179</sup> számítógépes program segítségével meghatároztuk a komplexek stabilitási szorzatát. A mérés közben kapott térfogat ( $V$ ) — pH adatpárok mellett szükséges a komponensek és az asszociátumok (a ligandum különböző protonáltsági fokú részecskéi, a különböző  $M_p L_q H_r$  fémkomplexek és hidroxidokomplexek) számát is megadni. Emellett az  $M$ ,  $H$  és  $L$  komponensekre nézve ( $p$ ,  $q$ ,  $r$ ) meg kell adni a komplexek összetételét, illetve az asszociátumok ismert protonálódási állandóit vagy stabilitási szorzatát, míg az ismeretlenekre becsült értéket adunk meg. A programba továbbá be kell vinni a komponensek kiindulási teljes koncentrációját, a titrálás során alkalmazott mérőoldat pontos koncentrációját, a víziionszorzatot és az Irving korrekciós faktort. Az utóbbira azért van szükség, mert a diffúziós potenciál kiküszöbölésére az Irving és munkatársai által kidolgozott módszert alkalmaztuk.<sup>180</sup> A keresett stabilitási szorzatok értékeit a kiindulási komponensekre felírható anyagmérleg-egyenletek (8-10) megoldásai adják.

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

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

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (10)$$

ahol  $n$  a rendszerben képződő asszociátumok számát, a  $p$ ,  $q$ ,  $r$  jelölések a sztöchiometriai együtthatókat jelölik. A program a kiindulási paramétereket felhasználva a Newton-Raphson iterációval közelíti a keresett ismeretlen stabilitási szorzatok értékeihez, amíg a  $\sum (V_{mért} - V_{számított})^2$  számérték, ahol a  $V$  az ismert koncentrációjú mérőoldat térfogatértékeit jelöli, el nem éri a minimumot. A minimumot elérve megkapjuk az egyes stabilitási szorzatok finomított értékeit és az azokhoz tartozó hibát. A közelítés pontosságát az illesztési paraméter, azaz a  $|V_{mért} - V_{számított}|$  átlagértéke adja meg. A stabilitási szorzatok megadásakor az utolsó értékes jegy hibáját zárójelben tüntetjük fel. A program a számított értékeket felhasználva kiszámítja az egyes részecskék egyensúlyi koncentrációját és a standard deviációt a titrálási görbe egyes pontjaiban. A program ezután ábrázolja a részecskék koncentráció-eloszlását a pH függvényében egy általunk kiválasztott komponensre vonatkozóan, ez a komponens általában a fémion. A dolgozatban szereplő koncentráció-eloszlás diagramokat a MEDUSA programmal<sup>181</sup> készítettük. Ehhez a kiindulási komponensek koncentrációja és a stabilitási szorzatok megadása szükséges.

Az általunk vizsgált vegyületek egyrésze vízoldható volt, míg a szalán típusú vegyületek között vízben rosszul vagy egyáltalán nem oldódó vegyületeket

is vizsgáltunk. Ezen indokból kifolyólag a pH-potenciometriás kísérleteket vizes oldatokban, illetve víz:dimetil-szulfoxid (30:70 V/V%) elegyben végeztük el. A vízoldható ligandumok esetében a mérésekhez számítógép által vezérelt 0,500 cm<sup>3</sup> végtérfogatú Hamilton üvegfecskendővel felszerelt Mol-AcS mikrobürettával ellátott MOLSPIN pH-mérőt használtunk, amihez 6.0234.100 Metrohm kombinált üvegelektrodót csatlakoztattunk. A pH-potenciometriás méréseket 2,5 és 11,5 közötti pH tartományban végeztük. A minták állandó ionerősségét 1,0 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú kálium-klorid oldattal 0,2 mol/dm<sup>3</sup>-re állítottuk be. A titrálandó minta térfogata vizes közegben 3,00 cm<sup>3</sup> volt. A mérőoldat adagolását, a titrálás során mért adatok rögzítését MOLSPIN számítógépes program vezérelte, illetve végezte. A víz : dimetil-szulfoxid (H<sub>2</sub>O:DMSO) 30:70 V/V% elegyben végzett pH-potenciometriás titrálást Mettler-Toledo T50 pH-mérő készüléken végeztük, melyhez Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrodót csatlakoztattunk. A minták állandó ionerősségét szilárd KCl vegyszer hozzáadásával állítottuk be 0,2 mol/dm<sup>3</sup>-re. A titrálandó minta térfogata a H<sub>2</sub>O:DMSO elegyben 4,00 cm<sup>3</sup> volt. A pH-potenciometriás mérések előtt a pH-mérő egyponos kalibrálásához 0,050 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldatot használtunk, melynek pH-értéke az alkalmazott hőmérsékleten 4,005. A titrálást pontosan meghatározott 0,2 mol/dm<sup>3</sup> koncentrációjú, argon gáz alatt tárolt, karbonátmentes kálium-hidroxid mérőoldat adagolásával végeztük, melynek pontos koncentrációját ismert koncentrációjú (0,050 mol/dm<sup>3</sup>) kálium-hidrogén-ftalát oldat segítségével határoztuk meg. A minták készítésekor felhasznált 0,2 mol/dm<sup>3</sup> sósav oldat pontos koncentrációját a már ismert koncentrációjú kálium-hidroxid oldattal titrálva határoztuk meg, melynek során megállapítottuk a vízionszorzatot és az Irving-faktort. A koncentrációk meghatározását a titrálási görbék Gran-féle linearizálásával végeztük. A vizsgálni kívánt ligandumok törzsoldatai szilárd anyagok bemérésével készültek. A ligandumok koncentrációi a mintában  $1 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-3}$  mol/dm<sup>3</sup> koncentráció tartományba estek. A ligandumok protonálódási állandóit és a mintabeli pontos koncentrációt a titrálási adatokból a SUPERQUAD<sup>182</sup> nevű számítógépes programmal számoltuk ki, figyelembe véve a titrálás során bekövetkező térfogatnövekedést is. A fémion-ligandum arányt 1:2 és 2:3 között változtattuk, míg a vegyes ligandumú minták esetén a fémion-ligandum arány 1:1 volt minden esetben. A fémkomplexek stabilitási szorzatainak kiszámítására a korábban említett PSEQUAD<sup>179</sup> programot alkalmaztuk. A mérések során a minták folyamatos kevertetéséhez VELD mágneses keverőt használtunk. A termosztálást (25°C) Julaba F12 ultratermosztát biztosította. Az oxigén és szén-dioxid gázok kizárása érdekében a minta légtérébe argon gázt vezettünk be.

### 3.4. UV-Vis spektrofotometria

Az átmenetifém-komplexekben d-d átmenetek játszódnak le. A fémkomplexek képződése során a központi fémion d-pályái a ligandum elektromos tere miatt eltérő energiájúak lesznek, ez a d-pályák felhasadását jelenti. A jellemző fényelnyelést az így keletkező d-pályák közötti elektronátmenetek, azaz a d-d átmenetek következtében alakul ki. A képződő komplexek a kapott spektrumok elemzésével jellemezhetők, ezáltal megadható a koordinációban részt vevő donoratomok száma és minősége. Ez alapján következtethetünk a komplex szerkezetére és geometriájára is. A réz(II)-komplexekre jellemző tetragonálisan torzult, oktaédes geometriájú térben az öt d-pálya négy energiaszintre hasad. A kétszeresen elfajult  $e_g$  pályák közül a  $d_{x^2-y^2}$  magasabb, míg a  $d_{z^2}$  alacsonyabb energiaszintre kerül, miközben a háromszorosan elfajult  $t_{2g}$  pályák is felhasadnak. A  $d_{xy}$  magasabb, míg a  $d_{xz}$  és  $d_{yz}$  alacsonyabb, egyenlő energiaszintre kerülnek. A létrejövő négy energiaszint között három d-d átmenetnek megfelelő sávot várunk a spektrumban, a  $d_{xz}$  ( $d_{yz}$ )  $\rightarrow$   $d_{x^2-y^2}$ , a  $d_{xy}$   $\rightarrow$   $d_{x^2-y^2}$  és a  $d_{z^2}$   $\rightarrow$   $d_{x^2-y^2}$  átmeneteket. Az egyes sávok a spektrumon legtöbbször széles sávként jelennek meg, az intenzitásuk pedig függ a koordinációs szférában levő donoratomok számától és minőségétől, illetve a kialakuló komplex geometriájától. A réz(II)-komplexek térbeli szerkezetéből adódóan csak az ekvatoriális síkban koordinált donoratomok rendelkeznek nagy hatással az abszorpciós spektrumra, az axiálisan koordinált donoratomok nem. Az N-, illetve kisebb mértékben az O-donoratomok a rövidebb hullámhosszok felé tolják el az abszorpciós maximumot. Továbbá azt is megfigyelték, hogy a donoratomok koordinálásához rendelhető hatás additív. Ezáltal, az axiális koordináció kivételével a Siegel és Martin<sup>183</sup> által felállított empirikus egyenlet (11) alapján kiszámolható a maximális elnyelési hullámhossz becsült értéke. Az összefüggés azonban nem veszi figyelembe a kelátgyűrű méretét, az axiálisan koordináló donoratomokat, illetve a ligandumhoz kötődő, de a fémkomplex kialakításában nem részt vevő szubsztituenseket.

$$\lambda_{max} = \frac{1000}{\sum_{i=1}^n x_i} [nm] \quad (11)$$

$x_i$ : hozzájárulási tényező, melyet számos spektrofotometriás mérés eredményeként adtak meg aminosav és peptid donoratomokra.<sup>184</sup>

$n$ : azon donoratomok száma, melyek hatással vannak a  $\lambda_{max}$  értékre.

Továbbá a koncentráció kiszámítható az elnyelési sáv intenzitásából is. Azonban, ha az oldat nem mutat szelektív abszorpciót, akkor a koncentráció számítható az

abszorpciós együtthatóval is, melyek között az összefüggést a Lambert-Beer törvény írja le:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (12)$$

ahol az  $\varepsilon$  a moláris abszorpciós együttható ( $M^{-1}cm^{-1}$ ),  $c$  a koncentráció ( $mol/dm^3$ ),  $l$  a kivetta hossza, ez általában 1,000 cm. A moláris abszorpciós együttható az anyagi minőségre jellemző, koncentrációtól független érték.

A spektrális vizsgálatokat a réz(II)ionokat tartalmazó rendszerekkel végeztük 200-900 nm hullámhossz tartományban. Az UV-látható spektrofotometriás méréseket Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras fotométerrel, illetve VWR UV-1600 PC típusú egysugaras spektrofotométerrel végeztük 1,000 cm-es kvarcküvetkát használva. Hasonlóan a pH-potenciometriás kísérleteknél alkalmazotthoz, a mintákban a ligandum koncentrációja  $1 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-3} mol/dm^3$  tartományba esett. A hullámhossz – abszorbanca adatpárokat a gyártók által biztosított szoftverrel regisztráltuk, míg a spektrumok ábrázolása MS Excel szoftverrel történt.

### 3.5. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia egyike azoknak a spektroszkópiás módszereknek, amelyek a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapulnak. Az élő szervezetek által szintetizált molekulák döntő többsége, így a fehérjék is optikailag aktívak, azaz az oldatukon keresztülbocsátott polarizált fény síkját elforgatják. A síkban polarizált fénysugár két cirkulárisan polarizált fényre bontható fel, egy jobbra és egy balra forgó komponens összegére, melyek azonos fázisban vannak és amplitúdójuk megegyezik. Ennek a fordítottja is igaz, azaz ha két, egymásra merőleges, egyenlő amplitúdójú síkban polarizált fényt adunk össze, amelyek egymáshoz képest  $90^\circ$  fáziskülönbséggel rendelkeznek, úgy cirkulárisan polarizált fényt kapunk. A mérőműszer is ezen elv alapján állít elő cirkulárisan polarizált fényt. Síkban polarizált fényt egyszerű polarizációs szűrő segítségével állíthatunk elő. Az optikailag aktív anyagok abszorpciós (extinkciós) együtthatóval és törésmutatóval rendelkeznek a kétféle cirkulárisan polarizált fénysugárral szemben, emiatt csekély abszorpciós különbség mutatkozik. E különbség eredményezi az elliptikusan polarizált kilépő fényt.

A cirkuláris dikroizmus (CD) mérés során  $\Delta A$ -t vagy ellipticitást mérünk a hullámhossz függvényében, amit a feldolgozás során a koncentráció és a kivetta hossz megadásával  $\Delta \varepsilon$ -ra konvertálunk ( $\Delta \varepsilon = \varepsilon_{bal} - \varepsilon_{jobb}$ ), ezt a hullámhossz függvényében ábrázolva megkapjuk a CD spektrumot. Tehát a cirkuláris

dikroizmus, vagy más néven a Cotton-effektus a síkban polarizált fény két összetevőjének különböző abszorpciója.

Az átmenetifém-komplexek optikai aktivitását a komplex molekula aszimmetriája, vagy a ligandum saját aszimmetriája okozhatja. Királis komplexek általában akkor jönnek létre, ha a komplexek kelátgyűrűket tartalmaznak, és az enantiomerek akkor valósulhatnak meg, ha a komplexben lévő fémion kinetikailag inert komplexek kialakítására hajlamos. A legegyszerűbb mérési mód arra, hogy kimutassuk egy vegyület optikai aktivitását, az szolgáltatja, hogy a síkban polarizált fény polarizációs síkja elfordul, ha olyan oldaton halad át, amely tartalmazza vagy az egyik, vagy a másik enantiomert, vagy amelyben valamelyik enantiomer feleslegben van. A komplex molekula optikai aktivitását okozhatja a központi atom aszimmetriája, vagy a komplexképződés hatására a ligandum donatoromján kialakuló aszimmetria. Ha a komplex optikai aktivitása a komplexképződés alatt alakul ki, akkor a komplexképződéssel a két enantiomer racém elegyét kapjuk, melyekhez ellentétes előjelű, azonos értékű Cotton-effektus tartozik, így kioltják egymást. Ezeket az enantiomereket csak kinetikailag inert komplexek esetében lehet egymástól elválasztani és vizsgálni.

A CD-spektroszkópiai vizsgálatokat JASCO-810 típusú készüléken végeztük a réz(II)iont tartalmazó ekvivalens arányú fémion-ligandum vegyes ligandumrendszerek esetén. A minták koncentrációja megegyezik a pH-potenciometrikus vizsgálatok kivitelezésénél alkalmazottal. A spektrumokat szobahőmérsékleten 220-800 nm hullámhossz tartományban vettük fel különböző pH-értékeken. A méréseket 0,100 cm és 1,000 cm úthosszú küvetákban végeztük. A spektrumokat Microsoft Office Excel programban ábráztuk.

### **3.6. Oxidációs kísérletek**

Az oxidáció lejátszódásának és előrehaladásának követésére nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (*HPLC: High-Performance Liquid Chromatography*) alkalmaztunk. A vizsgálatoknál 1,00 cm<sup>3</sup> mintát állítottunk össze, ahol a peptid koncentrációja 1,0 mmol/dm<sup>3</sup> volt. Az egyes oxidációs minták fémion-peptid arányának megfelelően változtattuk a hozzáadott fémion mennyiségét. Az Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub> nonapeptid esetében az oxidáció során keletkezett termékek meghatározása érdekében félpreparatív folyadékkromatográfot használtunk. Az elválasztásnál az oxidációhoz 20 mg nonapeptidet használtunk fel, míg a többi komponenst ezzel arányosan adtuk a mintához. A pH beállítására ~0,2 mol/dm<sup>3</sup>, pontosan ismert koncentrációjú KOH-oldatot alkalmaztunk. Az oxidációt 1%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hozzáadásával indítottuk el. Az

aszorbinsavat tartalmazó minták esetében az aszorbinsavat a peptidhez képest hússzoros feleslegben alkalmaztuk. A fémion-katalizált oxidációt Na<sub>2</sub>EDTA-oldat ötszörös feleslegével állítottuk le a mintavétel időpontjában. A vizsgálatokat pH = 7,4 értéken és 25 °C-on hajtottuk végre. A peptidok oxidációs termékeinek azonosítására LC-MS, offline MS, illetve MS/MS méréseket végeztünk.

A mérésekhez használt analitikai HPLC Jasco MD-2010 plus diódasoros detektorral, míg a félpreparatív HPLC Jasco UV-2077 plus UV-látható detektorral volt felszerelve. A reakció követésére használt analitikai kolonna paraméterei a következők: Teknokroma Europa Protein C18 (250 mm × 4,6 mm, 300 Å, 5 µm). A félpreparatív kolonnát frakciószedésre használtuk, ennek paraméterei a következők: Grace Vydac Protein and Peptide C18 218TP510 (250 mm × 10 mm, 300 Å, 5 µm). Elválasztáshoz eluensként vizet (Mobil A) és acetonitrilt (ACN) (Mobil B) használtunk, amelyek 0,1 % (V/V) TFA-t tartalmaztak. Áramlási sebességnek az analitikai HPLC esetén 1,00 ml/percet, míg a félpreparatív folyadékkromatográfiás módszer esetén 2,00 ml/percet választottunk.

Az alkalmazott folyadékkromatográfiás módszerek:

- A **Cu(II):Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Aszorbinsav=1:1:4:4** rendszer elválasztására használt gradiens módszer:

Idő (perc)	Mobil A	Mobil B
0,0	100	0
15,0	80	20
22,0	80	20
29,5	100	0

- Az **Ac-SKPKNMKHA-NH<sub>2</sub>** peptid oxidációjának követésére használt HPLC módszerek a Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendszerben a vizsgált védőmolekulák jelenlétében:

—; *HPCIH; HPCFUR; XITHIO; Aszorbinsav*

t (perc)	Mobil A	Mobil B
0,0	100	0
3,0	100	0
9,0	92	8
24,0	92	8
30,0	100	0

- Az *Ac-SKPKTNMKHM-NH<sub>2</sub>* peptid oxidációjának követésére használt HPLC módszerek a Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendszerben a vizsgált védőmolekulák jelenlétében:

—, <i>X1FUR; X1THIO;</i> <i>6F-Salpyran</i>			<i>HPCIH; HPCFUR; Salpyran;</i> <i>AEtQ; ACyQ</i>			<i>4F-Salpyran</i>		
t (perc)	Mobil A	Mobil B	t (perc)	Mobil A	Mobil B	t (perc)	Mobil A	Mobil B
0,0	100	0	0,0	100	0	0,0	100	0
3,0	100	0	3,0	100	0	3,0	100	0
9,0	88	12	9,0	86	14	9,0	90	10
24,0	88	12	24,0	86	14	24,0	90	10
30,0	100	0	30,0	100	0	30,0	100	0

<i>MetO-Salpyran; 4CF<sub>3</sub>O-Salpyran</i>			<i>Aszkorbinsav</i>		
t (perc)	Mobil A	Mobil B	t (perc)	Mobil A	Mobil B
0,0	100	0	0,0	100	0
3,0	100	0	5,0	100	0
5,0	88	12	8,0	90	10
16,0	88	12	14,0	90	10
17,0	75	25	15,0	88	12
27,0	75	25	24,0	88	12
28,0	100	0	30,0	100	0
30,0	100	0			

### 3.7. Tömegspektrometria (ESI-TOF-MS)

A peptidok, proteinek és fémkomplexek vizsgálatára széles körben alkalmazzák az ESI-MS módszert. A termékek fragmentálódását, hasadását vizsgálva tandem MS módszerrel szerkezeti információkra is szert tehetünk. Az elvégzett oxidációs vizsgálatok termékeinek azonosítására a tömegspektrometria megfelelő módszerként szolgál.

A minta komponenseinek gerjesztésére elektroporlasztásos-ionizációs (ESI) technika használható, amely során a vizsgált (oxidált) peptid fragmentációja elkerülhető, így ezzel a tömegük elsődlegesen meghatározható. Ennél a módszernél a mintát atmoszférikus nyomáson, folyadékárammal juttatjuk az ionforrásba, ahol az ionok az atmoszférikus nyomású térben képződnek. Az ionképződést a porlasztó kapillárisra kapcsolt elektrosztatikus tér eredményezi. A kapilláris hegye és az ellenelektrod között elektrosztatikus tér jön létre, így a kapilláris végén lévő folyadék felszínén töltéstöbblet alakul ki, melynek hatására a kapillárisból kilépő folyadék kúpszerűen kicsúcsosodik. Az elektrolitikus porlasztás eredményeképpen töltött cseppek képződnek, melyekből a szárítógáz

segítségével az oldószer elpárolog, és gázfázisú ionok keletkeznek. A keletkező ionokat először egy elektromos mező felgyorsítja, majd a nagyvákuum alatt levő TOF (time of flight, repülési idő) analizátorba jutva a nagyfeszültség hatására tömeg/töltés ( $m/z$ ) értékük alapján különböző időben kerülnek a detektorba. Tandem MS vizsgálat során az oxidált termék prekursorionként történő kiválasztását követően annak fragmentációjával megadható a pontos összetétele is. A kutatás során elsődlegesen arra voltunk kíváncsiak, hogy az oxidáció során a peptid szekvenciájában található aminosavak közül melyek oxidálódnak.

A keletkezett termékek azonosítására LC-MS, offline ESI-MS és MS/MS technikát alkalmaztunk. A méréseket a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékén* található Bruker MaXis II. ESI-TOF MS készüléken Dr. Csire Gizella, illetve az *Alkalmazott Kémia Tanszéken* Dr. Nagy Lajos végezte egy MicroTOF-Q típusú Qq-TOF MS készülékkel (Bruker Daltonik, Bréma, Németország) és ESI ionforrás mellett pozitív módban. A mintabevitel sebessége 3  $\mu$ l/perc volt, amelyet egy fecskendőpumpával (Cole-Parmer Ins. Co., Vernon Hills, IL, USA) kiviteleztek. A spray feszültsége 4 kV-ra lett állítva, a szárító gáz ( $N_2$ ) hőmérséklete 200 °C volt, áramlási sebessége 4 l/perc. A nitrogén ütközési gázként is szolgált az MS/MS vizsgálatoknál. A nyomás az ütközési cellában  $1,2 \cdot 10^{-3}$  mbar volt. A prekursorionok az MS/MS-nél 5  $m/z$  izolációs szélességben lettek kiválasztva. Külső kalibrálóként ESI körülmények között a nátrium-trifluoracetát oldatból keletkező klaszterionok szolgáltak.

### 3.8. Ciklikus voltammetria (CV)

A ciklikus voltammetria (CV) egy széles körben használt elektroanalitikai mérési technika, amely minőségi és mennyiségi információt is képes szolgáltatni. A módszer a feszültség szabályozásán alapul. Mérés közben a mintaoldatot tartalmazó elektrolízis cellába merített munkaelektrod és az állandó potenciálú referenciaelektrodok között lineárisan változtatjuk a feszültséget, miközben detektáljuk az átfolyó áramot a munka- és az ellenelektrod között. A mérés során kapott átfolyó áramerősséget ábrázolva a feszültség függvényében megkapjuk a voltammogramot. A felvett voltammogramon ábrázolt görbék szimmetriája, a leolvasott csúcspotenciálok ( $E_{p,a}$  ill.  $E_{p,c}$ ) és csúcsáramok ( $I_{p,a}$  ill.  $I_{p,c}$ ) mind információt adnak. A görbe alakja alapján a redoxireakciók reverzibilitásáról bizonyosodhatunk meg. Ha a vizsgált potenciáltartományban a voltammogramon nem látható az oxidációs vagy redukciós csúcs párja, akkor a vizsgált elektrokémiai átalakulás irreverzibilis. A módszer továbbá használható komplexek látszólagos stabilitási állandójának meghatározására, reakciómechanizmusok felderítésére. Továbbá az anódos és katódos folyamatok

során kapott csúcsáramok, illetve az áram lépcsőmagassága mennyiségi meghatározásra is alkalmazható.

A méréseket BASI Epsilon EClipse készüléken végeztük, szén munkaelektrod (CHI104), Ag/AgCl 3 mol/dm<sup>3</sup> NaCl referenciaelektrod ( $E_{1/2} = +209$  mV, normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva) és platina ellenelektrod (ALS Co. Japan) mellett. A rendszer kalibrálását K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] oldattal végeztük ( $E_{1/2} = +458$  mV, normál hidrogénelektrodra vonatkoztatva, I = 0,5 mol/dm<sup>3</sup> KCl).<sup>185</sup> A mérésekhez állandó ionerősséget 0,20 mol/dm<sup>3</sup> KNO<sub>3</sub> biztosította. A vizsgált vizes oldatok térfogata 1 cm<sup>3</sup> volt. Az oldatban a vegyületek koncentrációja 1,0 mmol/dm<sup>3</sup> volt, míg a Cu(II)-ligandum arányt korábbi tapasztalatok alapján 1:5-re állítottuk be. Az oldat pH-értékét KOH- és HNO<sub>3</sub>-oldatokkal állítottuk be. Az X1FUR és Salpyran réz(II)-komplexeinek ciklikus voltammogramját 800 – (-600) mV tartományban 100 mV/sec pásztázási sebességgel vettük fel 25 °C-on.

### **3.9. Aszkorbát fogyasztás kísérlet**

A képződő reaktív oxigén származékok (ROS) megakadályozásának mérésére szolgáló egyszerű indirekt módszer. Az aszkorbinsav, mint redukálószer a jelenlevő réz(II)ionokat redukálja réz(I)ionná, miközben reaktív oxigén származékok keletkeznek. A reakció során az aszkorbinsav többek között dehidroaszkorbinsavvá alakul át. Ez a folyamat az UV tartományban könnyen követhető spektrofotometriával.

A kísérletet Agilent 8453 spektrofotométerrel követtük 265 nm hullámhosszon. A minta 25 °C-os hőmérsékletét a fotométerhez csatlakoztatott Hewlett Packard 89090A termosztát biztosította. A mintaoldatok végtérfogata 2,50 cm<sup>3</sup> volt. Az oldat 100 mmol/dm<sup>3</sup> HEPES puffert tartalmazott, és a pH-t 0,2 mol/dm<sup>3</sup> HCl-oldattal állítottuk be 7,1-re. A HEPES puffer és aszkorbinsav törzsoldatokat frissen készítettük el. A Salpyran, CuCl<sub>2</sub> és aszkorbinsav koncentrációi a mintaoldatban 12 μM, 10 μM és 100 μM voltak. A komponenseket a következő sorrendbe adtuk az oldathoz: HEPES puffer, HCl, víz, aszkorbinsav, CuCl<sub>2</sub> és Salpyran. A Salpyran oldatba juttatása minden esetben a CuCl<sub>2</sub> hozzáadása után 5 percet követően történt. A kísérletet 25 °C-on és három különböző körülmény esetén végeztük el: 1) argonnal kizárva a levegő oxigénjét, 2) lezárt küvetében, oxigén eltávolítása nélkül és 3) nyitott küvetében. Az oldatot folyamatosan 300 rpm fordulatszámmal kevertettük. A használt kvarcküvetta úthossza 1,000 cm volt. A Salpyran nélküli kontroll kísérleteket 2 órán keresztül, míg a Salpyran ligandum hozzáadásával végzett kísérleteket 3 órán keresztül követtük. Az 1) esetben argon gázt vezettünk be minden felhasznált törzsoldatba, illetve a HEPES puffert, sósavat és vizet tartalmazó küvetébe legalább 15 percen

keresztül. A küvétát a kísérlet teljes ideje alatt lezártuk kivéve, amikor az aszkorbinsavat,  $\text{CuCl}_2$ -oldatot és Salpyrant adtuk az oldathoz. A 2) esetben nem zártuk ki az oxigént, azonban a kísérlet teljes ideje alatt lezárva tartottuk a küvétát, míg a 3) esetben a kűvetta nyílása a kísérlet teljes ideje alatt nyitva volt, ezáltal biztosítva a levegő oxigénjének szabad áramlását.

#### 4. Kísérleti eredmények

##### 4.1. Az Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub> mutáns oxidációs vizsgálata

Kutatásunk egyik célja a fémion-katalizált oxidáció optimális körülményének meghatározása volt. Ennek érdekében a vizsgálatokra a HuPrP (105-112) fragmens egy olyan mutánsát választottuk, melyben a 112-es pozícióban fellelhető metionint alaninra cseréltük, illetve a peptid oldhatóságának növelése érdekében az N-terminális végen egy szerin aminosav kapcsolódik a szekvenciához. Kutatócsoportunkban korábban már vizsgálták ezen peptid koordinációs kémiját réz(II)ionnal.<sup>186</sup> A korábbi oldategyensúlyi vizsgálatok alapján elmondható, hogy az Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub> terminálisan védett peptid esetében a komplexképződési folyamatban az imidazolil-oldallánc és a deprotonált amidnitrogének vesznek részt. A pH-potenciometriás titrálással meghatározott savi disszociációs állandók és a Cu(II):Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub> rendszerben képződő komplexek és stabilitási állandók az *1. táblázatban* láthatók.

*1. táblázat: Az Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub> szekvenciájú peptid deprotonálódási állandói és réz(II)-komplexeinek stabilitási állandói<sup>186</sup>*

Ac-SPKTNMKHA-NH <sub>2</sub>	
pK <sub>Im</sub>	6,25
pK <sub>Lys1</sub>	9,90
pK <sub>Lys2</sub>	10,71
[CuLH <sub>2</sub> ] <sup>4+</sup>	24,32
[CuL] <sup>2+</sup>	12,62
[CuLH <sub>-1</sub> ] <sup>+</sup>	5,36
[CuLH <sub>-2</sub> ]	-4,57
[CuLH <sub>-3</sub> ] <sup>-</sup>	-15,0

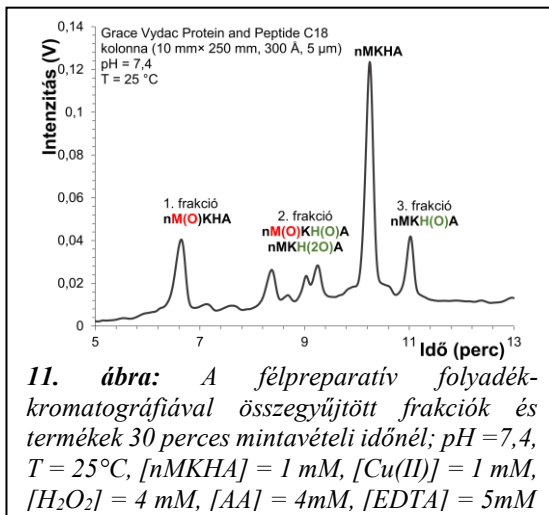
A réz(II)ionnal végzett oldategyensúlyi vizsgálatok során keletkezett fémkomplexek meghatározására a pH-potenciometria mellett UV-látható spektrofotometria és CD-spektroszkópia módszereket alkalmaztak a komplexek koordinációs módjának és szerkezetének meghatározására. A komplexképződés a réz(II)ionhoz a hisztidin deprotonált imidazolium gyűrűjén keresztül kezdődik el, kialakítva a [CuLH<sub>2</sub>]<sup>4+</sup> komplexet. A [CuL]<sup>2+</sup> komplexben az imidazol nitrogénatom mellett az N-terminális részen található két amidnitrogén és a metionin tioétercsoportja vesz részt. A nagyobb pH-tartományban képződő

$[\text{CuLH}_{-1}]^+$ ,  $[\text{CuLH}_{-2}]$  és  $[\text{CuLH}_{-3}]^-$  komplexekben egy harmadik amidnitrogén koordinálódik a fémionhoz, miközben a tioétercsoportot kiszorítja a koordinációs szférából. Ezen komplexek koordinációs módja  $[\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-]$ , melyek csak a lizil-oldalláncok protonáltóságában térnek el. Az oxidációs kísérleteknél alkalmazott 7,4 pH-értéknél majdnem azonos arányban a  $[\text{CuL}]^{2+}$  és  $[\text{CuLH}_{-1}]^+$  komplexek vannak jelen a rendszerben.

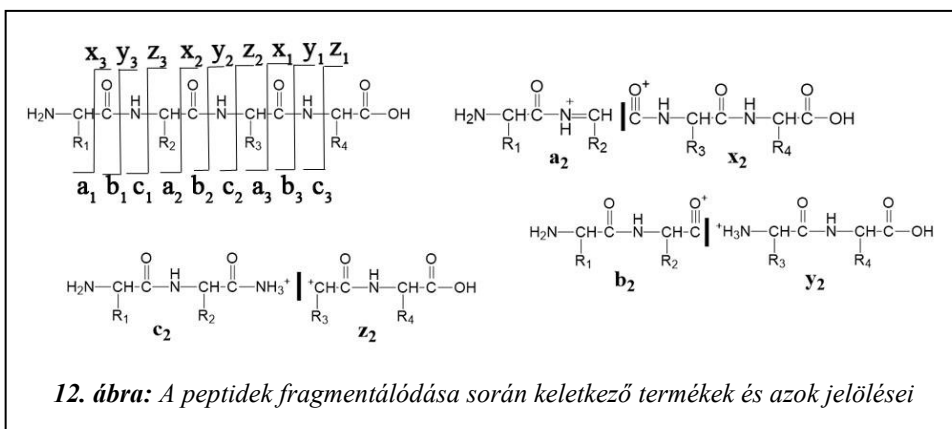
A vizsgált Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub> (későbbiekben: *nMKHA*) peptid két aminosavat is tartalmaz, melyek bizonyítottan érzékenyek az oxidációra hidrogén-peroxid jelenlétében: egy hisztidint és egy metionint. Az oxidációt egyes fémionok, mint például a réz(II)- és vas(III)ionok képesek katalizálni. Az optimális oxidációs körülmények felderítése érdekében a mutáns peptid oxidációját hidrogén-peroxiddal, illetve a hozzáadott fémionnal és L-askorbinsavval (C-vitamin) különböző arányokban vizsgáltuk. Az oxidáció lejátszódását folyadékkromatográfias módszerrel követtük, megadott időközönként mintát véve a reakcióelegyből. A kromatogramok segítségével a folyamat nyomon követése mellett a keletkező termékek száma is megadható, viszont a termékek azonosításához maga a HPLC módszer nem elegendő.

Az *nMKHA* - hidrogén-peroxid 1:4 arányú reakcióelegy esetén az oxidáció lejátszódását tapasztaltuk, azaz maga a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is képes oxidálni a peptidet, nem szükséges a redoxaktív fémion jelenléte. A kapott kromatogramok alapján egy termék képződött a reakció során. A Cu(II):*nMKHA*:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1:1:4 arányú rendszert vizsgálva az előbbivel megegyező retenciós idejű termék keletkezett, azonban a folyamat gyorsabban játszódott le, ami bizonyítja a réz(II)ion katalitikus hatását az oxidációra. Az előzővel megegyező, azonban tízszeres hidrogén-peroxid arány esetén az oxidáció a vártak alapján még gyorsabban játszódik le, vagyis a hidrogén-peroxid koncentrációja is befolyásolja az oxidációt. A peptid oxidációjára az aszkorbinsav hatását is megvizsgáltuk. A folyadékkromatográfias kísérlet eredményei alapján az *nMKHA*:AA = 1:20 oldatban nem következett be változás egy óra elteltével sem, ugyanez igaz a Cu(II):*nMKHA* = 1:1 esetén is. Ebből arra következtethetünk, hogy a levegőben levő O<sub>2</sub> — csak Cu(II) vagy aszkorbinsav jelenlétében — nem elegendő az ez idő alatt bekövetkező oxidációhoz. Azonban a Cu(II):*nMKHA*:AA = 1:1:20 reakcióelegyben már bekövetkezik a peptid oxidációja O<sub>2</sub> jelenlétében is, és több termék képződését is detektáltuk. Ezen reakciónál fontos megjegyezni, hogy az aszkorbinsav jelenléte a Cu(II)-iont Cu(I)-ionná redukálja, miközben •OH keletkezik, ami erősebben oxidálja a peptidet, mint az O<sub>2</sub>. Épp ezért nem meglepő, hogy ugyanezen rendszer vizsgálata esetén hidrogén-peroxidot is hozzáadva a reakcióelegyhez a keletkezett termékek számának és mennyiségének növekedése tapasztalható.

A folyadékkromatográfias kísérletek az oxidáció lejátszódásáról és a keletkezett termékek számáról adnak információt, viszont arról nem, hogy mely aminosavak oxidálódtak, illetve mi a keletkező termékek szerkezete. Az oxidáció során keletkezett termékek meghatározása érdekében folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektroszkópiát (LC-MS) és tandem tömegspektroszkópiát (MS/MS) használtunk. Az LC-MS kísérleteknél egyes jelek intenzitása túl kevésnek bizonyult online MS/MS mérések végzéséhez. Ezért az



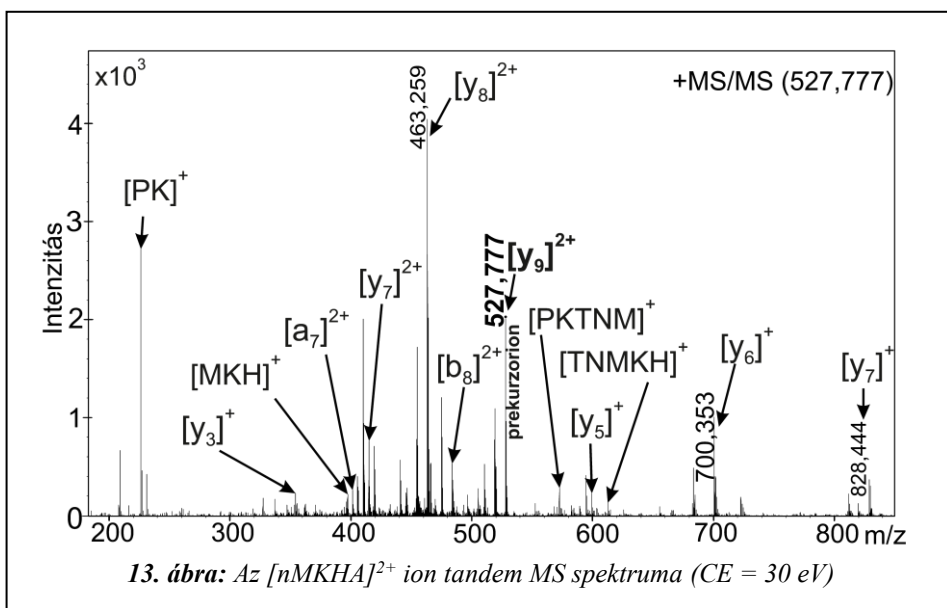
oxidáció során keletkező termékek szerkezetének felderítése érdekében a Cu(II):nMKHA:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:aszorbinsav = 1:1:4:4 arányú mintában képződő termékeket felpreparatív folyadékkromatográfiával elválasztottuk egymástól, és az egyes csúcsoknál gyűjtött frakciókat külön vizsgáltuk MS és offline MS/MS módszerekkel. A 11. ábrán látható frakciókból négy oxidált terméket sikerült azonosítani a nonapeptid mellett.



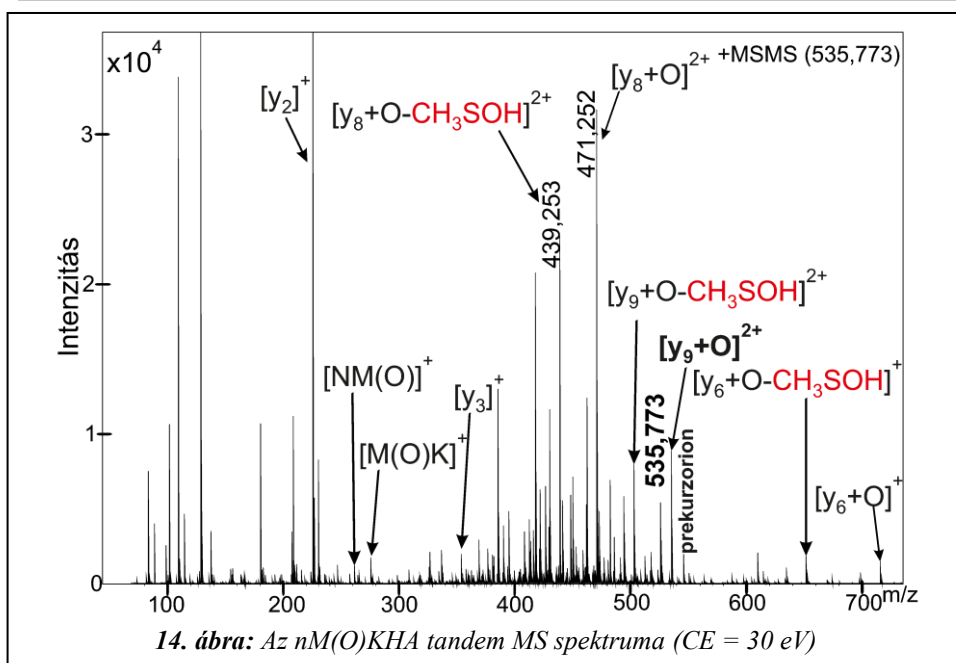
**12. ábra:** A peptid fragmentálódása során keletkező termékek és azok jelölései

A peptid fragmentálódása során keletkező termékek jelölését a 12. ábra mutatja be egy tetrapeptid példáján keresztül. A töltés helyzetétől függően különböző fragmens ionokat különböztetünk meg. Ha a töltés az N-terminuson marad, akkor az **a**, **b** és **c** ionokról beszélünk, melyek a peptidláncban bekövetkező

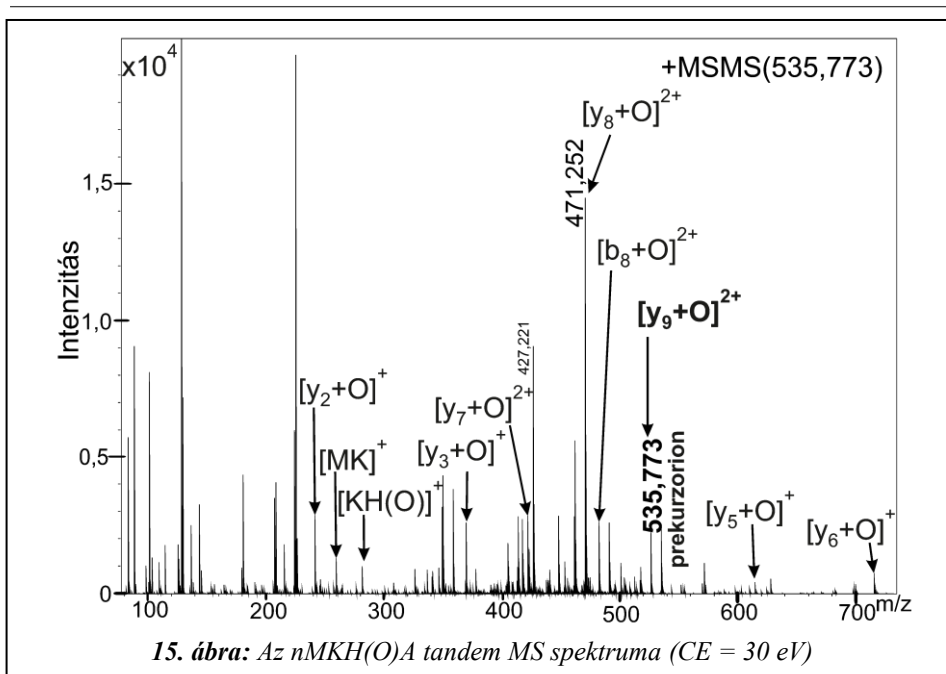
hasadás helyében különböznek. Ha a töltés a C-terminuson marad, akkor *x*, *y* és *z* betűkkel jelöljük a termékionokat. Ha a peptidláncon a kötés hasadása az  $\alpha$ -szénatom és az amidkötés karbonilcsoportja között jön létre, az ionokat „*a*” és „*x*” betűkkel jelöljük. Ha a hasadás az amidkötés között történik, akkor „*b*” és „*y*”-nal jelölt ionok képződnek, illetve ha az  $\alpha$ -szénatom és az amidnitrogén között hasad a peptidlánc, a termékionokat „*c*” és „*z*”-vel jelöljük.<sup>187</sup>



Az Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub> peptid ( $[nMKHA]^{2+}$ ) 527,777 m/z értéknél jelenik meg (számított: 527,777 m/z) kétszeres pozitív töltéssel. A peptid MS/MS spektruma a 13. ábrán látható. A peptid fragmentációja során 828,444 m/z értéknél (számított: 828,451 m/z) az  $[y_7]^+$ -ion, 700,353 m/z értéknél (számított: 700,356 m/z) az  $[y_6]^+$ , 599,298 m/z értéknél (számított: 599,308 m/z) az  $[y_5]^+$  egyszeresen pozitív töltésű ionok jelei láthatók. Az  $[y_3]^+$  iont 354,221 m/z (számított: 354,225 m/z), az  $[a_3]^+$  iont 327,204 m/z (számított: 327,203 m/z) értékeknél észleltük, az előbbi termékion NH<sub>3</sub> vesztesével együtt 337,190 m/z-nél (számított: 337,198 m/z). Az nMKHA fragmentálódási útvonalának több kétszeresen protonált formáját is detektáltuk: a  $[b_8]^{2+}$  iont 483,745 m/z-nél (számított: 483,745 m/z), az  $[y_8]^{2+}$  iont 463,259 m/z értéknél (számított: 463,256 m/z), illetve ugyanezen ionok NH<sub>3</sub> vesztesét is. Az MS/MS spektrumon továbbá látható még az  $[y_7]^{2+}$  termékion 414,732 m/z (számított: 414,729 m/z) és az  $[a_7]^{2+}$  ion is 401,211 m/z (számított: 401,218 m/z) értékeknél.



Offline tömegspektrometriás méréssel megállapítottuk, hogy az első frakcióban egy egyszerűen oxidált termék található. Az nMKHA ligandum oxidációjakor keletkező  $[y_9+O]^{2+}$  ion ( $[nMKHA+O]^{2+}$ ) az **535,773 m/z** (számított: 535,774 m/z) értéknél detektálható, melynek felvett MS/MS spektrumát a *14. ábra* mutatja be. Az  $[nMKHA+O]^{2+}$  fragmentációja alapján megállapítottuk, hogy a keletkezett oxidációs terméknél a metionin oxidálódott metionin-szulfoxidá. A fragmentáció az N-terminus irányából indul. Az MS/MS spektrumon a metionin oxidációját határozottan bizonyítja az  $[y_3]^+$  ion ( $[KHA]^+$ ) jelenléte 354,224 m/z (számított: 354,225 m/z) értéknél, tagjai a lizin, hisztidin és alanin, és a részecske nem tartalmaz az összetételénél több oxigént. A metionin oxidációját többek között bizonyítja még az  $[M(O)K]^+$  és  $[NM(O)]^+$  ionok jelenléte, 276,138 m/z (számított: 276,138 m/z) és 262,085 m/z (számított: 262,086 m/z) értékeknél. A mérés alapján találtunk még  $CH_3SOH$  összegképletű, 63,998 Da-hoz köthető tömegvesztést, amely az oxidált termékről hasad le. Ezt összesen három ion esetében figyeltük meg, többek között a 439,253 m/z-nél megjelenő  $[y_8+O-CH_3SOH]^{2+}$  ionnál, melynek számított 439,254 m/z értéke jó egyezésben van a mért eredménnyel. A fent említett 63,998 Da vesztes karakterisztikus a metionin-szulfoxid oldalláncot tartalmazó peptidek és fehérjék fragmentációjára. Korábban más kutatócsoportok is leírták a fent említett karakterisztikus veszteszt, vizsgálataik eredménye és az általunk kapott eredmények mind a metionin oxidációjára, illetve metionin-szulfoxid keletkezésére utalnak.<sup>188, 189</sup>



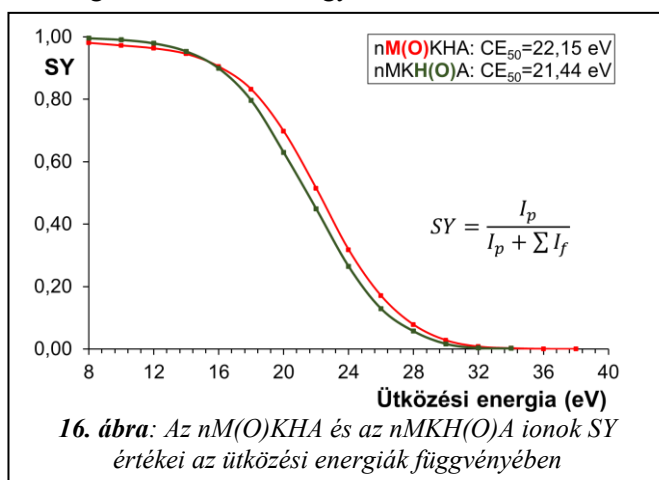
A harmadik frakcióban keletkező oxidált terméket **535,773 m/z** (számított: 535,774 m/z) értéknél detektáltuk. Az oxidált részecske,  $[y_9+O]^{2+}$  ( $[nMKHA+O]^{2+}$ ), az első frakcióban található termékkel megegyező molekulatömeggel rendelkezik, azonban a tandem MS mérés fragmentációs útvonala alapján az oxidáció a hisztidinnél következik be. A 15. ábrán látható, hogy a 471,252 m/z-nél (számított: 471,253 m/z) az  $[y_8+O]^{2+}$  ion esetében egy  $C_3H_8N_2O$  összegképletű, 88,062 Da vesztés megy végbe és egy 427,221 m/z értékű jel (számított: 421,221 m/z) detektálható. A hisztidin oxidációját a következő ionok egyértelműen alátámasztják: az  $[y_3+O]^+$  ion 370,219 m/z-nél (számított: 370,220 m/z) és a  $[KH(O)]^+$  ion 282,156 m/z-nél (számított: 282,156 m/z). Az  $[y_2+O]^+$  ion 242,125 m/z értéknél (számított: 242,125 m/z) szintén bizonyítja a hisztidin egyszeres oxidációját, mivel a termékion a  $[HisAla-NH_2+O]^+$  szekvenciának felel meg. A hisztidinen lévő oxigén jelenlétét továbbá bizonyítja még egy  $[MetLys]^+$  ion 260,142 m/z értéknél (számított: 260,143 m/z), ami megerősíti, hogy a metioninon nem található oxigén. Ezek alapján határozottan mondhatjuk, hogy a frakcióban levő oxidált termékben a hisztidin egyszerűen oxidálódott, az irodalom alapján feltételezhetően 2-oxo-hisztidinné.

Tandem MS mérés során azonos fragmentációs útvonallal rendelkező vegyületek megkülönböztethetők, ha a karakterisztikus ütközési energiájuk között jelentős a különbség. A karakterisztikus ütközési energia meghatározása céljából az alkalmazott ütközési energiákat változtatva ismét megmértük ESI-MS/MS

módszerrel a metionin-szulfoxid oldalláncú **nM(O)KHA** és a 2-oxo-hisztidin oldalláncú **nMKH(O)A** oxidált termékek MS/MS spektrumát. Az egyes ütközési energiákra a kapott MS/MS spektrumból túlélési hányados (*survival yield (SY)*) értéket számoltunk a 13. képlet alapján, ahol az  $I_p$  a prekuzorion és a  $\sum I_f$  az összes termékion intenzitása.

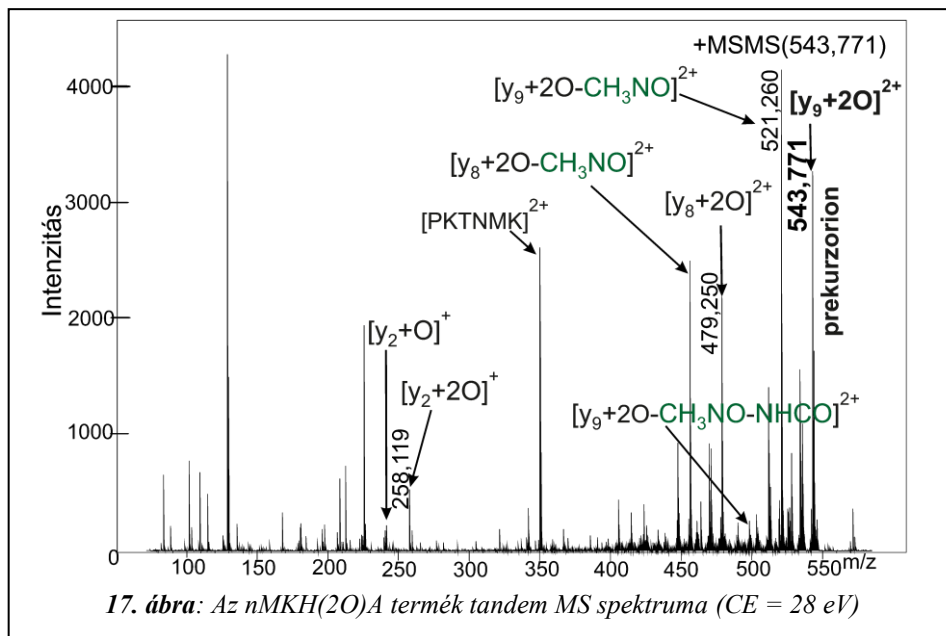
$$SY = \frac{I_p}{I_p + \sum I_f} \quad (13)$$

Az *SY* a prekuzorion intenzitásának és az összes termékion intenzitásának az aránya az MS/MS spektrumban, illetve a tömegspektrometria egyik eszköze a prekuzorion stabilitásának és belső energiájának megállapítására.<sup>190</sup> A kísérletileg számolt *SY* értékek segítségével meghatároztuk a  $CE_{50}$  értéket, ami az a kritikus ütközési energia, ahol a prekuzorion 50%-ban fragmentálódik. A módszert előzőleg már használták sztereoizomerek megkülönböztetésére, és azt találták, hogy abban az esetben, ha a két vegyület fragmentációs útvonala ugyanaz, viszont a karakterisztikus ütközési energiájuk között jelentős a különbség, akkor ezen sztereoizomerek egymástól jól megkülönböztethetők tandem MS mérés során.<sup>191</sup> A 16. ábra a két 535,774 m/z értékű oxidált termék kísérlet által meghatározott túlélési hányados (*SY*) értékeit mutatja be az alkalmazott ütközési energiák függvényében. A számolt adatok alapján kapott szigmoid görbék láthatóan elkülönülnek egymástól. Az interpolációval meghatározott  $CE_{50}$  értékek nM(O)KHA esetén 22,15 eV, míg nMKH(O)A esetén 21,44 eV. A két  $CE_{50}$  érték közötti különbség 0,71 eV. Ez a különbség elég nagy ahhoz, hogy tandem MS méréssel a két oxidált termék egymástól megkülönböztethető legyen.



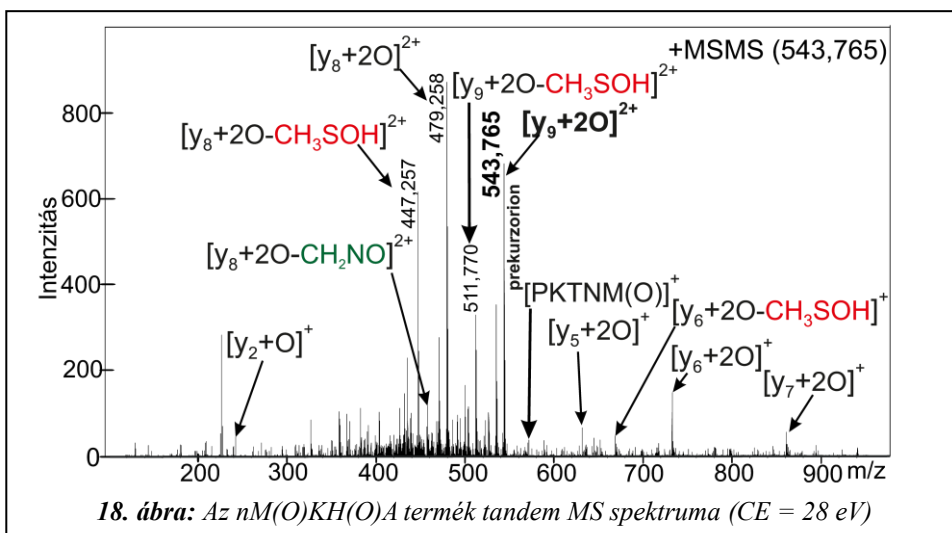
A félpreparatív HPLC mérés során a második frakcióban több egymáshoz nagyon közeli csúcsot gyűjtöttünk össze, ezért a frakcióban levő termékeket LC-

MS/MS módszerrel próbáltuk azonosítani. Tandem MS alapján megállapítottuk, hogy mindkét termék két oxigént tartalmaz, viszont az oxigének helyzete különböző. Az nMKHA oxidációjakor keletkező  $[y_9+2O]^{2+}$  ion az egyik termékénél **543,771 m/z** (számított: 543,772 m/z), míg a másik termékénél **543,765 m/z** (számított: 543,772 m/z) értéknél detektáltuk. A termékek szerkezetét az MS/MS vizsgálatok bizonyították.

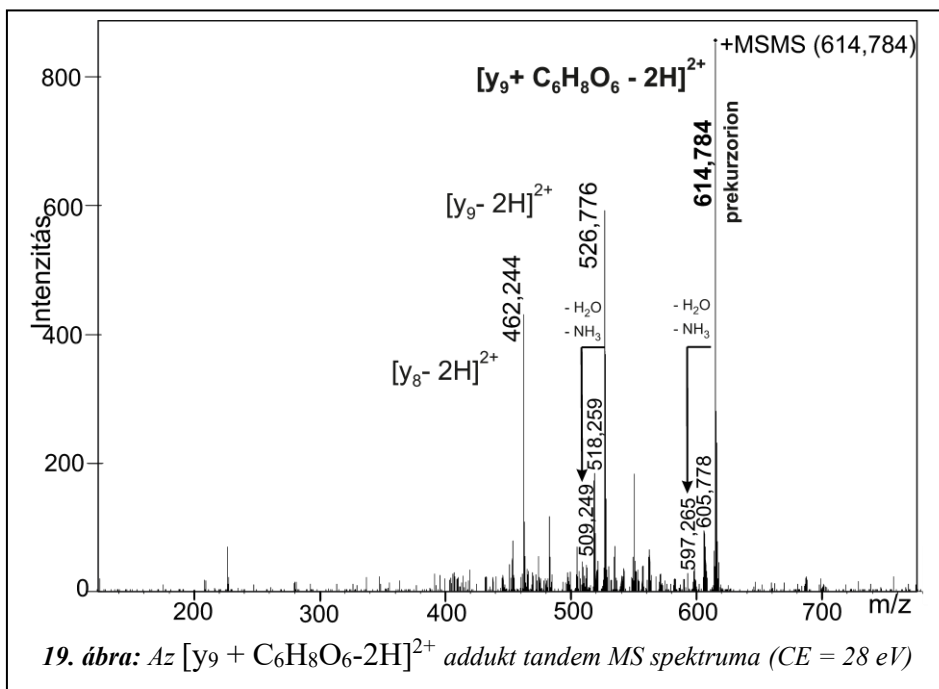


A 17. ábra a második frakcióban levő **543,771 m/z** (számított: 543,772 m/z) értékű ion MS/MS spektrumát mutatja be. Az oxidált termékben a hisztidin kétszeresen oxidálódott, vagyis mindkét oxigén a hisztidinen található, és az **nMKH(2O)A** termék keletkezett. Ezt határozottan bizonyítja az  $[y_2+2O]^+$  termékion jelenléte 258,119 m/z-nél (számított: 258,120 m/z), ami a  $[\text{HisAla-NH}_2+2O]^+$  szekvenciának felel meg, és két oxigént tartalmaz. A metionin oxidációjának hiányát bizonyítja az oxigént nem tartalmazó  $[\text{PKTNMK}]^{2+}$  ion 350,694 m/z értéknél (számított: 350,694 m/z). A 17. ábrán feltüntetett  $[y_9+2O]^{2+}$  és  $[y_8+2O]^{2+}$  ionok esetében egy 45,022 Da veszteséget is megfigyeltünk, amely a  $\text{CH}_3\text{NO}$  összegképlethez köthető. Az  $[y_9+2O]^{2+}$  ion esetében ez a veszteség kétszeresen is végbemegy és egy 498,751 m/z értékű (számított: 498,750 m/z) termékion képződik. Az 543,771 m/z részecskének fragmentációs útvonalát továbbá  $\text{NH}_3$ , illetve  $\text{H}_2\text{O}$  veszteségek is alátámasztják.

Az **543,765 m/z** (számított: 543,772 m/z) értékű, szintén a második frakcióban található kétszeresen oxidált termék tandem MS spektruma a *18. ábrán* látható. A mérések eredményeiből arra következtettünk, hogy ennél a részecskénél mind a metionin, mind a hisztidin oxidálódik. Ezt bizonyítja az  $[y_5+2O]^+$  ion 631,290 m/z (számított: 631,298 m/z) és az  $[y_2+O]^+$  ion 242,118 m/z értékek (számított: 242,125 m/z) együttes jelenléte a spektrumon. Az előbbi termékion szekvenciája  $[AsnMetLysHisAla-NH_2+2O]^+$ , amely két oxigénatomot tartalmaz, míg az utóbbi ioné  $[HisAla-NH_2+O]^+$ , ahol a hisztidin oxidálódik. Az előzőekben említett metionin oxidációra jellemző 64 Da vesztést itt is megfigyeltük az  $[y_6+2O]^+$ , az  $[y_8+2O]^{2+}$  és az  $[y_9+2O]^{2+}$  ionok esetében. Továbbá az  $[y_8+2O]^{2+}$  termékionnál egy 44,034 Da tömegű  $CH_2NO$ , illetve egy 88,060 Da tömegű  $C_2H_6N_3O$  összegképletekhez köthető egységek hasadása is kimutatható volt. Ezen termékionok is alátámasztják a hisztidinen bekövetkező oxidációt, egyúttal bizonyítva azt, hogy az oxidáció folyamán az **nM(O)KH(O)A** termék képződött, melyben a metionin és hisztidin oldalláncok metionin-szulfóxiddá és 2-oxo-hisztidinné oxidálódtak.

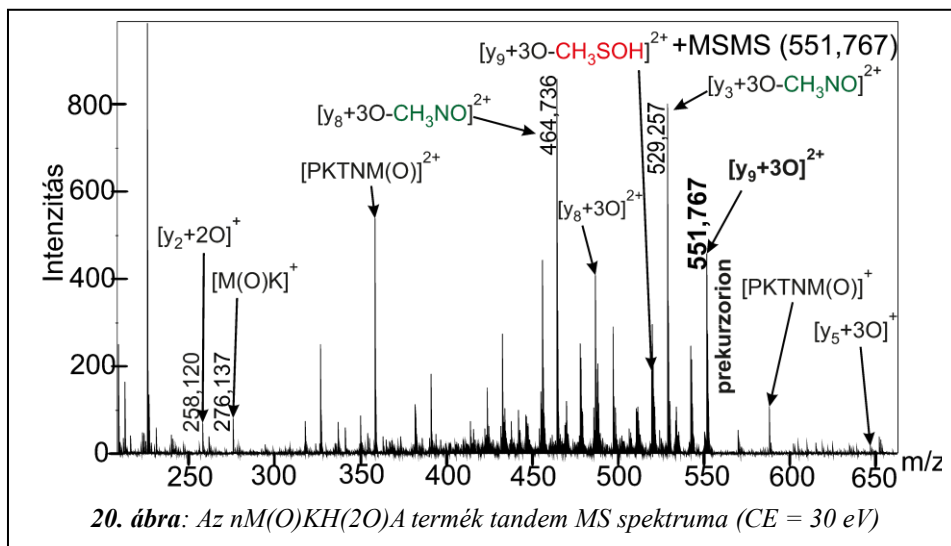


A második frakcióban továbbá egy harmadik termék is eluálódott, amelyhez a 614,784 m/z értékű  $[y_9 + C_6H_8O_6 - 2H]^{2+}$  termék tartozik. A 19. ábrán látható MS/MS spektrumból arra következtetünk, hogy az nMKHA és az aszkorbinsav egy kétszeresen protonált adduktot képez. A keletkező addukt összegképlete:  $C_{44}H_{71}N_{15}O_{13}S^*C_6H_8O_6 + 2H^+$ , melynek a Bruker Isotope Pattern nevű programmal számolt 614,785 m/z értéke jó egyezést mutat a mért értékkel. A terméket az 18. ábrán látható MS/MS spektrumon a fragmentációs útvonal is alátámasztja. A fragmentáció során az adduktból elsődlegesen az nMKHA peptid képződik. Ez a viselkedés karakterisztikus az adduktokra ESI-MS/MS mérési körülmények között. A spektrumon a  $[y_9 + C_6H_8O_6 - 2H]^{2+}$  ionnak a  $H_2O$  és  $NH_3$  molekulák vesztese is detektálható 605,778 m/z és 597,265 m/z értékeknél (számolt értékek: 605,780 m/z; 526,769 m/z). A peptidhez köthető  $[y_9 - 2H]^{2+}$  ion  $NH_3$  és  $H_2O$  vesztese is látható a spektrumon 518,259 m/z (számolt: 518,256 m/z) és 509,249 m/z (számolt: 509,250 m/z) értékeknél. Továbbá 462,244 m/z értéknél detektált (számolt: 462,248 m/z)  $[y_8 - 2H]^{2+}$  ion is jelen van a spektrumon.



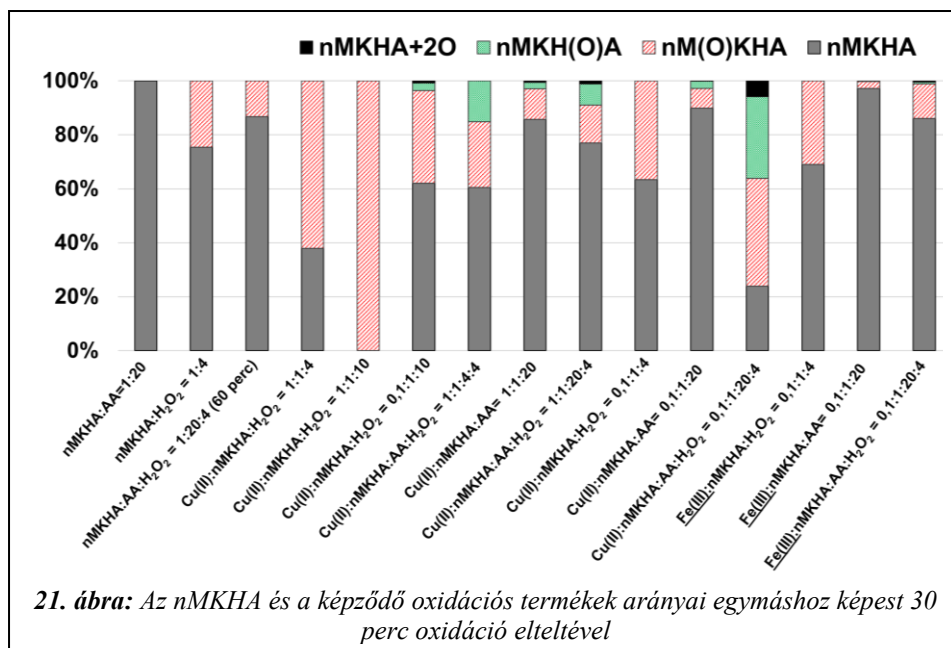
Az előzőekben bemutatott termékeken kívül a  $Cu(II):nMKHA:H_2O_2 = 0,1:1:10$  rendszerben egy háromszorosan oxidált terméket is azonosítottunk. Katalitikus mennyiségű réz(II)ion és hidrogén-peroxid nagy feleslege jelenlétében lejátszódó oxidáció során **551,767 m/z** (számolt: 551,769 m/z) értékű jelet

detektáltunk. A 20. ábrán látható MS/MS spektrum egy háromszorosan oxidált terméknek, a kétszeres pozitív töltésű  $[nMKHA+3O]^{2+}$  ionnak felel meg. Az ion tandem MS mérése alapján a keletkező termékben a hisztidin kétszeresen, illetve a metionin egyszeresen oxidálódik, vagyis a termék  $[nM(O)KH(2O)A]^{2+}$  összetételnek felel meg. A szerkezetet egyértelműen alátámasztja a 258,120 m/z értéknél jelentkező  $[y_2+2O]^+$  és a 276,137 m/z értéknél (számolt: 258,120 m/z és 276,137 m/z) detektált  $[M(O)K]^+$  ionok jelenléte a tömegspektrumon.



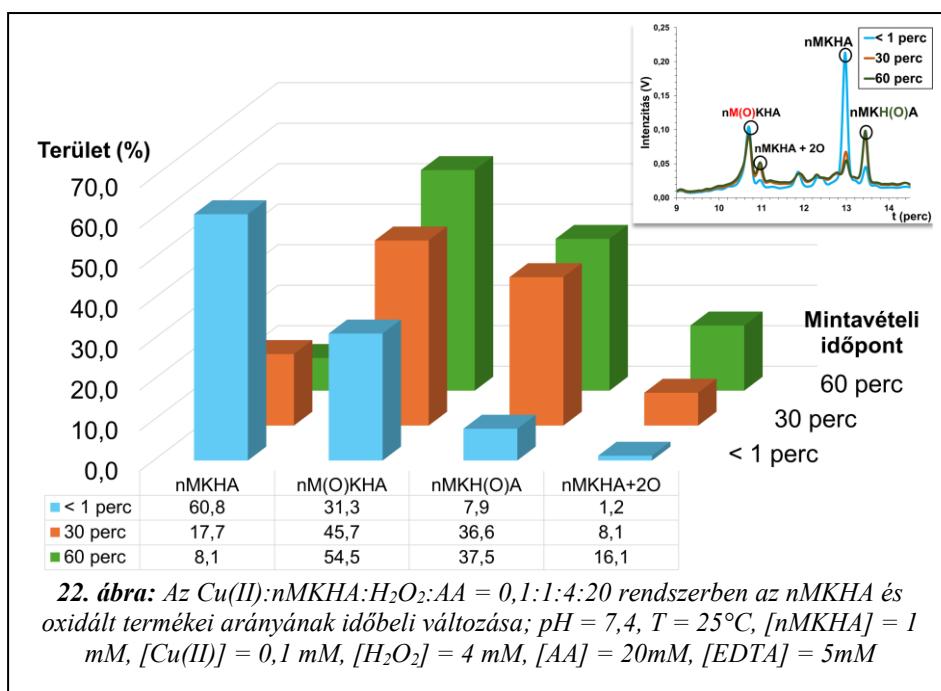
Az általunk elvégzett kísérletek alapján elmondható, hogy az Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub> peptid hidrogén-peroxiddal történő oxidációja során, illetve ekvimoláris arányú réz(II)ion jelenlétében elsődlegesen a metionin oxidálódik metionin-szulfoxidá. A hisztidin oxidációjához és a többszörösen oxidált termékek keletkezéséhez a réz(II)ion mellett szükséges az aszkorbinsav jelenléte. A 21. ábrán bemutatott oszlopdiagram az nMKHA, az egyszeresen oxidált nM(O)KHA és nMKH(O)A, valamint a kétszeresen oxidált (nMKHA+2O) termékek folyadékromatográfiával meghatározott területarányait szemlélteti egymáshoz képest 30 perc oxidációs idő elteltével. A peptid csak aszkorbinsav jelenlétében, - a vártak megfelelően, - nem oxidálódik. Az oszlopdiagramon az aszkorbinsavat az „AA” rövidítéssel jelöltem. Hidrogén-peroxid jelenlétében bekövetkezik a metionin oxidációja metionin-szulfoxidá, azonban aszkorbinsav jelenléte mellett a folyamat lelassul. Egy óra elteltével a metionin-szulfoxid aránya fele akkora, mint aszkorbinsav nélkül. A Cu(II):nMKHA:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1:1:4 rendszerben a metionin oxidációja jelentősen felgyorsul, míg tízszeres feleslegben alkalmazott hidrogén-peroxid mellett 30 perc alatt a peptid teljes mennyisége oxidálódik metionin-szulfoxid származékká. Aszkorbinsav jelenlétében vizsgált,

fémiont is tartalmazó rendszerek esetén az nM(O)KHA termék mellett megjelenik az nMKH(O)A termék is, amelyben a hisztidin 2-oxo-hisztidinné oxidálódik. Réz(II)ion és aszkorbinsav jelenlétében a korábban megfigyelthez képest a metionin oxidációjának kis mértékű visszaszorulása figyelhető meg a hisztidin oxidációjának javára.



Továbbá, mint az élő szervezetben nagymértékben fellelhető katalitikus fémiont, a vas(III)ion hatását is vizsgáltuk a nonapeptid oxidációjára. Fémion-peptid 1:1 arány esetén a Fe(III)-ionok hidrolízisét tapasztaltuk, így ezen arány esetén nem történtek vizsgálatok. Katalitikus Fe(III)-ion hozzáadásakor szintén gyorsabban játszódik le a metionin oxidációja metionin-szulfoxidá, mint fémion jelenléte nélkül; azonban aszkorbinsav jelenlétében sokkal lassabban és mennyiségében kevesebb oxidált termék keletkezik, mint ugyanazon rendszereknél réz(II)ion esetében. A Cu(II):nMKHA:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:aszorbinsav = 0,1:1:4:20 rendszerben négy oxidált terméket tudtunk azonosítani, melyek közül hármat tudtunk folyadékromatográfiásan elkülöníteni egymástól. Az említett termékek ezen arány esetén képződtek a legnagyobb mértékben. Az oxidált termékek arányainak változását egymáshoz képest a 22. ábra szemlélteti. Katalitikus mennyiségű Cu(II)-ion jelenlétében már a kezdeti mintavételi időpontban (< 1 perc) a peptid jelentős mennyisége (kb. 31 %- a) oxidálódott az nM(O)KHA termékké. Emellett kis mennyiségben a 2-oxo-hisztidin származék (nMKH(O)A) és a kétszeresen oxidált termék is megjelenik. Harminc perc

elteltével az nM(O)KHA mennyisége 14 %-kal nő, míg az nMKH(O)A közel 29 %-kal nő. Az egyszeresen oxidált termékek mennyiségének növekedésével párhuzamosan nő a kétszeresen oxidált termékek aránya. Egy óra elteltével az egyszeresen oxidált termékek mennyiségének növekedése csökkenő tendenciát mutat; azonban 30 perc és 60 perc mintavételi időpont között a kétszeresen oxidált termékek aránya (nMKHA + 2O) megduplázódik.



Összefoglalásként megállapítható, hogy a Fe(III)- és Cu(II)-ionokat tartalmazó rendszereket ugyanazon aránynál összehasonlítva a Cu(II)-ionokat tartalmazó rendszerek esetén az oxidáció nagyobb mértékben megy végbe. Ennek oka a fémion peptidhez történő koordinációjának affinitásában keresendő. Mivel a vas(III)ionok kisebb affinitással koordinálnak a vizsgált peptidhez, mint a réz(II)ionok, így feltételezhetően az oxidáció katalízise is kisebb mértékű. Ezt alátámasztja az is, hogy a Fe(III)-ion stabil komplexet főleg hard O-donoratomokat tartalmazó aminosavoldallánccokkal képez, míg az általunk vizsgált peptidben hisztidin, illetve metionin oldallánccok találhatóak, melyek soft karakterű donatoratomokat tartalmaznak, és ezekhez a Cu(II)-ion nagy affinitással kötődik, ezzel is elősegítve az oxidációt.

## 4.2. Az X1THIO és X1FUR aroil-hidrazonok kölcsönhatásai a HuPrP (103-112) fragmenssel Cu(II)- és Zn(II)ionok jelenlétében

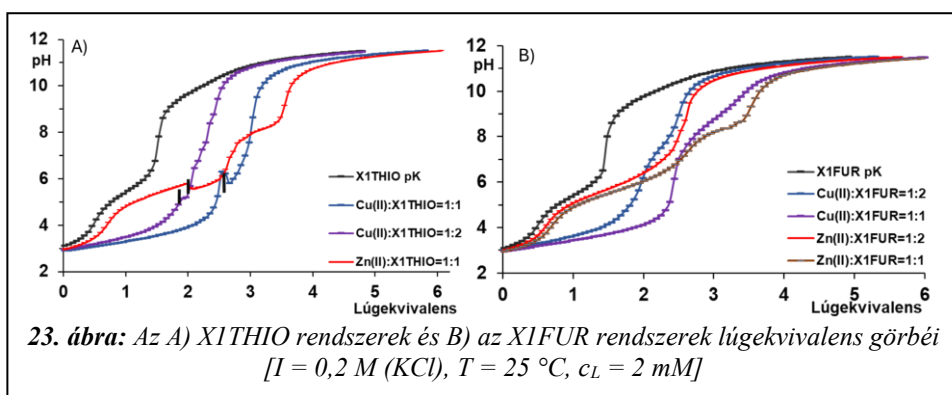
A kutatás egyik célja a fémion-peptid kölcsönhatást gyengítő kismolekulák hatásának tanulmányozása volt a HuPrP (103-112) fragmens fémion-katalizált oxidációjára. Ezért nemzetközi együttműködés keretében Nicolas Rey (Pontificia Universidade Católica Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazília) kutatócsoportjával együttműködve különböző aroil-hidrazonok hatását vizsgáltuk a peptidek oxidációjára. Az oxidáció során az oldatban fellépő kölcsönhatások megértése érdekében a két vízoldható aroil-hidrazonnal oldategyensúlyi vizsgálatokat végeztünk réz(II)- és cink(II)ionok jelenlétében, illetve vizsgáltuk a prion fragmens/aroil-hidrazon vegyes ligandum rendszerek komplexképződési folyamatát. A két tanulmányozott vízoldható aroil-hidrazon, az X1THIO (1-metil-1H-imidazol-2-karboxaldehid-2-tiofenil hidrazon) és X1FUR (1-metil-1H-imidazol-2-karboxaldehid-2-furanil hidrazon), egymástól csak a hidrazid részhez kapcsolódó csoportban különbözik, az X1THIO 2-tiofenil csoportot tartalmaz, míg az X1FUR 2-furanil csoportot. A vegyületek szerkezete a 9. ábrán látható.

### 4.2.1. Az X1THIO és X1FUR aroil-hidrazonok és réz(II)- és cink(II)-komplexeik

Az aroil-hidrazonok pH-potenciometriával meghatározott protonálódási állandói a 2. táblázatban láthatók. Az 1-metilimidazol csoport deprotonálódása pH ~ 4,5-nél kezdődik, melyet a hidrazon azometin nitrogénatomján levő hidrogén deprotonálódása követ pH 9 körül. Fiziológias pH esetén vizes oldatban mindkét aroil-hidrazon semleges formában van jelen. A két vegyület pK értékei nagyon hasonlóak, viszont az X1FUR esetén a hidrazoncsoport deprotonálódásához köthető érték kis mértékben nagyobb, ez a 2-furán szubsztituens jobb elektronküldő képességéhez köthető.

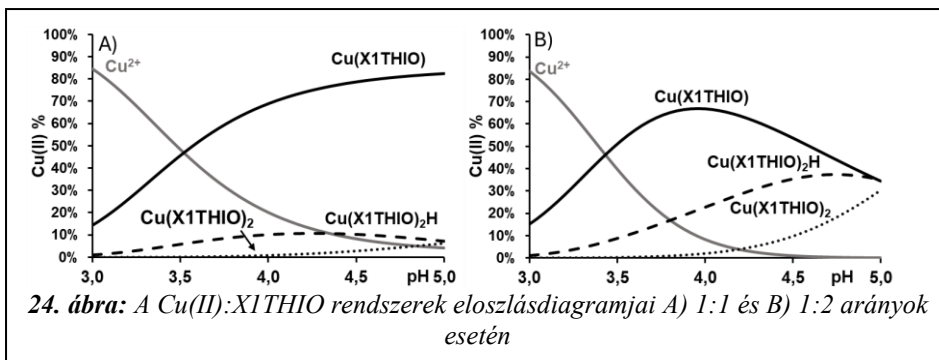
**2. táblázat:** Az X1THIO, X1FUR és a HuPrP(103-112) protonálódási állandói ( $lg\beta$ ) és réz(II)- és cink(II)-komplexeik stabilitási állandói [ $I = 0,2\text{ M (KCl)}$ ,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c_L = 2\text{ mM}$ ]

$lg\beta$	HuPrP (103-112) (Ac-SKPCKTNMKHM-NH <sub>2</sub> )		X1TIO		X1FUR	
	Cu(II)	Zn(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cu(II)	Zn(II)
HL	11,16 (3)		9,64 (1)		9,75 (1)	
H <sub>2</sub> L	21,39 (3)		14,98 (1)		15,08 (1)	
H <sub>3</sub> L	31,22 (4)		—		—	
H <sub>4</sub> L	37,38 (5)		—		—	
	Cu(II)	Zn(II)	Cu(II)	Zn(II)	Cu(II)	Zn(II)
MLH <sub>3</sub>	34,95 (3)	34,13 (5)	—	—	—	—
MLH <sub>2</sub>	—	26,50 (7)	—	—	—	—
MLH	23,41 (2)	—	—	11,88 (5)	—	12,21 (9)
ML	15,89 (2)	—	11,28 (1)	6,78 (3)	11,03 (2)	6,71 (3)
ML <sub>2</sub> H	—	—	25,19 (3)	—	24,77 (7)	—
ML <sub>2</sub>	—	—	20,13 (5)	13,52 (8)	17,79 (8)	12,99 (6)
MLH <sub>-1</sub>	6,08 (3)	—	—	—	—	—
MLH <sub>-2</sub>	-4,17 (3)	—	—	—	—	—
MLH <sub>-3</sub>	-15,23 (3)	—	—	—	—	—



A pH-potenciometriás vizsgálatok során az X1THIO vegyület komplexképződését pH 3-5 tartományban tudtuk meghatározni, mivel pH 5 felett sárga pelyhes csapadék képződését tapasztaltuk, amely nagyon lúgos pH-n ( $pH > 11$ ) sem oldódott fel. A képződő komplexek stabilitási állandóit is a 2. táblázatban tüntettem fel. A 23. A) ábrán látható lúgekvivalens görbéken feltüntetett fekete

vonala a csapadék kiválását jelzi, melyet a titrálási görbén a pH csökkenése is szemléltet. A titrálási adatok alapján pH 3 és 5 között három komplex képződését tudtuk leírni. A rendszerekben már pH < 3 értéknél elkezdődik a komplexképződés a Cu(X1THIO) kialakulásával. Ezt a 24. ábrán a részecskék eloszlása is szemlélteti.



24. ábra: A Cu(II):X1THIO rendszerek eloszlásdiagramjai A) 1:1 és B) 1:2 arányok esetén

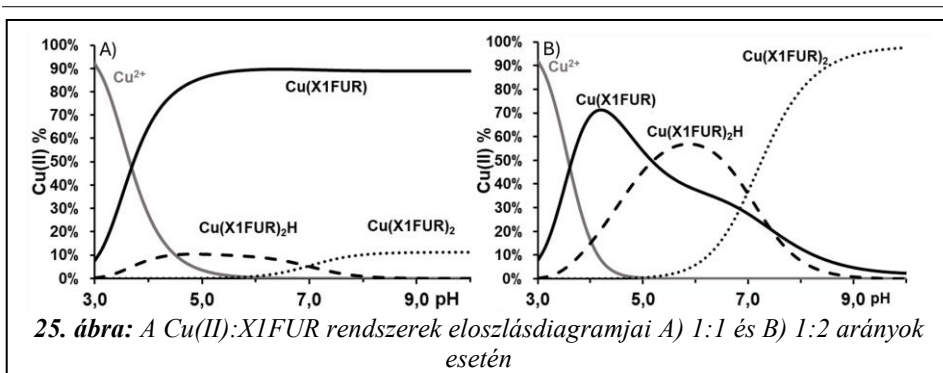
A komplexképződés során az aroil-hidrazon (N,N,O) koordinációs móddal kialakított (5,5) csatolt kelátrendszert hoz létre a réz(II)ionnal. A fémion az 1-metilimidazol N-donoratomon, illetve a Schiff-bázis típusú azometin N-donoratomon és a karbonilcsoport O-donoratomon keresztül koordinálódik. A komplexképződési folyamatot UV-látható fotometriás módszerrel is alátámasztottuk. A spektrumban a réz(II)ion koordinációjához köthető d-d töltésátviteli sáv abszorpciós maximuma fiziológiás pH-értéken 676 nm. A 24. ábra a képződő komplexek eloszlását mutatja be a vizsgált oldatokban. Ekvimoláris aránynál a Cu(X1THIO)<sub>2</sub> biszkomplex kialakulása pH ~ 4 körül kezdődik, mely a számolt tartományban csak maximálisan 10%-ban van jelen. Az 1:2 arány esetén a Cu(X1THIO)<sub>2</sub>H részlegesen protonált komplex legnagyobb arányban pH 4,6-nál van jelen, körülbelül 40%-ban képződik. A pH növelésével a részlegesen protonált biszkomplex deprotonálódásával elkezdődik a semleges töltésű Cu(X1THIO)<sub>2</sub> biszkomplex képződése. Feltételezhetően ezen komplexhez köthető a sárga csapadék megjelenése is.

Idegrendszeri betegségek esetén a réz(II)ionhoz hasonlóan a cink(II)ionok felhalmozódása is jellemző a szinaptikus részben. Épp ezért összehasonlításként a cink(II)ionnal is vizsgáltuk az aroil-hidrazonok komplexképződését. A cink(II)ion esetében pH 3 – 6 között tudtuk számolással meghatározni a komplexeket. A komplexképződés pH 4,5 körül kezdődik el a Zn(X1THIO)H és Zn(X1THIO) egyidejű képződésével, majd a semleges Zn(X1THIO)<sub>2</sub> biszkomplex pH 5,5 körül jelenik meg a rendszerben. A réz(II)-komplexhez hasonlóan a cink(II)-komplexek koordinációjában szintén az 1-metilimidazol N-donoratomja és a hidrazoncsoport

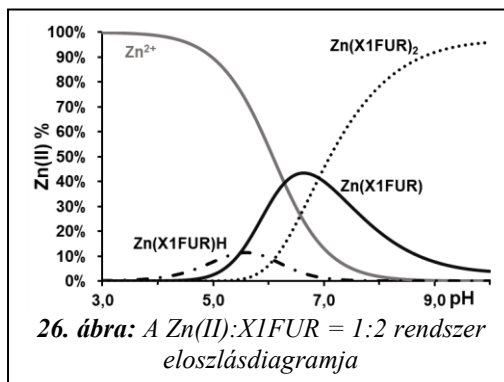
azometin N-donoratomja, valamint a karbonil O-donoratomja vesz részt. Hasonlóan a réz(II)-komplexhez, a biszkomplex halványsárga csapadékként válik le vizes oldatban.

A hasonló szerkezet ellenére a 2-furanil csoportot tartalmazó X1FUR aroil-hidrazon esetén a teljes pH-tartomány titrálási adataiból tudtunk számolni. Csapadékképződést csak 10,5-ös pH felett tapasztaltunk. Az X1THIO vegyülettel megegyező komplexeket tudtuk leírni a rendszerekben. A fentiekhez hasonlóan a komplexképződésben az X1FUR (N,N,O) koordinációs móddal (5,5) csatolt kelátrendszerű komplexet alakít ki a réz(II)- és cink(II)ionokkal. A komplexek stabilitási állandói szintén a 2. táblázatban láthatók. A vizsgált Cu(II):X1FUR rendszerekben a kezdetleges halványsárga oldat színe a titrálás folyamán intenzív sárga lett, a komplexképződés hasonlóan az X1THIO-hoz már pH 3 körül elkezdődik. Ekvimoláris körülmények között az oldat pH 9,5-nél barnássárga színe pH ~ 10,8-nál halványbarna színűvé változott, illetve kis mennyiségű barna csapadék leválását tapasztaltuk. A csapadék mennyisége a lúgosabb tartományban egyre nőtt. A 25. A) ábrán látható eloszlásdiagram is szemlélteti, hogy a rendszerben a fő komplex a Cu(X1FUR). Fiziológias pH-n (pH = 7,4) a rendszer közel 100%-ban a Cu(X1FUR) részecskét tartalmazza. Ezzel ellentétben ligandumfelesleg esetén, 1:2 aránynál az oldat már semleges pH-tartományban barnássárgává változott, viszont barna színű csapadék kiválását csak pH 11 körül tapasztaltuk. A 25. B) ábrán a 1:2 rendszer eloszlásdiagramja szemlélteti, hogy pH 4 körül a Cu(X1FUR) képződik a legnagyobb mennyiségben, majd pH 5 felett a Cu(X1FUR)<sub>2</sub>H, pH 7 felett pedig a Cu(X1FUR)<sub>2</sub> biszkomplex a domináns részecske.

A keletkező komplexek jelenlétét ESI-MS vizsgálattal is azonosítottuk. A pozitív módban végzett tömegspektrometriás mérés során a komplexek protonnal képződő adduktjait detektáltuk. A C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Cu összegképletű [Cu(X1FUR)]<sup>+</sup> részecskét 280,003 m/z értéknél, míg a (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CuH összegképletű [Cu(X1FUR)<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> részecskét 498,084 m/z értéknél detektáltuk. A részecskék jelenlétét a számolt és mért jelek izotópeloszlásának egyezése is alátámasztja.



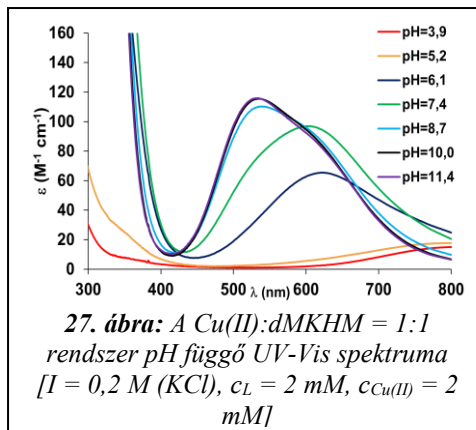
Hasonlóan az X1THIO vegyülethez, az X1FUR komplexképződési folyamatát is vizsgáltuk Zn(II)-ionokkal 1:1 és 1:2 fémion-ligandum arányok esetén. A 23. B) ábrán látható titrálási görbék alapján a komplexképződés pH 5 körül kezdődik. Ligandumfelesleg esetén pH 3 – 11 között szintelen volt az oldat, majd pH 11 felett halványsárga színű csapadék vált ki. Az ekvimoláris rendszert vizsgálva 7,5-ös pH-nál a szintelen oldat halványsárga színűvé vált, pH 8,3-nál halványsárga csapadék vált le, és a pH növelésével a csapadék mennyisége nőtt. Mindkét arány esetén három komplex van jelen a rendszerben, a Zn(X1FUR) és protonált formája, a Zn(X1FUR)H, illetve a Zn(X1FUR)<sub>2</sub> biszkomplex. A komplexek részecskeeloszlása alapján (26. ábra) ligandumfelesleg esetén a Zn(X1FUR) pH 6,5 körül maximálisan van jelen a rendszerben, a Zn(X1FUR)<sub>2</sub> képződése pH 5,5 körül kezdődik, melynek mennyisége nő a pH növelésével.



#### 4.2.2. A HuPrP (103-112) és aroil-hidrazonok vegyes ligandumú rendszerei réz(II)ionnal

Az egyedi rendszerek mérését követően a vizsgálatokat kiterjesztettük a Cu(II)/Ac-SKPKTNMKHM-NH<sub>2</sub>/aroil-hidrazon rendszerekre. Az oldategyensúlyi és spektroszkópiás vizsgálatoknál a peptid és az aroil-hidrazon mennyisége a Cu(II)-ionhoz képest ekvimoláris. Korábban a kutatócsoportunkban már tanulmányozták a HuPrP (103-112) fragmens (Ac-SKPKTNMKHM-NH<sub>2</sub>) koordinációs kémiáját a réz(II)ionnal.<sup>157</sup> A vegyes rendszerek tanulmányozásához elvégzett pH-potenciometriás kísérletek alapján kapott deprotonálódási állandók

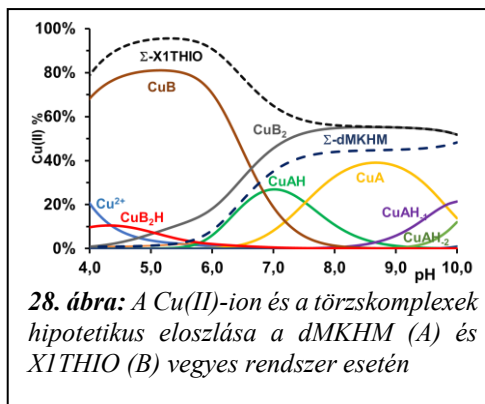
és a réz(II)-komplexek stabilitási állandóinak eredményei jól egyeznek a korábban meghatározott értékekkel. A dekapeptid meghatározott protonálódási állandói a hisztidin imidazolil-oldalláncához és a három lizin oldalláncon található aminocsoportok egymással átfedő lépésben történő deprotonálódásához rendelhetők. A peptid a réz(II)ionnal oktaédes geometriájú  $\text{CuLH}_3$  komplexet alakít ki a réz(II)ion



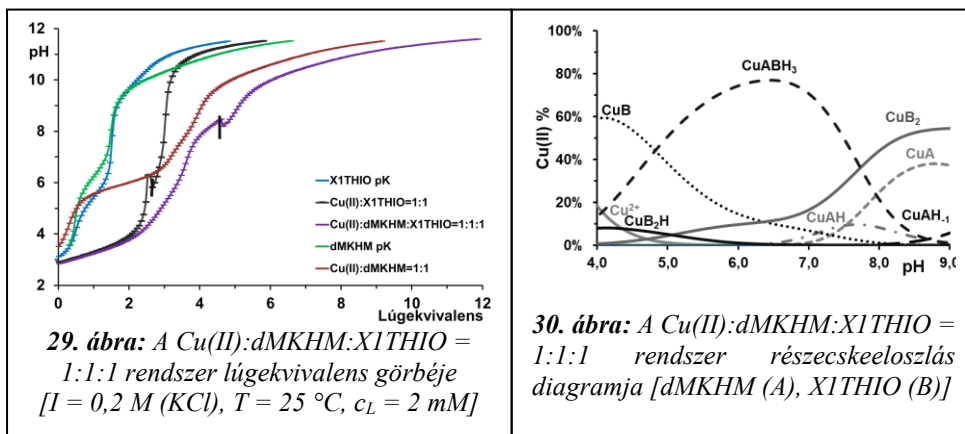
**27. ábra:** A  $\text{Cu(II):dMKHM} = 1:1$  rendszer pH függő UV-Vis spektruma [ $I = 0,2 \text{ M (KCl)}$ ,  $c_L = 2 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{Cu(II)}} = 2 \text{ mM}$ ]

egyfogó koordinációjával a hisztidin imidazolnitrogénjén keresztül, míg a három lizil-oldallánc protonált formában van jelen. Ezt követően a pH növelésével,  $\text{pH} < 6$ -nál a  $\text{Cu(II)}$ -ion két amidnitrogén egyidejű deprotonálódását indukálja, ezáltal kialakítva a  $\text{CuLH}$  összetételű komplexet. A peptidkötés kialakításában résztvevő amidnitrogének koordinációját támasztja alá a 27. ábrán látható UV-VIS spektrumban az abszorpciós maximum növekedése a pH növelésével, illetve annak eltolódása a kisebb hullámhosszok felé. A harmadik amidnitrogén koordinációjával képződő  $\text{Cu(dMKHM)H}$  komplexet támasztja alá az 530 nm körüli abszorpciós maximum megjelenése, amelyben a koordinációs mód a következő:  $(\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-)$ , és a lizin oldallánc protonált. A pH növelésével képződő további részecskékben a koordinációs mód nem változik, egyedül a lizil-oldalláncok deprotonáltságában különböznek. Fiziológias pH tartományban,  $\text{pH} 7,4$ -nél a  $\text{CuLH}$  és  $\text{CuL}$  összetételű komplexek közel 50-50%-ban vannak jelen, vagyis a harmadik amidnitrogén  $\text{Cu(II)}$ -ionhoz való koordinációja még nem teljes a rendszerben.

Az egyedi rendszerekben levő  $\text{Cu(II)}$ -komplexek stabilitási állandóinak ismeretében modelleztük az ekvimoláris arányú vegyes rendszer hipotetikus részecskeeloszlás diagramját az ismert törzskomplexek segítségével. (A dMKHM peptidet A, az X1THIO aroil-hidrazont B betűkkel jelöltem.) Ahogy az a 28. ábrán feltüntetett hipotetikus eloszlásdiagramon is látható, a savas tartományban közel 90%-ban a  $\text{CuB}$  komplex van jelen, vagyis az



**28. ábra:** A  $\text{Cu(II)}$ -ion és a törzskomplexek hipotetikus eloszlása a dMKHM (A) és X1THIO (B) vegyes rendszer esetén

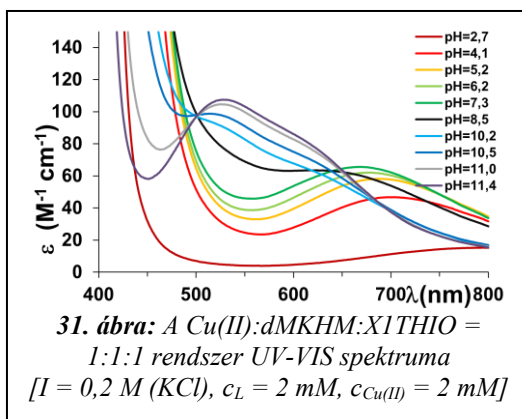


X1THIO szinte a teljes fémion mennyiséget megköti. A részecskeeloszlásban nagymértékű változás pH 6,5 körül várható, ahol csökken a  $\text{CuB}$  monokomplex mennyisége, ezzel egyidejűleg növekszik a  $\text{CuB}_2$  biszkomplexé, illetve pH 7-es értéken a peptid  $\text{CuAH}$  komplexe maximális mennyiségben van jelen. A pH növelésével 8,4-ig a  $\text{CuB}_2$  biszkomplex mennyisége közel állandó értéken marad, ezzel egyidejűleg megkezdődik a harmadik amidnitrogén deprotonálódása és a  $\text{CuA}$  komplex kialakulása, amely maximális mennyiségben pH 8,6-nál van. Ezen megfontolások alapján vegyes ligandumú komplex jelenlétét pH 6 – 8 között várhatjuk, míg a fémion-peptid kizárólagos kölcsönhatása a nagyobb pH tartomány felé tolódik el. A két ligandum réz(II)ion-megkötő képességének összehasonlítása érdekében összegeztük a törzskomplexek együttes hozzájárulását. Ezeket a görbéket  $\Sigma\text{-X1THIO}$  és  $\Sigma\text{-dMKHM}$  elnevezéssel jelöltem. A diagramon ezen görbék is jól szemléltetik, hogy pH 6 alatt kizárólagosan az X1THIO-hoz kötődik a fémion, illetve fiziológias pH-n is ez a kedvezményezett ligandum a réz(II)ion számára. A  $\text{Cu(II):dMKHM:X1THIO} = 1:1:1$  oldat titrálása esetén a komplexképződés pH 2,8-nál elkezdődik, ezt az oldat kezdeti citromsárga színe is jelzi. Az oldat színe csak lúgos pH-n változik, körülbelül 8,4-es pH-n a barna árnyalatú oldatban sárga csapadék válik ki. Ezt a 29. ábrán is látható lúgekivalens görbén is szemlélteti a pH csökkenése. A titrálás folyamán a pH emelésével a megjelent csapadék színe bebarnult, egészen lúgos, 11 feletti pH-n az oldat halvány lila színű lett, és kis mennyiségű barna porszerű csapadék vált ki. A csapadék megjelenése miatt a SUPERQUAD programmal a számolást pH 3,0 – 8,5 között végeztük és a titrálási adatok és az illesztés alapján egy vegyes komplexet tudtunk leírni. A számolt  $\text{Cu(dMKHM)(X1THIO)H}_3$  komplex lg $\beta$  értéke 47,08 (7), kicsit nagyobb, mint a  $\text{Cu(X1THIO)}$  és a  $\text{Cu(dMKHM)H}_3$  törzskomplexek összegének értéke. A vegyes komplex ezért széles pH-

tartományban jelen van és az oldatban pH 4,5 - 7,8 között ez a domináns részecske. Az illesztés alapján készített 30. ábrán látható részecskeeloszlás-diagram

bemutatja, hogy a Cu(X1THIO) komplex nagyon savas pH-tartományban van jelen az oldatban. A pH növelésével megjelenik a vegyes komplex, amelyben a peptid a hisztidin

egyfogú koordinációjával vesz részt a komplexképződésben, a további három koordinációs helyet az aroil-hidrazon (N,N,O) koordinációs móddal foglalja el. A részecske 6,5-ös pH-n maximális mennyiségben van jelen a rendszerben, a pH növelésével csökken a vegyes komplex, ezzel egyidejűleg nő a Cu(X1THIO)<sub>2</sub> biszkomplex és a peptid Cu(II)-komplexeinek mennyisége. A Cu(II):dMKHM:X1THIO = 1:1:1 rendszer UV-VIS spektrumát a 31. ábra mutatja be. A spektrumon pH 4-nél megjelenik a Cu(II)-X1THIO rendszerben is látható d-d töltésátviteli sáv, melynek abszorpciós maximuma 700 nm körül van. A moláris abszorpciós együttható ( $\epsilon$ ) a pH emelkedésével nő, az abszorpciós maximum ezzel egyidejűleg a kisebb hullámhossz felé tolódik. Ezen pH-értékeknél a réz(II)ion a CuABH<sub>3</sub> összetételű komplexként van jelen a rendszerben. A spektrumon 8,5-ös pH-n 745 nm-en megjelenik egy izobesztikus pont, amely a koordinációs mód folyamatos átrendeződéséhez köthető, viszont magasabb pH-értéken a vegyes komplex (N<sub>im</sub>, N, N, O) koordinációs módjának stabilitása kisebb, mint a (N<sub>im</sub>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>) koordinációs módú Cu(II)-peptid komplexé. A spektrumon látható, hogy 8,5-ös pH-n kezd eltolódní az eddigi abszorpciós sáv. Nagyobb pH-n a kisebb hullámhossz értékeknél megjelenik a Cu(II)-peptid komplexre jellemző elnyelési sáv 530 nm körül egy vállal, amit a peptid Cu(II)-komplexeinek és az X1THIO biszkomplexének egyidejű jelenléte okoz.



A Cu(II):dMKHM:X1FUR = 1:1:1 vegyes rendszer vizsgálatakor a pH-potenciometriás mérés során nem tapasztaltunk csapadékképződést, így ezen rendszer esetén a teljes pH-tartományban tudtunk számolni. A komplexképződés a korábbiakban elmondottakhoz hasonlóan savas pH-n elkezdődik, a lúgekvivalens görbe lefutása az X1THIO vegyes rendszerhez hasonló. A titrálása során az oldat színe is hasonlóan változik. A kezdeti halvány sárga szín pH 5-nél erős citromsárga lesz, majd pH 8,8 körül a vizes oldat zöldesbarna színűvé változik a koordinációs mód változásával egyidejűleg. A pH további emelésével

pH 10 körül a halványbarna színű oldat pH 11-nél halványlila színű lesz. Ezt a változást feltételezhetően a peptid Cu(II)-komplexének jelenléte okozza. Az X1THIO vegyes rendszerhez hasonlóan az X1FUR esetén is modelleztük az egyedi rendszerekben levő Cu(II)-komplexek stabilitási állandói alapján a törzskomplexek részecskeeloszlását a vegyes rendszerben. A modellezett hipotetikus eloszlásdiagram alapján a savas tartományban közel 90%-ban a Cu(X1FUR) komplex van jelen, vagyis az X1FUR szinte a teljes fémion mennyiséget megköti. A rendszerben a komplex maximális mennyiségben pH 5,3 körül van jelen. A Cu(X1FUR)<sub>2</sub>H biszkomplex képződése pH 3,0 körül szintén elkezdődik, míg a deprotonált biszkomplex kialakulása pH 5,0-nál kezdődik, mely maximális mennyiségben 8,4-es pH-n található meg a modellrendszerben. A hipotetikus eloszlásdiagram alapján a Cu(dMKHM)H és Cu(dMKHM) komplexek képződése 5,0-ös, illetve 6,0-os pH-értéken kezdődik el. A Cu(II)-ion pH 6-ig kizárólagosan az X1FUR-hoz kötődik, és fiziológias pH-tartományban is ez az elsődleges koordináció. A Cu(II)-peptid komplexek mennyisége csak pH 8 felett jelentős.

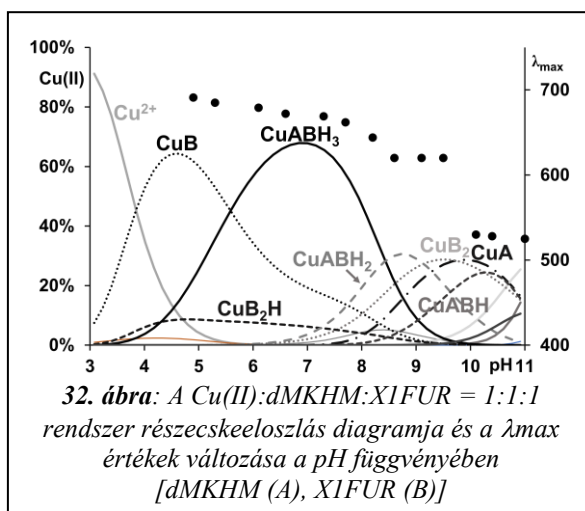
**3. táblázat:** A HuPrP (103-112) (dMKHM) és az X1THIO és X1FUR aroil-hidrazon vegyes rendszerek Cu(II)- és Zn(II)-komplexeinek stabilitási állandói [ $I = 0,2 \text{ M (KCl)}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c_L = 2 \text{ mM}$ ]

A = Ac-SKPKTNMKHM-NH<sub>2</sub>  
B = X1FUR, X1TIO

lgβ	Cu(II)		Zn(II)	
	X1TIO	X1FUR	X1TIO	X1FUR
MABH <sub>3</sub>	47,08 (7)	45,97 (5)	—	—
MABH <sub>2</sub>	—	37,85 (14)	—	—
MABH	—	29,00 (9)	—	23,52 (10)
MAB	—	19,08 (9)	—	—

A titrálási adatok alapján négy vegyes komplexet tudunk számolni, melyek a 3. táblázatban vannak feltüntetve. A Cu(dMKHM)(X1FUR)H<sub>3</sub> komplex esetén a peptid a hisztidin egyfogú koordinációjával vesz részt a komplexképződésben, a további három koordinációs helyet az X1THIO vegyülethez hasonlóan itt is az X1FUR az 1-metilimidazol és az azometin nitrogén-donoratomjain és a karbonilcsoport oxigén donoratomján keresztül kialakított (N, N, O) koordinációs móddal foglalja el, így létrehozva az (N<sub>im</sub>, N, N, O) koordinációs módot.

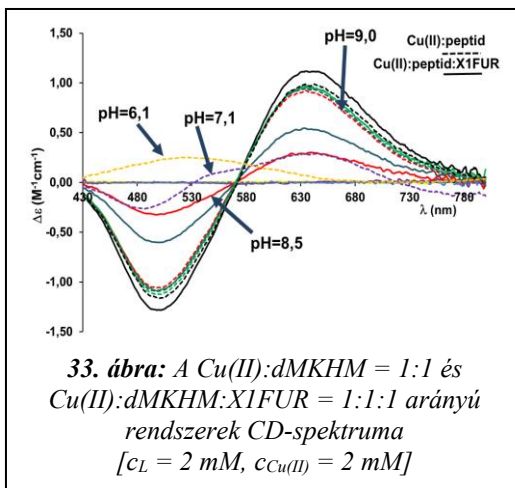
A további vegyes komplexekben a koordinációs módban nincs változás, a lizil-oldalláncban található  $\epsilon$ -aminocsoport deprotonálódása következik be. A 32. ábrán feltüntetett tényleges eloszlásdiagramon látható, hogy a  $\text{Cu}(\text{X1FUR})$  a kezdeti savas pH-n megjelenik a rendszerben, a  $\text{Cu}(\text{dMKHM})(\text{X1FUR})\text{H}_3$  komplexképződése pH 3,0 körül kezdődik el, a részecske maximális mennyiségben pH 6,5 körül van jelen. Semleges pH körül kezdődik el a  $\text{Cu}(\text{dMKHM})(\text{X1FUR})\text{H}_2$ , a  $\text{Cu}(\text{dMKHM})$  és a  $\text{Cu}(\text{X1FUR})_2$  komplexek képződése. A  $\text{Cu}(\text{dMKHM})(\text{X1FUR})\text{H}_2$  pH 8,0 körül, míg az utóbbi két komplex pH 9,0-nél maximális mennyiségben van jelen. A pH további növelésével a másik két lizil-oldallánc  $\epsilon$ -aminocsoportja deprotonálódik.



A vegyeskomplex jelenlétét mind UV-látható, mind CD-spektroszkópiával bizonyítottuk, illetve ESI-MS módszerrel is. A fotometriás mérés során kapott spektrum az X1THIO vegyületet tartalmazó vegyes rendszerrel szinte megegyező spektrális képet mutat. Ezen rendszer esetén is körülbelül pH 8,0-nál az abszorpciós sáv eltolódása figyelhető meg az alacsonyabb hullámhosszok felé, ami a  $\text{Cu}(\text{II})$ -peptid és  $\text{Cu}(\text{X1FUR})_2$  komplexek egyidejű képződéséhez köthető. Ezen komplexek mennyiségének növekedése a nagyobb pH tartományban 530 nm körül egy vállal rendelkező abszorpciós maximum megjelenését okozza, hasonlóan a 31. ábrán láthatóhoz. Fiziológias körülmények között elsődlegesen az aroil-hidrazonhoz, illetve a vegyes komplexhez koordinálódik a réz(II)ion. A  $\text{Cu}(\text{II}):\text{dMKHM}:\text{X1FUR} = 1:1:1$  rendszer eloszlásdiagramján (32. ábra) a pH függvényében feltüntetett maximum hullámhossz értékek jól szemléltetik, hogy a bázikus pH tartományban, ahogy a peptid  $\text{N}_{\text{im}}$  és a három  $\text{N}_{\text{amid}}$  koordinációja kedvezőbbé válik, úgy csökken a maximális hullámhossz is. Továbbá az is megfigyelhető, hogy az amidnitrogének

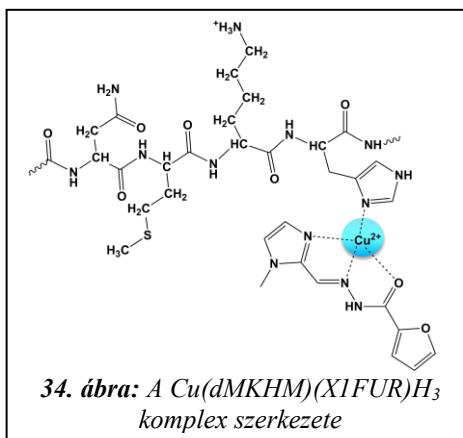
deprotonálódása a nagyobb pH értékek felé tolódik el, ez a folyamat körülbelül pH 9,0-nál kezdődik el.

A  $\text{Cu}(\text{dMKHM})(\text{X1FUR})\text{H}_3$  vegyes ligandumú komplex jelenlétét cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával is vizsgáltuk. A 33. ábrán látható CD-spektrumon a szaggatott vonallal jelölt  $\text{Cu}(\text{II})$ - $\text{dMKHM}$  1:1 arányú és a folytonos vonallal jelölt  $\text{Cu}(\text{II})$ - $\text{dMKHM}$ - $\text{X1FUR}$  1:1:1 arányú rendszerek cirkuláris dikroizmus spektrumai láthatók különböző pH értékeknél. A  $\text{Cu}(\text{II})$ - $\text{dMKHM}$  esetén az amidnitrogének réz(II)-indukált deprotonációja és koordinációjuk a peptidhez körülbelül pH ~ 6-nál elkezdődik. Ezt bizonyítja a spektrumon 530 nm-en a ( $\text{N}_{\text{im}}$ ,  $\text{N}^-$ ,  $\text{N}^-$ ) réz(II)-koordinációhoz rendelhető pozitív Cotton-effektus megjelenése. A harmadik amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja a  $\text{Cu}(\text{II})$ -ionhoz pH 7 körül kezdődik el. Ehhez a változáshoz a spektrumon 650 nm-nél megjelenő pozitív Cotton-effektus társítható. Ezzel ellentétben a folytonos vonallal jelölt  $\text{Cu}(\text{II})$ - $\text{dMKHM}$ - $\text{X1FUR}$  rendszer esetén a réz(II)ion és az amidnitrogén koordináció lúgosabb pH tartomány felé tolódik el.



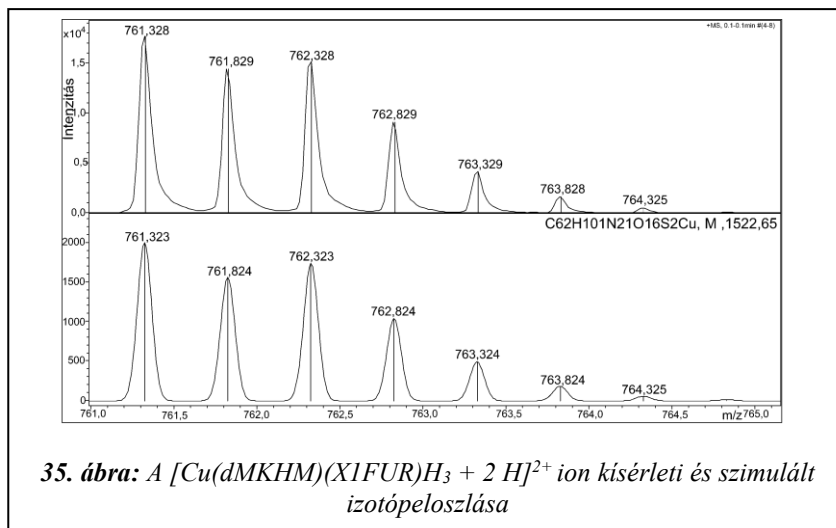
33. ábra: A  $\text{Cu}(\text{II})$ : $\text{dMKHM}$  = 1:1 és  $\text{Cu}(\text{II})$ : $\text{dMKHM}$ : $\text{X1FUR}$  = 1:1:1 arányú rendszerek CD-spektruma [ $c_L$  = 2 mM,  $c_{\text{Cu}(\text{II})}$  = 2 mM]

A ( $\text{N}_{\text{im}}$ ,  $\text{N}^-$ ,  $\text{N}^-$ ) réz(II)-koordinációhoz köthető Cotton-effektus körülbelül pH 8,5-nél jelenik meg. Ezen eredmények a részecskeeloszlás-diagrammal is összhangban vannak. A vegyes ligandumú komplex általunk feltételezett szerkezete a 34. ábrán látható. Továbbá a  $\text{Cu}(\text{dMKHM})(\text{X1FUR})\text{H}_3$  komplex jelenlétét ESI-MS spektroszkópiával is bizonyítottuk. A pH 6,5-nél jelenlevő  $[\text{Cu}(\text{dMKHM})(\text{X1FUR})\text{H}_3 + 2 \text{H}]^{2+}$  komplex kétszeres töltésű iont hidrogén adduktként detektáltuk 761,328 m/z



34. ábra: A  $\text{Cu}(\text{dMKHM})(\text{X1FUR})\text{H}_3$  komplex szerkezete

értéknél. A kísérleti és számolt izotópeloszlások jó egyezése alapján a vegyes komplex jelenlétét a 35. ábra bizonyítja.



#### 4.2.3. A HuPrP (103-112) és aroil-hidrazonok vegyes ligandumú rendszerei cink(II)ionnal

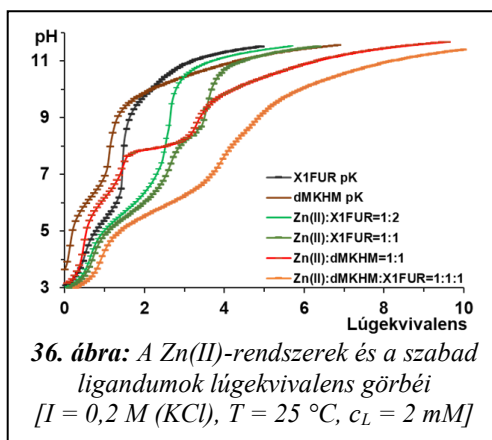
A réz(II)ionokhoz hasonlóan a cink(II)ionok felhalmozódása is bizonyított idegrendszeri betegségek esetén. A vegyes ligandumú rendszerek tanulmányozása érdekében elsőnek külön vizsgáltuk a HuPrP (102-113) fragmens (dMKHM) komplexképződését Zn(II)-ionnal. Az oldategyensúlyi kísérleteket ekvimoláris körülmények között végeztük. Korábban megfigyelték, hogy a Zn(II)-ion csak egy hisztidinnel és védett amino terminussal rendelkező peptid esetén nem képes stabil Zn(II)-komplexek kialakítására, továbbá pH 8 felett a Zn(II)-ion hidrolizál. Ezzel összhangban, mivel a vizsgált peptid horgonydonorként csak egy hisztidint tartalmaz, és a cink(II)ionok nem képesek indukálni az amidnitrogének deprotonálódását, a peptid nem tudja megakadályozni a Zn(II)-ion hidrolízisét, pH 8 körül csapadékkiválást tapasztaltunk. A szabad peptidet és a Zn(II)-iont is tartalmazó rendszerek titrálási görbéjét összevetve pH 6 körül a két titrálási görbe kis mértékben szétválik. Ezen pH-értéknél a hisztidin imidazolilcsoportja deprotonálódik, és kialakítja az egyfogú Zn(dMKHM)H<sub>3</sub> összetételű komplexet. A titrálási görbe alapján egy extra lúgfogyasztó folyamat is végbemegy pH 8 körül, ami a Zn(dMKHM)H vegyes hidroxó-komplex kialakulásához köthető. A részecskeeloszlás alapján

fiziológiás pH-n a  $Zn(dMKHM)H_3$  komplex van jelen. A komplexek stabilitási állandóit szintén a 2. táblázat tartalmazza.

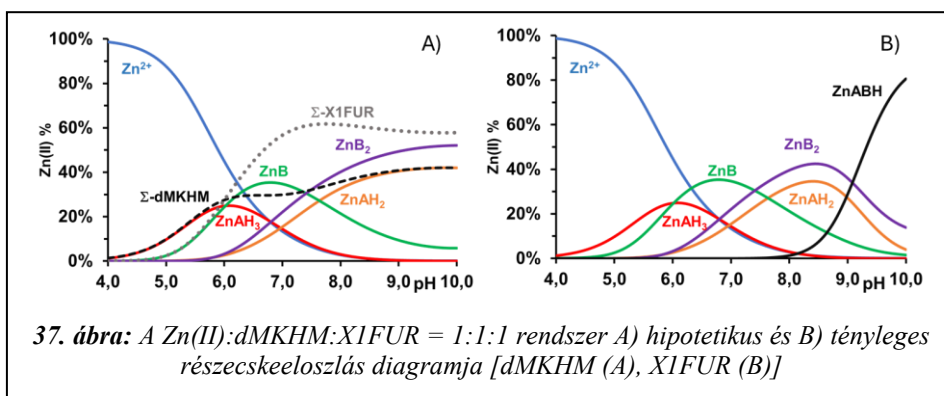
A  $Zn(II):Ac-SKPKNMKHM-NH_2:X1THIO = 1:1:1$  rendszer pH-potenciometriás vizsgálatokor 5,9-es pH-n halványsárga színű csapadék vált ki, melynek mennyisége a titrálás előrehaladtával egyre nőtt. Ezen okokból a titrálási adatok illesztését pH 3,0 és 5,9 között végeztük az egyedi rendszerek törzskomplexeinek stabilitási állandóit rögzítve. A SUPERQUAD programmal végzett számítás alapján a rendszer vegyeskomplexek jelenléte nélkül is jól leírható. Az oldategyensúlyi kísérlet alapján az oldat színváltozásából arra következtethetünk, hogy pH 4,5-nél a színtelen oldat sárgává változása a cink(II)ion és az X1THIO aroil-hidrazon közötti komplexképződési folyamatra utal. A korábbi tapasztalatok alapján a csapadékképződés feltételezhetően a  $Zn(X1THIO)_2$  biszkomplex megjelenéséhez és mennyiségi növekedéséhez köthető.

A  $Zn(II):Ac-SKPKNMKHM-NH_2:X1FUR = 1:1:1$  rendszer lúgekvivalens görbéje a 36. ábrán látható. Ellentétben az előző vizsgálattal, ezen rendszer esetén nem tapasztaltunk csapadékképződést. A lúgekvivalens görbét összevetve látható, hogy a  $Zn(II)$ -peptid komplexképződése pH 4 körül, míg az X1FUR komplexképződése viszont csak pH 5,5-nél kezdődik el. A 37. A) ábrán feltüntetett hipotetikus eloszlásdiagram alapján a vegyes ligandumú rendszerben várhatóan pH 6 alatt a  $Zn(II)$ -ion elsődlegesen szabad fémion formában és  $Zn(II)$ -dMKHM komplexként van jelen. A SUPERQUAD programmal a titrálási pontokból egy vegyes ligandumú komplexet tudtunk számolni, a  $Zn(dMKHM)(X1FUR)H$  komplexet, melynek stabilitási állandója 23,52 (10). Az irodalom alapján a komplexben a  $Zn(II)$ -ion a peptidhez a hisztidin imidazolgyűrű N-donoratomján keresztül koordinálódik, míg az X1FUR aroil-hidrazonhoz a 1-metilimidazol és az azometin N-donoratomokon, valamint a karbonilcsoport O-donoratomján keresztül.<sup>165</sup> Kizárólag a törzskomplexe jelenlétével számolt hipotetikus eloszlásdiagram semleges pH-ig hasonló a valós részecskeeloszláshoz.

A  $Zn(X1FUR)_2$  és  $Zn(dMKHM)H_2$  a vegyes rendszerben pH 8,5 körül maximális mennyiségben vannak jelen, továbbá ugyanezen a pH-n elkezdődik a



Zn(II)-vegyeskomplex képződése, mely pH 10 körül a domináns részecske az oldatban.



#### 4.3. Módosított szalán típusú vegyületek oldategyensúlyi vizsgálata réz(II)- és cink(II)ionokkal

A potenciális neurodegeneratív betegség elleni kelátképző ligandumok hatásának tanulmányozását a HuPrP (102-113) peptidre és fémion-katalizált oxidációjára kiterjesztettük módosított szalán típusú vegyületekre. A kutatást egy nemzetközi együttműködés keretén belül, George Kostakis (University of Sussex, Brighton, Egyesült Királyság) kutatócsoportjával közösen valósítottuk meg, akik a szalán típusú vegyületek tervezését, szintetizálását és karakterizálását végezték.

A szalán típusú ligandumok egyik előnye, hogy vizes közegben nem hidrolizáló komplexeket képeznek, éppen ezért céljaink között szerepelt olyan fémkelátorok hatásának vizsgálata a fémion-katalizált oxidációra, amelyek önmagukban és komplexként is vízben jól oldódnak. Azonban ez nem minden szintetizált és vizsgált ligandum esetében teljesült, ezért ezen vegyületek koordinációs kémiáját dimetil-szulfoxid:víz 70:30 (V/V%) elegyben vizsgáltuk.

A módosított szalán típusú vegyületeknél az oldategyensúlyi kutatási eredményeket két alfejezetben tárgyalom. Elsőként a dimetil-szulfoxid:víz 70:30 (V/V%) elegyben végzett kísérleti eredményeket mutatom be, majd a vízben jól oldódó vegyületek eredményeit.

#### 4.3.1. Szalán típusú vegyületek vizsgálata víz és dimetil-szulfoxid elegyben réz(II)- és cink(II)ionnal

A vegyületek a Salpyran kivételével mind vízben rosszul oldódnak, ezért stabilitási állandóikat pH-potenciometriával dimetil-szulfoxid és víz 70:30 (V/V%) elegyben határoztuk meg. A vizsgált molekulák összesen négy deprotonálódásra képes csoporttal rendelkeznek. A Salan, 4CF<sub>3</sub>O-Salan és *ditb*-Salan esetében ez a két fenolos hidroxilcsoport és a két aminocsoport. A Salpyran és a Salquin molekulák esetében az egyik fenol aromás szubsztituens helyett egy piridin, illetve egy kinolin kapcsolódik a szénlánchoz. Utóbbiak erősen savas jellegű nitrogénnel rendelkeznek, melynek protonálódási állandóját nem tudtuk meghatározni az alkalmazott módszerrel. A meghatározott protonálódási állandók a **4. táblázatban** láthatók.

A Salpyran és Salquin esetén az első állandó a fenolos hidroxilcsoportéhoz, míg a további kettő az aminocsoport protonálódásához köthető. *A ligandumok teljesen deprotonált formáinak töltése különbözik egymástól, ezért az egyszerűség kedvéért a ligandumok, illetve komplexeik töltését nem tüntettem fel.*

**4. táblázat:** A DMSO:H<sub>2</sub>O = 70:30 (V/V%) elegyben vizsgált ligandumok protonálódási állandói (*lgβ*) és deprotonálódási állandói (*pK*) [*I* = 0,2 M (KCl), *T* = 25 °C, *c<sub>L</sub>* = 2 mM]

<b>lgβ</b>	<b>Salpyran</b>	<b>Salquin</b>	<b>Salan</b>	<b>4CF<sub>3</sub>O-Salan</b>	<b><i>ditb</i>-Salan</b>
<b>HL</b>	12,09 (3)	11,55 (7)	12,64 (4)	12,65 (6)	14,22 (3)
<b>H<sub>2</sub>L</b>	20,35 (5)	19,53 (7)	24,39 (4)	23,90 (9)	26,44 (4)
<b>H<sub>3</sub>L</b>	25,79 (7)	24,84 (11)	32,83 (6)	32,44 (13)	34,46 (5)
<b>H<sub>4</sub>L</b>	—	—	38,93 (8)	38,27 (15)	39,75 (6)
<b>pK<sub>1</sub></b>	5,44 (7)	5,31 (11)	6,10 (8)	5,83 (15)	5,29 (6)
<b>pK<sub>2</sub></b>	8,26 (5)	7,98 (7)	8,44 (6)	8,54 (13)	8,02 (5)
<b>pK<sub>3</sub></b>	12,09 (3)	11,55 (7)	11,75 (4)	11,25 (9)	12,22 (4)
<b>pK<sub>4</sub></b>	—	—	12,64 (4)	12,65 (6)	14,22 (3)

A **réz(II)ionokkal** végzett oldategyensúlyi kísérletek alapján elmondható, hogy a többi ligandumhoz képest a szerkezetükben eltérő Salpyran és a Salquin vegyületeknél a képződő komplexek sztöchiometriája és stabilitása nagyon hasonló. Egymagvú és monoligandumú komplexek képződnek. Egyedi fotometriás kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a ligandumok nem képesek

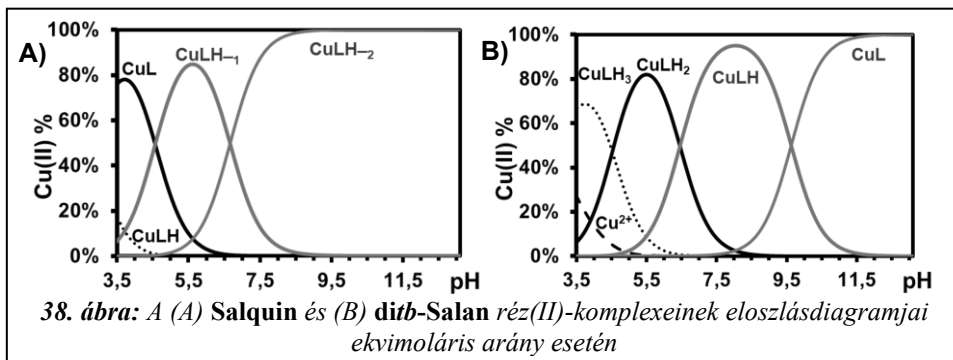
többszörös réz(II)-komplexek kialakítására. A piridin, illetve a kinolin koordinációja a ligandumhoz már nagyon savas pH-n bekövetkezik. A két aminocsoport nitrogénatomjának lépcsőzetes koordinációját a réz(II)ionhoz nem tudtuk leírni. A képződő komplexek stabilitási állandóit az 5. táblázatban tüntettem fel.

**5. táblázat:** A DMSO:H<sub>2</sub>O = 70:30 (V/V%) elegyben vizsgált ligandumok réz(II)-komplexeinek stabilitási állandói (lgβ) [I = 0,2 M (KCl), T = 25 °C, c<sub>L</sub> = 2 mM]

lgβ	Salpyran	Salquin	Salan	4CF <sub>3</sub> O-Salan	ditb-Salan
CuLH <sub>3</sub>	—	—	—	—	40,11 (7)
CuLH <sub>2</sub>	—	—	33,36 (9)	33,72 (5)	35,59 (7)
CuLH	23,77 (10)	23,82 (18)	28,82 (6)	29,04 (7)	29,14 (9)
CuL	18,98 (12)	20,96 (11)	21,73 (14)	19,55 (14)	19,51 (13)
CuLH <sub>-1</sub>	9,66 (20)	16,39 (16)	—	—	—
CuLH <sub>-2</sub>	-4,12 (22)	9,73 (19)	—	—	—

A komplexképződési folyamatban a meghatározott CuLH komplexben a réz(II)ion (N<sub>py</sub>, N<sub>amino</sub>, N<sub>amino</sub>) koordinációs móddal kötődik a ligandumhoz, ezzel kialakítva egy (5,5) csatolt kelátrendszerrel. A CuLH komplexben a fenolos hidroxilcsoport protonált, majd a titrálás előrehaladtával a hidroxilcsoport deprotonálódásával kialakul a CuL komplex. A komplexek stabilitási állandóit összehasonlítva elmondható, hogy a Salquin stabilabb réz(II)-komplexek kialakítására képes, mint a Salpyran. A DMSO-víz elegyben nagyobb pH-értékig végeztük a titrálást, ami megmagyarázza a CuLH<sub>-1</sub> és CuLH<sub>-2</sub> részecskék jelenlétét, melyek egy, illetve két axiálisan kötött deprotonált vízmolekulát tartalmaznak. A 38. A) ábrán feltüntetett részecskeeloszlás is mutatja, hogy a Salquin a réz(II)ionnal nagyon savas pH-n komplexet képez. Ezt az oldat színe is jelzi, a kezdetben színtelen oldat pH 4,8-nál halványzöld színű lett. Az eloszlás alapján pH 6,5 körül csak a vegyes réz-hidroxid komplex van jelen. Ez egybeesik a titrált oldat sötétzöld színének megjelenésével, ami a titrálás előrehaladtával nem változott. A ditb-Salan esetén a két nagy térkitöltésű *terc*-butil csoport lehetővé teszi, hogy csak az egyik nitrogénatom koordináljon a réz(II)ionhoz, kialakítva a CuLH<sub>3</sub> részecskét. Míg a Salan és 4CF<sub>3</sub>O-Salan vegyületek esetén a fent említett komplexet nem, csak a két aminonitrogén koordinációjával létrejövő stabil öttagú CuLH<sub>2</sub> kelátkomplex képződését tudtuk leírni. A nagyobb pH-értékeken képződő, a fenolos hidroxilcsoportok réz(II)ionhoz történő koordinációjával kialakuló CuLH és CuL komplexeket is ki tudtuk számolni. A

*ditb*-Salan részecskeeloszlását a 38. B) ábrán tüntettem fel. Az ábrán jól látható a lépcsőzetes komplexképződés folyamata, pH 5 fölött a rendszerben nem található szabad réz(II)ion.



A Salan és szerkezetében hasonló másik két módosított molekula réz(II)-komplexeinek stabilitási állandóit összevetve megfigyelhető, hogy a *ditb*-Salan komplexei nagyobb stabilitási állandóval rendelkeznek egészen a CuLH komplexig. Ezt feltételezhetően a *terc*-butil-csoportok elektronküldő tulajdonsága okozza. Azonban a CuL komplex kialakításakor a *terc*-butil-csoportok térigénye negatívan hat a stabilitási állandóra a csatolt kelátrendszer kialakításakor, így ezzel könnyen értelmezhető, hogy a szubsztituens csoportokat nem tartalmazó Salan esetében a CuL komplex miért nagyobb stabilitású, mint az szubsztituált módosulatai.

A Salan és a két szubsztituált módosított vegyületének komplexképződését **cink(II)ionokkal** is vizsgáltuk ekvimoláris fémion- és ligandum arányok mellett. Mindhárom vegyület esetén ugyanazon komplexeket tudtuk leírni dimetil-szulfoxid és víz 70:30 (V/V%) elegyében. A komplexképződés során kialakuló ZnLH komplexben a cink(II)ion ( $N_{\text{amino}}$ ,  $N_{\text{amino}}$ ,  $O^-$ ) koordinációs móddal kötődik a ligandumhoz, ezzel kialakítva egy (5,6) csatolt kelátrendszert. A ZnL komplex kialakításában az eddig koordinátatlan második hidroxil oxigéndonoratom is részt vesz. A ZnLH<sub>1</sub> komplex a cink hidrolíziséhez köthető. A cink(II)-komplexe stabilitási állandóit a 6. táblázatban tüntettem fel. A számolt állandók alapján a két *terc*-butil-csoporttal rendelkező vegyület stabilabb ZnLH komplexet képez, mint a trifluormetoxi-csoportot tartalmazó ligandum. Azonban a ZnL komplex esetén ennek ellenkezője tapasztalható. Ezt feltehetően a (6,5,6) csatolt kelátrendszerű komplex esetén a két *terc*-butil-csoport nagy térkitöltése okozza.

**6. táblázat:** A DMSO:H<sub>2</sub>O = 70:30 (V/V%) elegyben vizsgált ligandumok cink(II)-komplexeinek stabilitási állandói (lgβ) [I = 0,2 M (KCl), T = 25 °C, c<sub>L</sub> = 2 mM]

lgβ	Salan	4CF <sub>3</sub> O-Salan	ditb-Salan
ZnLH	20,93 (5)	21,26 (2)	22,10 (7)
ZnL	10,90 (18)	12,68 (5)	11,78 (23)
ZnLH <sub>-1</sub>	-3,03 (25)	-0,94 (6)	-2,21 (24)

### 4.3.2. Vízben oldódó szalán típusú vegyületek vizsgálata réz(II)- és cink(II)ionokkal

Az együttműködés keretében vizsgált vízben oldódó szalán típusú ligandumok közül az értekezésben azon hét vegyület kísérleti eredményeit mutatom be, amelyekkel a későbbiekben oxidációs vizsgálatokat is végeztünk. Az oxidációs vizsgálat eredményét a 4.4. fejezetben foglalom össze. Koordinációs kémiai szempontból a vegyületek négy koordinációra képes donoratommal rendelkeznek. Szerkezetüket tekintve két csoportba sorolhatjuk őket. A vizsgált molekulák többségének a szerkezeti alapváza a módosított szalán vegyület, a Salpyran. A különbség az alapváz fenilcsoportján található szubsztituens, illetve annak pozíciója. A szerkezeti alapvázában eltérő másik két molekula az AEtQ és az ACyQ. A vegyületekben a 8-hidroxikinolinhoz az első esetben egy alifás diaminocsoport, míg az ACyQ-hoz egy ciklikus diaminocsoport kapcsolódik. A vegyületek szerkezetei a 10. ábrán láthatók.

#### 4.3.2.1. A Salpyran és módosított változatainak oldategyensúlyi vizsgálata réz(II)- és cink(II)ionokkal

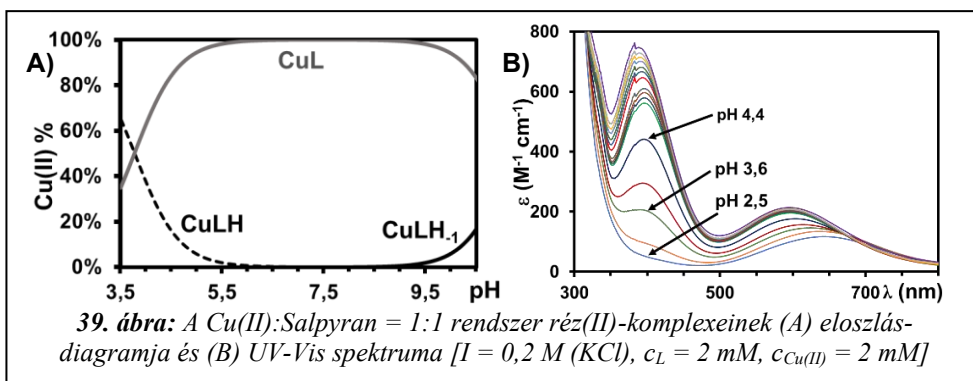
A pH-potenciometriával meghatározott deprotonálódási állandók a 7. táblázatban láthatók. A legnagyobb protonálódási állandó a piridin nitrogénatomához köthető, melyet viszonylag nagy szórással tudunk csak meghatározni a piridil- és a szomszédos aminocsoport között kialakuló intramolekuláris hidrogénkötés okozta rendkívüli savas jellege miatt. Ezen csoport deprotonálódása a Salpyran esetében már nagyon savas körülmények között, pH 2 alatt elkezdődik, míg a trifluormetoxi- és metoxicsoportokat tartalmazó módosulatoknál nagyobb pH-értéken következik be az első deprotonálódás.

7. táblázat: A Salpyran és módosított változatainak protonálódási állandói ( $\lg\beta$ ), deprotonálódási állandói ( $pK$ ) és réz(II)- és cink(II)-komplexeinek stabilitási állandói ( $\lg\beta$ ) [ $I = 0,2 M (KCl)$ ,  $T = 25^\circ C$ ,  $c_L = 2 mM$ ]

$\lg\beta$	Salpyran	4F-Salpyran	6F-Salpyran	4CF <sub>3</sub> O-Salpyran	MetO-Salpyran
<b>HL</b>	10,21 (2)	10,05 (3)	9,94 (1)	10,00 (6)	10,67 (4)
<b>H<sub>2</sub>L</b>	18,55 (3)	18,30 (4)	17,33 (1)	17,60 (9)	19,02 (8)
<b>H<sub>3</sub>L</b>	24,18 (4)	23,87 (5)	22,89 (1)	22,96 (12)	24,96 (10)
<b>H<sub>4</sub>L</b>	26,04 (9)	25,89 (10)	24,54 (3)	28,87 (17)	29,06 (11)
<b>pK<sub>1</sub></b>	1,86 (9)	2,02 (10)	1,65 (3)	5,91 (17)	4,10 (11)
<b>pK<sub>2</sub></b>	5,63 (4)	5,57 (5)	5,56 (1)	5,36 (12)	5,94 (10)
<b>pK<sub>3</sub></b>	8,34 (3)	8,25 (4)	7,39 (1)	7,60 (9)	8,35 (8)
<b>pK<sub>4</sub></b>	10,21 (2)	10,05 (3)	9,94 (1)	10,00 (6)	10,67 (4)
<b><math>\lg\beta</math></b>					
<b>CuLH<sub>2</sub></b>	—	—	—	—	28,58 (3)
<b>CuLH</b>	23,93 (8)	23,27 (3)	22,47 (3)	22,36 (3)	24,96 (3)
<b>CuL</b>	20,10 (8)	19,21 (4)	19,51 (2)	18,19 (7)	20,10 (4)
<b>CuLH<sub>-1</sub></b>	8,94 (10)	7,73 (6)	7,55 (2)	6,17 (10)	8,38 (5)
<b>pCu<sub>pH=7,4</sub></b>	13,30	11,65	12,67	11,17	11,84
<b>ZnLH<sub>2</sub></b>	—	—	—	21,10 (10)	23,89 (5)
<b>ZnLH</b>	—	17,41 (1)	16,25 (2)	16,99 (2)	19,05 (4)
<b>ZnL</b>	11,98 (5)	11,66 (2)	11,63 (1)	11,40 (4)	11,24 (9)
<b>ZnLH<sub>-1</sub></b>	2,38 (13)	2,22 (3)	2,06 (2)	1,95 (5)	1,44 (9)
<b>pZn<sub>pH=7,4</sub></b>	6,60	6,57	6,93	6,70	6,27

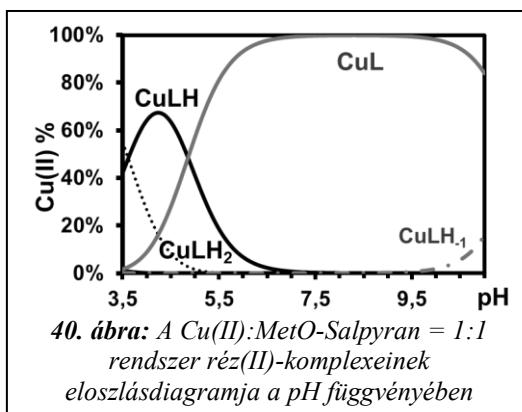
A Salpyran esetében a **réz(II)ionokkal** végzett oldategyensúlyi vizsgálatokat 1:1 és 1:2 fém-ligandum arányú rendszerekben vizsgáltuk. A számolási eredmények és az UV-Vis spektrumok alapján bizonyossággal állítható, hogy mindkét arány esetén ugyanazon egymagvú monokomplexek képződnek. A két arány titrálási görbéjének lefolyása szinte megegyező. A komplexképződés pH 3 alatt kezdődik, kialakítva a CuLH részecskét. Ezzel összhangban a titrált oldat kezdeti színe világoskékről a titrálás folyamán zöld színűvé változott pH ~ 6 körül. A CuLH komplexben a réz(II)ion a ligandummal ( $N_{py}$ ,  $N_{amino}$ ,  $N_{amino}$ ) koordinációs módon keresztül egy (5,5)-tagú csatolt

kelátgyűrűt képez. A hidroxilcsoport deprotonálódása és ezt követő koordinációja a CuL részecskét eredményezi. A CuL komplex a 39. A) ábrán bemutatott részecskeeloszlás diagramon látható, hogy pH 5 – 10 között az egyedüli részecske a rendszerben, míg nagyon lúgos pH tartományban megjelenik a CuLH<sub>-1</sub> komplex. Ez feltételezhetően egy koordinálódó vízmolekula deprotonálódásához köthető. A 39. B) ábrán feltüntetett UV-Vis spektrumon pH 2,5-nél látható egy abszorpciós sáv, melynek  $\lambda_{\max}$  értéke 650 nm. A pH növelésével megfigyelhető egy hipszokróm eltolódás, amely pH 4,4 körül 600 nm-nél állandósul. A részecskeeloszlással összevetve ez a CuL komplex domináns megjelenéséhez köthető. Ugyanehhez társítható az ezzel párhuzamosan pH 3,6-nál és 400 nm-nél megjelenő második elnyelési sáv, melynél hiperkróm változás figyelhető meg a pH növelésével.



A fluor szubsztituenssel módosított Salpyran vegyületeknél a 4F-Salpyran és 6F-Salpyran esetében a Salpyrannal megegyező komplexek képződnek. A két vegyület részecskeeloszlása és UV-Vis spektruma is megegyezik a Salpyranéval. Réz(II)-komplexeik stabilitási állandóit összevetve a 7. táblázatban a 4F- és 6F-Salpyran esetében minimálisan kisebb állandókat tudunk számolni. A szintén elektronszívó trifluorometoxi-csoporttal rendelkező 4CF<sub>3</sub>O-Salpyran esetében ugyanezen réz(II)-komplexeiket tudtuk leírni, viszont még kisebb stabilitási állandókkal. A fentiekkel ellentétben az elektronszívó metoxycsoportot tartalmazó MetO-Salpyrannál sikerült a CuLH<sub>2</sub> komplexet leírni. Ezen komplexben a réz(II)ion ( $N_{\text{py}}$ ,  $N_{\text{amino}}$ ) kétfogú koordinációs móddal kötődik a ligandumhoz.

A 40. ábrán feltüntetett részecskeeloszlás alapján az előző vegyületekkel ellentétben ekvimoláris arány esetén pH 4 körül mind a  $\text{CuLH}_2$ , mind a  $\text{CuLH}$  jelen van a rendszerben. A  $\text{CuLH}$  és  $\text{CuL}$  pH 5 körül közel 50% - 50%-ban van jelen, a  $\text{CuL}$  csak pH 6 felett válik domináns komplexé. Az öt vegyület  $\text{CuLH}$  komplexének stabilitási állandóit

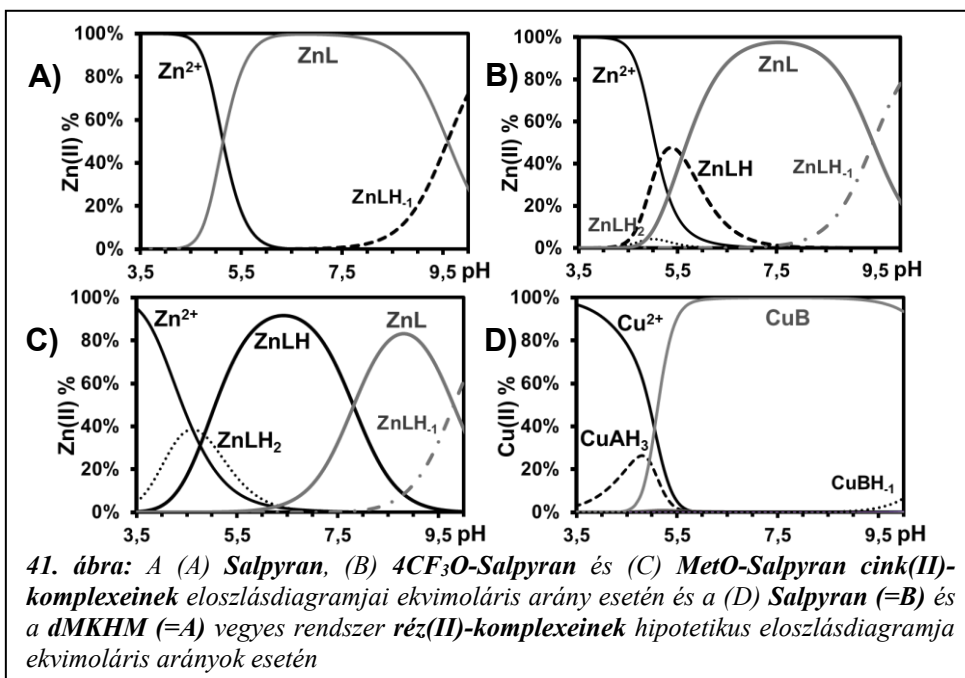


összehasonlítva minimális különbséggel, de a MetO-Salpyran komplexének a legnagyobb. Azonban a domináns részecske, a  $\text{CuL}$  komplex stabilitási állandója a Salpyran-éval megegyező, vagyis a szubsztituens nincs befolyással a fiziológias pH-n jelenlévő komplex stabilitási állandójára.

A **cink(II)ionokkal** végzett pH-potenciometriás kísérlettel meghatározott komplexek stabilitási állandói a 7. táblázatban láthatók. A vegyületek komplexképződése és koordinációs módja a cink(II)ionnal hasonló a réz(II)ionéhoz, ugyanakkor a cink(II)-komplexek stabilitási állandói kisebbek. Csak egymagvú és monokomplexek képződését tudtuk leírni. A  $\text{ZnLH}_1$  részecske a lúgos pH-n bekövetkező cink(II)ion hidrolíziséhez köthető vegyes cink-hidroxokomplex. A 41. A) ábrán feltüntetett eloszlásdiagram alapján elmondható, hogy pH 5-nél a Salpyran 50%-a kötődik a cink(II)ionhoz. A Salpyran vegyületnél nem, de szubsztituált módosulatainál sikerült a protonált komplexek képződésének leírása. A 4F- és 6F-Salpyran esetén a  $\text{ZnLH}$  komplexet is ki tudtuk számolni, míg a sztérikusan nagyobb szubsztitúciós csoportot tartalmazó 4CF<sub>3</sub>O- és 4MetO-Salpyran esetében már a  $\text{ZnLH}_2$  illesztése is lehetséges volt.

A 41. B) ábrán bemutatott részecskeeloszláson látható, hogy a 4CF<sub>3</sub>O-Salpyran esetében a kétszeresen protonált  $\text{ZnLH}_2$  komplex minimálisan van jelen pH 5-nél, míg a MetO-Salpyran esetén (41. C) ábrán látható) pH 4,5-nél majdnem 40%-ban jelen van a komplex. A két vegyület részecskeeloszlása alapján elmondható, hogy a 4MetO-Salpyran  $\text{ZnL}$  komplexének képződése lúgosabb pH tartomány felé tolódik el. A 4MetO-Salpyran rendszerben pH 7 körül a fő részecske az  $\text{ZnLH}$ , addig a másik négy ligandum esetében a ( $\text{N}_{\text{py}}$ ,  $\text{N}_{\text{amino}}$ ,  $\text{N}_{\text{amino}}$ ,  $\text{O}^-$ ) koordinációs módú  $\text{ZnL}$ . A réz(II)-komplexekhez hasonlóan a protonált komplexeket összehasonlítva a legnagyobb stabilitási állandó a MetO-Salpyran komplexekhez köthető. Azonban a  $\text{ZnL}$  komplex stabilitási állandója a többi vegyületéhez képest minimálisan, de a Salpyran esetén a legnagyobb.

Amíg a korábbi fejezetben a vizsgált aroil-hidrazonok és a dMKHM peptid vegyes ligandumú komplex kialakítására voltak képesek, addig a 41. D) ábrán látható hipotetikus eloszlásdiagram alapján pH 5 felett a réz(II)ion várhatóan csak a Salpyranhoz koordinálódik, és nem várható vegyes ligandumú komplex képződése a peptiddel. Ezért a Salpyrannal nem végeztünk kompetíciós oldategyensúlyi vizsgálatokat a HuPrP (103-112) fragmenssel (dMKHM).



#### 4.3.2.2. Az AEtQ és ACyQ vegyületek oldategyensúlyi vizsgálata réz(II)- és cink(II)ionnal

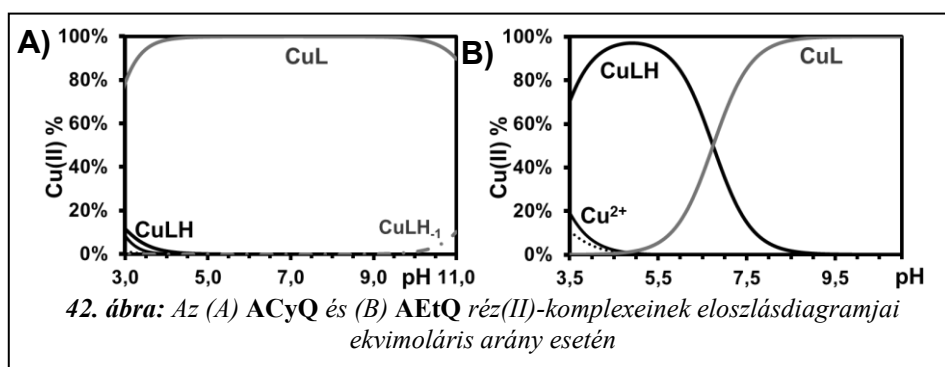
A 8-hidroxikinolin alapvázat tartalmazó vegyületek komplexképződése a réz(II)-, illetve cink(II)ionokkal hasonló képet mutat az előző vegyületekhez. Hasonlóan a Salpyranhoz, az AEtQ és ACyQ négy koordinációra képes donoratomot tartalmaz. A kinolin gyűrű piridintípusú nitrogénatomhoz tartozó pK értéket annak nagyon savas jellege miatt itt sem tudtuk meghatározni. A pH-potenciometriával meghatározott protonálódási és deprotonálódási állandókat a 8. táblázatban tüntettem fel. A legkisebb pK érték a primer aminocsoporthoz rendelhető, míg a szekunder aminocsoport és a hidroxilcsoport deprotonálódásának folyamata részben átfed. A deprotonálódás sorrendje azonban csak a mikro-állandók meghatározásával lenne lehetséges.

**8. táblázat:** Az AEtQ és ACyQ protonálódási állandói ( $\lg\beta$ ), deprotonálódási állandói ( $pK$ ) és réz(II)- és cink(II)-komplexeinek stabilitási állandói ( $\lg\beta$ ) [ $I = 0,2 M (KCl)$ ,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c_L = 2\text{ mM}$ ]

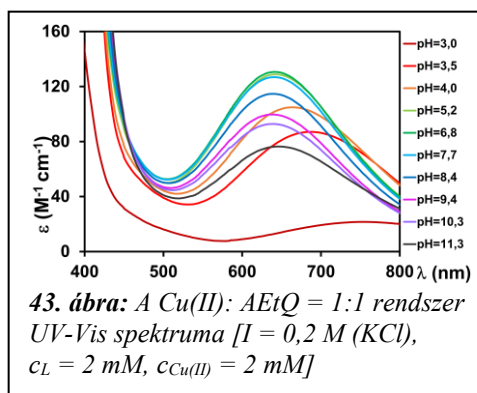
	AEtQ		ACyQ	
	$\lg\beta$	pK	$\lg\beta$	lpK
<b>HL</b>	10,34 (3)	10,34 (3)	10,37 (1)	10,37 (1)
<b>H<sub>2</sub>L</b>	19,38 (4)	9,04 (4)	19,44 (1)	9,07 (1)
<b>H<sub>3</sub>L</b>	25,71 (5)	6,33 (5)	24,94 (1)	5,50 (1)
<b>H<sub>4</sub>L</b>	—	—	—	—
<b><math>\lg\beta</math></b>	<b>Cu(II)</b>	<b>Zn(II)</b>	<b>Cu(II)</b>	<b>Zn(II)</b>
<b>MLH<sub>2</sub></b>	25,68 (5)	—	25,19 (14)	—
<b>MLH</b>	22,99 (2)	19,12 (5)	23,13 (2)	19,56 (3)
<b>ML</b>	16,25 (7)	13,99 (4)	20,96 (3)	15,44 (1)
<b>MLH<sub>-1</sub></b>	—	5,04 (8)	9,02 (4)	6,89 (5)
<b>pM<sub>pH=7,4</sub></b>	8,41	7,20	12,32	7,93

A koordinációs kémiájukat 1:1 és 1:2 fém-ligandum arányok mellett vizsgáltuk, azonban a képződő komplexek részecskeeloszlásában nem találtunk különbséget, csak egymagvú monokomplexek képződését tudtuk leírni. A réz(II)-komplexek stabilitási állandóit a 8. táblázatban tüntettem fel. Feltételezéseink

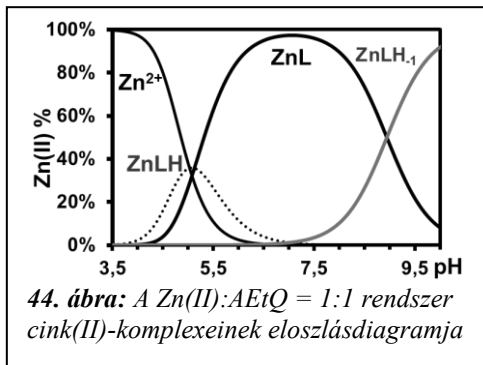
szerint hasonlóan a Salpyranhoz, a CuLH komplexben a **réz(II)ion** az ( $N_{py}$ ,  $N_{amino}$ ,  $N_{amino}$ ), míg a CuL komplex esetén az ( $N_{py}$ ,  $N_{amino}$ ,  $N_{amino}$ ,  $O^-$ ) koordinációs móddal kötődik a ligandumhoz. Lényeges különbséget a 42. ábrán a részecskeeloszlásokon figyelhetünk meg. Az ACyQ komplexeinek eloszlása nagyon hasonlít a 39. A) ábrán feltüntetett Salpyranéhoz. A CuL komplex az ACyQ esetén a teljes pH-tartományban dominál, számottevően nincs jelen más komplex a rendszerben. Ezzel ellentétben az AEtQ esetén a flexibilisebb alifás diamincsoport lehetőséget ad a stabil CuLH komplex képződésére. A 42. B) ábrán látható részecskeeloszlás alapján pH 7-ig a CuLH a fő komponens az oldatban. A CuL komplex a lúgosabb pH-tartományban válik dominánssá.



A szerkezetek alátámasztására UV-Vis spektrofotometriás kísérleteket végeztünk. A két vegyület réz(II)ion rendszereinek UV-Vis spektrális képe megegyezik, a Salpyran típusú vegyületekkel ellentétben egy abszorpciós sáv mutatkozik a spektrumon 640 nm hullámhossz maximumnál. Az ACyQ fotometriás titrálása közben a pH növelésével hiperkróm eltolódás figyelhető meg egészen pH 6-ig, ahol a moláris abszorpciós koefficiens értéke csaknem állandósul. Ezzel ellentétben a 43. ábrán bemutatott ekvimoláris Cu(II) - AEtQ rendszer spektrálisan más képet mutat. A pH növelésével 6,8-ig a hiperkróm eltolódást egy jelentős hipokróm eltolódás követi. Ez a változás a részecskeeloszlás alapján a CuL komplex rendszerbeli mennyiségének növekedéséhez, a hidroxilcsoport koordinációjához köthető.

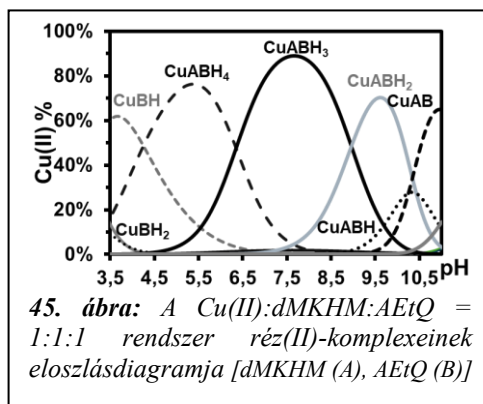


**Cink(II)**-komplexeiket összehasonlítva az AEtQ és ACyQ kölcsönhatása a fémionnal megegyezik. Habár az ACyQ cink(II)-komplexeinek stabilitási állandói kicsit nagyobbak, mint az AEtQ esetében. A képződő cink(II)-komplexek stabilitási állandói a 8. táblázatban láthatók. A két vegyület részecskeeloszlása szinte teljesen azonos. A vegyületek komplexeinek eloszlását a 44. ábrán a Zn(II):AEtQ = 1:1 rendszer eloszlása szemlélteti.



#### 4.3.2.3. A HuPrP (103-112) és az AEtQ és ACyQ vegyes ligandumú rendszerek vizsgálata réz(II)- és cink(II)ionnal

Hasonlóan a 4.2. fejezetben tárgyalt X1THIO és X1FUR aroil-hidrazonokhoz, az AEtQ és ACyQ ligandumok kompetícióját is tanulmányoztuk a HuPrP (103-112) fragmenssel (Ac-SKPKTNMKHM-NH<sub>2</sub>). Az oldategyensúlyi vizsgálatokat réz(II)- és cink(II)ionok jelenlétében vizsgáltuk ekvimoláris arányokat alkalmazva. Az ACyQ esetén a pH-potenciometriás adatok alapján nem tudunk vegyes komplexet leírni egyik vizsgált fémion esetén sem. Ezzel ellentétben az AEtQ vegyület képes vegyes ligandumú komplex kialakítására a peptiddel. A HuPrP (103-112) fragmens protonálódási állandóit és a réz(II)- és cink(II)ionokkal képződő komplexeinek stabilitási állandóját lásd a 4.2.1. fejezet 2. táblázatában. A titrálási adatok illesztése alapján a feltételezett képződő komplexek és stabilitási állandóik a 9. táblázatban láthatók. A 45. ábrán a pH-függő részecskeeloszlás alapján a vegyes ligandumú komplex képződése pH 4 alatt kezdődik el.

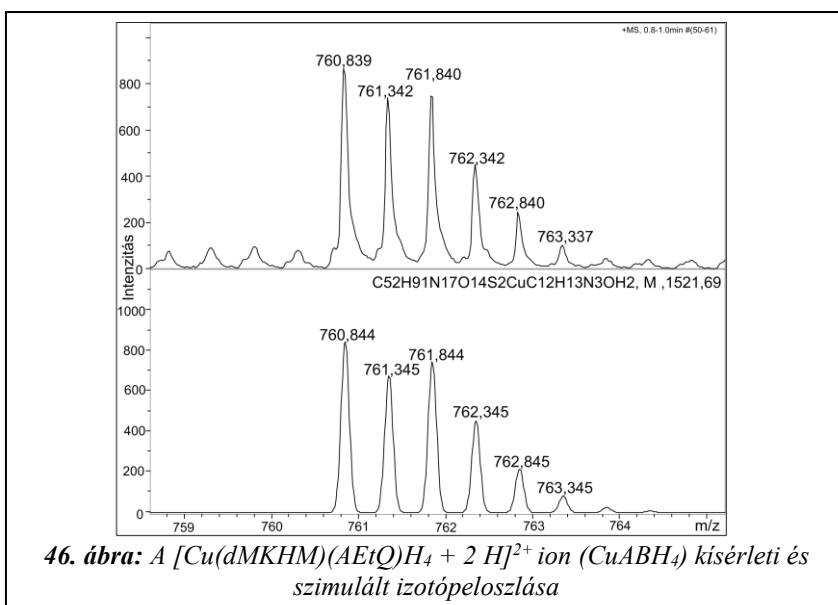


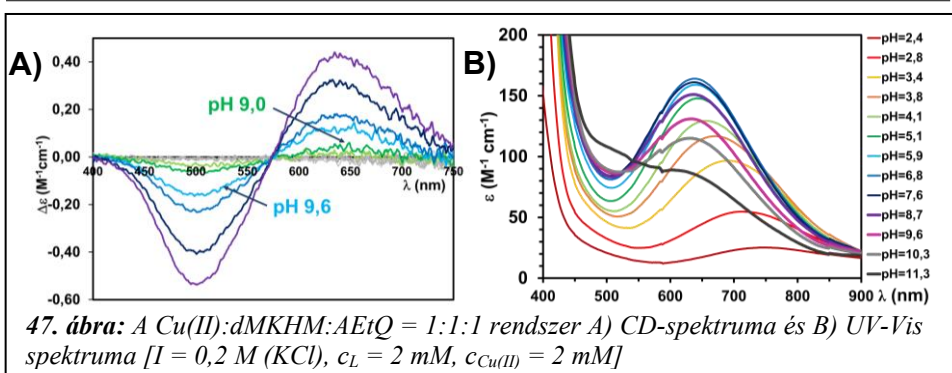
**9. táblázat:** A HuPrP (103-112) (dMKHM) és az AEtQ vegyes rendszerben képződő vegyes ligandumú Cu(II)- és Zn(II)-komplexeinek stabilitási állandói ( $\lg\beta$ ) [ $I = 0,2 \text{ M (KCl)}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $c_L = 2 \text{ mM}$ ]

A = Ac-SKPKTNMKHM-NH<sub>2</sub>  
B = AEtQ

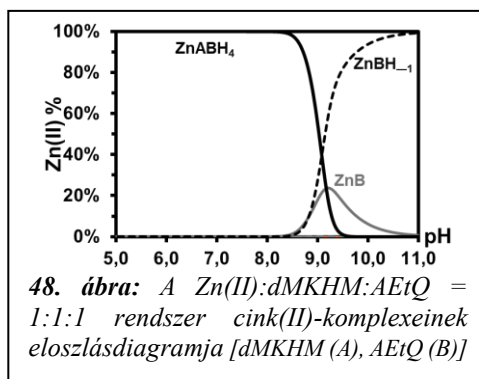
$\lg\beta$	Cu(II)	Zn(II)
MABH <sub>4</sub>	59,09 (2)	53,78 (8)
MABH <sub>3</sub>	52,74 (2)	—
MABH <sub>2</sub>	43,78 (3)	—
MABH	33,35 (3)	—
MAB	23,10 (3)	—
MABH <sub>-1</sub>	11,45 (5)	—

A komplexek szerkezetének azonosítására UV-Vis és CD-spektroszkópiát, illetve tömegspektrometriát alkalmaztunk. Oldategyensúlyi körülmények között a CuABH<sub>4</sub> komplex 5,5-ös pH-n a fő komponens. Tömegspektrometriás kísérlettel sikerült kimutatnunk a CuABH<sub>4</sub> komplex jelenlétét. A 46. ábrán a 760,839 m/z (számolt: 760,844 m/z) értéknél detektált ion a  $[\text{C}_{52}\text{H}_{91}\text{N}_{17}\text{O}_{14}\text{S}_2\text{CuC}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O} + 2\text{H}]^{2+}$  összetételű kétszeresen pozitív töltésű komplexnek feleltethető meg és az ion izotópeloszlása megegyezik a szimulált izotópeloszlással.

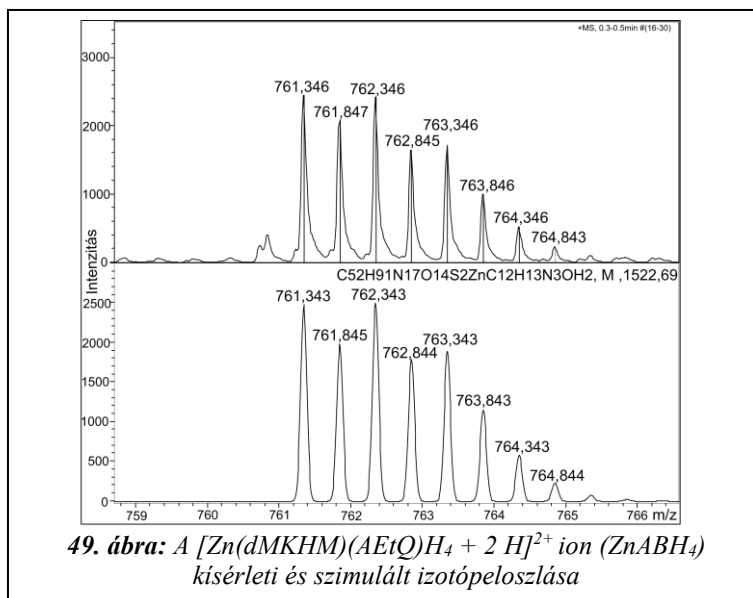




Feltételezhetően a komplex kialakításában a peptid a hisztidin imidazolil-oldalláncán keresztül kötődik a Cu(II)-ionhoz, míg a három lehetséges kötőhelyet az AEtQ nitrogéndonoratomjai foglalják el. Ez magyarázatot ad arra, miért nem figyelhető meg a 47. A) ábrán CD-aktivitás egészen pH 9-ig, ugyanis a peptidok esetében a hisztidin koordinációja a réz(II)ionhoz nem mutat CD-aktivitást, és az AEtQ sem rendelkezik kiralitás centrummal; továbbá a peptidváz amidnitrogénjeinek koordinációja is kizárható ezáltal. A bázikus pH tartományban a CuABH és CuAB komplexek megjelenésével 500 nm-nél egy negatív Cotton-effektus figyelhető meg, míg 650 nm hullámhossznál egy pozitív Cotton-effektus. Hasonló lefolyású CD-görbe figyelhető meg a Cu(II)-dMKHM rendszer ( $N_{\text{im}}, N^-, N^-, N^-$ ) koordinációs módú komplexei esetén. Ezen megfontolásokból és a 47. B) ábrán látható UV-VIS spektrumon pH 10 fölött az abszorpciós sáv a kisebb hullámhossz értékek felé történő kiszélesedéséből arra következtethetünk, hogy az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációjuk a Cu(II)-ionhoz lassan kiszorítja az AEtQ vegyületet. A lúgos pH tartományban a peptidben a lizil-oldalláncok deprotonálódása is bekövetkezik, azonban ez nem jelent változást a koordinációban. A titrálási adatok alapján a cink(II)ionnal is képes vegyes ligandumú komplex kialakulni a dMKHM és AEtQ között. A 48. ábrán bemutatott részecskeeloszláson látható, hogy pH 9-ig csak a ZnABH<sub>4</sub> vegyes ligandumú komplex van jelen a rendszerben. A ZnABH<sub>4</sub> komplex stabilitási állandója a vártnak megfelelően kisebb, mint a réz(II)ion esetén (9. táblázat). Elképzeléseink alapján az erősen lúgos pH tartományban az AEtQ hidroxilcsoportjának deprotonálódása és ezt követő koordinációja a cink(II)ionhoz teljesen kiszorítja a



hisztidin imidazolnitrogénjét a koordinációs szférából. A ZnB komplex kialakulásával párhuzamosan a cink(II)ion hidrolízise is bekövetkezik, és kialakul a  $ZnBH_4$  komplex. A képződő  $ZnABH_4$  komplexet tömegspektrometriával ki tudtuk mutatni. A 49. ábrán a  $[C_{52}H_{91}N_{17}O_{14}S_2ZnC_{12}H_{13}N_3O+2H]^{2+}$  összetételnek megfelelő mért 761,346 m/z (számolt: 761,343 m/z) értékű kétszeresen pozitív töltésű ion izotópeloszlása jó egyezést mutat a szimulált izotópeloszlással.



#### 4.4. A HuPrP (103-112) fragmens és mutánsának fémion-katalizált oxidációjának vizsgálata fémion-fehérje kölcsönhatást gyengítő molekulák jelenlétében

A fehérjéket felépítő aminosavak közül a metionil-oldallánc reverzibilis oxidációja egy fiziológiailag jelentős folyamat, amely feltételezhetően részt vesz a celluláris szabályozás molekuláris mechanizmusában. A reverzibilis oxidáció funkcionálisan képes megváltoztatni fontos jelátviteli fehérjéket, illetve a fehérjéket alkotó metionin és hisztidin oxidációja a fehérjék negyedleges szerkezetének átalakítása révén hozzájárul azok aggregációjához és az ezt követő patológiai folyamatok kialakulásához.

A fentebb említett okok miatt munkám fő céljaként tűztük ki új, illetve már korábban szintetizált, de módosított vegyületek fehérjék fémion-katalizált oxidációra gyakorolt hatásának tanulmányozását. A kísérleteket a HuPrP (103-112) fragmenssel ( $Ac-SKPKTNMKHM-NH_2$  (dMKHM)) és a M112A mutánsával, az  $Ac-SKPKTNMKHA-NH_2$  (dMKHA) peptiddel végeztük el.

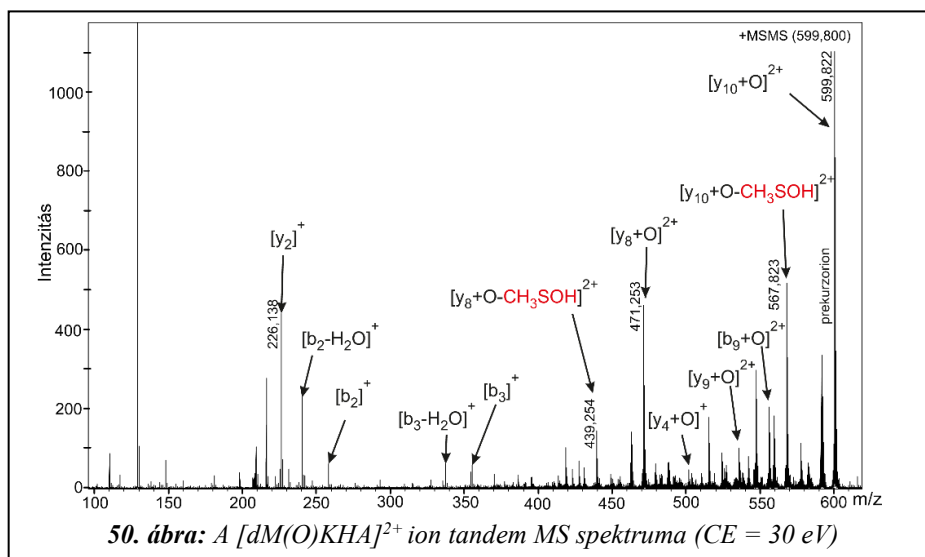
---

Kutatócsoportunkban korábban már vizsgálták ezen peptidek fémion-katalizált oxidációját Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendszerben.<sup>157</sup> Céljuk az oxidáció során képződött termékek azonosítása volt. A kapott eredményekből megállapították, hogy a metionintartalmú peptidekben a peptidlánc hasadása nem következik be, továbbá a peptidben jelenlévő metionin minden esetben metionin-szulfoxidá oxidálódik.

A vizsgált ágenseket két nemzetközi kutatócsoport biztosította számunkra. Az együttműködések keretein belül az aroil-hidrazon vegyületeket Nicolas Rey (Pontificia Universidade Católica Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazília) kutatócsoportja, míg a módosított szalán típusú vegyületeket George Kostakis (University of Sussex, Brighton, Egyesült Királyság) kutatócsoportja állította elő. A fejlesztett és vizsgált vegyületeknél az egyik fontos szempont az volt, hogy olyan vegyületeket állítsanak elő, amelyek megfelelő vér-agy gáton való átjutási tulajdonsággal rendelkeznek. Továbbá, a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy ezek a potenciális védőmolekulák mennyire képesek visszaszorítani a peptid oxidációját az általunk alkalmazott analitikai körülmények között. Mindemellett minden vegyület esetén végeztünk kontrollkísérleteket. A kontrollkísérletekre több okból is szükség volt. Elsődlegesen annak vizsgálatára, hogy a Cu(II)-ion és/vagy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatására történik-e szerkezeti változás a vegyületekben, ez lehet akár oxidáció vagy hasadás, továbbá számottevő változás következik-e be az ágens mennyiségében, amely befolyásolja a peptiddel végzett oxidációs kísérletet. A kontrollkísérletek a képződő csúcsok beazonosítása és a vegyületekhez való hozzárendelés miatt, illetve a további kromatográfias módszerfejlesztés szükségességének megállapítása miatt is fontos volt számunkra. Az oxidáció követésére alkalmazott kromatográfias módszerekre felállított egyik legfőbb követelmény, hogy az ágensekhez köthető eluálódó csúcsok retenciós ideje különböző legyen a peptid és ismert oxidációs termékeinek retenciós idejétől, és azok ne befolyásolják az utóbbiak detektálását.

#### 4.4.1. A HuPrP (103-112) M12A mutánssal végzett oxidációs kísérletek

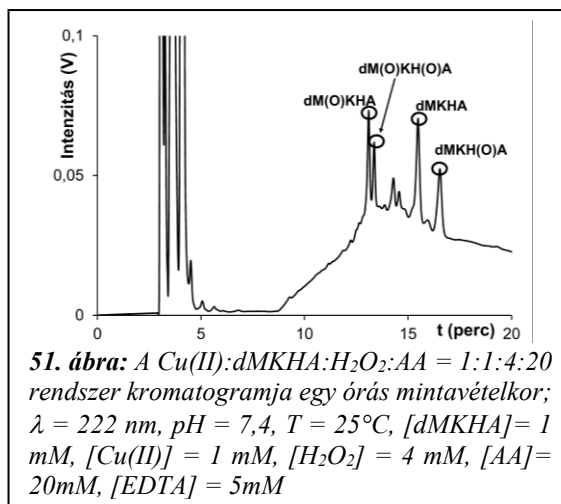
Az általunk kapott eredmények közül elsőként az Ac-SKPKNMKHA-NH<sub>2</sub> mutánssal végzett kísérletek eredményeit ismertetem. (A továbbiakban a dMKHA rövidítést használom.) Hasonlóan a korábbi tapasztalatokhoz<sup>157</sup> a Cu(II):dMKHA:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1:1:4 rendszerben csak egy termék képződését tudtuk folyadékkromatográfiával detektálni. Folyadékkromatográfiával összekötött tandem tömegspektrometriával megállapítottuk, hogy a metionin oxidálódik metionin-szulfóxiddá (dM(O)KHA). Az 50. ábrán a [y<sub>10</sub>+O]<sup>2+</sup> ion, vagyis a [dMKHA+O]<sup>2+</sup> kétszeresen pozitív töltésű proton adduktja 599,822 m/z (számított: 599,822 m/z) értéknél detektálható. Az [y<sub>9</sub>+O]<sup>2+</sup> és [y<sub>8</sub>+O]<sup>2+</sup> termékionok 535,302 m/z és 471,253 m/z (számított: 535,300 m/z és 471,253 m/z) értéknél láthatók. Az oxidált termék fragmentációja során a metionin-szulfoxidhoz köthető karakterisztikus 64 Da-os veszteség is megfigyelhető az [y<sub>10</sub>+O]<sup>2+</sup> és [y<sub>8</sub>+O]<sup>2+</sup> ionok esetén 567,823 m/z és 439,254 m/z (számított: 567,823 m/z és 439,254 m/z) értékeknél. A termék szerkezetét a fentiekén kívül továbbá bizonyítja a proton addukttal rendelkező [y<sub>2</sub>]<sup>+</sup> ion 226,138 m/z értéknél (elméleti 226,130 m/z), amely a HisAla-NH<sub>2</sub> szekvenciának megfeleltethető, és egyértelműen bizonyítja, hogy az oxigén nem a hisztidin aminosavdalláncra helyezkedik el.



Hasonlóan az Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub> (nMKHA) nonapeptidhez, aszkorbinsav jelenlétében is vizsgáltuk a szerkezetében szinte megegyező dMKHA peptidet. A korábbi tapasztalatokhoz hasonlóan a Cu(II):dMKHA:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:aszkorbinsav = 1:1:4:20 rendszerben az idő előrehaladtával

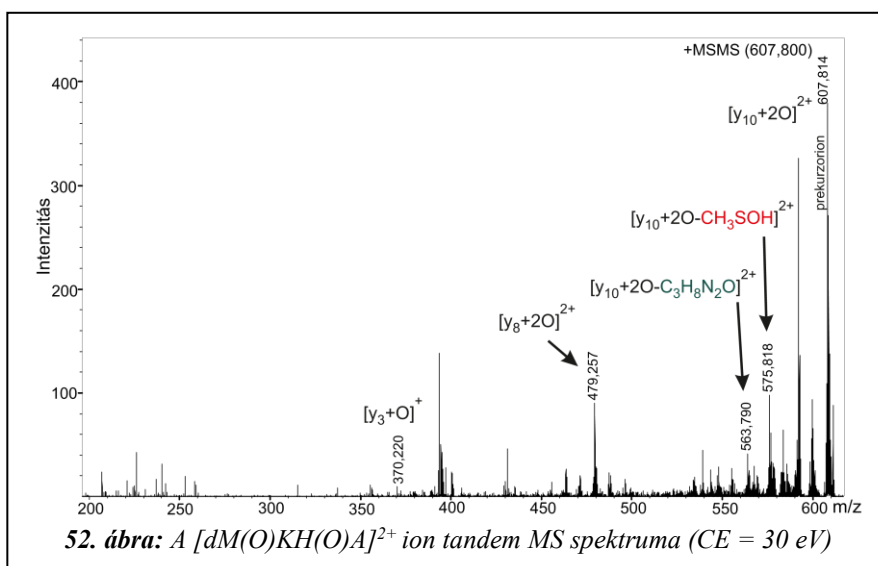
több termék is keletkezett. Az 51. ábrán a 60 perces mintavétel kromatogramja látható. A holtidőnél megjelenő nagy intenzitású csúcsok a szervetlen ionokhoz,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -hoz és az aszkorbinsavhoz rendelhetők. A kromatogramon feltüntettem az általunk azonosított csúcsokat. A dMKHA 15,5 percnél eluálódik, míg a metionin-szulfoxid származék 13,1 percnél. Korábbi tapasztalatok alapján a 16,6 percnél eluálódó csúcs a dMKH(O)A-hoz, vagyis a hisztidin egyszeres oxidációja során keletkező 2-oxo-hisztidint tartalmazó oxidált termékhez köthető, míg a 13,4 percnél eluálódó csúcs feltételezhetően a [dMKHA+2O] kétszeresen oxidált termékhez. A csúcsok azonosítására LC-MS/MS méréseket végeztünk. A fenti várakozásainkat alátámasztották a mérések, a csúcsok sorrendje annak megfelelő volt.

Tömegspektrometriával kimutattuk, hogy a kétszeresen oxidált termék esetén mind a metionin, mind a hisztidin oldallánca egy-egy oxigén addíciónálódik.



**51. ábra:** A  $\text{Cu(II)}:\text{dMKHA}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{AA} = 1:1:4:20$  rendszer kromatogramja egy órás mintavételkor;  $\lambda = 222 \text{ nm}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $[\text{dMKHA}] = 1 \text{ mM}$ ,  $[\text{Cu(II)}] = 1 \text{ mM}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4 \text{ mM}$ ,  $[\text{AA}] = 20 \text{ mM}$ ,  $[\text{EDTA}] = 5 \text{ mM}$

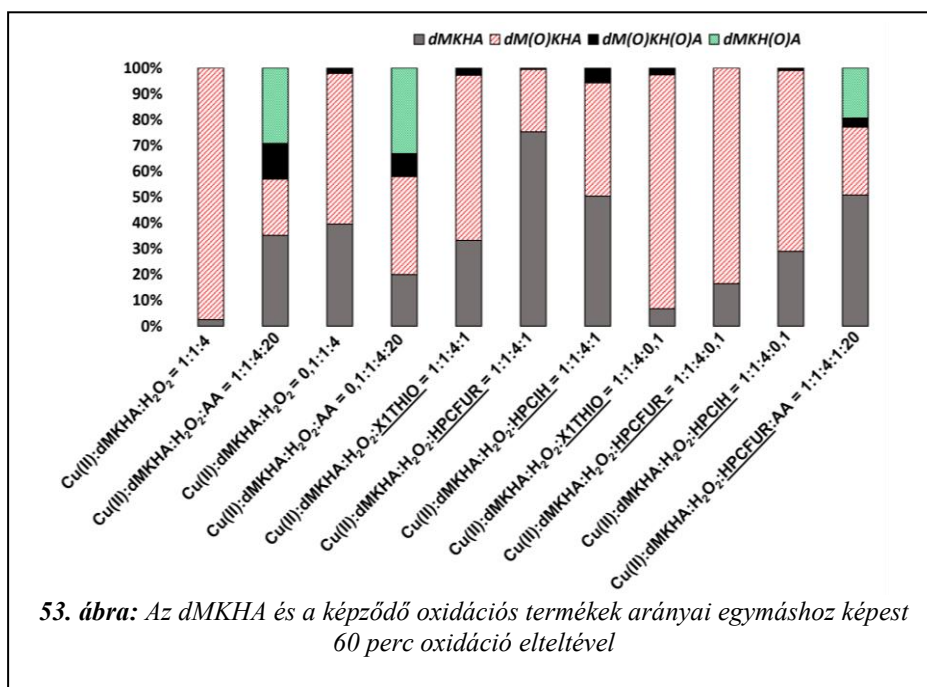
Az 52. ábrán bemutatott tömegspektrumon az ionok hidrogénadduktként vannak jelen. A jelek kis intenzitása ellenére a 607,814 m/z értéknél (számított: 607,819 m/z) látható a kétszeres töltésű prekursorion, az  $[\text{y}_{10}+2\text{O}]^{2+}$ , vagyis a  $[\text{dMKHA}+2\text{O}]^{2+}$ . A metioninon és hisztidinen bekövetkező oxidációt támasztja alá a korábbi tapasztalatokhoz hasonlóan egy 64 Da-os és 88 Da-os vesztes is. Az  $[\text{y}_{10}+2\text{O}-\text{CH}_3\text{SOH}]^{2+}$  és  $[\text{y}_{10}+2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_8\text{N}_2\text{O}]^{2+}$  ionok 575,818 m/z és 563,790 m/z (elméleti 575,818 m/z és 563,787 m/z) értéknél láthatók. A hisztidin oxidációját egyértelműen bizonyítja 370,220 m/z értéknél (számított: 370,220 m/z) az  $[\text{y}_3+\text{O}]^+$  ion, amely a -KHA- aminosav szekvenciának és egy oxigénnek feleltethető meg. Mivel a lizin és alanin oldalláncon nem jellemző egy oxigén addíciója így kijelenthető, hogy valószínűleg a hisztidin oxidálódik 2-oxo-hisztidinné.



A HPLC mérések során kapott eredmények alapján elmondható, hogy a  $Cu(II):dMKHA:H_2O_2:aszorbinsav = 1:1:4:20$  rendszerben az oxidáció kezdetekor vett mintavételi időpontban a peptid az oxidált termékekhez képest közel 72%-ban van jelen, míg a  $dM(O)KHA$  már közel 15%-ban, illetve a másik két azonosított termék, a  $dMKH(O)A$  és a  $dM(O)KH(O)A$  közel 10%-ban és 3%-ban. Egy óra elteltével a területarányok összehasonlítása alapján látható, hogy a  $dM(O)KHA$  aránya ~22%, míg a másik két oxidált termék arányai ~29%-ra és ~14%-ra nőnek. A  $Cu(II):dMKHA:H_2O_2 = 1:1:4$  rendszerben egy óra elteltével a peptid teljes mennyisége oxidálódott, vagyis az aszorbinsav jelenléte ezen arányok esetén bizonyítottan védi a peptidet az oxidációtól.

A fémion-fehérje kölcsönhatást gyengítő aroil-hidrazonok közül három vegyülettel végeztünk kísérletet. A vízoldható X1THIO (1-metil-1H-imidazol-2-karboxaldehid-2-tiofenil hidrazon) mellett két vízben rosszul oldódó vegyülettel, a HPCIH-vel (piridin-2-karboxaldehid izonikotinoil-hidrazon) és a HPCFUR-ral (piridin-2-karboxaldehid 2-furoil-hidrazon) is végeztünk kísérleteket. A HPCIH és HPCFUR törzsoldatok víz:acetonitril = 50:50 oldószerkeletben készültek. A vegyületekkel végzett kontrollkísérletek réz(II)ionnal és hidrogén-peroxiddal nem mutattak detektálható változást 222 nm-en – ami az elsődleges detektálási hullámhossz –, illetve más hullámhosszon sem.

Az 53. ábrán a dMKHA peptid és a képződő oxidációs termékek arányait mutatom be egymáshoz képest az oxidáció indítását követően 60 perc elteltével. Egy óra elteltével a Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendszerben szinte a teljes peptid oxidálódik, és a képződő termék a metionin-szulfoxid oldalláncot tartalmazó peptid, azaz szinte csak a dM(O)KHA van jelen a rendszerben. Hússzoros feleslegű aszkorbinsav jelenlétében a 2-oxo-hisztidin származék közel 30%-ban, és a peptid kétszeresen oxidált terméke 10%-ban van jelen. Ha a rendszerben nincs jelen az aszkorbinsav, és katalitikus mennyiségű réz(II)ion van jelen egy órás mintavételnél, a peptid 40%-ban még változatlan formában van a rendszerben, és a dM(O)KHA mellett minimálisan a kétszeresen oxidált termék is megjelenik. Ha katalitikus réz(II)ion mellett aszkorbinsav is jelen van a mintában, az egyszeresen oxidált termékek aránya nő a korábban vizsgált ekvimoláris réz(II)ionot tartalmazó rendszerhez képest. Azonban a peptid még 20%-ban változatlan formában van jelen, vagyis itt is megmutatkozik az aszkorbinsav kettős szerepe, amellett, hogy pro-oxidánsként elősegíti a hisztidin oxidációját, valamelyest védi is a peptidet az oxidációtól.



Az oszlopdiagramon feltüntetett területarányokat összevetve a Cu(II):dMKHA:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1:1:4 rendszerhez képest, az ekvivalens mennyiségben aroil-hidrazont tartalmazó minták esetén jelentősen visszaszorul a metionin oxidációja, habár minimálisan megjelenik a kétszeresen oxidált dM(O)KH(O)A

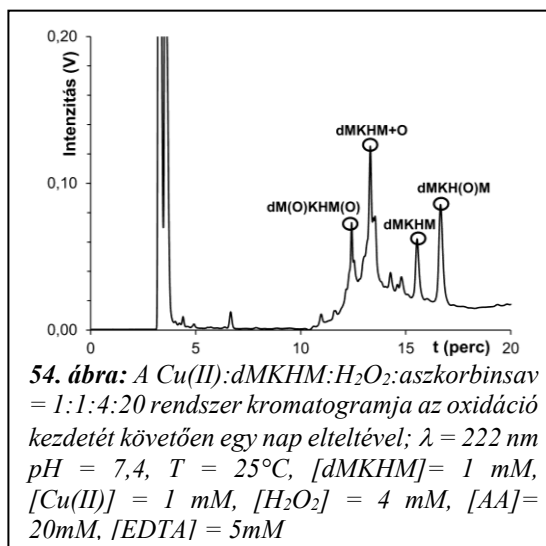
is az X1THIO és HPCIH aroil-hidrazonokat tartalmazó rendszereknél. Ezen arányok esetén a dM(O)KHA oxidált termék keletkezését a HPCFUR szorítja vissza a legjobban, míg a vízoldható X1THIO a legkevésbé. A Cu(II):dMKHA:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:aroil-hidrazon = 1:1:4:0,1 arányú rendszerek esetén az aroil-hidrazon a metionin-szulfoxid képződését kevésbé szorítja vissza, az X1THIO esetén az oxidáció mértéke megegyező a Cu(II):dMKHA:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=1:1:4 rendszernél megfigyelttel. Az oxidációs vizsgálatok során megkíséreltük olyan minták vizsgálatát, melyek nagyobb arányban tartalmazták az aroil-hidrazont, viszont csapadékkiválás miatt ezek vizsgálata meghiúsult. Minthogy a három vizsgált aroil-hidrazon közül a HPCFUR bizonyult a legsikeresebbnek az oxidáció visszaszorítása szempontjából, a vegyület hatásosságát aszkorbinsav jelenléte mellett is vizsgáltuk. Az oszlopdiagramon feltüntetett arányokból látható, hogy a 60 percnél vett mintánál a peptid 51%-ban, a reverzibilisen oxidált dM(O)KHA 26%-ban van jelen, míg a dM(O)KH(O)A, illetve a dMKH(O)A termékek 4%-ban és 19%-ban. Összességében elmondható, hogy az aszkorbinsav jelenléte pro-oxidánsként hat a peptid oxidációjára és iniciáló hatású a hisztidin irreverzibilis oxidációjára, azonban a HPCFUR aroil-hidrazon képes a hisztidin oxidációját kis mértékben visszaszorítani.

#### **4.4.2. A HuPrP (103-112) fragmensének oxidációs vizsgálata**

A munka folytatásaként kiterjesztettük a vizsgálatokat a HuPrP (103-112) fragmensre, melynek szekvenciája: Ac-SKPKTNMKHM-NH<sub>2</sub>. *(A továbbiakban a dMKHM rövidítést fogom használni.)* A peptid három oxidációra hajlamos aminosavat tartalmaz, a 109-es és 112-es pozíciókban két metionint és a 111-es pozícióban egy hisztidint. A fragmens oxidációját korábban már vizsgálták kutatócsoportunkban a Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendszerben.<sup>157</sup> A kutatás folytatásaként vizsgáltuk a peptid réz(II)ion-katalizált oxidációját hidrogén-peroxid és aszkorbinsav jelenlétében, illetve a fémion-fehérje kölcsönhatást gyengítő ágensek hatását az oxidációra. A kísérleteket a korábban bemutatott aroil-hidrazonok mellett kiterjesztettük egy további vízoldható aroil-hidrazonra (X1FUR) és hat módosított szalán típusú vegyületre is.

A dMKHM esetén is vizsgáltuk a peptid réz(II)ion-katalizált oxidációját aszkorbinsav jelenlétében. Az 54. ábrán a Cu(II):dMKHM:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:aszkorbinsav = 1:1:4:20 arányú rendszer kromatogramja látható 1 nap mintavételi időt követően, melyen minden tandem tömegspektrometriával azonosított csúcsot is feltüntettem. Egy nap elteltével még mindig jelen van 15,6 perc retenciós időnél a dMKHM oxidálatlan formája az oxidált termékek mellett. A

folyadékkromatográfiával végzett elválasztás során összegyűjtött frakciókat tömegspektrometriával próbáltuk azonosítani, ezeket a kromatogramon is feltüntettem. A peptid kétszeresen oxidált terméke, melyben mindkét metionin oxidálódik metionin-szulfoxiddá, 12,4 percnel eluálódik az alkalmazott folyadékkromatográfiás rendszerben. Az oxidáció során további két, egyszeresen oxidált termék is keletkezik. A dMKHM

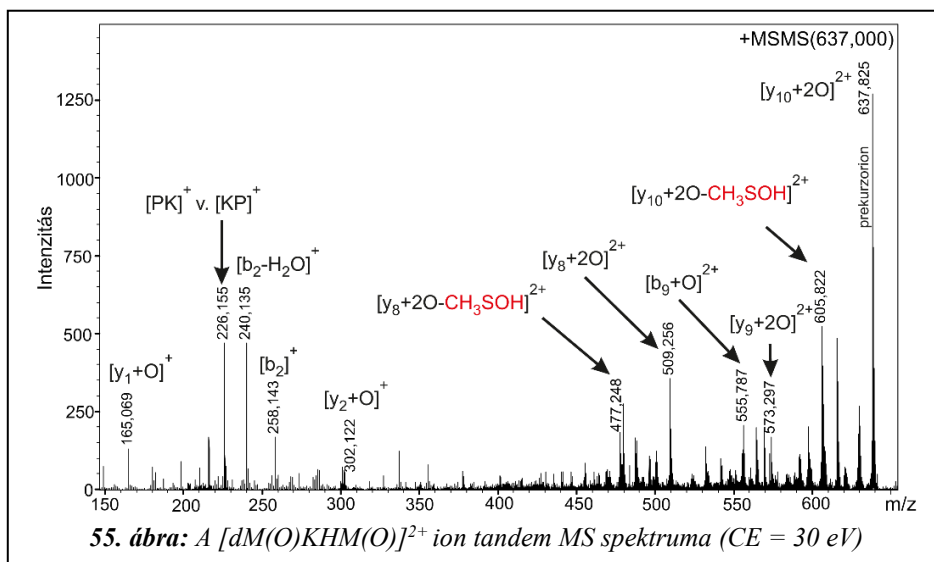


**54. ábra:** A Cu(II):dMKHM:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:aszorbinsav = 1:1:4:20 rendszer kromatogramja az oxidáció kezdetét követően egy nap elteltével;  $\lambda = 222 \text{ nm}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $[\text{dMKHM}] = 1 \text{ mM}$ ,  $[\text{Cu(II)}] = 1 \text{ mM}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 4 \text{ mM}$ ,  $[\text{AA}] = 20 \text{ mM}$ ,  $[\text{EDTA}] = 5 \text{ mM}$

egyszeresen oxidált terméke, melyben csak az egyik metionin oxidálódik, 13,3 percnel látható. Függetlenül attól, hogy a 109-es vagy a 112-es metioninon megy végbe az oxidáció, a nagyon hasonló polaritás miatt egyszerre eluálódik az oxidált termék, ezért a továbbiakban az oxidált termékre a dMKHM+O rövidítéssel fogok hivatkozni. A nagyobb visszatartással rendelkező, a peptidhez képest apolárisabb egyszeresen oxidált dMKH(O)M csúcsa 16,7 percnel látható, melyben a hisztidin az irodalom alapján feltételezhetően 2-oxo-hisztidinné oxidálódik. A termékek szerkezetét a tandem MS mérések során kapott tömegspektrumok is alátámasztják.

Az 55. ábrán a 12,4 percnel eluálódott dM(O)KHM(O) terméket **637,825 m/z** értéknél (számított: 637,821 m/z) detektáltuk. A kétszeres töltésű, hidrogénionnal adduktot képző  $[\text{y}_{10}+2\text{O}]^{2+}$  prekursorion fragmentációs útvonalának  $[\text{y}_9+2\text{O}]^{2+}$  és  $[\text{y}_8+2\text{O}]^{2+}$  573,297 m/z és 509,256 m/z termékionjai mellett (számított: 573,300 m/z és 509,252 m/z) a metionin-szulfoxid jelenlétére utaló karakterisztikus 64 Da-os veszteséghez köthető  $[\text{y}_{10}+2\text{O}-\text{CH}_3\text{SOH}]^{2+}$  és  $[\text{y}_8+2\text{O}-\text{CH}_3\text{SOH}]^{2+}$  termékionok 605,822 m/z és 477,248 m/z értéknél (számított: 605,822 m/z és 477,253 m/z) is alátámasztják az oxidált termék szerkezetét. A peptidben a két metionin oxidációját a  $[\text{b}_9+\text{O}]^{2+}$  555,787 m/z (számított: 555,790 m/z), a  $[\text{y}_2+\text{O}]^+$  302,122 m/z (számított: 302,128 m/z) és a  $[\text{y}_1+\text{O}]^+$  165,069 m/z (számított: 165,069 m/z) értéknél detektált ionok egyértelműen alátámasztják. A  $[\text{b}_9+\text{O}]^{2+}$  esetén az oxidációra hajlamos aminosavak közül a Met109 és His111 van jelen az ionban, míg az  $[\text{y}_2+\text{O}]^+$  a -HM(O)-NH<sub>2</sub> szekvencia egyszeresen oxidált ionjaként feleltethető meg és a  $[\text{y}_1+\text{O}]^+$  ion jelenléte az aminosavak közül csak a Met112-t tartalmazza. Ezen eredmények egyértelműen alátámasztják azt, hogy a

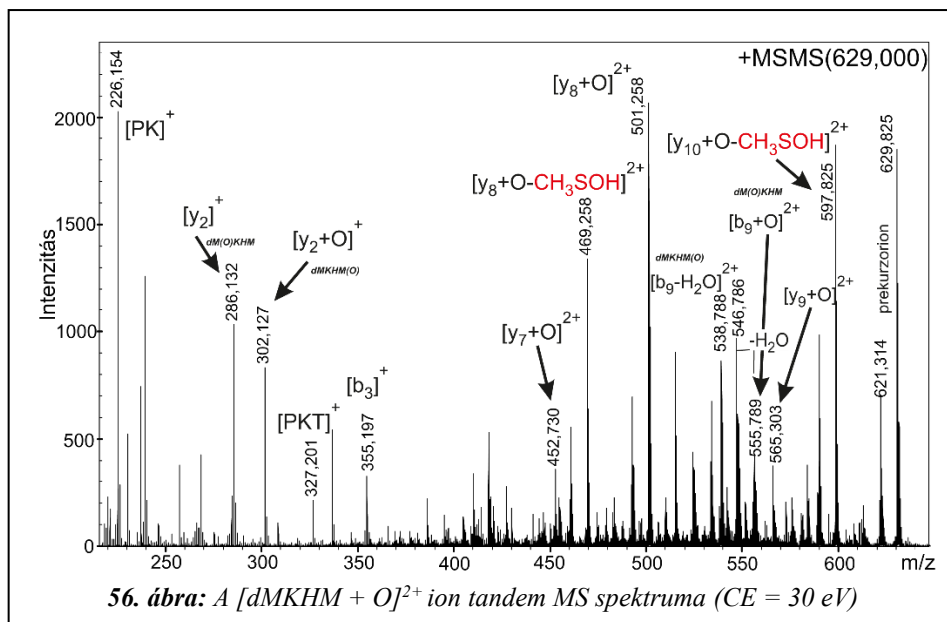
két oxigén a Met109 és Met112 aminosavakra addicionálódik, és a dM(O)KHM(O) termék keletkezik.



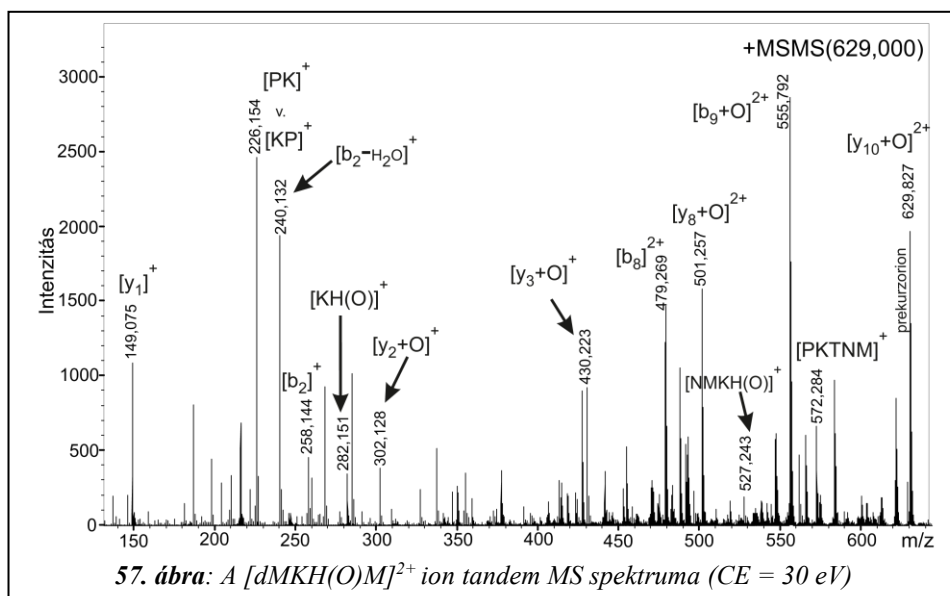
**55. ábra:** A  $[dM(O)KHM(O)]^{2+}$  ion tandem MS spektruma ( $CE = 30$  eV)

A 13,3 percnél eluálódó egyszeresen oxidált termék(ek)nek az MS/MS spektruma az 56. ábrán látható. A kétszeres pozitív töltésű  $[y_{10}+O]^{2+}$  prekuzorionja **629,825 m/z** értéknél (számított: 629,823 m/z) detektálható, illetve a  $[y_{10}+O-NH_3]^{2+}$  ion 621,314 m/z (számított: 621,310 m/z) értéknél. A dMKHM+O prekuzorion fragmentációs útvonala során az  $[y_{10}+O-CH_3SOH]^{2+}$  597,825 m/z (számított: 597,824 m/z), az  $[y_9+O]^{2+}$  565,303 m/z (számított: 565,302 m/z), az  $[y_8+O]^{2+}$  501,258 m/z (számított: 501,255 m/z), az  $[y_8+O-CH_3SOH]^{2+}$  469,258 m/z (számított: 469,256 m/z) és az  $[y_7+O]^{2+}$  452,730 m/z (számított: 452,728 m/z) ionok alátámasztják az egyszeresen oxidációt. Azonban a korábban felsorakoztatott ionok közül a 64 Da-os veszítés, amely a  $CH_3SOH$  összegképletnek feleltethető meg, egyértelműen az egyik metionin egyszeresen oxidációját támasztja alá metionin-szulfoxidá. Függetlenül attól, hogy a Met109 vagy Met112 oxidálódik, a peptid egyszeresen oxidált formája a metionin oxidáció esetén egyidejűleg eluálódik, így a folyadékkromatográfiás elválasztás során gyűjtött frakcióban mind a 109-es (dM(O)KHM) és 112-es (dMKHM(O)) metionin egyszeresen oxidált formái vannak jelen. Ezt a dM(O)KHM termék esetén a fragmentációs útvonalának az 555,789 m/z (számított: 555,790 m/z) értéknél detektált  $[b_9+O]^{2+}$  és egy vízmolekula veszítés 546,789 m/z (számított: 546,785 m/z) értéknél és a 286,132 m/z értékű (számított: 286,133 m/z)  $[y_2]^+$  ion (-HM-NH<sub>2</sub>) egyértelműen bizonyítja. A dMKHM(O) termék jelenlétét, melyben a Met112 egyszeresen oxidálódik, a fragmentációs útvonalára jellemző  $[b_9-H_2O]^{2+}$

538,788 m/z (számított: 538,787 m/z) értéknél és a 302,127 m/z értéknél (számított: 302,128 m/z) detektált  $[y_2+O]^+$  termékionok alátámasztják.



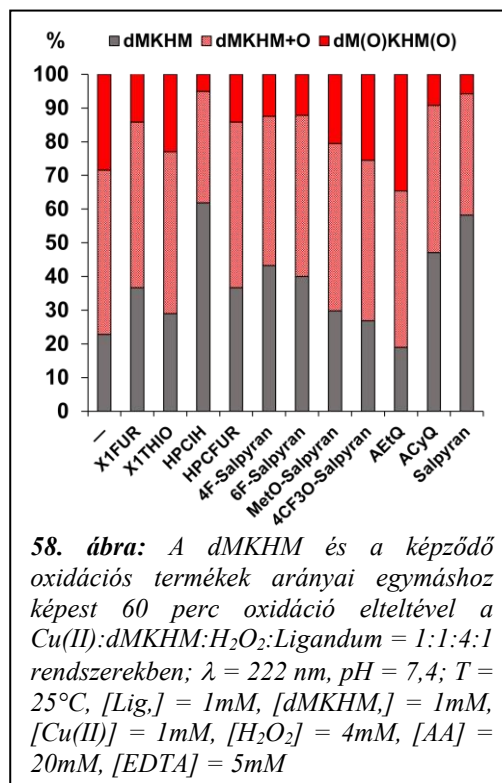
A 16,7 percnél eluálódó frakcióban a **629,827 m/z** (számított: 629,823 m/z) értéknél detektált csúcs szintén egy egyszerűen oxidált termék jelenlétére utal. Az 57. ábrán bemutatott  $[y_{10}+O]^{2+}$  hidrogénionnal adduktot képző, kétszeresen protonált prekursorion fragmentációs útvonalán detektált  $[b_9+O]^{2+}$  555,792 m/z (számított: 555,790 m/z),  $[y_8+O]^{2+}$  501,257 m/z (számított: 501,255 m/z),  $[b_8]^{2+}$  479,269 m/z (számított: 479,263 m/z),  $[y_3+O]^+$  430,223 m/z (számított: 430,233 m/z),  $[y_2+O]^+$  302,128 m/z (számított: 302,128 m/z) és  $[y_1]^+$  149,075 m/z (számított: 149,074 m/z) termékionok alátámasztják a hisztidin egyszeres oxidációját, a dMKH(O)M termék képződését. Ezenfelül az 527,243 m/z (számított: 527,240 m/z) és 282,151 m/z (számított: 282,156 m/z) értéknél detektált  $[NMKH(O)]^+$  és  $[KH(O)]^+$  köztes termékionok is egyértelműen bizonyítják a dMKHM peptidben a hisztidin egyszeres oxidációját, feltételezhetően 2-oxo-hisztidinné.



Mielőtt vizsgáltuk volna az ágensok hatását a HuPrP (103-112) fragmens réz(II)ion katalizált oxidációjára, elsőnek kontrollkísérleteket végeztünk a Cu(II):H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1:4 rendszerben, melyben az MPAC kismolekulák a réz(II)ionnal ekvivalens arányban voltak jelen. Az oxidációs kísérletek szempontjából a korábban még nem vizsgált, vízoldható X1FUR esetén az oxidáció kezdete után két csúcs is megjelent a 222 nm-en felvett kromatogramon, melyek nagyobb intenzitással detektálhatók 254 nm hullámhosszon. LC-MS vizsgálatok alapján kimutattuk, hogy a hamarabb eluálódó csúcs az X1FUR+O-hez rendelhető, míg az X1FUR ligandum után eluálódó csúcs egy H<sub>2</sub>O molekula elvesztéséhez köthető. A kontrollkísérlet alapján az X1FUR csúcs egy nap elteltével 50%-ban változatlan formában volt jelen a rendszerben. A 4F-Salpyran és 6F-Salpyran kontrollkísérleteinél hasonló eredményeket kaptunk. Mindkét ligandum esetén kis mértékű változás figyelhető meg a Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendszer kromatogramján. A kromatogramon több kisebb csúcs figyelhető meg a holtidő után, azonban jelentősebb intenzitással rendelkező csúcsot nem tapasztaltunk. Egy nap oxidációt követően a 4F-Salpyran ~50%-ban, míg a 6F-Salpyran ~30%-ban volt jelen változatlan formában. A Salpyran, 4MetO-Salpyran és 4CF<sub>3</sub>O-Salpyran esetén az előzőkhöz hasonlóan a ligandum kis mértékű reakciója figyelhető meg a Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rendszerben, de új, jól definiálható csúcs nem jelenik meg az alkalmazott módszereknél és a detektálási hullámhosszon. A fentebb említett ágensok esetén a dMKHM peptidet is tartalmazó rendszerekben a kromatogramok

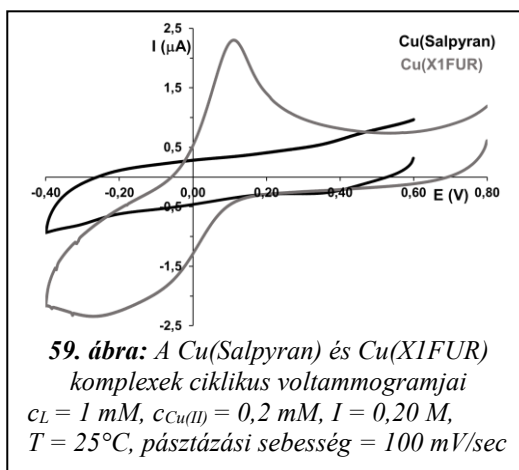
alapján az ágensek mennyiségében nincs változás az oxidációt követően. Ez feltételezhetően annak tudható be, hogy elsődlegesen a peptid az oxidáció célpontja, és nem az ágens. A  $\text{Cu(II):H}_2\text{O}_2 = 1:4$  arányú mintában az MPAC kismolekulához tartozó csúcs területének csökkenésével egyidejűleg az AEtQ esetén kettő, míg az ACyQ esetén egy darab jól definiálható csúcs megjelenése detektálható az oxidáció előrehaladtával. A korábbiaktól ellentétben a  $\text{Cu(II)/dMKHM/H}_2\text{O}_2$  mintában is csökken az AEtQ és ACyQ ligandumok mennyisége, azonban ez kisebb mértékű, illetve a reakciójukhoz rendelhető csúcsok nem zavarják a peptid oxidációjára gyakorolt hatásuk vizsgálatát.

A vizsgált fémion-fehérje kölcsönhatást gyengítő molekulák hatását a dMKHM réz(II)ion-katalizált oxidációjára hidrogén-peroxiddal a  $\text{Cu(II):dMKHM:H}_2\text{O}_2\text{:Ligandum} = 1:1:4:1$  rendszerekben az 58. ábra mutatja be. Az oszlopdiagram a dMKHM és ezen körülmények között képződő oxidált termékeinek, vagyis az egyszeres metionin oxidált termék(ek) (dMKHM+O) és a kétszeres metionin oxidált termék (dM(O)KHM(O)) arányait mutatja be egy órás mintavételi időnél. Az aroil-hidrazonok tekintetében a két vízdoldható vegyület közül az X1FUR minimálisan jobban visszashorította a peptid oxidációját, mint az X1THIO. Az aroil-hidrazonok közül a legnagyobb mértékben a vízben rosszul oldódó HPCIH szorítja vissza az oxidációt, egy óra elteltével a dMKHM ~60%-a még oxidálatlan állapotban van. Érdekes, hogy a dMKHA peptid esetén ugyanezt a HPCFUR esetén tapasztaltuk, viszont a dMKHM peptid jelen esetben kicsivel kevesebb mint 40% arányban található meg a mintában az oxidált termékeihez képest. A vízdoldható szalán típusú vegyületekkel végzett kísérletek eredményeként kapott egy órás kromatogramok alapján meghatározott területarányok azt mutatják, hogy legkevésbé az AEtQ vegyület szorítja vissza a peptid oxidációját. A dMKHM mindössze 20%-ban van jelen a mintában az oxidált termékekhez viszonyítva.



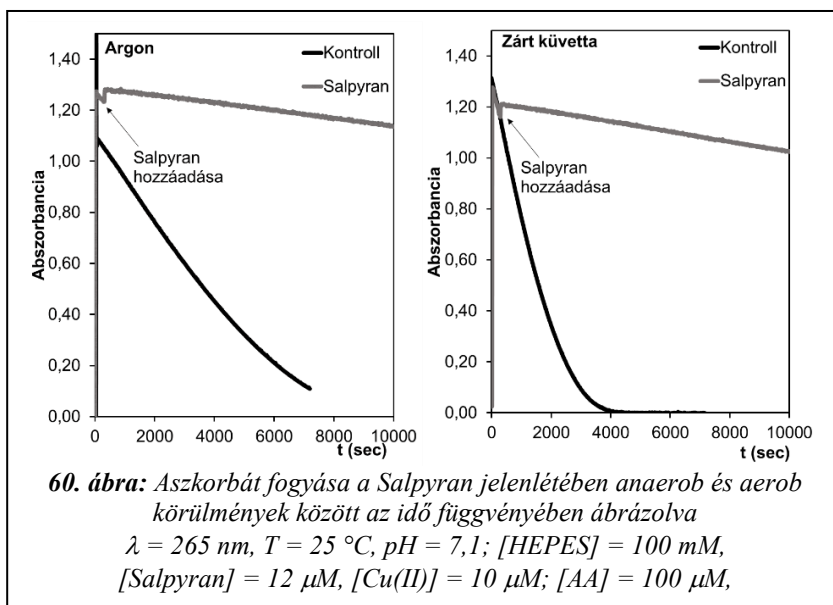
Ennél kicsivel jobban szorítja vissza az oxidációt a MetO-Salpyran és a  $4CF_3O$ -Salpyran. Mindkét vegyület esetén  $\sim 30\%$ -ban található meg a dMKHM. Ennél valamivel jobban teljesített a szerkezetében nagyon hasonló 4F-Salpyran és 6F-Salpyran; ebben az esetben a mintákban  $\sim 40\%$  dMKHM volt jelen egy óra elteltével. A kromatogramokból kapott eredmények alapján az ACyQ és a Salpyran vegyületek szorították vissza a legjobban az oxidációt, melyekben  $\sim 50\%$  és  $\sim 60\%$  arányú volt a dMKHM tartalom. Feltételezhetően a peptid réz(II)ion-katalizált oxidációjának visszaszorításában fontos szerepet játszik a potenciális védőmolekula koordinációja a réz(II)ionhoz. A korábbi fejezetekben bemutatott oldategyensúlyi vizsgálatok alapján az X1FUR, X1THIO és AEtQ vegyületek képesek vegyes ligandumú komplex kialakítására a dMKHM peptiddel, azonban az ACyQ vegyület nem. A meghatározott Cu(II)-ACyQ és Cu(II)-dMKHM törzskomplexek hipotetikus eloszlásdiagramja szinte megegyező a 4.3.2.1. fejezetben látható 40. D) ábrán a Salpyran esetén készített eloszlásdiagrammal. Korábban arra következtettünk, hogy nem valószínű a vegyes ligandumú komplex kialakulása, melyet pH-potenciometriával az ACyQ esetén nem is tudunk kimutatni. Ebből arra következtethetünk, hogy a peptid réz(II)ion-katalizált oxidációjának visszaszorítására azon ágensek képesek a legjobban, amelyek nem, vagy csak nagyon kis stabilitási állandójú vegyes ligandumú komplexet képesek kialakítani a peptiddel.

Vizsgáltuk a Cu(X1FUR) és Cu(Salpyran) komplexek elektrokémiai tulajdonságait ciklikus voltammetriával. A két komplex ciklikus voltamogramjának összehasonlítását az 59. ábra szemlélteti. A kapott voltamogramok alapján megállapítottuk, hogy a Cu(Salpyran) komplex nem rendelkezik redoxaktivitással, míg a Cu(X1FUR) irreverzibilis redoxaktivitást mutat. Az oxidációs vizsgálatok és az inaktív redoxi tulajdonság alapján kíváncsiak voltunk arra, hogy képes-e, mint potenciális terápiás kelátor, a Salpyran megakadályozni a reaktív oxigén származékok képződését. Ezt az irodalomhoz hasonlóan az aszkorbinsav mennyiségének monitorozásával vizsgáltuk 265 nm hullámhosszon.<sup>192</sup>



**59. ábra:** A Cu(Salpyran) és Cu(X1FUR) komplexek ciklikus voltammogramjai

$c_L = 1 \text{ mM}$ ,  $c_{Cu(II)} = 0,2 \text{ mM}$ ,  $I = 0,20 \text{ M}$ ,  
 $T = 25^\circ\text{C}$ , pásztázási sebesség =  $100 \text{ mV/sec}$



Az elektron donor aszkorbinsav jelenlétében a réz(II) ion redukálódik réz(I) ionná, miközben reaktív oxigén származékok képződnek. A ROS reakcióba lépve az aszkorbinsavval csökkenti annak mennyiségét, amit spektrofotometriával jól követhetünk. A kísérletet három különböző körülmény esetén végeztük el: 1) argonnal kizárva a levegő oxigénjét, 2) lezárt küvettaiban, oxigén eltávolítása nélkül és 3) nyitott küvettaiban. A kísérlet során mért abszorbancia változását az 1) és 3) körülménynél a 60. ábra szemlélteti. Az argon alatt végzett kontrollkísérlet két óra elteltével sem ért véget, míg aerob körülmények között igen. Látható, hogy az aszkorbát fogyását a Salpyran hozzáadása jelentősen lelassította. Az ábrázolt adatok alapján 5000 és 10000 mp között az aszkorbát fogyás folyamatára meghatározott sebességi állandók a három körülmény esetén: 1)  $1,07 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$ ; 2)  $1,36 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$ ; 3)  $1,37 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$ . Az aerob körülmények között végzett kísérleteknél számolt sebességi állandók közel azonosnak mondhatók, míg az argon alatt végzett kísérlet eredménye szembevetően kisebb. A kapott állandók nagyságrendileg megegyeznek az irodalomban<sup>192</sup> leírt potenciálisan terápiára kifejlesztett ligandumoknál tapasztaltakkal. Ezen eredmény nyilvánvalóan bizonyítja, hogy a Salpyran képes a ROS képződést megakadályozni, vagy legalábbis jelentősen visszaszorítani.

## 5. Összefoglalás

Kutatómunkám során a HuPrP (103-112) fragmensének fémion-katalizált oxidációja és fémion-fehérje kölcsönhatást gyengítő kismolekulák (*MPACs*) hatásának tanulmányozása volt a célunk. A munkánk egyik részében a HuPrP (105-112) mutáns N- és C-terminálison védett peptiden (Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub>) (*nMKHA*) keresztül tanulmányoztuk a peptid fémkatalizált oxidációját. Az aminosavszelektív fémkatalizált oxidáció elérése érdekében fémion/hidrogén-peroxid/aszkorbinsav jelenlétében az optimális körülmények meghatározását, illetve a keletkezett termékek azonosítását tűztük ki célul. Az eredmények alapján elsődlegesen a metionin oxidációja megy végbe, és minden esetben metioninszulfoxid képződik. Azon rendszer esetén, melyben katalitikus mennyiségű réz(II)iont vagy aszkorbinsavat is tartalmaz a reakcióelegy, a hisztidin oxidációja is megfigyelhető. A hisztidin egyszeres oxidációjából származó 2-oxo-hisztidin mellett a kétszeresen oxidált dioxo-hisztidin termék kialakulását is kimutattuk. Emellett a metionin és hisztidin oldalláncok együttes oxidációja is bekövetkezik.

A hisztidin oxidációjához feltételezhetően hozzájárul az LC-MS módszerrel kimutatott peptid - aszkorbinsav addukt képződése. A vas(III)ion jelenléte is katalitikus hatással van a peptid oxidációjára, azonban a réz(II)- és vas(III)ionok által katalizált kísérleteket összehasonlítva a réz(II)ion hatékonyabb katalizátornak mutatkozik. A katalitikus aktivitásukban fennálló különbség a koordinációs tulajdonságaikkal is magyarázható. A Fe(III)-ion koordinációs kémiai szempontból a hard karakterű donoratomokat részesíti előnyben, míg a vizsgált peptidben elsődlegesen soft karakterű donoratomok vannak jelen, mint például a hisztidin imidazoliumcsoportjában található nitrogénatom, illetve a peptidláncban található amidnitrogének. Azaz a peptid affinitása a réz(II)ionhoz nagyobb, mint a vas(III)ionhoz, így ezzel magyarázható, hogy a fémion kötődése is elősegíti a kötőhelyhez közeli oxidáció lejátsszódását. Összességében az aszkorbinsav jelenléte csökkenti a peptid oxidációjának mértékét, mind a fémion jelenlétében, mind anélkül. Azonban a kettős természetű antioxidáns és pro-oxidáns tulajdonságú aszkorbinsav elősegíti a hisztidin oldallánc irreverzibilis oxidációját a metionin reverzibilis oxidációjával szemben.

Kutatási célunk között szerepelt potenciális, terápiára kifejlesztett fémion-kölcsönhatást gyengítő kismolekulák (*MPACs*) tanulmányozása és a biológiailag fontos HuPrP (103-112) peptid fragmens oxidációjára gyakorolt hatásuk vizsgálata. A vizsgált *MPACs* molekulák két nagyobb csoportra oszthatók: aroil-hidrazonokra és módosított szalán típusú vegyületekre. Az oldatban lejátsszó folyamatok jobb megértése érdekében vizsgáltuk ezen

kismolekulák koordinációs kémiáját a redoxaktív réz(II)ionnal, illetve kiterjesztettük az oldategyensúlyi vizsgálatokat cink(II)ionra is.

A vizsgált X1FUR és X1THIO aroil-hidrazonok koordinációs kémiai szempontból megegyező komplexeket alakítanak ki. Mindkét aroil-hidrazon (N, N, O) koordinációs móddal kialakított (5,5) csatolt kelátrendszerű komplex kialakítására képes. Monokomplexek és biszkomplexek képződése is leírható, azonban a cink(II)-komplexek kisebb stabilitási állandóval jellemezhetők, mint a réz(II)-komplexek. Kompetíciós oldategyensúlyi vizsgálatokat végeztünk a HuPrP (103-112) peptiddel és az aroil-hidrazonokkal. Az X1THIO esetén egy vegyes ligandumú réz(II)-komplexet tudtunk leírni. A vegyes ligandumú komplexben a réz(II)ionhoz a peptid a hisztidin oldalláncon keresztül egyfogú koordinációval, míg az aroil-hidrazon (N,N,O) donortomjain keresztül kötődik. Az elvégzett oxidációs kísérletekben a vizsgálati pH-n minden esetben a vegyes ligandumú réz(II)-komplex a domináns részecske a reakcióelegyben. A vízoldható aroil-hidrazonok közül az X1FUR kis különbséggel, de jobban visszaszorította a vizsgált peptidben található metionin oxidációját, mint az X1THIO. Azonban a vízben rosszul oldódó aroil-hidrazonok (HPCIH és HPCFUR) nagyobb hatást mutattak az oxidációra. Az aroil-hidrazonok közül a HPCFUR bizonyult prominensnek, azonban aszkorbinsav jelenlétében a hisztidin oxidációját nem képes meggátolni.

Módosított szalán típusú vegyületek hatását is vizsgáltuk a HuPrP (103-112) fragmens fémkatalizált oxidációjára. A vízben rosszul oldódó vegyületekkel nem végeztünk oxidációs kísérleteket, de szintén tanulmányoztuk a vegyületek koordinációs kémiai tulajdonságait. Vízben rosszul oldódó szalán típusú molekulák és a vízben jól oldódó Salpyran esetén az oldategyensúlyi vizsgálatokat dimetil-szulfoxid:víz = 70:30 elegyben végeztük réz(II)- és cink(II)ionokkal. Minden esetben egymagvú, monokomplex képződik. A funkciós csoportok kisebb-nagyobb mértékben befolyásolják a komplexek stabilitását, azonban az elektronszállító csoportok a módosított szalán vegyületek esetén hátrányosan hatnak a negyedik donortom, a fenolos hidroxilcsoport deprotonálódására és koordinációjára. A stabilitási állandó a Cu(Salan) esetén a legnagyobb a DMSO-víz elegyben vizsgált vegyületek közül. A Salpyran esetén, összehasonlítva a DMSO-víz elegyben és vizes oldatokban végzett kísérleteket, a fémkomplexekre számolt stabilitási állandók hasonlóan mondhatók. Ezen eredmények alapján a kevésbé jó oldhatósággal rendelkező vegyületek vizsgálatára megfelelő alternatívaként szolgál a DMSO-víz rendszerekben végzett pH-potenciometriás mérés.

A vízben oldódó szalán típusú ligandumok megegyező komplexeket alakítanak ki, a funkciós csoportok kis mértékben befolyásolják a komplexek

stabilitását. Az elektronküldő csoportot tartalmazó MetO-Salpyran réz(II)-komplexei rendelkeznek a legnagyobb stabilitási állandóval, a fiziológias pH-n jelenlévő Cu(MetO-Salpyran) és Cu(Salpyran) komplexek stabilitási állandója megegyező. A Zn(II)-komplexek esetén hasonló eredményeket kapunk, a vártaknak megfelelően a komplexek stabilitási állandója kisebb. Az AEtQ és ACyQ vegyületek által kialakított komplexek koordinációs módja a Salpyranéval és módosított vegyületeivel megegyező. Az AEtQ és ACyQ vegyületekkel, valamint dMKHM peptiddel végzett kompetíciós oldategyensúlyi vizsgálatok alapján a nagy stabilitási állandójú törzskomplexekkel rendelkező vegyület (ACyQ, Salpyran) nem képes vegyes ligandumú komplex kialakítására. Ezzel ellentétben a kisebb stabilitású réz(II)-komplexekeket képző AEtQ vegyület igen. Spektroszkópiás módszerek alapján feltételezhetjük, hogy a vegyes ligandumú komplex kialakításában a dMKHM a hisztidin imidazolil-oldalláncán keresztül kötődik a fémionhoz, míg az AEtQ a három nitrogéndonoratomján keresztül.

A HPLC módszerrel követett oxidációs eredmények azt mutatják, hogy a két vegyületesalád közül a gyengén vízoldható HPCIH aroil-hidrazon és a vízoldható Salpyran ágensek mutatkoztak a legígéretesebbnek. Ezen két vegyületnél volt látható a legnagyobb mértékben a dMKHM oxidálatlan formában. További vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a Salpyran potenciálisan képes meggátolni a reaktív oxigén származékok képződését, azok mennyiségét jelentősen visszaszorítani.

## 6. Summary

Metal ions play a crucial role in biological systems, as living organisms rely on inorganic elements for a variety of essential processes. Dysfunction of metalloproteins is associated with a wide variety of diseases, particularly neurodegenerative disorders. The accumulation of metal ions such as copper(II), iron(III), and zinc(II) in specific regions of brain tissue significantly contributes to the development of these disorders. When present in higher-than-normal concentrations, metal ions can promote the onset of neurodegenerative diseases by (i) coordinating with proteins, thus inducing their conformation changes and misfolding and their subsequent aggregation, and (ii) by their metal-catalysed oxidation. These changes all contribute to the change of the tertiary and quaternary structural changes in the proteins, thereby impacting their functions.

Our objective was to investigate the effect of metal-protein attenuating compounds (*MPACs*) on the oxidation of the HuPrP (103-112) fragment. Although the precise role of prion proteins remains unclear, their high methionine

content—unusually abundant compared to other proteins—suggests that due to their unique characteristic it may play a significant role in the defence against oxidative stress.

One of our focus areas was to determine the optimal condition for the amino acid selective metal-catalysed oxidation of the HuPrP (105-112) mutant peptide Ac-SPKTNMKHA-NH<sub>2</sub> (*nMKHA*) in the metal/hydrogen peroxide/ascorbic acid oxidative system and to determine the oxidized products that arise. Based on our results, primarily methionine is oxidized and the main product formed in every studied system is the methionine sulfoxide derivative (nM(O)KHA). Oxidation of methionine is the most preferred, it occurs even in the absence of any metal ion. The presence of redox active metal ions catalyses the oxidation process, but it has no influence on the quality of the formed products. If copper(II) ion is present in catalytic amount or ascorbic acid is also added to the mixture, the oxidation of histidine also occurs. Both the singly oxidized 2-oxo-histidine residue (nMKH(O)A) and the doubly oxidized dioxo-histidine derivative (nMKH(2O)A) products were determined using mass spectroscopy. Moreover, the simultaneous oxidation of methionine and histidine side chains can be observed. The highest extent of histidine oxidation was seen when copper(II) ion was present only in catalytic amount and the ascorbic acid in 20-fold excess, while the hydrogen peroxide was in 4-fold excess. Presumably, the formation of an ascorbic acid-nMKHA adduct promotes, while the high concentration of copper(II) ion hinders the oxidation of the histidine side chain. Iron(III) also catalyses the oxidation, although to a lesser extent than copper(II). The difference in the catalytic activity of the two metal ions can be explained by their coordination ability. While Fe(III) prefers hard donor atoms, such as oxygen, it is not characteristic of the studied peptide, which contains mostly nitrogen donor atoms. Besides the amide nitrogen atoms, the anchor imidazole nitrogen donor atom of histidine is especially effective to coordinate to the borderline copper(II) ion. Therefore the affinity of the peptide for copper(II) ion is much higher. This binding promotes the oxidation of the peptide in the vicinity of the binding site. The addition of ascorbic acid decreases the extent of peptide oxidation both in the presence or absence of metal ions. However, because of its dual nature, it is not entirely beneficial as it promotes the irreversible oxidation of histidine versus the reversible oxidation of methionine.

Our primary focus was to investigate the effect of metal-protein attenuating compounds (*MPACs*), developed for potential therapeutic applications, on the oxidation of HuPrP (103-112) fragment Ac-SKPKTNMKHM-NH<sub>2</sub> (*dMKHM*). The studied MPACs can be classified into two categories: aroyl hydrazones and modified salan-type ligands. To better

understand their behaviour in aqueous solutions, we examined their coordination chemistry properties with the redox-active metal ion copper(II) and extended these experiments to include zinc(II).

The water-soluble aroyl hydrazones, X1THIO and X1FUR, form similar metal complexes with copper(II) and zinc(II), with the distinction that the X1FUR metal complexes are water-soluble, while the biscomplexes of X1THIO precipitate in water. Therefore, in the case of X1THIO, solution equilibrium studies could not be carried out over a wide pH range. Both aroyl hydrazones form five-membered chelate rings with a coordination mode of (N,N,O). The ligands bind to the metal ion through the nitrogen donor atoms of the azomethine and 1-methyl imidazole groups, and the oxygen donor atom of the carbonyl group. In the case of copper(II) and zinc(II) complexes, mono and bis complexes also form, although with lower stability constants with regard to zinc(II).

We also studied the metal ion/HuPrP (103-112) and aroyl hydrazones (X1THIO/X1FUR) ternary system. Regarding the X1THIO system, only one mixed-ligand complex could be determined with copper(II), while none were found with zinc(II). In the complex  $\text{Cu}(\text{dMKHM})(\text{X1THIO})\text{H}_3$ , copper is bound to the peptide through monodentate coordination to the histidine side chain, while X1THIO occupies the other three equatorial coordination sites with its two nitrogen and one oxygen donor atoms, similar to the copper-X1THIO monoligand complex. In the case of X1FUR, more mixed ligand complexes can be described, their coordination mode is that of X1THIO, with the difference in the deprotonation of lysyl side chains. Moreover, we successfully determined the  $\text{Zn}(\text{dMKHM})(\text{X1FUR})\text{H}$  mixed ligand complex, its coordination mode is similar to the copper(II) mixed ligand complex.

In every oxidation experiment, the prominent species in the reaction mixture at the set pH (7.4) is the mixed-ligand copper(II) complex. In the case of dMKHM, two oxidation products were observed in the presence of aroyl hydrazones in the  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{O}_2$  system. One product is the singly oxidized form of the peptide, in which one of the methionine side chains is oxidized to methionine sulfoxide, while in the other product, both methionines are oxidized to methionine sulfoxide. Regarding the water-soluble aroyl hydrazones, X1FUR is slightly more effective at hindering the oxidation of the HuPrP (103-112) fragment than X1THIO. Considering the poorly water-soluble aroyl hydrazones, both HPCIH and HPCFUR are more effective at hindering the oxidation of the peptide.

The oxidation of the HuPrP (103-112) M112A mutant was also studied in the presence of X1THIO, HPCIH, and HPCFUR in the  $\text{Cu}(\text{II})/\text{H}_2\text{O}_2$  system. At a 1:10 ratio of aroyl hydrazone to peptide, there was a slight decrease in the amount of oxidation products compared to the  $\text{Cu}(\text{II})/\text{dMKHM}/\text{H}_2\text{O}_2$  system. However,

the addition of aroyl hydrazones at a 1:1 ratio to the peptide resulted in a more significant decrease in the amount. HPCFUR proved to be the most effective among the three compounds. Nevertheless, in the presence of ascorbic acid, HPCFUR was unable to prevent the oxidation of the histidine side chain.

Within the framework of this thesis, we also investigated modified salan-type ligands and their effect on the metal-catalysed oxidation of the HuPrP (103-112) peptide. Prior to the oxidation experiments, their coordination properties with copper(II) and zinc(II) were examined. For the non-water-soluble salan-type molecules, as well as Salpyran, solution equilibrium studies were conducted in a dimethyl sulfoxide–water 70/30 (V/V%) medium. In all cases, mononuclear and mono complexes were formed. The coordination mode of the copper(II) complexes of Salquin and Salpyran is ( $N_{py}$ ,  $N_{amino}$ ,  $N_{amino}$ ,  $O_{phenol}$ ). The stability constant of Cu(Salquin) is higher than that of Cu(Salpyran). When comparing the stability constants of the copper(II) complexes formed with Salan, *ditb*-Salan, and 4CF<sub>3</sub>O-Salan, where the two amino nitrogen donor atoms and one phenolate oxygen donor atom coordinate, the stability constants for the modified compounds are greater than those for Cu(Salan)H. However, in the case of the modified salan compounds, the electron-donating groups adversely affect the deprotonation and coordination of the fourth donor atom, the phenolic hydroxyl group, as the highest stability constant belongs to Cu(Salan).

With regard to the coordination properties of the water-soluble salan-type molecules, Salpyran and its fluorine-containing modifications form identical complexes with copper(II) and zinc(II), consistent with the studies conducted in dimethyl sulfoxide–water 70/30 (V/V%) medium. The stability constant of the copper(II) complexes of Salpyran is higher than that of the modified compounds with fluorine-containing substituents. However, the highest stability constant is observed for Cu(II) - MetO-Salpyran complexes, which contains the electron-donating methoxy group. Nevertheless, at physiological pH, the stability constants of Cu(MetO-Salpyran) and Cu(Salpyran) are identical. For the zinc(II) complexes, similar trends are observed, albeit with lower stability constants. The formation of the ZnL complex of MetO-Salpyran shifts to alkaline pH, while in the physiological pH range, the dominant species is the ZnLH complex. In the case of the other studied compounds, the prominent complex at physiological pH is ZnL.

The coordination mode of the AEtQ and ACyQ copper(II) and zinc(II) complexes is similar to that of Salpyran and its modified compounds. However, competition studies with dMKHM revealed differences in the formation of mixed-ligand complexes. Although AcyQ, with stability constants similar to those of Cu(II)-Salpyran complexes, cannot form mixed-ligand complexes with dMKHM. Several mixed-ligand copper(II) complexes were identified with AEtQ, whose

parent complexes have lower stability constants than those of ACyQ. Additionally, one Zn(II) mixed-ligand complex was observed. Spectroscopic studies indicate that dMKHM coordinates to the metal ion through the histidine imidazolium side chain, while AEtQ binds to the metal ion via its three nitrogen donor atoms.

After studying the coordination properties of the MPACs with copper(II), we further investigated their effect on the metal-catalyzed oxidation of dMKHM in the Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. As before, under these conditions, only the methionine side chains were oxidized to methionine sulfoxide, and two oxidation products were identified, in which either one methionine (Met109/Met112) was oxidized or both were. The results obtained from HPLC showed that, among the two types of agents, HPCIH and Salpyran were the most promising, as the highest amount of unoxidized dMKHM peptide was detected in the presence of these compounds. However, considering that HPCIH is poorly water-soluble, Salpyran is more favourable for further investigations. For this reason, we performed an ascorbate consumption assay to determine whether Salpyran is capable of preventing the formation of reactive oxygen species. Our results were consistent with previously published data. Based on the calculated rate constants, Salpyran can prevent the formation of ROS and can significantly reduce their quantity.

In conclusion, the study of chelate-forming metal-protein attenuating compounds and their interactions with biologically relevant metal ions (e.g., copper(II), zinc(II)) can help to understand whether small molecules can be an effective treatment for certain neurodegenerative diseases. Their study, from the perspective of coordination chemistry, along with the investigation of the effects of biologically important molecules on oxidation, can enhance our understanding of the oxidation processes occurring in biological systems at the molecular level. These findings contribute to the development of metal chelators with improved properties and potential therapeutic applications in future research.

---

## 7. Irodalomjegyzék

1. H. Kozłowski, M. Luczkowski, M. Remelli, and D. Valensin, *Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases)*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**(19): p. 2129-2141.
2. E.R. Stadtman and B.S. Berlett, *Reactive Oxygen-Mediated Protein Oxidation in Aging and Disease*. Drug Metabolism Reviews, 1998. **30**(2): p. 225-243.
3. M.L. Hegde, P. Bharathi, A. Suram, C. Venugopal, R. Jagannathan, P. Poddar, P. Srinivas, K. Sambamurti, K.J. Rao, J. Scancar, L. Messori, L. Zecca, and P. Zatta, *Challenges associated with metal chelation therapy in Alzheimer's disease*. Journal of Alzheimer's Disease, 2009. **17**(3): p. 457-68.
4. S.C. Drew, *The Case for Abandoning Therapeutic Chelation of Copper Ions in Alzheimer's Disease*. Frontiers in Neuroscience, 2017. **11**.
5. K.D. Fasaie, A.O. Abolaji, T.R. Faloye, A.Y. Odunsi, B.O. Oyetayo, J.I. Enya, J.A. Rotimi, R.O. Akinyemi, A.J. Whitworth, and M. Aschner, *Metallobiology and therapeutic chelation of biometals (copper, zinc and iron) in Alzheimer's disease: Limitations, and current and future perspectives*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2021. **67**: p. 126779.
6. A. Gucký and S. Hamuláková, *Targeting Biometals in Alzheimer's Disease with Metal Chelating Agents Including Coumarin Derivatives*. CNS Drugs, 2024. **38**(7): p. 507-532.
7. A.M. Pisoschi, A. Pop, F. Iordache, L. Stanca, G. Predoi, and A.I. Serban, *Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2021. **209**: p. 112891.
8. A.A. Starkov, *The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008. **1147**(1): p. 37-52.
9. T. Hussain, B. Tan, Y. Yin, F. Blachier, M.C.B. Tossou, and N. Rahu, *Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?* Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016. **2016**(1): p. 7432797.
10. S. Kumar and A.K. Pandey, *Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbs*. Journal of Advances in Medicine and Medical Research, 2015. **7**(6): p. 438-457.
11. P.D. Ray, B.-W. Huang, and Y. Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. Cellular Signalling, 2012. **24**(5): p. 981-990.
12. M.A. Torres, J.D.G. Jones, and J.L. Dangl, *Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens*. Plant Physiology, 2006. **141**(2): p. 373-378.
13. V. Ullrich and R. Kissner, *Redox signaling: Bioinorganic chemistry at its best*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006. **100**(12): p. 2079-2086.
14. H. Sies, *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. Redox Biology, 2015. **4**: p. 180-183.
15. S. Steven, A. Daiber, J.F. Dopheide, T. Münzel, and C. Espinola-Klein, *Peripheral artery disease, redox signaling, oxidative stress – Basic and clinical aspects*. Redox Biology, 2017. **12**: p. 787-797.

16. A. Prasad, M. Sedlářová, A. Balukova, M. Rác, and P. Pospíšil, *Reactive Oxygen Species as a Response to Wounding: In Vivo Imaging in Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 2020. **10**: p. 1660.
17. H. Sies, *Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects*. *Antioxidants*, 2020. **9**(9): p. 852.
18. D.P. Jones, Y. Park, and T.R. Ziegler, *Nutritional Metabolomics: Progress in Addressing Complexity in Diet and Health*. *Annual Review of Nutrition*, 2012. **32**(Volume 32, 2012): p. 183-202.
19. Y.-M. Go and D.P. Jones, *Redox biology: Interface of the exposome with the proteome, epigenome and genome*. *Redox Biology*, 2014. **2**: p. 358-360.
20. C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau, and F. Collin, *Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease*. *Redox Biology*, 2018. **14**: p. 450-464.
21. A.M. Pisoschi and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015. **97**: p. 55-74.
22. Y. Sheng, I.A. Abreu, D.E. Cabelli, M.J. Maroney, A.-F. Miller, M. Teixeira, and J.S. Valentine, *Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases*. *Chemical Reviews*, 2014. **114**(7): p. 3854-3918.
23. Ł. Lewandowski, M. Kepinska, and H. Milnerowicz, *Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase activity by selected environmental xenobiotics*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2018. **58**: p. 105-113.
24. A. Baker, C.-C. Lin, C. Lett, B. Karpinska, M.H. Wright, and C.H. Foyer, *Catalase: A critical node in the regulation of cell fate*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2023. **199**: p. 56-66.
25. B. Halliwell and S. Chirico, *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1993. **57**(5): p. 715S-725S.
26. F. Guéraud, M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P.M. Eckl, L. Huc, I. Jouanin, W. Siems, and K. Uchida, *Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products*. *Free Radical Research*, 2010. **44**(10): p. 1098-1124.
27. G. Coliva, S. Duarte, D. Pérez-Sala, and M. Fedorova, *Impact of inhibition of the autophagy-lysosomal pathway on biomolecules carbonylation and proteome regulation in rat cardiac cells*. *Redox Biology*, 2019. **23**: p. 101123.
28. I. Dalle-Donne, D. Giustarini, R. Colombo, R. Rossi, and A. Milzani, *Protein carbonylation in human diseases*. *Trends in Molecular Medicine*, 2003. **9**(4): p. 169-176.
29. G. Cohen, Y. Riahi, V. Sunda, S. Deplano, C. Chatgililoglu, C. Ferreri, N. Kaiser, and S. Sasson, *Signaling properties of 4-hydroxyalkenals formed by lipid peroxidation in diabetes*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013. **65**: p. 978-987.
30. D. Del Rio, A.J. Stewart, and N. Pellegrini, *A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress*. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2005. **15**(4): p. 316-328.
31. I. Dalle-Donne, G. Aldini, M. Carini, R. Colombo, R. Rossi, and A. Milzani, *Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2006. **10**(2): p. 389-406.
32. M. Fedorova, *Diversity of Protein Carbonylation Pathways*, in *Protein Carbonylation*. 2017. p. 48-82.

- 
33. R.M. Domingues, P. Domingues, T. Melo, D. Pérez-Sala, A. Reis, and C.M. Spickett, *Lipoxidation adducts with peptides and proteins: Deleterious modifications or signaling mechanisms?* Journal of Proteomics, 2013. **92**: p. 110-131.
  34. G. Aldini, M.R. Domingues, C.M. Spickett, P. Domingues, A. Altomare, F.J. Sánchez-Gómez, C.L. Oeste, and D. Pérez-Sala, *Protein lipoxidation: Detection strategies and challenges*. Redox Biology, 2015. **5**: p. 253-266.
  35. I.M. Møller, A. Rogowska-Wrzesinska, and R.S.P. Rao, *Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective*. Journal of Proteomics, 2011. **74**(11): p. 2228-2242.
  36. J. Tamarit, A. de Hoogh, E. Obis, D. Alsina, E. Cabiscol, and J. Ros, *Analysis of oxidative stress-induced protein carbonylation using fluorescent hydrazides*. Journal of Proteomics, 2012. **75**(12): p. 3778-3788.
  37. K. Mukherjee, T.I. Chio, D.L. Sackett, and S.L. Bane, *Detection of oxidative stress-induced carbonylation in live mammalian cells*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **84**: p. 11-21.
  38. V.A. Timoshnikov, T.V. Kobzeva, N.E. Polyakov, and G.J. Kontoghiorghe, *Redox Interactions of Vitamin C and Iron: Inhibition of the Pro-Oxidant Activity by Deferiprone*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(11): p. 3967.
  39. J. De Laat and H. Gallard, *Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Fe(III) in Homogeneous Aqueous Solution: Mechanism and Kinetic Modeling*. Environmental Science & Technology, 1999. **33**(16): p. 2726-2732.
  40. S. Demirci-Çekiç, G. Özkan, A.N. Avan, S. Uzunboy, E. Çapanoğlu, and R. Apak, *Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2022. **209**: p. 114477.
  41. Michael J. Davies, *Protein oxidation and peroxidation*. Biochemical Journal, 2016. **473**(7): p. 805-825.
  42. M.J. Davies, *The oxidative environment and protein damage*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 2005. **1703**(2): p. 93-109.
  43. W. Zhang, S. Xiao, and D.U. Ahn, *Protein Oxidation: Basic Principles and Implications for Meat Quality*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2013. **53**(11): p. 1191-1201.
  44. M.Y. Aksenov, M.V. Aksenova, D.A. Butterfield, J.W. Geddes, and W.R. Markesbery, *Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease*. Neuroscience, 2001. **103**(2): p. 373-383.
  45. K.B. Pandey, N. Mishra, and S.I. Rizvi, *Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients*. Clinical Biochemistry, 2010. **43**(4): p. 508-511.
  46. A. Taylor and K.J.A. Davies, *Protein oxidation and loss of protease activity may lead to cataract formation in the aged lens*. Free Radical Biology and Medicine, 1987. **3**(6): p. 371-377.
  47. G. Aldini, I. Dalle-Donne, R.M. Facino, A. Milzani, and M. Carini, *Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls*. Medicinal Research Reviews, 2007. **27**(6): p. 817-868.
  48. G. Xu and M.R. Chance, *Hydroxyl Radical-Mediated Modification of Proteins as Probes for Structural Proteomics*. Chemical Reviews, 2007. **107**(8): p. 3514-3543.

49. Z.I. Watts and C.J. Easton, *Peculiar Stability of Amino Acids and Peptides from a Radical Perspective*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(32): p. 11323-11325.
50. C.L. Hawkins and M.J. Davies, *Generation and propagation of radical reactions on proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2001. **1504**(2): p. 196-219.
51. B. Morin, W.A. Bubb, M.J. Davies, R.T. Dean, and S. Fu, *3-Hydroxylysine, a Potential Marker for Studying Radical-Induced Protein Oxidation*. Chemical Research in Toxicology, 1998. **11**(11): p. 1265-1273.
52. C.L. Hawkins and M.J. Davies, *Oxidative damage to collagen and related substrates by metal ion/hydrogen peroxide systems: random attack or site-specific damage?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1997. **1360**(1): p. 84-96.
53. H.A. Headlam and M.J. Davies, *Beta-scission of side-chain alkoxy radicals on peptides and proteins results in the loss of side-chains as aldehydes and ketones*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **32**(11): p. 1171-1184.
54. K. Uchida, Y. Kato, and S. Kawakishi, *A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990. **169**(1): p. 265-271.
55. G. Xu and M.R. Chance, *Radiolytic Modification of Acidic Amino Acid Residues in Peptides: Probes for Examining Protein-Protein Interactions*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(5): p. 1213-1221.
56. E.R. Stadtman and R.L. Levine, *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins*. Amino Acids, 2003. **25**(3): p. 207-218.
57. R.L. Trelstad, K.R. Lawley, and L.B. Holmes, *Nonenzymatic hydroxylations of proline and lysine by reduced oxygen derivatives*. Nature, 1981. **289**(5795): p. 310-312.
58. D.L. Diedrich and C.A. Schnaitman, *Lysyl-derived aldehydes in outer membrane proteins of Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978. **75**(8): p. 3708-3712.
59. E.L. Finley, J. Dillon, R.K. Crouch, and K.L. Schey, *Identification of tryptophan oxidation products in bovine  $\alpha$ -crystallin*. Protein Science, 1998. **7**(11): p. 2391-2397.
60. E.R. Stadtman, *Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability*, in *Methods in Enzymology*. 1995, Academic Press. p. 379-393.
61. L. Grassi and C. Cabrele, *Susceptibility of protein therapeutics to spontaneous chemical modifications by oxidation, cyclization, and elimination reactions*. Amino Acids, 2019. **51**(10): p. 1409-1431.
62. G. Xu and M.R. Chance, *Radiolytic Modification and Reactivity of Amino Acid Residues Serving as Structural Probes for Protein Footprinting*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(14): p. 4549-4555.
63. A.J. Rivett and R.L. Levine, *Metal-catalyzed oxidation of Escherichia coli glutamine synthetase: Correlation of structural and functional changes*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1990. **278**(1): p. 26-34.
64. F. Zhao, E. Ghezzi-Schöneich, G.I. Aced, J. Hong, T. Milby, and C. Schöneich, *Metal-catalyzed Oxidation of Histidine in Human Growth Hormone: Mechanism, isotope effects, and inhibition by a mild denaturing alcohol*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(14): p. 9019-9029.

65. H. Uehara, S. Luo, B. Aryal, R.L. Levine, and V.A. Rao, *Distinct oxidative cleavage and modification of bovine [Cu–Zn]-SOD by an ascorbic acid/Cu(II) system: Identification of novel copper binding site on SOD molecule*. Free Radical Biology and Medicine, 2016. **94**: p. 161-173.
66. C. Cheignon, P. Faller, D. Testemale, C. Hureau, and F. Collin, *Metal-catalyzed oxidation of A $\beta$  and the resulting reorganization of Cu binding sites promote ROS production*†. Metallomics, 2016. **8**(10): p. 1081-1089.
67. J.R. Requena, D. Groth, G. Legname, E.R. Stadtman, S.B. Prusiner, and R.L. Levine, *Copper-catalyzed oxidation of the recombinant SHa(29–231) prion protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(13): p. 7170-7175.
68. M. Lal, *Radiation induced oxidation of sulphhydryl molecules in aqueous solutions. A comprehensive review*. Radiation Physics and Chemistry, 1994. **43**(6): p. 595-611.
69. C.C. Winterbourn and D. Metodiewa, *Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**(3): p. 322-328.
70. P. Wardman and C. von Sonntag, *Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells*, in *Methods in Enzymology*. 1995, Academic Press. p. 31-45.
71. C. Schöneich, *Kinetics of thiol reactions*, in *Methods in Enzymology*. 1995, Academic Press. p. 45-55.
72. Y.S. Voronkova, O.S. Voronkova, V.A. Gorban, and K.K. Holoborodko, *Oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants: a review*. Ecology and Noospherology, 2018. **29**(1): p. 52-55.
73. P. Hōrak and A. Cohen, *How to measure oxidative stress in an ecological context: methodological and statistical issues*. Functional Ecology, 2010. **24**(5): p. 960-970.
74. C.L. Hawkins, P.E. Morgan, and M.J. Davies, *Quantification of protein modification by oxidants*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **46**(8): p. 965-988.
75. F. Tietze, *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues*. Analytical Biochemistry, 1969. **27**(3): p. 502-522.
76. E. Niki, *Antioxidant capacity: Which capacity and how to assess it?* Journal of Berry Research, 2011. **1**: p. 169-176.
77. D. Pandeya, N. Acharya, and S.-T. Hong, *Review: The Prion and its Potentiality*. Biomedical Research, 2010. **21**: p. 111-125.
78. V. Zigas, *Kuru in New Guinea: discovery and epidemiology*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1970. **19**(1): p. 130-2.
79. S. Inge-Vechtomov, G. Zhouravleva, and Y. Chernoff, *Biological Roles of Prion Domains*. Prion, 2007. **1**: p. 228-35.
80. M. Moser, R.J. Colello, U. Pott, and B. Oesch, *Developmental expression of the prion protein gene in glial cells*. Neuron, 1995. **14**(3): p. 509-517.
81. R.G. Will and W.B. Matthews, *Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease*. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1982. **45**(3): p. 235-8.
82. M.R. Scott, R. Will, J. Ironside, H.O. Nguyen, P. Tremblay, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner, *Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine*

- spongiform encephalopathy prions to humans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1999. **96**(26): p. 15137-42.
83. P. Gambetti, Q. Kong, W. Zou, P. Parchi, and S.G. Chen, *Sporadic and familial CJD: classification and characterisation*. British Medical Bulletin, 2003. **66**: p. 213-39.
84. A. Aguzzi, F. Baumann, and J. Bremer, *The prion's elusive reason for being*. Annual Review of Neuroscience, 2008. **31**: p. 439-77.
85. A. Aguzzi and M. Polymenidou, *Mammalian prion biology: one century of evolving concepts*. Cell, 2004. **116**(2): p. 313-27.
86. S.B. Prusiner, *Prions*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1998. **95**(23): p. 13363-83.
87. C.J. Gibbs, Jr., D.C. Gajdusek, and R. Latarjet, *Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1978. **75**(12): p. 6268-70.
88. D. Riesner, *Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc)*. British Medical Bulletin, 2003. **66**: p. 21-33.
89. R. Zahn, A. Liu, T. Lührs, R. Riek, C. von Schroetter, F. López García, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, and K. Wüthrich, *NMR solution structure of the human prion protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2000. **97**(1): p. 145-50.
90. D.G. Donne, J.H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T.L. James, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, P.E. Wright, and H.J. Dyson, *Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1997. **94**(25): p. 13452-7.
91. R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, and K. Wüthrich, *NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231)*. Nature, 1996. **382**(6587): p. 180-2.
92. R.N. Abskharon, G. Giachin, A. Wohlkonig, S.H. Soror, E. Pardon, G. Legname, and J. Steyaert, *Probing the N-terminal  $\beta$ -sheet conversion in the crystal structure of the human prion protein bound to a nanobody*. Journal of the American Chemical Society, 2014. **136**(3): p. 937-44.
93. E.D. Walter, M. Chattopadhyay, and G.L. Millhauser, *The affinity of copper binding to the prion protein octarepeat domain: evidence for negative cooperativity*. Biochemistry, 2006. **45**(43): p. 13083-92.
94. A.R. Spevacek, E.G. Evans, J.L. Miller, H.C. Meyer, J.G. Pelton, and G.L. Millhauser, *Zinc drives a tertiary fold in the prion protein with familial disease mutation sites at the interface*. Structure, 2013. **21**(2): p. 236-46.
95. A.J. McDonald, D.R. Leon, K.A. Markham, B. Wu, C.F. Heckendorf, K. Schilling, H.D. Showalter, P.C. Andrews, M.E. McComb, M.J. Pushie, C.E. Costello, G.L. Millhauser, and D.A. Harris, *Altered Domain Structure of the Prion Protein Caused by Cu<sup>(2+)</sup> Binding and Functionally Relevant Mutations: Analysis by Cross-Linking, MS/MS, and NMR*. Structure, 2019. **27**(6): p. 907-922.e5.
96. M. Moudjou, J. Chapuis, M. Mekrouti, F. Reine, L. Herzog, P. Sibille, H. Laude, D. Vilette, O. Andréoletti, H. Rezaei, M. Dron, and V. Béringue, *Glycoform-independent prion conversion by highly efficient, cell-based, protein misfolding cyclic amplification*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 29116.
97. G.L. Millhauser, *Copper and the prion protein: methods, structures, function, and disease*. Annual Review of Physical Chemistry, 2007. **58**: p. 299-320.
98. G. Arena, D. La Mendola, G. Pappalardo, I. Sóvágó, and E. Rizzarelli, *Interactions of Cu<sup>2+</sup> with prion family peptide fragments: Considerations on*

- affinity, speciation and coordination*. Coordination Chemistry Reviews, 2012. **256**(19): p. 2202-2218.
99. L. Quintanar, L. Rivillas-Acevedo, R. Grande-Aztatzi, C.Z. Gómez-Castro, T. Arcos-López, and A. Vela, *Copper coordination to the prion protein: Insights from theoretical studies*. Coordination Chemistry Reviews, 2013. **257**(2): p. 429-444.
100. E. Gralka, D. Valensin, E. Porciatti, C. Gajda, E. Gaggelli, G. Valensin, W. Kamysz, R. Nadolny, R. Guerrini, D. Bacco, M. Remelli, and H. Kozłowski, *Cu<sup>II</sup> binding sites located at His-96 and His-111 of the human prion protein: thermodynamic and spectroscopic studies on model peptides*. Dalton Transactions, 2008(38): p. 5207-5219.
101. K. Osz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Di Natale, D. Sanna, G. Micera, E. Rizzarelli, and 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 (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), 2007. **13**: p. 7129-43.
102. F. Berti, E. Gaggelli, R. Guerrini, A. Janicka, H. Kozłowski, A. Legowska, H. Miecznikowska, C. Migliorini, R. Pogni, M. Remelli, K. Rolka, D. Valensin, and G. Valensin, *Structural and Dynamic Characterization of Copper(II) Binding of the Human Prion Protein Outside the Octarepeat Region*. Chemistry – A European Journal, 2007. **13**(7): p. 1991-2001.
103. C. Hureau, L. Charlet, P. Dorlet, F. Gonnet, L. Spadini, E. Anxolabéhère-Mallart, and J.J. Girerd, *A spectroscopic and voltammetric study of the pH-dependent Cu(II) coordination to the peptide GGGTH: relevance to the fifth Cu(II) site in the prion protein*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2006. **11**(6): p. 735-44.
104. L. Rivillas-Acevedo, R. Grande-Aztatzi, I. Lomelí, J.E. García, E. Barrios, S. Teloxa, A. Vela, and L. Quintanar, *Spectroscopic and electronic structure studies of copper(II) binding to His111 in the human prion protein fragment 106-115: evaluating the role of protons and methionine residues*. Inorganic Chemistry, 2011. **50**(5): p. 1956-72.
105. R. Grande-Aztatzi, L. Rivillas-Acevedo, L. Quintanar, and A. Vela, *Structural models for Cu(II) bound to the fragment 92-96 of the human prion protein*. The Journal of Physical Chemistry B, 2013. **117**(3): p. 789-99.
106. G. Salzano, M. Brennich, G. Mancini, T.H. Tran, G. Legname, P. D'Angelo, and G. Giachin, *Deciphering Copper Coordination in the Mammalian Prion Protein Amyloidogenic Domain*. Biophysical Journal, 2020. **118**(3): p. 676-687.
107. A.K. Thakur, A.K. Srivastava, V. Srinivas, K.V.R. Chary, and C.M. Rao, *Copper alters aggregation behavior of prion protein and induces novel interactions between its N- and C-terminal regions*. Journal of Biological Chemistry, 2011. **286**(44): p. 38533-38545.
108. Eric G.B. Evans, M.J. Pushie, Kate A. Markham, H.-W. Lee, and Glenn L. Millhauser, *Interaction between Prion Protein's Copper-Bound Octarepeat Domain and a Charged C-Terminal Pocket Suggests a Mechanism for N-Terminal Regulation*. Structure, 2016. **24**(7): p. 1057-1067.
109. K.M. Schilling, L. Tao, B. Wu, J.T.M. Kiblen, N.C. Ubilla-Rodriguez, M.J. Pushie, R.D. Britt, G.P. Roseman, D.A. Harris, and G.L. Millhauser, *Both N-Terminal and C-Terminal Histidine Residues of the Prion Protein Are Essential*

- for Copper Coordination and Neuroprotective Self-Regulation.* Journal of molecular biology, 2020. **432**(16): p. 4408-4425.
110. P. D'Angelo, S. Della Longa, A. Arcovito, G. Mancini, A. Zitolo, G. Chillemi, G. Giachin, G. Legname, and F. Benetti, *Effects of the pathological Q212P mutation on human prion protein non-octarepeat copper-binding site.* Biochemistry, 2012. **51**(31): p. 6068-79.
111. G. Giachin, P.T. Mai, T.H. Tran, G. Salzano, F. Benetti, V. Migliorati, A. Arcovito, S.D. Longa, G. Mancini, P. D'Angelo, and G. Legname, *The non-octarepeat copper binding site of the prion protein is a key regulator of prion conversion.* Scientific Reports, 2015. **5**(1): p. 15253.
112. H. Wille and J.R. Requena, *The Structure of PrP(Sc) Prions.* Pathogens, 2018. **7**(1).
113. G. Spagnolli, M. Rigoli, S. Orioli, A.M. Sevillano, P. Faccioli, H. Wille, E. Biasini, and J.R. Requena, *Full atomistic model of prion structure and conversion.* PLOS Pathogens, 2019. **15**(7): p. e1007864.
114. K.M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen, and et al., *Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993. **90**(23): p. 10962-6.
115. J. Safar, P.P. Roller, D.C. Gajdusek, and C.J. Gibbs, *Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein.* Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(27): p. 20276-20284.
116. S.B. Prusiner, *Neurodegenerative Diseases and Prions.* New England Journal of Medicine, 2001. **344**(20): p. 1516-1526.
117. A. Mangé, F. Béranger, K. Peoc'h, T. Onodera, Y. Frobert, and S. Lehmann, *Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein.* Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization, 2004. **96**: p. 125-32.
118. H.E.M. McMahon, A. Mangé, N. Nishida, C. Créminon, D. Casanova, and S. Lehmann, *Cleavage of the Amino Terminus of the Prion Protein by Reactive Oxygen Species \**. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(3): p. 2286-2291.
119. N.T. Watt, D.R. Taylor, A. Gillott, D.A. Thomas, W.S. Perera, and N.M. Hooper, *Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress.* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(43): p. 35914-21.
120. C.L. Haigh, S.Y. Marom, and S.J. Collins, *Copper, endoproteolytic processing of the prion protein and cell signalling.* Frontiers in Bioscience-Landmark, 2010. **15**(3): p. 1086-1104.
121. J. Liang and Q. Kong,  *$\alpha$ -Cleavage of cellular prion protein.* Prion, 2012. **6**(5): p. 453-60.
122. H.C. Altmeppen, J. Prox, B. Puig, F. Dohler, C. Falker, S. Krasemann, and M. Glatzel, *Roles of endoproteolytic  $\alpha$ -cleavage and shedding of the prion protein in neurodegeneration.* The FEBS Journal, 2013. **280**(18): p. 4338-47.
123. A.J. McDonald, J.P. Dibble, E.G.B. Evans, and G.L. Millhauser, *A New Paradigm for Enzymatic Control of Alfa-Cleavage and Beta-Cleavage of the Prion Protein.* Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(2): p. 803-813.
124. V. Lewis, V.A. Johanssen, P.J. Crouch, G.M. Klug, N.M. Hooper, and S.J. Collins, *Prion protein "gamma-cleavage": characterizing a novel*

- endoproteolytic processing event*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016. **73**(3): p. 667-683.
125. A. Kojima, M. Konishi, and T. Akizawa, *Prion fragment peptides are digested with membrane type matrix metalloproteinases and acquire enzyme resistance through Cu<sup>2+</sup>-binding*. Biomolecules, 2014. **4**(2): p. 510-26.
126. C. Sánchez-López, C.O. Fernández, and L. Quintanar, *Neuroprotective alpha-cleavage of the human prion protein significantly impacts Cu(II) coordination at its His111 site*. Dalton Transactions, 2018. **47**(28): p. 9274-9282.
127. C. Sánchez-López and L. Quintanar, *β-cleavage of the human prion protein impacts Cu(II) coordination at its non-octarepeat region*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2022. **228**: p. 111686.
128. K.N. Prasad and S.C. Bondy, *Oxidative and Inflammatory Events in Prion Diseases: Can They Be Therapeutic Targets?* Current Aging Science, 2019. **11**(4): p. 216-225.
129. M.P.B. Gomes, T.A. Millen, P.S. Ferreira, N.L.C. e Silva, T.C.R.G. Vieira, M.S. Almeida, J.L. Silva, and Y. Cordeiro, *Prion Protein Complexed to N2a Cellular RNAs through Its N-terminal Domain Forms Aggregates and Is Toxic to Murine Neuroblastoma Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(28): p. 19616-19625.
130. S. Yin, X. Fan, S. Yu, C. Li, and M.S. Sy, *Binding of recombinant but not endogenous prion protein to DNA causes DNA internalization and expression in mammalian cells*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(37): p. 25446-25454.
131. P. Cavaliere, B. Pagano, V. Granata, S. Prigent, H. Rezaei, C. Giancola, and A. Zagari, *Cross-talk between prion protein and quadruplex-forming nucleic acids: a dynamic complex formation*. Nucleic Acids Research, 2012. **41**(1): p. 327-339.
132. L. Gasperini, E. Meneghetti, B. Pastore, F. Benetti, and G. Legname, *Prion Protein and Copper Cooperatively Protect Neurons by Modulating NMDA Receptor Through S-nitrosylation*. Antioxidants and Redox Signaling, 2014. **22**(9): p. 772-784.
133. M.A. Wells, G.S. Jackson, S. Jones, L.L. Hosszu, C.J. Craven, A.R. Clarke, J. Collinge, and J.P. Waltho, *A reassessment of copper(II) binding in the full-length prion protein*. Biochemical Journal, 2006. **399**(3): p. 435-44.
134. C. Migliorini, A. Sinicropi, H. Kozlowski, M. Luczkowski, and D. Valensin, *Copper-induced structural propensities of the amyloidogenic region of human prion protein*. Journal of Biological Inorganic Chemistry 2014. **19**: p. 635-645.
135. E. Biasini, J.A. Turnbaugh, U. Unterberger, and D.A. Harris, *Prion protein at the crossroads of physiology and disease*. Trends in Neurosciences, 2012. **35**(2): p. 92-103.
136. R. Linden, V.R. Martins, M.A. Prado, M. Cammarota, I. Izquierdo, and R.R. Brentani, *Physiology of the prion protein*. Physiological Reviews, 2008. **88**(2): p. 673-728.
137. B. Wu, A.J. McDonald, K. Markham, C.B. Rich, K.P. McHugh, J. Tatzelt, D.W. Colby, G.L. Millhauser, and D.A. Harris, *The N-terminus of the prion protein is a toxic effector regulated by the C-terminus*. eLife, 2017. **6**: p. e23473.
138. J. Laurén, D.A. Gimbel, H.B. Nygaard, J.W. Gilbert, and S.M. Strittmatter, *Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-β oligomers*. Nature, 2009. **457**(7233): p. 1128-1132.

139. B. Vincent, M. Cisse Alfa, C. Sunyach, M.-V. Guillot-Sestier, and F. Checler, *Regulation of Beta-APP and PrPc Cleavage by Alfa-Secretase: Mechanistic and Therapeutic Perspectives*. Current Alzheimer Research, 2008. **5**(2): p. 202-211.
140. E. Bove-Fenderson, R. Urano, J.E. Straub, and D.A. Harris, *Cellular prion protein targets amyloid- $\beta$  fibril ends via its C-terminal domain to prevent elongation*. Journal of Biological Chemistry, 2017. **292**(41): p. 16858-16871.
141. D.R. Brown, B. Schmidt, and H.A. Kretzschmar, *Prion protein fragment interacts with PrP-deficient cells*. Journal of Neuroscience Research, 1998. **52**(3): p. 260-7.
142. D. Brown, *Altered toxicity of the prion protein peptide PrP106–126 carrying the Ala117→Val mutation*. Biochemical Journal 2000. **346**: p. 785 - 791.
143. M.T. Islam, *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders*. Neurological Research, 2017. **39**(1): p. 73-82.
144. H. Yaribeygi, Y. Panahi, B. Javadi, and A. Sahebkar, *The Underlying Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: A Mechanistic Review*. CNS & Neurological Disorders Drug Targets, 2018. **17**(3): p. 207-215.
145. N.N. Nalivaeva and A.J. Turner, *Role of Ageing and Oxidative Stress in Regulation of Amyloid-Degrading Enzymes and Development of Neurodegeneration*. Current Aging Science, 2017. **10**(1): p. 32-40.
146. C.A. Cobb and M.P. Cole, *Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration*. Neurobiology of Disease, 2015. **84**: p. 4-21.
147. M. Antoine, S. Boschi-Muller, and G. Branlant, *Kinetic Characterization of the Chemical Steps Involved in the Catalytic Mechanism of Methionine Sulfoxide Reductase A from Neisseria meningitidis*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(46): p. 45352-45357.
148. J. Moskovitz, J.M. Poston, B.S. Berlett, N.J. Nosworthy, R. Szczepanowski, and E.R. Stadtman, *Identification and Characterization of a Putative Active Site for Peptide Methionine Sulfoxide Reductase (MsrA) and Its Substrate Stereospecificity*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(19): p. 14167-14172.
149. S. Boschi-Muller and G. Branlant, *Methionine sulfoxide reductase: Chemistry, substrate binding, recycling process and oxidase activity*. Bioorganic Chemistry, 2014. **57**: p. 222-230.
150. J.L. King and T.H. Jukes, *Non-Darwinian evolution*. Science, 1969. **164**(3881): p. 788-98.
151. J. Bettinger and S. Ghaemmaghami, *Methionine oxidation within the prion protein*. Prion, 2020. **14**(1): p. 193-205.
152. N.D. Younan, R.C. Nadal, P. Davies, D.R. Brown, and J.H. Viles, *Methionine Oxidation Perturbs the Structural Core of the Prion Protein and Suggests a Generic Misfolding Pathway* Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(34): p. 28263-28275.
153. L. Redecke, M.v. Bergen, J. Clos, P.V. Konarev, D.I. Svergun, U.E.A. Fittschen, J.A.C. Broekaert, O. Bruns, D. Georgieva, E. Mandelkow, N. Genov, and C. Betzel, *Structural characterization of  $\beta$ -sheeted oligomers formed on the pathway of oxidative prion protein aggregation in vitro*. Journal of Structural Biology, 2007. **157**(2): p. 308-320.
154. Z. Wang, B. Feng, G. Xiao, and Z. Zhou, *Roles of methionine oxidation in E200K prion protein misfolding: Implications for the mechanism of pathogenesis in*

- E200K linked familial Creutzfeldt–Jakob disease*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2016. **1864**(4): p. 346-358.
155. P.M.H. Heegaard, H.G. Pedersen, J. Flink, and U. Boas, *Amyloid aggregates of the prion peptide PrP106–126 are destabilised by oxidation and by the action of dendrimers*. *FEBS Letters*, 2004. **577**(1-2): p. 127-133.
156. R.C. Nadal, S.R. Abdelraheim, M.W. Brazier, S.E.J. Rigby, D.R. Brown, and J.H. Viles, *Prion protein does not redox-silence Cu<sup>2+</sup>, but is a sacrificial quencher of hydroxyl radicals*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007. **42**(1): p. 79-89.
157. G. Csire, L. Nagy, K. Várnagy, and C. Kállay, *Copper(II) interaction with the Human Prion 103–112 fragment – Coordination and oxidation*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2017. **170**: p. 195-201.
158. G. Csire, I. Turi, I. Sóvágó, E. Kárpáti, and 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*, 2020. **203**: p. 110927.
159. M. Sutradhar, T. Roy Barman, A.J.L. Pombeiro, and L.M.D.R.S. Martins, *Aroylhydrazone Schiff Base Derived Cu(II) and V(V) Complexes: Efficient Catalysts towards Neat Microwave-Assisted Oxidation of Alcohols*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. **21**(8): p. 2832.
160. M.V. Angelusiu, S.-F. Barbuceanu, C. Draghici, and G.L. Almajan, *New Cu(II), Co(II), Ni(II) complexes with aroyl-hydrazone based ligand. Synthesis, spectroscopic characterization and in vitro antibacterial evaluation*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010. **45**(5): p. 2055-2062.
161. M. Sutradhar and A. Pombeiro, *Coordination chemistry of non-oxido, oxido and dioxido vanadium(IV/V) complexes with azine fragment ligands*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2014. **265**: p. 89-124.
162. M. Sutradhar, M.V. Kirillova, M.F.C. Guedes da Silva, C.-M. Liu, and A.J.L. Pombeiro, *Tautomeric effect of hydrazone Schiff bases in tetranuclear Cu(II) complexes: magnetism and catalytic activity towards mild hydrocarboxylation of alkanes*. *Dalton Transactions*, 2013. **42**(47): p. 16578-16587.
163. M. Sutradhar, E.C.B.A. Alegria, K.T. Mahmudov, M.F.C. Guedes da Silva, and A.J.L. Pombeiro, *Iron(III) and cobalt(III) complexes with both tautomeric (keto and enol) forms of aroylhydrazone ligands: catalysts for the microwave assisted oxidation of alcohols*. *RSC Advances*, 2016. **6**(10): p. 8079-8088.
164. A.V. Astashkin, R.D. Utterback, Y.-S. Sung, and E. Tomat, *Iron Complexes of an Antiproliferative Aroyl Hydrazone: Characterization of Three Protonation States by Electron Paramagnetic Resonance Methods*. *Inorganic Chemistry*, 2020. **59**(16): p. 11377-11384.
165. D.S. Cukierman, E. Accardo, R.G. Gomes, A. De Falco, M.C. Miotto, M.C.R. Freitas, M. Lanznaster, C.O. Fernández, and N.A. Rey, *Aroylhydrazones constitute a promising class of 'metal-protein attenuating compounds' for the treatment of Alzheimer's disease: a proof-of-concept based on the study of the interactions between zinc(II) and pyridine-2-carboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2018. **23**(8): p. 1227-1241.
166. J. Wahbeh and S. Milkowski, *The Use of Hydrazones for Biomedical Applications*. *SLAS Technology*, 2019. **24**(2): p. 161-168.

167. I. Iliev, D. Kontrec, R. Detcheva, M. Georgieva, A. Balacheva, N. Galić, and T. Pajpanova, *Cancer cell growth inhibition by aroylhydrazone derivatives*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2019. **33**(1): p. 756-763.
168. L.E. Scott and C. Orvig, *Medicinal Inorganic Chemistry Approaches to Passivation and Removal of Aberrant Metal Ions in Disease*. Chemical Reviews, 2009. **109**(10): p. 4885-4910.
169. A. Gaeta, F. Molina-Holgado, X.L. Kong, S. Salvage, S. Fakihi, P.T. Francis, R.J. Williams, and R.C. Hider, *Synthesis, physical–chemical characterisation and biological evaluation of novel 2-amido-3-hydroxypyridin-4(1H)-ones: Iron chelators with the potential for treating Alzheimer's disease*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011. **19**(3): p. 1285-1297.
170. A. Budimir, *Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy*. Acta Pharmaceutica, 2011. **61**(1): p. 1-14.
171. R.A. Hauser-Davis, L.V. de Freitas, D.S. Cukierman, W.S. Cruz, M.C. Miotto, J. Landeira-Fernandez, A.A. Valiente-Gabioud, C.O. Fernández, and N.A. Rey, *Disruption of zinc and copper interactions with A $\beta$ (1–40) by a non-toxic, isoniazid-derived, hydrazone: a novel biometal homeostasis restoring agent in Alzheimer's disease therapy?* Metallomics, 2015. **7**(5): p. 743-747.
172. D.S. Cukierman, A.B. Pinheiro, S.L.P. Castiñeiras-Filho, A.S.P. da Silva, M.C. Miotto, A. De Falco, T. de P. Ribeiro, S. Maisonette, A.L.M.C. da Cunha, R.A. Hauser-Davis, J. Landeira-Fernandez, R.Q. Aucélio, T.F. Outeiro, M.D. Pereira, C.O. Fernández, and N.A. Rey, *A moderate metal-binding hydrazone meets the criteria for a bioinorganic approach towards Parkinson's disease: Therapeutic potential, blood-brain barrier crossing evaluation and preliminary toxicological studies*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2017. **170**: p. 160-168.
173. T. Punniyamurthy, S. Velusamy, and J. Iqbal, *Recent Advances in Transition Metal Catalyzed Oxidation of Organic Substrates with Molecular Oxygen*. Chemical Reviews, 2005. **105**(6): p. 2329-2364.
174. J.C. Pessoa and I. Correia, *Salan vs. salen metal complexes in catalysis and medicinal applications: Virtues and pitfalls*. Coordination Chemistry Reviews, 2019. **388**: p. 227-247.
175. A. Erxleben, *Transition metal salen complexes in bioinorganic and medicinal chemistry*. Inorganica Chimica Acta, 2018. **472**: p. 40-57.
176. P. Jeslin Kanaga Inba, B. Annaraj, S. Thalamuthu, and M.A. Neelakantan, *Cu(II), Ni(II), and Zn(II) Complexes of Salan-Type Ligand Containing Ester Groups: Synthesis, Characterization, Electrochemical Properties, and In Vitro Biological Activities*. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2013. **2013**(1): p. 439848.
177. E.Y. Tshuva and D. Peri, *Modern cytotoxic titanium(IV) complexes; Insights on the enigmatic involvement of hydrolysis*. Coordination Chemistry Reviews, 2009. **253**(15): p. 2098-2115.
178. I. Correia, J. Costa Pessoa, M.T. Duarte, R.T. Henriques, M.F.M. Piedade, L.F. Veiros, T. Jakusch, T. Kiss, Á. Dörnyei, M.M.C.A. Castro, C.F.G.C. Gerales, and F. Avecilla, *N,N'-Ethylenebis(pyridoxylideneiminato) and N,N'-Ethylenebis(pyridoxylaminato): Synthesis, Characterization, Potentiometric, Spectroscopic, and DFT Studies of Their Vanadium(IV) and Vanadium(V) Complexes*. Chemistry – A European Journal, 2004. **10**(9): p. 2301-2317.
179. I.N. L. Zékány, *PSEQUAD: A comprehensive for the evaluation of potentiometric and/or spectrophotometric equilibrium data using analytical derivatives*

- Computational methods for the determination of formation constants*. 1985, New York: D. Legett (Ed) Plenum Press. 291-353.
180. H.M. Irving, M.G. Miles, and L.D. Pettit, *A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titrations using a glass electrode*. *Analytica Chimica Acta*, 1967. **38**: p. 475-488.
181. G. Eriksson, *An algorithm for the computation of aqueous multi-component, multiphase equilibria*. *Analytica Chimica Acta*, 1979. **112**(4): p. 375-383.
182. P. Gans, A. Sabatini, and A. Vacca, *SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data*. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1985(6): p. 1195-1200.
183. H. Sigel and R.B. Martin, *Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands*. *Chemical Reviews*, 1982. **82**(4): p. 385-426.
184. E.J. Billo, *Copper(II) chromosomes and the rule of average environment*. *Inorganic and Nuclear Chemistry Letters*, 1974. **10**(8): p. 613-617.
185. J.I. Wirgau, I. Spasojević, H. Boukhalfa, I. Batinić-Haberle, and A.L. Crumbliss, *Thermodynamics, Kinetics, and Mechanism of the Stepwise Dissociation and Formation of Tris(l-lysinehydroxamate)iron(III) in Aqueous Acid*. *Inorganic Chemistry*, 2002. **41**(6): p. 1464-1473.
186. A. Laskai, in *Tudományos Diákköri Dolgozat*. 2014: Debreceni Egyetem.
187. P. Roepstorff and J. Fohlman, *Letter to the editors*. *Biomedical Mass Spectrometry*, 1984. **11**(11): p. 601-601.
188. X. Jiang, J.B. Smith, and E.C. Abraham, *Identification of a MS-MS Fragment Diagnostic for Methionine Sulfoxide*. *Journal of Mass Spectrometry*, 1996. **31**(11): p. 1309-1310.
189. F. Turecek, D.E. Drinkwater, and F.W. McLafferty, *Gas-phase chemistry of CH<sub>3</sub>SOH, -CH<sub>2</sub>+SHOH, CH<sub>3</sub>SO, and CH<sub>2</sub>SOH by neutralization-reionization mass spectrometry*. *Journal of the American Chemical Society*, 1989. **111**(20): p. 7696-7701.
190. Á. Kuki, L. Nagy, M. Zsuga, and S. Kéki, *An approach to estimate the activation energies of fragmentation occurring in quadrupole collision cell of the mass spectrometer*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2017. **52**(10): p. 672-680.
191. T. Nagy, Á. Kuki, B. Antal, L. Nagy, M. Purgel, A. Sipos, M. Nagy, M. Zsuga, and S. Kéki, *Chiral differentiation of the noscapine and hydrastine stereoisomers by electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2015. **50**(1): p. 240-6.
192. C. Esmieu, R. Balderrama-Martínez-Sotomayor, A. Conte-Daban, O. Iranzo, and C. Hureau, *Unexpected Trends in Copper Removal from Aβ Peptide: When Less Ligand Is Better and Zn Helps*. *Inorganic Chemistry*, 2021. **60**(2): p. 1248-1256.

## 8. Függelék

### Az értekezés alapját képező közlemények:

1. Daphne S. Cukierman, **Nikolett Bodnár**, Beatriz N. Evangelista, Lajos Nagy, Csilla Kállay, Nicolás A. Rey, *Impact of pyridine-2-carboxaldehyde-derived aroylhydrazones on the copper-catalyzed oxidation of the M112A PrP103–112 mutant fragment*, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 24 1231-1244, **2019**  
**IF: 3.632**
2. **Nikolett Bodnár**, Katalin Várnagy, Lajos Nagy, Gizella Csire, Csilla Kállay, *Ambivalent role of ascorbic acid in the metal-catalyzed oxidation of oligopeptides*, Journal of Inorganic Biochemistry, 222, 111510, **2021**  
**IF: 4.155**
3. Jack Devonport, **Nikolett Bodnár**, Andrew McGown, Mahmoud Bukar Maina, Louise Serpell, Csilla Kállay, John Spencer, and George E. Kostakis, *Salpyran: A Cu(II) Selective Chelator With Therapeutic Potential*, Inorganic Chemistry, 60, 20, 15310–1532, **2021**  
**IF:5,165**
4. Daphne S. Cukierman, **Nikolett Bodnár**, Renata Diniz, Lajos Nagy, Csilla Kállay, Nicolas A. Rey, *Full Equilibrium Picture in Aqueous Binary and Ternary Systems Involving Copper(II), 1-Methylimidazole-Containing Hydrazonic Ligands, and the 103-112 Human Prion Protein Fragment*, Inorganic Chemistry 61, 1, 723-737, **2022**  
**IF:5,165**

### Az értekezés anyagához nem kapcsolódó közlemények:

Ágnes Grenács, **Nikolett Bodnár**, Dóra Csilla Pálinkás, Norbert Lihi, Katalin Várnagy, *The effect of side chains on the complex formation processes of N-terminally free hexapeptides containing C-terminal cysteinyl functions*, New Journal of Chemistry, 46, 3754 – 3765, **2022**  
**IF:3,591**

### Egyéb publikációs tevékenység:

I.Fiatal Kémikusok Fóruma Kiadványkötet, 203 – 208, 2019  
**Bodnár Nikolett**, Csire Gizella, Kállay Csilla, Nagy Lajos: *Egy prion protein mutáns peptid oxidációs körülményeinek optimalizálása*  
ISBN:978-615-6018-00-7,

Az értekezés anyagából készült előadások:

1. **Csire Gizella**, Bodnár Nikolett, Kállay Csilla, Nagy Lajos: Prion fehérje fragmense és mutánsai oxidációs körülményeinek optimalizálása egy nonapeptiden keresztül, *LII. Komplexkémiai Kollokvium*, 2018. május 22-24., Balatonvilágos
2. **Csilla Kállay**, Nikolett Bodnár, Gizella Csire, Lajos Nagy: Optimization of the metal catalyzed oxidation of prion protein fragments, *XIVth International Symposium on Inorganic Biochemistry*, 2018. szeptember 5-9., Wroclaw, Lengyelország
3. **Kállay Csilla**, Bodnár Nikolett, Csire Gizella, Nagy Lajos, Bellér Gábor: Hisztidint és/vagy metionint tartalmazó peptidek oxidációját befolyásoló tényezők vizsgálata, *MTA Reakciókinetikai és Fotokémiai Munkabizottság, a Koordinációs Kémiai Munkabizottság és a VEAB Kémiai Szakbizottság közös tudományos ülése*, 2018. november 8-9., Veszprém
4. **Bodnár Nikolett**: Oxidációra érzékeny aminosavakat is tartalmazó nonapeptid redoxi vizsgálata, *2019 Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Kémiai és Vegyipari Szekció*, 2019. március 21-23., Budapest
5. **Bodnár Nikolett**: Egy prion protein mutáns peptid oxidációs körülményeinek optimalizálása, *XXII. Tavaszi Szél Konferencia*, 2019. május 3-5., Debrecen
6. **Bodnár Nikolett**, Kállay Csilla és Nagy Lajos: A fémion-peptid közötti kölcsönhatást gyengítő kismolekulák hatása a peptidek fémion-katalizált oxidációjára, *Komplexkémiai Kollokvium*, 2021. május 26-27., Szeged
7. **Nikolett Bodnár**, Csilla Kállay, Daphne S. Cukierman, Nicolás A. Rey, Jack Devonport, George E. Kostakis, Lajos Nagy, Effects of metal-protein attenuating molecules towards metal-catalyzed oxidation of peptides, *Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (YRICCCE III), 4-5 June 2021, Cluj-Napoca, Romania*
8. **Csilla Kállay**, Nikolett Bodnár, George E. Kostakis, Jack Devonport, Daphne S. Cukierman, Nicolás A. Rey, Lajos Nagy: Factors affecting the oxidation of prion protein fragments, *International Symposium on Metal Complexes, ISMEC2022*, 2022. június 5-8., Valencia, Spanyolország

9. **Kállay Csilla**, Galvácsi Antal, Bodnár Nikolett, Nagy Lajos: Prion protein és  $\beta$ -amiloid peptidmodellek kölcsönhatása réz(II)-ionokkal – koordináció és oxidáció, *Koordinációs Kémiai Munkabizottság ülése*, 2023. december 8., Debrecen

Az értekezés anyagából készült poszterek:

1. Csilla Kállay, **Nikolett Bodnar**, Gizella Csire, Lajos Nagy: Metal catalyzed oxidation of a prion protein mutant peptide, *Acta of the International Symposia on Metal Complexes – ISMEC Acta*, Volume 8 - ISMEC 2018, June 3<sup>rd</sup> – 7<sup>th</sup> 2018, Florence, Olaszország

2. **Bodnár Nikolett**, Csire Gizella, Kállay Csilla, Nagy Lajos: Egy prion protein mutáns peptid oxidációs körülményeinek optimalizálása, *I. Fiatal Kémikusok Fóruma Szimpózium*, 2019. április 3-5., Debrecen

3. **Nikolett Bodnár**, Csilla Kállay, Daphne S. Cukierman, Nicolás A. Rey, Lajos Nagy: Aroylhydrazones as potential protecting agents against metal-catalyzed oxidation of prion protein, *International Symposium on Thermodynamics of Metal Complexes*, June 16<sup>th</sup>-18<sup>th</sup>, 2021 Białystok, Lengyelország

4. **Nikolett Bodnár**, Csilla Kállay, George E. Kostakis, Jack Devonport, Daphne S. Cukierman, Nicolás A. Rey, Lajos Nagy: Cu(II) ion selective chelators with therapeutic potentials, *International Symposium On Metal Complexes*, June 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> 2022, Valencia, Spanyolország