



1949

**Aszparaginsavat, glutaminsavat, hisztidint és ciszteint
tartalmazó peptidek átmenetifém-komplexei**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Lukács Márton

Témavezető: Prof. Dr. Várnagy Katalin, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács
Kémia Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2020

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Kémiai Tudományok Doktori Iskola K/2 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

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

Debrecen, 2020.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Lukács Márton doktorjelölt 2016-2020 között a fent megnevezett Doktori Iskola K/2 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2020..

a témavezető aláírása

Aszparaginsavat, glutaminsavat, hisztidint és ciszteint tartalmazó peptidek átmenetifém-komplexei

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

Írta: **Lukács Márton** okleveles vegyész

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

Témavezető: **Prof. Dr. Várnagy Katalin** egyetemi tanár

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
.....

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2020.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm *Dr. Fábrián István* és *Dr. Gáspár Attila* egyetemi tanároknak, hogy lehetővé tették számomra a doktori munkám elkészítését a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai kémiai Tanszékén.

Ezúton szeretném kifejezni őszinte hálám és köszönetem témavezetőmnek *Prof. Dr. Várnagy Katalin* egyetemi tanárnak az áldozatos közös munka lehetővé tételéért, biztatásáért, a rám szánt idejéért és energiájáért.

Köszönet illeti *Dr. Farkas Etelka* professzor emeritát, *Dr. Sóvágó Imre* professzor emeritust és *Dr. Buglyó Péter* egyetemi docenst, akik bármikor szívesen segítettek, válaszoltak a felmerülő kérdésekre, nyomon követték munkámat, illetve tanácsaikkal támogatták azt.

Köszönettel tartozom a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* minden régi és jelenlegi tagjának, akikkel a munka könnyedén, kooperatívan és baráti hangulatban telt. Külön köszönöm *Dr. Csire Gizellának* és *Dr. Lihi Norbertnek*, hogy megtanították a pH-potenciometriás berendezések használatát és az eredmények értelmezését, valamint *Dr. Dávid Ágnesnek*, aki az UV-látható és cirkuláris dikroizmus spektroszkópiánál használt készülékekkel történő munkavégzést tanította meg. *Dr. Lihi Norbertnek* szeretném megköszönni a ^{113}Cd NMR-spektrum felvételét.

Köszönet illeti *Godó Attila* műszaki ügyintézőt és *Fekete Orsolya* vegyésztechnikust, hogy mindig önzetlenül segítettek bármi problémám is merült fel.

Köszönöm *Dr. Kurtán Tibornak* a cirkuláris dikroizmus mérésekben nyújtott segítségét, továbbá *Dr. Nagy Lajosnak* pedig az MS spektrumok felvételét.

Hálával tartozom a CNR-IBB kutatóközpontban dolgozó, velünk együttműködésben álló, *Dr. Giuseppe Pappalardo* és *Giuseppe Di Natale* kutatóknak a Tau fragmensek előállításánál, kromatográfiás tisztításánál, MALDI-TOF méréseiknél nyújtott segítségüket emellett az ESR és MS mérések kivitelzését.

Végül, de nem utolsó sorban őszintén köszönöm családomnak és barátaimnak, akik mindig készségesen mellettem álltak és támogattak az elmúlt években.

A kutatások anyagi támogatásáért köszönet illeti az NKFI Hivatalt (K 115480 azonosító számú pályázat), valamint a Tempus Közalapítványt. A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Tartalom

1. Bevezetés és célkitűzés	1
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. A vizsgált fémionok jellemzése.....	4
2.1.1. A kadmium élettani hatása és koordinációs kémiája.....	4
2.1.2. A nikkel élettani hatása és koordinációs kémiája.....	5
2.1.3. A réz élettani hatása és koordinációs kémiája.....	7
2.1.4. A cink élettani hatása és koordinációs kémiája.....	8
2.2. Peptidek komplexképző sajátosságai	9
2.2.1. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek jellemzése	11
2.2.2. Ciszteint tartalmazó peptidek jellemzése	13
2.2.3. Hisztidint tartalmazó peptidek jellemzése	16
2.3. Neurodegeneratív megbetegedések áttekintése	19
2.3.1. Az Alzheimer-kór kialakulásáért felelős tényezők	20
2.3.1.1. A tau fehérje jellemzése és hatása az Alzheimer-kór lefolyásában ..	21
2.3.2. A fémionok szerepe neurodegeneratív megbetegedésekben	24
2.3.2.1. A tau fehérje kölcsönhatása fémionokkal.....	25
3. Kísérleti körülmények és alkalmazott módszerek	27
3.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok	27
3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis	31
3.3. pH-potenciometria.....	34
3.4. UV-látható spektrofotometria.....	37
3.5. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia	40
3.6. ESR-spektroszkópia	41
3.7. ¹¹³ Cd NMR-spektroszkópia	43

3.8. Tömegspektrometria.....	43
4. Kísérleti eredmények és értékelésük	44
4.1. Aszparaginsavat és glutaminsavat tartalmazó peptidek	44
4.2. Ciszteint tartalmazó peptidek	48
4.2.1. Egy-, illetve két-cisztein-tartalmú peptidek sav-bázis tulajdonságai	48
4.2.2. Egy-, illetve két-cisztein-tartalmú peptidek Cd(II)- és Zn(II)-komplexei	50
4.2.3. Két ciszteint tartalmazó peptidek Ni(II)-komplexei	57
4.2.3.1. A $[\text{Ni}_3\text{L}_4]^{2-}$ komplex tulajdonságai	60
4.2.3.2. A $[\text{NiH}_1\text{L}]$ komplex tulajdonságai	60
4.2.3.3. A $[\text{Ni}_2\text{H}_2\text{L}_2]_x$ és $[\text{Ni}_2\text{H}_3\text{L}_2]_x$ komplexek tulajdonságai	61
4.2.3.4. A $[\text{NiH}_2\text{L}]$ komplex tulajdonságai	63
4.2.3.5. A $[\text{NiH}_3\text{L}]$ komplex tulajdonságai	64
4.3. Tau fragmensek	66
4.3.1. Szabad ligandumok protonálódási egyensúlyai.....	67
4.3.2. Cu(II)-Tau(9-16) rendszer vizsgálata	68
4.3.3. Tau(26-33) és mutánsainak Cu(II)-komplexei	72
4.3.4. A Cu(II)-Tau(12-16)(30-34) rendszer vizsgálat	78
4.3.5. MS vizsgálatok	84
4.3.6. Tau fragmensek Ni(II)-komplexei.....	85
5. Összefoglalás.....	90
6. Summary	94
7. Függelék.....	98
8. Irodalomjegyzék.....	105

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata:

$A\beta$	amiloid- β peptid
Ac-	acetilcsoport (védőcsoport)
AK	Alzheimer-kór
Ala, A	alanin
Asp, D	aszparaginsav
APP	amiloid prekursor fehérje
CD	cirkuláris dikroizmus
CNR-IBB	Consiglio Nazionale Delle Ricerche - Istituto Di Biostrutture e Bioimmagini
-CO vagy -C=O	karbonilcsoport
-COO ⁻	karboxilátcsoport
-COOH	karboxilcsoport
CT sáv	töltésátviteli sáv (Charge Transfer)
Cys, C	cisztein
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ESI	elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization)
ESR	elektronspin-rezonancia
FAAS	lángatomabszorpciós spektrometria
Fmoc	9-fluorenil-metoxi-karbonil
Gln, Q	glutamin
Glu, E	glutaminsav
Gly, G	glicin
His, H	hisztidin
ICP-AES	induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometria
L	ligandum
Lys, K	lizin
$lg\beta[H_qL_r]$	bruttó képződési állandó
$lg\beta$ vagy $lg\beta[M_pH_qL_r]$	stabilitási állandó
M	koncentráció kifejezése, mólos, mol/dm ³
MAPT	Microtubule-Associated Protein Tau, mikrotubulushoz kapcsolódó tau fehérje
MALDI	mátrix által segített lézerdesorpciós ionizáció
Me	metilcsoport
Met, M	metionin
MP-AES	mikrohullámú plazma atomemissziós spektrometria
MS	tömegspektrometria
MT	metallotioneinek
NFK	neurofibrilláris köteg
-NH ₂	aminocsoport
N _{Im} , Im(N), Im	imidazolnitrogén
NMR	mágneses rezonancia (nuclear magnetic resonance)
peptid-N ⁻	deprotonált peptidnitrogén
PHF	páros helikális filamentum

p _{tau}	hiperfoszforilált tau
Pro, P	prolin
RP-HPLC	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
ROS	reaktív oxigén származék
(tiolát-)S ⁻	tiolátcsoport
Ser, S	szerin
SOD	szuperoxid-dizmutáz
Tau(9-16)	Ac-EVMEDHAG-NH ₂
Tau(26-33)	Ac-QGGYTMHQ-NH ₂
Tau(26-33)m	Ac-KGGYTMHK-NH ₂
Tau(26-33)mA	Ac-KGGATMHK-NH ₂
Tau(12-16)(30-34)	Ac-EDHAGTMHQD-NH ₂
Thr, T	treonin
TOF	time of flight, repülési időn alapuló analízátor
Trp, W	triptofán
Trt	tritol
Tyr, Y	tirozin
UV	ultraibolya
Val, V	valin

1. Bevezetés és célkitűzés

Napjainkra vitathatatlaná vált, hogy a fémionok a mikrobiális, növényi és állati szervezetekben előforduló fehérjékkel kölcsönhatásba lépnek komplex vegyületek keletkezése közben. Az elemek élő szervezetekre gyakorolt hatása alapján két kategóriát különíthetünk el: egyrészt a létfontosságú, másrészt a szennyező elemeket. Utóbbi kategória mérgező, illetve közömbös alcsoportokra osztható. A Cu(II) és Zn(II) egyértelműen létfontosságú nyomelemek, míg a Cd(II) mérgező tulajdonságú, a Ni(II) karaktere pedig a vizsgált organizmus minőségének függvénye.

Az, hogy egy adott szervezet miért kerül kölcsönhatásba egy adott fémmel vagy annak ionjával az több okból is fakadhat. Természetes esetben egy elem felvétele azért történik meg, mert az élőlénynek szüksége van rá, és az anyagcsere folyamatok során a táplálékból könnyedén ki tudja nyerni és hasznosítani. Előfordul azonban, hogy valamilyen külső behatás (például környezetszennyezés, ipari munkavégzés) miatt kerül kapcsolatba nagymennyiségű mérgező vagy könnyen nem ürülő, akár létfontosságú fémmel. Ekkor akut, majd később idült mérgezés kialakulásával kell számolni.

A fémionok élő szervezetekben betöltött szerepe nagyrészt metalloenzimekhez és metalloproteinekhez köthető, oly módon, hogy azokban vagy szerkezetalkító vagy redox aktív szerepet töltenek be. Általánosan igaz, hogy a fémionok a poli- és oligopeptidekhez azok oldalláncain keresztül képesek kötődni, amelyben leggyakrabban karboxilát-, imidazolil- és tiolátcsoportok érintettek.

Az emberi agy egy erősen összetett, komplex rendszer, amelyben a fémionok kiegyensúlyozott koncentráció-eloszlása meghatározó annak zavartalan működése szempontjából. Ha a fehérjék egészséges működésében, ezáltal a fémionok homeosztázisában valamilyen zavar lép fel, akkor neurodegeneráció alakulhat ki az ún. aggregátumok képződése miatt, amelyek különböző fémionokat tartalmaznak. Az idegrendszer egymással összefüggő, finom egyensúlyban lévő folyamatainak megbomlása az idegsejtek fokozatos elhalását, ezzel párhuzamosan a betegek szellemi és/vagy fizikális leépülését okozza.

A Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport már évtizedek óta foglalkozik különböző ligandumok fémkomplexeivel. A tanulmányozott ligandumok egyik nagy

csoportját azon hisztidin-tartalmú peptidek képezik, amelyek különféle neurodegeneratív betegségek kialakulásáért felelős fehérjék vagy oligopeptidek különböző tagszámú fragmensei. A vizsgálatok elsősorban Cu(II)-ionnal történnek, azonban a szerkezetmeghatározást segítő a Ni(II)-komplexek vizsgálata is folyik. Egy másik nagy ligandum csoport a cisztein-tartalmú peptidek, amelyek révén a ciszteint, és más koordinálódó oldalláncot is, tartalmazó peptidek fémion szelektivitását befolyásoló tényezők felderíthetők. A munka során a Ni(II)-ion tanulmányozása mellett hangsúlyt kap a Cd(II)- és Zn(II)-komplexek vizsgálata is. Ezen ligandumcsaládok mellett csoportunk a gyengén koordinálódó oldalláncú aminosavakat (például aszparaginsavat és glutaminsavat) tartalmazó peptidek különféle fémkomplexeit is kiterjedten analizálja, annak megállapítására, hogy az aminosavak helye és száma milyen hatással van a képződő komplexek szerkezetére és stabilitására.

PhD munkám során ezekben a kutatásokba kapcsolódtam be. A célkitűzéseimet az alábbi pontokban mutatom be:

➤ A kutatók az elmúlt időszakban kis hangsúlyt fektettek arra, hogy a gyengén koordinálódó oldalláncok hogyan befolyásolják a különböző átmenetifém-komplexek stabilitását és összetételét, ezért csoportunk a közelmúltban aszparaginsavat és glutaminsavat tartalmazó kistagszámú peptidek Fe(II)-, Co(II)-, Zn(II)-, Cu(II)- és Ni(II)-komplexeinek oldategyensúlyi viselkedését széleskörűen tanulmányozta. A kapott eredmények teljessé tétele szükségessé tette a Cd(II)-ion komplexeinek tanulmányozását is, így munkám során célul tűztem ki több aszparaginsav és/vagy glutaminsav-tartalmú peptid Cd(II)-kötő képességének és esetlegesen a Cd(II)-ion felé mutatott szelektivitásának tanulmányozását.

➤ A természetben több olyan oligopeptid is előfordul – például cink-ujj fehérjék – amelyek ciszteint tartalmaznak és nem csak természetes, hanem toxikus fémionok megkötésére képesek. Emiatt az irodalomban már több olyan publikáció is megjelent, amely különböző fehérje modell peptidek vizsgálatával foglalkozik. Viszont nem mindegyik fémion komplexének tanulmányozása történt meg, ezért célom volt egy, illetve két ciszteint tartalmazó kistagszámú peptidek szisztematikus vizsgálata, amelyek segíthetnek a nagyobb tagszámú peptidek oldategyensúlyi viselkedésének

értelmezésében. Kutatásaim során azt vizsgáltuk, hogy a ciszteinek száma és pozíciója a peptidek szekvenciájában hogyan befolyásolja azok Cd(II)- és Zn(II)-komplexeinek összetételét és stabilitását. Az eredményeket a Ni(II)-ion tanulmányozásával tettük teljessé.

➤ Az amiloid- β peptid részletes tanulmányozása csoportunkban korábban már megtörtént, viszont az Alzheimer-kór lefolyásában szintén részt vevő tau molekulával vagy fragmenseivel még nem történtek vizsgálatok, ezért a kutatócsoportunk ezen fehérje különböző, hisztidint tartalmazó kötőhelyeinek a szisztematikus vizsgálatát kezdte el. PhD munkám részeként az N-terminális régióban megtalálható 14. és 32. számú hisztidint (His14 és His32) és azok környezetét tartalmazó fragmensek és mutánsaik vizsgálatát tűztem ki célul elsősorban Cu(II)-ion jelenlétében. A Ni(II)-ion segíthet utóbb említett részecskék koordinációs kémiai viselkedésének értelmezésében, így néhány esetben a Ni(II)-komplexeket is tanulmányoztam.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A vizsgált fémionok jellemzése

2.1.1. A kadmium élettani hatása és koordinációs kémiája

A kadmiumot Göttingenben a cinkászványok kísérőjeként Friedrich Stromeyer fedezte fel [1]. A kadmium egy ezüst-fehér színű, közepes sűrűségű ($8,7 \text{ g/cm}^3$) fém, amely jó elektromos vezetőképességének, jó korrózióállóságának és alacsony olvadáspontjának köszönhetően jó ipari alapanyag, így használata széleskörben elterjedt. Alkalmazása sokrétű, nagy mennyiségben az újratölthető Ni-Cd elemek gyártásánál használják fel az anód alapanyagaként. Kisebb mennyiségben hasznosítják, mint színező és festőanyag, bevonat képző és műanyagstabilizátor. Nem elhanyagolható mennyiségben található meg a foszfor műtrágyákban [2].

A kadmium az élő szervezetekben semmilyen alapvető biológiai funkciót nem lát el, vagyis annak normális működés során a fémion nincs jelen. Az élőlényekre gyakorolt hatása alapján mérgező fémion, azonban méretéből és kémiai tulajdonságaiból kifolyólag képes felhalmozódni a mikroorganizmusokban [3], a növényi [4] és állati szervezetekben [5], akár oly módon, hogy annak külső jele nem mutatkozik. Ez volt az oka a második világháború alatt és után, 1955-ben felismert, krónikus kadmium mérgezésnek, amelyet Itai-itai kórnak neveznek. Az eset a Jinzu folyónál, Toyama tartományban, Japánban történt, ahol a Kamioka bányánál folyó munkálatok során keletkező szennyvizet 40 éven át a folyóba engedték, amelyben ezáltal fémek, főleg nehézfémek – ólom, kadmium, cink – dúsultak fel. Az öntözés révén feldúsultak magában a termőföldben, a zöldségekben és a rizsben is. A kadmium(II)ion méretéből adódóan képes a kalcium(II)ion helyettesítésére, ami csontlágylást okoz. Ez a jelenség azoknál a középkorú nőknél volt a legsúlyosabb, akik legalább 30 évet éltek a szennyezett területen és több gyermeket is vállaltak. A fémion legnagyobb mennyiségben a vizeletben, a vérben, a vesében volt kimutatható, de a többi szervben is akkumulálódott [6]. A szervezetből a kadmium kiürülése több, mint tíz évet is igénybe vehet [7].

A fémion felszívódását követően elsősorban albuminnal és transzferinnel szállítódik a májba, ahol detoxifikálását a legnagyobb hányadban a metallothioneinek (továbbiakban MT) végzik. A Cd-MT komplexek a véráram révén a vesékbe jutnak,

ahol a kéregben raktározódnak [8]. A MT ciszteinben gazdag kismolekulák, amelyek a fémion megkötését különböző klaszterek [9] létrehozásával végzik. A MT több funkciót is ellátanak a szervezetben, ugyanis közreműködnek a fémionok felvételében és leadásában, valamint azok kicserélődésében és szállításában. Redox aktív viselkedést mutatnak, ami a reaktív oxigéngyökök semlegesítésében, valamint a sejtek redoxiállapotának szabályozásában mutatkozik meg [10]. A fémionok a $Hg > Cu > Cd > Zn$ sorrendben csökkenő affinitást mutatnak a MT felé [11]. A fehérjékhez koordinált Zn(II)- és Cd(II)-ionok képesek indukálni azok keletkezését, amivel ezek a multicisztein-tartalmú molekulák a szervezet védekező mechanizmusához járulnak hozzá [12]. A MT szekvenciája több, mint 30% ciszteint tartalmaz a CXC, CXXC, CXCC, CCXXC és CXXCXC szekvenciák formájában [13-15].

A kadmium a periódusos rendszer II.B csoportjába tartozik és 0, +1, +2 oxidációs állapotokban fordulhat elő, amelyek közül a +2 a leggyakoribb. Lágyabb (soft) tulajdonságú Lewis sav, mint a cink, de kevésbé, mint a higany, ezért a S-donoratomot tartalmazó ligandumokat előnyben részesíti az N- és O-donorúakkal szemben. Meg kell azonban jegyezni, hogy utóbbiakkal is képződnek komplex vegyületek, azonban azok kevésbé stabilisak.

Koordinációs száma 2 és 6 között változik [16], azaz lineáris, tetraédes és oktaédes geometria egyaránt előfordulhat. Nem tudunk kitüntetett geometriát megkülönböztetni, ami a d^{10} elektronszerkezettel magyarázható, ugyanis ebben az esetben nem lép fel kristálytér-stabilizációs energia.

2.1.2. A nikkél élettani hatása és koordinációs kémiája

A nikkél az emberi és állati szervezetek számára nem létfontosságú, annak biológiai funkcióját ezen élőlényekben még nem azonosították. A fémet jó megmunkálhatósága, korrózióállósága, fémes fénye és jutányos ára tette vonzóvá az ipar számára [17]. Az ember leggyakrabban érmék, ékszerek és ötvözetek révén kerül vele érintkezésbe, és az emberi populáció több mint 30%-ánál – nagyobb részt nőknél – akár súlyos allergiás reakció is felléphet [18]. Rákos megbetegedésekkel – tüdő-, arc- és orrüregrák – szintén összefüggésbe hozható a fém, amelyet iparban dolgozó munkásoknál figyeltek meg [19]. A Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség (IARC),

több független szerző vizsgálati eredményei alapján, a nikkelt és vegyületeit, az emberi és állati szervezetekre gyakorolt hatásaik alapján, az általa létrehozott kategóriarendszer első csoportjába sorolta, mert elegendő bizonyíték áll rendelkezésre arról, hogy rákkeltő tulajdonságúak [20].

A növények [21] és mikroorganizmusok a Ni(II)-iont beépítették anyagcsere-folyamataikba, olyan fontos enzimek alkotójaként, mint az ureáz és a hidrogenáz. Előbbi a $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} = [\text{NH}_2-\text{COOH}] + \text{H}_2\text{O} = 2 \text{NH}_3 + \text{CO}_2$, míg utóbbi a $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$ folyamatot katalizálja, amely reakciók létfontosságúak több mikroorganizmus, így a *Helicobacter pylori* számára is, egyrészt, mert a gyomor savas pH-ját az ureáz csökkenti, mivel hidrolitikus tevékenysége révén ammóniát állít elő, másrészt a [NiFe] hidrogenáz lehetővé teszi a légzésen alapuló energia előállítását a baktérium számára a mukózában [22].

Emellett az oxidatív stressz elleni védelemben a szuperoxid-dizmutáz enzimsaládnak nem csak a Cu(II)-, Zn(II)-, Mn(II)-, hanem a Ni(II)-tartalmú tagjai is részt vesznek [23].

A nikkelt oxidációs száma komplex vegyületeiben 0 és +4 között változik, azonban elemorganikus vegyületekben a viszontkoordináció miatt negatív oxidációs állapot is előfordul. A d^8 elektronszerkezetnek köszönhetően a +2-es a leggyakoribb oxidációs szám, és a Ni(II)-komplex vegyületeiben az oktaéderes, tetraéderes és síknégyzetes geometria is megvalósulhat attól függően, hogy milyen a ligandum szimmetriája és a kristálytér felhasadás mértéke. Síknégyzetes geometriájú komplexek képződése akkor kedvező, ha a ligandumtér kis szimmetria besorolású és kellően nagy az energiája. A mágneses tulajdonságok tekintetében: az oktaéderes komplexek paramágneses, a síknégyzetesek pedig diamágnes tulajdonságúak [24,25]. Tetraéderes geometriájú komplexek kisebb számban ismertek [26]. Ez köztes geometriaként is felfogható a síknégyzetes és oktaéderes geometria között, hiszen a kristálytér-stabilizációs energia értéke $8 Dq$, és általában olyan ligandumokkal keletkeznek, ahol vagy energetikai, vagy szterikus ok miatt a fémion d elektronjainak spinpárosodása nem válik lehetővé [27].

2.1.3. A réz élettani hatása és koordinációs kémiája [28, 29]

A réz harmadlagos biogén elem a kobalt, szelén, mangán, cink, molibdén és jódelemekkel együtt. Egy átlagos testsúlyú ember körülbelül 80-120 mg-ot tartalmaz belőle, és mennyiségét az átmenetifémek tekintetében csak a vas és a cink haladja meg. A biológiai rendszerekben sosem szabad formában, hanem leggyakrabban fehérjék hisztidin, cisztein vagy metionin oldalláncokhoz kötődve található. A bélben történik a felszívódása, ezután a szállítását az albumin és ceruloplazmin, míg a tárolását a metallothioneinek végzik. A réz metalloenzimek alkotója, amelyek redoxi folyamatok katalízisében vesznek részt (CuZn-SOD, oxidázok, oxigenázok, elektronszállító-fehérjék).

A réz-tartalmú fehérjék három típusba sorolhatók a fémion oxidációs állapota, a komplexek geometriája és a donortomok minősége alapján:

Az *I. típusú* vagy „*kék rézfehérjék*” olyan fehérjék, amelyek egyetlen rézatomot tartalmaznak, egy erősen torzult geometriában, ahol a fémion megkötésében 2 N- és 2 S-donortom vesz részt. Ez az állapot egy átmenet a réz(II)ionra jellemző síknégyszetes és a réz(I)ionra jellemző tetraédes állapot között. Ezt a fehérje típust intenzív kék szín jellemzi, amely egy 600 nm körüli igen nagy intenzitású ($\epsilon = 3000\text{--}5000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) S \rightarrow Cu(II) töltésátviteli sáv eredménye. Továbbá a szokásostól eltérő ESR-paraméterek jellemzik a csoportot. Ide sorolhatjuk például a plasztocianinokat, amelyek a fotoszintézis során működő elektronszállító fehérjék.

A *II. típusú* vagy „*nemkék rézfehérjék*” monomer réz(II)iont tartalmazó komplexei tetragonálisan torzult oktaédes geometriával rendelkeznek, és széles abszorpciós sávval, valamint ESR-aktivitással jellemezhetők. Ebbe a csoportba tartoznak például a szuperoxid-dizmutáz enzimek, amelyek feladata a szuperoxid gyökönion semlegesítése a diszproporció katalízise révén. Az eukarióta sejtekben található CuZn-SOD szerkezetében a Zn(II) az aktív hely konformációjának kialakításában vesz részt, míg a Cu(II)-ion oxidációs számának megváltoztatásával a katalízist bonyolítja le ($\bullet\text{O}_2^- \rightarrow \text{O}_2^{2-}$). A két fémiont egy hisztidin imidazolato-hídja köti össze.

A *III. típusú* vagy „*ESR-inaktív fehérjék*” általában több fémcentrumot tartalmaznak, és a Cu(I)-ionok jelenléte, és/vagy a Cu(II)-ionok közötti erős antiferromágneses kölcsönhatása miatt ESR-inaktivitás jellemző rájuk. Ilyen fehérje például a

hemocianin, amely a puhatestűek és alacsonyabb rendű tengeri élőlények szervezetében az oxigént szállító fehérje. Az oxigén kötődése során egy $[\text{Cu(II)-O}_2^{2-}\text{-Cu(II)}]$ peroxo kötésmódú komplex jön létre, ami kevésbé stabilis, mint a hemoglobinban képződő Fe(III)-O_2^- komplex, miáltal a hemocianin kevésbé hatékony oxigénszállító makromolekula.

Koordinációs kémiai aspektusból a fém esetében három oxidációs állapot ismert: a +1, +2 és +3, amelyek közül a +2 állapokra vonatkozó tudásanyag a legkiterjedtebb. A réz(I)ion d^{10} elektronkonfigurációjú, ebből fakadóan komplexei színtelenek és diamágneses tulajdonságúak. A koordinációs száma kettő vagy négy, így a vegyületekben a lineáris és tetraédes geometria kedvezményezett. Lágú (soft) karakterű, emiatt nagy affinitást mutat a S-donoratomot tartalmazó molekulák felé. A +2-es oxidációs állapotú réz(II)ion d^9 elektronkonfigurációjú, komplexei színesek, paramágnesesek. A koordinációs szám vegyületeiben általában négy, öt vagy hat, ugyanakkor a szabályos geometriájú vegyületei ritkák és sokszor nehéz különbséget tenni a síknégyzetes és tetragonálisan torzult oktaédes szerkezetek között. Ennek oka a Jahn-Teller effektus, ami az E_g pályák nem egyenlő feltöltöttségéből fakad. Középső (borderline) típusú fémion, ezért az S-, N- illetve O-donorokkal egyaránt stabilizálhatók. A réz(III)ion elektronkonfigurációja d^8 , így a Ni(II)-ionhoz hasonlóan síknégyzetes geometriájú, kis spinszámú és diamágneses komplexeket képez. Az ilyen vegyületek könnyen redukálódnak, azonban egyes biológiai elektronszállító folyamatokban feltételezett szerepük miatt számos réz(III)-peptid-komplexet tanulmányoztak [30,31].

2.1.4. A cink élettani hatása és koordinációs kémiája [32, 33]

A cink harmadlagos biogén elem, ami az emberi szervezetben előforduló második leggyakoribb nyomelem a maga körülbelül 2 g-os mennyiségével. Nem vegyértékváltó fém, ami azt jelenti, hogy nem vesz részt redoxi folyamatokban, ugyanakkor sav-bázis reakciókban igen, továbbá az enzimek aktív szerkezetének kialakításához is hozzájárul. Az elsőként felismert cink-tartalmú enzim a szénsav-anhidráz volt, ami a széndioxid és víz közötti egyensúlyi reakciót katalizálja. A Zn(II)-ionok elrendeződése tetraédes és a fémiont három hisztidin imidazol nitrogén

atomja, továbbá a katalitikus ciklusban szereplő vízmolekula koordinálja. Szintén a térszerkezet kialakításában vesz részt a cink-ujj fehérjékben, amelyek transzkripciós faktorok. A fémiont bennük minden ismétlődő egység 2-2 ciszteinje és hisztidinje koordinálja az oldalláncaikon keresztül, létrehozva egy 12-15 aminosavból álló hurkot, amely a DNS nagyárcában kötődik meg.

A cink(II)ion komplexei színtelenek és diamágnesesek, ami a kadmiumhoz hasonló, d^{10} elektronszerkezet következménye. A fémion hidrolízis hajlama nagy, ezért oldata savas közegben tartható el, ugyanakkor tiolát-donorokkal stabilizálható. Peptidekkel közepes termodinamikai stabilitású komplexei ismertek, melyek stabilitása a Co(II)-komplexeivel összemérhető. A koordinációs szám komplex vegyületeiben leggyakrabban 4 vagy 6, azaz a tetraéderes és oktaéderes geometria kedvező, a ligandumok minőségétől függően.

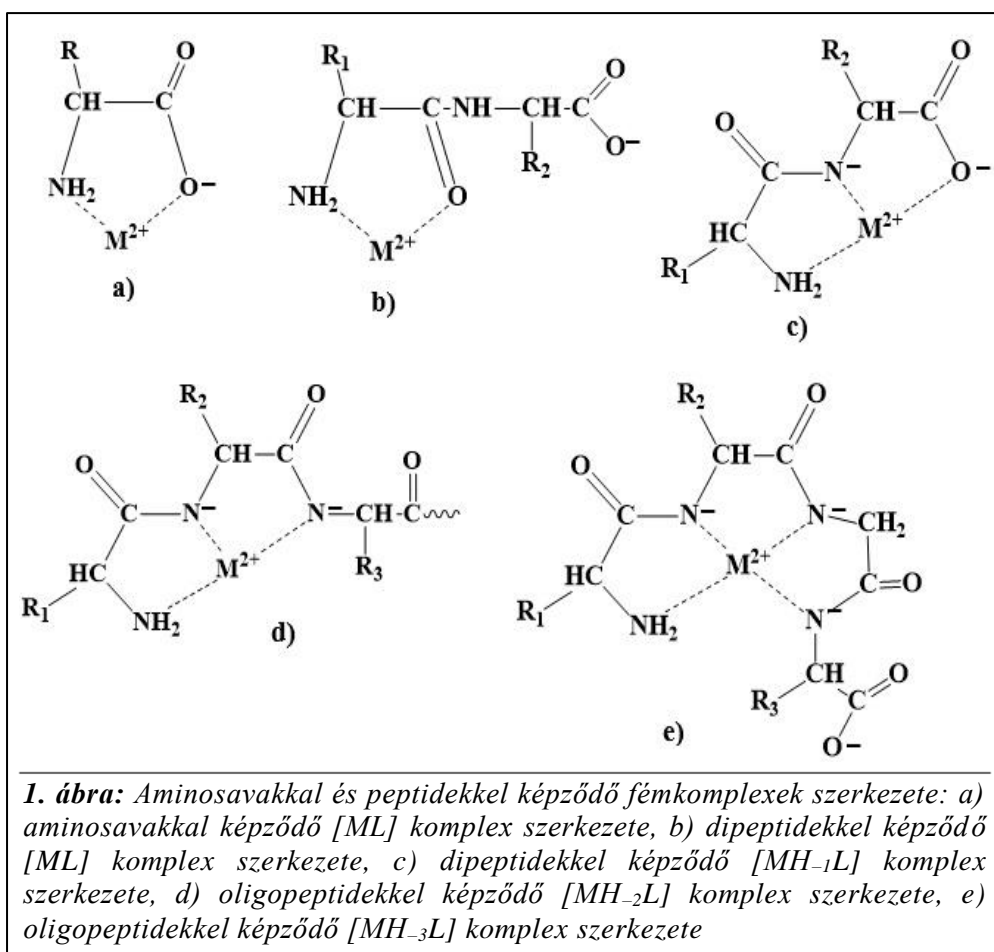
Nehezen lehet donoratom preferenciát felállítani, de a peptidek esetén ez a sorrend $S > N > O$ irányban csökken, ami azt jelenti, hogy a leggyakrabban tiolát- S^- , imidazol-N és terminális aminocsoportokhoz kötődik. Nem koordinálódó oldalláncok esetén a Zn(II)-ion nem képes elősegíteni a peptid-NH deprotonálódását és koordinációját, amely a kristálytér-stabilizációs energia hiányával, és az említett nagy hidrolízis hajlammal értelmezhető [34]. His horgony esetén, például a GlyHis ligandumnál, azonban tapasztalták peptid- N^- csoport koordinációját [NH_2, N^-, N_{Im}] kötésmódot eredményezve [35].

2.2. Peptidek komplexképző sajátosságai

A peptidek fémionokkal alkotott komplexeinek vizsgálatával számos kutatócsoport foglalkozik. A témában több irodalmi közlemény csakúgy, mint összefoglaló is fellelhető [36-41].

A peptidek α -aminosavakból épülnek fel, ezért ezek koordinációs kémiai viselkedésével is érdemes foglalkozni röviden. Ezek a molekulák minden esetben tartalmaznak egy terminális aminocsoportot és egy terminális karboxilcsoportot, valamint a minőségüktől függően az oldalláncban egy másik funkciós csoportot. A terminális csoportok képesek több fémion stabilis megkötésére, ami a keláteffektusnak – 5 tagú kelátgyűrű kialakulásának – köszönhető, és a létrejövő

koordinációs módot aminosavszerű koordinációnak nevezzük. Ha az oldalláncban olyan donorcsoport található, amely képes a fémion megkötésére, akkor annak koordinációja befolyásolhatja a komplexek szerkezetét és stabilitását [42]. Az oldalláncok minősége alapján megkülönböztetünk nem, gyengén vagy erősen koordinálódó oldalláncbéli donorcsoportokat. Ilyen csoporttal rendelkeznek például, rendre az alanin (metilcsoport), az aszparaginsav/glutaminsav (karboxilcsoport), illetve a cisztein (tiolcsoport) és hisztidin (imidazol-N). A fehérjék kötőhelyeit és azok környezetét nem az aminosavak, hanem a(z) (oligo)peptidek modellezik jobban, ezért a továbbiakban ezek koordinációs sajátosságait mutatom be.



A peptidek az aminosavak kondenzációjával keletkeznek, amid- vagy peptidkötés létrejötté közben, emiatt a terminális csoportok távolabb kerülnek egymástól, mint az aminosavban voltak, így nem lehetnek ugyanannak a kelátgyűrűnek a tagjai. Egy

peptid szerkezetében azt, hogy melyik – oldalláncbeli vagy terminális – csoport lesz az elsődleges kötőhely, azt a fémion minősége határozza meg. A peptidváz az aminosavaktól eltérően új potenciális donoratomokat tartalmaz, ezek a peptidkötésben található karboniloxigén, illetve a peptidnitrogén, amelyek részvételével szintén öttagú kelátgyűrű keletkezésére nyílik lehetőség. A karbonilcsoport részvételével (1. (b) ábra) keletkező komplexek stabilitása kisebb, mint az aminosavak $[\text{NH}_2, \text{COO}^-]$ (1. (a) ábra) koordinációs módú komplexei. A peptid-NH nagyon gyenge savként, valamint nagyon gyenge bázisként viselkedik, és a pK -értéke ~ 15 (GlyTyr 15,2 [43]), ami azt jelenti, hogy a mérhető, $2 < \text{pH} < 14$ pH-tartományban nem vesz részt sav-bázis folyamatokban. Ám néhány fémion (Cu(II), Ni(II), kiváltképpen Pd(II)) képesek ezt a pK -értéket lecsökkenteni (fémion indukálta peptidnitrogén deprotonálódás) abban az esetben, ha kelátképző helyzetben egy horgonycsoport, például terminális aminocsoport vagy tiolát- S^- található a molekulában. Dipeptid esetén ekkor $[\text{MH}_{-1}\text{L}]$ (1. (c) ábra) komplex képződik, amely $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{COO}^-]$ koordinációs móddal jön létre. Tri-, illetve oligopeptidek esetén a peptidnitrogének deprotonálódásával és koordinációjával telítődhet a fémion koordinációs szférája $[\text{MH}_{-2}\text{L}]$ (1. (d) ábra) és $[\text{MH}_{-3}\text{L}]$ (1. (e) ábra) komplexek keletkezése közben. A folyamat hajtóereje az, hogy – leggyakrabban (5,5,5)-tagú – csatolt kelátrendszer [40] valósul meg. A Cu(II)-ion jelenlétében már pH 4-6 körül lejátszódhat egy vagy több peptidnitrogén deprotonálódása, ellentétben a Ni(II)-ionnal, ahol ez a folyamat gyengén lúgos közegben kezdődik el [44].

A koordinációs viszonyok szignifikáns módosulását okozza az erős, illetve gyenge oldalláncok jelenléte, minősége, illetve pozíciója a peptid szekvenciájában: a komplexek összetételének sokfélesége és termodinamikai stabilitása széles skálán változik. A következőkben a téma szempontjából releváns gyengén, illetve erősen koordinálódó donorcsoportokat tartalmazó, terminálisan szabad és védett peptidek koordinatív jellemzőit foglalom össze.

2.2.1. Aszparaginsavat tartalmazó peptidek jellemzése

Két α -aminosav, nevezetesen az aszparaginsav és glutaminsav karboxilát funkciós csoportot (β -, illetve γ -helyzetben) tartalmaz az oldalláncában. Általánosan

ismert tény, hogy az oldalláncbeli donorcsoport akkor fejt ki legnagyobb mértékben hatását a komplexképződési folyamatokra, ha az a terminális aminocsoportoz közel, azaz az első, második vagy harmadik pozícióban található, és a donatorom az amino- és/vagy peptidnitrogénekhez képest kelátképző helyzetben van. A β -karboxilát oldallánc koordinációja hattagú, míg a γ -karboxiláté héttagú kelátgyűrű létrejöttéhez vezet. A kelátgyűrűk tagszáma erősen befolyásolja azok stabilitását: a legkedvezőbb az öttagú gyűrű kialakulása, a tagszám növekedésével párhuzamosan a stabilitás csökken. Emiatt érdemes áttekinteni az első, második és harmadik helyen aszparaginsavat tartalmazó peptidek koordinációs módjait [45,46].

Az első helyen aszparaginsavat tartalmazó peptidek a Cu(II)-, Ni(II)-, Cd(II)-, Zn(II)- és Pb(II)-ionokat ún. β -alanin-szerű (1. (a) ábra) koordinációval kötik meg. Ez a koordináció ligandumfelesleg esetén biszkomplexek keletkezését teszi lehetővé. A pH növelésével az ilyen ligandumok peptid-NH donorjai deprotonálódnak és koordinálódnak a fémionhoz és telítik a koordinációs szféráját, ha a fémion ezt indukálni képes, valamint elegendő donor áll rendelkezésre.

A második és harmadik helyen Asp-tartalmú peptidek esetében egy jelentősebb hatás figyelhető meg: az $[\text{NH}_2, \beta\text{-COO}^-]$ koordinációs mód kialakulása után az N-terminális csoportot követő első, illetve az első és második peptid-NH deprotonálódása és koordinációja kedvezményezetté válik, $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-]$, illetve $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \beta\text{-COO}^-]$ koordinációs mód jön létre, és ez az aszparaginsavat követő további peptid-N⁻ csoportok koordinációját a nagyobb pH-tartomány felé tolja el. Ez a gátló hatás a legszembetűnőbb a legalább négy tagú, harmadik helyen aszparaginsavat tartalmazó és N-terminálisan szabad peptidek esetében, ahol a harmadik peptid-N⁻ koordinációja csak pH 11 felett valósul meg (1. (e) ábra).

A kutatócsoportunk kiterjedten vizsgálta több aszparaginsavat és glutaminsavat tartalmazó molekulák (AspAsp, AspAspAsp, AspAspAspAsp) koordinációs sajátosságait Cu(II) és Ni(II) jelenlétében [47,48]. A tanulmányok alapján a több oldalláncbeli donorcsoport hatása nagymértékben érvényre jut. A fentebb bemutatott koordinációs módok alakulnak ki, azonban a nem kötött karboxilátcsoportok a peptid háromfogú koordinációját eredményezik a [NiL] vegyületekben, miközben azok gyenge axiális kölcsönhatása valószínűsíthető a [CuL]

komplexekben, ami a komplexek stabilitásnövekedését eredményezi. Ez a koordináció egyre kedvezményezettebbé válik az aszparaginsavak növekvő számával. A peptid oldalláncok számának növekedésével a komplexek negatív töltése is nő, ami miatt az AspAspAspAsp peptidnél a tetraglicin-szerű koordináció létrejötte nagyobb mértékben gátolt, mint az XaaYaaAsp szekvenciát magában foglaló tetra- és attól nagyobb tagszámú ligandumok esetén.

A glutaminsavat első, második vagy harmadik helyen tartalmazó peptidekben a karboxilátcsoportok kis mértékben növelik a keletkező komplexek stabilitását, ám összehasonlítva a megfelelő aszparaginsav komplexekével, hatásuk kevésbé jelentős. A nagy negatív töltésű komplexek kialakulása ugyanakkor jelentős mértékben akadályozza a peptidnitrogének deprotonálódását.

Az Cd(II)-ion és az aszparaginsav kölcsönhatásba lép egymással, [CdL] és [CdL₂] komplexek keletkeznek, ahol előbbi stabilitása az aminosavszerű koordinációhoz (1. (a) ábra) képest kismértékben megnövekedett, aminek oka az oldallánc stabilizáló hatása (tridentát kötődés kialakulása) [49].

Kadmium(II)komplexek képződnek peptidekkel is, amelyek analízisének eredményeként fény derült arra, hogy a karboxilátcsoport nagyobb mértékű stabilizáló hatást fejt ki, mint például az alkoholos karakterű hidroxil funkciós csoportok [50]. A GlyGlu peptid vizsgálata során kapott eredmények azt mutatták, hogy a képződő [CdL] komplex stabilitása a GlyGly megfelelő komplexéhez képest nagyobb [51]. Ha N-terminális pozícióban Asp aminosav található, akkor az [NH₂,COO⁻] hattagú kelát kialakulása szintén stabilitásnövekedést okoz (például DDNKI) [52], szemben a GlyAsp [53] peptid megfelelő komplexével.

2.2.2. Ciszteint tartalmazó peptidek jellemzése

A cisztein aminosav tiolátcsoportja megfelelő horgonycsoport több fémion számára is, azonban rendkívül szelektív [54,55]: gyengébb kölcsönhatás alakul ki a kemény (hard) donorokkal, míg a lágy (soft) karakterűekkel pedig ettől jóval erősebb, kovalens jellegű. Az aminosav száma és pozíciója szintén befolyásolja a keletkező komplexek sokféleségét, amelyet a tioláthidas szerkezetek megjelenése színesít [56]. Több vegyértékváltó fémionnal, például Cu(II)ionnal [57] is redoxireakcióba lép és

különböző diszulfidhidas szerkezetű molekulák jönnek létre, valamint a fémion redukciója következik be.

Az első vizsgálatok a terminálisan szabad két, illetve három aminosavból álló peptidek vizsgálatával kezdődtek, amelyek rávilágítottak arra, hogy amennyiben N-terminális helyzetben Cys aminosav található, akkor $[\text{NH}_2, \text{S}^-]$ koordinációs mód valósul meg, és Zn(II), Cd(II), valamint Ni(II)-ionok esetén is stabilis $[\text{ML}]$, illetve $[\text{ML}_2]$ összetételű komplexek képződnek. Ez a koordináció akadályozza a peptidvázban található donorcsoport(ok) deprotonálódását és koordinációját a fémionokhoz. Továbbá fény derült arra is, hogy a tiolátkén-atom hídként is kötődhet a fémionokhoz, ami többmagvú komplexek kialakulását eredményezi, főképp ligandumfelesleg alkalmazása mellett.

Amennyiben második vagy harmadik pozícióban van cisztein aminosav a peptid szekvenciáján belül, abban az esetben különbséget kell tenni aközött, hogy a fémion képes-e indukálni a peptidnitrogének deprotonálódását és koordinációját vagy sem. Így például a Cd(II) és a Zn(II) általában nem képes elősegíteni az utóbb említett folyamatot, és a C-terminális cisztein, valamint a terminális $-\text{COO}^-$ -csoport köti meg a fémionokat, hatta gyú kelátgyűrűt létrehozva. Ugyanakkor a Ni(II)-ion elősegíti a peptid-NH csoport(ok) deprotonálódást és koordinációját úgy, hogy $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-]$ és $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-]$ koordinálta részecskék keletkeznek. Polinukleáris komplex az $[\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-]$ kötésmódnál is létrejöhet a szabadon maradó koordinációs hely megléte miatt [40,58].

A peptidszintézis és a spektroszkópiai módszerek korszerűbbé válásával újbóli vizsgálatok kezdődtek meg, amelyek már a terminálisan védett, különböző számban és helyzetben ciszteint tartalmazó peptidek előállítására és analízisre irányultak. A tanulmányok középpontjában a MT fémionmegkötőképességének és a *Helicobacter pylori* baktérium Ni(II) háztartásának fenntartásához szükséges enzimek vizsgálata áll, amelyek eredményeit foglalja össze röviden a következő néhány bekezdés – kiegészítve a MerR fehérjecsaldó egyes tagjainak fémionkötőhelyét modellező peptidjeinek analízise révén kapott új ismeretekkel.

A nikkal sápon fehérjék Cys és His gazdag fehérjék, amelyek fémionmegkötőképességét már átfogóan tanulmányozták. A legújabb, a *Helicobacter*

pylori baktérium Hpn (hisztidin gazdag fehérje, amely affinitása nagy a Ni(II)-ion felé [59]) és HspA (hősokk fehérje) fehérjével összefüggő vizsgálatokból levont következtetések alapján a CC motívumot tartalmazó peptidek (Ac-CCSTSDSHHQ-NH₂, Ac-EEGCCHGHHE-NH₂, Ac-GSCCHTGNHD-NH₂, Ac-ACCHDHKKH-NH₂) a nikkel(II)iont hatékonyan kötik meg a ciszteinek jelenlétének köszönhetően – [2S⁻,N⁻] donor-szett alakul ki. A keletkező komplexek stabilisabbak, mint a Zn(II)-ionnal képzettek még akkor is, ha a ligandum His-t is tartalmaz a szekvenciájában [60,61].

K. Kulon és munkatársai CXC motívumot tartalmazó, az acetyl-coenzim A szintáz A kleszterét és a MT-3 fehérjét modellező molekulák (Ac-CGC-NH₂, Ac-CHCH-NH₂) cink(II)-, nikkel(II)- és kadmium(II)komplexeinek analízisét végezték el és arra a következtetésre jutottak, hogy az elsődleges kötőhely a fémionok számára a ciszteinek oldallánca és minden esetben döntően [ML₂] komplex keletkezik, amelyben [4S⁻] koordinációs mód valósul meg. A Ni(II)-ion esetén nagy pH-n a koordinációban a peptid-N⁻-ek is részt vesznek: [2S⁻,2N⁻]. [62]

H. Kozłowski és kutatócsoportja a CXXC szekvencia hatását kutatta a fentebb említett fémionok komplexképződési folyamataira az Ac-GCASCDCRACKK-NH₂, Ac-GCASCDCRAAKK-NH₂ és Ac-GCASCDCNARAANK-NH₂ [63] peptidek, valamint a HypA (hidrogenáz érési faktor) Zn(II)-ionkötő árkának megfelelő fragmensén, Ac-ELECKDCSHVFKPNALDYGVCEKCHS-NH₂ [64], és annak mutánsain [65] keresztül. Megállapították, (i) hogy a fémionok kötőhelye a tiolátcsoport, valamint a Cd(II)-komplexek stabilitása nagyobb, mint a Zn(II)-ionoké, (ii) ellentétben a CC motívumot tartalmazó ligandumokkal a Zn(II)-komplexek stabilitása nagyobb, mint a Ni(II)-komplexé mind a négy szekvencia esetén, függetlenül attól, hogy a fémion megkötése hasonló donorcsoportok részvételével történik, (iii) illetve, hogy a CXXC motívumok közötti linkerek hossza és annak aminosav szekvenciája befolyásolja a képződő komplexek stabilitását.

A bakteriális sejtekben a fémionok homeosztázisát speciális fehérjék, például a MerR család tagjai tartják fent, amelyek nemcsak a létfontosságú, de a toxikus fémionok mennyiségét is szabályozni tudják [66]. Jancsó A. és munkatársai az említett családba tartozó fehérjék fémionkötő doménjeinek modell vegyületeit

állították elő, amelyek szekvenciája Ac-SCHGDQGSDCSI-NH₂ [67,68] és Ac-SCPGDQGSDCSI-NH₂ [69], valamint vizsgálták azok Zn(II)- és Cd(II)-ion kötő tulajdonságait. Az általuk levont következtetés alapján, a peptidben a két egymástól távol elhelyezkedő cisztein oldallánc a Cd(II)- és Zn(II)-ionokhoz egyidőben koordinálódik ([2S⁻]), és ezt a koordinációt az imidazolil-, illetve karboxilátcsoportok egészítik ki. A keletkező komplexek stabilitása közel akkora, mint azon peptidek esetében, ahol a szekvenciában CC, CXC vagy CXXC motívum található.

2.2.3. Hisztidint tartalmazó peptidek jellemzése

A védett N-terminális csoportot tartalmazó hisztidin-tartalmú peptidek komplexeinek vizsgálata szerteágazó, ám elsősorban a SOD enzim aktív centrumának modellezése, valamint a neurodegeneratív betegségek molekuláris hátterének felderítése céljából történik. Az egy hisztidint tartalmazó, védett ligandumok [70-73] vizsgálata során a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy a komplexképződés a savas pH-tartományban az imidazol koordinálta [CuL] komplex képződésével kezdődik. Dipeptidek esetén [CuL₂] komplexek is kialakulhatnak, amelyek akár csapadék formában ki is válhatnak az oldatból a kis oldékonyságuknak köszönhetően. A pH növelésével párhuzamosan a peptidvázbeli donortomok deprotonálódnak és koordinálódnak a Cu(II)-ionhoz. Ha a His N-terminális pozícióban található, akkor a C-terminális irányába eső peptid-N⁻ csoportok koordinálódnak (7,5,5)-tagú csatolt kelátrendszer létrehozva. Szintén ilyen kelátrendszer keletkezik abban az esetben is, amikor a His előtti pozícióban Pro [74] vagy szarkozin [75] található. Ha az N-terminálistól távolabbi helyzetben található a His akkor a stabilisabb (5,6)- és (5,5,6)-tagú csatolt kelátok jönnek létre és a peptidnitrogének koordinációja az N-terminális irányába történik.

Az egy, illetve két hisztidint tartalmazó védett peptidek esetében a különböző minőségű aminosavak befolyással vannak a komplexképződésre. A komplexképződés szempontjából a Lys, Asp és Glu aminosavak hatását vizsgálták. Az oldalláncban megjelenő negatív és pozitív töltések a keletkező komplexek bruttó töltését megváltoztatják, amely befolyásolja azok stabilitását. A Lys-tartalmú peptidek [76-79] tanulmányozása azt mutatta, hogy az oldalláncban jelen levő aminosav nem

vesz részt a komplexképződésben, és fiziológiás pH-értéken protonált formában létezik, azaz nem stabilizálja a keletkező makrokelátokat és az ösztöltés növelésével destabilizációt idézhet elő.

Az aszparaginsav vagy glutaminsav hatása a komplexek szerkezetére és stabilitására annak a függvénye, hogy milyen pozícióban van(nak) az adott komplexképző molekulán belül. Mind az α -Asp mind pedig a β -Asp növeli a két imidazol koordinálta Cu(II)-tartalmú részecskék stabilitását, azonban az α -Asp nagyobb mértékben [79,80]. A peptidlánc közbenső helyzeteiben lévő glutaminsav szintén hatással van a Cu(II)- és Zn(II)-komplexek stabilitására a keletkező részecskék között megvalósuló hidrogénkötési rendszer révén [81].

A monokomplexek nem képesek megakadályozni a peptid-NH csoportok deprotonálódását, ami a réz(II)ion esetén pH 5-6 felett, a nikkell(II)ion esetén pedig pH 8 felett játszódik le. A kialakuló koordinációs módot – $[N_{Im}, N^-, N^-, N_{Im}] / [N^-, N^-, N_{Im}]$, $[N^-, N^-, N^-, N_{Im}]$ – a hisztidinek száma és helyzete, továbbá a környező aminosavak minősége szignifikánsan befolyásolja. A karboxilátcsoportok képesek megnövelni az imidazol-koordinált részecskék stabilitását annyira, hogy a peptid-NH deprotonálódás kissé a lúgosabb pH-tartomány felé tolódik.

A di- és polinukleáris komplexek keletkezése akkor kedvezményezett, amikor egymástól távol található a His aminosavak.

A Creutzfeldt-Jakob, kergemarha- vagy surlókorban, illetve az Alzheimer-kór kialakulásában szerepet játszó prion, illetve amiloid- β molekulák módosulása egyaránt neurodegeneratív elváltozásokhoz vezet, és közös vonásuk, hogy His aminosavakat tartalmaznak. Kutatócsoportunkban széles körben folytak vizsgálatok mind a két molekula esetében.

Az amiloid- β egy olyan peptid, amely leggyakrabban 40 és 42 tagból áll, és három hisztidint tartalmaz, amelyek közül a 6. pozícióban lévő jól elkülönül a többitől (a másik kettő szomszédos pozícióban található (His13, His14)). Az N-terminális rész szabad aminocsoportja és poláris oldalláncú aminosavai révén jó réz(II)ion megkötő tulajdonságú. A kutatócsoportunk vizsgálta egy olyan mutáns ligandum fémion komplexeit, amelyben mindkét terminális csoport védett (Ac-DAEFRH-NH₂) és a hatodik pozícióban lévő His oldategyensúlyi viselkedéséről adott új információkat. A

levont következtetések alapján az [ML] (M = Cu(II), Ni(II)) összetelű komplexek makrokelát szerkezetűek, amelyek az Asp1, a Glu3 és a His6 oldalláncok részvételével keletkeznek. A peptidnitrogén donoratomok koordinálódásával a [CuH₂L] törzskomplex keletkezik nagy mennyiségben, ami már CD aktív tulajdonságú, és benne a koordináció a His6 oldalláncáról indul, [2N⁻,N_{im}] koordinációs mód alakul ki, amely a Ni(II)-ion esetében egy karboxilátsoporttal is kiegészül. Nagy pH-értéken egy újabb peptidváz donor koordinálódik ([3N⁻,N_{im}]). Ez a koordinációs mód a réz(II)ion esetében 8,2-es, míg a nikkell(II)ion esetén 11,4-es pH-n valósul meg [82,83].

A prion protein 10 His-t tartalmaz, ezek közül négy (H61, H69, H77, H85) az ún. oktarepeat és kettő (H96, H111) a neurotoxikus tartományban, további négy (H140, H155, H177, H187) pedig a C-terminális részen. A teljes fehérje szekvencia vizsgálata oldhatósági probléma miatt nem lehetséges, ezért annak fragmenseit tanulmányozták. Koordinációs kémiai szempontból kétféle hisztidint tartalmaznak, egyrészt olyat (H61, H69, H77, H85), amelyik a -PHGGGWGQ- szekvenciában található, és a megelőző peptidnitrogének deprotonálódása akadályozott, miáltal (7,5,5)-tagú kelátrendszer alakul ki Cu(II)- és Ni(II)-ion esetén az [MH₃L] komplexekben [84], másrészt olyat, amelyek esetén az N-terminális irányba lehetséges a koordináció és az előzőtől stabilisabb, (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer jön létre, ami az oktarepeat tartományon kívüli hisztidinekre jellemző (H96, H111) [85]. Csoportunkban analizálták a HuPrP(94-97) (Ac-GTH(96)S-NH₂) és HuPrP(109-112) (Ac-MKH(111)M-NH₂) ligandumokat, valamint a két kötőhelyet összekapcsoltan tartalmazó Ac-GTHSMKHM-NH₂ szekvenciájú [85] peptidet annak megállapítására, hogy mutat-e a Cu(II)- vagy a Ni(II)-ion preferenciát valamely fémionmegkötőhely felé. Következtéseik alapján a lizin oldallánc csak a képződő komplexek sztöchiometriáját változtatja meg, továbbá az Ac-GTHS-NH₂ 3N-es átmeneti komplexében a tioéter-S stabilizáló hatást mutat [86]. Ezen fragmens olyan pontmutációja, ahol a 109-es pozícióban található Met cseréje Ser aminosavra történik, szintén azt sugallja, hogy a 109-es helyzetű aminosavnak stabilizáló hatása lehet [87]. Az összetett szekvenciájú ligandum Cu(II)- és Ni(II)-ionnal alkotott rendszereiben a komplexképződés imidazol koordinálta részecskék keletkezésével

kezdődik, azután a réz(II)ion esetén először kettő, majd, a pH növelésével, három peptidnitrogén kötődik a fémionhoz az imidazolilcsoport(ok) mellett, míg a Ni(II)-ion esetén a peptidnitrogének egyetlen lépésben, kooperatíván, kötődnek a fémionhoz. A Cu(II)-ion a két kötőhely között összemérhető mennyiségben oszlik meg a [CuH₃L] komplexben, azaz nem mutat preferenciát egyik kötőhely felé sem, szemben a Ni(II)-ionnal, ami szinte kizárólag a -GTH(96)S- szekvenciához koordinálódik erősen lúgos pH-tartományban [85].

Az Alzheimer-kór lefolyása során nemcsak az amiloid- β molekula, hanem a tau fehérje szerkezeti megváltozása is megtörténik. Ez a fehérje szintén egy olyan polipeptid, amely szekvenciájában több hisztidin aminosav található, szám szerint 12, és több biokémiai, valamint szerkezeti kutatás középpontjában állt. Utóbbi vizsgálatok arra fókuszáltak, hogy hogyan kötődik a Cu(II)-ion a teljes fehérjéhez [88], illetve néhány abból származtatható ligandumhoz [89]. Dacára ennek, valamint annak a ténynek, hogy a tau N-terminális fragmentumainak koncentrációja az Alzheimer-kóros betegek agy-gerincvelői folyadékában emelkedett, gyakorlatilag nincs olyan koordinációs kémiai közlemény, amely ezen régió izolált vizsgálatával foglalkozik terminálisan védett peptidok felhasználása révén. A fenti tanulmányok így hozzájárulnak a tau fehérje szekvenciájában lévő ugyanilyen kötőhelyek és azok környezete koordinációs kémiai viselkedésének értelmezéséhez.

2.3. Neurodegeneratív megbetegedések áttekintése

A neurodegeneratív betegség kifejezés egy olyan gyűjtő fogalom, amely olyan betegségekre utal, ami az emberi agyban található idegsejteket érinti. A megbetegedésekben közös vonás az, hogy valamilyen jól meghatározott egészségesen működő fehérje egy, akár ismeretlen eredetű hatás folytán vagy egymást gerjesztő folyamatok következtében megváltoztatja konformációját, amelynek eredménye különböző aggregátumok, plakkok és kötegek megjelenése az agy szöveteiben. Ezen rendellenes formák jelenléte a szövetállomány pusztulását idézi elő, amely az érintett személy(ek) szellemi (demencia), valamint fizikális (ataxia) leépüléséhez vezet. A fehérje-szerkezetváltozások konkrét molekuláris háttere még nem ismert, ugyanakkor

feltételezhető az oxidatív stressz, valamint különböző fémionok szerepe a lejátszódó (bio)kémiai folyamatokban [90-92].

2.3.1. Az Alzheimer-kór kialakulásáért felelős tényezők

Alois Alzheimer német orvos 1907-ben írta le először a nevét viselő betegség, az Alzheimer-kór (továbbiakban AK) tüneteit. A kór egy olyan progresszív, neurodegeneratív elváltozás, amelyet a kezdeti, tünetmentes stádiumban a memóriazavarok és a kognitív képesség romlása jellemez. Ezek az idő előrehaladásával már kihatnak a viselkedésre, a beszédre, a térbeli tájékozódási képességre és a motoros funkciókra [93] egyaránt. Az esetek nagytöbbsége sporadikus (elszigetelten jelentkező, egyedi), amely idős korban fordul elő, ám a megbetegedések megközelítőleg 5%-a családi halmozódást mutat, így ez a forma már fiatal korban jelentkezhet az APP és γ -szekretáz komplex öröklött mutációja révén [94]. Az AK a demencia leggyakoribb formája és gyakran nem önmagában fordul elő, hanem valamilyen más betegség is kíséri [95]. További gyakori neurodegeneratív betegség a vaszkuláris demencia, Lewis-testes demencia, frontotemporális lobáris degeneráció, amelyek közül az első kettő gyakran az AK kísérői [96]. Jelenleg 47 millió regisztrált beteg van, akiket valamilyen formában érint a demencia, és a kezelésre szánt költségek 2018-tól kezdve elérik az egy trillió amerikai dollárt. Az évszázad közepéig az érintettek száma nőni fog, egyes becslések szerint 2050-re akár 131 millió ember szorulhat kezelésre, különösen az idősebb korosztály tagjai közül, mivelhogy az AK legnagyobb rizikófaktora az öregedés [97].

Makroszkópikus neuropatológiás szempontból az agy szöveti állománya hol megvastagodik hol pedig elvékonyodik az egészségeshez képest [98]. Mikroszkópikus nagyságrendben megfigyeltek a sejtek extracelluláris terében ún. amiloid plakkokat, az intracelluláris terében pedig ún. neurofibrilláris kötegeket (NFK), amelyek az Alzheimer-kór összes altípusa esetén fellelhetők. Ezek alkotói a felsorolás sorrendjében haladva: az amiloid- β ($A\beta$) molekula és a tau fehérje. Az említett lerakódások megjelenése megelőzi az agy szerkezeti változását, amihez hozzátartozik a hippokampusz sorvadása és a glükóz metabolizmus felborulása is [99].

Az AK egy olyan több tényezős, komplex betegség, amely visszafordítására vagy megelőzésére alkalmas gyógyszerek még csak kísérleti stádiumban vannak. Az agy egy erősen összetett szervünk – amelyet hűen reprodukáló állati modell szervezet eddig még nem ismert – továbbá az AK kutatását célzó tanulmányok elvégzéséhez szükséges eszközök sem minden esetben biztosítottak, emiatt a betegség ideje alatt végbemenő folyamatokat a kutatóknak és orvosoknak nagy részletességgel még nem sikerült feltárnia. A kémia és biológia területén elért eredmények alapján több hipotézis is született már a kór kialakulására vonatkozóan: amiloid-kaszád, tau, kolinerger hipotézis, glükóz hipometabolizmus, neuroinflammáció-hipotézis és oxidatív stressz hipotézis [100].

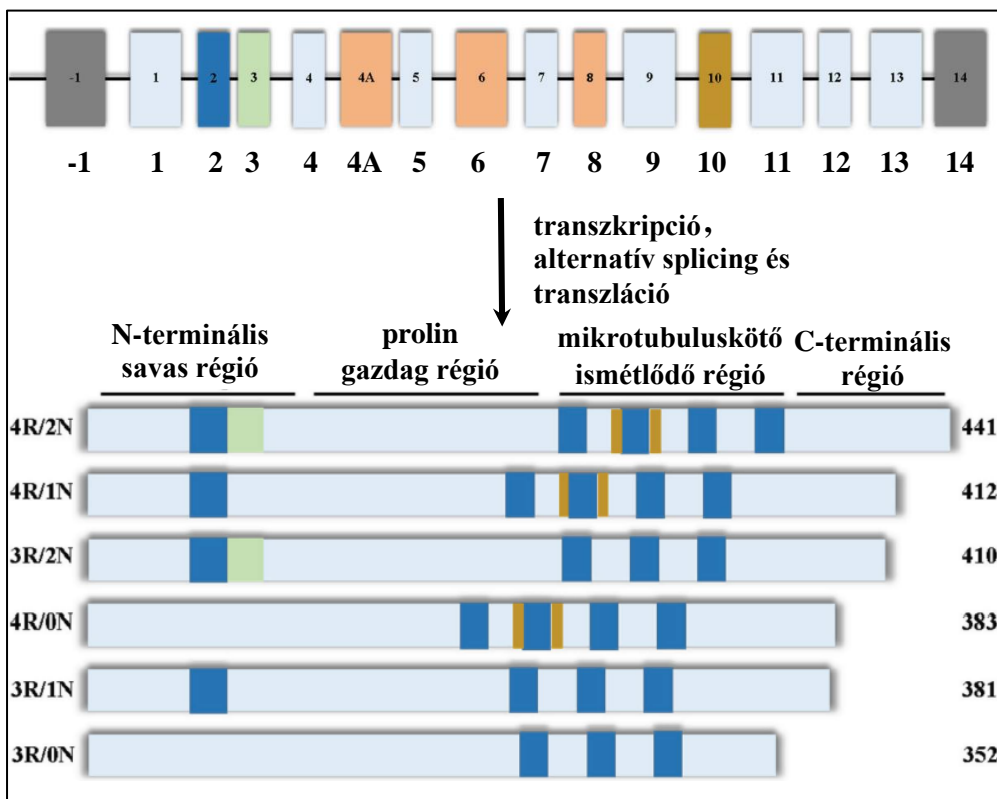
Az amiloid-kaszád és tau hipotézisek talán a legtöbb szakember által elfogadott feltevések. Az amiloid-kaszád hipotézis értelmében az amiloidogén úton keletkező $A\beta$ molekula ($A\beta$ 1-40, $A\beta$ 1-42) kóros felhalmozódása szignifikáns klinikai, biokémia és hisztológiai változásokat hoz létre az AK-os betegek szervezetében. Mára világossá vált, hogy a különböző $A\beta$ megjelenési formák aggregáltságának mértéke [101] és koncentrációja [102] kulcsfontosságú az AK patomechanizmusában, ugyanis a legmérgezőbb – a betegség kialakulásában legjelentősebb szereppel bíró – forma az $A\beta$ 1-42 és nem az extracelluláris $A\beta$ lerakódások [103]. Az elmúlt évtizedekben szerzett tapasztalatok alapján úgy tűnik, hogy az $A\beta$ az AK patológiás kaszkádjának indító molekulája lehet, azonban a szerepe a AK kiteljesedésében nem kizárólagos [100], ugyanis az általa gerjesztett kóros folyamatok közvetett módon összefüggésben vannak a tau fehérje szintén rendellenes fibrillum képzési folyamataival [104].

A tau hipotézis középpontjában a fehérje szerkezeti megváltozása áll, amelyről a következő alfejezetben (2.3.2. alfejezet) lesz szó.

2.3.1.1. A tau fehérje jellemzése és hatása az Alzheimer-kór lefolyásában

A tau makromolekulát egyetlen gén, a MAPT gén kódolja, mely a 17-es kromoszómában (17q21) található, és 16 exont tartalmaz. Az 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 és 13 alkotó exonok és a 0 vagy -1 a promotor része, amely a transzkripcóban részt vesz,

de a transzlációban nem [105]. Az emberi agyban a 2, 3 és 10-es exon alternatív splicingjével (az a folyamat, amely csorán bizonyos exonok kivágódnak a génből, és nem vesznek részt a transzláció előtti hírvívő RNS kiépülésében) a szervezetben 6 izoforma jelenik meg [106] (2. ábra). A 2-es és 3-as exonok alternatív splicingjével



2. ábra: A tau gén (MAPT gén) és az abból képződő hat izoforma sematikus ábrája. Halvány kék színnel a létesítő (1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 és 13), rózsaszínnel a ritkán expresszálódó (4A, 6 és 8), kékkel a 2-es, zölddel a 3-as és barnával a 10-es exonok vannak feltüntetve. Az exon 2, 3 és 10 jelenlététől vagy hiányától függően a tau három vagy négy mikrotubuluskötő ismétlődést (3R/4R), illetve nulla, egy vagy kettő N-terminális beékelődést foglalhat magában. 441-352 a hat izoforma tagszámát jelöli, továbbá több szerkezeti régió létezik: N-terminális régió (1-150), prolin gazdag régió (151-243), mikrotubuluskötő ismétlődő régió (244-369), C-terminális régió (370-441).

N-terminálist nem (0N), egyet (1N) vagy kettőt (2N) magában foglaló tau jön létre, míg 10-es exon alternatív splicingje olyan tau fehérjéket eredményez, amelyek három (3R) vagy négy (4R) mikrotubuluskötő ismétlődő domént tartalmaznak. A 441 aminosavból álló izoforma szerkezetiileg négy részre tagolódik [107-109].

Magzati korban csak a 3R formát sikerült kimutatni és az agy fejlődésével párhuzamosan nő a formák száma és mennyisége. A 4R és 3R formák aránya az egészséges felnőtt emberi agyban 1:1 [110,111] és ez az arány megváltozik a neurodegeneratív betegségekkel küzdő emberek agyában. A tau a mikrotubuláris rendszer szabad átrendeződéséért és szilárdságáért felelős, mint elsődleges neurális fehérje. Egy a citoskeletont alkotó főbb komponensek közül, ami meghatározza a neuronok normál morfológiáját és szerkezetét, illetve pályaként szolgál az axonális transzporthoz. Az egészséges tau fehérje 2-3 mol foszfátot [112,113] tartalmaz mólonként és a foszforiláltsági foka megfelel a normális működéshez szükségesnek. A hiperfoszforilált tau (továbbiakban ptau) kötődése a mikrotubulusokhoz és a szerkezetalkító szerepe csökkent mértékű az egészséges fehérjéhez képest. A rendellenes tau elválik a mikrotubulusuktól, így azok rendszere megbomlik; amit azonban defoszforiláció helyreállíthat. A tau hiperfoszforilációja az intracelluláris molekulák aggregációját – neurotoxikus előkötegek, PHF és NFK létrejöttét – okozza, valamint csökkenti az egészséges fehérjék anterográd (fehérje eljuttatása célállomásra) és retrográd (fehérjék visszaszállítása a kiindulási sejtservecskébe) sejtranszportjának sebességét az axonokban, ami azért jelentős, mert az egészséges fehérje legnagyobb mennyiségben az axonokban, mikrotubulusukhoz kötődve található meg [114-117].

Számos neurodegeneratív megbetegedés lejárásakor a tau poszttranszlációs módosulásokon megy keresztül: hiperfoszforiláció [118], glikozilálás [119], tagszámcsökkenés [120], glikáció [121], nitrálódás [117], acetilálás [122] és ubiquitinálás [123]. Ezek közül az első kétségkívül a legintenzívebben kutatott folyamat. Az eredmények alapján a 441 tagú izoformában 80 szerin, 5 treonin és 5 tirozin foszforilálható, amely foszforilációs helyek közül az egészséges emberi agyból kinyert és oldható fehérjékben 10 betöltött, ellentétben egy AK-os agyból nyert fehérjével, ahol 45 tartalmaz foszfátcsoportot – tehát a kötőhelyek csaknem fele [124]. A természetes tau molekula kis méretű, rendezetlen, rövid életű és proteaszómák által bontható molekula [125], ellentétben a ptau-val, amely aggregációja inhibálja az autofágiát (sejtes önmegsejtesítés a lizoszomális rendszer révén) és az azt követő lizoszomális hasítást [126]. SDS-PAGE (nátrium-dodeciszulfát-

poliakrilamid-gél-elektroforézis) módszerrel vizsgált AK-os páciensektől származó aggregátumok tanulmányozása során kiderült, hogy azok hat hiperfoszforilált izoformából állnak, amelyek három, 68, 64 és 60 kDa tömegű immunoreaktív köteg megjelenését eredményezik [107,127].

A foszforilációs folyamat szabályozásával több enzim is összefügg, amelyek mennyiségének megváltoztatása ígéretes stratégia lehet az AK megelőzésében. Jelenleg a kór kezelésére használt készítmények kis hatékonyságúak, míg a klinikai tesztelés alatt állók a harmadik fázistól nem jutottak tovább.

2.3.2. A fémionok szerepe neurodegeneratív megbetegedésekben

A fémionok alapvető szerepet játszanak az agy kiegyensúlyozott működésében, ezért, ha homeosztázisukban probléma lép fel, akkor az idegrendszeri megbetegedésekhez, sokszor valamilyen fehérje aggregátumok kialakulásához (a már említett plakkok és NFK) vezethet [128]. A fémionok részvételével keletkező aggregátumok többféle mechanizmus alapján képződhetnek:

- A fémionok megváltoztathatják az érintett fehérjék harmadlagos konformációját [129,130].
- Új intermolekuláris kötésrendszer kialakulását katalizálhatják a fémionok a fehérje szálai között [131].
- Ha a fémion-fehérje komplex keletkezésekor, annak nettó töltése semlegessé válik, akkor az felgyorsíthatja a fibrillumok keletkezését [132].
- A fémion koordinációja miatt megváltozhat a fehérje morfológiája is, ami az oligomer szerkezetben stabilisabb [133].
- A fémion hatására a fehérje nempatogén szerkezete destabilizálódik, így a fehérje letekeredése energetikailag kedvezményezetté válik [134,135].

A neurodegeneratív megbetegedésekkel összefüggő tanulmányok alapján a 3d átmenetifém-sor elemei (Mn, Cr, Fe, Co, Cu, Zn) és a Ca érintettek valamilyen formában a fentebb említett folyamatokban, végsősoron a különböző agyi elváltozások kialakulásában. Az öregedés során ezen fémionok szerkezetbeli egyensúlya elengedhetetlen az idegrendszer megfelelő működése, vagyis

funkciójának zavartalan ellátása szempontjából [136-138], így tehát az AK épp ugyanannyira metalopátia, mint proteopátia [139] is.

A legtöbb információ a Cu(II),- Zn(II)- és Fe(II)-ionokról áll rendelkezésre. A szenilis plakkokban mindhárom ion jelenlétét bizonyították [140,141], ami a környező agyi régiók fémion megoszlásában egyfajta hiányt eredményez [142]. A kutatók megfigyelték azt is, hogy az AK-os betegek vérében és plazmájában a Zn(II)-ion koncentrációja lecsökkent, míg az agy-gerincvelői folyadékban és a neokortikális („új agykéreg”) szövetben [143,144] pedig megnőtt. A folyamattal párhuzamosan mind a Zn(II), mind pedig a Cu(II) és Fe(II) mennyisége nőtt a neuropilémában (axonokat és dendriteket, valamint a közöttük kialakuló szinapszisokat nagy mennyiségben tartalmazó központi terület) [145]. Az mindmáig nem tisztázott, hogy az utóbb említett fémionok egészséges homeosztázisának zavara az AK tünete vagy kiváltó oka-e.

2.3.2.1. A tau fehérje kölcsönhatása fémionokkal

A NFK képződés folyamatát fémionok modulálják [134]. A Zn(II) kötődik a tau-hoz és elősegíti annak hiperfoszforilációját [146]: ha kis koncentrációban van jelen, elősegíti a fibrillumok képződését, míg ha nagy koncentrációban, akkor szemcsés aggregátumok létrejöttét idézi elő [147]. A Fe(III) szintén kötődik a fehérjéhez és indukálja az aggregációját, főképpen a PHF szerkezet kialakulását. Amennyiben a Fe(III)-ion Fe(II)-ionná redukálódik, úgy a keletkező ion az aggregátum képződést visszafordítja [148]. A vas felesleg a NFK-ben akkumulálódik, ami oxidatív stresszt okoz a Fenton-reakción keresztül és állandósítja a hiperfoszforilációt [149]. A Cu(II)-ion szerepe vitatott: egyrészt, a Cu(II) kötődik a polipeptidhez [150] és gátolja a tau aggregációját in vitro körülmények között [151], míg elősegíti a hiperfoszforilációt a hippokampus neuronjaiban [152], másrészt, AK-os egerek agyában az intracelluláris réz mennyiségét növelve réz(II)-bisz(tioszemikarbazon) komplexek segítségével, a foszforiláció gátolttá válását tapasztalták [153]. A nikkel szerepéről kevés információ áll rendelkezésünkre, azonban egy újabb tanulmányban arra a következtetésre jutottak, hogy a NiCl₂ és annak

morfolin konjugátumai védő hatásúak az AK lefolyásában, ugyanis a konjugátumok elősegítik a nagyobb sejtcsoportosulások szétesését [154].

3. Kísérleti körülmények és alkalmazott módszerek

3.1. Felhasznált vegyszerek, vizsgált ligandumok

A titrálások végrehajtásához $\sim 0,2$ mol/dm³ pontosan ismert koncentrációjú KOH (Merck Millipore Co.) mérőoldatot használtam, mely pontos koncentráció meghatározását minden alkalommal kálium-hidrogén-ftalát (BDH Prolabo, VWR) oldattal kiviteleztem. A minták állandó ionerősségét KNO₃ (Molar Chemicals Kft.) és KCl (Merck Millipore Co.) kémszerekkel biztosítottam. A ligandumok komplexképző sajátságának vizsgálatához Cd(NO₃)₂-, CdSO₄-, NiCl₂-, NiSO₄-, ZnCl₂-, Zn(NO₃)₂-, CuCl₂ törzsoldatokat használtam, amelyek a Reanal Finomvegyyszergyár Zrt. a.l.t. minőségű vegyszereiből készültek, és háromszor ioncserélt vízben történő oldással nyerték. A pontos koncentráció meghatározása gravimetriásan oxinát csapadékok formájában, pH-potencimetriás és klasszikus titrálásokkal EDTA titrálószerrel, illetve a Cd(NO₃)₂ esetében FAAS, MP-AES és ICP-OES technikákkal történt.

A peptidek előállítása során felhasznált vegyszereket és oldószereket kereskedelmi forgalomból szereztük be; azokat további tisztítás nélkül alkalmaztam. Az aminosavak terminális aminocsoportja 9-fluorenil-metoxi-karbonil (röviden Fmoc) védőcsoporttal védett formában kerülnek forgalomba (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(O t Bu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(O t Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Ser(Trt)-OH, Fmoc-Thr(t Bu)-OH, Fmoc-Tyr(t Bu)-OH, Fmoc-Val-OH) és ezek, valamint a Rink Amide AM gyanta és a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-terametilammónium-tetrafluoroborát (TBTU) a Novabiochem-től származik. A 2,2'-(etiléndioxi)dietántiolt (DODT), a dietil-étert (Et₂O), az *N*-metil-2-pirrolidont (NMP), az *N*-hidroxi-benzotriazol hidrátot (HOBt·H₂O), a szintetikus célra használható *N,N*-dimetil-formamidot (DMF), a trifluoecetsavat (TFA) és a triizopropil-szilánt (TIS) a Sigma Aldrich Co. árusítja. A 2-metil-bután-2-olt és az *N,N*-diizopropil-etilamint (DIPEA) a Merck Millipore Co., az ecetsavanhidridet (Ac₂O) pedig a VWR International biztosította. A piperidin, a diklór-metán (DCM) és a 96%-os ecetsav a Molar Chemicals Kft. termékei.

A peptidek tisztaságát nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias vizsgálatokkal ellenőriztük, amihez az acetonitril (ACN) a Sigma Aldrich Co. és a

Molar Chemicals Kft. gyártmánya volt, a TFA-t pedig a Merck Millipore Co. és a Sigma Aldrich Co. értékesítette.

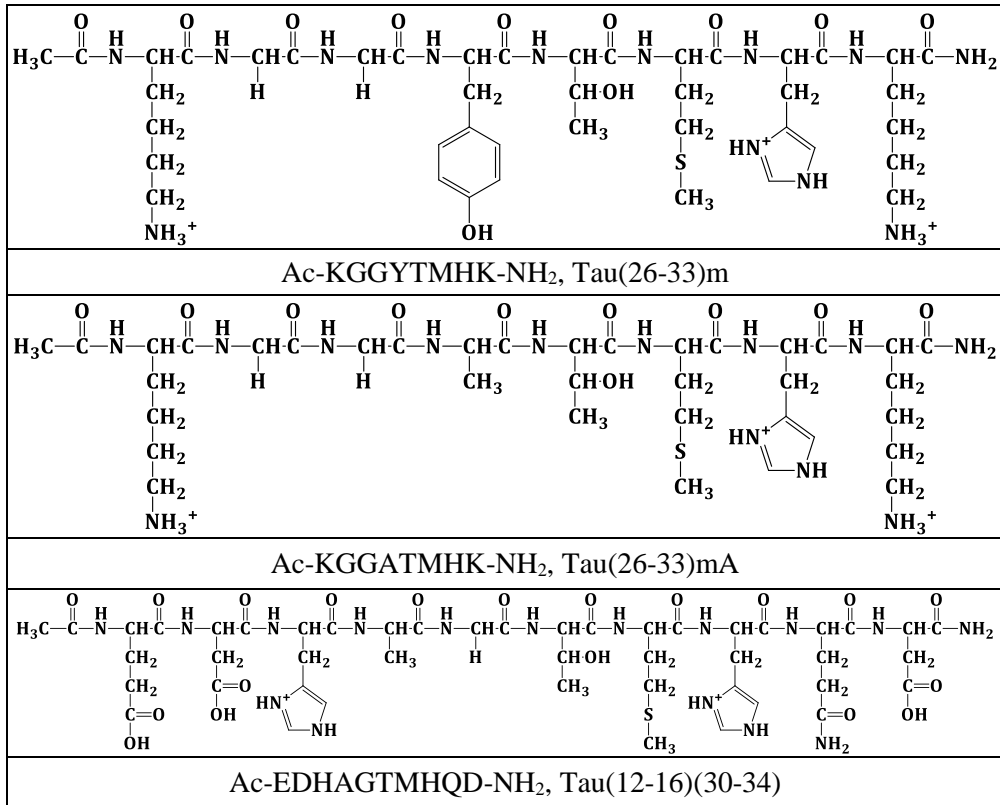
A kutatásokhoz használt **AspAla**, **AspAsp**, **AspGlu**, **GluGlu**, **AspAspAsp** és **AspAspAspAsp** a Bachem cég gyártmánya volt. Az **Ac-SAAC-NH₂**, **Ac-SCCS-NH₂**, **Ac-CSC-NH₂** és az **Ac-CSSC-NH₂** anyagokat a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén, az **Ac-EDHAGTMHQD-NH₂** peptidet pedig az olaszországi Consiglio Nazionale Delle Ricerche - Istituto Di Biostrutture e Bioimmagini (CNR-IBB, Catania) kutatóközpontban állítottam elő. Az **Ac-QGGYTMHQ-NH₂** ligandumot Dr. Lihi Norbert, **Ac-EVMEDHAG-NH₂** peptideket Hógyéné Dr. Grenács Ágnes Judit, az **Ac-KGGYTMHK-NH₂**, **Ac-CGSC-NH₂** ligandumokat Dr. Szunyog Györgyi, az **Ac-KGGATMHK-NH₂** pedig Balogh Bettina Diána és Bodnár Nikolett állította elő. A tau fragmensek dolgozatban használt rövidítéseit az alábbi 1. táblázat tartalmazza. A vizsgált ligandumok képletei a 2. táblázatban szerepelnek.

1. táblázat: *A tau fragmensek dolgozatban használt rövidítései*

Szekvencia	A dolgozatban használt rövidítés
Ac-EVMEDHAG-NH ₂	Tau(9-16)
Ac-QGGYTMHQ-NH ₂	Tau(26-33)
Ac-KGGYTMHK-NH ₂	Tau(26-33)m
Ac-KGGATMHK-NH ₂	Tau(26-33)mA
Ac-EDHAGTMHQD-NH ₂	Tau(12-16)(30-34)

2. táblázat: A vizsgált ligandumok összeg- és szerkezeti képletei

Ligandumok szerkezeti és összegképlete
$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Asp-Ala (DA)
$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array} $
Asp-Asp (DD)
$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array} $
Glu-Glu (EE)
$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{OH} \end{array} $
Asp-Glu (DE)
$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \quad \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \quad \parallel \quad \quad \parallel \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array} $
Asp-Asp-Asp (DDD)
$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \quad \parallel \quad \quad \parallel \quad \parallel \quad \\ ^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \quad \text{C}=\text{O} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \quad \quad \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array} $
Asp-Asp-Asp-Asp (DDDD)



3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis

A peptidok szintézisének történetében nagy áttörést hozott a szilárdfázisú peptidszintézis módszere [155], amelyet Robert Bruce Merrifield dolgozott ki, és amelyért 1984-ben Nobel-díjjal ismerték el. Az eljárás során a peptidet egy szilárd hordozóhoz, ún. gyantához kapcsolják hozzá. Ez a gyanta egy olyan finomszemcsés térhálós műanyag, amely egyrészt szerves oldószerekben jól duzzad, másrészt a felületén és a belsejében olyan funkciócsoportok találhatók, amihez kémiai úton aminosavak kapcsolása lehetséges. Az aminosavak gyantához, illetve egymáshoz történő csatolása heterogén reakció, így azok időbeli lefutása emiatt elméletben lassú, ugyanakkor a szilárdfázisú eljárás számos előnye miatt kedvelt: (i) a feleslegessé vált reagensek egy egyszerű szűréssel a reakciótérből könnyedén eltávolíthatók, (ii) a peptid mosása és kicsapása az egyes aminosavak kapcsolása után nem szükséges, miáltal a hozam javul a folyadékfázisban végrehajtott előállításokkal szemben, (iii) a kapott anyag könnyedén feldolgozható, (iv) a kapcsolás szelektív és ciklikus

ismételhetősége révén [156] automatizálható. Annak elkerülésére, hogy a kívánttól rövidebb vagy hiányos szekvenciájú peptidek keletkezzenek, vagy nagy reagensfelesleget, vagy hosszabb reakciót időt, vagy a kapcsolási lépések ismétlését alkalmazzuk.

A peptidek aminosavankénti csatolásakor a terminális csoportok reaktívvá tételét el kell végezni, míg az oldalláncban található különböző funkciós csoportok védett formában kell, hogy legyenek a teljes peptidlánc kiépülése alatt azért, hogy a nem kívánt reakciókat elkerülhessük. Különböző védőcsoport stratégiák ismeretesek: Boc/Bzl [157] vagy Fmoc/*t*Bu [158]. Munkánk során a második módszer szerint jártunk el, ahol a Fmoc az α -amino csoportét, a *t*Bu – vagy az abból származtatható csoportok – pedig az oldalláncok védőcsoportját jelölik. Utóbbiak a szintetikus munka során nem vesznek részt kémiai reakcióban és annak végeztével könnyedén eltávolíthatók. Az aminosavak oldalláncai a peptidek előállításakor a következők voltak:

- nincs védőcsoport: A, G, M, V
- tritil (Trt): C, Q, H, S
- *terc*-butil (*t*Bu): T, Y
- *terc*-butoxi (*Ot*Bu): D, E
- *terc*-butil-oxikarbonil (Boc): K

A peptidek szekvenciájának felépülése a C-terminális vég felől az N-terminális vég irányába történik egyesével, gyantához rögzítve. Az alkalmazott gyantával szemben támasztott elvárás a jó mechanikai és kémiai ellenállóképesség, vagyis, hogy ne reagáljon sem oldószerekkel, reagensekkel, sem pedig magával a peptiddel.

A szilárd fázisú peptidszintézis Liberty peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) történt, és az oldószer *N,N*-dimetil-formamid volt. Az általunk szintetizált peptidek C-terminális végén amid védőcsoport volt, amely kialakítása a Rink Amide [159] típusú gyantáról történő hasítás miatt következik be. A Rink Amide Am gyanta Fmoc védőcsoporttal ellátva kerül forgalomba, amelyet az első lépésben a készülék 0,1 mol/dm³ HOBt·H₂O és 20 V/V% piperidin-tartalmú DMF segítségével hasított le, melyhez 30 W teljesítményű mikrohullámú sugárzást alkalmazott 80 °C-on, 180 másodpercen keresztül. Ezután történt az aminosav hozzáadása négyszeres

felesleg (0,2 mol/dm³ koncentráció) felhasználása mellett, illetve a karboxil funkciós csoport(ok) aktiválása a TBTU/HOBt/DIEA stratégia alapján, a konverzió növelése érdekében. Az aminosav gyantához, illetve a következő aminosavhoz kapcsolását a készülék ismét 30 W teljesítményű mikrohullám segítségével, 80 °C-on végezte, 300 másodpercen át. A lépéseket ciklikusan ismételve készítette el a berendezés a vizsgálatokhoz szükséges peptideket. Ezek α -amino csoportját N-acilezéssel tette a készülék védetté, az utoljára kapcsolt aminosavegység Fmoc csoportjának eltávolítása után, 6 V/V% Ac₂O és 5 V/V% DIEA-t tartalmazó DMF oldat igénybevételével.

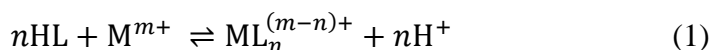
Az ily módon nyert – gyantához kötött – peptideket diklórmetán, 96%-os ecetsav, 2-metil-2-butanol és Et₂O alkalmazásával mostuk a további feldolgozás előtt. A gyantáról történő lehasítás és az oldalláncban lévő védőcsoportok eltávolítása szimultán történt. A felhasznált hasítóelegyek térfogatszázalékos összetételei a következők voltak: TFA/TIS/H₂O/DODT 94/2,5/2,5/1 V/V% vagy 95/2,5/2,5/0 V/V%. A hasítási reakció szobahőmérsékleten a készüléken kívül, két órán keresztül történt. A folyadékelegyen található peptidet a gyantától szűréssel választottuk el, és kicsapását hideg Et₂O-be történő csepegtetéssel végeztük, kevertetés közben. A peptidet szűréssel nyertük ki, majd szárítottuk, vízben feloldottuk, végül liofilizáltuk.

A kész ligandumok tisztaságát minden esetben fordított fázisú HPLC, ESI-MS és pH-potenciometriás technikákkal ellenőriztük, illetve több esetben ESI-TOF és/vagy MALDI-TOF analízist is végeztünk. Ha a vizsgálatok alapján az előállított anyag csak a hatóanyagot és esetleg inert szennyezőt tartalmazott, akkor az anyagot további tisztítás nélkül használtuk. Ha a termékek a hatóanyag mellett nem inert szennyezőt is tartalmaztak, akkor elvégeztük azok kromatográfiás tisztítását egy Shimadzu DAD rendszerű, preparatív, fordított fázisú HPLC készülék alkalmazásával, amelyhez LC-20A folyadékszállító egység csatlakozott. A detektálást 222 nm-en végeztük, ami a peptidkötésre jellemző maximális elnyelési hullámhossz. Az Ac-QGGYTMHQ-NH₂, Ac-KGGYTMHK-NH₂ és Ac-EDHAGTMHQD-NH₂ peptideknél Synergi, Fusion-RP C18 250 x 10 mm-es (80Å pórusméret, 4 µm szemcseméret), az Ac-KGGATMHK-NH₂ esetén Phenomenex, Jupiter Proteo C12 250 x 4,6 mm-es (90Å pórusméret, 4 µm szemcseméret) oszlopot használtunk. Az áramlási sebesség 10 ml/min volt, és az eluens egy olyan keverék

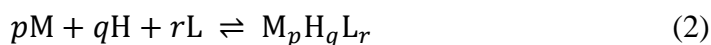
volt, amely az A oldószert (H₂O 0,1% TFA-val) és a B oldószert (MeCN 0,1% TFA-val) különböző mennyiségben tartalmazta a vonatkozó módszerek alapján.

3.3. pH-potenciometria

A pH-potenciometria egy olyan módszer, amely az oldatfázisban végbemenő komplexképződési folyamatok egyensúlyi jellemzésére alkalmas. Abban az esetben végezhetünk vizsgálatokat, ha a ligandum protonálódási egyensúlyára a komplexképződés hatással van, más szóval mérhető pH-effektus tapasztalható. A módszerrel tanulmányozható ligandumok gyenge bázisnak tekinthetők, emiatt a komplexképződés nem más, mint a H⁺-ion és a M^{m+} fémion közötti kompetíció, amely a (1) egyenlettel írható le.



A bruttó komplexképződési folyamat a (2) egyensúlyi reakcióval általánosan megadható (a töltéseket nem tüntettem fel, az egyszerűbb kezelhetőség miatt):



ahol M: a fémion, L: a deprotonált ligandum, H: a hidrogén, p , q és r sztöchiometriai együtthatók. A titrálás során keletkező komplexek sztöchiometriáját és stabilitási állandó értékeit határozzuk meg a módszerrel. Egy M _{p} H _{q} L _{r} összetételű komplex bruttó stabilitási állandója a következő képlettel adható meg (3):

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

A kísérleti adatok alapján a szabad ligandumokra jellemző bruttó képződési állandók, valamint a komplexek stabilitási állandói meghatározhatók a SUPERQUAD [160] és a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén kifejlesztett PSEQUAD [161] számítógépes programokkal.

A PSEQUAD program használatához a következő primer adatokra van szükség: a ligandum, a fémion és hidrogénion analitikai koncentrációja, vízionszorzat, a mérőoldat pontos koncentrációja, a részecskék ismert vagy feltételezett összetétele, becsült vagy ismert stabilitási állandói, valamint a térfogat-pH adatpárok. A program a bemenő adatok alapján Newton-Rapson iterációval közelíti a finomítani kívánt stabilitási állandók értékét addig, amíg a mérőoldatra nézve a $\sum(V_{mért} - V_{számított})^2$

összefüggésre minimumot talál (V a hozzáadott mérőoldat térfogata). A stabilitási állandók értékeit a kiindulási komponensekre felírható anyagmérleg egyenletek (4-6) adják, ahol „ n ” a rendszerben keletkező asszociátumok számát jelenti:

$$c_M = [M] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pqr} [M]_i^p [H]_i^q [L]_i^r \quad (4)$$

$$c_H = [H] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pqr} [M]_i^p [H]_i^q [L]_i^r \quad (5)$$

$$c_L = [L] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [H]_i^q [L]_i^r \quad (6)$$

Az iterációs sorozat végen a program megadja: egyrészt a finomított állandók értékeit, másrészt a számított titrálási görbék pontjaihoz tartozó $|V_{mért} - V_{számított}|$ értékek átlagát (illesztési paraméter). Mindezek mellett a kiválasztott komponensekre vonatkozóan megrajzolja az asszociátumok/részecskék koncentrációeloszlási görbéit a pH-függvényében. A dolgozatban a stabilitási állandókat ($\lg\beta$, $\lg\beta[M_pH_qL_r]$) tartalmazó táblázatokban az értékek mellett zárójelben szereplő számok az állandó utolsó számjegyével azonos nagyságrend szerinti standard deviációértékét jelöli. Egy rendszerben a feltételezett részecskék egy adott összességét modellnek nevezzük. A modelleket abban az esetben fogadtuk el, ha kémiai megfontolások alapján reálisnak tűntek, illetve ha a vonatkozó illesztési paraméter a legkisebb volt.

A dolgozatban szereplő koncentráció-eloszlási görbéket a SED [162] program Windows operációs rendszer alatt futó változatával, a MEDUSA-val szerkesztettem meg, amelyhez a részecskék pontos stabilitási szorzatait és összetételét, valamint azok kiindulási koncentrációit használtam.

A fémkomplexek protonálódási egyensúlyainak jellemzésére, illetve a különböző ligandumokkal létrejött komplexek összehasonlítása végett több esetben ún. származtatott állandókat képeztünk, az érintett komplexek bruttó stabilitási állandóit felhasználva, különböző matematikai műveletek révén.

Az imidazolilcsoportok részvételével kialakuló komplexek stabilitásának jellemzésére a $\lg K(M+Im)$ értéket vezettük be, ahol M Cu(II) vagy Ni(II). Abban az esetben, ha a ligandum nem tartalmaz olyan funkciós csoportot, amelynek savi állandója a $\text{His } pK$ -értékénél nagyobb, úgy a kialakuló imidazol-N koordinálta részecske $\lg K(M+Im)$ értéke megegyezik az $[ML]$ összetételű komplex $\lg\beta$ értékével. Amennyiben ez nem teljesül, azaz nagy pH-tartományban deprotonálódó

donorcsoporto(ka)t tartalmaz a ligandum, mint például a Tyr-OH vagy Lys-NH₃⁺, úgy a következő módon számoltunk (7) és (8) egyenlettel:



$$\lg K(M+N(\text{Im})) = \lg \beta(MH_xL) - \lg \beta(H_xL) \quad (8)$$

A peptidnitrogének (kooperatív) deprotonálódásának jellemzésére az alábbi módon számolt állandókat használtuk ((9) egyenlet):

$$pK \left(\frac{MH_nL}{MH_{n-x}L} \right)_{\text{(átlag)}} = \frac{\lg \beta(MH_nL) - \lg \beta(MH_{n-x}L)}{x} \quad (9)$$

A kisebb tagszámú peptideknél lehetőség van biszkomplexek képződésére. Azt hogy ez a folyamat mennyire kedvezményezett, azt a $\lg(K_1/K_2)$ érték mutatja meg. Ezt a következőképpen számolhatjuk ((10) egyenlet):

$$\lg \left(\frac{K_1}{K_2} \right) = \lg K_1 - \lg K_2 = 2 \cdot \lg \beta(ML) - \lg \beta(ML_2) \quad (10)$$

A dolgozatban feltüntetett titrálási görbék esetén a pH-t a titráló lúg ekvivalenseinek függvényében ábrázoltam, ahol a lúgekvivalens = $\frac{n_{\text{KOH}} - n_{\text{H}^+ \text{ felesleg}}}{n_{\text{ligandum}}}$

és nulla ekvivalensnél a teljesen protonált ligandum van jelen (3-5. ábra). A titrálások során a légköri szén-dioxid és oxigéngáz kizárását az oldat felső részébe vezetett argon gázzal oldottuk meg; a minták kevertetését pedig VELD mágneses keverőttest végezte. A mérőoldat a titrálások közben pontosan ismert körülbelül 0,2 mol/dm³-es, karbonátmentes, argon alatt tárolt KOH volt. A koncentráció meghatározására (0,0500 mol/dm³) kálium-hidrogén ftalát oldatot használtam. Az elektród kalibrálását szintén ilyen oldattal végeztem, amelynek a kísérletek során biztosított 298 K hőmérsékleten a pH-ja 4,005. Az állandó hőmérsékletről egy ultratermosztát gondoskodott. A méréseket számítógép által vezérelt Mol-AcS mikrobüretta és MOLSPIN pH-mérő igénybevételével hajtottam végre, amihez Metrohm 6.0234.100 és 6.0234.110 kombinált üvegelektrodot használtam, a büretta pedig egy 1 vagy 0,5 cm³ végtérfogatú Hamilton freckendő volt.

A minták elkészítéséhez használt HCl és HNO₃ oldatok koncentrációját a már ismert töménységű KOH oldattal állapítottam meg. A koncentrációk meghatározását a titrálási görbék Gran-féle linearizálásával vittem véghez. A diffúziós potenciál kiküszöbölésére a Irving és munkatársai által javasolt módszert alkalmaztuk [163].

A ligandumból készített törzsoldatokat szilárd anyag beméréssel készítettem, és minden esetben háromszor ioncserélt vizet használtam. Az így nyert oldatok koncentrációja $1 \cdot 10^{-3}$ - $2 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ koncentráció-tartományba esett. Az oldatok pontos koncentrációját a SUPERQUAD programmal számítottuk ki.

A minták kezdeti térfogata három, illetve négy cm³ volt, az állandó ionerősséget – 0,2 mol/dm³ – 1 mol/dm³ töménységű KNO₃ és KCl adagolásával értem el. Ez az ionerősség jóval nagyobb, mint a titrálendő oldat ligandum- és fémion-koncentrációinak összege, valamint megegyezik a mérőoldat koncentrációjával, emiatt az ionerősség változása a mérések során elhanyagolható. A fémion/ligandum arányt a ligandumtól és a törzsoldat koncentrációjától függően 1:1, 1:2, 1:4 és 2:1 arány között változtattuk. A térfogat változását a módszer használata során a számítógépes szoftver figyelembe vette.

A kiértékelések során figyelembe vettük minden fémion esetén a hidroxokomplexek stabilitását is. Ezek a következők: [Cu(OH)]⁺ ($\lg\beta = -7,22$), [Cu₃(OH)₄]²⁺ ($\lg\beta = -21,05$) [164], [Ni(OH)]⁺ ($\lg\beta = -9,87$), [Ni₄(OH)₄]⁴⁺ ($\lg\beta = -28,04$) [165], [Zn(OH)₂] ($\lg\beta = -16,55$), [Zn(OH)₄]²⁻ ($\lg\beta = -39,71$) [166], [Cd(OH)]⁺ ($\lg\beta = -9,60$) [167].

A pH-potenciometriás titrálások segítségével információt nyerhetünk a különböző komplexek összetételéről és stabilitásáról, ugyanakkor a koordinációs módról, a koordinációban résztvevő donoratomokról, a geometriáról nem ad ismereteket. A módszer hiányossága még továbbá, hogy néhány esetben egy rendszer több modellel is jól leírható, vagy két részecske képződése azonos pH-effektussal jár. Ez szükségessé teszi az oldategyensúlyi karakterizálás kibővítését spektroszkópiai módszerekkel: UV-látható, CD, ESR, MS, NMR.

3.4. UV-látható spektrofotometria

Az átmenetifémek komplexeinek képződése során a központi fémion d-pályáinak degeneráltsága megszűnik a ligandum elektromos terének hatására. A keletkező d-pályák közötti elektronátmenetek (töltésátvitel) okozzák a komplexek színét, fényabszorpcióját. A felvett spektrumok információt adnak a komplexek geometriájáról, kötémódjáról és a koordinálódó donoratomok számáról.

A réz(II)ion d^9 elektronkonfigurációjú, amely a d^1 fordítottjaként értelmezhető, miáltal viszonylag egyszerű abszorpciós spektrumok detektálhatók. A tetragonálisan torzult oktaédes geometriájú fémkomplexekben a Jahn-Teller effektus következtében az 2E_g alap- és 2T_g gerjesztett állapotú energiaszintek gyenge- és erősterű ligandumok esetén szintén felhasadnak, és háromféle átmenet jöhet létre: $d_{xz}(d_{yz}) \rightarrow d_{x^2-y^2}$, $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$, $d_x^2 \rightarrow d_{x^2-y^2}$. Ezek az átmenetek általában egy széles abszorpciós sávva olvadnak össze a spektrumokban, amelynek intenzitása (A) és energiája (így az abszorpciós maximumhoz tartozó hullámhossz, λ_{\max}) függ a koordinálódó atomok számától és minőségétől. Ez utóbbiakat Sigel és Martin [168], továbbá Pettit és munkatársai [169] vizsgálták (3. táblázat).

3. táblázat: *A réz(II)komplexek abszorpciós maximumának és moláris abszorbanciájának függése a koordinált nitrogénatomok számától*

Koordinált nitrogénatomok száma	Abszorpciós maximum λ_{\max} (nm)	Moláris abszorbancia ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
1	680-730	30-60
2	620-670	40-120
3	540-590	100-150
4	500-530	120-200

Ha a $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$ kation ekvatoriális pozícióiban lévő víz O-donoratomjait lecserjük más minőségűekre (például N, szerves eredetű-O) akkor az abszorpciós maximum helye eltolódik. Ez az effektus kifejezetten a N-donoratomoknál érezteti hatását; hipszokróm eltolódás. Az abszorpciós maximumok értéke megbecsülhető egy empirikus összefüggés segítségével ((11) egyenlet) [168]:

$$\lambda_{\max} = \frac{10^3}{0,294(C=O/H_2O) + 0,346(COO^-) + 0,460(NH_2) + 0,494(N=) + 0,434(Im)} \quad (11)$$

Ez azonban nem veszi figyelembe az axiálisan koordinálódó – nem víz molekulától származó – atomok részvételét a koordinációban (az axiális koordináció batokróm eltolódást eredményez), a keláteffektust, illetve a ligandumban található (egyéb) kromofór csoportokat.

A nikkell(II)ion esetében 6-os koordinációs számú, oktaédes, nagy spinszámú és paramágneses komplexek jönnek létre gyengeterű ligandumokkal.

Ekkor három spinmegengedett d-d átmenet történik, amely a Laporte-szabály szerinti tiltás értelmében kis intenzitású ($\epsilon_{\max} < 30 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Az abszorpciós spektrumban a sávok 770-1430 nm, 500-910 nm és a 370-520 nm hullámhossz-tartományban jelentkeznek. Ezek mellett egy negyedik, kisebb intenzitású spintiltott átmenet is létezik, mely csupán vállként jelentkezik valamelyik sávon.

Amennyiben a koordinációs szám négy, úgy a keletkező Ni(II)-komplexek geometriája tetraédes vagy síknégyzetes lehet. Tetraédes elrendeződés alakul ki, amennyiben gyengeterű, monodentát (például halogenid) a ligandum, vagy a kelátképző donoratomja sztérikusan zsúfolt környezetben van. Ekkor átmenet tapasztalható 500-900 nm körül ($\epsilon_{\max} \sim 100\text{-}1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

A síknégyzetes geometriájú komplexek szinte kizárólag erősterű ligandumokkal (például tiolátcsoport, peptid- N^- , makrociklusok) képződne és szinte kizárólag diamágnesesek. Az ilyen geometriájú komplexek keletkezése intenzív színváltozással jár: kis pH-értéken sárga, a pH növelésével vörös, majd nagy pH-n barna színű az oldat. Az abszorpciós spektrumban 400-550 nm hullámhossz-tartományban egy összetett átmenetet (2 maximum, váll) figyelhetünk meg, amely intenzitása (ϵ_{\max}) $\sim 50\text{-}500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [170].

A Cd(II)-ion és Zn(II)-ion komplexei szintelenek, mivel az elektronkonfiguráció d^{10} ; ami megnehezíti a vizsgálatokat. A komplexképződés ugyanakkor követhető, ha a ligandumnak az UV-tartományban elnyelése van, ami a deprotonálódás révén megváltozik: például $\text{Cd} \rightarrow \text{S}^-$ [171,172].

A spektrumokat Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras spektrofotométerrel jól zárható, 1,000 cm-es küvettában vettük fel. A kadmium(II)ionot tartalmazó minták elnyelését 200-400 nm között, a réz(II)- és nikkell(II)ionokat tartalmazókat pedig 250-900 nm közötti hullámhossz-tartományban detektáltuk. A minták koncentrációja $1 \cdot 10^{-4}$ és $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ között változott, a fémion/ligandum arány 1:1 és 2:1 között volt. A dolgozatban feltüntetett moláris abszorbancia értékeket, illetve moláris abszorpciós spektrumokat úgy számoltam ki, hogy a primer adatokat elosztottam a minták fémion koncentrációjával. A két ciszteint tartalmazó peptidek Cd(II)-komplexei esetében a PSEQUAD program használatával kapott görbékéből meghatározott adatokat tüntettem fel. A spektrumokat különböző

pH-értékeken rögzítettük, melyhez a 6.0234.110 Metrohm kombinált üvegelektroddal összekapcsolt Metrohm 827 pH lab hordozható pH-mérő készüléket használtunk. A pH állításához KOH, HCl, HNO₃ és H₂SO₄ oldatokat használtunk. A táblázatok moláris abszorbancia

3.5. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus spektroszkópia egyike azon módszereknek, amelyek a polarizált fény és az optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapulnak. A síkban polarizált fény felbontható egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár összegére. Az optikailag aktív anyagok törésmutatója és abszorpciós koefficiense különbözik a kétféle fénykomponens esetében, emiatt a közegen áthaladva az abszorpcióban különbség mutatkozik. Ezt a különbséget nevezzük cirkuláris dikroizmusnak vagy Cotton-effektusnak. Cirkuláris dikroizmus görbét (spektrumot) kapunk akkor, amikor a hullámhossz függvényében a kétféle fénysugár abszorpciójának vagy az abból származtatható moláris abszorpciójának a különbségét ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{bal}} - \varepsilon_{\text{jobb}}$) ábrázoljuk. A CD-görbe minimumai és maximumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximumai helyén vagy ahhoz közel jelentkeznek, és viszonylag keskeny Gauss-görbék, ellentétben az abszorpciós spektrummal. Ennek köszönhető, hogy a CD-spektrum több esetben informatívabb az utóbbinál, mivel a Cotton-effektusok előjele is szerkezeti információt hordoz.

Egy átmenetifém komplex akkor CD-aktív, ha a fémion királis környezetben van. A szabad fémion a d-d tartományban, az UV-látható spektroszkópiával szemben, nem mutat aktivitást, ami megkönnyíti a fehérje/peptid molekulák kölcsönhatásának vizsgálatát, hiszen a jelek csak ebből a kölcsönhatásból erednek [173].

A fémionok optikai aktivitása három dolognak tulajdonítható: konfigurációs hatás, konformációs hatás, vicinális (szomszédos) hatás [174,175]. A konfigurációs hatás hozzájárulása az optikai aktivitáshoz a legnagyobb, és akkor jelentkezik, amikor a fémionhoz koordinálódott csoportok vagy atomok elhelyezkedése nem szimmetrikus. A konformációs hatás bizonyos fémion-ligandum kombinációk esetén jelentkezik a kelátgyűrűk tulajdonságaitól függően [176]. Az olyan Cu(II)- és kis spinszámú Ni(II)-komplexekben, amelyben kedvezményezett a sík elrendeződés, az optikai aktivitás

főként a vicinális (szomszédos csoport) hatásnak köszönhető, amely a keltárgyűrű környezetében elhelyezkedő csoportok jelenlétéből adódik [174,175]. Gyakran figyeltek meg egészen intenzív d-d átmeneteket a négyzetes geometriájú komplexek esetén, amelyekben $\text{Im}(\text{N})$ és peptid- N^- egyidejű koordinációja valósul meg [177-179]. Ekkor az aktivitás abból fakad, hogy a királis α -szénatom két koordinálódó csoport által bezárt kelátgyűrűbe esik [175].

Az oldalláncok pozíciója a koordinációs sík körül modulálja a különböző csoportok hatását. Különböző di- és tripeptidek tanulmányozásának eredményeképpen különböző törvényszerűségeket ismertek fel. Megállapították, hogy a komplexben különböző helyzetben lévő, de azonos kémiai minőségű optikailag aktív csoportok különböző nagyságú Cotton-effektust eredményeznek:

$$\Delta\varepsilon_{\lambda}^{\text{Gly-X-Gly}} > \Delta\varepsilon_{\lambda}^{\text{Gly-Gly-X}} > \Delta\varepsilon_{\lambda}^{\text{X-Gly-Gly}} \quad (12)$$

Ezt úgy értelmezhetjük, hogy a központi fémionhoz, mint kromofór csoporthoz, koordinálódó különböző donorcsoportok nem azonos mértékben továbbítják a királis információt. Az alábbi sorrendet ismerték fel: peptid- $\text{N}^- >$ karboxilátóxigén $>$ aminonitrogén [168].

A cirkuláris dikroizmus spektroszkópiás méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszék, valamint a Cataniai CNR-IBB központ JASCO-810 típusú készülékén végeztük. A minták fémion/ligandum aránya 1:1 és 2:1 között változtattuk. A spektrumokat szobahőmérsékleten, különböző pH-értékeken rögzítettük, a 220-800 nm hullámhossz-tartományban 1,000 mm és 1,000 cm úthosszú küvettákban. A $\Delta\varepsilon$ értékeket úgy kaptam, hogy a korrigált primer adatokat (háttér korrekció, küvetta úthosszának figyelembe vétele) a minták fémion koncentrációjával osztottam el. Az adatok kiértékelése a gyártó által mellékelte szoftveren, illetve az MS Excel program használatával történt.

3.6. ESR-spektroszkópia

Az elektronspin-rezonancia módszerével paramágneses fémionok, és párosítatlan elektront tartalmazó molekulák vizsgálatára nyílik lehetőség. A mintát erős mágneses térbe helyezzük a vizsgálat során és a gerjesztési energiát az elektronspinek nyelik el. A mérhető paraméterek anizotrópok fagyasztott vagy szilárd

minták esetén, emiatt megkülönböztethető a spektrum párhuzamos és merőleges tartománya. Egykristályok rögzített tengely körüli forgatásakor az anizotrópia jól nyomon követhető. A Cu(II)-ion paramágneses tulajdonsága miatt tudtuk a komplexeit vizsgálni.

Általános tapasztalat, hogy egy I spinszámú mag a spektrumban 2I+1 számú, azonos intenzitású finomszerkezetet hoz létre. A Cu(II)-ionra I = 3/2, ami azt jelenti, hogy réz(II)komplexek esetén négy vonalból álló hiperfinom szerkezet alakul ki. A hiperfinom szerkezet segít következtetni a komplexekben végbemenő szerkezeti változásokra.

A spektrumokból nyerhető elsődleges információ a g_{\parallel} tenzor ((13) egyenlet) értéke, valamint a hiperfinomcsatolási-állandó (A_{\parallel}) ((14) egyenlet):

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

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

ahol g_0 a külső standard értéke, H_0 és H_{\parallel} a standardban és a mintában mért mágneses térerő értéke [Gauss], a_{\parallel} csatolási állandó [Gauss], μ_B a Bohr-magneton [$9,2740 \cdot 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$], c a fénysebesség [$2,9979 \cdot 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$], h a Planck-állandó [$6,6250 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$]. A módszer nem abszolút, azaz a kapott spektrumokat más komplexek spektrumaival összehasonlítva tudunk következtetést levonni arra vonatkozóan, hogy milyen minőségű és mennyiségű donorcsoport köti meg a fémiont. Ha a mágneses donoratomok lépnek kölcsönhatásba a párosítatlan elektronokkal, lehetőség van rezonanciajelek további felhasadására, ekkor beszélünk szuperhiperfinom-kölcsönhatásról. Ez lehetőséget ad különböző pozíciókban koordinálódó mágneses donoratomok megkülönböztetésére.

A méréseket a CNR-IBB kutatóközpontban Dr. Giuseppe Pappalardo munkatársai végezték a Cataniai Egyetemen (University of Catania). Egy számítógép által vezérelt Bruker Elexsys E500 CW-ESR készüléket használtak a kutatásokhoz. A mintákhoz legfeljebb 10% metanolt adtak a felbontás javítása érdekében, ezután 150 K hőmérsékleten, különböző pH-értékeken és fémion/ligandum arány alkalmazása

mellett vették fel a spektrumokat. A fém törzsoldat izotóptiszta $^{63}\text{Cu}^{2+}$ ionokat tartalmazott.

3.7. ^{113}Cd NMR-spektroszkópia

A mágneses magrezonancia spektroszkópia a szabad ligandumok és a diamágneses fémiont tartalmazó komplexek esetében alkalmazható. A Cd(II)-Ac-CSSC-NH₂ oldatát lúgos pH-tartományban vizsgáltuk ilyen módszerrel. A vizsgálatot Bruker AMX 400 MHz készüléken vettük fel, és a kiértékelés során MestreNova 8.1 szoftvert használtunk. A mérés során deuterált DMSO-t alkalmaztunk. 0,1 M koncentrációjú Cd(NO₃)₂ DMSO oldatát használtunk külső standardként. Az mérési paraméterek az alábbiak voltak: impulzushossz: 15 μs (60°), várakozási idő (pulse repetition time) 20 s, a spektrum szélessége: 42 kHz, mérési adatpontok száma: 65356, teljes scan szám 16000.

3.8. Tömegspektrometria

A tömegspektrometriás mérések Olaszországban a Giuseppe Pappalardo vezette kutatócsoport által készültek. A nagyhatékonyságú ESI-MS spektrumokat Q Exactive (orbitrap) tömegspektrométeren (Thermo Fisher Scientific) rögzítették hasonló koncentráció tartományban, mint, amit az UV-CD méréseknél használtunk. A teljes MS vizsgálatot a 200-2000 m/z tartományban végezték el 150000 félértékszélesség felbontással pozitív módban. A vizsgálatok körülményei: az alkalmazott feszültség = 3,5 kV, kapilláris hőmérséklet = 250 °C. A tömegspektrumban (ionintenzitás az m/z (tömeg) függvényében ábrázolva) megjelenő jelcsoportok a leggyakoribb ionokhoz rendelhetők.

4. Kísérleti eredmények és értékelésük

4.1. Aszparaginsavat és glutaminsavat tartalmazó peptidek

A vizsgált ligandumok (DA, DD, DDD, DDDD, DE, EE) egy aminocsoportot és 2-5 karboxilcsoportot tartalmaznak, ennek megfelelően 3-6 deprotonálódási állandóval (pK) jellemezhetők, amelyeket a 4. és 5. táblázatban foglaltam össze. Ezek jó egyezést mutatnak korábban ezekre a ligandumokra közölt adatokkal [180].

4. táblázat: A vizsgált, aszparaginsavat tartalmazó peptidek deprotonálódási állandói ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KNO}_3$, $T = 298 \text{ K}$)

pK_n	DA	DD	DDD	DDDD	AA[180]
pK_1	2,73(2)	2,52(1)	1,94(1)	2,40(6)	3,08
pK_2	3,60(2)	3,27(2)	3,01(5)	3,16(3)	8,26
pK_3	7,90(1)	4,33(2)	3,84(3)	3,79(3)	–
pK_4	–	8,08(8)	4,71(2)	4,35(2)	–
pK_5	–	–	8,10(1)	5,02(2)	–
pK_6	–	–	–	8,25(8)	–
$pK(\text{NH}_3^+)$	7,90	8,08	8,10	8,25	8,26

5. táblázat: A vizsgált, glutaminsavat tartalmazó peptidek deprotonálódási állandói ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KNO}_3$, $T = 298 \text{ K}$)

pK_n	DE	EE	AA[180]
pK_1	2,46(5)	2,41(6)	3,08
pK_2	3,38(3)	3,73(3)	8,26
pK_3	4,43(2)	4,53(2)	–
pK_4	8,02(1)	8,09(1)	–
$pK(\text{NH}_3^+)$	8,02	8,09	8,26

A karboxilcsoportok deprotonálódása átfedő lépésben, kooperatív módon, játszódik le, így a makroszkópikus állandók ebben az esetben nem rendelhetők hozzá az egyes csoportokhoz, nem úgy, mint az ammóniumcsoport esetében, amely pK -értéke minden esetben a legnagyobb. A táblázat adatai alapján az N-terminális helyzetben lévő aszparaginsav kismértékben csökkenti az ammóniumcsoport deprotonálódási állandóját az egyszerű peptidekhez képest (például AA) (4., 5. táblázat) [47].

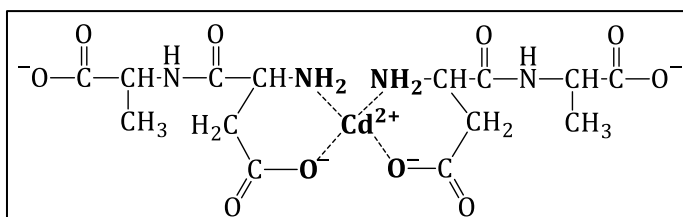
A kadmium(II)-peptid rendszerekben a titrálások során a lúgos pH-tartományban minden esetben fehér csapadék jelent meg, amely további KOH oldat adagolásra sem oldódott fel, még nagy pH-értéken sem, így ez a csapadék $\text{Cd}(\text{OH})_2$ volt. A különböző rendszerekben keletkező komplexek összetételét és stabilitási állandóit a 6. táblázat mutatja be (a ligandumok eltérő bázicitása miatt a komplexek töltéseit nem tüntettem fel).

6. táblázat: A kadmium(II)komplexek összetétele és stabilitási állandói ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KNO}_3$, $T = 298 \text{ K}$)

$\lg\beta(\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r)$	DA	DD	DDD	DDDD	DE	EE
$[\text{CdH}_2\text{L}]$	–	–	–	15,74(3)	–	–
$[\text{CdHL}]$	–	9,61(16)	10,32(2)	11,08(2)	10,23(5)	10,58(3)
$[\text{CdL}]$	2,81(9)	3,38(2)	3,82(4)	4,20(3)	3,70(3)	3,68(3)
$[\text{CdL}_2]$	5,24(19)	–	–	–	–	–
$[\text{CdH}_1\text{L}]$	–	–5,87(5)	–6,13(2)	–	–5,30(3)	–5,52(8)
pK ($[\text{CdH}_2\text{L}]/$ $[\text{CdHL}]$)	–	–	–	4,66	–	–
pK ($[\text{CdHL}]/$ $[\text{CdL}]$)	–	6,23	6,50	6,88	6,53	6,90
pK ($[\text{CdL}]/$ $[\text{CdH}_1\text{L}]$)	–	9,25	9,95	–	9,00	9,20
$\lg(K_1/K_2)$	0,38	–	–	–	–	–

A komplexképződési folyamat a gyengén savas pH-tartományban, protonált komplexek keletkezésével kezdődik el. A $[\text{CdH}_2\text{L}]$ komplexben az aminosoprot és egy karboxilcsoport protonált, amelyet alátámaszt (i) a $\text{CdH}_2\text{L} \rightleftharpoons \text{CdHL} + \text{H}^+$ reakcióra számolható $\text{pK}([\text{CdH}_2\text{L}]/[\text{CdHL}])$ -érték egyezése a szabad tetrapeptid egy

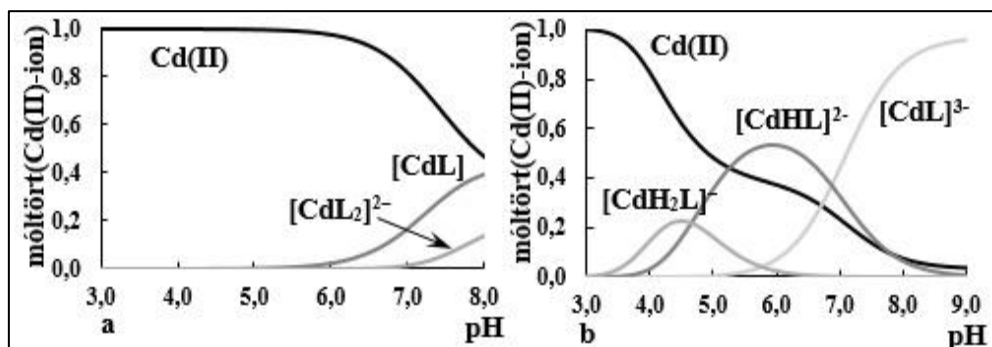
karboxilcsoportjának pK -értékével (ii) valamint az, hogy a $CdHL \rightleftharpoons CdL + H^+$ egyensúlyi folyamatra jellemző $pK([CdHL]/[CdL])$ -értékek jóval kisebbek a szabad ligandum deprotonálódására jellemző $pK(NH_3^+)$ -értékeknél, de nagyobbak, mint a karboxilcsoportokra vonatkozó deprotonálódási állandók. Ez alapján a pH növelésével, az ammóniumcsoport deprotonálódásával keletkező $[CdL]$ komplexben a fémion az N-terminális amino- és karboxilát-csoporthoz koordinálódik – $[NH_2, COO^-]$ koordinációs móddal. Ez a DA ligandum esetén biszkomplex képződését teszi lehetővé (3. ábra). A biszkomplex képződésének kedvezményezettségét az erre a komplexre jellemző $\lg(K_1/K_2)$ adat, a statisztikailag várt 0,6 értéktől jóval kisebb volta, erősíti meg. Vegyes hidroxokomplexek létrejöttét



3. ábra: A $[Cd(DDA)_2]^{2-}$ komplex sematikus ábrája

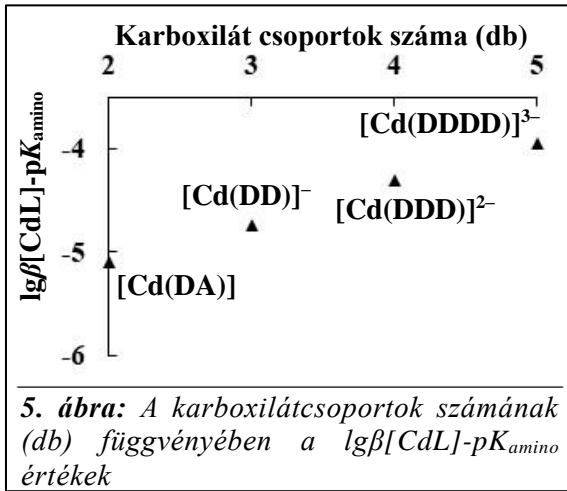
feltételezzük egy a koordinációs szférában lévő vízmolekula deprotonálásával, ami a $pK([CdL]/[CdH_1L])$

alapján pH 9 körül játszódik le. Ezen komplexek azonban a fémion hidrolízisét nem akadályozzák meg nagy pH-n. A koordinált karboxilátcsoportok számának növekedésével a komplexképződés már a savas pH-tartományban megvalósul, amit jól szemléltetnek a $Cd(II):DA$ és $Cd(II):DDDD$ 1:3 arányú rendszereinek koncentráció-eloszlás görbéi a pH-függvényében (4. ábra), amelyeken látható, hogy a több karboxilát donorcsoportot tartalmazó DDDD peptid esetén már pH 4,5-nél különböző komplexek jelennek meg. A 4. (b) ábrán megfigyelhető az is, hogy még



4. ábra: A $Cd(II):DA$ 1:3 (a) és a $Cd(II):DDDD$ 1:3 (b) arányú rendszereinek koncentráció-eloszlás görbéi a pH-függvényében ($c_{Cd(II)} = 1,10 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

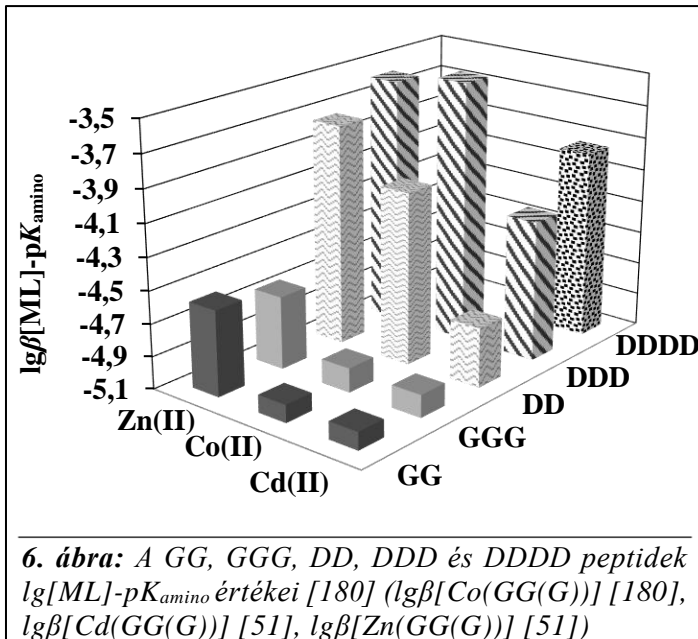
nagy számú karboxilátcsoport jelenlétében is, fiziológiás pH-tartományban,



számottevő a szabad fémion mennyisége az oldatban. A karboxilátcsoportok számának növekedése a [CdL] komplexek stabilitásnövekedését okozza, amelynek sorrendje a következő: DA < DD < EE ~ DE < DDD < DDDD. Ugyanakkor nemcsak a koordinálódó oldalláncok száma, hanem a képződő komplexek

bruttó töltése is növekszik, ami azonban nem akadályozza a komplexképződést. Ezt támasztja alá az 5. ábra, amelyen a karboxilátcsoportok számának függvényében a lgβ[CdL]-pK_{amino} értékek folyamatos növekedése látható.

Ha összehasonlítjuk a 6. ábrán feltüntetett [CdL] komplexek stabilitását azon fém-



ionok komplexeinek stabilitásával, amelyek [NH₂(COO⁻)_x] koordinációs móddal kötik meg a fémionokat komplexeikben, akkor azt figyelhetjük meg, hogy a peptidek nem szelektívek a Cd(II)-ionra a Co(II)- és Zn(II)-ionhoz képest, valamint nem bizonyulnak hatásos fém-

ionmegkötőknek sem, hiszen stabilisabb Zn(II)- és Co(II)-komplexek képződnek. Ugyanakkor a karboxilátcsoportok jelenléte az egyszerű peptidekhez képest (például

GG és GGG) növelik a képződő komplexek stabilitását mindhárom feltüntetett fémion esetében.

Mivel a gyengén koordinálódó aszparaginsav és glutaminsav karboxilátoldallancának koordinációja nem eredményezi kiemelkedően stabilis komplexek létrejöttét, még nagy donoratomszám mellett sem, ezért a vizsgálatokat ezen aminosavakat tartalmazó peptidek irányába nem folytattuk tovább. Az irodalomban már közölt, terminálisan szabad peptidekre vonatkozó adatok alapján a legstabilisabb komplexek a CysGly molekula esetén képződnek ($\lg\beta[\text{CdL}] = 9,84$ [56]). Ezt a tényt, illetve az irodalmi bevezetőben már ismertetett megállapításokat szem előtt tartva a kísérleteket a Cys aminosavat tartalmazó molekulák irányába folytattuk tovább. Ezekhez terminálisan védett peptideket használtunk, mert a terminálisan szabad peptidek esetében más koordinációs módok valósulhatnak meg, mint az a természetben megtalálható, csak oldalláncokon keresztül fémiont koordinálni képes, nagy makromolekulák esetében feltételezhető.

4.2. Ciszteint tartalmazó peptidek

4.2.1. Egy-, illetve két-cisztein-tartalmú peptidek sav-bázis tulajdonságai

A vizsgálatokhoz az egy cisztein aminosavat tartalmazó Ac-SAAC-NH₂ peptidet használtam, amelynek egy deprotonálódásra képes csoportja van, ennek megfelelően egyetlen pK-értékkel jellemezhető, amely a ciszteinhez rendelhető (7. táblázat).

7. táblázat: Egy ciszteint tartalmazó peptidek deprotonálódási állandói ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KNO}_3$, $T = 298 \text{ K}$)

pK _n	Ac-AAAC -NH ₂ [182]	Ac-SAAC -NH ₂	Ac-DAAC -NH ₂ [183]	Ac-HAAC -NH ₂ [184]
pK ₁	8,64	8,79(1)	3,80	6,49
pK ₂	–	–	8,87	8,81

A táblázat adatai azt tükrözik, hogy az általam meghatározott pK-érték jó egyezésben van más, egy ciszteint tartalmazó peptidekével. Emellett az is kiderül, hogy a gyengén

és erősen koordinálódó oldalláncok – aszpartil- és imidazoliloldallánc – nem befolyásolják számottevően a tiolcsoport deprotonálódását.

A két ciszteint tartalmazó peptidek – Ac-SCCS-NH₂, Ac-CSC-NH₂, Ac-CSSC-NH₂, Ac-CGSC-NH₂ – esetében a deprotonálódások átfedő lépésekben történnek, így az értékek nem rendelhetők egy konkrét tiolcsoporthoz sem. A mérésekkel meghatározott p*K*-értékeket a 8. táblázat foglalja össze. A pH-potenciometriával meghatározott állandók értékei jó egyezésben vannak az irodalomban korábban már közölt hasonló ligandumok értékeivel. Az első p*K*-adatok 8,0-8,3, míg a második a 8,8-9,3 pH-tartományban változnak, és a ciszteinek közötti növekvő távolsággal tendencia nem figyelhető meg.

8. táblázat: A két ciszteint tartalmazó peptidek deprotonálódási állandói ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KNO}_3$, $T = 298 \text{ K}$)

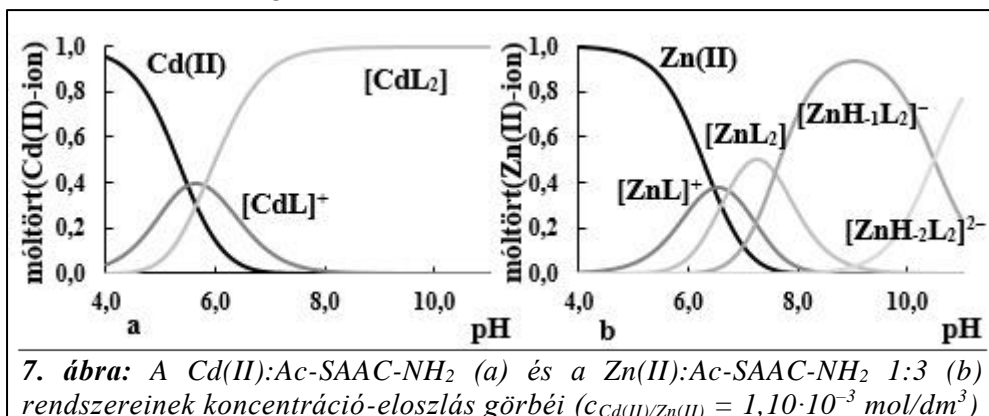
p <i>K</i> _n	Ac-SCCS-NH ₂	Ac-CCSTSDSHHQ-NH ₂ [60]	Ac-CSC-NH ₂	Ac-CGC-NH ₂ [62]	Ac-CSSC-NH ₂	Ac-CGSC-NH ₂	Ac-GCASC DNARAAK-NH ₂ [63]	Ac-CSSACS-NH ₂ [182]
p <i>K</i> ₁	8,13(1)	8,21	8,11(3)	8,03	8,30(1)	8,13(5)	7,97	8,09
p <i>K</i> ₂	8,98(1)	9,07	9,16(5)	9,23	9,34(1)	8,98(1)	9,37	8,82

A továbbiakban a különböző fémionok komplexeinek eredményeit ismertetem, melyek közül Ni(II)-ion koordinációs kémiai viselkedése peptidek jelenlétében eltér a másik két fémionétól, emiatt eltérő összetételű, geometriájú és stabilitású komplexek keletkeznek. Ennek megfelelően külön alfejezetekben tárgyalom a kapott eredményeket: Cd(II), Zn(II) (4.2.2. alfejezet), Ni(II) eredményei (4.2.3. alfejezet).

4.2.2. Egy-, illetve két-cisztein-tartalmú peptidek Cd(II)- és Zn(II)-komplexei

A vizsgálatok során a fémion/ligandum arányokat minden alkalommal 1:1 és 1:4 között változtattuk. A titrálások során csapadék az Ac-SAAC-NH₂ ligandum esetén képződött 1:1 aránynál mindkét fémion esetében: (i) a Cd(II)-ion-tartalmú mintákban pH 8 körül Cd(OH)_2 jelent meg az oldatban, amely nehezen észlelhető és fehér volt, továbbá nem oldódott fel a pH növelésével sem, (ii) a Zn(II)-ion esetén pH 7 körül Zn(OH)_2 jelent meg, ami a pH növelésével feloldódott. A két-cisztein-tartalmú peptidek tanulmányozása során csapadékképződés nem volt megfigyelhető. A kiértékelések során nem vettük figyelembe azt a pH-tartományt, ahol csapadék volt jelen. A keletkező komplexek sztöchiometriáját és stabilitási állandó értékeit a 9. és 10. táblázat tartalmazza.

A Cd(II)- és Zn(II)-Ac-SAAC-NH₂ rendszerekben mono- és biszkomplexek egyaránt keletkeznek, amelyek a Cd(II)-ion esetében képesek visszaszorítani a vegyes hidroxokomplexek keletkezését, ellentétben a Zn(II)-ionnal, aminél az utóbbi komplexek képződése már pH 7 körül elkezdődik. Ezt szemléltetik a 7. ábrán látható koncentráció-eloszlás görbék.



7. ábra: A Cd(II):Ac-SAAC-NH₂ (a) és a Zn(II):Ac-SAAC-NH₂ 1:3 (b) rendszereinek koncentráció-eloszlás görbéi ($c_{\text{Cd(II)/Zn(II)}} = 1,10 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

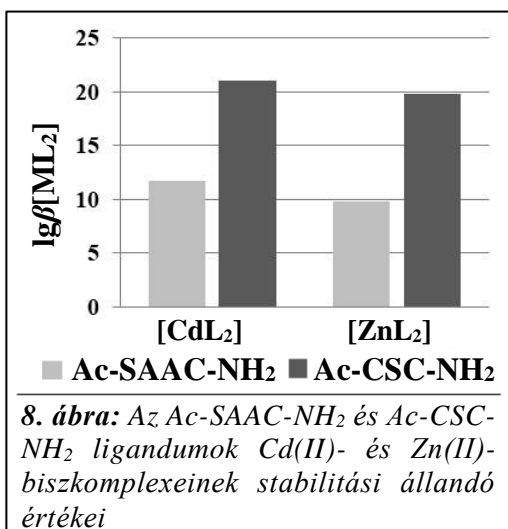
Az egy ciszteint tartalmazó peptidek stabilitási állandóinak (9. táblázat) összehasonlítása alapján a következő megállapítások vonhatók le: (i) a Cd(II)-komplexek stabilitása nagyobb, mint a Zn(II)-komplexeké; (ii) a cisztein mellett jelenlevő koordinálódásra képes donorcsoportok (D (Asp) és H (His)) növelik a keletkező komplexek stabilitását mindkét fémion esetén a ligandum kétfogú koordinációjának köszönhetően; (iii) a ligandumok kétfogú

9. táblázat: Az Ac-SAAC-NH₂ molekula Cd(II)- és Zn(II)-komplexeinek stabilitási állandó értékei ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KNO}_3$, $T = 298 \text{ K}$)

$\lg\beta[M_pH_qL_r]$	Ac-SAAC-NH ₂		Ac-DAAC-NH ₂ [183]		Ac-HAAC-NH ₂ [184]	
	Cd(II)	Zn(II)	Cd(II)	Zn(II)	Cd(II)	Zn(II)
[ML ₂]	11,69(6)	9,80(8)	11,9(1)	10,34(6)	13,34	13,58
[MH ₁ L ₂]	–	2,22(7)	–	–	2,27	3,06
[MH ₂ L ₂]	–	–8,27(9)	–	–	–	–
[MHL]	–	–	–	–	12,54	12,05
[ML]	5,96(6)	5,00(8)	6,51(5)	5,32(6)	7,7	7,02
[MH ₁ L]	–	–	–3,2(1)	–3,30(13)	–2,35	–0,35
[MH ₂ L]	–	–	–	–13,32(6)	–14,21	–10,39
$\text{p}K$ ([ML ₂]/ [MH ₁ L ₂])	–	7,58	–	–	11,07	10,52
$\text{p}K$ ([MH ₁ L ₂]/ [MH ₂ L ₂])	–	10,49	–	–	–	–
$\lg(K_1/K_2)$	0,23	0,20	1,08	0,30	2,06	0,46

(A ligandumok eltérő bázicitása miatt a komplexek töltését nem tüntettem fel.)

koordinációja akadályozza a második ligandum belépését, amit a $\lg(K_1/K_2)$ értékek növekedésében nyilvánul meg. Ez a kadmium(II)ionnál nagyobb mértékben



érvényesül.

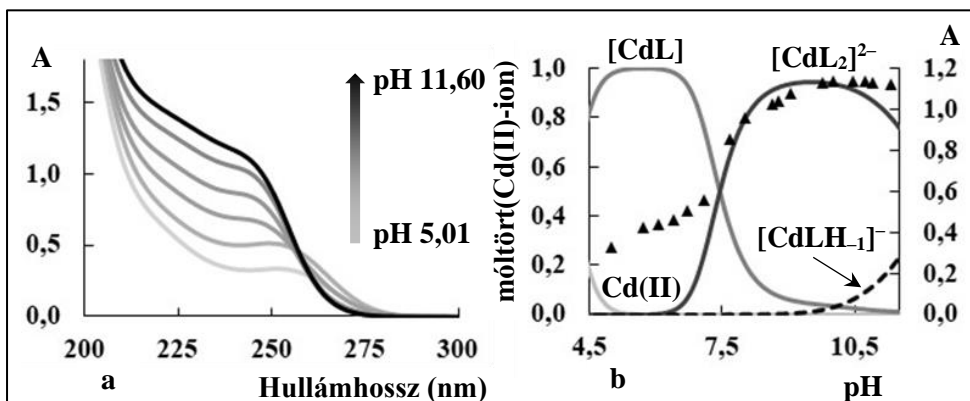
Az újabb cisztein oldallánc megjelenése a szekvenciában, ezáltal a fémionok koordinációs szférájában, szignifikáns komplex stabilitásnövekedést eredményez az egycisztein-tartalmú peptidekhez képest, amely növekedést a 8. ábra szemléltet. Mono- és biszkomplexeik egyaránt keletkeznek (10. táblázat) és utóbbi, a $\lg(K_1/K_2)$ származtatott állandók

alapján, az Ac-CSC-NH₂ esetén képződik a legkönnyebben mindkét fémionnál. Emellett a biszkomplexek képződése kevésbé kedvező az egy ciszteint tartalmazó peptideknél tapasztaltnál képest. A biszkomplexekre kapott stabilitási állandók értéke hasonló az irodalomban közölt két-cisztein-tartalmú peptidek eredményeihez (14. táblázat). Nagy pH-tartományban (~8,5-10) vegyes hidroxokomplexek ekkor is kialakulnak, amelyek a fémionok hidrolízisét megakadályozzák.

10. táblázat: A két ciszteint tartalmazó peptidek Cd(II)- és Zn(II)-komplexeinek stabilitási állandó értékei ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KNO}_3$, $T = 298 \text{ K}$)

$\lg\beta[\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r]$	Ac-SCCS-NH ₂		Ac-CSC-NH ₂		Ac-CSSC-NH ₂		Ac-CSSACS-NH ₂ [182]	
	Cd(II)	Zn(II)	Cd(II)	Zn(II)	Cd(II)	Zn(II)	Cd(II)	Zn(II)
$[\text{ML}_2]^{2-}$	19,10(18)	16,71(12)	21,04(14)	19,77(5)	21,09(17)	19,25(11)	18,59	17,07
$[\text{ML}]^-$	12,60(3)	10,05(2)	12,69(2)	10,11(4)	13,04(2)	10,47(2)	11,47	9,16
$[\text{MH}_-1\text{L}]^-$	2,59(5)	1,36(6)	2,57(7)	2,21(5)	2,38(5)	2,15(5)	0,83	0,88
$[\text{MH}_-2\text{L}]^{2-}$	–	–8,84(7)	–9,07(10)	–8,17(6)	–	–8,40(6)	–	–9,82
$\lg(K_1/K_2)$	6,10	3,39	4,34	0,45	4,99	1,69	4,35	1,25

A komplexekben kialakuló koordinációs módok megismerésére, vagyis a koordinált tiolátcsoportok számának megbecslésére UV-spektroszkópiás méréseket



9. ábra: A Cd(II):Ac-SCCS-NH₂ 1:2 arányú abszorpciós spektruma (a), illetve koncentráció-eloszlás görbéi együtt ábrázolva a 240 nm-en rögzített abszorbancia értékekkel (b) ($c_{\text{Cd(II)}} = 1,20 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$)

végeztem. A szabad ligandum tiolcsoportjának deprotonálódásával párhuzamosan egy növekvő intenzitású váll jelenik meg 230 nm-nél. A Cd(II)-komplexek esetén szintén egy váll jelenik meg a 220-250 nm hullámhossz-tartományban, már savas pH-tartományban (9. (a) ábra), amely intenzitása a pH növelésével nő. A komplexképződést jól szemlélteti a komplexek eloszlásával együtt ábrázolt abszorbancia értékek pH-függése (9. (b) ábra). Hasonló vizsgálatokat végeztem a cink(II)komplexeknél is, azonban a Zn(II)-ion jelenlétében mért spektrumok alig mutattak eltérést a szabad liganduméhoz képest, így spektrális paramétereket nem tudtam meghatározni. A szabad ligandumokat és a Cd(II)-komplexeket jellemző spektrális paramétereket a 11. és 12. táblázat tartalmazza. Ezek alapján az egyszerűen és kétszeresen deprotonált peptidekre 6000 és 12000 M⁻¹cm⁻¹-es moláris abszorbancia érték jellemző.

11. táblázat: A vizsgált szabad ligandumokra jellemző spektrális paraméterek (λ_{\max} (nm), ε (M⁻¹cm⁻¹))

	Ac-SAAC-NH ₂		Ac-SCCS-NH ₂		Ac-CSC-NH ₂		Ac-CSSC-NH ₂		Ac-CGSC-NH ₂	
	λ_{\max}	ε	λ_{\max}	ε	λ_{\max}	ε	λ_{\max}	ε	λ_{\max}	ε
[HL] ⁻	–	–	230	5500	230	5500	229	5500	230	6000
[L] ²⁻	230	6000	230	10000	230	10000	230	10000	230	10000

A [Cd(Ac-SAAC-NH₂)₂] komplexében két tiolcsoport koordinálódik (2x[S⁻, ε = 8000-10000 M⁻¹cm⁻¹)), aminek moláris abszorpciós koefficiense egyezésben van a többi, két-cisztein-tartalmú peptid monokomplexére jellemzővel ([S⁻,S⁻] (ε = 8000-10000 M⁻¹cm⁻¹)).

12. táblázat: Az Cd(II)-komplexekre jellemző spektrális paraméterek (λ_{\max} (nm), ε (M⁻¹cm⁻¹))

	Ac-SAAC-NH ₂		Ac-SCCS-NH ₂		Ac-CSC-NH ₂	
	λ_{\max}	ε	λ_{\max}	ε	λ_{\max}	ε
[CdL] ⁻	-	-	243	8000	243	8000
[CdL ₂] ²⁻	245	10000	243	24000	243	22000

	Ac-CSSC-NH ₂		Ac-CGSC-NH ₂		Ac-CSSACS-NH ₂ [182]	
	λ_{\max}	ϵ	λ_{\max}	ϵ	λ_{\max}	ϵ
[CdL] ⁻	243	9000	243	10000	250	10000
[CdL ₂] ²⁻	237	22000	243	26000	241	25000

Utóbbi peptidek biszkomplexeinek értéke körülbelül kétszeres, ami alátámasztja négy donorcsoport részvételét a koordinációban (2x[S⁻,S⁻], $\epsilon = 22000\text{-}26000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A komplexek koordinációs módjait az is alátámasztja, hogy a méréseink eredményei összhangban vannak az irodalomban már megjelentekkel: [CdL₁], ahol L₁ = Ac-ELECKDCSSV-NH₂ $\epsilon = 11780 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ([S⁻,S⁻]), [Cd(L₂)₂], ahol L₂ = Ac-ELECKDCSHV-NH₂ $\epsilon = 25670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (2x[S⁻,S⁻]), [Cd(L₃)₂], ahol L₃ = Ac-DYGVCEKCHS-NH₂ $\epsilon = 24900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (2x[S⁻,S⁻]) [65].

Több esetben próbálkoztunk ¹¹³Cd NMR-spektrumok felvételével, ami azonban csak egyetlen esetben járt sikerrel. Az [Cd(Ac-CSSC-NH₂)₂]²⁻ komplexet tartalmazó, erősen lúgos oldat spektrumában egyetlen csúcs jelent meg 648 ppm értéknél, ami megfeleltethető más molekulák [4S⁻] koordinációs módú komplexeinek kémiai eltolódásával, amelyet 13. táblázat mutat be. Ez alátámasztja négy tiolátcsoport jelenlétét a fémion koordinációs szférájában, illetve összhangban van az UV-spektroszkópiás vizsgálatból levont következtetésekkel.

13. táblázat: *Különböző, négy tiolátcsoport részvételével keletkező, komplexek kémiai eltolódása ¹¹³Cd NMR-spektrumokban*

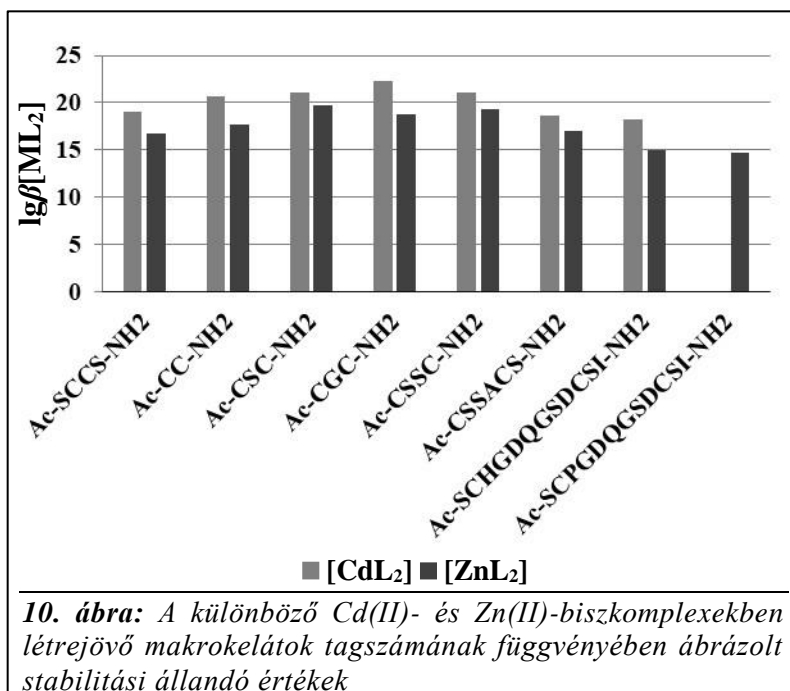
Kompleképző molekula	Koordinációban résztvevő tiolátcsoportok száma (db)	Kémiai eltolódás (ppm)
Ac-CSSC-NH ₂	4	648
C ₂ H ₅ SH [185]	4	648
n-C ₃ H ₇ SH [185]	4	647
metallotioneinek [185]	4	610-680

A ciszteinek távolságának a makrokélatok stabilitására gyakorolt hatását vizsgáló készítem a 14. táblázatot, amelyben a makrokélatok tagszáma és a komplexek stabilitása szerepel – de az egyszerűség kedvéért a komplexek töltése nem. A táblázat adatainak összehasonlításával látható, hogy akkor keletkeznek a

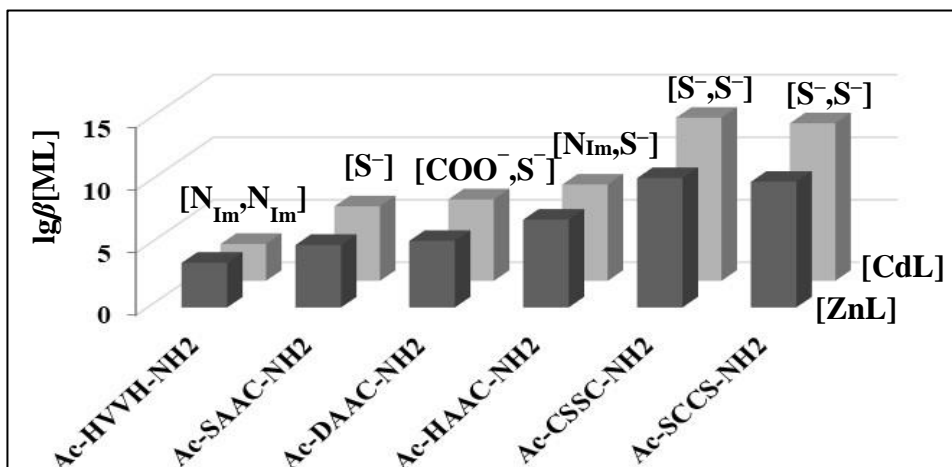
legstabilisabb komplexek, ha a makrokelát tagszáma 12 vagy 15. Ezt jól szemlélteti a 10. ábra is.

14. táblázat: A különböző ligandumok esetén megvalósuló makrokelát gyűrűk tagszáma és a biszkomplexeik stabilitási állandói

	Ac-SCCS-NH ₂	Ac-CC-NH ₂ [60]	Ac-CSC-NH ₂	Ac-CGC-NH ₂ [62]	Ac-CSSC-NH ₂	Ac-CSSACS-NH ₂ [182]	Ac-SCHGDQGSDCSI-NH ₂ [67,68]	Ac-PCPGDQGSDCSI-NH ₂ [69]
$\lg\beta[\text{CdL}_2]$	19,10	20,71	21,04	22,3	21,09	18,59	18,23	–
$\lg\beta[\text{ZnL}_2]$	16,71	17,63	19,77	18,81	19,25	17,07	15,02	14,72
kelátgyűrű tagszáma	9	9	12	12	15	18	30	30

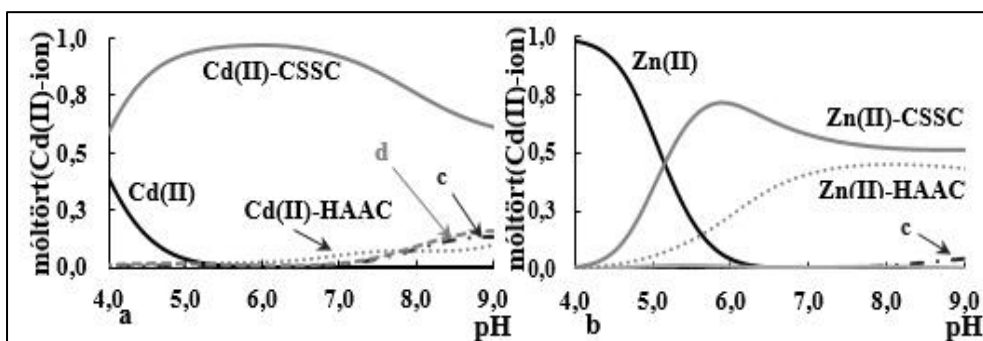


A tiolátsoportok jó fémion-megkötőképességét ezen lágy karakterű fémionok esetén, illetve azt, hogy kiemelkedően stabilis komplexeket hoznak létre, a 11. ábra illusztrálja, amelyen különböző koordinációs módokat tartalmazó Cd(II)- és Zn(II)-



11. ábra: Különböző koordinációs módú monokomplexek stabilitási állandói (Ac-HVVH-NH₂[186], Ac-DAAC-NH₂[183], Ac-HAAC-NH₂[184])

monokomplexek stabilitási állandói szerepelnek. A legkevésbé stabilis komplexek akkor keletkeznek, amikor a fémionokhoz két imidazolilcsoport koordinálódik, a legstabilabb pedig akkor, ha két tiolátsoport. Ez a különbség még kifejezettebb, ha olyan rendszerek predomancia görbéit ábrázoljuk, amelyek a Cd(II)- vagy Zn(II)-iont és két különböző donoresoportot tartalmazó ligandumokat 1:1:1 arányban tartalmazzák (12. ábra).



12. ábra: A Cd(II)(a)/Zn(II)(b):SAAC:DAAC[183]:HAAC[184]:CSSC 1:1:1:1 rendszerekben képződő különböző ligandumot tartalmazó komplexek összegeinek koncentráció-eloszlás görbéi a pH-függvényében, (c) a DAAC és (d) az SAAC ligandumok komplexeit jelöli ($c_{Cd(II)/Zn(II)} = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

4.2.3. Két ciszteint tartalmazó peptidek Ni(II)-komplexei

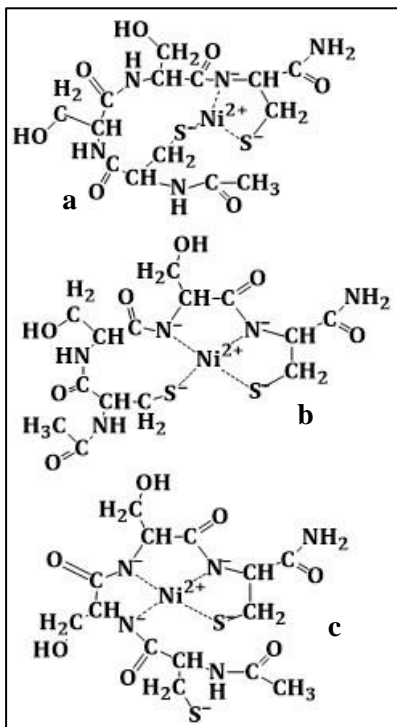
A nikkell(II)ion-tartalmú minták titrálásakor csapadék leválását nem tapasztaltam egyik esetben sem, és az oldatok színe savas és semleges pH-értékeken sárgás, illetve vöröses volt, majd nagyobb pH-tartományban pedig barna. A spektroszkópiás mérések ideje alatt a levegő oxigén tartalmának távoltartására erősen törekedtem, ezért a fotometriás mérésekhez jól zárható küvettát, a CD mérésekhez pedig egyedi mintákat használtam. Erre azért volt szükség, mert azt tapasztaltuk, hogy a Ni(II)-iont és peptidet tartalmazó mintákban levegőn, hosszabb állás után, vélhetően, valamilyen redoxi folyamat megy végbe, nem pedig a várt komplexképződési folyamatok. A fent említett mérési körülményeket alkalmazva azonban a minták színváltozásai megfeleltek a titrálás során tapasztaltaknak, ezért nem feltételeztük redoxi folyamatok lejátszódását. A vizsgálatokat 1:1 és 1:3 fémion/ligandum aránynál végeztem. A különböző peptidek esetén képződő komplexek összetételét és stabilitási állandóit a 15. táblázatban foglaltam össze. A monokomplexek mellett polinukleáris komplexek képződését is feltételezzük a savas és gyengén lúgos pH-tartományban, biszkomplexek keletkezését pedig nem tapasztaltuk. A $[\text{Ni}_3\text{L}_4]^{2-}$ és $[\text{NiL}]$ komplexek vélhetően csak tiolát koordinációt tartalmaznak – melyet a spektroszkópiás vizsgálatok megerősítettek, ám az első részecskében a tiolát- S^- donorcsoport hídligandumként egyszerre két fémionhoz is kötődik. A makrokelátszerkezetű $[\text{NiL}]$ komplex stabilitása a tagszám növekedésével csökken: $\lg\beta[\text{Ni}(\text{Ac-CSSC-NH}_2)] = 8,34$ és $\lg\beta[\text{Ni}(\text{Ac-CSSACS-NH}_2)] = 7,39$. Minden esetben megvalósultak extra lúgfogyasztó folyamatok, amelyek a ligandumok peptid-NH donorjainak deprotonálódásához és koordinációjához rendelkeznek, és amelyeket a táblázat alsó soraiban található származtatott állandók értéke jellemez. Az egy ciszteint tartalmazó peptid esetén (Ac-SAAC-NH_2) a tiolátcsoport horgonycsoportként elősegíti a peptid szekvenciájában megelőző helyzetben lévő peptidnitrogén csoportok kooperatív deprotonálódását és koordinációját. Az egy hisztidin-tartalmú peptidek hasonló viselkedést mutatnak, de a peptidváz donorok deprotonálódása nagyobb pH-n játszódik le. Amennyiben a ligandum két ciszteint tartalmaz: (i) ha a közöttük lévő aminosavak száma nulla vagy

15. táblázat: A Ni(II)-ion két-cisztein-tartalmú peptidek komplexeinek stabilitási állandói ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KCl}$, $T = 298 \text{ K}$)

$\lg\beta(\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r)$	Ac-SAAc-NH ₂ [182]	Ac-SCCS-NH ₂	Ac-CSC-NH ₂	Ac-CSSC-NH ₂	Ac-CGSC-NH ₂	Ac-CSSACS-NH ₂ [182]	Ac-SKPKTNAKHA-NH ₂ [187]
[Ni ₃ L ₄]	-	43,93(8)	42,37(9)	39,61(9)	38,03(12)	35,57(18)	-
[NiH ₃ L]	-	-	-	-	-	-	33,79
[NiHL]	-	-	-	-	-	-	17,19
[NiL]	-	-	-	8,34(3)	7,90(3)	7,39(7)	9,06
[NiH ₋₁ L]	-	-	-	-0,63(4)	0,38(8)	-	-0,48
[NiH ₋₂ L]	-12,01	-	-6,19(7)	-10,04(4)	-8,93(5)	-9,67(4)	-11,24
[NiH ₋₃ L]	-19,36	-	-	-21,05(4)	-19,98(5)	-20,81(4)	-21,67
[NiH ₋₁ L] _x	-	-	2,84(4)	-	-	-	-
[Ni ₂ H ₋₂ L ₂] _x	-	11,55(2)	-	-	-	-	-
[Ni ₂ H ₋₃ L ₂] _x	-	0,98(6)	-	-	-	-	-
pK ₁ (N ⁻)	7,35	-	6,1*	8,97	7,52	8,69	8,24
pK ₂ (N ⁻)		-	9,03	9,41	9,31		
pK ₃ (N ⁻)		-	-	11,01	10,05	11,14	

*koncentráció-eloszlási görbe alapján megállapított adat

(A ligandumok eltérő bázicitása miatt a komplexek töltését nem tüntettem fel.)
egy (Ac-SCCS-NH₂ és Ac-CSC-NH₂) akkor egy, illetve két peptidnitrogén koordinált részecske képződik, két egymástól elváló lépésben (15. (b) és 18. (b) ábra); (ii) ha

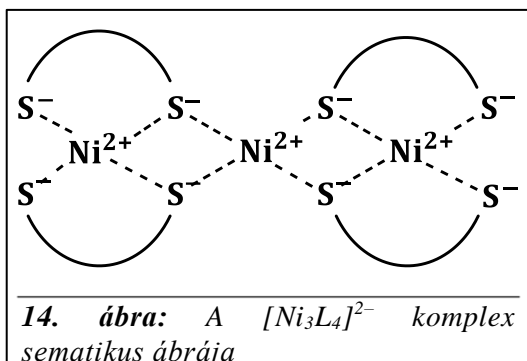


13. ábra: Az Ac-CSSC-NH₂ peptid [NiH₋₁L]⁻ (a), [NiH₋₂L]²⁻ (b) és [NiH₋₃L]³⁻ (c) komplexének feltételezett szerkezete

a távolság két aminosav (Ac-CSSC-NH₂ és Ac-CGSC-NH₂), a C-terminális ciszteint megelőző három peptid-NH-csoport szintén egymástól független lépcsőkben deprotonálódik és telíti a Ni(II)-ion koordinációs szféráját (13. ábra). A fémion megkötésében a kisebb pH-tartományban keletkező [NiL] összetételű komplexekben mind a két tiolátcsoport részt vesz, ami a [NiH₋₁L] (13. (a) ábra) komplexben akadályozza a következő peptidnitrogén koordinációját. A pH növelésével keletkező [NiH₋₂L] részecskében stabilis (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer ([S⁻,N⁻,N⁻,S⁻] koordinációs mód) jön létre, amely képződése kedvezményezett folyamat (13. (b) ábra). A [NiH₋₃L] komplex csak úgy alakulhat ki, ha egy tiolátcsoport a koordinációs szférában peptid-N⁻csoportra cserélődik, ami 10-11-es pH körül játszódik le, ez indokolja a pK₃(N⁻) Ac-

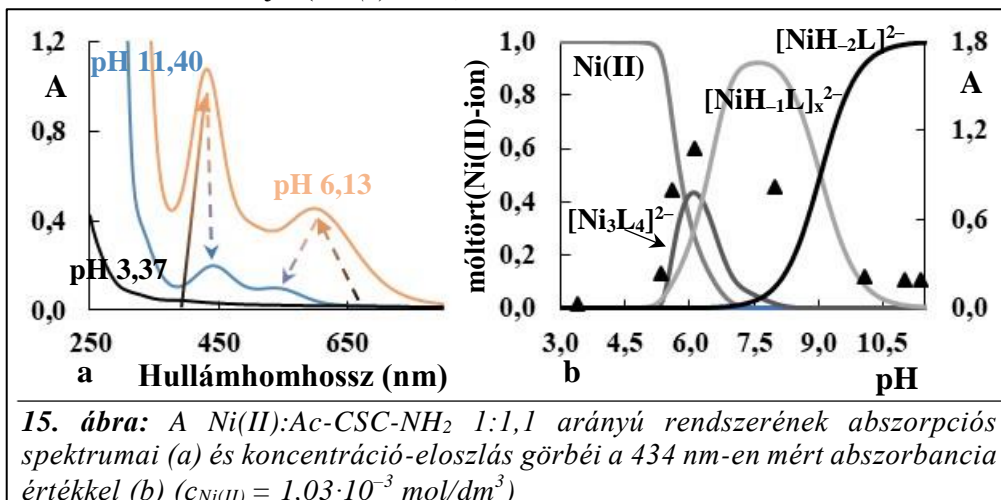
SKPKTNAKHA-NH₂ peptidéhez viszonyított nagyobb értékét. (iii) Ha a peptid két ciszteint tartalmaz három aminosav távolságban (Ac-CSSACS-NH₂), akkor az N-terminális tiolátcsoport kevésbé gátolja a C-terminális ciszteint megelőző, két peptid-N⁻ csoport deprotonálódását és koordinációját, mert bár ez a folyamat nagyobb pH-n történik, mint az Ac-SAAC-NH₂ esetében, ugyanakkor kooperatív módon – amit egyértelműen a ciszteinek közötti nagyobb távolság eredményez. A pK₃(N⁻) ebben az esetben is, hasonlóan az Ac-CSSC-NH₂ és Ac-CGSC-NH₂ ligandumokhoz, nagy, ami szintén azzal magyarázható, hogy a tiolátcsoportnak a koordinációs szférából ki kell kerülnie az [N⁻,N⁻,N⁻,S⁻] koordináció megvalósulásához (13. (c) ábra).

4.2.3.1. A $[\text{Ni}_3\text{L}_4]^{2-}$ komplex tulajdonságai



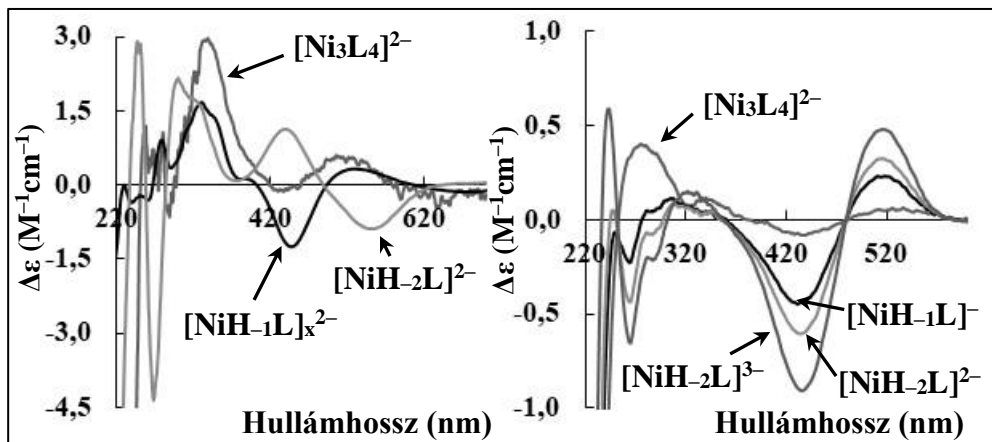
A $[\text{Ni}_3\text{L}_4]^{2-}$ összetételű komplex feltételezett szerkezetét mutatja be a 14. ábra. Meg kell azonban jegyezni, hogy nem csak két, hanem több egység egymáshoz kapcsolódására is van lehetőség polinukleáris komplex keletkezése közben. A többmagvú komplex

képződését támasztja alá, hogy az abszorpciós spektrumok intenzitása a ligandumtól függően 6-8 pH-ig (15. (a) ábra), a polinukleáris részecske koncentrációjának maximumáig, növekszik – kiugróan nagy moláris abszorbancia értéket elérve ($\epsilon \sim 1100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) – majd pedig csökken, miközben az abszorpciós maximumok hullámhossza eltolódik, amely jelenséget a polinukleáris komplex megszűnése idézi elő. A 434 nm-en rögzített abszorbancia értékek pH-függése közel jól követi a $[\text{Ni}_3\text{L}_4]^{2-}$ koncentrációját (15. (b) ábra).

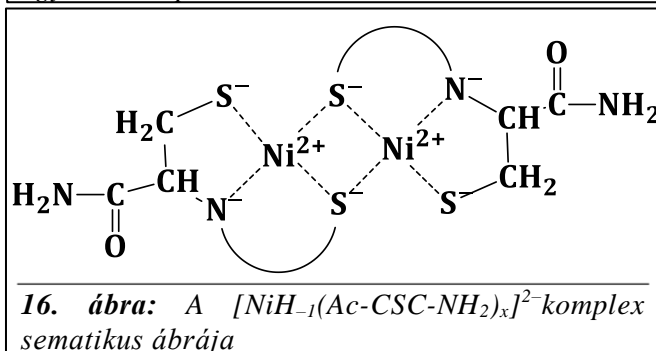


4.2.3.2. A $[\text{NiH}_1\text{L}]$ komplex tulajdonságai

A peptidek vázában található, a horgonycsoportot megelőző, első peptid-NH-donoratom deprotonálódása pH 7,5 felett kezdődik el a $[\text{NiH}_1\text{L}]^-$ komplex keletkezésével. Amennyiben megvizsgáljuk az Ac-CSC-NH₂ és Ac-CSSC-NH₂



17. ábra: Az Ac-CSC-NH₂ (a) és Ac-CSSC-NH₂ (b) Ni(II)-komplexeinek egyedi CD-spektrumai



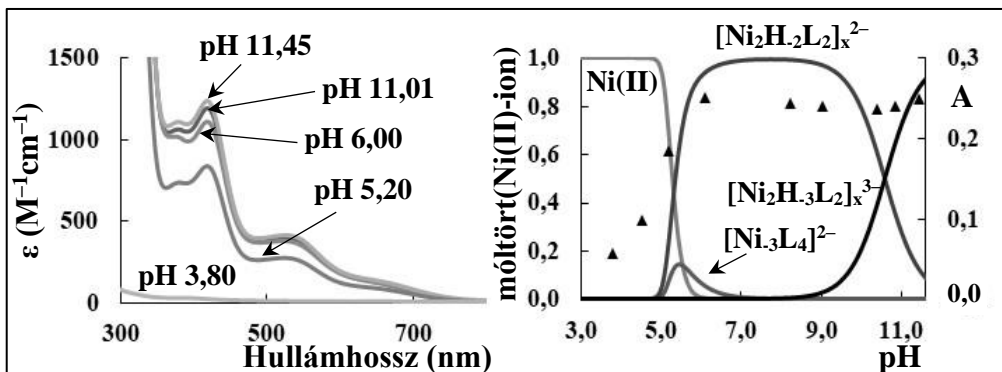
16. ábra: A $[\text{NiH}_{-1}(\text{Ac-CSC-NH}_2)_x]^{2-}$ komplex sematikus ábrája

peptidek ezen komplexeinek egyedi spektrumait, az látható, hogy míg az első peptid esetében a spektrum rosszul definiált az UV-tartományban, addig a második

nem (17. ábra), amiből arra következtetünk, hogy a $[\text{NiH}_{-1}(\text{Ac-CSC-NH}_2)]$ részecske többmagvú. Ez azért lehetséges, mert a $[\text{S}^-, \text{N}^-, \text{S}^-]$ koordinációs mód megvalósulásakor a fémion koordinációs szférája telítetlen, vagyis egy, másik ligandumtól származó, újabb tiolátsoport koordinálódhat hozzá (16. ábra). Biskomplex keletkezését nem tudtuk kimutatni, így feltételezhető, hogy az első peptidnitrogén deprotonálódását és koordinációját követően is megmarad a polinukleáris szerkezet (legalábbis részben) és csak a második peptid-N⁻ deprotonálódását követően alakul ki egymagvú részecske számottevő mennyiségben, amit a spektrális változások is alátámasztanak.

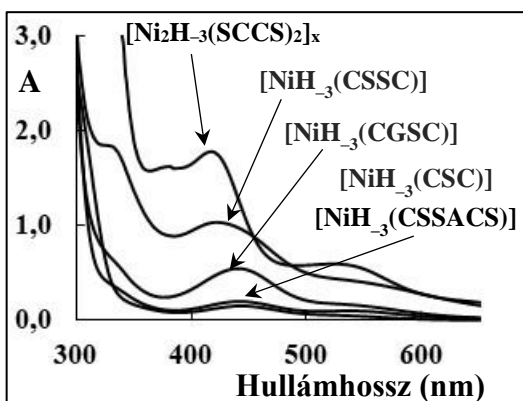
4.2.3.3. A $[\text{Ni}_2\text{H}_2\text{L}_2]_x$ és $[\text{Ni}_2\text{H}_3\text{L}_2]_x$ komplexek tulajdonságai

Az Ac-SCCS-NH₂ ligandum esetében a teljes pH-tartományban többmagvú komplexek vannak jelen, mivel nagy moláris abszorbanciával jellemezhető UV-látható-spektrumokat kaptam minden fémion/ligandum aránynál. Ezeknek csak az



18. ábra: Az $Ni(II):Ac-SCCS-NH_2$ 1:2,6 arányú rendszerének abszorpciós spektrumai ($c_{Ni(II)} = 1,58 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$) (a) és az 1:2,6 fémion/ligandum rendszer koncentráció-eloszlás görbéi az 527 nm-en mért abszorbancia pH-függésével (b) ($c_{Ni(II)} = 5,01 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$)

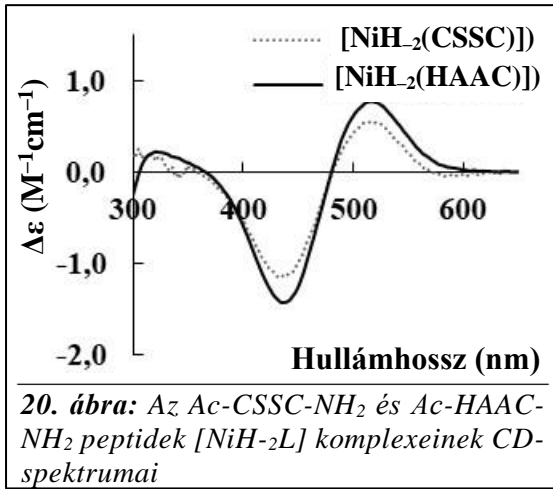
intenzitása változik pH 6 felett, de a lefutása nem (18. (a) ábra). Ezt mutatja be a



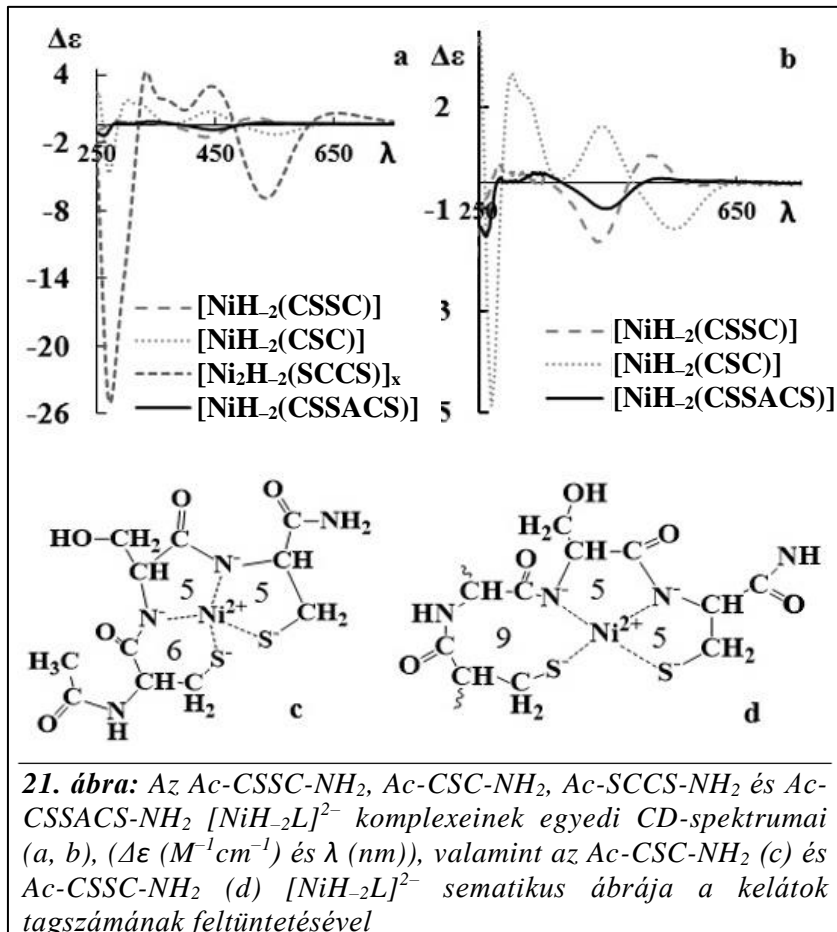
19. ábra: Az erősen lúgos közegben ($pH > 11$) felvett egyedi spektrumok

ligandumfelesleget tartalmazó minta analízisekor rögzített abszorbancia értékek pH-függése is (18. (b) ábra). Összehasonlítva az összes két ciszteint tartalmazó peptid erősen lúgos közegben felvett spektrumait (19. ábra) látható, hogy az $Ac-SCCS-NH_2$ komplexe esetén eltérés mutatkozik a többihez képest, ami a komplexek eltérő szerkezetéből fakad. A fémion

megkötésében javarészt a két tiolátcsoport és a két cisztein aminosavat összekötő peptid- N^- vesz részt ($[Ni_2H_2L_2]_x^{2-}$), ugyanakkor erősen bázikus közegben már az N-terminális felé következő peptid- N^- helyettesíthet egy tiolát- S^- donort ($[Ni_2H_3L_2]_x^{3-}$, $pK([Ni_2H_2L_2]_x/[Ni_2H_3L_2]_x) = 10,57$). Erre bizonyíték a 350 nm körüli $S^- \rightarrow Ni(II)$ és a 271 nm-nél megjelenő $N^- \rightarrow Ni(II)$ töltésátviteli sáv jelenléte a teljes pH-tartományban, valamint az intenzitásban bekövetkező kismértékű csökkenés és növekedés, amely az új komplex kialakulása miatt jelentkezik (18. (b) ábra). A fémion koordinációját és a síknégyzetes geometriát az erős d-d elektronátmenetek jelzik.

4.2.3.4. A $[\text{NiH}_2\text{L}]$ komplex tulajdonságai

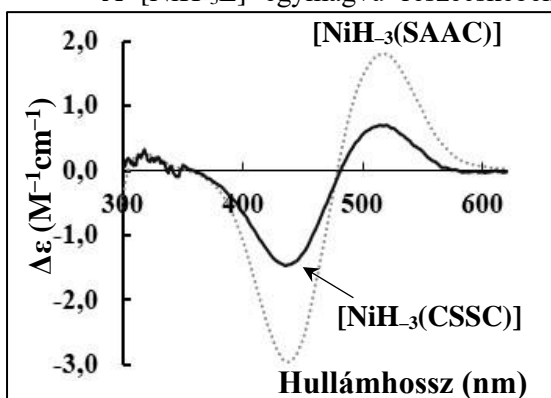
és (b) ábra különböző $[\text{NiH}_2\text{L}]$ komplexek egyedi CD-spektrumait mutatja be. A 21.



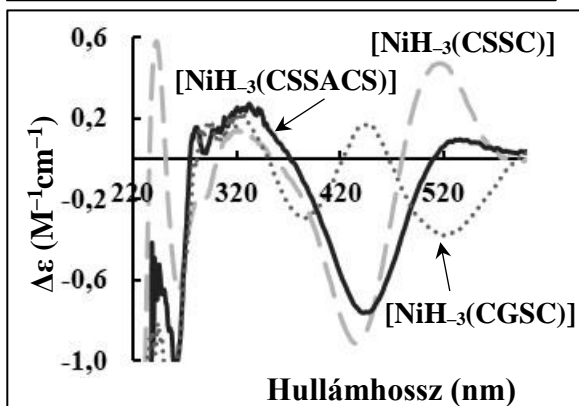
(a) és 21. (b) ábra egymástól abban tér el, hogy az (a) rész tartalmazza az Ac-SCCS-NH₂ komplexének CD-görbéjét is. Az ábrán az látható, hogy az Ac-SCCS-NH₂ komplexe CD-görbéjének intenzitása szignifikánsan eltér a többitől, ami a [Ni₂H₂L₂]_x²⁻ komplex polinukleáris mivoltára vezethető vissza. Az Ac-CSC-NH₂ esetében szabályos (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki (21. (c) ábra), míg a másik két esetben ettől nagyobb tagszámú (5,5,9) (21. (d) ábra) továbbá (5,5,12)-tagú csatolt kelátrendszer (AC-CSSACS-NH₂) valósul meg, mely miatt utóbbi kettő spektruma hasonló, míg az elsőé eltérő.

4.2.3.5. A [NiH₃L] komplex tulajdonságai

A [NiH₃L] egymagvú részecskében a koordinációs mód [N⁻,N⁻,N⁻,S⁻],



22. ábra: Az Ac-SAAC-NH₂ és az Ac-CSSC-NH₂ ligandumok erősen lúgos közegben mért CD-spektrumai



23. ábra: Az Ac-CSSC-NH₂, Ac-CSSACS-NH₂ és az Ac-CGSC-NH₂ [NiH₃L]³⁻ komplexeinek egyedi spektrumai

amelyet a 22. ábra mutat meg, amelyen az Ac-SAAC-NH₂ és az Ac-CSSC-NH₂ peptidek három peptidnitrogén koordinált részecskéinek CD-spektrumát tüntettem fel. A CD-spektrumok lefutása közel azonos, ami nemcsak a feltételezett koordinációs módot igazolja, hanem arról is információt ad, hogy a C-terminális cisztein a

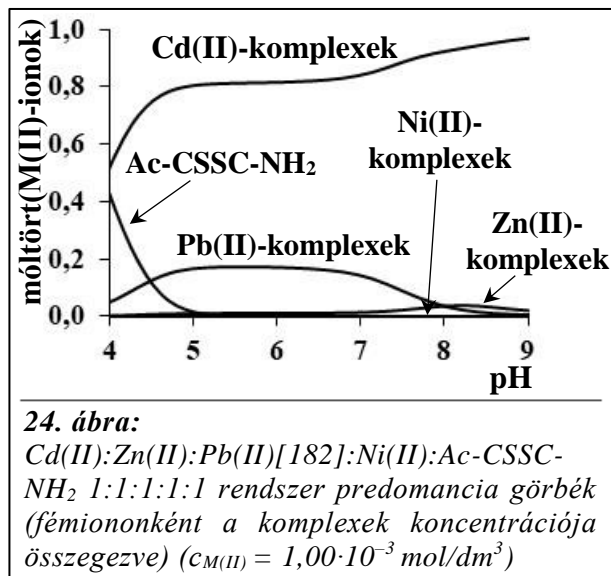
horgonycsoport a fémion számára.

Az egyedi spektrumok tekintetében elmondható, hogy az Ac-SCCS-NH₂ spektruma nem különbözik a 21. (a) ábrán feltüntetettől, azaz a polinukleáris szerkezet nem bomlik fel nagy pH-értékeken sem. A többi komplexnél a rögzített spektrumokat a

23. ábrán tüntettem fel. Az Ac-CSSC-NH₂ és Ac-CSSACS-NH₂ peptidok komplexei CD-spektrumainak lefutása hasonló, amelyektől az Ac-CGSC-NH₂ peptidé mutat különbséget. Ennek oka, hogy utóbbi peptidben és komplexében, a szimmetriacentrumok száma lecsökken, ami inverziót idéz elő a d-d tartományban. Ez az inverzió szintén lehetőséget adott annak megállapítására, hogy a C-terminális cisztein az elsődleges kötőhely a Ni(II)-ion számára. A d-d sávok nagy intenzitása és helye az UV-látható- és CD-spektrumokban minden ligandum esetében a síknégyzetes geometriára utal.

A vizsgálataim során felvett spektrumokból nyert adatokat összehasonlítva az irodalomban a CC (Függelék 24. táblázat), CXC (Függelék 25. táblázat) és CXXC (Függelék 26. táblázat) motívumot tartalmazó peptidok Ni(II)-komplexeinek megfelelő adataiból levonható következtetések: (i) A CC egységet tartalmazó (Ac-SCCS-NH₂) peptid lúgos pH-tartományban hasonló spektrális paraméterekkel jellemezhető, mint az irodalomban közölt Ac-ACCHDHKKH-NH₂, ugyanakkor ezen ligandum tanulmányozásakor a teljes pH-tartományban kizárólag egymagvú komplexek létrejöttét mutatták ki. (ii) Az Ac-CSC-NH₂ ligandum Ni(II)-komplexeire kapott értékeket összevetve az Ac-CGC-NH₂ molekuláéval az adatok egymással hasonlóságot mutatnak, azonban a polinukleáris szerkezetű komplexek kialakulásával nem számoltak. Az általunk többmagvú komplexként azonosított [Ni₃L₄]²⁻ és [NiH₋₁L]_x²⁻ helyett egy peptidnitrogén koordinált [NiH₋₁L]⁻ ([S⁻,N⁻,S⁻]), illetve nagyobb pH-n biszkomplex ([4S⁻]) keletkezését állapították meg; annak ellenére, hogy minden részecskénél jelentkezik a N⁻ → Ni²⁺ töltésátviteli sáv 260 nm hullámhossz körül. (iii) A CXXC motívumot magukban foglaló peptidok komplexeire jellemző értékek az irodalomban közölt két ciszteint tartalmazó peptidok megfelelő komplexeinek értékével hasonlóságot mutatnak.

Annak szemléltetésére, hogy melyik fémiont kötik meg a ligandumok a leghatékonyabban, az Ac-CSSC-NH₂ peptid predominancia diagramját tüntettem fel (24. ábra), amelyen látható, hogy fiziológias pH-tartományban a peptid körülbelül 90%-ához Cd(II)-ion kötődik, azaz ezt az iont képes leghatékonyabban megkötni.



4.3. Tau fragmensek

Kutatócsoportunk az amiloid- β molekulát és mutánsait kiterjedten vizsgálta. A neurodegeneratív megbetegedésekben azonban nemcsak az amiloid- β érintett, hanem a tau fehérje is, ezért szisztematikus vizsgálatokat kezdtünk el, amelyek a szekvenciában található különböző kötőhelyek koordinációs kémiai viselkedését célozza.

A fehérje N-terminális régiója nem kötődik a mikrotubulusukhoz, így lehetőség van arra, hogy fémionok kötődjenek hozzá. Ebben a fehérje-szakaszban két hisztidin található (His14 és His32), ezért munkám során a két hisztidint egyenként tartalmazó peptideket (Tau(9-16) (Ac-EVMEDHAG-NH₂) és Tau(26-33) (Ac-QGGYTMHQD-NH₂) állítottunk elő és vizsgáltunk. A Tau(26-33) vízdoldhatósága korlátozott, ezért egy olyan mutáns is szintetizáltunk, amelynek a szekvenciájában Gln/Lys cserét hajtottunk végre, hogy növeljük a vízdoldhatóságot: Tau(26-33)m (Ac-KGGYTMHK-NH₂) – a Tau(26-33) vizsgálatát híg oldatok felhasználásával elvégeztük. Annak eldöntésére, hogy a tirozin aminosav hatással van-e az oldategyensúlyi folyamatokra, egy tirozint nem tartalmazó mutáns, a Tau(26-33)mA (Ac-KGGATMHK-NH₂) molekula szintézisét és analízisét is elvégeztük. A kötőhely preferencia megállapítására egy olyan két hisztidint

tartalmazó peptidet is tanulmányoztunk, amelyben a két különböző környezetű hisztidint tartalmazó szekvenciát kapcsoltuk össze (Ac-EDHAGTMHQD-NH₂).

4.3.1. Szabad ligandumok protonálódási egyensúlyai

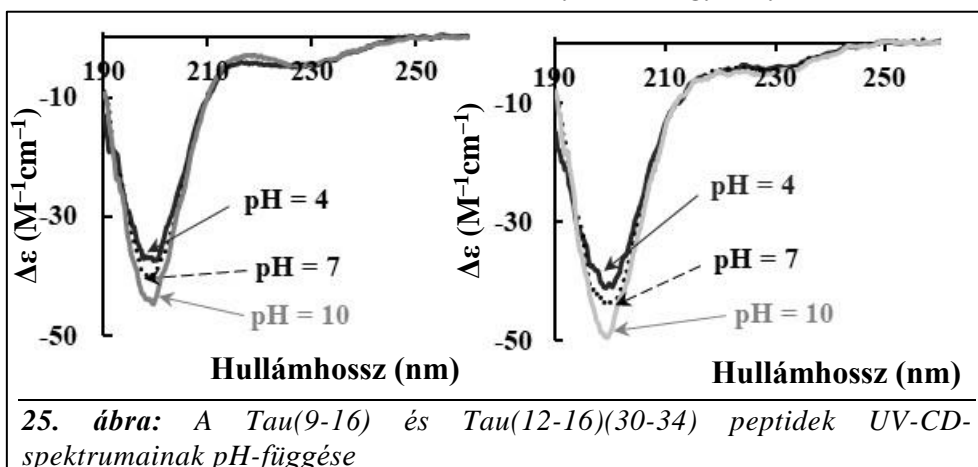
A tanulmányozott ligandumok, illetve összehasonlítást lehetővé tevő peptidek

16. táblázat: A vizsgált ligandumok deprotonálódási állandó értékei ($I = 0,20$ mol/dm³ KCl, $T = 298$ K)

	Tau(9-16)	Tau(26-33)	Tau (26-33)m	Tau (26-33)mA	Tau (12-16)(30-34)	Ac- $\alpha\beta$ (1-6)	Ac- $\alpha\beta$ (8-16)(HA)		HuPrP (94-97)(109-112)
pK_n	Ac- EVMEDHAG- NH ₂	Ac- QGGYTMHQ- NH ₂	Ac- KGGYTMHK- NH ₂	Ac- KGGATMHK- NH ₂	Ac- EDHAGTMHQD- NH ₂	Ac-DAEFRH- NH ₂ [188]	Ac-GAEGHAQK- NH ₂ [189]	Ac-SPKTNAKHA- NH ₂ [187]	Ac-GTHSMKHM- NH ₂ [190]
pK (Im) ₁	6,70(1)	6,02(10)	6,22(2)	6,18(2)	6,27(1)	6,46	6,46	6,28	5,80
pK (Im) ₂	-	-	-	-	7,12 (1)	-	-	-	6,61
pK (Im) ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pK (Asp) ₁	3,41(4)	-	-	-	3,21(4)	3,48	-	-	-
pK (Asp) ₂	-	-	-	-	3,85(2)	-	-	-	-
pK (Glu) ₁	4,14(2)	-	-	-	4,48(2)	4,45	4,09	-	-
pK (Glu) ₂	4,68(2)	-	-	-	-	-	-	-	-
pK (Lys) ₁	-	-	10,13(4)	9,93(2)	-	-	10,27	9,8	10,19
pK (Lys) ₂	-	-	10,71(3)	10,77(1)	-	-	-	10,37	-
pK (Lys) ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pK (Lys) ₄	-	-	-	-	-	-	-	10,97	-
pK (Tyr)	-	9,48(5)	9,38(4)	-	-	-	-	-	-

deprotonálódási egyensúlyaira jellemző állandókat tüntettem fel a 16. táblázatban. A táblázat adataiból látható, hogy a karboxil-, az ϵ -NH₂- és a fenolos-OH-csoportok pK-értékei jó egyezésben vannak az irodalomban korábban már közölt peptidekével. A hisztidinekre jellemző adatokat megvizsgálva az látható, hogy a Tau(9-16) és Tau(12-16)(30-34) esetében nagyobbak a többi egy, illetve egymástól távol hisztidint tartalmazó ligandumokkal szemben, ami a karboxilátcsoportok nagy számával, egyszerűsített a ligandum negatívabb karakterével magyarázható.

UV-CD technikát alkalmazva tanulmányoztuk, hogy milyen hatással van a



pH a komplexben nem kötött peptidek konformációjára. Ehhez pH 4-10 között végeztünk méréseket, ezek eredményei közül kettőt szemléltetésül mutatok be a 25. ábrán. Mint látható, a pH növelése gyakorlatilag semmilyen hatással nincsen a peptidek oldatbeli konformációjára, amelyet a 200 nm körül megjelenő negatív Cotton-effektus mutat. Az abszorpciós maximum helye a spektrumban, előző vizsgálatok [191] alapján, rendezetlen szerkezetről árulkodik.

4.3.2. Cu(II)-Tau(9-16) rendszer vizsgálata

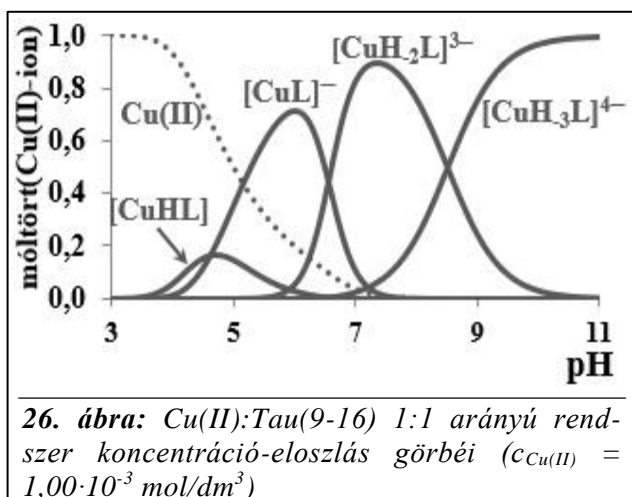
A Tau(9-16) (Ac-EVMEDHAG-NH₂) Cu(II)-komplexeinek stabilitási állandóit (17. táblázat) pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg. A táblázat adatai tükrözik, hogy csak 1:1 összetételű, egymagvú komplexek képződnek. 1,5:1 fémion/ligandum arány esetén nem tapasztaltuk kétmagvú komplexek kialakulását, azaz a peptid aszparaginsav és glutaminsav oldalláncai nem képesek külön kötőhelyként viselkedni. A gyengén savas pH-tartományban imidazol-koordinált

17. táblázat: A Cu(II)-Tau(9-16) rendszerben keletkező komplexek stabilitási állandói ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KCl}$, $T = 298 \text{ K}$)

$\lg\beta[\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r]$		Tau(9-16) Ac EVMEDHAG -NH ₂	Ac-A β (8-16)AH Ac- SGAEGHAQK -NH ₂ [189]	Ac-A β (1-6) Ac- DAEFRH -NH ₂ [188]	Ac-HuPrP(94-97) Ac- GTHS -NH ₂ [192]		
[CuHL]		9,66 (17)	14,47	8,92	–		
[CuL]		5,04 (7)	7,96	4,57	3,94		
[CuH ₁ L]		–	2,23	–2,09	–2,59		
[CuH ₂ L]		–8,09 (7)	–6,53	–8,03	–8,21		
[CuH ₃ L]		–16,61 (11)	–16,74	–16,24	–16,18		
$\text{pK}(\text{N}^-)_1$	$\text{pK}(\text{N}^-)$ 1,2átlag	6,57	6,51	6,12	6,66	6,53	5,64
$\text{pK}(\text{N}^-)_2$			5,73		5,94		
$\text{pK}(\text{N}^-)_3$		8,52	8,76	8,21	7,97		
$\lg K(\text{Cu}+\text{Im})$		5,04	4,20	4,57	3,94		

(A komplexek töltését az egyszerűség kedvéért nem tüntettem fel.)

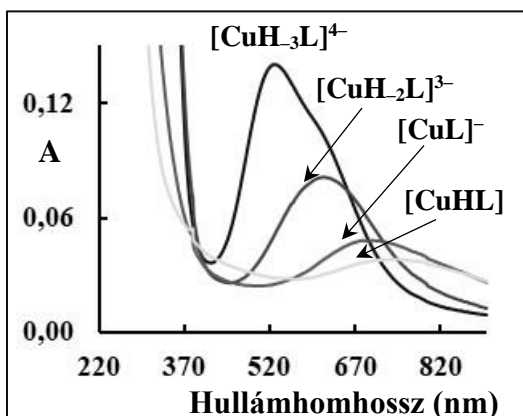
[CuHL] és [CuL][–] komplexek, a pH növelésével pedig peptidnitrogén koordinált [CuH₂L]^{3–} és [CuH₃L]^{4–} komplexek (26. ábra) képződnek. A keletkező komplexek



stabilitási állandóinak összehasonlítása közvetlenül nem lehetséges, ezért a $\lg K(\text{Cu}+\text{Im})$ képzett állandót ((8) egyenlet) is fel-tüntettem a táblázatban. Összehasonlítva az értékeket egymással látható, hogy a Tau(9-16) esetén ez az érték 0,8-1 logaritmus egységgel

nagyobb a többitől, ami azzal magyarázható, hogy a karboxilátcsoportok száma a tanulmányozott molekulában a legnagyobb, melyek nagy valószínűséggel koordinálnak a [Cu(Ac-EVMEDHAG-NH₂)][–] komplexben. A [CuL][–] részecske megnövekedett stabilitása a horgonycsoportot megelőző két peptidnitrogén

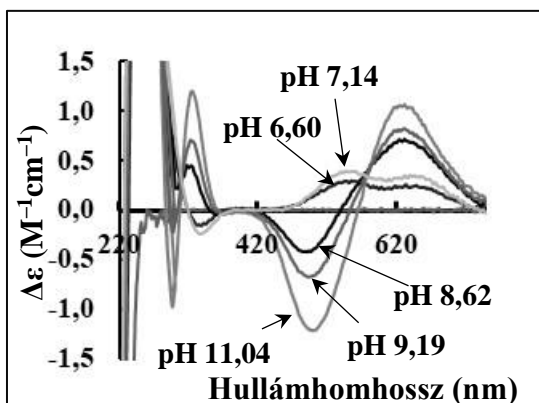
deprotonálódását és koordinációját kismértékben a lúgos pH-tartomány felé tolja. A két peptid-N⁻ csoport koordinációja egy lépésben, kooperatív módon valósul meg, ami az egy hisztidint tartalmazó peptidek esetén nem szokatlan ([187,84]). A harmadik vázdonor koordinációja a fémionhoz elkülönült lépésben játszódik le, és a folyamatra jellemző pK-érték összhangban van más peptidek ilyen komplexeinek értékével (17. táblázat).



27. ábra: A Cu(II):Tau(9-16) 1:1,1 arányú rendszerében keletkező komplexek egyedi spektrumai

A koordinációs módok megállapítására különböző spektroszkópiai módszereket alkalmaztunk. A Cu(II)-ion-tartalmú rendszerekre jellemző UV-látható-spektrumokat a 30. ábra szemlélteti. A pH növelésével az abszorpciós maximumok hullámhossza hipszokróm eltolódást szenved (18. táblázat), ami megfelel a Cu(II)-ion körüli ekvatoriális sík N-donorokkal történő feltöltődésének.

Az empirikus képlet ((11) egyenlet) segítségével kiszámolt λ_{\max} értékeket a 18. táblázat tartalmazza. A [CuL]⁻ komplexben,



28. ábra: Cu(II):Tau(9-16) 1:1,1 arányú mintájának CD-spektrumai

az abszorpciós spektrum maximális elnyelési hullámhosszának helye alapján, a fémion koordinációs szférájában az imidazolilcsoport mellett legalább egy karboxilát-csoport is található. A vázkoordinált komplexek számolt abszorpciós maximumai: a 3N-es ([N⁻,N⁻,N_{im}]) koordináció esetén 582, a 4 N-esnél

([N⁻,N⁻,N⁻,N_{im}]) pedig 521 nm. Ez mind a két esetben kisebbnek bizonyult a Tau(9-16) részecskéinek spektrumából leolvasottól. Ez valamilyen egyéb csoport ekvatoriális vagy axiális koordinációja miatt lehetséges.

A 31. ábrán az 1:1,1 arányú minta CD-spektrumainak pH-függése látható. A Cu(II)-N_{Im} koordináció nem jár CD-aktivitással, így a 6,1-es pH feletti CD-spektrumok a [CuH₂L]³⁻ és [CuH₃L]⁴⁻ komplexekre jellemzőek, amit a CD-spektrum UV-tartományában 246 és 260 nm-nél található N⁻ → Cu(II) töltésátviteli sáv és a ~330 nm hullámhossznál megjelenő N_{Im} → Cu(II) sáv jelenléte erősít meg.

18. táblázat: A Tau(9-16) Cu(II)-komplexeinek spektrális paraméterei (λ_{max} (nm)/(Δ) ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$), $A_{||}$ ($10^4 \cdot cm^{-1}$))

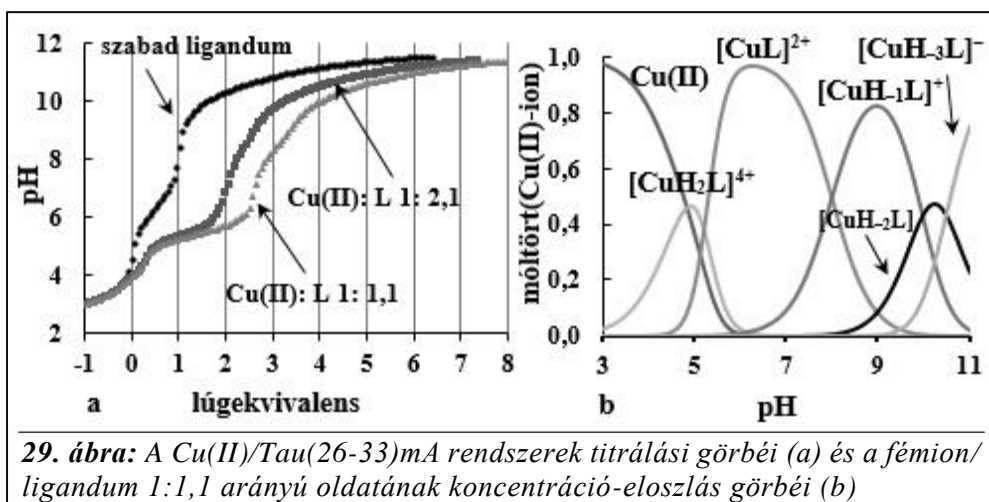
Részecske	Koordinációs mód	UV	CD	ESR		Számolt λ_{max}
		λ_{max}/ϵ	$\lambda_{max}/\Delta\epsilon$	$g_{ }$	$A_{ }$	
[CuHL]	[N _{Im}]	747/38	–	2,344	148	759
[CuL] ⁻	[N _{Im} , 2/3 COO ⁻]	691/44	–	2,315	160	680/704
[CuH ₂ L] ³⁻	[N _{Im} , 2 N ⁻]	616/74	651/+0,34 557/+0,40 339/-0,23 246/+7,13	2,239	163	583
[CuH ₃ L] ⁴⁻	[N _{Im} , 3 N ⁻]	530/144	627/+1,05 498/-1,21 329/+1,20 295/-0,97 260/+7,39	2,194	200	521

Az ESR vizsgálatok során az 5-6,5 pH-tartományban két részecske jelenlétét tapasztaltuk, ami megfelel a 26. ábrán feltüntetett részecske-eloszlásnak. A [CuHL] komplexre kapott $g_{||}$ - és $A_{||}$ -értékek a Cu(II)-N_{Im} kötődéshez rendelhetőek és összhangban vannak az Ac-NGAKALMGGHGATKVMVGAAA-NH₂ [193] ligandum ilyen kötési módú komplexével, amelynél $g_{||}/A_{||}$ 2,358/141·10⁻⁴ cm⁻¹. A [Cu(Ac-EVMEDHAG-NH₂)]-komplexre kapott $g_{||}$ -értékében tapasztalt csökkenés és az $A_{||}$ növekedése az előző értékekhez képest bizonyítja a -COO⁻ koordinációt, amely segíti a imidazolilcsoport fémionmegkötését. A [CuH₂L]³⁻ komplexre kapott paraméterek megegyeznek egy olyan peptid adataival, ahol egy hisztidin és két peptidnitrogén van a Cu(II)-ion koordinációs szférájában kiegészülve egy karboxilátcsoport kötődésével (CuH₂(Ac-HHVGD-NH₂)]⁻ $g_{||}/A_{||}$ 2,205/179·10⁻⁴cm⁻¹, [CuH₂(Ac-HVGDH-NH₂)]⁻ $g_{||}/A_{||}$ 2,232/188·10⁻⁴ cm⁻¹ [193]). Az [N⁻,N⁻,N⁻,N_{Im}] koordinációjú [CuH₃L]⁴⁻ részecske jellemző adatai megegyeznek más ligandumok

vonatkozó adataival – például $[\text{CuH}_3(\text{Ac-FKHV-NH}_2)]^-$ $g_{\parallel}/A_{\parallel} 2,195/195 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ [192]. A vártnál kissé alacsonyabb A_{\parallel} -értéket a koordinációs sík torzultsága okozhatja.

4.3.3. Tau(26-33) és mutánsainak Cu(II)-komplexei

A pH-potenciometriás titrálások (29. (a) ábra) során kapott adatok alapján meghatározott stabilitási állandók értékeit a 19. táblázat tartalmazza (a töltések az eltérő bázicitás miatt nem szerepelnek). Biszkomplexek képződését nem tapasztaltuk még háromszoros ligandumfelesleg alkalmazása mellett sem. A szekvenciában a lizin és/ vagy tirozin aminosavak jelenléte többszörösen protonált komplexek keletkezését okozza (29. (b) ábra). A különböző koordinációs módok, így másfajta



komplexösszetétellel rendelkeznek, amelyet jól mutat, hogy a Cu(II)- N_{Im} kötésmódot tartalmazó $[\text{CuH}_3\text{L}]$, $[\text{CuH}_2\text{L}]$ és $[\text{CuHL}]$ komplexek sztöchiometriája aszerint változik, hogy azt az Ac-KGGYTMHK-NH₂, Ac-KGGATMHK-NH₂ vagy az Ac-QGGYTMHQ-NH₂ képezi. Ezt figyelembe véve elmondható, hogy a törzskomplexek száma megegyezik a Tau(9-16)-nál megismertekkel. A komplexek stabilitása és a spektrális paraméterek, ugyanakkor, másfajta oldategyensúlyi viselkedésről tesznek tanúbizonyságot. A táblázatban szereplő $pK(\text{Tyr-OH})$ - és $pK(\text{Lys-NH}_3^+)$ -értékek a megfelelő komplexek – $[\text{CuH}_1\text{L}]$, $[\text{CuH}_2\text{L}]$, $[\text{CuH}_3\text{L}]$ – deprotonálódására jellemző értékek (amely számszerűsítve a komplexek stabilitásának különbségét jelenti,

19. táblázat: A Cu(II)-Tau(26-33) és mutánsai esetén megállapított Cu(II)-komplexek stabilitási állandó értékei ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KCl}$, $T = 298 \text{ K}$)

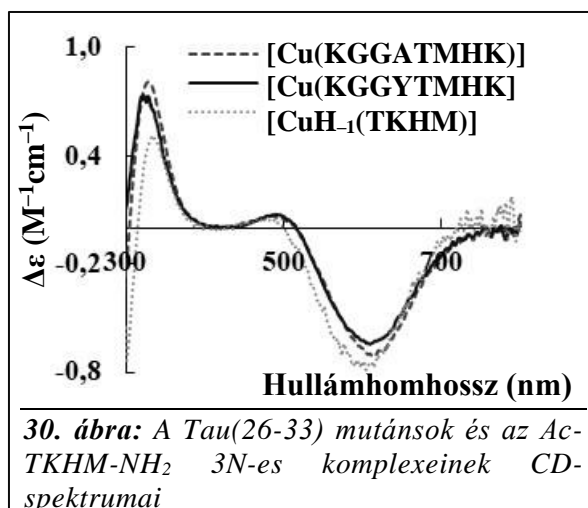
$\lg\beta[\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r]$	Tau(26-33) Ac- QGGYTMHQ -NH ₂	Tau(26-33)m Ac- KGGYTMHK -NH ₂	Tau(26-33)mA Ac- KGGATMHH -NH ₂	Tau(9-16) Ac- EVMEDHAG -NH ₂
[CuH ₃ L]	–	34,15 (3)	–	–
[CuH ₂ L]	–	–	25,18 (3)	–
[CuHL]	13,26 (14)	23,98 (9)	–	9,66
[CuL]	–	16,01 (2)	14,77 (2)	5,04
[CuH ₁ L]	3,23 (5)	6,68 (2)	6,78 (3)	–
[CuH ₂ L]	–5,60 (9)	–3,58 (2)	–3,19 (4)	–8,09
[CuH ₃ L]	–15,47 (8)	–14,09 (1)	–13,67 (4)	–16,61
$\text{p}K(\text{N}^-)_{1,2\text{átlag}}$	5,02	5,09	5,21	6,57
$\text{p}K(\text{N}^-)_3$	8,83	7,97	7,99	8,52
$\lg K(\text{Cu}+\text{Im})$	3,78	3,93	4,48	5,04
$\text{p}K(\text{Tyr-OH})$	9,87	–	–	–
$\text{p}K(\text{Tyr-OH})$	–	9,33	–	–
$\text{p}K(\text{Lys-NH}_3^+)$	–	10,26	9,97	–
$\text{p}K(\text{Lys-NH}_3^+)$	–	10,51	10,48	–

például $\text{p}K(\text{Tyr-OH}) = \lg\beta[\text{CuH}_2(\text{Tau}(26-33))] - \lg\beta[\text{CuH}_3(\text{Tau}(26-33))]$. Ezek a $\text{p}K$ -értékek jó egyezésben vannak a szabad ligandum tirozin és lizin aminosavaira meghatározott $\text{p}K$ -értékkel, ami azt jelenti, hogy a fémion megkötésében nem vesznek részt ezek az aminosavak ((8) egyenlet). A His32 tartalmú peptidek összevethetők az irodalomban közölt más egy hisztidint belső pozícióban tartalmazó peptidekével (Ac-SKPKTNAKHA-NH₂ $\lg K(\text{Cu}+\text{Im}) = 3,53$ [187]), ugyanakkor az értékek kisebbek, mint a Tau(9-16) peptidnél megállapított, ami a karboxiláts csoportok hiányára vezethető vissza.

A szabad ligandumok titrálása során fogyott lúg mennyiséghez képest extra mérőoldat fogyasztó folyamatok lejátszódását tapasztaltuk (29. (a) ábra), amelyek a peptidek vázában található N-donor csoportok deprotonálódásának és koordinációjának köszönhető. Az első két peptidnitrogén kooperatív módon kötődik

a fémionhoz, és a folyamatra számolt $pK(N^-)_{1,2\text{átlag}}$ állandók értékei kisebbek olyan peptidekétől, ahol kizárólag csak N_{Im} és peptidnitrogén koordináció valósul meg (Ac-SKPKTNAKHA-NH₂ $pK(N^-)_{1,2\text{átlag}} = 6,06$ [187,193]). Ezt a csökkenést egy extra stabilizáló kölcsönhatás okozza (például egy csoport axiális koordinációja), amelyet a spektrális adatok is alátámasztanak. A harmadik peptid-NH csoport deprotonálódása és koordinációja külön lépésben deprotonálódik. Az Ac-TKHM-NH₂ ligandum [87] esetében a lizin ϵ -NH₂ csoportja és a treonin hidroxilcsoportja között hidrogénhid alakul ki, amely konformációváltozást okoz, amikor a lizin oldallánc deprotonálódik. A Tau(26-33) peptid nem tartalmaz lizin aminosavat, ellentétben a mutáns szekvenciákkal, így nincs lehetőség hidrogénhid kialakulására, ami indokolja, hogy ezen peptid esetében a $pK(N^-)_3$ 0,8 logaritmus egységgel nagyobb, mint a másik két ligandum esetében.

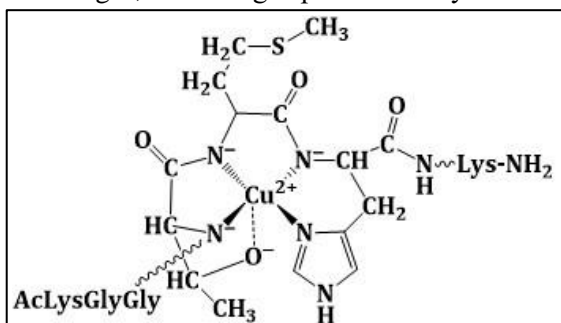
A spektrofotometriás vizsgálatok során kapott spektrális paramétereket a 20. táblázatban foglaltam össze. A két, illetve három peptidnitrogén koordinált részecskék abszorpciós hullámhosszai az összes esetben eltérnek a várttól, ami valamilyen egyéb csoport fémion megkötő szerepére utal. A CD vizsgálatok alatt aktivitást szintén a peptidnitrogén koordinált részecskék esetében tapasztaltunk (20. táblázat). A tau fragmensek 3N-es komplexei spektrumának lefutása megegyezik az Ac-TKHM-NH₂ molekula ugyanilyen koordinációmódú komplexének spektrumával (30. ábra) [87].



20. táblázat: A Tau(26-33) és mutánsainak spektrális paraméterei (λ_{\max} (nm)/ $(\Delta)\epsilon$ ($M^{-1}cm^{-1}$), A_{\parallel} ($10^4 cm^{-1}$))

Koordinációs mód	Tau(26-33)				Tau(26-33)m				Tau(26-33)mA	
	UV	CD	ESR		UV	CD	ESR		UV	CD
	λ_{\max}/ϵ	$\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$	g_{\parallel}	A_{\parallel}	λ_{\max}/ϵ	$\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$	g_{\parallel}	A_{\parallel}	λ_{\max}/ϵ	$\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$
$[N^-, N^-, N_{Im}]$	576/63	623/-0,35 504/+0,13 326/+0,78 252/+2,77	2,214	191	590/75	618/-0,68 497/+0,05 328/+0,78 294/-0,26 255/+2,94	2,221	191	587/76	614/-0,70 485/+0,064 327/+0,80 292/-0,43 254/+2,76
$[N^-, N^-, N^-, N_{Im}]$	551/87	562/-0,77 491/+0,26 280/+3,14	2,205	204	560/97	570/-0,78 499/+0,24 347/-0,21 281/+4,18	2,203	204	563/90	562/-0,59 491/+0,22 278/+2,20

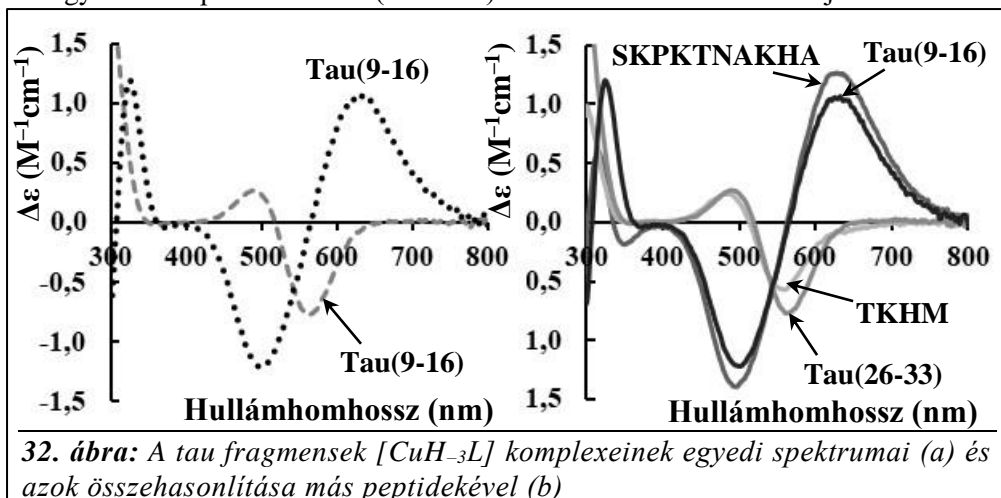
Ez alapján arra következtetünk, hogy a treonin aminosav oldalláncában lévő hidroxilsoport is részt vehet fémion megkötőként az oldategyensúlyi folyamatokban a semleges, illetve lúgos pH-tartományban.



31. ábra: A Tau(26-33) $[CuH_3L]$ komplexének sematikus ábrája

Az erősen bázikus oldatokban $[CuH_3L]$ összetételű komplexek jönnek létre, amelyekben a fémiont egy imidazolil és három peptidázbeli donortom köti meg (31. ábra). Az empirikus képlettel ((11) egyenlet) erre a koordinációs módra számolt

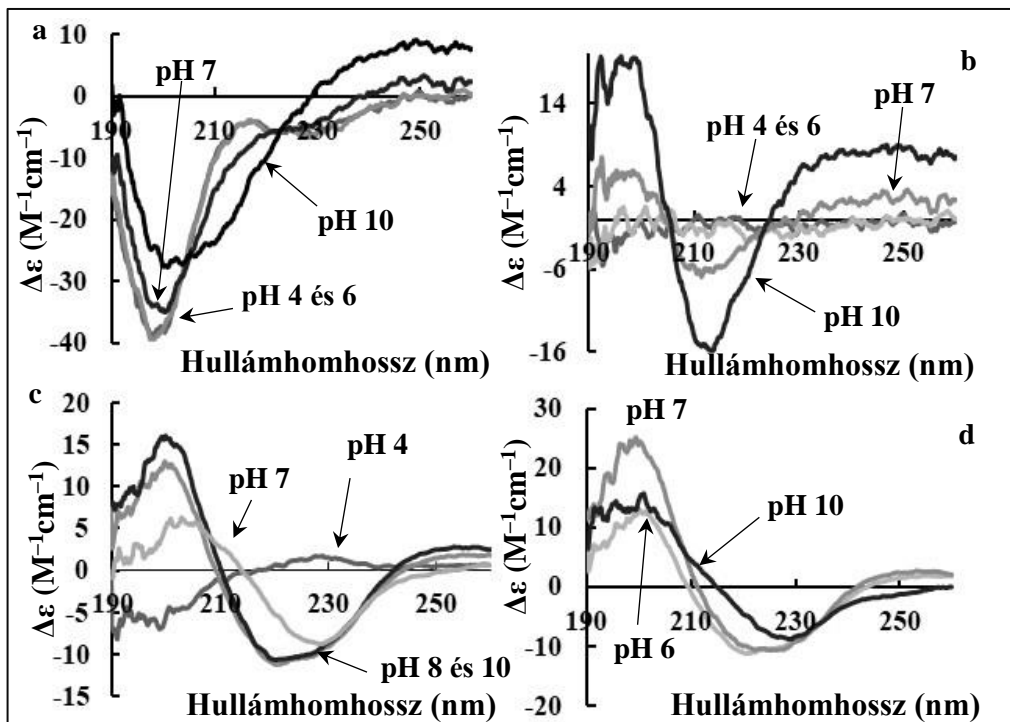
abszorpciós maximum hullámhossza 521 nm, a jelenleg tárgyalt fragmensek esetén 551 nm. Ez a batokróm eltolódás az alkoholos hidroxilcsoport axiális koordinációja miatt lehetséges. Az Ac-TKHM-NH₂ vonatkozó komplexének spektrális paraméterei 551 nm/83 M⁻¹cm⁻¹, ami kifejezetten jó egyezésben van az általunk kapott értékekkel. Az egyedi CD-spektrumokból (32. ábra) is hasonló következtetésre jutottunk. Mint



32. ábra: A tau fragmensek [CuH₃L] komplexeinek egyedi spektrumai (a) és azok összehasonlítása más peptidekével (b)

az ábrán látható, a Tau(9-16) komplexének CD-spektruma megegyezik egy ilyen közbenső pozícióban hisztidint tartalmazó peptid Cu(II)-komplexének (Ac-SKPKTNAKHA-NH₂) CD-spektrumával. Ez azt jelenti, hogy ebben a fragmensben semmilyen extra stabilizáló kölcsönhatás nincsen, ellentétben a Tau(26-33) és mutánsaival, amely görbéinek lefutása az Ac-TKHM-NH₂ ligandum részecskéjével egyezik meg. Ez az eltérés szintén a treonin oldallánc hatásával magyarázható.

A 3N- és 4N-es koordinációs mód esetén a szerkezeti változásokat UV-CD vizsgálatokkal is alátámasztottuk (33. ábra). A peptid CD-spektrumában megjelenő negatív Cotton-effektus (25. ábra (68. oldal)), ami a random elrendeződésű szerkezetek jelenlétére utal, egy ekvivalens réz(II)ion jelenlétében lecsökken a pH növelésével (33. (a) ábra). Amennyiben kivonjuk a fémiont is tartalmazó rendszereknél rögzített spektrumokból a szabad ligandumok ugyanazon pH-n rögzített spektrumait, akkor egy pozitív Cotton-effektus jelenik meg 190-200 nm körül és egy negatív 210-220 nm tartományban (33. (b) és (d) ábra). Korábbi irodalmi adatok alapján [191] ezt az imidazol és a peptid-N⁻ donorok koordinációja, azaz egy

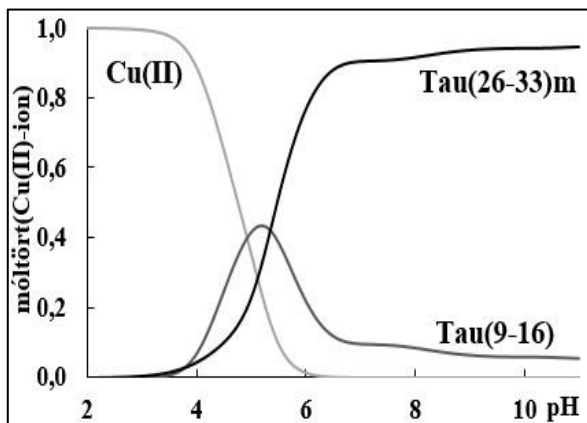


33. ábra: A *Tau(9-16)* és a *Tau(26-33)* *Cu(II)*-komplexeinek UV-CD-spektrumai (a,c), valamint komplexekre jellemző és a szabad ligandum spektrumainak különbsége (b,d)

rendezettebb térbeli szerkezet felvétele, okozza. A két tau fragmens koordinációs szférájában lévő donorcsoportok különbözőségét az eltérő UV-CD-görbék is jól mutatják (33. (a) és (c) ábra).

A *Cu(II)*-*Tau(26-33)* és *Cu(II)*-*Tau(26-33)m* fagyasztott mintáin, körülbelül semleges pH-n, elvégzett ESR mérések alapján a $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]$ és $[\text{CuHL}]$ komplexekben a fémion három N-donoratomhoz koordinálódik. Az A_{\parallel} adatok mindkét rendszerben nagyobbak, mint, amit a $[\text{C}=\text{O}/\text{H}_2\text{O}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$ koordinációs környezet fennállásakor várnánk ($[\text{CuH}_{-3}(\text{Ac-GTHS-NH}_2)] g_{\parallel}/A_{\parallel} 2,240/176 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ [192]), ami nem zárja ki a metionin tioétercsoportjának vagy a treonin alkoholos hidroxilcsoportjának koordinációját. A 4N-es komplexekre meghatározott paraméterek megfelelnek más ligandumok *Cu(II)*-komplexeinek adataival (például $[\text{CuH}_{-3}(\text{Ac-GTHS-NH}_2)] g_{\parallel}/A_{\parallel} 2,201/210 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ [192]).

A 34. ábrán egy olyan koncentráció-eloszlás diagram látható, amely a *Cu(II)*-iont az *Ac-EVMEDHAG-NH₂* és *Ac-KGGYTMHK-NH₂* peptidet 1:1:1 arányban

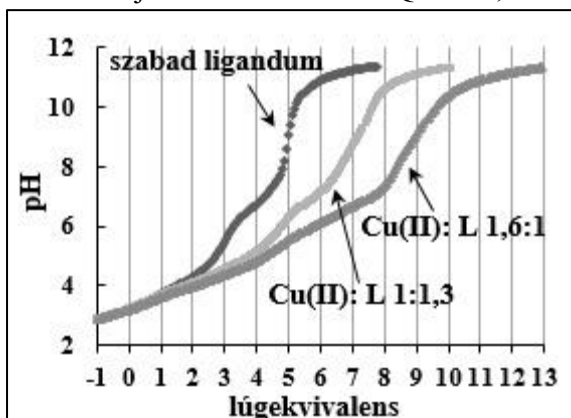


34. ábra: A $Cu(II):Tau(9-16):Tau(26-33)m$ 1:1:1 arányú rendszer koncentráció-eloszlás görbéi ($c_{Cu(II)} = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

tartalmazza. Bár mindkét peptid ugyanazokat a donorcsoportokat tartalmazza szekvenciájában a $Cu(II)$ -ion megkötésére, mégis a fémion számára a gyengén savas pH-tartományban a Tau(9-16) szekvencia felé mutat nagyobb affinitást, míg semleges és lúgos közegben a Tau(26-33) felé. Ennek oka ez utóbbi szekvenciánál kialakuló axiális kölcsönhatás stabilizáló hatása.

4.3.4. A $Cu(II)$ -Tau(12-16)(30-34) rendszer vizsgálat

A His14 és His32 kötőhelyet egyaránt tartalmazó peptidet, amely szekvenciája Ac-EDHAGTMHQD-NH₂, azért állítottam elő, hogy a kétféle



35. ábra: A $Cu(II)$ -Tau(12-16)(30-34) rendszerek titrálási görbéi

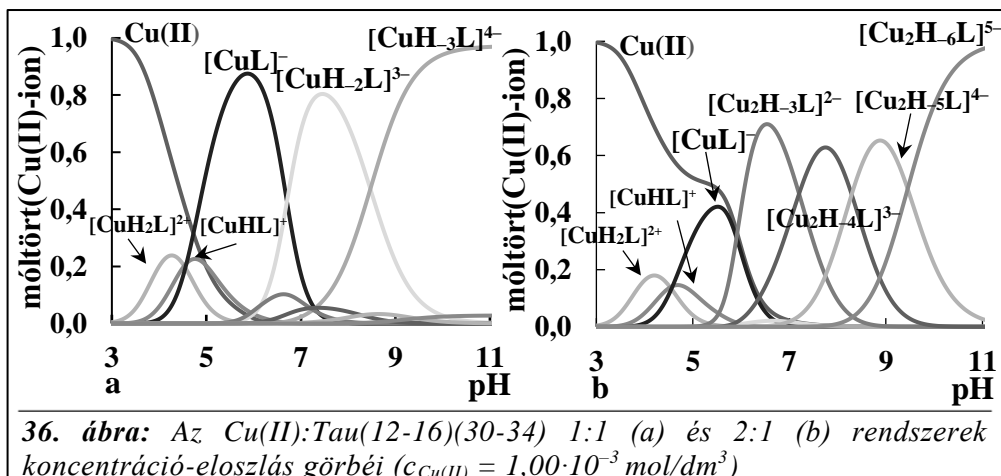
környezetben jelenlévő hisztidin fémionkötőképességét össze tudjuk hasonlítani. Hasonló ún. kiméra peptidet a prion fehérje kötőhelyeinek tanulmányozására is szintetizáltak, ennek adatait összehasonlításként a 21. táblázatban feltüntettem. A ligandum segítségével vizsgálni tudtuk, hogy a 34. ábrán látott kötőhely

preferencia mutatkozik-e. Az analízis 1:1,1, 1,6:1 és 2:1 fémion/ligandum arányok alkalmazásával készült. A két hisztidin aminosav oldallánca egyaránt lehet horgonycsoport, és részvételükkel kétmagvú komplexek képződésére is lehetőség nyílik, ezért tanulmányoztam fémionfelesleget tartalmazó mintákat is (35. ábra). A keletkező komplexek stabilitási állandói a 21. táblázatban szerepelnek. A táblázatból

21. táblázat: A Tau(12-16)(30-34) Cu(II)-komplexeinek összetétele és stabilitási állandói ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KCl}$, $T = 298 \text{ K}$)

$\lg\beta[\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r]$	Tau(12-16)(30-34) Ac-EDHAGTMHQD-NH ₂	Ac-HuPrP(94-97)(109-112) Ac-GTHSMKHM-NH ₂ [190]
[CuH ₂ L]	16,77 (5)	–
[CuHL]	12,24 (6)	15,72
[CuL]	7,66 (3)	9,16
[CuH ₋₁ L]	–	2,67
[CuH ₋₂ L]	–5,75 (5)	–5,50
[CuH ₋₃ L]	–14,22 (1)	–15,78
[Cu ₂ H ₋₂ L]	–	0,18
[Cu ₂ H ₋₃ L]	–7,18 (5)	–6,32
[Cu ₂ H ₋₄ L]	–14,38 (11)	–14,00
[Cu ₂ H ₋₅ L]	–22,67 (15)	–22,86
[Cu ₂ H ₋₆ L]	–32,12 (15)	–33,43
$\lg K(\text{Cu}+2\text{Im})$	7,66	5,53
$\text{p}K(\text{N}^-)_{1,2}$ átlag	6,71	6,53
$\text{p}K(\text{N}^-)_3$	8,47	8,17
$\text{p}K([\text{Cu}_2\text{H}_{-3}\text{L}]/[\text{Cu}_2\text{H}_{-4}\text{L}])$	7,20	7,68
$\text{p}K([\text{Cu}_2\text{H}_{-4}\text{L}]/[\text{Cu}_2\text{H}_{-5}\text{L}])$	8,29	8,86
$\text{p}K([\text{Cu}_2\text{H}_{-5}\text{L}]/[\text{Cu}_2\text{H}_{-6}\text{L}])$	9,45	10,57

(a ligandumok eltérő bázicitása miatt a komplexek töltését nem tüntettem fel) látható, hogy 1:1 összetételű monokomplexek keletkeznek (36. (a) ábra), de biszkomplexek nem. Fémionfeleslege esetén kétmagvú komplexek egyaránt



képződnek a semleges és lúgos pH-tartományban (36. (b) ábra). A Cu(II)-ion megkötése két hisztidin aminosav oldalláncán keresztül történik egy ún. makrokelát gyűrűt létrehozva. A $\lg K(\text{Cu}+2\text{Im})$ értéke a tau fragmens esetében nagyobb, mint az Ac-GTHSMHKM-NH₂ esetében, amiből arra lehet következtetni, hogy az imidazolilcsoportok mellett a szekvenciában lévő két karboxilátcsoport is koordinálódik a fémion.

A szabad ligandum titrálása során fogyott titrálóoldat mennyiséghez képest extra lúgfogyasztó folyamatok lejátszódását itt is tapasztaltuk mind az ekvimoláris, mind a fémionfelesleget tartalmazó rendszernél (35. ábra). Ez a horgonycsoportot megelőző peptid-NH donorok deprotonálódásához és koordinációjához rendelhető. Az első két nitrogén fémionhoz kötődése kooperatív folyamat, és a $pK(\text{N}^-)_{1,2}$ átlag-értékkel jellemezhető. Ez az érték nagyobb, mint a Ac-GTHSMKHM-NH₂ ilyen értéke, azaz, akár csak a Tau(9-16) esetében, itt is a karboxilátcsoportok koordinációja a vázbeli donorok deprotonálódását és koordinációját kissé a lúgos pH-tartomány felé tolja. A harmadik peptidnitrogén koordinációja külön lépésben játszódik le és a $pK(\text{N}^-)_3$ -érték hasonló a HuPrP(94-97)(109-112) peptidéhez.

A dinukleáris komplexekben, akár csak az egymagvú komplexeknél, imidazol-N és peptid-N⁻ kötődnek a Cu(II)-ionhoz, mivel a dinukleáris komplexek deprotonálódási állandói közül (21. táblázat utolsó sorai; $pK(\text{Cu}_2\text{H}_x\text{L})/[\text{Cu}_2\text{H}_{x-1}\text{L}] = \lg\beta[\text{Cu}_2\text{H}_x\text{L}] - \lg\beta[\text{Cu}_2\text{H}_{x-1}\text{L}]$) az első két állandó jó egyezésben van a referencia peptidével. Mindegyik peptidnitrogén lépcsőzetesen koordinálódik a fémionhoz, ugyanakkor a hatodik deprotonálódása és koordinációja kismértékben kedvezményezett a prion modell peptidéhez képest.

A spektroszkópiai vizsgálatok során kapott adatokat a 22. táblázat tartalmazza. Az UV-látható-spektrumok abszorpciós maximumainak helye a pH növelésével folyamatosan a kisebb hullámhosszak felé tolódott mind az ekvimoláris, mind a fémionfelesleget tartalmazó minták esetén, ami a Cu(II)-ion koordinációs szférájának N-donoratomokkal történő telítődését kísérő jelenség. A $[\text{CuH}_2\text{L}]^{3-}$ komplex mért és számított abszorpciós maximumának helye jó egyezésben van, így a koordinációs mód $[\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}]$, míg a $[\text{CuH}_3\text{L}]^{4-}$ részecskéhez rendelhető spektrumban az

22. táblázat: Az $Tau(12-16)(30-34)$ spektrális paramétereit (λ_{max} (nm)/ $(\Delta)\epsilon$ ($M^{-1}cm^{-1}$), A_{\parallel} ($10^4 \cdot cm^{-1}$))

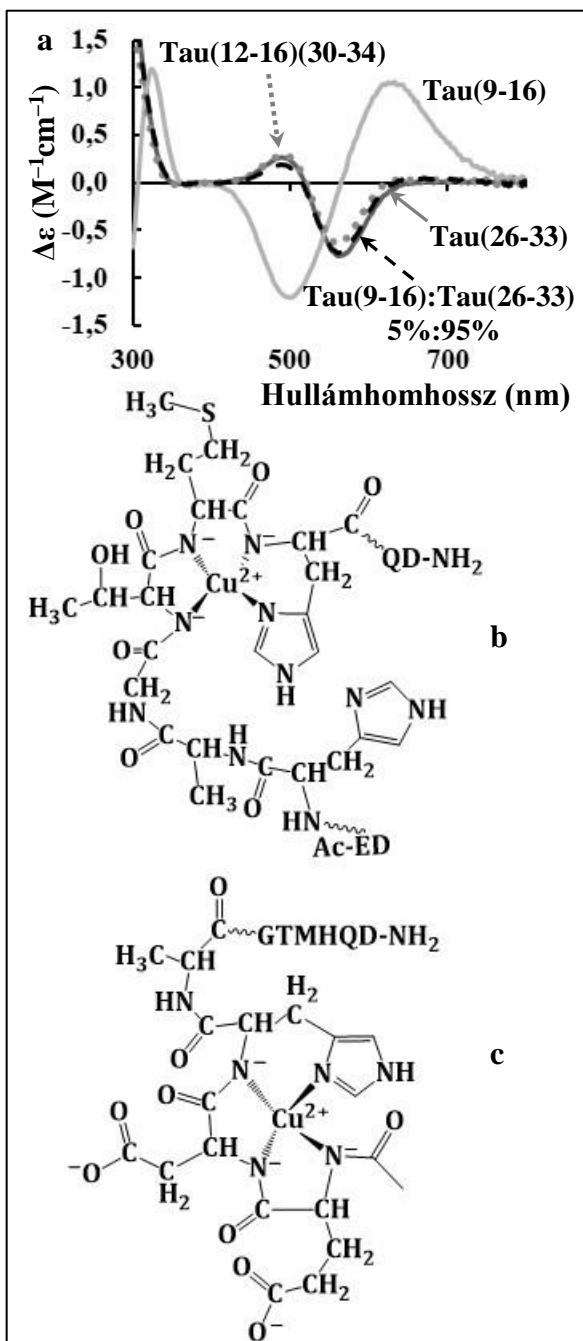
Részecske	Koordinációs mód	UV	CD	ESR		Kiszámolt λ_{max}
		λ_{max}/ϵ	$\lambda_{max}/\Delta\epsilon$	g_{\parallel}	A_{\parallel}	
[CuL]	[2N _{Im}]	–	–	2,295	176	–
[CuH ₂ L] ³⁻	[2N ⁻ , 2N _{Im}]	590/75	620/-0,40 504/+0,08 331/+0,61 297/-0,15 255/+2,89	2,217	195	582
[CuH ₃ L] ⁴⁻	[3N ⁻ , N _{Im}]	564/90	663/+0,22 567/-0,62 496/+0,28 357/-0,02 278/+2,57	2,204	208	521
[Cu ₂ H ₄ L] ³⁻ pH = 7,76	2[2N ⁻ , N _{Im}]	–	–	2,219	186	–
[Cu ₂ H ₅ L] ⁴⁻ pH = 8,90	[2N ⁻ , N _{Im}] + [3N ⁻ , N _{Im}]	–	666/+0,04 580/-0,11 511/+0,20 344/-0,16 250/+5,40	2,228	183	–
[Cu ₂ H ₆ L] ⁵⁻	2[3N ⁻ , N _{Im}]	550/86	642/+0,49 546/-0,51 492/-0,43 367/-0,03 308/+0,96 266/+3,17	2,196	204	521

abszorpciós maximum batokrómm eltolódást szenved a számolt értékhez képest, ami valamely csoport axiális koordinációjára utal. Ez a jelenség [Cu₂H₆L] komplex esetében is feltételezhető.

Intenzív CD-spektrumokat [N⁻, N⁻, N_{Im}] és [N⁻, N⁻, N⁻, N_{Im}] donorszett esetében rögzítettem minden fémion/ligandum arány esetében, ahol a donorcsoportok koordinációját a 326 nm körül megjelenő N_{Im} → Cu²⁺ és a 255 nm körül jelentkező N⁻ → Cu²⁺ töltésátviteli sáv mutatja.

A 37. (a) ábra a különböző tau fragmensek [CuH₃L] összetételű komplexeinek CD-spektrumait szemlélteti, kiegészítve egy olyan számolt görbével, amelyet a Tau(9-16):Tau(26-33) spektrumainak 5:95 arányú összegzésével kaptam. Mint látható, a Tau(12-16)(30-34) és a Tau(26-33) spektrumai közel azonosak,

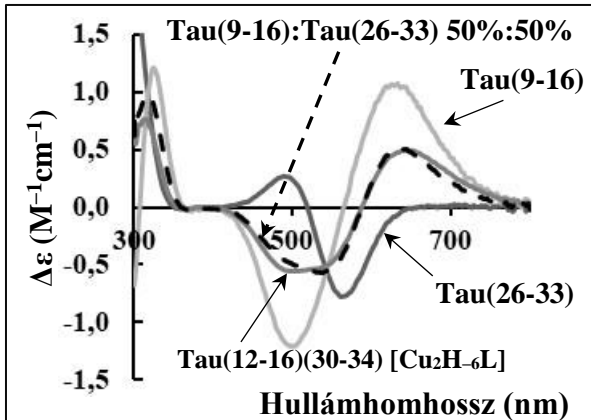
azonban teljesen eltér a Tau(9-16) esetén rögzítettől. Ugyanakkor a



37. ábra: A különböző 4*N*-es komplexek egyedi spektrumai (a), His32 izomer (b) és a His14 (c) izomer szerkezeti képletei

Tau(12-16)(30-34) spektrumát jobban közelíti az a CD-görbe, amely a Tau(9-16):Tau(26-33) spektrumainak 5:95 arányban való összegzésével adódik, tehát két koordinációs izomer van jelen az Ac-EDHAGTMHQD-NH₂ oldatában lúgos pH-tartományban: 5%-ban tartalmaz az oldat olyan komplexet, amelyben a His14 a kötőhely (37. (b) ábra) és 95%-ban olyan, amelyben a His32 (37. (c) ábra). Ez azt jelenti, hogy a két-hisztidin-tartalmú peptid esetében a His32 kötőhelyhez történő koordináció a kedvezményezettebb a His14-nel szemben bázikus közegben. Ez összhangban van azzal a megállapítással, hogy a Tau(26-33) kedvezőbb kötőhelyet jelent a Cu(II)-ion számára, mint a Tau(9-16).

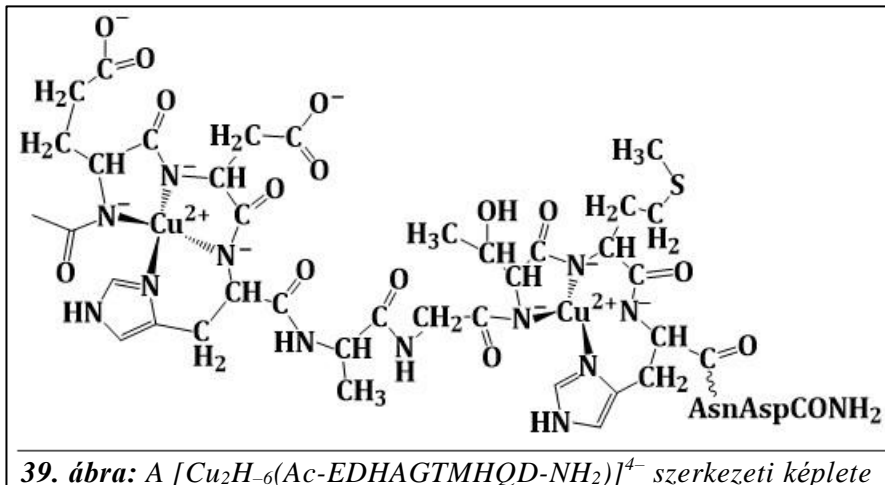
A 38. ábra a Tau(9-16), Tau(26-33) [CuH₃L] és a Tau(12-16)(30-34) [Cu₂H₆L]⁴⁻komplexeinek egyedi CD-görbéit mutatja be kiegészítve



38. ábra: A Tau(9-16) és Tau(26-33) [CuH₃L, valamint a Tau(12-16)(30-34) [Cu₂H₆L]komplexek CD-görbéi, és az egymagvú komplexek 1:1 arányú összegzésével kapott spektrum

egy olyan görbével, amit az egyhisztidin-tartalmú részecskék spektrumainak 1:1 arányú összegzésével kaptam. A dinukleáris [Cu₂H₆L]⁴⁺ összetételű (39. ábra) komplex keletkezését támasztja alá, hogy a spektruma eltér a két másik egymagvú komplex spektrumától, valamint, hogy az ez utóbbiak 1:1 arányú összegzésével nyert CD-görbe le-

futása megegyezik a kétmagvú komplex spektrumainak lefutásával.



39. ábra: A [Cu₂H₆(Ac-EDHAGTMHQD-NH₂)]⁴⁺ szerkezeti képlete

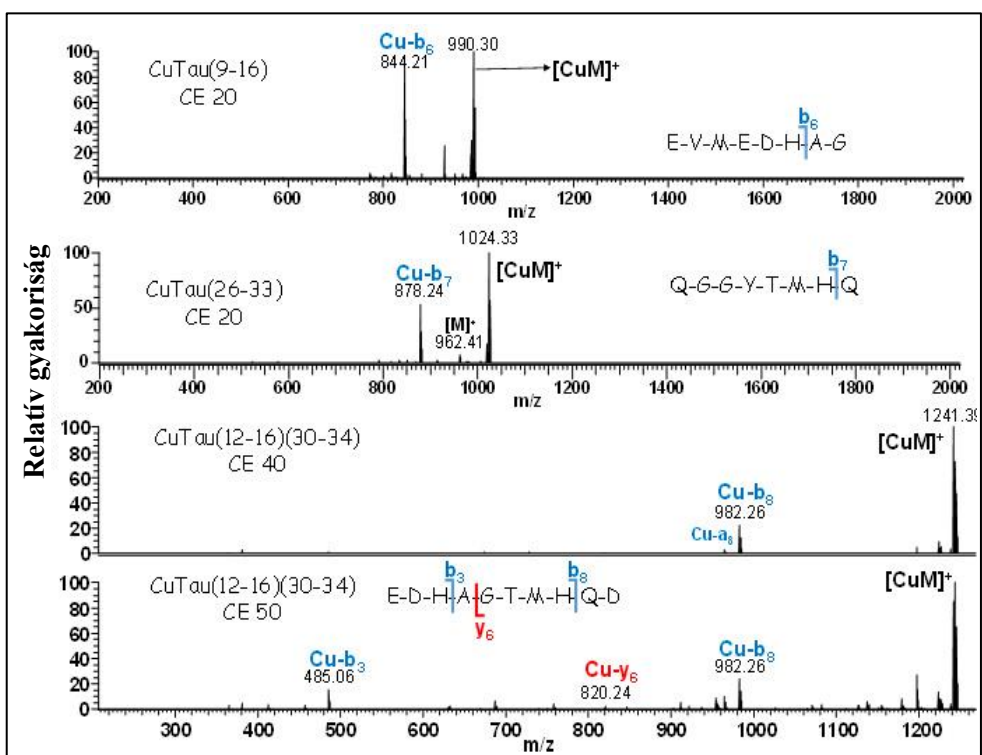
Az ESR-adatok is megerősítik az előző megállapításokat: (i) a [CuL] komplexben egy karboxilátsoport koordinációja, mert az erre a komplexre meghatározott adatok nagyon jó egyezésben vannak az Ac-SRYTHFLTQHYDAK-NH₂ peptid [CuH₃L] komplexére meghatározottal ($g_{\parallel}/A_{\parallel}$ 2,296/176·10⁻⁴ cm⁻¹ [195]) (ii) a peptidnitrogén koordinált részecskékre kapott értékek pedig jó egyezésben vannak a Tau(26-33) fragmens vizsgálatokor kapottal.

4.3.5. MS vizsgálatok

A tömegspektrometriás vizsgálatok és azok értékelése a CNR-IBB kutatóközpontban készültek, és a könnyebb áttekinthetőség érdekében egy külön alfejezetben tárgyalom.

A Fourier-transzformációs és tandem MS módszerek további információt adtak a komplexek szerkezetére vonatkozóan. Az egy hisztidint tartalmazó peptifragmensek esetén 1:1 aránynál csak egyetlen fémionkötőhely azonosítása történt meg, míg az összetett peptid esetében 2:1 fémion/ligandum arányú rendszerénél a dinukleáris $[\text{Cu}_2\text{H}_{-6}\text{L}]^{4+}$ részecske jelenlétét (*Függelék 45. ábra*) is sikerült igazolni. A sztöchiometriát a szimulált és mért izotópeloszlások összehasonlítása révén állapítottuk meg. A fémkomplexek képletének számolásakor figyelembe vettük, hogy $^{63}\text{Cu(I)}$ vagy $^{63}\text{Cu(II)}$ ligandumokhoz kötődése egy, illetve két proton felszabadulásával jár – a felsorolás sorrendjében. Az kísérleteileg kapott és szimulált eloszlások alapján a réz Cu(I)-ion formájában van jelen a komplexekben, amely ion redukcióval keletkezik vagy az ionizáció során [196], vagy a szkimmer, vagy a forrás nagy feszültsége miatt [197].

A fémiont kötő peptidek kis ütközési energiával történő fragmentációjakor (*43. ábra Tau(9-16) és Tau(26-33)*) elsősorban b_n fragmensek jönnek létre, amelyek a His aminosav C-terminális felőli oldalán lévő peptidkötés hasadásának eredménye. A fémionkötőhely mellett bekövetkező ilyen hasadást előzőleg már megfigyeltek [198]. 40 eV-tal történő fragmentációval a Cu(II):Ac-EDHAGTMHQD-NH₂ 1:1 fémion/ligandum rendszerben a Cu- b_8 volt a főfragmens a hasadás lejárásakor. Vagyis a His32-Gln33 között bekövetkező kötés-hasadás kedvezményezettebb, mint a His14-Ala15 között található peptidkötés (Cu- b_3 fragmens), ami alapján a Cu(II)-ion a His32-hez kötött formában van jelen a hasadás után is. Nagyobb ütközési energiánál a Cu- b_3 fragmens megjelenése is tapasztalható (*40. ábra*).



40. ábra: Az egyszeres töltésű réz-komplexek MS/MS spektrumainak vonalai: Cu(II)-Tau(9-16) (m/z $[M]^+ = 990,30$); Cu(II)-Tau(26-33) (m/z $[M]^+ = 1024,33$) és Cu(II)-Tau(12-16)(30-34) (m/z $[M]^+ = 1241,39$) 20-50 ütközési energia mellett. Az $[M]^+$ a molekulaiont jelöli. Az MS/MS spektrumoknál látható lehetséges fragmensek: a, b fragmensek, amennyiben a töltés az N-terminális felőli részen marad, illetve y fragmens, ha a töltés a C-terminális részen helyezkedik el. Az alsó index a hasított aminosavnak a megfelelő terminálistól számított távolságát mutatja. Csak a fémiont kötő b_n/a_n típusú fragmensek (kék szín) és y_n típusú fragmensek (piros szín) szerepelnek az ábrán.

4.3.6. Tau fragmensek Ni(II)-komplexei

Ni(II)-ion jelenlétében a Tau(9-16), Tau(26-33)m, Tau(26-33)mA és Tau(12-16)(30-34) ligandumokat vizsgáltuk. A fémion nem létfontosságú az élő szervezetek számára, azonban komplexképzési folyamatai hasonlóak a Cu(II)-ionhoz, így komplexei, mint a Cu(II)-komplexek modelljei használhatók, ezért végeztünk pH-potenciometriás, UV-látható és CD-spektroszkópiás vizsgálatokat a fémion felhasználásával.

A pH-potenciometrás titrálások alapján meghatározott komplexek összetételét és stabilitási állandóit tartalmazza a 23. táblázat.

23. táblázat: A tau fragmensek Ni(II)-komplexeinek stabilitási állandó értékei ($I = 0,20 \text{ mol/dm}^3 \text{ KCl}$, $T = 298 \text{ K}$)

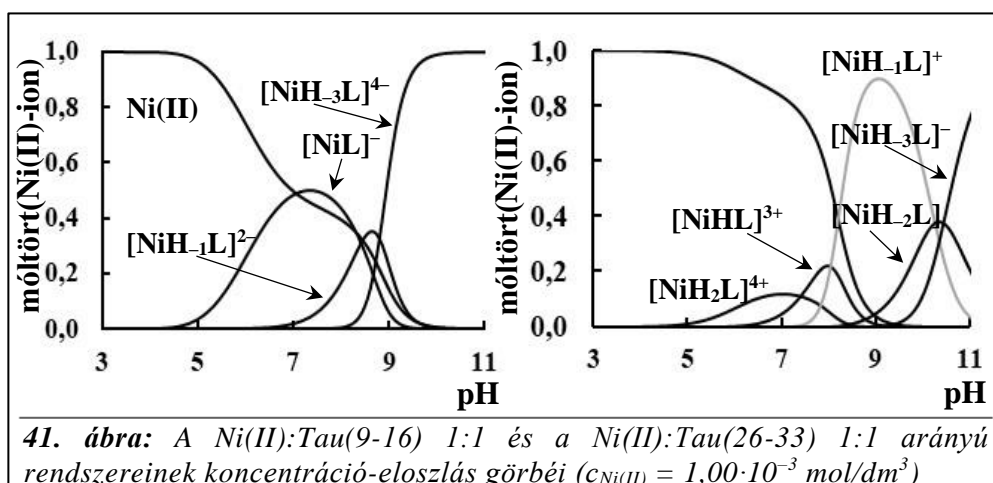
$\lg\beta[\text{M}_p\text{H}_q\text{L}_r]$	Tau (9-16) Ac- EVMEDHAG -NH ₂	Tau (26-33)m Ac- KGGYTMHK -NH ₂	Tau (26-33)mA Ac- KGGATMHK -NH ₂	Tau (12-16)(30-34) Ac- EDHAGTMHQD -NH ₂
[NiH ₃ L]	–	32,96(6)	-	–
[NiH ₂ L]	–	25,29(5)	22,99 (23)	–
[NiHL]	–	–	15,60 (9)	–
[NiL]	3,47(7)	9,44(2)	–	4,44(3)
[NiH ₋₁ L]	-4,95(7)	0,19(2)	-0,47	–
[NiH ₋₂ L]	–	-10,08(3)	-10,73(5)	–
[NiH ₋₃ L]	-22,56(5)	-20,51(2)	-21,16(5)	-21,43(5)
$\text{p}K(\text{N}^-)_1$	8,42	7,63	7,39	–
$\text{p}K(\text{N}^-)_{2,3\text{átlag}}$	8,81	7,93	8,04	–
$\text{p}K(\text{N}^-)_{1,3\text{átlag}}$	–	–	–	8,62
$\lg K(\text{Ni}+\text{Im})$	3,47	2,70	2,29	–
$\lg K(\text{Ni}+2\text{Im})$	–	–	–	4,44
$\text{p}K(\text{Tyr-OH})$	–	9,25	–	–
$\text{p}K(\text{Lys-NH}_3^+)$	–	10,27	10,26	–
$\text{p}K(\text{Lys-NH}_3^+)$	–	10,44	10,43	–

(A ligandumok eltérő bázicitása miatt a komplexek töltését nem tüntettem fel)

A táblázatból látható, hogy 1:1 összetételű mononukleáris komplexek képződnek az összes ligandum esetében. Dinukleáris komplexek keletkezésére a két hisztidint tartalmazó peptid esetében ugyan lenne lehetőség, azonban nem képződik, mert (i) a fémion indukált peptidnitrogén deprotonálódás és koordináció pH 8 felett indul meg, ami nagyobb, mint a réz(II)ion esetén, így a második ekvivalens Ni(II)-ion koordinációja már annyira bázikus közegben játszódna le, ahol a szabad fémion már

könnyedén $\text{Ni}(\text{OH})_2$ csapadék formájában leválik; (ii) a $[\text{Ni}_2\text{H}_6\text{L}]^{5-}$ komplex bruttó töltése elegendően nagy lenne ahhoz, hogy akadályozza a komplex keletkezését.

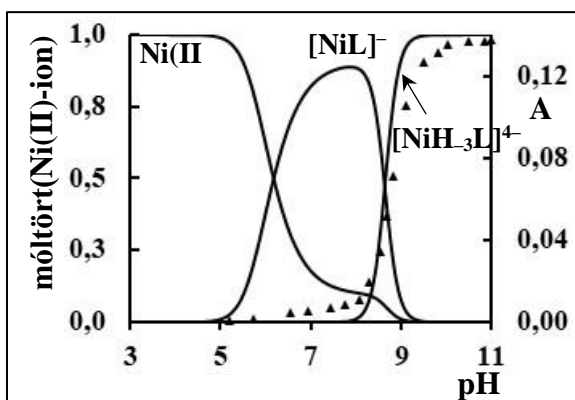
Két fő részecske és két különböző (oktaéderes és síknégyszetes) koordinációs mód jellemzi ezeket a komplexeket. pH 5 körül jelenik meg az imidazol koordinációjú részecske (41. ábra) és összetétele változatos attól függően, hogy van-e a ligandumban nagy pH-tartományban deprotonálódó aminosav oldallánc (Y (Tyr) és (K) Lys), ugyanis ezek ebben a pH-tartományban még protonált formában vannak jelen.



A $\text{Tau}(26-33)\text{m}$ és $\text{Tau}(26-33)\text{mA}$ molekulákra meghatározott $\lg K(\text{Ni}+\text{Im})$ értékek ((8) egyenlet) hasonlóak más belső pozícióban hisztidint tartalmazó peptidok ilyen értékeihez (Ac-FKHV-NH_2 2,81) [192], azonban a $\text{Tau}(9-16)$ esetén az érték 0,8 logaritmus egységgel nagyobb, ami a karboxilátcsoportok stabilitásnövelő hatásának az eredménye. A két hisztidint tartalmazó peptid esetében a karboxilátcsoportok koordinációja a fémionhoz a gyengén savas pH-tartományban szintén növeli a képződő $[\text{ML}]$ összetételű részecske stabilitását, amit a nagyobb $\lg K(\text{Ni}+2\text{Im})$ érték is tükröz (Ac-GTHSMKHM-NH_2 3,52 [190]). A komplexek utolsó kettő vagy három deprotonálódási lépésre számolt $\text{p}K$ -értékei a szabad ligandumra jellemző deprotonálódási állandókhoz hasonlóak, ami alapján ezek a csoportok nem vesznek részt a fémion megkötésében. A horgonycsoportot megelőző első peptid-NH-csoport deprotonálódása és koordinációja pH 8 felett játszódik le, míg a második és harmadik csoport kötődése már kooperatív folyamat. Az első deprotonálódási lépésre vonatkozó

$pK(N^-)_1$ -értékeket összehasonlítva egymással kitűnik, hogy a Tau(9-16) esetében majdnem egy logaritmus egységgel nagyobb, mint a másik két mutáns peptid esetén, vagyis a karboxilátcsoportok az első peptidnitrogén deprotonálódását és koordinációját kismértékben a lúgos pH-tartomány felé tolják. A következő két kooperatív deprotonálódási lépés $pK(N^-)_{2,3\text{átlag}}$ -értéke szintén emiatt nagyobb. A Tau(12-16)(30-34) peptid esetében a három csoport egy lépésben koordinálódik, azonban a peptidnitrogének koordinációja itt is nagyobb pH-n játszódik le, mint azt várnánk (Ac-GTHSMKHM-NH₂ 8,21). Bázikus közegben $[3N^-,N_{Im}]$ koordinációs módú komplexek alakulnak ki.

Fontos hangsúlyozni, hogy a Tau(12-16)(30-34) peptidhez stabilisabban kötődik a Ni(II)-ion, mint az egy hisztidint tartalmazó szekvenciákhoz. Ezt jól mutatják a 42. ábrán szereplő Ni(II):Tau(12-16)(30-34) rendszer koncentráció-eloszlás görbéi a pH-függvényében, amelyen szerepel a 450 nm hullámhosszon

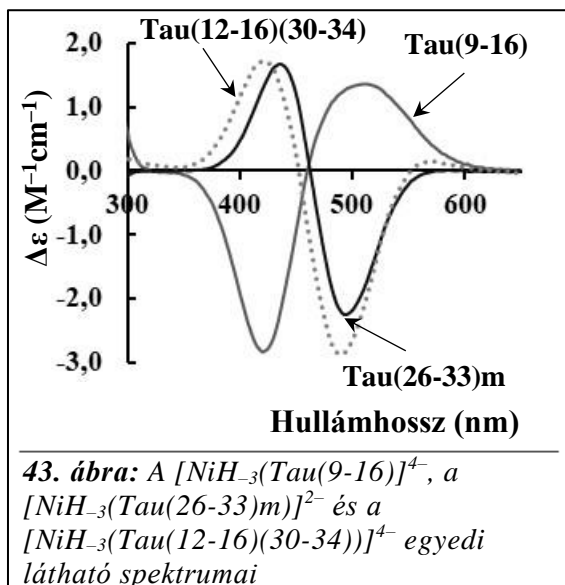


42. ábra: A Ni(II):Ac-EDHAGTMHQD-NH₂ 1:1,1 arányú rendszerének koncentráció-eloszlási görbéi a 450 nm hullámhosszon rögzített A értékekkel együtt ábrázolva ($c_{Ni(II)} = 1,06 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

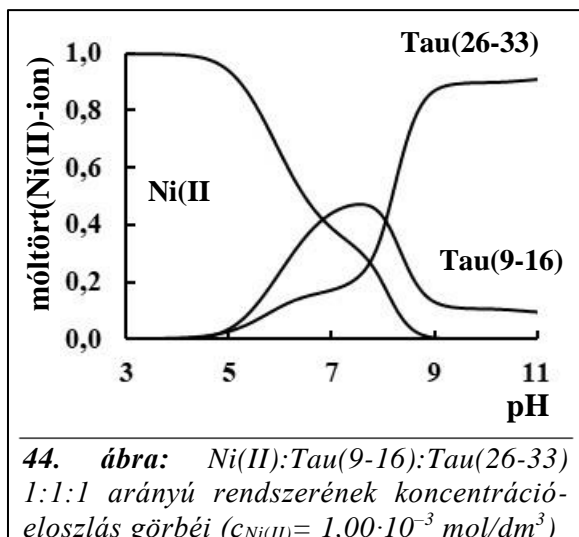
rögzített abszorbancia értékek változása a pH-függvényében. A stabilitásnövekedést a két imidazolilcsoport együttes koordinációja okozza a [NiL] komplexben. Utóbbi részecske mennyisége a pH 7-8 tartományban körülbelül 90%, amíg ez a szám alig 30-50% volt az egy-hisztidin-tartalmú peptidek esetében (26. és 29 (b) ábra). Az ábrán továbbá az is látható, hogy az abszorbancia

értékek változása követi a $[NiH_3L]^{4+}$ komplex koncentrációját, ami azt mutatja, hogy ez az egyik fő komplex, valamint, hogy a részecske síknégyszetes geometriájú, ami a 4N-es koordinációs módra utal. Csak erre a komplexre határozhatók meg megbízhatóan spektrális paraméterek. A $[NiH_3L]$ komplexek abszorpciós spektrumai nem meglepő módon rendkívül hasonlóak egymáshoz ($\lambda_{max} = 440-450 \text{ nm}$,

$\epsilon = 120\text{-}145 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), azonban a CD-spektrumaik nem, ezt szemlélteti a 43. ábra.



Hasonlóan, mint ahogyan azt a Cu(II)-komplexeknél láttuk, itt is különbség van a CD-görbék lefutásában a látható fény hullámhossz-tartományában: a Tau(9-16) Ni(II)-komplexére jellemző spektrum teljesen eltér a Tau(26-33)m és Tau(12-16)(30-34) komplexekétől, ami azt mutatja, hogy a Ni(II)-ion kötődése a His32-t tartalmazó molekularészhez kedvezményezett.



A 44. ábrán egy olyan modell rendszer koncentráció-eloszlás görbéi láthatóak, amelyben a Ni(II):Tau(9-16):Tau(26-33)m ekvimoláris mennyiségben vannak jelen. Fiziológias pH-érték körül a Tau(9-16) fragmens kétszeres mennyisége köt fémiot mint a Tau(26-33)m, ez a trend azonban a pH növelésével megfordul, és erősen lúgos

közegben szinte kizárólag a 32. hisztidint tartalmazó molekulához kötődik a Ni(II)-ion hasonlóan, mint a Cu(II)-ion esetén.

5. Összefoglalás

A fémionok élő szervezetekben betöltött szerepe nagyrészt metalloenzimekhez és metalloproteinekhez köthető. Általánosan igaz, hogy a fémionok a poli- és oligopeptidekhez azok oldalláncain keresztül képesek kötődni, amelyben leggyakrabban karboxilát-, imidazolil- és tiolátcsoportok érintettek. A fehérjemolekulák szekvenciájában több ilyen oldalláncot tartalmazó aminosav is előfordul, így azok fémionokkal kialakított kölcsönhatásának tanulmányozásához elengedhetetlenül szükséges megismerni, hogy a különböző fémionok milyen kölcsönhatást alakítanak ki az egyszerűbb aszparaginsav, glutaminsav-, cisztein- és hisztidin-tartalmú peptidekkel. Munkám során ezért ilyen aminosavakat tartalmazó oligopeptideket vizsgáltam.

A kutatók az elmúlt időszakban kis hangsúlyt fektettek arra, hogy a gyengén koordinálódó oldalláncok hogyan befolyásolják a különböző átmenetifém-komplexelek stabilitását és összetételét, ezért csoportunk a közelmúltban aszparaginsavat és glutaminsavat tartalmazó kistagszámú peptidek átmenetifém komplexeinek oldategyensúlyi viselkedését széleskörűen tanulmányozta. *A kapott eredmények teljessé tette szükségessé tette a Cd(II)-ion komplexeinek tanulmányozását is, így munkám során célul tűztem ki több aszparaginsav- és/vagy glutaminsav-tartalmú peptid Cd(II)-ion felé mutatott fémionkötőképességének tanulmányozását.* A felhasznált ligandumok az DA, az DD, az DE, a EE, az DDD és az DDDD voltak. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a karboxilátoldalláncok növekvő száma kis mértékben növeli a keletkező komplexek stabilitását, és a komplexek növekvő töltése nem befolyásolja a komplexképződést. Továbbá a peptidek nem szelektívek a Cd(II)-ionra, és nem bizonyultak hatásos fémionmegkötőknek sem, mert az $[\text{NH}_2(\text{COO}^-)_x]$ koordinációs módot tartalmazó Co(II)- és Zn(II)-komplexek stabilisabbak.

A természetben több olyan oligopeptid is előfordul – például cink-ujj fehérjék –, amelyek ciszteint tartalmaznak és nem csak természetes, hanem toxikus fémionok megkötésére is képesek. Emiatt az irodalomban már több olyan publikáció is megjelent, amely különböző fehérje modell peptidek vizsgálatával foglalkozik. *Célom volt egy, illetve két ciszteint tartalmazó kistagszámú peptidek szisztematikus*

vizsgálata, amelyek segíthetnek a nagyobb tagszámú peptidek oldategyensúlyi viselkedésének értelmezésében. Kutatásaink során azt vizsgáltuk, hogy a ciszteinek száma és pozíciója a peptidek szekvenciájában hogyan befolyásolja azok Cd(II)- és Zn(II)-komplexeinek összetételét és stabilitását. Az eredményeket a Ni(II)-ion tanulmányozásával tettük teljessé. A felhasznált ligandumok az Ac-SAAC-NH₂, az Ac-SCCS-NH₂, az Ac-CSC-NH₂, az Ac-CSSC-NH₂ és Ac-CGSC-NH₂ voltak.

Az egy-cisztein-tartalmú peptid komplexeinek stabilitási állandóit összevetve az Ac-DAAC-NH₂ és Ac-HAAC-NH₂ peptidek megfelelő komplexeinek értékével azt a megállapítást tettük, hogy a ligandumokban jelenlévő egyéb donorcsoportok növelik a képződő komplexek stabilitását, és mindkét fémionra a stabilitás az Ac-SAAC-NH₂ < Ac-DAAC-NH₂ < Ac-HAAC-NH₂ sorrendben változik.

Általánosan megállapítható, hogy (i) a Cd(II)-komplexek stabilitása nagyobb, mint a Zn(II)-komplexeké. (ii) A cisztein aminosavak számának növekedésével jelentős komplexstabilitásnövekedés történik mind a Cd(II)-, mind a Zn(II)-ion esetén, ami akkor a legkifejezettebb, ha a kialakuló makrokelát tagszáma 12 és 15 között van.

(iii) Mindkét fémion esetén a [S⁻,S⁻] koordinációs mód nagyobb stabilitású komplexek kialakulását teszi lehetővé, mint az [N_{1m},N_{1m}], [S⁻], [COO⁻, S⁻], valamint az [N_{1m},S⁻] koordinációs mód.

A Ni(II)-komplexek esetében a tiolátcsoport jó horgonycsoportnak bizonyult, és részvételével nemcsak egymagvú, hanem többmagvú komplexek képződését is sikerült kimutatnunk ([Ni₃L₄], [NiH₋₁L]_x, [Ni₂H₋₂L₂]_x, [Ni₂H₋₃L₂]_x), ugyanis a csak tiolátcsoportok révén történő koordináció során a donorcsoportok hídligandumként két fémionhoz is kötődhetnek egyidőben. Megállapítottuk, hogy a cisztein aminosavak szekvencián belüli távolságának növekedésével (i) polinukleáris szerkezetek képződése háttérbe szorul, valamint, hogy (ii) a horgonycsoport mellett jelenlévő második tiolátcsoport a horgonycsoportot megelőző, peptidnitrogén donorok koordinációját egyre kisebb mértékben gátolja.

Ugyanakkor az eredmények irodalmi adatokkal való összevetése alapján azt is megállapítottuk, hogy a korábban hasonló szekvenciájú peptidekre közölt modellek leegyszerűsítettek és nem számolnak a többmagvú komplexek képződésével.

Összevetve különböző fémionok [ML] komplexeinek stabilitását a következő sorrend állítható fel: Cd(II) > Pb(II) > Zn(II) > Ni(II), azaz a ligandumok a Cd(II)-iont képesek a leghatékonyabban megkötni. A következtetéseink alapján úgy tűnik, hogy a CXXC, illetve CXXXC szekvenciák alkalmasak lehetnek a Cd(II)-ion szelektív megkötésére.

Az amiloid- β peptid részletes tanulmányozása csoportunkban korábban már megtörtént, viszont az Alzheimer-kór és más neurodegeneratív betegségek lefolyásában szintén részt vevő tau molekulával vagy fragmenseivel még nem történtek vizsgálatok, ezért a kutatócsoportunk ezen fehérje különböző hisztidint tartalmazó kötőhelyeinek a szisztematikus vizsgálatát kezdte el. *PhD munkám részeként az N-terminális régióban megtalálható 14. és 32. számú hisztidint (His14 és His32) és azok környezetét tartalmazó fragmensek és mutánsaik vizsgálatát tűztem ki célul elsősorban Cu(II)-ion jelenlétében.* A Ni(II)-ion segíthet utóbb említett részecskék koordinációs kémiai viselkedésének értelmezésében, így néhány esetben a Ni(II)-komplexeket is tanulmányoztam. A felhasznált ligandumok az Ac-EVMEDHAG-NH₂ (Tau9-16)(natív), az Ac-QGGYTMHQ-NH₂ (Tau(26-33))(natív), Ac-KGGYTMHQ-NH₂ (Tau(26-33)m), Ac-KGGATMHK-NH₂ (Tau(26-33)mA) és az Ac-EDHAGTMHQD-NH₂ (Tau(12-16)(30-34)).

Mindkét natív fragmens képes a Cu(II)- és a Ni(II)-ion megkötésére, de a Ni(II)-komplexelek termodinamikai stabilitása számottevően kisebb, mint a Cu(II)-komplexeké. A hisztidin az elsődleges kötőhely minkét fémion számára, azonban a Tau(9-16) peptidnél a szekvenciában jelenlévő karboxilcsoportok képesek a M-Im koordinált komplexek stabilitását megnövelni a Cu(II)-ion esetén a gyengén savas, míg a Ni(II)-ionnál a fiziológias pH-tartományban. A pH növelésével a peptidek szekvenciájában a hisztidint megelőző peptid-NH-csoportok fémion indukált deprotonálódása és koordinációja játszódik le. A Cu(II)-ion esetében az első két donor deprotonálódása átfedő lépésekben történik, más terminálisan védett belső pozícióban hisztidint tartalmazó peptidekhez hasonlóan. A folyamat során [N⁻,N⁻,N_{im}] koordinációs módú részecske keletkezik, amely uralkodó a fiziológias pH-tartományban. A harmadik peptidnitrogén deprotonálódása és koordinációja gyengén bázikus közegben játszódik le. A Ni(II)-ion esetén peptidnitrogén koordinált részecskék pH 8 felett képződnek gyakorlatilag egy lépésben, amely során a

koordinációs geometria átalakul oktaédresből síknégyzetesbe. Erősen lúgos pH-tartományban mindkét fémion $[N^-,N^-,N^-,N_{im}]$ kötésmódú komplexeket képez. Az egyszerű, monodentát kötődést tartalmazó részecskék átalakulása peptidnitrogén koordinált részecskékké megváltoztatja a fémion hisztidinek felé mutatott preferenciáját is: a His32-hez történő kötődés dominánssá válik a His14-nel szemben. A Tau(12-16)(30-34) a két hisztidin aminosavat ugyanolyan környezetben foglalja magában, mint a natív fragmensek. A CD-spektrumok egyértelmű bizonyítékot adnak arra, hogy a Cu(II)- és Ni(II)-ion is a His32-hez kötődik lúgos közegben, hasonlóan az egy hisztidint tartalmazó fragmensekhez. Azonban két fő különbség is mutatkozik a komplexképződés folyamatában: (i) a Tau(12-16)(30-34) peptid két ekvivalens Cu(II)-iont is képes koordinálódni, dinukleáris komplexek keletkezése közben, mert a két hisztidin különálló kötőhelyként képes viselkedni; (ii) a két imidazolilcsoport makrokelátot képez, ami megnöveli a keletkező Cu(II)- és Ni(II)-komplexek stabilitását.

6. Summary

The role of metal ions is related to metalloenzymes and metallopeptides. Metal ions usually can bind to oligo- and poly-peptides through their side chains: carboxylate, imidazole and thiolate groups are the ones most affected in this interaction. In the sequence of the proteins can be found more than one amino acids, which comprise these side chains, thus, it is necessary to study the interaction between different metal ions and simple ligands containing histidine, cysteine, aspartic and glutamic acid. Therefore, I studied peptides comprising these amino acid residues during my PhD work.

Researchers have put reduced emphasis on how the slightly and strongly coordinating groups influence the stoichiometry and stability of the different transitional metal complexes recently. Thus, our research group has analysed widely the solution equilibrium behavior of transitional metal complexes of short ligands containing aspartatic and/or glutamic acids. The completion of these results also requires the investigation of the Cd(II) complexes, thus, *my aim was to investigate the cadmium(II) ion binding affinity of short peptides containing several aspartic and/or glutamic acid residues*. The applied peptides were: DA, DD, EE, DDD, DDDD.

Based on the results we established that the increasing number of carboxylate groups slightly enhances the stability of the complexes and the increasing charge of the complexes does not hamper the complex formation. Furthermore, these peptides have no high and selective metal binding affinity for Cd(II) and selective Cd(II) chelators, because the $[\text{NH}_2,(\text{COO}^-)_x]$ coordination mode including Co(II) and Zn(II) complexes is more stable.

There are several oligopeptides in nature (zinc finger proteins) that contain cysteinyl residue and not only essential metal ions but also toxic ones can be bound by them. Therefore, lots of articles have been published in the scientific literature dealing with different model ligands of natural proteins. *My aim was the systematic investigation of short peptides containing one or two cysteinyl residues, which can support the interpretation of the solution equilibrium manner of long peptides*. During the studies we focused on how the number and the position of the cysteinyl residues in the sequence of the peptides influence the stoichiometry and stability of their Cd(II) and

Zn(II) complexes. Studies were completed with the analysis of Ni(II) complexes. The applied peptides were: Ac-SAAC-NH₂, Ac-SCC-NH₂, Ac-CSC-NH₂, Ac-CSSC-NH₂ and Ac-CGSC-NH₂.

When the stability of the one cysteine residue containing peptide compared with the stability of Ac-DAAC-NH₂ and Ac-HAAC-NH₂ complexes it is notable that the other donor atoms in the sequence of the ligands enhances the stability of the forming complexes. The order of the stability changes in the next order: Ac-SAAC-NH₂ < Ac-DAAC-NH₂ < Ac-HAAC-NH₂ in the case of each metal ions.

Our general findings are: (i) the stabilities of the Cd(II) complexes are higher than Zn(II) complexes (ii) the increasing number of cysteine residues causes complex stability enhancement by both Cd(II) and Zn(II) ions. This phenomenon has the biggest effect when the chelate ring has 12-15 members. (iii) For both metal ions the [S⁻,S⁻] coordination mode obtains more stable complexes than [N_{Im},N_{Im}], [S⁻], [COO⁻,S⁻] and [N_{Im},S⁻].

In the case of Ni(II) complexes, the thiolate group serves a good anchor group forming mono- and poly-nuclear complexes as well, since it can behave as a bridging ligand between two Ni(II) ions. Thus not only mononuclear but also polynuclear complexes were detected in our systems ([Ni₃L₄], [NiH₋₁L]_x, [Ni₂H₋₂L₂]_x [Ni₂H₋₃L₂]_x). The increasing number of amino acids between the two cysteinyl residues (i) de-emphasizes the formation of the polynuclear complexes (ii) causes the second cysteinyl residue to prevent the deprotonation and coordination of peptide nitrogens to the metal ion to a lower extent. Comparing our results with literary data reveals that the previously published models of similar Ni(II)-peptide systems are too simplified and the formation of polynuclear complexes was not taken into account. Considering the stability of the [ML] complexes the following order can be set up: Cd(II) > Pb(II) > Zn(II) > Ni(II) namely Cd(II) can be bound the most effectively. According to the aforementioned facts CXXC and CXXXC sequences are capable of the selective binding of Cd(II).

Amyloid-β peptide has been studied thoroughly in our research group lately, however, the tau preprotein causing Alzheimer disease and its fragments have been never investigated before. Therefore, our group has begun the systematic analysis of

the different binding sites of this protein. *As part of my PhD work my aim was to study the 14th and 32th histidine (His14 and His32) and model peptides mimicking their surroundings sequences primarily in the presence of Cu(II).* Ni(II) complexes can support the interpretation of the solution equilibrium forms of the Cu(II) complexes, thus, in some cases I also investigated Ni(II) complexes. The applied peptides were: Ac-EVMEDHAG-NH₂ (Tau9-16)(native), Ac-QGGYTMHQ-NH₂ (Tau(26-33))(native), Ac-KGGYTMHQ-NH₂ (Tau(26-33)m), Ac-KGGATMHK-NH₂ (Tau(26-33)mA) as well as Ac-EDHAGTMHQD-NH₂ (Tau(12-16)(30-34)).

Both native fragments are able to bind Cu(II) or Ni(II) ions but the thermodynamic stability of the Ni(II) complexes is significantly lower than that of the Cu(II) species. Histidyl residues are the primary metal binding sites for both metal ions, but in the case of Tau(9-16) the side chain carboxylate functions can enhance the stability of the M(II)-N_{im} coordinated complexes. These species are present in slightly acidic solutions for Cu(II), while they are the major components in the physiological pH range for Ni(II). An increase of pH results in the deprotonation and metal ion coordination of the peptide-N⁻ groups preceding the histidyl sites. In the case of Cu(II) the deprotonation of the first two peptide-N⁻ donor takes place in a cooperative manner which is a common feature of the terminally protected peptides including internal histidyl residues. This process results in the [N_{im},N⁻,N⁻] coordination mode and this is the predominating species in the physiological pH range. The deprotonation and Cu(II) coordination of the third peptide-N⁻ group occurs under slightly alkaline conditions. For Ni(II) the peptide-N⁻ coordinated species are formed above pH 8.0 and this is a cooperative process for all three peptide-N⁻ groups resulting in a change of the coordination geometry from octahedral to square planar. The donor atoms of the major species in basic solutions are the same for both metal ions [N⁻,N⁻,N⁻,N_{im}]. The change of the binding mode from the simple monodentate imidazole binding to the peptide-N⁻ bonded complexes changes the metal ion preference of the two histidyl sites, too. For the latter binding mode His32 site predominates over His14.

The octapeptide Ac-EDHAGTMHQD-NH₂ contains the histidines in the same environments as in the native fragments. The CD spectra give an unambiguous proof for the Cu(II) and Ni(II) binding to the second histidyl residue in alkaline samples

similar to the one-histidine counterparts. There are, however, two major differences in the complex formation processes. On the one hand the octapeptide can keep two equivalents of Cu(II) ions in solution resulting in the formation of dinuclear complexes, in which the histidines are independent metal binding sites. On the other hand, the two imidazoles can form macrochelates enhancing the overall metal binding ability of the decapeptide.

7. Függelék

Tudományos publikációk

Az értekezés alapját képező közlemények:

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

1. M. Lukács, Gy. Szunyog, Á. Grenács, N. Lihi, Cs. Kállay, G. Di Natale, T. Campagna, V. Lanza, G. Tabbi, G. Pappalardo, I. Sóvágó, K. Várnagy, **Copper(II) Coordination Abilities of the Tau Protein's N-Terminus Peptide Fragments: A Combined Potentiometric, Spectroscopic and Mass Spectrometric Study**, *ChemPlusChem*, 84 (2019) 1697-1708. IF: 2,753
2. N. Lihi, M. Lukács, M. Raics, Gy. Szunyog, K. Várnagy, Cs. Kállay, **The effect of carboxylate groups on the complexation of metal ion with oligopeptides – Potentiometric investigation**, *Inorganica Chimica Acta*, 472 (2018) 165-173. IF: 2,433

Az értekezés anyagához szorosan nem kapcsolódó közlemények:

1. B. D. Balogh, Zs. Bihari, P. Buglyó, G. Csire, Zs. Kerekes, M. Lukács, I. Sóvágó, K. Várnagy, **Metal binding selectivity of an N-terminally free multihistidine peptide HAVAHHH-NH₂**, *New Journal of Chemistry*, 43 (2019) 907-916. IF: 3,288
2. N. Lihi, M. Lukács, D. Szűcs, K. Várnagy, I. Sóvágó: **Nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of peptides containing separate aspartyl and cysteinyl residue**, *Polyhedron*, 133 (2017) 364-373. IF: 2,067

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások:

1. Lukács Márton, Szunyog Györgyi, Grenács Ágnes, Kállay Csilla, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Cire Gizella, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre: **A tau fehérje két kötőhelyét modellező peptidek Cu(II)- és Ni(II)-komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata**, 53. Komplexkémiai Kollokvium, Velence, 2019.05.21.-05.23., E11
2. Lukács Márton, Szunyog Györgyi, Grenács Ágnes, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Cire Gizella, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre: **A tau fehérje két kötőhelyét modellező peptidek Cu(II)-komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata**, Tavasz Szél Konferencia, Debrecen, 2019.05.03.-05.05., 311. oldal

3. Lukács Márton, Szunyog Györgyi, Grenács Ágnes, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Cire Gizella, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre: **A tau fehérje két kötőhelyét modellező peptidek Cu(II)-komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata**, I. Fialat Kémikusok Fóruma Szimpózium Konferencia, Debrecen, 2019.04.03-04.05., 39. oldal
4. Lukács Márton, Kerekes Zsuzsanna, Várnagy Katalin: **Tau fehérje kötőhelyét modellező peptidek vizsgálata**, Tavasz Szél Konferencia, Győr, 2018. 05.04.-05.06., 203. oldal
5. Lukács Márton, Várnagy Katalin: **Terminálisan védett cisztein tartalmú peptidek oldategyensúlyi és spektroszkópiás vizsgálata**, 51. Komplexkémiai Kollokvium, Balatonvilágos, 2017.05.29-05.31., E11
6. Lukács Márton, Várnagy Katalin: **Terminálisan védett cisztein tartalmú peptidek oldategyensúlyi és spektroszkópiás vizsgálata**, Tavaszi Szél Konferencia, Miskolc, 2017.03.31-04.02., 195. oldal
7. Lukács Márton, Várnagy Katalin: **Terminálisan védett cisztein tartalmú peptidek oldategyensúlyi és spektroszkópiás vizsgálata**, XXXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Miskolc, 2017.03.29-03.31., 16. oldal

Az értekezés anyagához nem kapcsolódó előadások:

1. Balogh Bettina Diána, Csire Gizella, Kerekes Zsuzsanna, Lukács Márton, Várnagy Katalin: **Az N- és C-terminális rész fémionkötő képességének összehasonlítása a HAVAHHH-NH₂ peptidben**, 53. Komplexkémiai Kollokvium, Velence, 2019.05.21.-05.23., E8 oldal

Az értekezés alapját képező poszterek:

1. Lukács Márton, Szunyog Györgyi, Grenács Ágnes, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre: **Metal ion binding ability of the free N-termini of tau protein: appraisal of preference by solution equilibrium study**, International Symposium on Metal Complexes, Hajdúszoboszló (Debrecen), 2019.06.11-06.14., 131-132. oldal
2. Giuseppe Di Natale, Lukács Márton, Valeria Lanza, Giovanni Tabbi, Tiziana Campagna, Kállay Csilla, Giuseppe Pappalardo: **Copper(II) binding within the N-terminal region of the Tau protein: the use of model peptides for the evaluation of metal ion binding preferences**, International Symposium on Metal Complexes, Hajdúszoboszló (Debrecen), 2019.06.11-06.14., 99. oldal
3. Grenács Ágnes, Lihi Norbert, Bodnár Nikolett, Pataki Zsombor, Pálinkás Dóra Csilla, Lukács Márton, Várnagy Katalin: **Effects of polar side chains on the formation of nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of**

- cysteine peptides**, International Symposium on Metal Complexes, Hajdúszoboszló (Debrecen), 2019.06.11.-06.14., 112. oldal
4. Lukács Márton, Szunyog Györgyi, Lihi Norbert, Grenács Ágnes, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Várnagy Katalin: **Copper(II) complexes of peptides mimicking the Tau protein binding sites**, 35th International Conference on Solution Chemistry, Szeged, 2018.08.26.-08.30., 91. oldal
 5. Lukács Márton, Várnagy Katalin: **Cadmium(II) and zinc(II) complexes of terminally protected tetrapeptides containing cysteinyl residue**, 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference Budapest, 2016.08.28.-09.01., 161. oldal

Az értekezés alapját képező egyéb publikációk:

1. Lukács Márton, Szunyog Györgyi, Grenács Ágnes, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre: **A tau fehérje két kötőhelyét medellező peptidek Cu(II) komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata**, I. Fiatal Kémikusok Fóruma konferencia kiadvány, Debrecen, 2019.04.03.-04.05., 97-102., 97-101. oldal

24. táblázat: Az Ac-ACCHDHKKH-NH₂ és az Ac-SCCS-NH₂ ligandumok különböző Ni(II)-komplexeinek spektrális paraméterei (λ_{\max} (nm)/ ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$))

	Ac-ACCHDHKKH-NH ₂ [61]		Ac-SCCS-NH ₂	
	UV λ_{\max}/ϵ	CD $\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$	UV λ_{\max}/ϵ	CD $\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$
[Ni ₂ H ₋₂ L ₂] _X ²⁻ pH = 8,60	–	–	648/134 (váll) 517/397 (váll) 420/1160 378/1057	652/+0,97 530/-7,29 448/+3,76 372/+2,29 335/+4,69 272/-25,5
[NiH ₋₂ L] ₋ pH ~ 11	540/213 419/647 380/617 310/5494	650/+0,286 538/-3,131 450/+1,569 370/1,233 332/2,165 270/-10,047 237/4,573	–	–
[NiH ₋₃ L ₂] _X ³⁻ pH ~ 11	–	–	644/122 (váll) 515/373 (váll) 420/1119 382/1023	659/+0,94 537/-6,55 447/+3,30 371/+2,03 (váll) 333/+4,61 272/-24,6

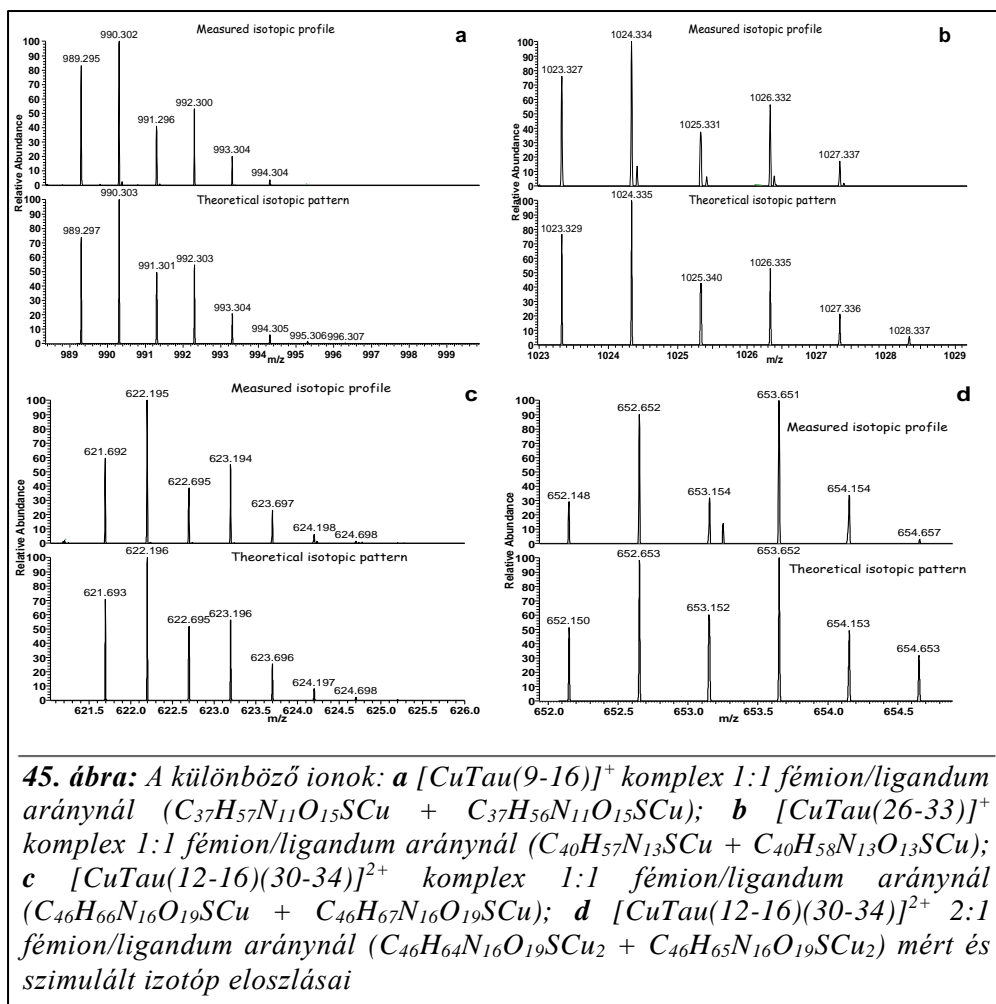
25. táblázat: Az Ac-CGC-NH₂ és az Ac-CSC-NH₂ ligandumok különböző Ni(II)-komplexeinek spektrális paraméterei (λ_{\max} (nm)/ ϵ (M⁻¹cm⁻¹))

	Ac-CGC-NH ₂ [62]			Ac-CSC-NH ₂	
	UV λ_{\max}/ϵ	CD $\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$		UV λ_{\max}/ϵ	CD $\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$
[NiH ₁ L] ⁻ pH ~ 6,4	416/952 302/4172	651/-0,13 505/+0,21 439/-0,58 382/+1,02 váll 332/+1,84 268/-1,73	[Ni ₃ L ₄] ²⁻ pH ~ 6,0	602/474 434/1120	641/-0,42 521/+0,49 438/-0,14 397/+0,41 váll 338/2,94 289/-0,66 281/+1,05 268/+0,68 259/+1,18
[NiL ₂] ²⁻ pH ~ 7,7	589/298 427/794 312/3541	616/+0,14 440/-1,23 378/+0,53 315/+1,20 263/-3,49	[NiH ₁ L] _x ²⁻ pH ~ 7,7	595/321 435/848	523/+0,29 447/-1,30 394/+0,0087 váll 329/+1,26 278/+0,47 254/-0,22 233/-0,043
[NiH ₂ L] ²⁻ pH ~ 11	550/117 431/258 333/636	616/+0,14 440/-1,23 378/+0,53 315/+1,20 263/-3,49	[NiH ₂ L] ²⁻ pH > 11	531/97 váll 445/197	555/-0,89 442/+1,12 328/+1,63 váll 303/+2,10 269/-4,37 253/+2,75 248/+2,89

26. táblázat: Az Ac-CSSC-NH₂, az Ac-CGSC-NH₂, Ac-ELECKDCSSV-NH₂ és Ac-CSSACS-NH₂ ligandumok különböző Ni(II)-komplexeinek spektrális paraméterei (λ_{\max} (nm)/ ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$))

	[NiH ₂ L]		[NiH ₃ L]	
	UV λ_{\max}/ϵ	CD $\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$	UV λ_{\max}/ϵ	CD $\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$
Ac-CSSC-NH₂	551/359 váll 427/932 328/1638 váll	514/+0,32 435/-0,61 310/+0,085 287/-0,10 265/-0,48 246/+0,13	550/349 váll 426/884 329/1576 váll	518/+0,442 436/-0,84 325/+0,11 290/-0,23 282/-0,15 264/-0,72 242/+0,70
Ac-CGSC-NH₂	–	–	549/159 váll 443/550 334/620 váll	649/+0,006 522/-0,37 446/+0,17 384/-0,28
Ac-ELECKDCSSV-NH₂ [65]	–	–	550/215 451/340 366/1230 270/7770	578/+1,91 452/-1,88 387/-1,15 353/+0,59 324/+1,09 283/+5,67 251/+1,41
Ac-CSSACS-NH₂ [182]	549/130 váll 446/265 váll 364/553 váll	625/+0,047 533/+0,094 446/-0,49 343/-0,18 284/+0,12 262/-1,04	545/114 váll 450/227 370/491 váll	533/+0,15 447/-1,50 325/+0,21 289/-0,63 276/-0,041 260/-1,37

A 24., 25. és 26. táblázatban különböző töltésátmenetekhez rendelhető számértékek láthatóak. Ezek az átmenetek az alacsonyabb hullámhosszaktól a nagyobb hullámhosszak felé haladva a következők: 230-240 nm $S_{\sigma_z} \rightarrow Ni$, 265 nm körül $N^- \rightarrow Ni$, 270 nm körül $N^-, S_{\sigma_z} \rightarrow Ni$, 280 nm körül $S_{\sigma_x} \rightarrow Ni$, 310-335 nm $S_{\pi_x} \rightarrow Ni$, 350 nm felett d-d átmenetek [56].



45. ábra: A különböző ionok: **a** $[CuTau(9-16)]^+$ komplex 1:1 fémion/ligandum arányánál ($C_{37}H_{57}N_{11}O_{15}SCu + C_{37}H_{56}N_{11}O_{15}SCu$); **b** $[CuTau(26-33)]^+$ komplex 1:1 fémion/ligandum arányánál ($C_{40}H_{57}N_{13}SCu + C_{40}H_{58}N_{13}O_{13}SCu$); **c** $[CuTau(12-16)(30-34)]^{2+}$ komplex 1:1 fémion/ligandum arányánál ($C_{46}H_{66}N_{16}O_{19}SCu + C_{46}H_{67}N_{16}O_{19}SCu$); **d** $[CuTau(12-16)(30-34)]^{2+}$ 2:1 fémion/ligandum arányánál ($C_{46}H_{64}N_{16}O_{19}SCu_2 + C_{46}H_{65}N_{16}O_{19}SCu_2$) mért és szimulált izotóp eloszlásai

8. Irodalomjegyzék

- [1] Weeks, M. E., The discovery of the elements. X. The alkaline earth metals and magnesium and cadmium. *Journal of Chemical Education* **1932**, 9 (6), 1046
- [2] Faroon, O.; Ashizawa, A.; Wright, S.; Trucker, P.; Ingerman, L; Rudisill, C.; *Toxicological Profile for Cadmium*. 2012.
- [3] Lane, T. W.; Saito, M. A.; George, G. N.; Pickering, I. J.; Prince, R. C.; Morel, F. M. M., A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* **2005**, 435 (7038), 42-42.
- [4] Ghosh, R.; Roy, S., Chapter 8 - Cadmium Toxicity in Plants: Unveiling the Physicochemical and Molecular Aspects. In *Cadmium Tolerance in Plants*, Hasanuzzaman, M.; Vara Prasad, M. N.; Nahar, K., Eds. Academic Press: 2019; pp 223-246.
- [5] Thévenod, F.; Petering, D.; Templeton, D.; Lee, W.-K.; Hartwig, A., *Cadmium Interaction with Animal Cells*. 2018.
- [6] Horiguchi, H., Itai Itai Disease. In *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Wexler P., Ed. Academic Press: 2014; pp 1-2.
- [7] Suwazono, Y.; Kido, T.; Nakagawa, H.; Nishijo, M.; Honda, R.; Kobayashi, E.; Dochi, M.; Nogawa, K., Biological half-life of cadmium in the urine of inhabitants after cessation of cadmium exposure. *Biomarkers* **2009**, 14 (2), 77-81.
- [8] Yang, H.; Shu, Y., Cadmium Transporters in the Kidney and Cadmium-Induced Nephrotoxicity. *International journal of molecular sciences* **2015**, 16, 1484-1494.
- [9] Yang, Z.; Chu, C., Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress. 2011.
- [10] Capdevila, M.; Bofill, R.; Palacios, O.; Atrian, S., State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, 256.
- [11] Engel, D.; Brouwer, M., Metal Regulation and Molting in the Blue Crab, *Callinectes sapidus*: Metallothionein Function in Metal Metabolism. *Biological Bulletin* **1987**, 173, 239.
- [12] Smith, D. R.; Nordberg, M., Chapter 2 - General Chemistry, Sampling, Analytical Methods, and Speciation*. In *Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)*, Nordberg, G. F.; Fowler, B. A.; Nordberg, M., Eds. Academic Press: San Diego, 2015; pp 15-44.
- [13] Krężel, A.; Maret, W., Dual Nanomolar and Picomolar Zn(II) Binding Properties of Metallothionein. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (35), 10911-10921.
- [14] Loebus, J.; Peroza, E. A.; Blüthgen, N.; Fox, T.; Meyer-Klaucke, W.; Zerbe, O.; Freisinger, E., Protein and metal cluster structure of the wheat metallothionein domain γ -Ec-1: the second part of the puzzle. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2011**, 16 (5), 683.
- [15] Palacios, O.; Atrian, S.; Capdevila, M., Zn-and Cu-thioneins: A functional classification for metallothioneins? *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2011**, 16, 991-1009.
- [16] Borsari, M., Cadmium: Inorganic Chemistry. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd. 2014; pp 1-16.
- [17] Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. *Pol. J. Environ. Stud.* **2006**, 15 (3), 375-382.
- [18] Bryld, L. E.; Hindsberger, C.; Kyvik, K. O.; Agner, T.; Menné, T., Genetic Factors in Nickel Allergy Evaluated in a Population-Based Female Twin Sample. *Journal of Investigative Dermatology* **2004**, 123 (6), 1025-1029.
- [19] Son, Y.-O., Molecular mechanisms of nickel-induced carcinogenesis. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* **2019**, 19.
- [20] Humans, I., *A Review of Human Carcinogens. Part C: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts*. 2012; Vol. 100C pp. 211.

- [21] Fabiano, C.; Tezotto, T.; Favarin, J.; Polacco, J.; Mazzafera, P., Essentiality of nickel in plants: A role in plant stresses. *Frontiers in Plant Science* **2015**, *6*.
- [22] Witkowska, D.; Rowinska-Zyrek, M.; Valensin, G.; Kozłowski, H., Specific poly-histidyl and poly-cysteil protein sites involved in Ni²⁺ homeostasis in *Helicobacter pylori*. Impact of Bi³⁺ ions on Ni²⁺ binding to proteins. Structural and thermodynamic aspects. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256*, 133-148.
- [23] Bryngelson, P.; Maroney, M., Nickel Superoxide Dismutase. 2007; pp 417-443.
- [24] Kolodziej, A., The Chemistry of Nickel-Containing Enzymes. 2007; Vol. 41, pp 493-597.
- [25] Kowalik-Jankowska, T.; Kozłowski, H.; Farkas, E.; Sóvágó, I., Nickel Ion Complexes of Amino Acids and Peptides. In *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, Sigel, H.; Sigel, A.; Sigel R.K.O., Eds. Wiley: 2007; Vol. 2, pp 63-107.
- [26] Van Hecke, G. R.; Horrocks, W. D., Diteriary Phosphine Complexes of Nickel. Spectral, Magnetic, and Proton Resonance Studies. A Planar-Tetrahedral Equilibrium. *Inorganic Chemistry* **1966**, *5* (11), 1968-1974.
- [27] Venanzi, L. M., 140. Tetrahedral nickel(II) complexes and the factors determining their formation. Part I. Bistriphenylphosphine nickel(II) compounds. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1958**, (0), 719-724.
- [28] Crichton, R., Chapter 14 - Copper – Coping with Dioxide. In *Biological Inorganic Chemistry (Third Edition)*, Crichton, R., Ed. Academic Press: 2019; pp 405-433.
- [29] Kaim, W.; Schwederski, B.; Klein, A., Copper-containing Proteins: An Alternative to Biological Iron. In *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life (Second Edition)*, Atwood, D.; Crantee, B.; Meyer, G., Ed Wiley: 2013; pp 183-209.
- [30] McDonald, M. R.; Scheper, W. M.; Lee, H. D.; Margerum, D. W., Copper(III) Complexes of Tripeptides with Histidine and Histamine as the Third Residue. *Inorganic Chemistry* **1995**, *34* (1), 229-237.
- [31] McDonald, M. R.; Fredericks, F. C.; Margerum, D. W., Characterization of Copper(III)-Tetrapeptide Complexes with Histidine as the Third Residue. *Inorganic Chemistry* **1997**, *36* (14), 3119-3124.
- [32] Crichton, R., Chapter 12 - Zinc – Lewis Acid and Gene Regulator. In *Biological Inorganic Chemistry (Third Edition)*, Crichton, R., Ed. Academic Press: 2019; pp 339-362.
- [33] Kaim, W.; Schwederski, B.; Klein, A., Zinc: Structural and Gene-regulatory Functions and the Enzymatic Catalysis of Hydrolysis and Condensation Reactions. In *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life (Second Edition)*, Atwood, D.; Crantee, B.; Meyer, G., Ed Wiley: 2013; pp 235-256.
- [34] Krężel, A.; Maret, W., The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2016**, *611*, 3-19.
- [35] Rabenstein, D.; Daignault, S.; Isab, A.; Arnold, A.; Shoukry, M., Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. 21. The complexation of zinc by glycylhistidine and alanylhistidine peptides. *Journal of the American Chemical Society* **1985**, *107*.
- [36] Sigel, H.; Martin, R., Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands. *Chemical Reviews* **1982**, *82*, 385-426.
- [37] Sóvágó, I., Chapter 4 - Coordination equilibria in biologically active systems. In *Biocoordination chemistry*, Burger, K., Ed. 1990; pp 135-184.
- [38] Pettit, L.D.; Gregor, J.E.; Kozłowski, H., Complex formation between metal ions and peptides. In *Perspectives in bioinorganic chemistry*, Hay, R.W.; Dilworth, J.R.; Nolan, K.B., Eds. Jai Press: 1991; Vol 1.
- [39] Kozłowski, H.; Bal, W.; Dyba, M.; Kowalik-Jankowska, T., Specific structure-stability relation in metallopeptides. *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, *184*, 319-346.

- [40] Sóvágó, I.; Osz, K., Metal ion selectivity of oligopeptides. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2006**, 32, 3841-3854.
- [41] Sóvágó, I.; Kállay, C.; Várnagy, K., Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, 256, 2225–2233.
- [42] Farkas, E.; Sóvágó, I., Metal complexes of amino acids and peptides. In *Amino Acids, Peptides and Proteins: Volume 41*, Ryadnov, M.; Hudecz, F., The Royal Society of Chemistry: 2017; Vol. 41, pp 100-151.
- [43] Appleton, D. W.; Kruck, T. P. A.; Sarkar, B., A comparative study of Zn(II) and Co(II) binding to glycy-L-tyrosine, a pseudosubstrate for carboxypeptidase A. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1979**, 10 (1), 1-8.
- [44] Dorigatti, T. F.; Billo, E. J., Solution equilibria of copper(II) and nickel(II) complexes of glycyL peptide amides. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* **1975**, 37 (6), 1515-1520.
- [45] Sóvágó, I.; Kiss, T.; Gergely, A., Proton and copper(II) complexes of the pentapeptide thymopoietin(32–36). *Inorganica Chimica Acta* **1984**, 93 (4), L53-L55.
- [46] Sóvágó, I.; Bertalan, C.; Gobi, L.; Nyéki, O., Copper(II) complexes of low molecular weight derivatives of thymopoietin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1994**, 55 (1), 67-75.
- [47] Kállay, C.; Várnagy, K.; Micera, G.; Sanna, D.; Sóvágó, I., Copper(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005**, 99 (7), 1514-1525.
- [48] Kállay, C.; Várnagy, K.; Micera, G.; Sanna, D.; Sóvágó, I., Nickel(II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005**, 99, 1514-25.
- [49] Bottari, E.; Festa, M.; Jasionowska, R., Complex Formation Between Cadmium(II) and Aspartate and Glutamate. *Journal of Coordination Chemistry* **1989**, 20, 209-217.
- [50] Perkins, D., A study of some simple peptide complexes with zinc and cadmium ions in aqueous solution. *The Biochemical journal* **1954**, 57, 702-704.
- [51] LU Ai-ru, P. L. D., Gregor J. E., The Determination of Stability Constants of Complexes of Zn(II) and Cd(II) with Amino-Acids, Dipeptides and Tripeptides by Micro-pH-Potentiometric Titration. *Chemical Journal of Chinese Universities* **1992**, 13 (3), 322-324.
- [52] Malandrinos, G.; Louloudi, M.; Hadjiliadis, N., Ternary systems of Zn²⁺ and Cd²⁺, 2-(α -hydroxyethyl)thiamin pyrophosphate (HETPP) and the pentapeptide Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.: Implications for the mechanism of thiamin enzymes. *Inorganica Chimica Acta* **2003**, 349, 279-283.
- [53] Wang, S. M.; Gilpin, R. K., Cadmium-113 and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry of cadmium peptide complexes. *Talanta* **1985**, 32 (4), 329-333.
- [54] Sóvágó, I.; Kállay, C.; Várnagy, K., Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, 256, 2225–2233.
- [55] Sóvágó, I.; Osz, K., Metal ion selectivity of oligopeptides. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2006**, 32, 3841-3854.
- [56] Kozłowski, H.; Révérénd; Decock-Le, B.; Fichoux; Damien; Loucheux; Claude; Sovago; Imre, Nickel(II) complexes with sulfhydryl containing peptides. potentiometric and spectroscopic studies. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1987**, 29, 187-197.
- [57] Perrin, D.; Sayce, I., Complex formation by nickel and zinc with penicillamine and cysteine. *Journal of The Chemical Society A: Inorganic, Physical, Theoretical* **1968**, 1.
- [58] Krezel, A.; Bal, W., Coordination chemistry of glutathione. *Acta biochimica Polonica* **1999**, 46 (3), 567-80.
- [59] Seshadri, S.; Benoit, S.; Maier, R., Roles of His-Rich Hpn and Hpn-Like Proteins in Helicobacter pylori Nickel Physiology. *Journal of bacteriology* **2007**, 189, 4120-4126.

- [60] Rowinska-Zyrek, M.; Witkowska, D.; Bielinska, S.; Kamysz, W.; Kozłowski, H., The –Cys–Cys– motif in *Helicobacter pylori*'s Hpn and HspA proteins is an essential anchoring site for metal ions. *Dalton Transactions* **2011**, 40 (20), 5604-5610.
- [61] Rowinska-Zyrek, M.; Witkowska, D.; Valensin, D.; Kamysz, W.; Kozłowski, H., The C terminus of HspA—a potential target for native Ni(II) and Bi(III) anti-ulcer drugs. *Dalton Transactions* **2010**, 39 (25), 5814-5826.
- [62] Kulon, K.; Woźniak, D.; Wegner, K.; Grzonka, Z.; Kozłowski, H., Specific interactions of metal ions with Cys-Xaa-Cys unit inserted into the peptide sequence. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2007**, 101 (11), 1699-1706.
- [63] Krzywoszynska, K.; Rowinska-Zyrek, M.; Witkowska, D.; Potocki, S.; Luczkowski, M.; Kozłowski, H., Polythiol binding to biologically relevant metal ions. *Dalton Transactions* **2011**, 40 (40), 10434-10439.
- [64] Rowinska-Zyrek, M.; Potocki, S.; Witkowska, D.; Valensin, D.; Kozłowski, H., The zinc-binding fragment of HypA from *Helicobacter pylori*: a tempting site also for nickel ions. *Dalton Transactions* **2013**, 42 (17), 6012-6020.
- [65] Kolkowska, P.; Krzywoszynska, K.; Potocki, S.; Chetana, P. R.; Spodzieja, M.; Rodziewicz-Motowidło, S.; Kozłowski, H., Specificity of the Zn²⁺, Cd²⁺ and Ni²⁺ ion binding sites in the loop domain of the HypA protein. *Dalton Transactions* **2015**, 44 (21), 9887-9900.
- [66] Brown, N.; Stoyanov, J.; Kidd, S.; Hobman, J., The MerR family of transcription regulators. *FEMS microbiology reviews* **2003**, 27, 145-63.
- [67] Jancsó, A.; Szunyogh, D.; Larsen, F. H.; Thulstrup, P. W.; Christensen, N. J.; Gyurcsik, B.; Hemmingsen, L., Towards the role of metal ions in the structural variability of proteins: CdII speciation of a metal ion binding loop motif. *Metallomics* **2011**, 3 (12), 1331-1339.
- [68] Szunyogh, D.; Gyurcsik, B.; Larsen, F. H.; Stachura, M.; Thulstrup, P. W.; Hemmingsen, L.; Jancsó, A., ZnII and HgII binding to a designed peptide that accommodates different coordination geometries. *Dalton Transactions* **2015**, 44 (28), 12576-12588.
- [69] Jancsó, A.; Gyurcsik, B.; Mesterházy, E.; Berkecz, R., Competition of zinc(II) with cadmium(II) or mercury(II) in binding to a 12-mer peptide. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2013**, 126, 96-103.
- [70] Bryce, G.; Roeske, R.; Gurd, F., Cupric Ion Complexes of Histidine-Containing Peptides. *The Journal of biological chemistry* **1965**, 240, 3837-3846.
- [71] Bryce, G.; Roeske, R.; Gurd, R., L-histidine-containing peptides as models for the interaction of copper(II) and nickel(II) ions with sperm whale apomyoglobin. *The Journal of biological chemistry* **1966**, 241, 1072-1080.
- [72] Sanna, D.; Ágoston, C.; Sóvágó, I.; Micera, G., Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes formed by oligopeptides containing histidine with a protection at the terminal amino group. *Polyhedron* **2001**, 20, 937-947.
- [73] Orfei, M.; Alcaro, M.; Marcon, G.; Chelli, M.; Ginanneschi, M.; Kozłowski, H.; Brasuń, J.; Messori, L., Modeling of copper(II) sites in proteins based on histidyl and glycyl residues. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2003**, 97, 299-307.
- [74] Di Natale, G.; Damante, C.; Nagy, Z.; Osz, K.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I., Copper(II) binding to two novel histidine-containing model hexapeptides: Evidence for a metal ion driven turn conformation. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, 102, 2012-9.
- [75] Sóvágó, I.; Osz, K., Metal ion selectivity of oligopeptides. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2006**, 32, 3841-3854.
- [76] Casolaro, M.; Chelli, M.; Ginanneschi, M.; Laschi, F.; Messori, L.; Muniz-Miranda, M.; Papini, A. M.; Kowalik-Jankowska, T.; Kozłowski, H., Spectroscopic and potentiometric study of the SOD mimic system copper(II)/acetyl-l-histidylglycyl-l-histidylglycine. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, 89 (3), 181-190.

- [77] Remelli, M.; Łuczowski, M.; Mieczysław Bonna, A.; Mackiewicz, Z.; Conato, C.; Kozłowski, H., Cu(II) ion coordination to SPARC: a model study on short peptide fragments. *New Journal of Chemistry* **2003**, 27 (2), 245-250.
- [78] Kulon, K.; Valensin, D.; Kamysz, W.; Valensin, G.; Nadolski, P.; Porciatti, E.; Gaggelli, E.; Kozłowski, H., The His-His sequence of the antimicrobial peptide demegen P-113 makes it very attractive ligand for Cu²⁺. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, 102, 960-972.
- [79] Matera-Witkiewicz, A.; Brasuń, J.; Świątek-Kozłowska, J.; Pratesi, A.; Ginanneschi, M.; Messori, L., Short-chain oligopeptides with copper(II) binding properties: The impact of specific structural modifications on the copper(II) coordination abilities. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2009**, 103 (5), 678-688.
- [80] Brasuń, J.; Czapor, H.; Matera-Witkiewicz, A.; Kotynia, A.; Sochacka, A.; Ceburat, M., The unusual coordination abilities of the peptides with βXaaHisGlyHis sequence. The influence of structural modification of the peptide chain on the copper(II) binding. *Dalton Transactions* **2010**, 39 (28), 6518-6523.
- [81] Grasso, G.; Magri, A.; Bellia, F.; Pietropaolo, A.; La Mendola, D.; Rizzarelli, E., The copper(II) and zinc(II) coordination mode of HExxH and HxxEH motif in small peptides: The role of carboxylate location and hydrogen bonding network. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, 130, 92-102.
- [82] Damante, C.; Osz, K.; Nagy, Z.; Pappalardo, G.; Grasso, G.; Impellizzeri, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I., The Metal Loading Ability of β-Amyloid N-Terminus: A Combined Potentiometric and Spectroscopic Study of Copper(II) Complexes with β-Amyloid(1-16), Its Short or Mutated Peptide Fragments, and Its Polyethylene Glycol (PEG)-ylated Analogue. *Inorganic Chemistry* **2008**, 47, 9669-9683.
- [83] Józsa, E.; Osz, K.; Kállay, C.; De Bona, P.; Damante, C.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I., Nickel(II) and mixed metal complexes of amyloid-β N-terminus. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2010**, 39, 7046-7053.
- [84] Osz, K.; Nagy, Z.; Pappalardo, G.; Di Natale, G.; Sanna, D.; Micera, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I., 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, 7129-7143.
- [85] Turi, I.; Sanna, D.; Garribba, E.; Pappalardo, G.; Sóvágó, I., The effect of non-coordinating side chains on the metal binding affinities of peptides of histidine. *Polyhedron* **2013**, 62, 7-17.
- [86] Józsa, V.; Nagy, Z.; Osz, K.; Sanna, D.; Di Natale, G.; La Mendola, D.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I., Transition metal complexes of terminally protected peptides containing histidyl residues. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, 100, 1399-409.
- [87] Csilla, K.; Ildikó, T.; Sarolta, T.; Zoltán, N.; Sanna, D.; Pappalardo, G.; De Bona, P.; Enrico, R.; Imre, S., The effect of point mutations on copper(II) complexes with peptide fragments encompassing the 106-114 region of human prion protein. *Monatshfte für Chemie* **2012**, 142, 189-197.
- [88] Soragni, A.; Zambelli, B.; Mukrasch, M. D.; Biernat, J.; Jeganathan, S.; Griesinger, C.; Ciurli, S.; Mandelkow, E.; Zweckstetter, M., Structural Characterization of Binding of Cu(II) to Tau Protein. *Biochemistry* **2008**, 47 (41), 10841-10851.
- [89] Ma, Q.; Li, Y.; Du, J.; Liu, H.; Kanazawa, K.; Nemoto, T.; Nakanishi, H.; Zhao, Y., Copper binding properties of a tau peptide associated with Alzheimer's disease studied by CD, NMR, and MALDI-TOF MS. *Peptides* **2006**, 27 (4), 841-849.
- [90] Barbagallo, M.; Dominguez, L.; Prima, A.; Belvedere, M., Oxidative stress and Alzheimer disease. *European Geriatric Medicine* **2012**, 3, S78.

- [91] Crichton, R.; Ward, R., Metal-Based Neurodegeneration: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Metal-based Neurodegeneration: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Strategies* **2006**, 1-227.
- [92] Thompson, K. J.; Shoham, S.; Connor, J. R., Iron and neurodegenerative disorders. *Brain Research Bulletin* **2001**, 55 (2), 155-164.
- [93] Stelzmann, R.; PhD, H.; Murtagh, F., An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde." *Clinical Anatomy* **1995**, 8, 429-431.
- [94] Chávez-Gutiérrez, L.; Bammens, L.; Benilova, I.; Vandersteen, A.; Benurwar, M.; Borgers, M.; Lismont, S.; Zhou, L.; Van Cleynenbreugel, S.; Esselmann, H.; Wiltfang, J.; Serneels, L.; Karran, E.; Gijssen, H.; Schymkowitz, J.; Rousseau, F.; Broersen, K.; De Strooper, B., The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J* **2012**, 31 (10), 2261-2274.
- [95] Masters, C. L.; Bateman, R.; Blennow, K.; Rowe, C. C.; Sperling, R. A.; Cummings, J. L., Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers* **2015**, 1 (1), 15056.
- [96] Barker, W.; Luis, C.; Kashuba, A.; Luis, M.; Harwood, D.; Loewenstein, D.; Waters, C.; Jimison, P.; Shepherd, E.; Sevush, S.; Graff-Radford, N.; Newland, D.; Todd, M.; Miller, B.; Gold, M.; Heilman, K.; Doty, L.; Goodman, I.; Robinson, B.; Duara, R., Relative Frequencies of Alzheimer Disease, Lewy Body, Vascular and Frontotemporal Dementia, and Hippocampal Sclerosis in the State of Florida Brain Bank. *Alzheimer disease and associated disorders* **2002**, 16, 203-12.
- [97] Comas Herrera, A.; Prince, M.; Knapp, M.; Karagiannidou, M.; Guerchet, M., *World Alzheimer Report 2016: Improving healthcare for people with dementia. Coverage, quality and costs now and in the future*, Alzheimer's Disease International: 2016
- [98] Serrano-Pozo, A.; Frosch, M.; Masliah, E.; Hyman, B., Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2011**, 3, a006189.
- [99] Jack, C.; Petersen, R.; Xu, Y.; O'Brien, P.; Smith, G.; Ivnik, R.; Boeve, B.; Waring, S.; Tangalos, E.; Kokmen, E., Prediction of AD with MRI-Based Hippocampal Volume in Mild Cognitive Impairment. *Neurology* **1999**, 52, 1397-1403.
- [100] Du, X.; Wang, X.; Geng, M., Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translational Neurodegeneration* **2018**, 7.
- [101] Orban, G.; Völgyi, K.; Juhasz, G.; Penke, B.; Kékesi, K.; Kardos, J.; Czurko, A., Different electrophysiological actions of 24- and 72-hour aggregated amyloid-beta oligomers on hippocampal field population spike in both anesthetized and awake rats. *Brain research* **2010**, 1354, 227-35.
- [102] Puzzo, D.; Privitera, L.; Dale, E.; Fa, M.; Staniszewski, A.; Palmeri, A.; Arancio, O., Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2009**, 28, 14537-14545.
- [103] Walsh, D. M.; Selkoe, D. J., A β Oligomers – a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry* **2007**, 101 (5), 1172-1184.
- [104] Kametani, F.; Hasegawa, M., Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* **2018**, 12.
- [105] Guo, T.; Noble, W.; Hanger, D., Roles of tau protein in health and disease. *Acta neuropathologica* **2017**, 133.
- [106] Andreadis, A., Tau gene alternative splicing: Expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* **2005**, 1739, 91-103.
- [107] Avila, J.; Lucas, J.; Pérez, M.; Hernández, F., Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiological reviews* **2004**, 84, 361-84.

- [108] Hirokawa, N.; Shiomura, Y.; Okabe, S., Tau proteins: The molecular structure and mode of binding on microtubules. *The Journal of cell biology* **1988**, *107*, 1449-59.
- [109] Maina, M.; Al-Hilaly, Y.; Serpell, L., Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease. *Biomolecules* **2016**, *6*, 9.
- [110] D'Souza, I.; Schellenberg, G., Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1739*, 104-15.
- [111] Iseki, E.; Yamamoto, R.; Murayama, N.; Minegishi, M.; Togo, T.; Katsuse, O.; Kosaka, K.; Akiyama, H.; Tsuchiya, K.; Silva, R.; Andrew, L.; Arai, H., Immunohistochemical investigation of neurofibrillary tangles and their tau isoforms in brains of limbic neurofibrillary tangle dementia. *Neuroscience letters* **2006**, *405*, 29-33.
- [112] Köpke, E.; Chen, Y. H.; Shaikh, S.; Alonso, A.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I., Microtubule-associated protein tau: Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* **1993**, *268*, 24374-84.
- [113] Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Chen, Y. H., Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 44913-44917.
- [114] Chong, F.; Ng, K.; Koh, R. Y.; Soi Moi, C., Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2018**, *38*.
- [115] Gendron, T. F.; Petrucelli, L., The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **2009**, *4*, 13-13.
- [116] Wang, J.-Z.; Gao, X.; Wang, Z.-H., The physiology and pathology of microtubule-associated protein tau. *Essays in biochemistry* **2014**, *56*, 111-123.
- [117] Wang, J.-Z.; Liu, F., Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Progress in neurobiology* **2008**, *85*, 148-75
- [118] Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E., Tau in Alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology* **1998**, *8* (11), 425-427.
- [119] Wang, J.-Z.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K., Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nature Medicine* **1996**, *2* (8), 871-875.
- [120] Kovacech, B.; Novak, M., Tau Truncation is a Productive Posttranslational Modification of Neurofibrillary Degeneration in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer research* **2010**, *7*, 708-716.
- [121] Ledesma, M.; Bonay Miarons, P.; Colaco, C.; Avila, J., Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269*, 21614-9.
- [122] Gorsky, M.; Burnouf, S.; Sofola, O.; Dols, J.; Augustin, H.; Weigelt, C.; Groenke, S.; Partridge, L., Pseudo-acetylation of multiple sites on human Tau proteins alters Tau phosphorylation and microtubule binding, and ameliorates amyloid beta toxicity. *Scientific Reports* **2017**, *7*.
- [123] Mori, H.; Kondo, J.; Ihara, Y., Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* **1987**, *235* (4796), 1641.
- [124] Hanger, D.; Byers, H.; Wray, S.; Leung, K.-Y.; Saxton, M.; Seereeram, A.; Reynolds, C.; Ward, M.; Anderton, B., Novel Phosphorylation Sites in Tau from Alzheimer Brain Support a Role for Casein Kinase 1 in Disease Pathogenesis. *The Journal of biological chemistry* **2007**, *282*, 23645-23654.
- [125] Schreiber, A.; Peter, M., Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2014**, *1843* (1), 163-181.
- [126] Chesser, A.; Pritchard, S.; Johnson, G., Tau Clearance Mechanisms and Their Possible Role in the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *Frontiers in neurology* **2013**, *4*, 122.

- [127] Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Cairns, N.; Crowther, R. A., Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* **1992**, *8*, 159-168.
- [128] Bush, A., The metallobiology of Alzheimer's Disease. *Trends in neurosciences* **2003**, *26*, 207-214.
- [129] Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Chen, Y. H., Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 44913-44917.
- [130] Prusiner, S. B., Neurodegenerative Diseases and Prions. *New England Journal of Medicine* **2001**, *344* (20), 1516-1526.
- [131] Syme, C. D.; Viles, J. H., Solution 1H NMR investigation of Zn²⁺ and Cd²⁺ binding to amyloid-beta peptide (Abeta) of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1764* (2), 246-256.
- [132] Sarell, C.; Wilkinson, S.; Viles, J., Substoichiometric Levels of Cu²⁺ Ions Accelerate the Kinetics of Fiber Formation and Promote Cell Toxicity of Amyloid- from Alzheimer Disease. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285*, 41533-41540.
- [133] Liu, B.; Moloney, A.; Meehan, S.; Morris, K.; Thomas, S.; Serpell, L.; Hider, R.; Marciniak, S.; Lomas, D.; Crowther, D., Iron Promotes the Toxicity of Amyloid Peptide by Impeding Its Ordered Aggregation. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 4248-4256.
- [134] Leal, S. S.; Botelho, H. M.; Gomes, C. M., Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256* (19), 2253-2270.
- [135] Younan, N. D.; Klewpatinond, M.; Davies, P.; Ruban, A. V.; Brown, D. R.; Viles, J. H., Copper(II)-Induced Secondary Structure Changes and Reduced Folding Stability of the Prion Protein. *Journal of Molecular Biology* **2011**, *410* (3), 369-382.
- [136] Smaili, S.; Hirata, H.; Ureshino, R.; Monteforte, P.; Morales, A.; Muler, M.; Terashima, J.; Oseki, K.; Rosenstock, T.; Lopes, G.; Bincoletto, C., Calcium and cell death signaling in neurodegeneration and aging. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **2009**, *81*, 467-475.
- [137] Egorova, P.; Popugaeva, E.; Bezprozvanny, I., Disturbed calcium signaling in spinocerebellar ataxias and Alzheimer's disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2015**, *40*, 127-133.
- [138] Leal, S.; Gomes, C., Calcium dysregulation links ALS defective proteins and motor neuron selective vulnerability. *Frontiers in cellular neuroscience* **2015**, *9*, 225.
- [139] Barnham, K.; Bush, A., Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases. *Chemical Society reviews* **2014**, *43*.
- [140] Lovell, M. A.; Robertson, J. D.; Teesdale, W. J.; Campbell, J. L.; Markesbery, W. R., Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the Neurological Sciences* **1998**, *158* (1), 47-52.
- [141] Zatta, P.; Drago, D.; Bolognin, S.; Sensi, S. L., Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* **2009**, *30* (7), 346-355.
- [142] Roberts, B.; Ryan, T.; Bush, A.; Masters, C.; Duce, J., The role of metallobiology and amyloid- β peptides in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **2011**, *120* Suppl 1, 149-166
- [143] Basun, H.; Forssell, L. G.; Wetterberg, L.; Winblad, B., Metals and trace elements in plasma and cerebrospinal fluid in normal aging and Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* **1991**, *3* (4), 231-258.
- [144] Baum, L.; Chan, I. H. S.; Cheung, S. K.-K.; Goggins, W. B.; Mok, V.; Lam, L.; Leung, V.; Hui, E.; Ng, C.; Woo, J.; Chiu, H. F. K.; Zee, B. C.-Y.; Cheng, W.; Chan, M.-H.; Szeto, S.; Lui, V.; Tsoh, J.; Bush, A. I.; Lam, C. W. K.; Kwok, T., Serum zinc is decreased in

- Alzheimer's disease and serum arsenic correlates positively with cognitive ability. *BioMetals* **2009**, *23* (1), 173.
- [145] Bishop, G. M.; Robinson, S. R.; Liu, Q.; Perry, G.; Atwood, C. S.; Smith, M. A., Iron: A Pathological Mediator of Alzheimer Disease? *Developmental Neuroscience* **2002**, *24* (2-3), 184-187.
- [146] Sun, X.-Y.; Wei, Y.-P.; Xiong, Y.; Wang, X.-C.; Xie, A.-J.; Wang, X.-L.; Yang, Y.; Wang, Q.; Lu, Y.-M.; Liu, R.; Wang, J.-Z., Synaptic Released Zinc Promotes Tau Hyperphosphorylation by Inhibition of Protein Phosphatase 2A (PP2A). *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287*, 11174-11182.
- [147] Mo, Z.-Y.; Zhu, Y.-Z.; Haili, Z.; Fan, J.-B.; Chen, J.; Liang, Y., Low Micromolar Zinc Accelerates the Fibrillization of Human Tau via Bridging of Cys-291 and Cys-322. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284*, 34648-34657.
- [148] Yamamoto, A.; Shin, R.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Sato, H.; Yoshimasu, F.; Kitamoto, T., Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated tau and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* **2002**, *82*, 1137-1147.
- [149] Smith, M.; Harris, P.; Sayre, L.; Perry, G., Iron accumulation in Alzheimer disease is source of redox-generated free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**, *94*, 9866-9868.
- [140] Ma, Q.; li, Y.; Du, J.; Liu, H.; Kanazawa, K.; Nemoto, T.; Nakanishi, H.; Zhao, Y., Copper binding properties of a tau peptide associated with Alzheimer's disease studied by CD, NMR, and MALDI-TOF MS. *Peptides* **2006**, *27*, 841-849.
- [151] Zhou, L.-X.; Du, J.-T.; Zeng, Z.-Y.; Wu, W.-H.; Zhao, Y.-F.; Kanazawa, K.; Ishizuka, Y.; Nemoto, T.; Nakanishi, H.; Li, Y.-M., Copper (II) modulates in vitro aggregation of tau peptide. *Peptides* **2007**, *28*, 2229-2234.
- [152] Kitazawa, M.; Cheng, D.; Laferla, F., Chronic copper exposure exacerbates both amyloid and tau pathology and selectively deregulates CDK5 in a mouse model of AD. *Journal of Neurochemistry* **2009**, *108*, 1550-1560.
- [153] Crouch, P.; Hung, L.; Adlard, P.; Cortes, M.; Lal, V.; Filiz, G.; Pérez, K.; Nurjono, M.; Caragounis, A.; Du, T.; Laughton, K.; Volitakis, I.; Bush, A.; Li, Q.-X.; Masters, C.; Cappai, R.; Cherny, R.; Donnelly, P.; White, A.; Barnham, K., Increasing Cu bioavailability inhibits A oligomers and tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 381-386.
- [154] Gorantla, N. V.; Das, R.; Balaraman, E.; Chinnathambi, S., Transition metal nickel prevents Tau aggregation in Alzheimer's disease. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**.
- [155] Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85* (14), 2149-2154.
- [156] Pedersen, S. L.; Jensen, K. J., Instruments for automated peptide synthesis. *Methods Mol Biol* **2013**, 544-615.
- [157] Atherton, E.; Clive, D. L. J.; Sheppard, R. C., Polyamide supports for polypeptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1975**, *97* (22), 6584-6585.
- [158] Carpino, L. A.; Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37* (22), 3404-3409.
- [159] Rink, H., Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28* (33), 3787-3790.
- [160] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A., SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1985**, (6), 1195-1200.
- [161] Zekany, L.; Nagypal, I., PSEQUAD. In *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, Leggett, D. J., Ed. Springer US: 1985; pp 291-353.
- [162] Eriksson, G., An algorithm for the computation of aqueous multi-component, multiphase equilibria. *Analytica Chimica Acta* **1979**, *112* (4), 375-383.

- [163] Irving, H. M.; Miles, M. G.; Pettit, L. D., 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*, 475-488.
- [164] Odani, A.; Masuda, H.; Inukai, K.; Yamauchi, O., Pteridine-containing ternary and quaternary complexes as models for metalloenzyme-pterin cofactor-substrate association. Structure of ternary copper(II)-2,2'-bipyridine-lumazine complex and successful equilibrium study of a quaternary copper(II) system. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114* (16), 6294-6300.
- [165] Milic, N.B.; Bugarcic, Z.D; Vasic, M.V., Hydrolysis of the nickel(II) ion in potassium chloride medium. *Mulletin de la Societe Chimique Beograd* **1980**, *45* (9), 349-357.
- [166] Pérez-Cadenas, A.; López-Garzón, R.; Godino-Salido, L.; Arranz-Mascarós, P.; Gutiérrez-Valero, D.; Carillo-Márquez, T., The reactivity of N-2-(4-amino-1,6-dihydro-1-methyl-5-nitroso-6-oxo-pyrimidyl)-L-histidine towards silver(I) and zinc(II) ions. *Transition Metal Chemistry* **2002**, *27*, 184-190.
- [167] Trisak, S. T.; Rode, B. M., The complex formation of cadmium(II) with guanosine. *Inorganica Chimica Acta* **1989**, *160* (2), 249-252.
- [168] Sigel, H.; Martin, R. B., Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chemical Reviews* **1982**, *82* (4), 385-426.
- [169] Pettit, L.D.; Gregor, J.E.; Kozłowski H., Complex formation between metal ions and peptides. In *Perspectives in bioinorganic chemistry*, Hay, R.W.; Dilworth, J.R.; Nolan, K.B., Eds. Jai Press Ltd.: 1991
- [170] Császár, J.; Bán, M., *Optikai szinkép, ligandumtér-elmélet, komplex szerkezetek*, Akadémiai Kiadó: 1972.
- [171] Vasak, M.; Kaegi, J. H. R.; Hill, H. A. O., Zinc(II), cadmium(II), and mercury(II) thiolate transitions in metallothionein. *Biochemistry* **1981**, *20* (10), 2852-2856.
- [172] Matzapetakis, M.; Farrer, B. T.; Weng, T.-C.; Hemmingsen, L.; Penner-Hahn, J. E.; Pecoraro, V. L., Comparison of the Binding of Cadmium(II), Mercury(II), and Arsenic(III) to the de Novo Designed Peptides TRI L12C and TRI L16C. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (27), 8042-8054.
- [173] Viles, J. H.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Goodin, D. B.; Wright, P. E.; Dyson, H. J., Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96* (5), 2042-2047.
- [174] Martin, R. B.; Tsangaris, J. M.; Chang, J. W., Double octant rule for planar transition metal ion complexes. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90* (3), 821-823.
- [175] Tsangaris, J. M.; Martin, R. B., Visible circular dichroism of copper(II) complexes of amino acids and peptides. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92* (14), 4255-4260.
- [176] Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R., *Circular Dichroism: Principles and Applications (Second Edition)*, Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W., Eds Wiley: 2000
- [177] Mylonas, M.; Krężel, A.; Plakatouras, J.; Hadjiliadis, N.; Bal, W., Interactions of Transition Metal Ions with His-Containing Peptide Models of Histone H2A. *Journal of Molecular Liquids* **2005**, *118*, 119-129.
- [178] Kállay, C.; Várnagy, K.; Malandrinos, G.; Hadjiliadis, N.; Sanna, D.; Sóvágó, I., Copper(ii) complexes of terminally protected pentapeptides containing three histidyl residues in alternating positions, Ac-His-Xaa-His-Yaa-His-NH₂. *Dalton Transactions* **2006**, (38), 4545-4552.
- [179] Conato, C.; Kozłowski, H.; Swiatek-Kozłowska, J.; Młynarz, P.; Remelli, M.; Silvestri, S., Formation equilibria of nickel complexes with glycyl-histidyl-lysine and two synthetic analogues. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, *98* (1), 153-160

- [180] Lihi, N.; Lukács, M.; Raics, M.; Szunyog, G.; Várnagy, K.; Kállay, C., The effect of carboxylate groups on the complexation of metal ion with oligopeptides – Potentiometric investigation. *Inorganica Chimica Acta* **2018**, *472*, 165-173.
- [181] Nagypál, I.; Gergely, A., Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 2. Equilibrium study of the mixed complexes of copper(II) with aliphatic dipeptides and amino-acids. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1977**, (11), 1109-1111.
- [182] Szunyog Györgyi Doktori értekezés, Debrecen **2019**
- [183] Lihi, N.; Lukács, M.; Szűcs, D.; Várnagy, K.; Sóvágó, I., Nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of peptides containing separate aspartyl and cysteinyl residues. *Polyhedron* **2017**, *133*, 364-373.
- [184] Raics, M.; Lihi, N.; Laskai, A.; Kállay, C.; Várnagy, K.; Sóvágó, I., Nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of hexapeptides containing separate histidyl and cysteinyl binding sites. *New Journal of Chemistry* **2016**, *40* (6), 5420-5427.
- [185] Sigel, A.; Sigel, H.; Sigel, R., *Cadmium: From Toxicity to Essentiality*. 2013
- [186] Rajković, S.; Kállay, C.; Serényi, R.; Malandrinos, G.; Hadjiliadis, N.; Sanna, D.; Sóvágó, I., Complex formation processes of terminally protected peptides containing two or three histidyl residues. Characterization of the mixed metal complexes of peptides. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* **2008**, 5059-5071.
- [187] Csire, G.; Nagy, L.; Várnagy, K.; Kállay, C., Copper(II) interaction with the Human Prion 103–112 fragment – Coordination and oxidation. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2017**, *170*, 195-201.
- [188] Damante, C. A.; Ösz, K.; Nagy, Z.; Pappalardo, G.; Grasso, G.; Impellizzeri, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I., The Metal Loading Ability of β -Amyloid N-Terminus: A Combined Potentiometric and Spectroscopic Study of Copper(II) Complexes with β -Amyloid(1–16), Its Short or Mutated Peptide Fragments, and Its Polyethylene Glycol (PEG)-ylated Analogue. *Inorganic Chemistry* **2008**, *47* (20), 9669-9683.
- [189] Grenács, Á.; Sanna, D.; Sóvágó, I., Copper(II) and nickel(II) binding sites of peptide containing adjacent histidyl residues. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2015**, *151*, 87-93.
- [190] Turi, I.; Sanna, D.; Garribba, E.; Pappalardo, G.; Sóvágó, I., The effect of non-coordinating side chains on the metal binding affinities of peptides of histidine. *Polyhedron* **2013**, *62*, 7-17.
- [191] Di Natale, G.; Bellia, F.; Sciacca, M. F. M.; Campagna, T.; Pappalardo, G., Tau-peptide fragments and their copper(II) complexes: Effects on Amyloid- β aggregation. *Inorganica Chimica Acta* **2018**, *472*, 82-92.
- [192] Józai, V.; Nagy, Z.; Ösz, K.; Sanna, D.; Di Natale, G.; La Mendola, D.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I., Transition metal complexes of terminally protected peptides containing histidyl residues. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, *100* (8), 1399-1409.
- [193] Di Natale, G.; Grasso, G.; Impellizzeri, G.; La Mendola, D.; Micera, G.; Mihala, N.; Nagy, Z.; Ösz, K.; Pappalardo, G.; Rigó, V.; Rizzarelli, E.; Sanna, D.; Sóvágó, I., Copper(II) Interaction with Unstructured Prion Domain Outside the Octarepeat Region: Speciation, Stability, and Binding Details of Copper(II) Complexes with PrP106–126 Peptides. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44* (20), 7214-7225.
- [194] Kállay, C.; Nagy, Z.; Várnagy, K.; Malandrinos, G.; Hadjiliadis, N.; Sóvágó, I., Thermodynamic and Structural Characterization of the Copper(II) Complexes of Peptides Containing Both Histidyl and Aspartyl Residues. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2007**, *2007*, 1-9.
- [195] La Mendola, D.; Farkas, D.; Bellia, F.; Magri, A.; Travaglia, A.; Hansson, Ö.; Rizzarelli, E., Probing the Copper(II) Binding Features of Angiogenin. Similarities and Differences between a N-Terminus Peptide Fragment and the Recombinant Human Protein. *Inorganic Chemistry* **2012**, *51* (1), 128-141.

- [196] Lavanant, H.; Virelizier, H.; Hoppilliard, Y., Reduction of copper(II) complexes by electron capture in an electrospray ionization source. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9* (11), 1217-1221.
- [197] Gianelli, L.; Amendola, V.; Fabbrizzi, L.; Pallavicini, P.; Mellerio, G. G., Investigation of reduction of Cu(II) complexes in positive-ion mode electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2001**, *15* (23), 2347-2353.
- [198] Hu, P.; Loo, J. A., Gas-Phase Coordination Properties of Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, and Co²⁺ with Histidine-Containing Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (45), 11314-11319.