

DE TTK



1949

**AMILINHORMON FRAGMENTEK ÉS MUTÁNSOK
FÉMIONKOMPLEXEINEK OLDATEGYENSÚLYI
VIZSGÁLATA**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Dávid Ágnes

Témavezető:
Dr. Várnagy Katalin
egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2017

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

Debrecen, 2017. június 22.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Dávid Ágnes** doktorjelölt **2012 - 2016** között a fent megnevezett Doktori Iskola **K/2** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.*

Debrecen, 2017. június 22.

a témavezető aláírása

**AMILINHORMON FRAGMENTEK ÉS MUTÁNSOK
FÉMIONKOMPLEXEINEK OLDATEGYENSÚLYI VIZSGÁLATA**

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

Írta: **Dávid Ágnes** okleveles vegyész

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

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

A doktori szigorlat időpontja:

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja:

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm *Dr. Fábián István* tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra doktori munkám elkészítését a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken.

Hálával tartozom témavezetőmnek, *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi tanárnak sokoldalú segítségéért, mindenre kiterjedő odafigyeléséért. Köszönet illeti azért is, mert mellette és általa az egyetemi oktatásról, kutatásról nagyon sokat megtanulhattam. Külön köszönöm *Dr. Kállay Csillának*, első témavezetőmnek is, hogy lehetőséget adott arra, hogy ebben a kutatócsoportban dolgozhassak, valamint hogy megtanított nagyon figyelmesen, igényesen végezni munkámat és mindig jó irányt mutatott.

Köszönet illeti *Dr. Farkas Etelka* professor emeritát, *Dr. Sóvágó Imre* professor emeritust és *Dr. Buglyó Péter* egyetemi docent, akik szívesen segítettek, ha kérdések merültek fel bennem.

Hálásan köszönöm az elmúlt évek jó hangulatú közös munkáit, a sok meghallgatást, építő szándékú kritikát, vidám percek (Lukács Mártonnak különösképp) és a kávék bögrék fölötti konzultációkat doktorandusz társaimnak, *Csire Gizellának*, *Dr. Grenács Ágnesnek*, *Bihari Zsoltnak* és *Lihi Norbertnek*, akik nem csak munkatársaim, hanem barátaim is lettek az évek során.

Köszönettel tartozom a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* és a PhD szoba minden régi (*Dr. Baginé Dr. Timári Saroltának*, *Dr. Földi-Bíró Lindának*, *Lekkáné Dr. Szabó Orsolyának*, valamint *Fáriné Dr. Turi Ildikónak*) és új tagjainak, hogy baráti légkört teremtettek és teremtenek a közös munkához az elmúlt 9 évben.

Köszönöm *Fekete Orsolya* és *Hüse Ilona* vegyészmérnököknek, valamint *Godó Attila* műszaki ügyintézőnek a gyakorlati tanácsait és segítségüket. Szeretném megköszönni *Nagyné Dombi Gizella* tanszéki irodavezetőnek a hivatalos ügyek intézésében nyújtott segítségét.

Köszönöm *Dr. Kurtán Tibornak* a cirkuláris dikroizmus mérésekben nyújtott segítségét, *Dr. Nagy Lajos* egyetemi adjunktusnak, valamint *Nagy Tibor* doktorandusz társamnak a tömegspektrumok felvételét. Köszöneti illeti *Dr. Giuseppe Pappalardot*, *Dr. Eugenio Garribbát*, *Dr. Daniele Sannát*, hogy lehetővé tették az olaszországi együttműködéseinket és méréseinket.

Külön köszönöm minden *tanáromnak*, *mentoraimnak*, *egyetemi oktatóm*nak mindazt a tudást, mely nélkül nem jutottam volna idáig.

Hálával gondolok egyetemi barátaimra és évfolyamtársaimra; külön kiemelve *Dóka Évát* (a tökéletes papírcsónakokért), *Koczka Pétert* és *Gyöngyösi Tamást* (az elmúlt 14 év barátságáért) és mostanra magyartanár évfolyamtársaimat (*Annát*, *Dávidot*, *Lillát*, *Árpit*, *Lucát*, *Kittit* és *Asyt*), hogy mindig bátorítottak, példát mutattak és segítettek, bármilyen kevés időm is marad(t) olykor rájuk.

Végül, de egyáltalán nem utolsósorban köszönöm családomnak, külön kiemelve *szüleimet*, *testvéreimet*, valamint köszönöm páromnak és családjának kitartó és állandó támogatásukat, szeretetüket és hogy mellettem álltak az elmúlt évek során.

A kutatások anyagi támogatásáért az OTKA K 72956, K 115480 számú pályázatoknak és a TAMOP 4.2.4.B/2-11/1-2012-0001 Campus Hungary ösztöndíj pályázatnak tartozunk köszönettel. A kutatás az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg. A kutatáshoz a TAMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 (ENVIKUT) projekt is hozzájárult.

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK	6
2.1. A vizsgált fémionok biológiai jelentősége	6
2.2. Az amilin hormon és az amiloid lerakódások	9
2.2.1. Különböző fajok amiloid lerakódásainak vizsgálata	9
2.2.2. A fémionok szerepe	12
2.2.3. A humán amilin fémionmegkötő képességének vizsgálatai	14
2.2.4. A rIAPP (17-29) vizsgálata Cu(II)-ionnal	17
2.3. Aminosavak és peptidek koordinációs kémiája	19
2.4. A oldalláncok hatása	22
2.4.1. Nem koordinálódó oldalláncok	22
2.4.2. Gyengén koordinálódó oldalláncok	23
2.4.2.1. Az arginin és az arginintartalmú peptidek	23
2.4.2.2. A szerin és a szerintartalmú peptidek	25
2.4.2.3. Az aszparagin és az aszparagintartalmú peptidek	27
2.4.3. A hisztidintartalmú peptidek	28
3. CÉLKITŰZÉSEK	30
4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK	31
4.1. A használt vegyszerek	31
4.2. Vizsgálati módszerek	35
4.2.1. Szilárdfázisú peptidszintézis	35
4.2.2. A pH-potenciometria	37
4.2.3. UV-látható spektrofotometria	39
4.2.4. A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	41
4.2.5. A spektrumok kiértékeléséhez használt programok	43
4.2.6. ESR spektroszkópia	43
4.2.7. A védett peptidek koncentrációjának meghatározása	44
5. A KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	46
5. 1. <i>A patkány amilin Cu(II)-ionkötőhelyének modellezése</i>	46
5. 1. 1. A patkány amilin védett fragmenseinek vizsgálata	46
5.1.1.1. Patkány amilin 17-29: Új eredmények	46
5.1.1.2. Az Ac-VRSSNN vizsgálata	49
5.1.1.3. Az Ac-VRAA és az Ac-VASS vizsgálata	51
5.1.1.4. Az Ac-VRSS vizsgálata	53
5.1.1.5. Az Ac-SSNN vizsgálata	55

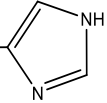
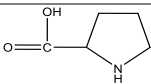
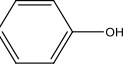
5.1.2. Szabad N-terminusú mutánsok vizsgálata <i>Cu(II)</i> -ionnal	61
5.1.2.1. Tetrapeptidek vizsgálata.....	61
5.1.2.2. Az NH_2 -VRSSNN és mutánsainak vizsgálata.....	68
5.1.2.3. A NH_2 -GGHSSNN vizsgálata.....	74
5.1.3. Szabad N-terminusú mutánsok vizsgálata <i>Ni(II)</i> - és <i>Zn(II)</i> -ionnal	78
5.1.3.1. Patkány amilin mutánsok vizsgálata <i>Ni(II)</i> -ionnal.....	78
5.1.3.2. Az NH_2 -GGHSSNN vizsgálata <i>Ni(II)</i> -ionnal	83
5.1.3.3. Az NH_2 -SSNA vizsgálata <i>Zn(II)</i> -ionnal	84
5.1.3.4. Az NH_2 -GGHSSNN vizsgálata <i>Zn(II)</i> -ionnal.....	84
5. 2. <i>A humán amilin Cu(II)-ion kötőhelyének modellezése</i>	86
5.2.1. Az Ac-AAAHSSNN ligandum vizsgálata	86
6. ÖSSZEFOGLALÁS	93
7. SUMMARY	96
8. IRODALOMJEGYZÉK	101
9. FÜGGELÉK	114

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

<i>A, Ala</i>	alanin
<i>D, Asp</i>	aszparaginsav
<i>E, Glu</i>	glutaminsav
<i>F, Phe</i>	fenilalanin
<i>G, Gly</i>	glicin
<i>H, His</i>	hisztidin
<i>K, Lys</i>	lizin
<i>M, Met</i>	metionin
<i>N, Asn</i>	aszparagin
<i>P, Pro</i>	prolin
<i>Q, Gln</i>	glutamin
<i>R, Arg</i>	arginin
<i>S, Ser</i>	szerin
<i>T, Thr</i>	treonin
<i>V, Val</i>	valin
<i>W, Trp</i>	triptofán
<i>Y, Tyr</i>	tirozin
NH_2–RS–OH	Szabad N- és C-terminussal rendelkező peptid.
NH_2–RS(–NH_2)	Szabad N- és védett C-terminussal rendelkező peptid.
Ac–RS(–NH_2)	Védett N- és C-terminussal rendelkező peptid.
<i>Ac</i>	acetil (védőcsoport)
<i>ACN</i>	acetonitril, CH_3CN
<i>AcOH</i>	ecetsav
<i>Ac₂O</i>	ecetsavanhidrid
<i>Asn22</i>	az aminosavszekvenciában a 22-es pozícióban lévő aszparagin
<i>ATCUN</i>	Amino Terminal Cu and Ni binding site (aminoterminális Cu(II)- és Ni(II)-kötőhely)
<i>CD</i>	cirkuláris dikroizmus
<i>CT sáv</i>	töltésátviteli sáv (Charge Transfer)
<i>Boc</i>	<i>t</i> -butoxi-karbonil (védőcsoport)
<i>Bzl</i>	benzil (védőcsoport)
<i>Ch-PrP</i>	csirke prion protein
<i>DCM</i>	diklórmétán
<i>DIEA</i>	<i>N,N</i> -diizopropil-etilamin
<i>DMF</i>	<i>N,N</i> -dimetil-formamid

<i>EDT</i>	etán-1,2-ditiol
<i>DODT</i>	2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol
<i>EPR (ESR)</i>	elektron paramágneses rezonancia (elektronspin-rezonancia spektroszkópia)
<i>Et₂O</i>	dietil-éter
<i>fiziológiás pH</i>	Habár az élő szervezetben a pH ~2-es és a pH ~9-es testnedv/szöveti rendszer is fellelhető, a kevésbé pontos, de megszokott pH 6,8-7,4 tartományt értem alatta.
<i>Fmoc</i>	9-fluorenil-metoxi-karbonil (védőcsoport)
<i>HOBt</i>	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol
<i>HPLC</i>	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
<i>hIAPP</i>	emberi (humán) amilin
<i>hPrP</i>	humán (emberi) prion protein
<i>Me</i>	metilcsoport
<i>Met109Ser</i>	a 109. pozícióban metionin helyett szerin található
<i>N⁻</i>	deprotonált amidnitrogén
<i>N_{im}</i>	imidazolnitrogén
<i>NMP</i>	<i>N</i> -metil-2-pirrolidon
<i>NMR</i>	magmágneses rezonancia
<i>O_{karbonil}</i>	karboniloxigén
<i>O_{karboxilát}</i>	karboxiláttoxigén
<i>pQ</i>	piroglutamin
<i>rIAPP</i>	patkány amilin
<i>RP-HPLC</i>	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
<i>SOD</i>	szuperoxid-dizmutáz (enzim)
<i>TBTU</i>	2-(1- <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-
<i>tBu</i>	<i>terc</i> -butil (védőcsoport)
<i>TFA</i>	trifluorecetsav
<i>TIS</i>	triizopropil-szilán
<i>Trt</i>	tritol (védőcsoport)
<i>UV-vis</i>	ultraibolya – látható
<i>Z</i>	benziloxi-karbonil (védőcsoport)

1. táblázat: A humán és a patkány amilinben előforduló aminosavak rövidítései, és oldalláncaik szerkezete

<i>Név és jelölés</i>	<i>Szerkezet</i>
Alanin (Ala, A)	---CH_3
Cisztein (Cys, C)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{SH}}{\text{C}}}\text{---}$
Fenilalanin (Phe, F)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}$ 
Glicin (Gly, G)	---H
Hisztidin (His, H)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}$ 
Izoleucin (Ile, I)	$\text{---}\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}\text{---}$
Lizin (Lys, K)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---NH}_2$
Leucin (Leu, L)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}}{\text{---}}}\text{---CH}_3$
Aszparagin (Asn, N)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}\text{---}$
Prolin (Pro, P)	
Glutamin (Gln, Q)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}\text{---}$
Arginin (Arg, R)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---NH---}\overset{\text{NH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}\text{---}$
Szerin (Ser, S)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---OH}$
Treonin (Thr, T)	$\text{---}\overset{\text{OH}}{\underset{\text{CH}}{\text{---}}}\text{---}\overset{\text{CH}_3}{\text{---}}$
Valin (Val, V)	$\text{---}\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}}{\text{---}}}\text{---CH}_3$
Tirozin (Tyr, Y)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{\text{C}}{\text{---}}}\text{---}$ 

1. BEVEZETÉS

A Debreceni Egyetem Bioszervetlen és Koordinációs Kémiai Kutatócsoportjában évtizedek óta folynak olyan kutatások, melyek a különböző hormonrendszeri és idegrendszeri elváltozásokban, megbetegedésekben szerepet játszó peptidfehérjék és az élettani szempontból fontos fémionok között kialakuló komplex kölcsönhatások megértését célozzák. Az Alzheimer-kór és a prionbetegség mellett ilyen a cukorbetegség is.

Egy 1998-as közlemény adatai szerint az ezredfordulón 151 millió cukorbeteg élt a világon, és akkori becslésük szerint számuk 2025-re várhatóan 300 millióra növekszik.¹ A WHO² 2014-re vonatkozó adatai szerint a korábbi becsléshez képest nagyobb mértékben növekedett a cukorbetegek száma, abban az évben ugyanis már 422 millió cukorbeteget tartottak számon.

Ugyanezen forrásnál az is olvasható, hogy 2012-ben 1,5 millió haláleset oka volt a diabétesz. A cukorbetegségben szenvedők rendszerint túlsúlyosak vagy elhízottak, és 60 százalékuknál egyidejűleg a magasvérnyomás-betegség is diagnosztizálható.³

Az orvosi gyakorlat statisztikai adatai szerint a cukorbetegség, illetve a szív- és érrendszeri betegségek együttes előfordulása szoros (oksági) kapcsolatról árulkodik. Emellett meglévő cukorbetegség esetén a szív- és érrendszeri katasztrófák is gyakoribbak, azonfelül pedig súlyosabb kimenetelűek is.

Ebből fakadóan a cukorbetegség egyenes következménye lehet szívinfarktus, sztrók, vakság, veseelégtelenség kialakulása és a végtagamputáció is.

Magyarországon 2011-ben 224 ezer nőt és 344 ezer férfit regisztráltak cukorbetegként, azonban számuk azóta is nő, sőt várhatóan megduplázódik 2025-re.⁴

A cukorbetegségnek három megnyilvánulási formája ismert. A 2-es típusú diabétesz abban különbözik az 1-es típusútól, hogy az utóbbinál egyáltalán nem termelnek a bétasejtek inzulint, míg a 2-es típusú cukorbetegség esetében az inzulinérzékelő receptorok működése elégtelen (ún. inzulinrezisztencia áll fenn). Az inzulinrezisztens állapot egy ideig nem okoz tünetet, sőt a vércukorszint is normális marad, mivel a szervezet a szokásosnál nagyobb mennyiségű inzulint termel, hogy ellensúlyozza az inzulinhiányt.

A 2-es típusú diabétesz akkor okoz komoly tüneteket, amikor következményeként idővel az inzulintermelő bétasejtek az állandó túlműködés okán kimerülnek, majd el is halnak.

A 2-es típusú cukorbetegséget (másként: nem inzulinfüggő cukorbetegség) korábban „felnőttkori” cukorbetegséggént emlegették, azonban napjainkban egyre fiatalabb korra tolódik a megjelenése. A 3-as típusúnak elnevezett fajtáját terhességi diabétesznek nevezik, és bár a terhességet követően megszűnik a kórállapot, megjelenése sajnos hajlmosít a 2-es típusú cukorbetegség kialakulására.

Igaz, hogy a cukorbetegséget régóta tanulmányozzák, kialakulásának okait azonban még nem sikerült minden kétséget kizáróan feltérképezni és megmagyarázni.

Gyakran hozzák kapcsolatba a neurodegeneratív megbetegedésekkel, hiszen közös szövettani „nyomuk” bizonyos viasszerű, áttetsző lerakódások megjelenése, az ún. amiloidózis jelensége.*

Az amiloidózis összefoglaló név. A funkcionális fehérje α -hélix szerkezetét az egyes aminosavak között létesülő, nagyszámú kedvező kölcsönhatás alakítja ki. Lehetnek azonban olyan hatások, melyek részlegesen megbonthatják, vagy akár teljesen megváltoztatják az eredeti szerkezetet.

Többféle szerkezetmódosító hatás ismeretes. Az egyik ok gyakorta valamilyen külső behatás (oxidatív stressz, fémionok helyi feldúsulása, a fémionok koordinációja miatt bekövetkező konformációváltozás), de az alfa-hélix átrendeződése lehet mutáció következménye. Az élet folyamán spontán is történhet szerkezetváltozás, ám mivel a szervezetben működnek ún. javító mechanizmusok, az nem okoz maradandó változást. A kor előre haladtával azonban csökken a javító enzimek hatékonysága, és emiatt jellemzőbbek az amiloidotikus megbetegedések az idősebbeknél.

A fehérje leginkább a részlegesen megváltozott, átmeneti szerkezetében képes – hidrogénhidakon keresztül – a szomszédos fehérjékhez kapcsolódni. Ilyenkor gócképződést követően egy polimerizációs mechanizmus indul meg.⁵ Az előbbi hatások eredményeképp a fehérje egy másik stabil szerkezetet vesz fel, és β -szerkezetű polipeptid láncokat tartalmazó szálak, ún. fibrillumok (a továbbiakban: *kötegek*) alakulnak ki, melyek a megfelelő szöveti rendszerben aggregátumként jelennek meg.⁶

Ez a szerkezet stabil a láncban található aminosavak minőségétől függetlenül is, ezért kialakulása gyakorlatilag minden fehérje esetében bekövetkezhet. A megváltozott konformációjú fehérje amellet, hogy nem képes betölteni funkcióját, toxikus hatással is bír – hasonlóan a prion fehérjéhez.^{7,8}

A fehérje térszerkezetében bekövetkező változások következményeként a különböző szervekben, szövetekben, illetve a sejten kívüli térben megjelenő



1. ábra: Plakkok az idegsejtek között

* Érdeemes tisztázni az *amiloidózis kifejezés* eredetét is. A görög eredetű „amylum” szó elsődleges jelentése ’poliszacharid-típusú növényi tartalék tápanyag’, másodlagos jelentésében inkább tulajdonságra utal: ’áttetsző, viasszerű megkeményedett anyag’. Utóbbi jelentése adott okot arra, hogy a különböző szövetekben található géles/szivacsos lerakódásokat az „amylum” és „oid” képző (’valamihez hasonló’) összevonásával amiloidnak nevezzék el.

oldhatalan amiloid kötegek rakódnak le,⁹ amelyek a megfelelő szervrendszer (pl. az agy, a hasnyálmirigy, a máj, a vese, stb.) működését károsítják¹⁰ (1. ábra).¹¹

Az így kialakult fehérjeaggregátumot nevezi a szakirodalom amiloid lerakódásnak, fehérje plakknak, amiloid plakknak, amiloid aggregátumnak is. Az értekezés további szakaszaiban én egységesen az „amiloid lerakódás” kifejezést fogom használni.

Belgyógyászati szempontból az amiloid lerakódások képződése igen általános jelenség.⁹ Klinikailag az ún. *szisztémás* és a *helyi* formákat különítik el. Az utóbbi amiloidózis leginkább az öregedés folyamatával, valamint a cukorbetegséggel van kapcsolatban. Kórtani hátterük az egyéni-egyedi eltérések ellenére meglepő hasonlatosságot mutat (pl. a prekursor fehérje megnövekedett koncentrációja, a sajátos genetikai háttér, a kötegek megváltozott proteolízise és a sejten kívüli mátrix eltérései).

A *helyi* amiloidózis⁹ formák típusai:

- *Polipeptid hormon eredetű amiloidózis* esetén az adott hormontermelő szövetekben és daganatokban mutatható ki amiloidlerakódás. Az amilin (itt: szigetsejt-amiloid polipeptid, IAPP) a 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő betegek zömében az inzulinomában is lerakódik.**

- *Szív- és érrendszeri amiloidózis* fennállásakor (fehérje eredetű, ezúttal nem zsírból származó!) lerakódások akadályozhatják a szívbillentyűk és a szívizomszövet munkáját, amely szívelégtelenségre hajlamosít. A szívelégtelenség és szívritmuszavar mindezekén túl gyakran az infarktuszok kiváltója.

- *Alzheimer-kórral társuló amiloidózis*: Az Alzheimer-kórban és a Down-szindróma esetében nagy mennyiségű β -amiloid fehérje (A β) mutatható ki az agyszövetben.

- *Prionbetegségek*: A prionok a fertőző fehérjék egy szokatlan csoportját alkotják. Az embereket megfertőző prionok többféle megbetegedést is okozhatnak: pl. kuru (a nevetőhalál), a Creutzfeldt–Jakob-betegség, a Gertsman–Straussler–Scheinker-szindróma és a végzetes családi halmozódású álmatlanság (*fatalis familiaris insomnia*).***

Elsőként (1901-ben) Opie és munkatársai találtak amiloid típusú lerakódásokat a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben.¹² Alois Alzheimer csak hat évvel később, 1907-ben számolt be hasonló agyszöveti lerakódásokról.

A 2-es típusú cukorbetegségben szenvedők hasnyálmirigyének bonctani vizsgálatát követően 90-95 százalékuknál neurodegeneratív megbetegedésekre jellemző, amiloid típusú lerakódásokat mutattak ki.¹³ Mindezekből levonták a következtetést, hogy egyértelmű és szoros kapcsolat van az amiloidózis és a cukorbetegség kialakulása között, sőt diagnosztikus célra is alkalmazni kezdték a plakkok (lerakódások) vizsgálatát.

** Az inzulinóma egy daganat, mely a hasnyálmirigy inzulintermelő sejtjeiből származik.

*** Az „álmatlanság-kór” a Buendía családot is sújtja Gabriel García Márquez Száz év magány című regényében.

Idővel az is érdekelte a téma kutatóit, hogy mely fehérje megváltozása vezet a hasnyálmirigy amiloid lerakódásainak képződéséhez. Utóbbiak összetételét és szekvenciáját vizsgálva Westermarck és munkatársai 1986-ban izolálták és megtisztították az emberi inzulinkiválasztó tumorszövetekből származó amiloid kötegeket, és arra lettek figyelmesek, hogy a szekvencia nem hasonlít az inzulinéhoz, melyet a cukorbetegséggel kapcsolatban kézenfekvőnek gondoltak volna. Amit találtak, azt *Insulinoma Amyloid Peptide*-nak (IAPP) nevezték el, mely szekvenciális hasonlóságot (bár mindösszesen 50%-os homológicitást) mutatott egy másik peptidhez, mely az ún. CGRP neuropeptid volt (CGRP: *kalcitonin génhez kapcsolódó peptid, calcitonine gene related peptide*).^{14,15 †}

A (korántsem meggyőző 50%-os) homológicitás ellenére/mellett továbbra is kérdés maradt, hogy egyfelől a peptid részt vesz-e a Langerhans-szigetek hormonális szabályozásában, másfelől pedig mekkora a relevanciája a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásában.

Cooper és csoportja néhány évvel később azt közölték, hogy az aggregátumok legfőbb fehérjealkotója a 37 aminosavból álló humán amilin peptidhormon (amylin, amilin, human islet amyloid polypeptide, hIAPP).^{16,17}

A dolgozat további részében az emberi vagy humán amilin[‡] (röviden: hIAPP) elnevezéseket fogom használni.

Az amilint a szakirodalomban egyértelműen az ún. „kalcitonin peptidcsaládba” sorolják. Habár élettani szerepe még nem tisztázott teljesen, hatása alapján is az említett peptidcsaládhoz rendelhető.¹⁸

A hIAPP az inzulinhoz hasonlóan a hasnyálmirigy bétasejtjeiben keletkezik, csökkenti a gyomorürülés sebességét és ezáltal mérsékli az étkezés utáni vércukor-emelkedést. Kiválasztódása az inzulinnal párhuzamosan történik, és a vércukorszint beállításában, a glükózfelvétel egyensúlyozásában is együtt fejtik hatásukat.¹⁹ Máshol az olvasható, hogy oldott formája többek között fontos szerepet játszik az inzulinkiválasztás szabályozásában.²⁰ Abból adódóan, hogy koncentrációi szoros kapcsolatban vannak az inzulin szintjével, komoly összefüggést feltételeznek az inzulinrezisztencia és az amilin eredetű lerakódások képződése között. Azt is felismerték, hogy az amiloid lerakódások képződése együttjár a bétasejtek kimerülésével és elhalásával.

Az amilin peptidlánc aggregációjának oka és mechanizmusa ugyanakkor mindmáig kérdés maradt.

[†] Amennyiben a CGRP koncentrációja megemelkedik, akkor az érfalak tágulata is megnő, és ez a megnövekedett nyomás okozza a migrénes rohamokat.

[‡] Minthogy az amilin az egészséges szervezetben is megtalálható, indokolt volt olyan nevet adni ennek a hormonnak, mely nem a cukorbetegséggel való kapcsolatát helyezi előtérbe. Az amiloid szót az „-in” névszóképzővel ellátva kapták az amilin elnevezést. Az amiloid kifejezés tehát egy általános formula és *tulajdonságot* jelöl különböző szövetek esetében, mint például az agyszövetben, vagy a hasnyálmirigy szöveiben. Az amilin pedig egy, a fenti tulajdonságot hordozó konkrét vegyületet a hasnyálmirigyben.

Azt már korábban is tudták, hogy az ideg- illetve hormonrendszeri betegségek kialakulása alapvetően a fehérjemolekulák konformációváltozásával, és az azt követő aggregációjukkal van összefüggésben. Azonban ezen fehérjék nagy fémionaffinitása és így a fémionok ezen folyamatokban betöltött szerepe csak az újabb kutatások alapján vált egyértelművé.²¹

Ennek a hatásnak többféle mechanizmusát is közölték már. (Hozzá kell azonban fűznünk, hogy ezek az eredmények egyrészt különböző szövetekre vonatkoznak, másrészt eltérő típusú amiloidképzést tanulmányozó kutatásokból származhatnak.)

- Az egyik lehetséges magyarázat, hogy a fémionok koordinációja során a geometriai és elektrosztatikus viszonyok módosulnak, és ezzel kiváltják a harmadlagos szerkezet megváltozását.^{22,23}

- A fémion-peptid komplex képződése során intermolekuláris keresztkötések jöhetnek létre a fehérjeszálak között.²⁴

- A képződött fémion-fehérje komplex nettó töltése miatt semlegessé is válhat, és így fölgyorsulhat a kötegek képződése.²⁵

- A koordináció stabilizálhatja az oligomer formát, ez pedig a fehérje alaki sajátságainak megváltozását okozza.²⁶

- A fémion megkötése destabilizálhatja a fehérje eredeti szerkezetét, ezért a letekeredés energetikailag kedvezőbbé válik.^{27, 28}

Hogy a fémionok szerepe valóban releváns, arra egyértelmű eredmények mutatnak, hiszen a Cu(II), Fe(III) és Zn(II) kiugróan nagy koncentrációban vannak jelen az amiloid lerakódásokban.²⁹

A fémion szerepe és részvételének mibenléte ugyanakkor igen összetett. Számos kutatást ismerhetünk, melyben a fémionokat *mint kiváltó okot* mutatják be, de épp ilyen sok helyen olvashatunk arról, hogy a fémionok jelenléte inkább csak egy-egy szöveti degeneráció *következménye* volna.

Mint az eddig leírtak is mutatják, az amiloidózis összetett, soktényezős, és bonyolult folyamat. Az orvosi gyakorlatban és élettani vizsgálatokban számos probléma akad, ha egy ilyen jelenséget szükséges megvizsgálni.

Többek között az is nehezíti ezeknek a rendszereknek a vizsgálatát, hogy a szövetek nem homogén oldatrendszerek, így a koncentráció heterogenitásával is számolni kell (pl. egyes részecskék helyi feldúsulása). In vivo körülmények között nehezebb reprodukálható adatokat nyerni, így a nyert adatok eltéréseit sem lehet helyesen értelmezni.

Mindezekből kitűnik, hogy a biológiai folyamatok megértéséhez föltétlenül szükséges, hogy az azokat felépítő kémiai folyamatokat behatóbban és részletesen ismerjék, avagy hogy az élettani jelenségeket ezzel a tudással befolyásolni tudják. A Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban ennek megfelelően igyekszünk a létfontosságú peptidszekvenciák biogén fémionokkal szembeni viselkedését, alakító tényezőit *in vitro* tanulmányozni, megérteni és leírni, s így tudományosan tisztázott, molekuláris szintű alapokat nyújtani az *in vivo* vizsgálatokhoz.

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1. A vizsgált fémionok biológiai jelentősége³⁰

Mint az előző fejezet végén is utaltam rá, néhány átmenetifém-ionnak szerepe lehet az amilin szerkezetének megváltozásában. Doktori munkám során az amilin fragmenseinek és mutáns peptidszakaszainak, illetve három létfontosságú fémionnak a kölcsönhatását tanulmányoztam.

Az ún. létfontosságú fémionok közös jellemzője, hogy meghatározott koncentrációtartományban fordulnak elő a szervezetben. A táplálékból történő elvonásuk után reprodukálható és hátrányos fiziológiás elváltozásokat figyeltek meg. Ezek az elváltozások mindazonáltal az illető elem pótlásával visszafordíthatók vagy legalább enyhíthetők. Hiányuk és/vagy fölöslegük jól meghatározott betegségekkel is összefüggésbe hozható. Szerepüket tekintve pedig elmondható, hogy a létfontosságú elemek biológiai előfordulása mindig valamely, meghatározott biokémiai folyamathoz vagy folyamatokhoz kötődik.

Ezek közül munkám során a Cu(II)- és a Zn(II)-ion szerepét tanulmányoztam. Bár a források szerint a szövetekben a Fe(II)-ion koncentrációja is megemelkedett, de ez csak az agyszöveti plakkokat érintette. A cukorbetegség amiloid lerakódásaiban a Cu(II)- és a Zn(II)-ion szintje volt magasabb a normálisnál, így a következőkben ezeknek az átmenetifémionoknak a biológiai szerepét és koordinációs viselkedését mutatom be.

A Ni(II)-ion élettani szerepét az ember és más emlősök esetén bár még nem bizonyították, de a szervezetben nagyságrendileg a létfontosságú mangánnal egyező mennyiségben fordul elő (kb. 10 mg/70 kg). Abból fakadóan, hogy bizonyos oldalláncoknak a komplexképzésben történő részvétele igen fontos kérdés ezen a területen, a Ni(II)-ion koordinációs sajátosságainak tanulmányozása azért is volt szükséges, mert értékes összehasonlító és megerősítő adatokat nyerhetünk vizsgálatával.

A **réz** valamennyi élő szervezetben jelen van, az átmeneti fémek közül csak a vas és a cink fordul elő nagyobb mennyiségben.^{31,32,33}

Az élő rendszerekben azonban – mint jó komplexképző – javarészt rézproteinekben található meg, kötött formában. Ezek élettani folyamatokban betöltött szerepüket tekintve is nagy változatosságot mutatnak; a réz szállításához (ceruloplazminok), illetve tárolásához (metallothioneinek), és redoxi folyamatok katalíziséhez is kapcsolhatóak (szuperoxid-diszmutázok, oxidázok, oxigenázok, elektron-transzferproteinek).

A réztartalmú fehérjéket három típusba sorolhatjuk a komplex geometriája, a fémion oxidációs állapota és a donoratomok szempontjából.

A fotoszintézisben fontos szerepet betöltő ún. kékréz fehérjékben a paramágneses Cu(II)-ion két nitrogén és két kén donoratomhoz koordinálódik. Ezen komplexmolekulák geometriája részben a Cu(II)-komplexek (négy-nitrogénes) tetragonálisan torzult oktaéderes koordinációs módjára, részben a Cu(I)-komplexek (négy-kénes) tetraéderes koordinációjára hasonlít. Szokatlan

abszorpciós és ESR paraméterekkel rendelkeznek. Nevüket a 600 nm körül jelentkező S-Cu töltésátviteli sáv miatt kapták ($\epsilon \sim 3000\text{-}5000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A második típus legfontosabb képviselője a Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz enzim, mely a nemkékréz fehérjék csoportjába sorolható. Geometriájukat tekintve ezek síknégyszeteselek.

A harmadik típusba az ESR-inaktív rézproteinek sorolhatóak, melyeknek két csoportja ismert. Az első csoportban képviselőiben két, egymáshoz közeli (de független) Cu(I)-ion található, amelyekben a hisztidin N-donorjai koordinálják a fémiont. Jellemző képviselőjük a hemocianin, mely a puhatestűekben az oxigénmolekula transzportjára és aktiválására szolgál. A második csoportot a két antiferromágnesesen csatolt Cu(II)-iont tartalmazó fehérjék alkotják.

A rézkomplexeiket számos betegséggel kapcsolatosan is tanulmányozták. Ezeknek a körébe tartozik a Menkes-kór, mely a sejten belüli réztranszport örökletes rendellenessége. Az ennek következtében kialakuló rézhiány súlyos elváltozásokat idézhet elő a szellemi és a fizikai fejlődésben. Megfelelő rézvegyületek formájában intravénásan pótolható a fém(ion). A Wilson-kór is a réz anyagcseréhez kötődő megbetegedés, a szervezet réztároló képességének súlyos agyi rendellenességeket előidéző örökletes zavara. A betegség kezelése kelátterápiával történhet, de még ma is folyik a meglévő terápiás szerek fejlesztése, illetve keresik azokat a kezelési módokat, melyek alkalmasak a betegség még hatékonyabb kezelésére.³⁴

Bár a réz oxidációs száma a komplexeiben 0-tól +4-ig terjedhet, a fenti rendszerekben leggyakoribb a +2-es oxidációs állapot, de jelentős még a +1-es is.

A Cu(I)-komplexelek d^{10} elektronkonfigurációval rendelkeznek, ezzel összefüggésben színtelenek és diamágneses sajátosságúak. A preferált N=2 koordinációs számú komplexelek esetében lineáris, míg a ritkábban előforduló N=4 koordináció esetében tetraéderek téralkat jellemzi őket. Standardpotenciáljából adódóan könnyen oxidálódik, de redoxipotenciálja jelentősen függ a koordinálódó ligandumtól. Szóft fémion lévén stabilis komplexet ugyancsak szóft karakterű ligandumokkal képez (például jodidion, tiolok).

A d^9 elektronkonfigurációjú, egy párosítatlan elektronnal rendelkező Cu(II)-ion komplexei azonban paramágnesesek, színük változatos (kék, zöld vagy lila, széles elnyelési sávval). Ez okból utóbbiak jól vizsgálhatók ESR-spektroszkópiával, UV-látható spektrofotometriával, valamint CD spektroszkópiával (amennyiben a ligandum optikailag aktív).

Négy, öt, de legjellemzőbben hat ligandum koordinálódhat maximálisan a fémionhoz, utóbbi koordinációs szám esetén a komplex tetragonálisan torzult oktaéderek geometriát vesz föl. Két jellemző sáv lelhető fel abszorpciós spektrumában ($\lambda = 500\text{-}800 \text{ nm}$, $\epsilon \sim 10\text{-}100 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Amennyiben a komplexképződés során nő a koordinálódott nitrogéndonoratomok száma, akkor az abszorpciós maximumok a kisebb hullámhosszak felé tolódnak, az oxigéndonoratomokhoz történő kötődés esetén pedig éppen az ellenkező irányba. A Cu(II)-komplexelek jellemző ESR paraméterekkel rendelkeznek. Komplexei labilisak, gyors ligandumcsere figyelhető meg. Az Irving-Williams sor alapján

komplexeinek termodinamikai stabilitása igen nagy a 3d-átmenetifémek körében: $\text{Mn(II)} < \text{Fe(II)} < \text{Co(II)} < \text{Ni(II)} < \text{Cu(II)} > \text{Zn(II)}$.^{30,34}

A d^8 elektronkonfigurációjú Cu(II)-komplexeiket planáris geometria jellemzi ($N=4$). Igen inerte és rendkívül erőteljes oxidálószer.

A Cu(I) szoft és a Cu(II) köztes (borderline) karakterének megfelelően stabilis komplexeket hoz létre aminosavakkal, peptidokkal, fehérjékkel, amelyekben a donoratomok leginkább nitrogén, oxigén vagy kén atomok.

A Cu(II)-ion élettani jelentősége szempontjából fontos a tény, hogy képes elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját már kisebb pH -n is (például a vér vagy egyéb szövetekre jellemző pH -tartományban).³⁰

A **nikkel** vegyületei zömében mérgezőek (például a nikkel-tetrakarbonil, illetve a karcinogén nikkel-oxidok és –szulfidok). Emellett több közleményben is beszámoltak már a használati tárgyakból és különböző pótlóanyagokból felszívódó nikkel által kiváltott allergiáról is.^{30,35}

A nikkel-tartalmú enzimek változatos funkciókat látnak el, ismert a karbamid hidrolízését katalizáló ureáz enzim egyes baktériumokban és növényekben. Egy másik funkcióban a hidrogén vízzel történő oxidációját katalizálja a nikkel-vas hidrogenáz enzim.³⁶ Utóbbiak szerkezetileg a vas-kén fehérjékhez hasonlíthatók, de az aktív szerkezeti egység cisztein-S hidakkal összekapcsolt Ni-Fe centrumot tartalmaz és a kénatomot szelén is helyettesítheti. Emellett a nikkel fontos szerepet tölt be a metil-koenzim-M-reduktázban, amely a szén-dioxid metánná alakításában vesz részt.³⁷ Szintén Ni(II)-iont tartalmaz a szén-monoxid szén-dioxiddá történő reverzibilis oxidációját katalizáló CO-dehidrogenáz,³⁸ emellett immár ismert a Ni(II)-szuperoxid-diszmutáz enzim is.³⁹ Itt a nikkel atomok megkötésében a cisztein-S donoratomoknak van meghatározó szerepe, és a működés során Ni(II) – Ni(III) átmenet valósul meg.

A nikkel +4-től 0-ig terjedő oxidációs állapotai egyaránt ismeretesek, ennél alacsonyabb oxidációs számmal csak a fémorganikus vegyületekben szerepel. A d^8 elektronszerkezetű, +2-es oxidációs állapota kiugróan stabil. A Ni(II)-ion koordinációs száma négyes, ötös valamint hatos lehet.

A Ni(II)-ion paramágneses tulajdonságú, oktaéderes geometriájú komplexeket képez oxigén és/vagy nitrogén donoratomot tartalmazó mono- és polifunkciós ligandumokkal. Az így képződő komplexeket tartalmazó oldatok színe halványkék vagy halványzöld.

Erős terű ligandumok jelenlétében viszont már vörös/sárga színű síknégyszetes szerkezetű, diamágneses tulajdonságú Ni(II)-komplexek képződnek (például tiolvegyületek, peptidok, makrociklusok S- és N-donoratomjai esetében).

A **cink** a második leggyakoribb átmenetifém az élő szervezetben, ráadásul valamennyi élőlényben megtalálható és élettani szerepe is igen sokrétű (szénsavanhidráz, karboxipeptidáz, redoxi katalizátorok, alkohol dehidrogenázok, Cu,Zn-SOD). A cinktartalmú fehérjék például a DNS replikációja során szabályozzák a genetikai információ átadását. Az élő

szervezetben ligandumai kizárólag fehérjék, gyakorta koordinálódik a hisztidin, cisztein, glutaminsav és aszparaginsav oldalláncbeli donorcsoportjaihoz.

Egy átlagos testtömegű felnőtt emberi szervezetben 2-3 g cink fordul elő, melynek közel 60 százaléka az izomszövetben, és kb. 30 százaléka a csontban halmozódik fel.

Hiánya növekedési zavart (törpenövést), látászavart, bőrelváltozást, hajhullást és sebesedést, de esetenként impotenciát, mentális zavart, valamint étvágytalanságot is okoz. A kevésbé toxikus nehézfémek közé tartozik, az élő szervezet viszonylag nagy mennyiségű cinket képes tolerálni, így specifikus felesleg betegsége nem ismeretes.

2.2. Az amilin hormon és az amiloid lerakódások

A hormonra vonatkozó korábbi kutatások igen sokfélék abból szempontból, hogy mire helyezték a hangsúlyt. Vannak munkák, melyek a *humán* amiloid lerakódásokra koncentrálnak, találunk szintetikus peptidmodellekkel történő és sejtkörnyezetben végzett vizsgálatokat is. Egy újabb csoportot képeznek azok az eredmények, melyek *fémion(ok) jelenlétében* történtek. Tanulmányozták már egyes *rágcsálók* vagy kifejezetten a *patkány* amilinjét is. Fellelhetők olyan közlemények is, melyekben keverednek a felsorolt szempontok, így itt tematikusan rendezve tárgyalom az eredményeket.

2.2.1. Különböző fajok amiloid lerakódásainak vizsgálata

Miután az emberek szervezetében azonosították a cukorbetegséggel együttjáró lerakódásokat, természetesen más fajok szöveteit is megvizsgálták. Az emberek érintettsége mellett még néhány állatfaj esetében is találunk példát amiloid lerakódások kialakulására az irodalomban; bizonyos főemlősök, mint például a *majmok*,⁴⁰ *kutyák*⁴¹ és a *macskafélék*⁴² esetében.

Megfigyelték azonban, hogy a *patkányok*, *egerek*, illetve *hőrcsögök* hasnyálmirigyében nem képződnek amiloid lerakódások.

A patkány amilinjét tovább vizsgálva, annak a szöveti környezet pH-jával való kapcsolatát is jobban megismerték. A fiziológiás pH-tartományban ugyanis a patkány amilin nem mutat hajlamot tipikus plakkok képzésére, de lúgos közegben képez kis pálcikászerű kötegeket. Az ilyen rostkötegek azonban nem mikronos méretűek, ahogy azt az emberi amilin lerakódásainál megfigyelték.⁴³ A lerakódások ráadásul (ellentétben a humán aggregátumokkal) nem képeznek kötegeket, nem mérgezőek a még egészséges és még működő szigetsejtekre.

Ha a szekvenciákat összehasonlítjuk, több eltérő tagot is találunk. A patkány amilin és az emberből izolált amilin a 18., 23., 25., 26., 28. és 29. aminosavban tér el egymástól.⁴⁴ Míg az ember amilinjében ezeken a helyeken hisztidin, fenilalanin, alanin, izoleucin, és két szerin található, addig a patkányéban arginin, leucin, prolin, valin, és két prolin (2. táblázat).

(Az aminosavak három- és egybetűs rövidítéseit az 1. táblázatban foglaltam össze.)

2. táblázat: A humán és a patkány amilin szekvenciája (*Az eltérő tagokat kiemelttem.*)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>hIAPP</i>	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	H
<i>rIAPP</i>	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	R
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
S	S	N	N	F	G	A	I	L	S	S	T	N	V	G	S	N	T	Y
S	S	N	N	L	G	P	V	L	P	P	T	N	V	G	S	N	T	Y

Abból kifolyólag, hogy a patkányok, egerek és hörcsögök hasnyálmirigyében nem képződnek amiloid lerakódások Betsholtz és munkatársai munkájuk során a szekvenciális különbségek hatását kezdték tanulmányozni.⁴⁵

A humán és a hörcsög amilin megfelelő szakaszait modellező peptidek szintézise után összehasonlították őket abból a szempontból, hogy mennyire hajlamosak az aggregációra. Eredményeik arra mutattak, hogy a *hIAPP* (20–29) (–SNNFGAILSS–) fragmens felelős a teljes szekvencia amiloidképző hajlamáért.

Ennek további vizsgálata során pontcseréket (más néven pontmutációkat) hajtottak végre a *hIAPP* (20–29) tartományában olyan aminosavakra, melyek az adott pozícióban a patkány amilin szekvenciájában lelhetők fel és ezek aggregációra való hajlamát vetették össze. Mindebből jól látszik, hogy a különböző fajok amilinjében lévő szekvenciális eltérések fontos szerepet játszanak az amiloidképződési hajlam kialakulásában.

Moriarty és munkatársai azt is szerették volna meghatározni,⁴⁶ hogy a tíztágú szekvencia mely tagjainak van szerepe, és ha van, ez mekkora *a humán amilin* amiloid képződésben. Abból indultak ki, hogy a prolin képes destabilizálni a β -struktúrát, s így inhibálni az amiloidképződést. Ezt úgy oldották meg, hogy tíz peptidmutánst szintetizáltak a dekapeptid egy-egy tagját prolinnal szubsztituálva, így információt nyertek arról, melyik pozíciónak van szerepe vagy nagyobb szerepe az amilin plakkképzésében. A lerakódásokat Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával (FTIR) és transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) is elemezték.

Eredményeik azt mutatták, hogy a *humán* amilinben az Asn22, a Gly24, ill. a (IleLeuSer) 26–28 fragmens a kulcsfontosságú. Ezek közül viszonylag erősebb másodrendű kölcsönhatásra a poláris (Asn22, Ser28) oldalláncok képesek, így ezek hatására még a további fejezetek egyikében ki fogok térni.

Moriarty és munkatársai vizsgálataik során azonban csak *a humán amilin* (20–29) szakaszára fókuszáltak, míg a patkány amilinjére nem tértek ki. Az utóbbi szerkezete a hat szubsztituens miatt, – melyből három prolin – jelentősen eltérő lehet, azonkívül az eltérések nagy része a kritikus pozíciókba esik: Asn22, Val 26, Pro28.

Egy másik kutatás⁴⁷ során a legrövidebb *humán* amilin szakaszt keresték, amely képes a β -redők és amlioidképzésre. A 3. táblázatban a vizsgált szekvenciákat foglaltam össze.

3. táblázat: A vizsgált humán és patkány amilinfrafragmensek⁴⁷

fragmens	szekvencia
hIAPP (20-29)	SNNFGAILSS: Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-Ser-Ser
hIAPP (20-27)	SNNFGAIL: Ser-Asn-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu
hIAPP (22-27)	NFGAIL: Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu
hIAPP (23-27)	FGAIL: Phe-Gly-Ala-Ile-Leu
hIAPP (24-27)	GAIL: Gly-Ala-Ile-Leu
hIAPP (22-27)*	LIAGFN: Leu-Ile-Ala-Gly-Phe-Asn
rIAPP (20-29)	SNNLGPVLPP: Ser-Asn-Asn-Leu-Gly-Pro-Val-Leu-Pro-Pro
rIAPP (22-27)*	NLGPVL: Asn-Leu-Gly-Pro-Val-Leu

*módosított szekvencia

Méréseik során arról számoltak be, hogy az SNNFGAILSS, az SNNFGAIL, NFGAIL és az FGAIL fragmensek képeznek β -redős lerakódásokat, ellenben a GAIL szekvencia nem mutat hajlamot az amiloidképzésre. A kevert szekvenciák sem képeztek jól strukturált és a többi sejtet mérgező lerakódásokat, legfeljebb amorf formák jelentek meg, melyek nem bizonyultak citotoxikusnak. Mindezekből látszik, hogy az egyes aminosav tagok megléte mellett a sorrend is meghatározó.

Megállapították ezeken túl azt is, hogy az –NFGAIL– és a –FGAIL– domének egyaránt elégségesek a β -redők képződéséhez. Annak ellenére, hogy mindössze csak egyetlen aminosavban térnek el egymástól, teljesen más szerkezetű amiloidkötegek képződésére figyelhetek fel. Az aszparagin tagot is magába foglaló hexapeptid ugyanis tipikus amiloid morfológiájú tekercseket képzett, míg a pentapeptid párhuzamos, nagyobb kiterjedésű szalagszerű formákat hozott létre.

Arra is felfigyeltek tehát, hogy a rostképződési mechanizmust az határozza meg, hogy az Asn22 tag jelen van-e. Azt feltételezték, hogy ennek az oldalláncnak kulcsszerepe lehet bizonyos intermolekuláris kölcsönhatásokban, melyek révén stabilizálódik az egyik jellemző morfológia. A kinetikai vizsgálatok szintén az Asn22 nagyobb jelentőségét mutatták ugyanebben a vizsgálatssorozatban.

2005-ben azonban Abedini és munkatársai beszámoltak arról, hogy a His18 tag nagyobb jelentőségűnek bizonyul, mivel a teljes szekvencia amiloidképzése *in vitro* körülmények között pH-függést mutat – különösen a His18 pK értéke fölötti tartományban.⁴⁸ Ez arra enged következtetni, hogy bár a 20–29 fragmens bizonyítottan döntő szerepet játszik a plakk-képződést tekintve, de önmagában nem elégséges a mechanizmus modellezéséhez.

Mindezekből az tűnik ki, hogy két fontos eleme van a hIAPP szekvenciájának, mely az aggregációra való hajlamot befolyásolja és szabályozza; a His18 és az

(SSN)NFGAIL szekvenciaszakaszok. Továbbá az is látszik, hogy a pH meghatározó ebből a szempontból. (Enzimek esetében azonban köztudott, hogy csak egy jól meghatározott, szűkebb pH-tartományban működnek, ún. pH-optimummal rendelkeznek.)

2.2.2. A fémionok szerepe

Mint a *Bevezetés* c. részben és az *2.1. fejezetben (A vizsgált fémionok biológiai jelentősége)* is említettem, a konformációváltozás kiváltója többféle tényező is lehet. Ezek közül munkánk során a fémionok szerepének szenteltünk különös figyelmet.

Számos példát közöltek már az irodalomban arra, hogy a fémionok meghatározzák (többek között) a plakkok morfológiáját (alaktani sajátosságait). Az amiloid- β peptid vizsgálatai során például azt találták, hogy a Cu(II)- és Zn(II)-ionok jelenlétében az *amorf* aggregátumok képződése a kedvezményezett,^{49,50,51,52,53} ezzel azonban gátlódik a fibrillumok, azaz kötegek képződése.^{49,54}

Más munkákban arra jutottak, hogy Fe(III)-ionok hatására semleges pH-n amiloidkötegek jelennek meg.⁵⁰ Mint látható az előző fejezetből is, az amiloid lerakódások morfológiája meghatározó információt hordozhat, és a fémionoknak ebben meghatározó szerepe lehet.

Mindazonáltal adódik a kérdés, hogy a fémionok és peptidek közötti kölcsönhatás vajon milyen mértékű lehet, továbbá milyen arányban vannak jelen egymás mellett a hasnyálmirigy amiloid lerakódásokat tartalmazó sejteiben.

A hasnyálmirigy szöveteiben lévő koncentrációviszonyokat ugyanakkor nem lehet vagy nagyon nehéz egyértelműen megadni.

A *patkányok amilinjének* vérplazmabeli koncentrációjára vonatkozóan például a 3-5 pM-es, illetve 15-20 pM-es értéktartományt jelölik meg.⁵⁵ Az inzulinkiválasztó granulómákban viszont nagyságrendekkel nagyobb mennyiséget, akár néhány mM nagyságrendű koncentrációt is mértek.⁵⁶ Az *emberi szervezetben lévő amilin* mennyiségére is hasonló adatokat találunk másutt, de itt is érdemes szem előtt tartanunk, hogy az adatok különböző szövetekre vonatkoznak (vérplazma, granulómák). A szakirodalomban fellelhető adatokat a *4. táblázatban* foglaltam össze.

4. táblázat: Az IAPP koncentrációja a szervezetben (mol/l)

patkány ⁵⁶	<i>vérplazmában</i>	$3-5 \cdot 10^{-12}$ ill. $15-20 \cdot 10^{-12}$
	<i>inzulinkiválasztó granulómákban</i>	$5 \cdot 10^{-4}$ vagy néhány mM
	<i>egészséges (vérplazma)</i>	$6,4 \cdot 10^{-12}$
humán ⁵⁷	<i>cukorbeteg (vérplazma)</i>	$6,7 \cdot 10^{-12}$
	<i>cukorbeteg és elhízott (vérplazma)</i>	$10,5 \cdot 10^{-12}$

A fémionok koncentrációinak megadása sem egyszerűbb feladat. Sokkal kiterjedtebbek az *agyszövetekre vonatkozó vizsgálatok*, a hasnyálmirigy amiloid

lerakódásainak összetételére vonatkozóan ezzel szemben csak kevés adat áll rendelkezésünkre.

Az *Alzheimer-kór* kutatása során azt találták például, hogy a betegek szervezetében a normál értékek többszörösére növekedik a Cu(II), Fe(II) és a Zn(II) mennyisége (5. táblázat).⁵⁸

Más források⁵⁹ arra hívják fel a figyelmet, hogy a kor előre haladtával, illetve a neurodegeneratív betegségben szenvedőknél szignifikánsan megnövekedik a Cu(II)/Zn(II) arány és a Cu(II)-koncentráció az emberi vérérszérumban. Emellett ennek a jelenségnek az oxidatív stresszel való egyértelmű kapcsolatát is felismerték. Itt a betegek vérérszérumának Cu(II)-ion koncentrációja több mint 20 μM , de ez is általában értendő a neurodegeneratív megbetegedésekben szenvedőkre.

A *cukorbeteg*ekre konkrétan vonatkozó adatok is csak a vérérszérumra és a vizeletre érhetőek el (6. táblázat), viszont a plakkokban ettől eltérő koncentráció lehet.⁶⁰

5. táblázat: Különböző átmenetifémionok koncentrációja *Alzheimer-kóros és egészséges emberek agyában*⁵⁸

Az egészséges agyszövetben			Alzheimer-kór esetén	
Cu(II)	$\sim 60 \mu\text{M}^*$	$\sim 4 \mu\text{g/g}$	$\sim 375 \mu\text{M}^*$	$\sim 25 \mu\text{g/g}$
Zn(II)	$\sim 320 \mu\text{M}^*$	$\sim 23 \mu\text{g/g}$	$\sim 740 \mu\text{M}^*$	$\sim 53 \mu\text{g/g}$
Fe(III)	$\sim 310 \mu\text{M}^*$	$\sim 19 \mu\text{g/g}$	$\sim 1120 \mu\text{M}^*$	$\sim 69 \mu\text{g/g}$

* Közelítő érték, az agyszövet sűrűségét az agy átlagos tömegéből és átlagos térfogatából számoltam az összehasonlíthatóság érdekében.

6. táblázat: Különböző átmenetifémionok koncentrációja *cukorbeteg és egészséges emberek szervezetében*⁶⁰

Egészséges szervezet			Cukorbeteg szervezet	
Cu(II)	$\sim 14 \mu\text{M}$	$\sim 0,22 \mu\text{M}$	$\sim 20 \mu\text{M}$	$\sim 0,23 \mu\text{M}$
Zn(II)	$\sim 9 \mu\text{M}$	$\sim 4 \mu\text{M}$	$\sim 9 \mu\text{M}$	$\sim 7 \mu\text{M}$
Ni(II)	$\sim 0,075 \mu\text{M}$	$\sim 0,06 \mu\text{M}$	$\sim 0,15 \mu\text{M}$	$\sim 0,05 \mu\text{M}$

Az adatok a vérérszérumra és a vizeletre vonatkoznak ebben a sorrendben.

Az mindenesetre látszik, hogy a vérérszérum és a vizelet összetételét ICP-MS technikával különböző fémionokra megvizsgálva (Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Hg, Cd és Pb) a Cu és a Mo antagonistikus kölcsönhatása bizonyult meghatározónak. Az előbbi irodalmakkal megegyezően a Cu(II)-ion koncentrációja ebben a kutatásban is közel 20 μM -nak adódik a betegek esetében.

Zargar és munkatársai a vérplazmára adták meg eredményeiket.⁶¹ Ezek alapján a cink és mangán koncentrációja nem tér el, ellenben a Cu(II)-ion mennyisége megemelkedett 14 μM -ról 17-re μM -ra. A Zn(II)-ion

koncentrációja minimális eltérést mutatott csak: 16 μM és 17 μM a megfelelő értékek.

Abból kifolyólag, hogy a szövetek egyes fémionokat megnövekedett mennyiségben tartalmazzák, a fehérjék, illetve a peptidfragmensek Cu(II) -ionokkal való kölcsönhatását kiterjedten tanulmányozták.^{23, 62,63,64} A Cu(II) -ionok felé mutatott nagy affinitását az aminosav-szekvenciában található hisztidin imidazolil-oldallancok jelenlétének tulajdonítják, amelyek elsődleges kötőhelyek a fémionok számára. A prion protein peptidfragmenseinek vizsgálata során^{65,66} ezen peptidek nagy szelektivitását tapasztalták a Cu(II) -ion megkötésére, míg az amiloid- β esetében azt találták,^{67,68} hogy az utóbbi viszont igen stabil komplexeket képez mind a Cu(II) -ionnal, mind a Zn(II) -ionnal.

Fontos a ligandum és a fémionok kölcsönhatásának vizsgálata különböző arányok esetében is, hiszen a szakirodalomban közölt eredmények szerint például az amiloid- β peptid és a Cu(II) -ionok egymáshoz viszonyított aránya meghatározó abból a szempontból, hogy képződnek-e és ha igen, milyen szerkezetűek az amiloidlerakódások.^{69,70}

Az adatokat megfigyelve ugyanakkor látnunk kell, hogy az elérhető adatok csak nagyon nehezen vethetőek össze egymással, hiszen a *hIAPP* és a *rIAPP* koncentráció, illetve a fémionok koncentrációi hol a vérszérumra, vérplazmára, vizeletre vonatkozóan vannak megadva. A plakkok koncentrációviszonyait kiterjedten pedig csak az agyi plakkokat illetően térképezték föl. *Ami ezek ellenére is kitűnik, hogy a Cu(II) -ion koncentrációja a megbetegedés során mindig nagyobb az egészséges szervezetre jellemző értéknél. Másrészt az agyi plakkokban bizonyítottan vannak különböző fémionok, ráadásul igencsak földúsulva a normális szintjükhöz képest. Az amilin/fémion aránnyal kapcsolatban ligandum fölösleg lehet a hasnyálmirigyben, de az előbb említett okok miatt indokolt más arányok szisztematikus vizsgálata is.*

Mint az **1. fejezetben** is utaltam rá, az élő szövetek nem tekinthetők homogén oldatrendszernek, így például az itt összegyűjtött koncentráció adatok is csupán orientáló jellegűek lehetnek.

Harmadrészt egyszerre többféle fémion is jelen lehet ezekben a szövetekben különböző mennyiségben és arányban, illetve maga egy peptidlánc teljes hosszában akár több fémion megkötésére is képes lehet. Ez a fémionkoncentráció fölöslegét feltételezné, ám ez a lokális feldúsulások figyelembe vételével könnyen értelmezhető.

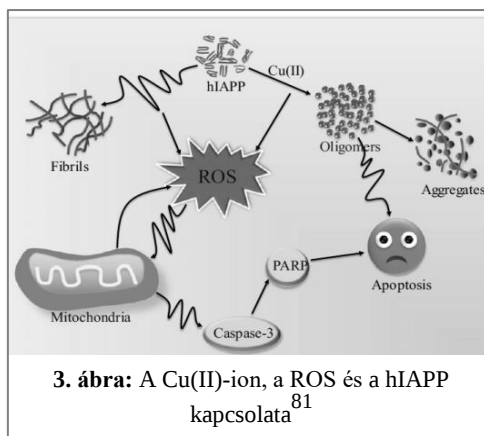
2.2.3. A humán amilin fémionmegkötő képességének vizsgálatai

A *hIAPP* élettani jelentősége elősegítette az amilin szempontjából szóba jövő peptidek koordinációs kémiai tanulmányozását, de annak kis vízdékonysága nagyban akadályoztatta az ilyen jellegű vizsgálódásokat. A *hIAPP* 18. pozíciójában egy hisztidin található (2. ábra), mely erős horgonyként szolgálhat a fémionok számára, így nagyszámú nemrégiben közölt eredmény áll

esetében is megakadályozza a plakk-képződést. Egy későbbi munkájukban⁷⁷ arról számolnak be, hogy az Al(III)- és a Zn(II)-ion jelenléte nem befolyásolja/növeli különösebben a Cu(II)-ion védő hatását. Munkájukat ők is *in vitro* végezték.

A Zn(II)-ion védőhatását emelik ki másutt⁷⁸ abból kifolyólag, hogy a kiválasztó granulómákban annak millimólos nagyságrendű a koncentrációja, méréseiket ellenben *in vitro* végezték. Azt feltételezik, hogy a Zn(II)-ion koordinálódik a szekvencia 18-as helyén lévő hisztidinhez, az így megváltozott elektrosztatikus környezet pedig kedvezőtlené teszi a szálak aggregációs folyamatait.

Más munkákban viszont a Cu(II)-ionnak a „ROS” (*ROS: reaktív oxigén származékok*) képződésre gyakorolt hatását emelték ki. Arra következtettek, hogy a sejtek elhalásához a humán amilin, a Cu(II) és a H₂O₂ között végbemenő redoxireakció vezet. Ugyanilyen megfigyeléseket tettek a humán amilin egy mutánsának (His18Ala) vizsgálatakor is, tehát a 18-as helyen



álló hisztidint nem találták kulcsfontosságúnak ebben a folyamatban. A patkány amilin vizsgálata során – ellentétben a humán amilinnel – nem találtak redoxireakcióra utaló nyomot.⁷⁹

Ellentmondásosak azonban az eredmények, hiszen Lee és munkatársai (szintén *in vitro* vizsgálataik után) arról számoltak be, hogy bár az amilinból képződik a H₂O₂, de a Cu(II)-amilin komplex jelentősen csökkenti a H₂O₂ koncentrációját, és ezáltal a komplex védő hatással bír.⁸⁰

Egy 2014-es közlemény⁸¹ más hatásokat helyez előtérbe. Azt vizsgálták, hogy CuCl₂, CuSO₄, és Cu(Gly)₂ jelenlétében csökken-e a rostkötegek képződése *in vitro* körülmények között. Az adatok azt mutatták, hogy a Cu(II) és a humán amilin kölcsönhatnak egymással és ennek eredménye itt is a csökkent rostképződés, ráadásul mindhárom rézvegyület képes volt ezt a hatást ugyanakkora mértékben előidézni.

Méréseiket atomerőmikroszkópiával és transzmissziós elektronmikroszkópiával támasztották alá és arra is rámutattak, hogy a Cu(II)-ion jelenléte kiválthatja a ROS túlermelődését és a mitokondriális károsodást.

A közleményben egy lehetséges magyarázatát is bemutatják ennek az összetett folyamatnak (3. ábra).

Máshol⁸² ennek az ellenkezője tűnik ki az eredményekből. Arra jutottak ugyanis, hogy a hIAPP és a Cu(II)-ion közötti koordinációs kölcsönhatás növeli a plakkok toxicitását azzal, hogy – feltételezésük szerint – a konformáció megváltozásával kezdvézményezetté válik az oligomerek képződése. Azt is közölték ugyanitt, hogy a Ni(II)-ion megemelkedett szintje mellett is visszaszorul a rostképződés és csökken ezek toxikussága is. Minthogy azonban a Ni(II)-ion

nem képez redoxiaktív komplexeket, ennek okán a plakkok képződése nem tulajdonítható a ROS-képződésnek, hanem inkább az oligomerek kialakulásának.

Továbbá az is közölték már, hogy a Cu(II)-ion képes módosítani az *hIAPP* lebontó enzim proteolitikus aktivitását is.⁸³

Egy másik közleményben lézerablációs elektropray ionizációs tömegspektrometriával tanulmányozták a humán amilin rézkötőhelyét. Megvizsgálták a *hIAPP*, a His18Ala mutánst és a *hIAPP* (8-37) fragmenst egyaránt, és a –HSSNN- szakaszt határozták meg mint kötőhelyet.⁸⁴ Ebben a munkában ugyancsak a His18 tagot találták meghatározónak, hiszen a mutáns csak jóval gyengébben kötötte meg a fémiont.

Kim és munkatársai szerint⁸⁵ gázfázisban a Cu(II)–amilin komplex kötőhelye az *hIAPP* (22-26) (NFGAI) szakasz. Magára az inhibíció mechanizmusára még mindig nem derült fény, leginkább a képződő komplexek okozta megváltozó töltésviszonyoknak tulajdonítják, hogy úgy változik meg a konformáció, hogy visszaszorul például már a plakkképződés első lépését jelentő dimerképződés is.

Rivillas-Acevedo és munkatársai már vizsgálták⁸⁶ a *hIAPP* (15-18) (FLVH), *hIAPP* (15-22) (FLVH-SSNN), a *hIAPP* (15-29) (FLVH-SSNN-FGAILS) és a *hIAPP* (15-22) (His18Ala) (FLVA-SSNN) mutánst. Ők is arra jutottak, hogy a Cu(II)-ion koordinációja akadályozza a dimerek képződését és így a β -redős szerkezet kialakulását. Vizsgálataikat azonban DMSO-s közegben végezték, és megállapításaikat ők is a 7,2-es pH-ra fókuszálták, így szükségessé vált az élő szervezetre a pH szempontjából relevánsabb körülmények között tanulmányoznunk a humán amilint.

Az eredmények, mint látható, igen sokfélék és igen ellentmondásosak is. Bár a legtöbb adat *in vitro* körülményekre vonatkozik ebben a fejezetben, de sok származik különböző fázisban végzett mérésekből, vagy az oldószer sem azonos némelyik kutatás esetében. Nem egységes annak megítélese sem, hogy redoxi vagy éppen koordinációs kémiai folyamat határozza-e meg a tapasztalatokat, mint ahogy a meghatározó fémion minősége sem.

2.2.4. A *rIAPP* (17-29) vizsgálata Cu(II)-ionnal⁸⁷

Összhangban azokkal a korábbi kutatási eredményekkel, melyek a humán amilin esetében többek között az Asn22, His18 szerepét is kiemelik, kutatócsoportunkban már folytattak vizsgálatokat, amelyekkel az amilin azon legrövidebb szakaszát tanulmányozták, mely az emberből és a patkányból izolált amilinnek az egymástól eltérő szekvenciáját tartalmazza. A vizsgálatokat⁸⁷ a *rIAPP* (17-29) fragmenssel végezték Cu(II)-ion jelenlétében.

A 18. pozíciót is magába foglaló *rIAPP* (17-29) fragmens vizsgálata azért volt indokolt, mert a humán amilin 18. pozíciójában a közismerten jó fémmegkötő hisztidin van, ezzel szemben a patkány amilinjének ezen helyén arginin található, melynek hasonló szerepe felvetődhet az amilin fémmegkötő helyének leírása szempontjából.

Minthogy azonban a ligandum nem tartalmaz disszociábilis protont (terminális aminocsoport, hisztidin, etc.), ezért a ligandum törzsoldatának koncentrációja nem volt meghatározható a hagyományos pH-potenciometriás titrálással, és így a további, fémiont is tartalmazó minták fémion/ligandum aránya sem volt megadható. *Mindezek alapján a képződő komplexek sztöchiometriájára és stabilitására, pH szerinti eloszlására, az egyes komplexek egyedi spektrumának hozzárendelésére sem volt lehetőség.*

A titrálási görbe kiértékelésénél a bemérés alapján 100%-os tisztaságot feltételeztek, és megközelítőleg 1:2 arányú ligandumfölösleget állítottak be.

A patkány amilin vizsgálata során azonban nagyon érdekes tapasztalatot nyertek. Jól látszott a titrálási görbén, hogy a molekula képes volt egy ekvivalens Cu(II)-ion oldatban tartására – még jól ismert horgonycsoportok hiányában is –, illetve csapadékot sem észleltek a mintában.

A pH 5,5 fölött tapasztalt extra lúgfogyás alapján arra következtettek, hogy az amidnitrogének és/vagy oldalláncok vettek részt a fémion megkötésében. A korábbi tapasztalatok szerint ebben a pH-tartományban a közönséges peptidek csakis horgonycsoporttal (pl. aminocsoport, imidazolcsoport) képesek megkötni a fémionokat.

A spektrofotometriás mérések során is a $\lambda_{\max}$ értékek kisebb hullámhosszak felé történő eltolódását tapasztalták a pH növelésével. A pH 11 fölött felvett spektrumok abszorpciós maximuma 538 nm-re tolódik, mely eddigi szakirodalmi tapasztalataink alapján négynitrogénes koordinációra utal a leginkább.

Mindennek a jelentősége abban áll, hogy a patkány amilin szekvenciáját felépítő aminosavak oldalláncaikban nem tartalmaznak a mérhető pH-tartományban egy olyan donoratomot sem (disszociábilis protont, terminális aminocsoportot, ciszteint, vagy hisztidinnitrogént), melyek fémmegkötő képességükről ismertek az irodalomban. *Mindennek ellenére a patkány amilin mégis koordinálja az előbb leírt vizsgálatok alapján a Cu(II)-iont, ráadásul a fiziológias pH-tartományban. Ezek alapján feltételezhető, hogy az amilin kapcsán egy egészen más módon megvalósuló koordináció mehet végbe.*

Kérdés tehát, hogy a molekula mely része köti meg a Cu(II)-iont, illetve mely csoport(ok) és milyen arányú közreműködése játszik ebben az egyedi koordinációs mód létrejöttében szerepet.

Irodalmi ismereteink alapján csak az arginit, szerint, aszparagint tartalmazó szekvenciarészen van lehetőség az oldalláncok között másodrendű kölcsönhatások kialakítására (2. táblázat).

Ez azt jelenti, hogy a peptidvázban lévő amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja csak úgy következhet be, ha ezek a poláris oldalláncok valamilyen módon elősegítik, hogy a Cu(II)-ion közel kerülhessen a peptidvázhoz. Más szóval, a ligandumban kell lennie egy vagy több horgonycsoportként funkcionáló oldalláncnak (molekularésznek, csoportnak).

A 18-as helyzetű, már említett arginin oldalláncában ugyanakkor nincs hatékony horgonyként működő donorcsoport, illetőleg az irodalomban sincs példa arra, hogy ez az aminosav tag horgonyként funkcionált volna.^{88,89}

Az arginin mellett az azt követő két szerinnek és két aszparaginnak (ebből az egyik aszparagin a döntő fontosságúnak tűnő Asn22 pozícióban lévő) lehet még szerepe. A polipeptidet alkotó többi aminosav apoláris oldalláncú, így ezek nem jöhetnek szóba fémionok koordinációja szempontjából.

A következő alfejezetekben az említett aminosavak és az ezeket tartalmazó peptidek komplexkéimiai sajátosságait foglalom össze.

2.3. Aminosavak és peptidek koordinációs kémiája

Számos összefoglaló közlemény született már, melyekben az aminosavak és peptidek koordinációs kémiájának sajátosságait taglalták.^{88,90,91,92,93,94}

Ismert, hogy az aminosavak aminocsoportjának nitrogénje és karboxilátóxiogénje képes öttagú kelátgyűrű kialakítására (2. ábra), ezáltal stabilis bisz-, illetve triszkomplexeke képezhetnek különböző átmeneti fémionokkal (NH_2, CO típusú koordináció). Amennyiben az oldallánc nem tartalmaz koordinálódó donorcsoportot, akkor mindössze a terminális aminocsoport és a karboxilcsoport deprotonálódási állandója határozza meg a komplexképződési folyamatokat.

Dipeptidek képződése során azonban a kialakuló peptidkötés jelentősen megváltoztatja azok komplexképzési lehetőségeit. Ebben az esetben az amidkötés révén a terminális helyzetű donorcsoportok távolabb kerülnek egymástól, így ezeknek a csoportoknak a részvételével nem alakulhat ki az előbbi stabil kelátgyűrű.

Ugyanakkor részt vehet a koordinációban az amidnitrogén és a karboniloxigénatom is. Hogy melyekhez koordinálódik a fémion, abból a szempontból a fémion karaktere meghatározó. Miután az átmenetifém-ionok a nitrogéndonorokat részesítik előnyben, kialakulhat az $(\text{NH}_2, \text{O}_{\text{karbonil}})$ koordinációjú $[\text{ML}]^+$ összetételű komplex, melynek stabilitása azonban kisebb, mint az aminosavak $(\text{NH}_2, \text{O}_{\text{karboxilát}})$ koordinációs móddal megvalósuló $[\text{ML}]$ komplexéé.

Az aminosav nemkötő elektronpárral rendelkező aminonitrogénje ugyanakkor a peptidcsoportba épülve elveszíti bázicitását, emiatt az amidkötés a mérhető pH-tartományban semleges.

A koordináció létrejöttéhez tehát az amidcsoport deprotonálódása szükséges, mely a szabad ligandum esetén $\text{pH} = 14$ fölött játszódik le. Egyes fémionok jelenléte azonban elősegítheti az amidcsoport deprotonálódását, és így az amidnitrogén koordinálódását is. Míg a Zn(II) -ion egyszerű peptidek esetében nem képes elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását, addig a Cu(II) -ionok és a Ni(II) -ionok¹⁰⁶ képesek arra.

Nagyobb pH-n az eddigi folyamatokat követően az amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja következik be, amely együtt jár a karboxilátcsoport koordinálódásával is (2. ábra). Ekkor képződik a kifejezetten stabil, csatolt, kettős kelátgyűrűből álló, $[\text{MLH}_{-1}]$ összetételű komplex.

A tri- és tetrapeptidekben további peptidkötések találhatóak, amelyek szintén deprotonálódhatnak, és $[\text{MLH}_2]^-$, $[\text{MLH}_3]^{2-}$ komplexek alakulhatnak ki (2. ábra).

A Cu(II)-komplexek koordinációs sajátosságai. A $[\text{CuLH}_1]$ komplexben a Cu(II)-ionnak az egyik koordinációs helye még nem foglalt, így lúgos oldatban a fémion és ligandum arányától függően különböző részecskék alakulhatnak ki.^{95,96,97}

A $[\text{CuL}_2\text{H}_1]^-$ biszligandumú komplexben a második ligandum az amino- és a karbonilcsoporton keresztül axiális-ekvatoriális irányban koordinálódik. Ez a komplex nem képes megakadályozni a $[\text{CuLH}_1]$ komplex hidrolízisét, aminek eredményeként pH ~ 9 körül vegyes-hidroxokomplexek képződnek ($[\text{CuLH}_2]^-$, $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_3]^-$). Utóbbi folyamat egyik jele az abszorpciós spektrum vörös irányú eltolódása.

Nagyobb pH-n, és nagyobb ligandumfőlölség alkalmazása mellett négy-nitrogénes koordinációjú $[\text{Cu}(\text{LH}_1)_2]^{2-}$ összetételű komplexek képződnek az egyes ligandumok aminocsoportjának és amidnitrogénjének részvételével.^{98,99}

Nagyobb tagszámú, *egyszerűbb oligopeptidek esetén* is jól ismertek a komplexképződésre vonatkozó folyamatok. A Cu(II)-ion és a tri- / tetraglicin ($\text{NH}_2\text{---GGG---OH}$, $\text{NH}_2\text{---GGGG---OH}$) által alkotott rendszerekben^{100,101,102} az amidnitrogének egymást követő deprotonálódása és koordinációja $[\text{CuLH}_1]$, $[\text{CuLH}_2]^-$ és $[\text{CuLH}_3]^{2-}$ összetételű komplexek kialakulásához vezet (4. ábra).

A triglicin esetén a $[\text{CuLH}_2]^-$ komplexben megvalósuló (NH_2 , N^- , N^- , $\alpha\text{---COO}^-$) koordináció telítve a Cu(II)-ion koordinációs helyeit meggátolja a biszligandumú komplexek képződését és ezzel akadályozza a komplex hidrolízisét.

A tetraglicin esetében a $[\text{CuLH}_3]^{2-}$ komplexben a Cu(II)-ion mind a négy koordinációs helyét már nitrogén foglalja el. Azt, hogy nem alakul ki újabb Cu-amidnitrogén kötés, a pentaglicin Cu(II)-komplexének röntgendiffrakciós vizsgálatával igazolták.¹⁰³

Az előbbieknél nagyobb tagszámú peptidláncok esetében azonban a makromolekula konformációja és az oldalláncbeli donatoratomok részvétele jelentősen módosíthatja a komplexképződési folyamatokat.

Amennyiben a peptid aminocsoportján *acetil* védőcsoport található, akkor a következő koordinációs mód valósulhat meg (4f ábra). Ebben az esetben az acetilamid-nitrogén deprotonálódása és koordinációja történik meg, ugyanakkor az acetilamid-nitrogén megnövekedett bázicitása miatt ez a folyamat csak nagyobb pH értékeken játszódik le.

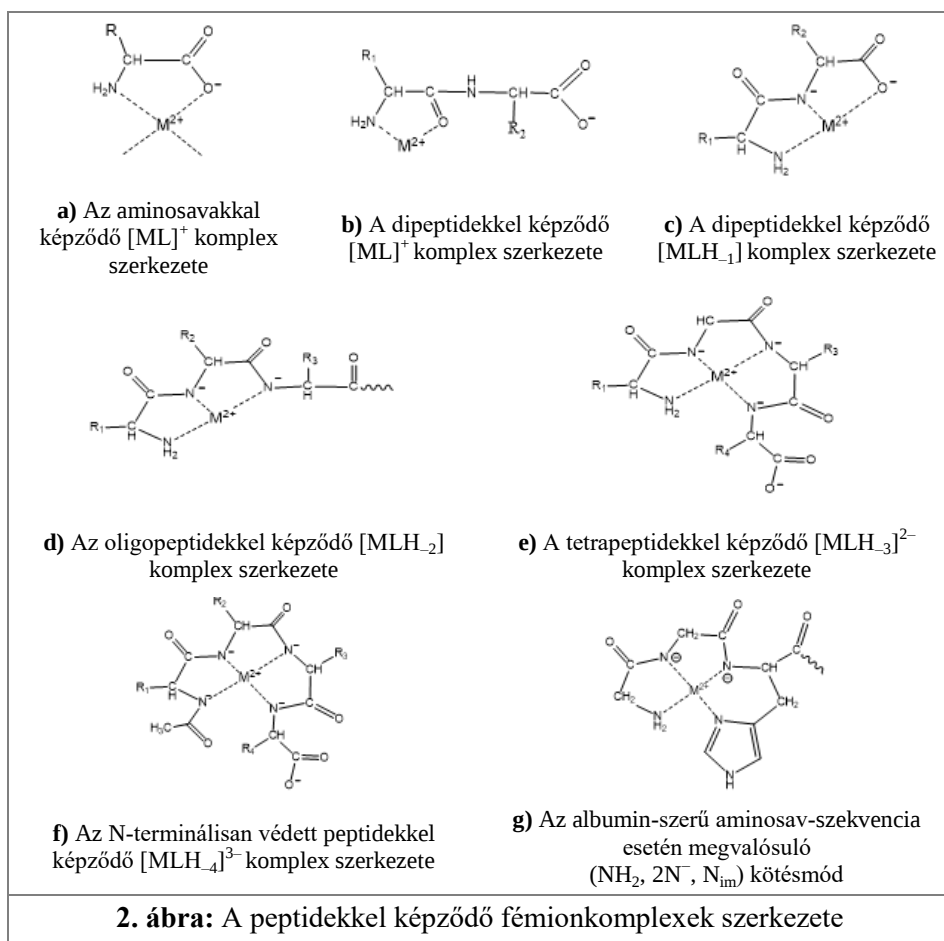
Egyszerű tri- és tetrapeptidek esetén az a jellemző, hogy – hasonlóan a Cu(II)-komplexekhez – a **Ni(II)-komplexek esetében** is a terminális aminocsoport szolgál horgonyként.

A második koordinációs helyet ugyancsak a közeli karboniloxigén telíti és oktaéderes geometria alakul ki. Nagyobb pH-n viszont (pH 8,5 körül) deprotonálódnak az amidnitrogének és kooperatívan koordinálódnak leginkább három- és négy-nitrogénes, immár síknégyszetes komplexek képződésével.¹⁰⁴ A

[NiLH₂] komplexek (a tetraglicin esetén) ebből kifolyólag nem mutathatók ki az oldatban.

Az is különbség a Cu(II)-komplexekhez képest, hogy lúgosabb tartományban megy végbe az amidnitrogének deprotonálódása, valamint gyakorta képződnek ezekben a rendszerekben biszligandumú komplexek. A síknégyszetes, diamágneses komplexek kialakulását kristályszerkezeti vizsgálatok,¹⁰⁵ az oldatok abszorpciós spektruma, valamint az NMR mérések alapján¹⁰⁶ is bizonyították.

Egy másik eltérés, hogy a Ni(II)-oligopeptid minták vizsgálata során gyakran találkozunk a Ni(II)-komplexek inertségével, mely a deprotonált amidcsoportok számának növekedésével egyre nagyobb mértékű lesz.^{30,35,107}



A **Zn(II)-komplexek** koordinációs sajátosságai szintén mutatnak bizonyos eltéréseket az előbbi folyamatokhoz képest. A 3d¹⁰ elektronszerkezetű Zn(II)-ion közepes termodinamikai stabilitású és kinetikailag labilis, színtelen, diamágneses komplexeket képez. Oxidációs állapota zömmel +2-es ezekben a részecskékben. Változó koordinációs számú (2 < N < 8) komplexei közül leggyakoribbak a

tetraéderes és az oktaéderes geometriájúak, de – különösen kelátképző ligandumok esetén – torzulhat azok geometriája.

Közbenső karakteréből adódóan donoratom preferenciája a $S > N > O$ sorban változik, a komplexek stabilitása is ilyen trend szerint alakul. Peptidekhez is képes koordinálódni, amelyek savas és enyhén lúgos oldatban csapadék leválása nélkül vizsgálhatóak.¹⁰⁸

Akárcsak az előbbi fémionoknál, pH 5,0 fölött a Zn(II)-ion rendszereiben is [ML] összetételű komplex képződik az aminos csoport és a szomszédos karboniloxigén részvételével. Ez a fémion (mint már utaltam rá) nem képes az egyszerű peptidek amidnitrogénjének deprotonálódását előmozdítani, melyet a fémion nagymértékű hidrolízishajlamával és a ligandumtér-stabilizáció hiányával magyaráznak. Lúgosabb pH-tartományban már polimer szerkezetű komplexek képződése is valószínűsíthető (pl. $[Zn_2L_2H_{-2}]$, $[Zn_3L_2H_{-4}]$ stb.), amelyekben vélhetően a fémionokat hidroxohidak kapcsolják össze, további polimerizációjuk pedig $Zn(OH)_2$ csapadék képződését eredményezi.

Martin és munkatársai ugyanakkor arról számoltak be, hogy a Zn(II)-ion jelenlétében pH 7,0 körül a NH_2 -GH dipeptid amidnitrogénje képes volt deprotonálódni.¹⁰⁹ Idővel egyre többet tudtak meg arról, hogy az oldalláncban jelenlevő donorcsoportok milyen körülmények között segíthetik elő ezt a folyamatot.

A szakirodalom alapján az is ismeretes, hogy a Zn(II)-ion által kiváltott amidnitrogén-deprotonálódás a hisztidinnek a peptidben elfoglalt pozíciójától függ, azaz ha a hisztidin a második helyet foglalja el a szekvenciában, akkor megvalósul az $[NH_2, N^-, N_{im}]$ típusú koordináció.^{110,111,112,113}

Máshol a terminális aminonitrogén és az imidazolnitrogén koordinációját írták le olyan ligandumok vizsgálata után, melyek a hisztidint egyes vagy a hármas helyzetben tartalmazzák (pl. NH_2 -HGG-OH, NH_2 -GGH-OH).^{114,115} Lúgos oldatban azonban ez a kötésmód nem volt képes háttérbe szorítani a fémion hidrolitikus folyamatait.¹¹⁶

Abban az esetben, ha az oldallánc nem tartalmaz koordinálódó donoratomot (pl. alanin, fenilalanin, valin), akkor – bár új koordinációs módok kialakulásával nem kell számolnunk – a képződő komplexek stabilitásában lehetnek eltérések az oldalláncok befolyásoló hatásának következményeként.¹¹⁷

2.4. Az oldalláncok hatása

2.4.1. Nem koordinálódó oldalláncok⁹⁴

A nem koordinálódó oldalláncot tartalmazó peptidek esetében az oldalláncok közvetlenül nem koordinálnak a fémionokhoz, mégis jelentősen hozzájárulhatnak a komplexek stabilitásának megváltozásához és szerkezetalakító szerepük is lehet.

Ha például egy aminosavtag nagy térigényű oldallánccal rendelkezik (leucin, triptofán, fenilalanin), annak jelenléte csökkentheti a komplexek termodinamikai stabilitását és a szerkezet torzulását is okozhatja.

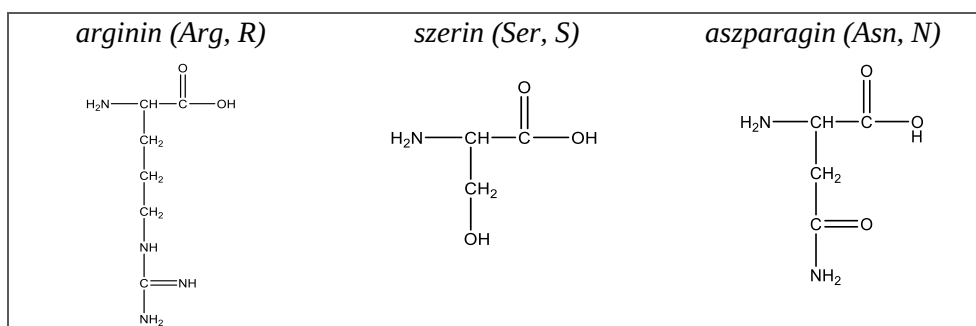
Másfelől bizonyos nemkovalens jellegű kölcsönhatások is elősegíthetik a különböző részecskék stabilitásának növekedését vagy stabilizálhatják a komplex adott szerkezetét. Például a prolin esetében (szekunder amincsoportja révén) lehetetlen az amidcsoport deprotonálódása és koordinációja, ezért a prolin helyén töréspont lehet a komplexképződési folyamatban.

2.4.2. Gyengén koordinálódó oldallancok

A természetes aminosavakból felépülő peptidek többsége a vizsgált fémionok tekintetében ebbe a csoportba sorolható. Ide tartozik a szerin, a treonin, valamint a tirozin fenolos OH-csoportja, és ezek mellett az aszparaginsav és a glutaminsav oldalláncbéli karboxilcsoportja is.

Úgyisintén ebbe a csoportba soroljuk az aszparagin és glutamin oldalláncának végén található amidcsoportokat, a tioétercsoportot a metioninban, az aminocsoportot a lizinben, illetőleg az arginin oldalláncbéli nitrogéndonor csoportjait.

Az eddigi szakirodalmak alapján ezek egyikének a jelenléte sem okozott drámai változást a fémionkomplexek termodinamikai stabilitásában, illetőleg a szerkezetüket sem módosítja nagyobb mértékben. Ezen hatások mértéke ugyanakkor függ a szekvenciától és a fémion minőségétől.



5. ábra: A poláris aminosav tagok szerkezeti képletei

2.4.2.1. Az arginin és az arginintartalmú peptidek

Az arginin aminosavhoz (5. ábra) két pK érték rendelhető; a karboxilcsoport és az aminocsoport deprotonálódási állandói. Oldalláncában egy nagy térkitöltésű ún. guanidincsoport található, mely savassága igen kismértékű, pK értéke ennek megfelelően 14-nél nagyobbak adódik.^{118,119} Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy jelentős ellentmondás van a szakirodalomban a guanidincsoport pK értékét illetően, hiszen igen eltérő, 11–15 közötti értékeket is találunk. Az állandó

pontos ismerete azért volna fontos, mert az oldalláncnak feltehetően hatása lehet az aminosav komplexképző sajátságaira.

Mivel az arginin *mint aminosav* a mérhető pH-tartományban két disszociábilis protont tartalmaz, ennek köszönhetően a fémionokat kétfogú ligandumként koordinálhatja, ekkor öttagú, glicintípusú kelátgyűrű képződik.

Az *arginintartalmú peptidek* koordinációs kémiája ugyanakkor az egyik legkevésbé jól körülírt, az irodalomban ide vonatkozóan csak néhány eredmény áll rendelkezésünkre. Az oldallánc komplexképzésben betöltött szerepét csak bizonytalanul, sőt ellentmondásokkal írják le. Egyre inkább az arginin szerkezetalakító szerepe kerül előtérbe, mely a másodlagos kölcsönhatásokból fakad.

Az utóbbi években biokémiai jelentősége miatt egyre több tanulmány jelent meg, amelyekben az arginin fehérjékben betöltött szerepét tanulmányozzák. Bizonyos másodlagos kölcsönhatásoknak a fehérjék aminosav tagjai között nagy szerepe van a molekuláris felismerésben, az enzimátikus reakciókban és a fehérjék struktúrájának stabilizálásában. A DNS-szál replikációja során a genetikai információ átadását szabályozó „*cink-ujjak*” is tartalmaznak arginint.¹²⁰ A HIV vírus sejtfalán lévő receptorok működésében pedig szintén kimutatható az arginin guanidinocsoportja és a karboxiláts csoport közötti másodrendű kölcsönhatás, mely a molekuláris felismerés fontos lépéseként ismert.¹²¹

Ezekhez a tulajdonképpen másodrendű kölcsönhatásokhoz képest érdekes eredményre bukkantak egy *hepatitis B vírus*-fehérje szintetikus analógjának vizsgálatakor. Abból eredően, hogy a peptid szekvenciája (QDPR) nem tartalmaz erősen koordinálódó horgonycsoportot, azt feltételezték, hogy az aminos csoport és peptidvázbeli amidcsoportok szolgáltatják az elsődleges kötőhelyet. Ezzel szemben a Cu(II)-ion és az oldalláncbeli ún. guanidinocsoport részvételével létrejött töltésátviteli komplex jelenlétét tapasztalták.¹²² Ezt a szokatlan eredményt egy specikus szekvenciának, az -DPR- egységnek tulajdonították.

Zoruddu és munkatársai az Ac-TRSRSHTSEGTRSR¹²³ peptidet vizsgálták Cu(II)- és Ni(II)-ion jelenlétében. Eredményeik azt mutatták, hogy a Cu(II)-komplexek esetében már pH~9 fölött, a Ni(II)-komplexeknél pedig a 10-es pH-t követően deprotonálódik az arginin guanidino oldallánca. A deprotonálódási állandó kisebbnek adódott a szabad ligandumra jellemzőnél, ezt a hatást a fémion és az oldallánc között kialakult kölcsönhatással értelmezték.

Puspita és munkatársai¹²⁴ az NH₂-RD-OH, NH₂-RE-OH, NH₂-RG-OH, NH₂-KD-OH, NH₂-KE-OH, NH₂-KG-OH, NH₂-GD-OH, NH₂-AG-OH, NH₂-GE-OH, NH₂-GG-OH dipeptidek Cu(II)-komplexeit vizsgálták röntgenkristallográfiás, pH-potenciometriás és spektroszkópiás módszerekkel. Azt találták, hogy a guanidinocsoport a láncban található aszparaginsav és a glutaminsav karboxiláts csoportjával hidrogénkötéseket létesít, így jelentősen megváltoztatja a komplexnek és magának az egész peptidnek a szerkezetét egyaránt.

Más közleményekben az [Arg⁸]-vazopresszin és az [Arg⁸]-vazotocin Cu(II)- és Ni(II)-komplexeinek stabilitását vizsgálták.^{125,126} Itt azonban az arginin deprotonálódását és koordinációját nem mutatták ki, ehelyett a négynitrogénes

komplexek nagy stabilitását a diszulfidhidak stabilizáló szterikus hatásával magyarázták.

Egy szintén arginint is tartalmazó polipeptid¹²⁷ ($\text{NH}_2\text{-NSFRY-NH}_2$) és mutánsainak¹²⁸ ($\text{NH}_2\text{-ASFRY-NH}_2$, $\text{NH}_2\text{-NAFRY-NH}_2$, $\text{NH}_2\text{-NSARY-NH}_2$, $\text{NH}_2\text{-NSFAY-NH}_2$, $\text{NH}_2\text{-NSFRA-NH}_2$) tanulmányozása során azt találták, hogy a képződő négynitrogénes komplex nagy stabilitását a koordinációban részt nem vevő oldalláncok (aszparaginil, szeril, fenilalanil, arginil, tirozinil) együttes (elektrosztatikus, hidrogénkötések általi és a gyűrűt stabilizáló) hatása által létrehozott speciális „környezet” eredményezi.

A biokémiai folyamatokban ismert ilyen jellegű hatás. Például az Asp102, a His57, és a Ser195 oldalláncok (az ún. katalitikus triád) a kimotripszinogén-kimotripszin konformációs átalakulást követően térben közelebb kerülnek egymáshoz. Az Asp102 és a His57 oldalláncok közötti hidrogénhidkötés megnöveli a His57 bázikusságát, s ezért az protont von el a Ser195 oldalláncától, ezáltal aktiválódik a Ser195 oldallánc és parciális negatív töltése által megtámadhatja a szubsztrát parciálisan pozitív töltésű karbonil széncentrumát.

Mindezek tudatában kutatócsoportunkban azt feltételezték, hogy patkány amilin szekvenciájában a hisztidin helyén található arginin horgonycsoportként funkcionálhat a hisztidinhez hasonlóan.

Ennek alátámasztására szisztematikus vizsgálatokra került sor arginintartalmú peptidekkel,⁸⁷ melyek terminális aminosocsoporttal rendelkező egy, illetve több arginint tartalmazó peptidek voltak, illetve tanulmányozták az acil védőcsoporttal ellátott arginint is. A kapott stabilitási állandókból és a spektrális eredményekről arra következtettek, hogy az arginintartalmú peptidekkel képződő komplexek kötémódja megegyezik a koordinálódó oldalláncot nem tartalmazó megfelelő glicinszármazékok esetén leírtakkal.

Ennek alapján látható, hogy az arginin *nem*, vagy *önmagában nem* felelős a rIAPP (17-29) sajátos természetű fémmegkötő képességéért.

2.4.2.2.. A szerin és a szerintartalmú peptidek

A szakirodalmi tapasztalatok és adatok alapján nagy általánosságban elmondható, hogy a szerin és a treonin alkoholos hidroxilcsoportja közvetlenül nem vesz részt a fémion megkötésében. Akárcsak az arginin, a szerin aminosav is mindössze két disszociálabilis protont tartalmaz a mérhető tartományban.

A *szerin aminosav* (5. ábra) oldalláncában lévő alkoholos hidroxilcsoport savassága szintén igen kicsi, pK értéke meghaladja a 14-et. Az alkoholos OH-csoport induktív effektusa révén azonban csökkenti az aminosocsoport bázicitását.

Koordinatív sajátságait illetően azonban jelentős egyet nem értés uralkodik a szakirodalomban. Az elérhető adatok alapján a Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionnal csak kissé hajlamos stabil kelátképzésre. A gyakorta képződő $[\text{ML}_2]$ összetételű komplexeknél változatos szerkezeteket azonosítottak. Előfordul, hogy az alkoholos hidroxilcsoport egyáltalán nem vesz részt a koordinációban,¹²⁹ de arra is találunk példát, hogy deprotonálódik és koordinálódik a fémionhoz.¹³⁰ Pettit és munkatársai ehhez hasonló koordinációs módot írtak le, ők úgy találták, hogy

egy koordinált vízmolekulához kapcsolódik hidrogénkötéssel a szerin alkoholos hidroxilcsoportja.¹³¹

Bázikus oldatban az alkoholos OH-csoport protonja ionizálódik a Cu(II)-szerin komplexben.¹³² Ezekben a szerin – CD spektroszkópiás vizsgálatok alapján *mint háromfogú ligandum* – $[\text{CuL}_2\text{H}_1]^-$ és $[\text{CuL}_2\text{H}_2]^{2-}$ összetételű komplexeket képez.

Szerint tartalmazó oligopeptidekben általában a megfelelő tagszámú glicintartalmú peptidekéhez hasonló komplexkémiaili viselkedést írnak le, ugyanakkor lehetnek olyan hatások és körülmények, melyek valamilyen mértékben hangolják ezeket a jól ismert folyamatokat.

Sigel és munkatársai kutatásaik során azt találták, hogy az OH-csoportot az N-terminuson tartalmazó dipeptidek $[\text{CuL}]$ komplexének stabilitása megnövekedett,¹³³ melyet a fémion és az OH-csoport axiális kölcsönhatásával magyaráztak, ráadásul az amidcsoport deprotonálódásának és koordinációjának elősegítésével csökkenti a pK_{amid} értéket.

Más potenciometriás és spektroszkópiás vizsgálatok is ugyanerre a következtetésre jutottak, és emellett leírták az alkoholos OH-csoport szerepét nagyobb pH-n lejátszódó folyamatokban.^{134,135,136} A kapott spektrális adatokat és a második amidnitrogén deprotonálódására vonatkozó kisebb pK_{amid} értéket a nemkoordinálódó karboxilátcsoport és az alkoholos OH-csoport között létrejövő hidrogénkötés okozta stabilizáló hatásnak tulajdonították.¹³⁶ Azt is kimutatták, hogy az aminos csoport és amidcsoport koordinációja révén képződő biszkomplex stabilisabb a $\text{NH}_2\text{--SG--OH}$ (N-terminális OH-csoport) esetében, mint a $\text{NH}_2\text{--GS--OH}$ dipeptidnél (C-terminális OH-csoport).¹³⁶ Ebből az N-terminális végén alkoholos OH-csoportot tartalmazó dipeptidek stabilitásnövelő hatása tűnik ki.

Ezek mellett a $\text{NH}_2\text{--GS--OH}$ ligandum deprotonálódott alkoholát-csoportjának részvételét írták le számos különböző Cu(II)-komplexben is.^{137,138}

Hasonló hatásról számoltak be a prion protein esetében is a különböző Met109Ser mutáns fragmensek Cu(II)-komplexeiben.

Ennél erősebb hatást tapasztaltak olyan Cu(II)-komplexek esetében, ahol a fémion indukálta az alkoholos OH-csoport deprotonálódását és koordinációját biszligandumú és kétmagvú komplexekben a pH 9 fölé¹³⁹, ugyanakkor arra nem találunk példát, hogy mindezen folyamatok a fiziológiás pH-tartományban is végbementek volna.

Kutatócsoportunkban az N- és C-terminális pozíciójú szerin oldalláncot (is) tartalmazó ($\text{NH}_2\text{--RS--OH}$, $\text{NH}_2\text{--SV--OH}$, $\text{NH}_2\text{--SS--OH}$) vizsgálata kapcsán sem tapasztaltak kiugró stabilitást, a dialaninnal ($\text{NH}_2\text{--AA--OH}$) megegyező összetételű komplexek képződtek, csak kismértékű stabilitásnövekedés volt megfigyelhető.¹⁴⁰

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy az eredmények nem mutatnak lényegi különbséget az egyszerűbb tripeptidekhez képest. Ugyanolyan összetételű komplexekkel írhatóak le, illetve ezek eloszlása, stabilitási állandói és spektrális sajátosságai is hasonlóak az egyszerű tripeptidekkel, a triglicinnel és trialaninnal kapott adatokhoz.

Így világossá vált, hogy a Cu(II)-ion esetében nem következtethetünk az OH-csoport jelentősebb szerepére, és az amilinnél korábban észlelt elváltozások sem értelmezhetőek csupán a szerin hatásával.

2.4.2.3.. Az aszparagin és az aszparagintartalmú peptidek

Ismert, hogy az aszparaginsavhoz (Asp) viszonyítva az aszparagin (Asn) gyengébb háromfogú ligandum, ez leginkább az oldalláncukban található karboxilcsoport és az amidcsoport eltérő koordinálóképességének tulajdonítható (5. ábra).

A kristályszerkezeti vizsgálatok azt mutatták, hogy az aszparagin aminosav a Cu(II)-, Zn(II)-ionnal kétfogú ligandumként glicintípusú biszkomplexekeket képez, illetve lehetséges még egy, az amidcsoport karbonilcsoportja és a szomszédos komplex fématomja között megvalósuló koordináció is.^{141,142} Ezek az eredmények azonban néha ellentmondóak, más közleményben a polimer szerkezet helyett egy tridentát koordinációt javasolnak.¹⁴³

A szakirodalom adatai alapján az aszparagin-Co(II) és az aszparagin-Ni(II) rendszerekben jelentékeny oldallánc kölcsönhatásra következtethetünk, ám a aszparagin-Cu(II) rendszerben ez a hatás csak igen csekély.¹⁴⁴

Kalorimetriás, UV-Vis, CD és NMR vizsgálatok viszont másutt azt mutatták, hogy az aszparagin oldallánc savamid csoportja koordinálódik a Cu(II)-, a Zn(II), a Ni(II)- és a Co(II)-ionhoz is. Ez a kölcsönhatás azonban eredményeik alapján gyengébb, mint ami az aszparaginsav esetében tapasztalható.

Az aszparagin oldalláncbeli amidcsoportjai nemkoordinálódó oldalláncokként ismertek a fiziológiás tartományban képződött komplexek esetében, de az is ismert ugyanakkor, hogy a fémion(ok) által indukált deprotonálódásuk és koordinációjuk erősen lúgos közegben végbemehet.

Gergely és munkatársai¹⁴⁵ vizsgálták a NH₂-GD-OH, NH₂-GG-OH és NH₂-GN-OH peptidek és a Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionok kölcsönhatását. Azt tapasztalták, hogy – bár a diglicinhez hasonló részecskék képződnek a semleges és enyhén lúgos pH-tartományban – mégis érvényesül az oldalláncok kismértékű stabilitásnövelő hatása, mely az aszparaginsav karboxilátcsoportjának esetében volt a legnagyobb a [CuL] komplexet illetően: NH₂-GA-OH < NH₂-GN-OH < NH₂-GE-OH < NH₂-GD-OH.

A Cu(II)-ion lúgos közegben hidrolízist szenved, azonban az NH₂-GN-OH ligandum esetében egy extra lúgfogyasztó folyamatot figyeltek meg, melyet az aszparagin oldalláncában lévő amidcsoport deprotonálódásának és ekvatoriális helyzetű koordinációjának tulajdonítottak.

Martin és munkatársai ugyanerre az eredményre jutottak,¹⁴⁶ de azt is megállapították azonban, hogy a Ni(II)- és Zn(II)-ion esetében ugyanilyen folyamat nem megy végbe.¹⁴⁷

Ebben a fejezetben visszautalok egy korábban már bemutatott vizsgálatra az NH₂-NSFRY-NH₂ peptidre vonatkozóan, ott ugyanis az aszparagin oldallánc elektronszívó hatásának tulajdonították az aminos csoport kiugróan lecsökkent

deprotonálódási állandóját ($H_2L_{\text{pentaalanin}}:8,04$; $H_2L_{\text{NSFRY}}:6,44$).¹²⁷ Ugyanitt az egynitrogén komplexre gyakorolt stabilizáló hatását emelik ki.

Szintén az aszparagin oldallánc hatását emelik ki másutt,¹⁴⁸ ahol beszámolnak annak pH 10-12 körüli deprotonálódásáról és axiális koordinációjáról.

A szakirodalomban az oligopeptid-Cu(II) rendszerekben az aszparagin oldallánc deprotonálódását követő koordinációjára is találunk példát, melyet nem csak pH-potenciometriás, UV-Vis és CD spektroszkópiás adatokkal, hanem NMR mérésekkel is bizonyítottak.¹⁴⁹ Ebben az esetben a sialorphinban (NH_2 -QHNPR-OH) és analógjában (NH_2 -p-QHNPR-OH) pH ~ 12 körül az aszparagin oldalláncok amidcsoportja is koordinálta a fémiont.

Az, hogy a lúgos tartományban az aszparagin oldalláncbéli amidcsoportja részt vesz a koordinációban, nem új a szakirodalomban, viszont arra vonatkozóan, hogy fiziológiás körülmények között, vizes közegben és a hasnyálmirigy szöveteiben uralkodó 8-9-es pH-tartományban szerepet játszhat-e az aszparagin oldallánca, nemigen találunk példát.

Az N- és C-terminális helyzetű aszparaginoldallánc szerepét tanulmányozták az NH_2 -NV-OH, NH_2 -VQ-OH illetve a NH_2 -VN-OH dipeptid vizsgálatával, melyek esetében mind a pH-potenciometriás, mind a spektrofotometriás vizsgálatok is csak az egyszerű dipeptidokkal megegyező koordinációs módot mutatták.¹⁵⁰

Mindhárom oldallánc esetében jól látszik az adatokból, hogy lényegében sem az arginin, sem a szerin, sem pedig az aszparagin nem okoz jelentékenyebb stabilitásnövekedést.

2.4.3. A hisztidintartalmú peptidok koordinációs kémiája

Minthogy a hisztidin szerepe létfontosságú az élettani folyamatokban, emiatt szerepét és koordinációs-, illetve komplexkémiailag tulajdonságát széleskörűen tanulmányozták már.^{107,92,93,151,152,153}

Az egy hisztidint tartalmazó, szabad aminotermínusú peptidkomplexekben két horgonycsoport is található, a szabad N-terminuson az aminocsoport és az imidazolgyűrű nitrogénatomja(i).

N-terminális hisztidin jelenlétében egy stabilis 6-tagú kelátgyűrű alakulhat ki az imidazolnitrogén (N3) és a terminális aminocsoport részvételével.

Az ilyen típusú kölcsönhatás igen megnöveli a mono- és biszkomplexek termodinamikai stabilitását, valamint visszaszorítja az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját.^{92,154,110}

Ezt a koordinációs módot hisztaminszerűnek nevezzük, melyben Cu(II)- és Ni(II)-komplexek esetében a fémion-ligandum aránytól függően képződő $[ML]$ és $[ML_2]$ összetételű komplexekkel írható le a rendszer.

Ha a hisztidin a második helyen áll, már van lehetőség a deprotonálódott amidnitrogénhez történő koordinációra is, de a hisztidin tagot követő amid deprotonálódását továbbra is meggátolja annak jelenléte. Ilyen peptideknél nem csak a Cu(II)- és Ni(II)-ionok képesek előidézni az amidcsoport deprotonálódását és koordinációját, hanem pH 7,0 körül a Zn(II)-ionok is.^{155,156}

A hisztidint harmadik helyen tartalmazó peptidek kiemelkedő Cu(II)- és Ni(II)-ion megkötő képességükről ismertek, ezeket albumin modellnek vagy ATCUN motívumként (*Amino Terminal Cu and Ni binding Site*) is nevezik, élettani jelentőségéből fakadóan számos közlemény jellemzi.^{157,158,159} A fiziológiás pH-tartományban az amidnitrogének párhuzamosan lezajló deprotonálódásával és koordinációjával (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakulhat ki. Az ebben a pH-tartományban uralkodó mennyiségben jelen lévő (NH₂,2N⁻,N_{im}) koordinációjú [CuH₂L] és [NiH₂L] összetételű részecskének kimagasló a stabilitása.^{160,161}

A kötémódot kristályszerkezeti vizsgálatok is alátámasztották.¹⁶² A Zn(II)- és Co(II)-komplexek körében viszont még nem mutatták ki az előbbi kiemelkedő stabilitású kötémódot.

Ha a hisztidin a 4. vagy ennél távolabb eső pozícióban szerepel a ligandumban, akkor gyengén savas pH-tartományban egy ún. makrokelát szerkezet az uralkodó (NH₂, CO, N_{im}) kötémóddal.¹⁶³

Azt azonban hozzá kell fűznünk, hogy a makrokelát méretének növekedése csökkenti a komplex stabilitását. A pH emelésével mind a Cu(II)-,¹⁶⁴ mind a Ni(II)-komplexek¹⁶⁵ esetén végbemegy az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja, így [MH₁L], [MH₂L]⁻ és [MH₃L]²⁻ összetételű komplexek keletkeznek (M=Cu, Ni).

A deprotonálódás elvileg mindkét terminus irányába végbemehet. Bár az irodalmi adatok nem egyértelműek, általánosan elmondható azonban, hogy kisebb tagszámú peptidek esetén (NH₂,3N⁻), míg nagyobb peptidmolekulák esetén (N_{im},3N⁻) koordinációs módot rendelték a megfelelő komplexekhez.¹⁵²

Az N-terminuson védett, egy hisztidint tartalmazó peptidkomplexekben a hisztidin oldallánca lehet az egyedüli horgony. Ilyen peptidek esetén Pd(II)-, Cu(II)- vagy Ni(II)-ion jelenlétében a peptidvázban lévő amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja az aminosavtagok minőségétől függően mind az N-terminus, mind a C-terminus irányába indulhat a koordináció, miközben hat- és héttagú kelátgyűrűk jönnek létre.

A gyűrűk méretének okán az N-terminus irányába történő koordináció a kedvezményezett.

A C-terminus irányába történő koordináció preferált viszont akkor, ha a hisztidin N-terminális helyen van (például Ac-HGGG¹⁶⁶ ligandum).

Másrészt az is ismert, hogy akkor is a C-terminus irányba történik meg a koordináció, ha a hisztidin egy olyan aminosavat követ, amelyben az amidnitrogén nem rendelkezik disszociálható protonnal (például prolin^{18, 167} vagy szarkozin¹⁶⁸).

3. CÉLKITŰZÉSEK

A szakirodalomban fellelhető adatok szerint a patkány és a humán amilin eltérő viselkedésében a szekvenciális eltéréseknek, poláris oldalláncoknak, különösképpen a poláris szerin- és/vagy az aszparagin-oldalláncoknak együttesen lehet jelentős szerepe. A Cu(II)-ion megkötésének pontos módja ugyanakkor mind ez ideig megválaszolatlan maradt, így ez további vizsgálatokat irányoz elő ebben a témakörben.

Munkám első szegmense a *patkány* amilin humán amilintól eltérő szakaszának (rIAPP 17-29) vizsgálata során nyert, korábbi irodalmi adatok kiegészítése volt. Az egyes oldalláncok szerepének és fémion megkötésének módját vizsgálendő rövidebb, terminálisan védett fragmensek és mutánsok pH-potenciometriás és spektroszkópiás vizsgálatát végeztem el.

További munkám során arra voltam kíváncsi, hogy az egyes oldalláncoknak számszerűsíthetően milyen és mekkora szerepe lehet a szokatlan komplexképzésben, emiatt elvégeztem néhány N-terminálisan nem védett patkány amilin fragmens szintézisét és fémionkomplexeiknek pH-potenciometriás és spektroszkópiás vizsgálatát.

Munkám harmadik szakaszában arra kerestem a választ, hogy más, erősen koordináló fémkötőhely mellett milyen szerepe lehet a poláris oldalláncok alkotta szekvenciaszakasznak a fémion, avagy egy második ekvivalens fémion megkötésében.

Ugyanezen fragmensek egy jelentős részét az egyes oldalláncok sajátos komplexkémiái szerepének felderítésére, illetőleg megerősítő és összehasonlító információk nyérésének céljából az élettani szempontból jelentős Ni(II)-ion és Zn(II)-ion jelenlétében is tanulmányoztam.

A negyedik vizsgálati csoportot a terminálisan védett *humán* amilin fragmensek képezték, melyek Cu(II)-komplexeinek tanulmányozásával szerettem volna választ kapni a patkány és a humán amilin eltérő koordinációs és plakkképzési hajlamának okaira.

Munkám során az emberi szervezetet jellemző vizes rendszerek tanulmányozására törekedtem minden vizsgálat esetében. Különösen érdekelt minket az, hogy a hasnyálmirigy pH-viszonyai között hogyan viselkednek és milyen szerkezetűek komplexeink, hiszen az irodalomban túlnyomórészt csak a vér pH-jára, illetve az emberi szervezetben elő nem forduló erősen lúgos közegben végzett adatok lelhetőek föl.

4. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK

4.1. A használt vegyszerek

A munkánk során tanulmányozott ligandumok szerkezeti képleteit, szekvenciáját és annak egybetűs rövidebb formuláit a 6/1-3. ábra szemlélteti.

A vizsgált peptidek egy részét (Ac-VRSSNN-NH₂, Ac-VRSS-NH₂, Ac-VASS-NH₂, Ac-VRAA-NH₂) egy nemzetközi együttműködés keretében Dr. Kállay Csilla állította elő az olaszországi Cataniai Egyetemen. A rIAPP (19-22) (Ac-SSNN) tetrapeptidet Dr. Timári Sarolta szintetizálta ugyanezen együttműködésben. Valamennyi peptid szilárdfázisú peptidszintézissel készült.

Az összehasonlítás céljából vizsgált egyszerűbb oligopeptideket (NH₂-SSS-OH, NH₂-AAAA-OH) kereskedelmi forgalomból, a Bachem cégtől szereztük be. Az Ac-AAAA-OH tetrapeptidet a szintén a kereskedelmi forgalomból beszerzett terminálisan nem védett tetraalaninból (NH₂-AAAA-OH) állítottam elő oldatfázisban, ecetsavanhidrid segítségével. A reakció teljességét ninhidrines próbával követtem.

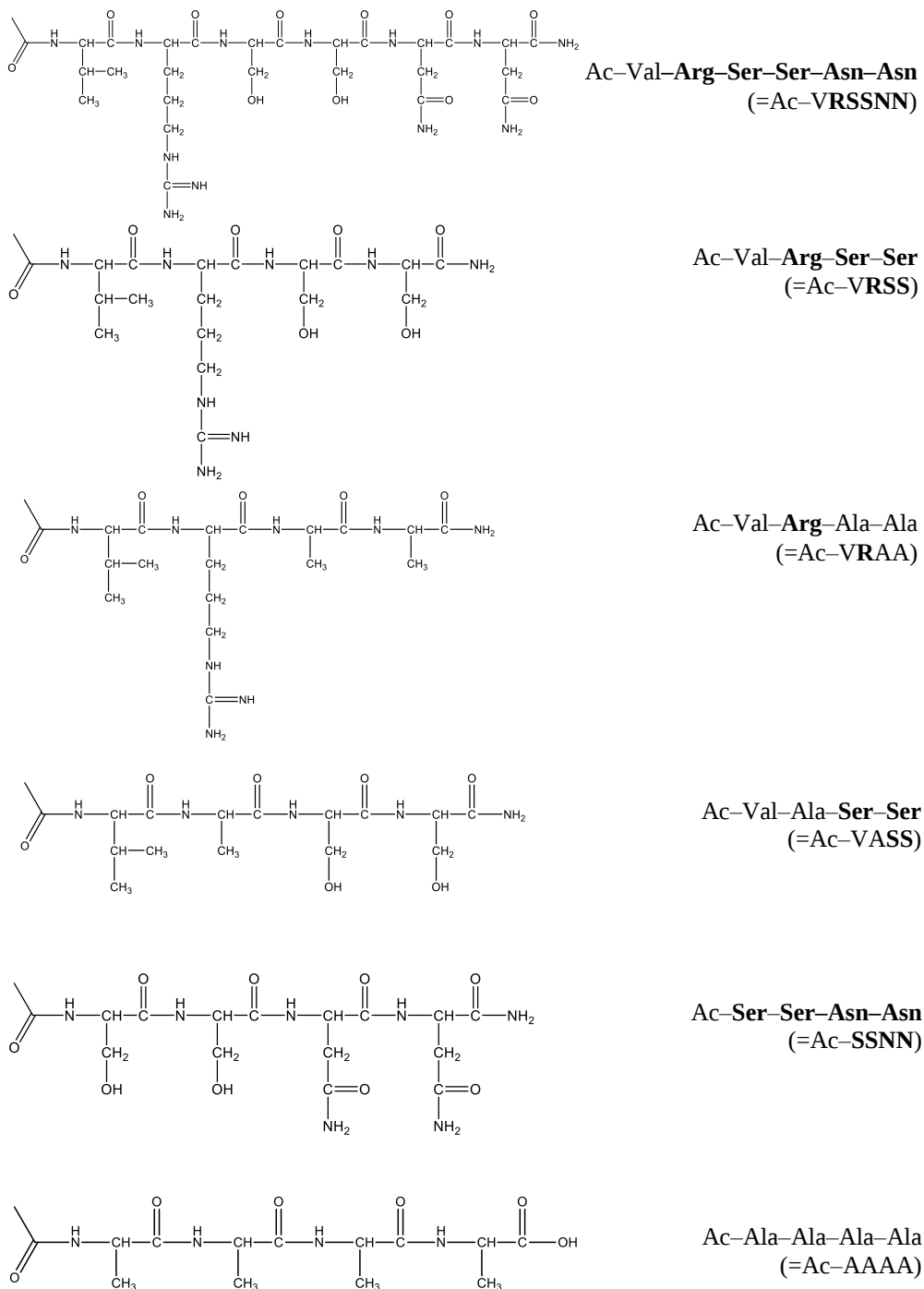
A fennmaradó tíz tanulmányozott peptidet (NH₂-VRSSNN-NH₂, NH₂-VRSS-NH₂, NH₂-VRAANN-NH₂, NH₂-VRSSAA-NH₂, NH₂-SSNN-NH₂, NH₂-SSNA-NH₂, NH₂-AANN-NH₂, NH₂-GGHSSNN-NH₂, Ac-AAAHSSNN-NH₂, Ac-AAAHAAAA-NH₂) pedig Debrecenben, a kutatócsoportban szintetizáltam ugyancsak szilárdfázisú peptidszintézissel egy Liberty 1 típusú készülék segítségével. *(A C-terminálisan védett peptidek esetében a savamid-csoport jelölését a továbbiakban elhagyom. Pl: Ac-VRSSNN)*

A CuCl₂, NiCl₂, ZnCl₂ és KOH oldatokat analitikai minőségű, a Reanal cég által gyártott vegyszerekből készítettük, a pontos fémion-koncentrációkat gravimetriásan oxinát formájában, a sav-, illetve a lúgkoncentrációkat pedig pH-potenciometriásan határoztuk meg.

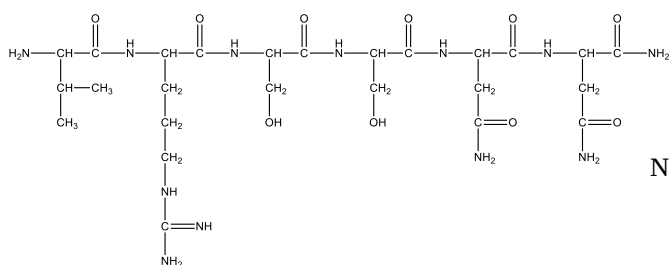
A titrálásokat ~0,2 mol/dm³, pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes, argon alatt készített és tárolt KOH-oldattal végeztük. Vizsgálataink során az állandó ionerősséget 0,2 mol/dm³ koncentrációjú KCl-oldattal biztosítottuk.

Az ESR spektroszkópiás vizsgálatokhoz a fém rezet (99,3% ⁶³Cu és 0,7% ⁶⁵Cu) Oroszországból vásárolták (Moszkva, JV Izoflex), melyet szulfát vegyületté alakítottak.

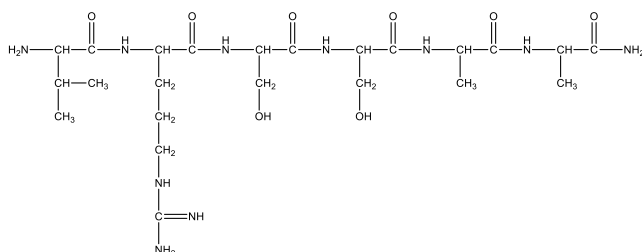
A Fmoc-védőcsoportot tartalmazó aminosavakat, a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborátot (TBTU) és N-hidroxi-benzotriazolt (HOBt) az InBios cégtől, a piperidint, a triizopropil-szilánt (TIS), az ecetsavanhidridet, az N,N-diizopropil-etilamint (DIEA), dietil-étert (Et₂O) és trifluor-ecetsavat (TFA) a Sigma/Aldrich-től rendeltük. Az N,N-dimetil-formamid (DMF), az acetonitril (ACN) és a diklórmétán (DCM) a Labscan Analytical Sciences író cégtől érkezett, a Novasyn TGR gyanta pedig a Novabiochem svájci cégtől.



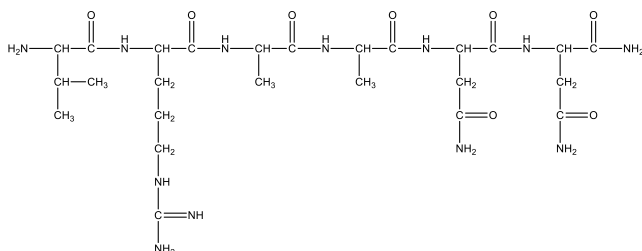
6/1. ábra: Avizsgált ligandumok szerkezeti képletei



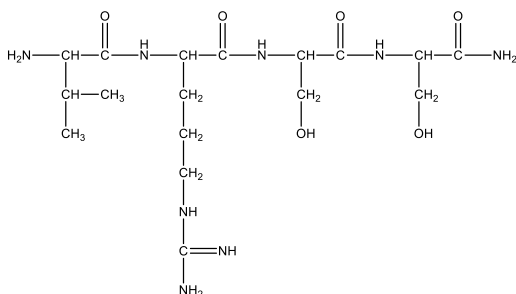
NH₂-Val-Arg-Ser-Ser-Asn-Asn
(=NH₂-VRSSNN)



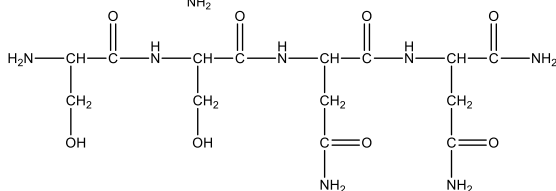
NH₂-Val-Arg-Ser-Ser-Ala-Ala
(=NH₂-VRSSAA)



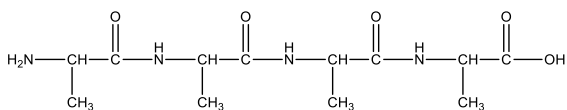
NH₂-Val-Arg-Ala-Ala-Asn-Asn
(=NH₂-VRAANN)



NH₂-Val-Arg-Ser-Ser
(=NH₂-VRSS)



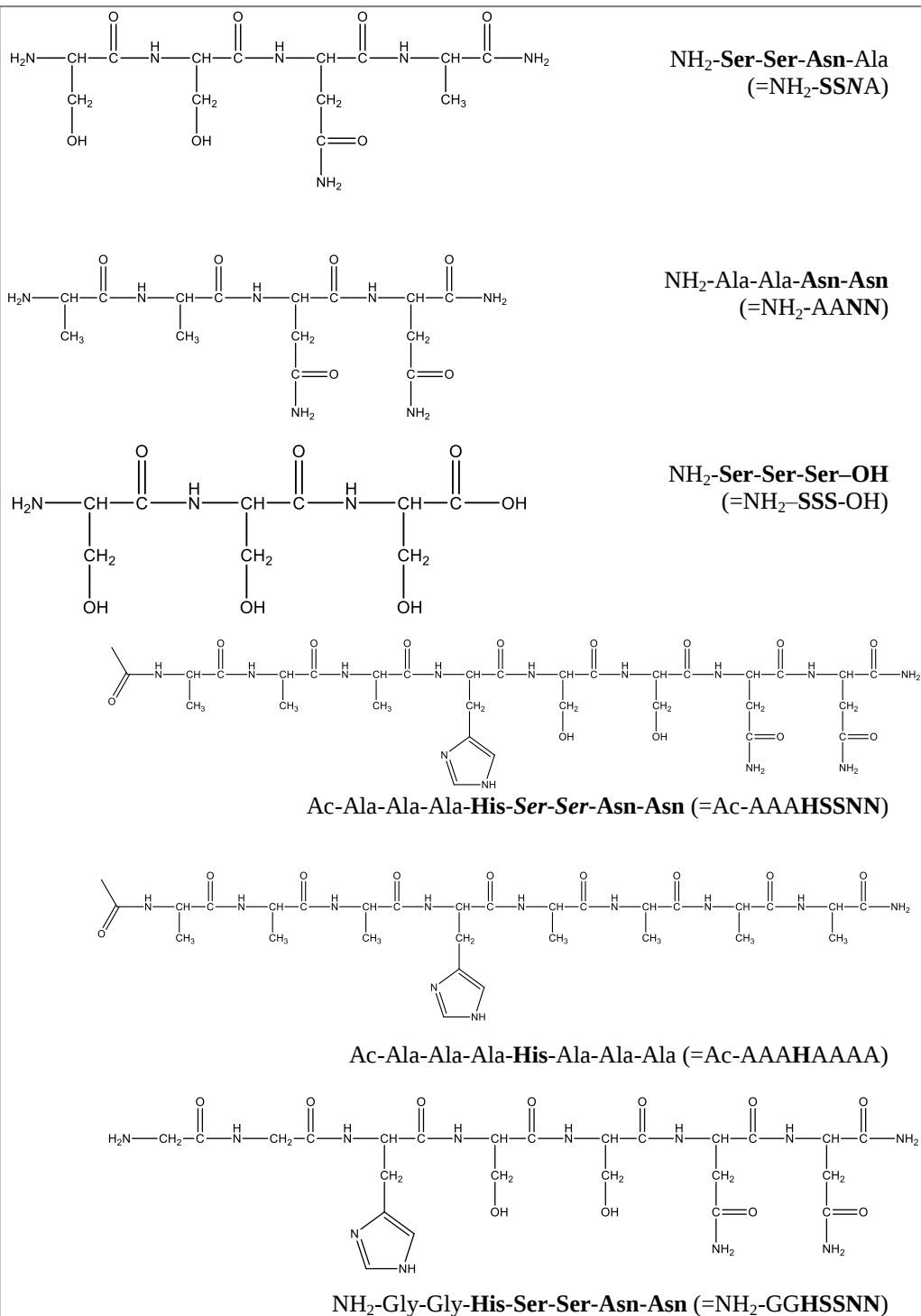
NH₂-Ser-Ser-Asn-Asn
(=NH₂-SSNN)



NH₂-Ala-Ala-Ala-Ala-OH
(=NH₂-AAAA)

6/2. ábra: Avizsgált ligandumok szerkezeti képletei

Amilinhormon fragmensek és mutánsok fémionkomplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata



6/3. ábra: Avizsgált ligandumok szerkezeti képletei

4.2. Vizsgálati módszerek

4.2.1. Szilárdfázisú peptidszintézis

Munkánk során az összes ligandum szintézisét automatizált módon, egy mikrohullámú Liberty peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) végeztük. Mind az olaszországi együttműködésben, mind pedig a kutatócsoportunkban a R. B. Merrifield által kidolgozott szilárdfázisú peptidszintézis módszerét alkalmazták/alkalmaztuk.

A szilárdfázisú szintézis nagy előnye, hogy a termék egy makropólusos (gél)mátrixhoz kötődik. Bár heterogén fázisú a reakció, és így elvben lassú, mégis számos előnye miatt igen hatékony módszer. Az így előállított termék hozama igen jó, a kapcsolt oldalláncok minőségétől függően esetemben a kitermelés 70-95% közé adódott. A könnyű feldolgozhatóság és automatizálhatóság is igen modern eljárásá teszi. Automatizálását a módszer ciklikus ismétlődése tette lehetővé.¹⁶⁹

Hátránya, hogy nagy reagens fölösleget igényel, melynek oka, hogy esetenként sem a kapcsolási reakció, sem a védőcsoport eltávolítása nem játszódik le teljesen, ezért kis mennyiségben hiányos szekvenciájú, illetve rövidebb peptidek is keletkezhetnek. Ezt leginkább a kapcsolási lépések ismétlésével, hosszabb reakcióidővel, vagy a reagensek nagy feleslegének alkalmazásával küszöbölhetjük ki.

A gyantaszemcsék felületén és azok belsejében olyan (gyártónként, termékenként meghatározott mennyiségű) funkciós csoportok vannak, amelyek lehetővé teszik, hogy a szemcsékhez aminosavakat kapcsolhassunk kémiai kötással. A szilárd hordozó szemcsemérete, alakja, homogenitása, duzzadási tulajdonsága és a funkciós csoport kiépítésének lehetősége mind-mind meghatározó a szintézis sikerességének szempontjából.

A peptidek előállítására munkám során Rink Amide¹⁷⁰ gyantákat használtam. Az első lépésben a peptid C-terminálisán lévő aminosavat kapcsoljuk fel kovalens kötással a gyantára. A további aminosavakat ehhez az aminosavhoz kapcsoljuk, így a növekvő peptid a szintézis végéig a szilárd hordozóhoz kötve marad.

Minthogy az aminosavak oldalláncaikban tartalmazhatnak olyan funkciós csoportokat, amelyek reagálnak a szintézis során, így szükség van ezek blokkolására, ellenkező esetben változatos összetételű melléktermékek keletkeznek. Olyan oldallánc-védőcsoportokat kell tehát alkalmazni, amelyek a szintézis során változatlanok maradnak, de a szintézis befejezése után könnyedén eltávolíthatóak. A szilárdfázisú peptidszintézisben két meghatározó védőcsoport kombináció terjedt el a legjobban. Ezek közül a legjobban automatizálható a *terc*-butil alapú oldallánc-védőcsoportokkal kiegészített 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) átmeneti α -aminocsoport védelem (Fmoc/tBu).^{171,172}

Munkám során az N-terminus védelmét Fmoc-technikával biztosítottuk. Az általunk használt aminosavakat és az alkalmazott oldallánc-védőcsoportokat a 7. táblázat foglalja össze.

7. táblázat: A felhasznált, védőcsoporttal rendelkező aminosavak

Aminosav	Oldaláncfunkció	Védőcsoport
hisztidin	imidazolil	tritol (Trt)
arginin	guanidino-	pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)
aszparagin	amid-	tritol- (Trt)
szérin	hidroxil-	<i>t</i> -butil (<i>t</i> Bu)

Az N-terminuson acilezett, illetve szabad aminocsoporttal rendelkező modellpeptideket Fmoc/*t*Bu technikával állítottuk elő, ehhez a C-terminuson amid végződést biztosító Rink Amide AM típusú gyantát használtunk, amely 1% divinil-benzollal térhálósított funkcionált polisztirol mátrixból áll.

Az aminosavak aktiválása a TBTU/HOBt/DIEA technika segítségével zajlott és a szintézisek során alkalmazott oldószer *N,N*-dimetil-formamid (DMF) volt.

A peptidszintézis lényegi lépései a következők voltak:

1. A Rink-amid gyanta Fmoc csoporttal védve kerül forgalomba, ezt a védelmet az első aminosav kapcsolása előtt el kell távolítani, melyet a készülék 20 % piperidin – 80 % DMF elegyben hajtotta végre (180 másodperc, 80°C) 30 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás segítségével.

2. A soron következő aminosav kapcsolása négyszeres aminosav-felesleg mellett, ugyancsak 80°C-on 30 W teljesítményű mikrohullám segítségével következett be 300 másodperc alatt. Ebben a lépésben az aminosavak aktiválására használt aktivátor 0,5 mol/dm³ HOBt és 0,5 mol/dm³ TBTU tartalmú DMF oldat, az aktivátor bázis pedig 2 mol/dm³ DIEA tartalmú NMP.

3. Az előző két műveletből álló ciklus addig ismétlődött, míg felépült a kívánt aminosav-szekvencia. A reagensek feleslege az egyes reakciók után többszöri oldószeres mosásokkal és szűrésekkel került eltávolításra.

4. Az N-terminuson acilezett modellpeptidek esetén még egy további lépés is szükséges volt; 6 V/V% ecetsavanhidridet és 5 V/V% DIEA-t tartalmazó DMF oldattal került sor az acilezésre, az N-terminus védelmére.

A peptid gyantáról való lehasítását szobahőmérsékleten végeztük 94,0 % TFA, 1,0 % DODT/EDT, 2,5 % TIS, 2,5 % H₂O elegyével 1-1,5 óra alatt.

Ezalatt nem csak a gyantáról való hasítás, hanem az oldalláncbeli védőcsoportok eltávolítása is megtörtént. A hideg, dietiléterben történő kicsapás után kaptuk meg a nyers termékeket. A csapadékot centrifugálással választottuk el és ülepítettük, majd újbóli hideg dietil-éterrel való mosást követően szárítás következett. Az így kapott anyagot 4 ml vízben feloldottuk, majd liofilizáltuk.

A nyers peptidek tisztaságát fordított fázisú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) technikát alkalmazva ellenőriztük, egy Jasco MD-2010 plus multiwavelength detektorral ellátott Jasco készülék segítségével. Az analízishez analitikai Vydac C₁₈ (300 Å pórusméret, 5 µm részecskeméret) 250×4,6 mm átmérőjű kolonnát és gradiens elúciót használtunk (az áramlási sebesség

1 ml/min volt). Az eluálószer 0,1 % TFA-t tartalmazó víz, illetve 0,1 % TFA-t tartalmazó acetonitril volt.

A detektáláshoz az amidesoport, mint kromofórcsoport elnyelését 222 nm hullámhosszon követtük. A jobb elválasztás érdekében a peptidek esetén célszerű gradiens elúciót alkalmazni. Lineáris elúciót alkalmaztunk, ahol az acetonitril tartalom 5 %-ról 15 %-ra nőtt tetrapeptidek esetén, illetve 3 %-ról 40 %-ra az oktapeptidek esetén, a tridekapeptid esetén pedig 40 perc alatt 3 %-ról 13 %-ra.

A peptidek tisztaságát HPLC-vel, ESI-MS analízissel és pH-potenciometriával is ellenőriztem.

4.2.2. A pH-potenciometria

Munkánk során valamennyi ligandum esetében az első alkalmazott technika a pH-potenciometriás módszer volt, mely az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatának legáltalánosabb kísérleti módszere. A pH-potenciometriás mérések segítségével határoztuk meg a ligandumok protonálódási állandóit és a fémionkomplexek stabilitási állandóit, valamint ezzel a módszerrel határoztuk meg a ligandumok hatóanyagtartalmát is.

A módszer alkalmazhatóságának feltétele, hogy a ligandum és a fémion közötti komplexképződés pH-effektussal járjon. Mivel a ligandum gyenge bázisnak tekinthető, ezért a komplexképződés kompetitív reakciót jelent a H^+ -ion és a fémion között. Ennek eredményeképpen a pH-potenciometriás pH-potenciometriás adatokból következtetni lehet a képződő komplex(ek) stabilitására. A komplexképződésre az alábbi általános egyensúly írható fel:



M : fémion,

L : teljesen deprotonált ligandum

H : proton

p, q, r : sztöchiometriai együtthatók

β_j : a különféle molekulafajták bruttó stabilitási állandója

A komponensek stabilitási állandója mindig egységnyi. (*A részecskék töltését az egyszerűbb kezelhetőség miatt nem tüntettük fel.*)

A részecskék stabilitási szorzata a következő általános egyenlettel írható fel:

$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pL_qH_r]}{[M]^p[L]^q[H]^r} \quad (2)$$

Munkám során csak vizes közegben végeztem méréseket. Ilyen esetben a hidroxidion sztöchiometriai együtthatója hidrogénre -1 , az összes többi komponensre 0 . Ebből következően a hidroxidion képződési állandója megegyezik a vízionszorzattal ($K_w = [H^+][OH^-]$), melynek értéke a mi mérési

körülményeink között (298 K, $I = 0,2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ KCl}$) $\text{pK}_w = 13,756$. Ennek a figyelembe vétele szükségessé válik a titrálás lúgos tartományában.

A kísérleti adatokból a fémkomplexekre meghatározott stabilitási szorzatokat a PSEQUAD¹⁷³ nevű számítógépes programmal számítottuk ki. Az értékelések során komponensként szerepeltek: a fémion (M), a teljesen deprotonált ligandum (L) és a proton (H).

A mintához adott mérőoldat térfogat–pH kísérleti adatpárokon kívül bemenő adatként meg kell adnunk az asszociátumok (különböző protonáltsági fokú ligandum, $\text{M}_p\text{L}_q\text{H}_r$ fémkomplexek és hidroxokomplexek) számát, az asszociátumok összetételét, a komponensek kiindulási teljes koncentrációját, a minta kiindulási térfogatát, az ismert és az ismeretlen (közelítő) stabilitási szorzatokat, a mérőoldat koncentrációját, a vízionszorzatot és a műszer által kijelzett pH-értéknek egyensúlyi koncentrációval kifejezett pH-értékre történő átszámításához szükséges ún. Irving-féle¹⁷⁴ korrekciós tényezőt.

A program a keresett stabilitási szorzatokat az M, L és H komponensekre felírt anyagmérlegek (x–y egyenletek) megoldásával adja, ahol „n” a rendszerben képződő asszociátumok száma. A program a kiindulási adatok figyelembevételével, Newton-Raphson iterációval végzi a közelítést mindaddig, míg a mérőoldatra nézve a $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}})^2$ értéke minimumot ad („V”: a hozzáadott mérőoldat térfogata). Valamennyi megadott pH-értéknél kiszámolja az összes képződő részecske egyensúlyi koncentrációját és az adott pontokhoz tartozó standard deviáció értékét.

$$C_H = [H] + \sum_{i=1}^n r_i \beta_{pqr} [M]_i^p [L]_i^q [H]_i^r \quad (3)$$

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

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

Az iterációsorozat végén megadja a finomított stabilitási szorzatokat, a kísérleti és a számított titrálási görbék pontjaihoz tartozó $|V_{\text{mért}} - V_{\text{számolt}}|$ értékek átlagát (illesztési paraméter), és a kiválasztott komponensekre vonatkozóan kirajcolja az asszociátumok koncentrációeloszlási görbéjét a pH függvényében.

A dolgozatban különböző táblázatokban feltüntetett stabilitási állandók összesítésekor a zárójelben szereplő szám az állandó utolsó számjegyével azonos nagyságrend szerinti standard deviáció értékét jelöli.

A feltételezett asszociátumok egy adott összességét nevezzük a rendszer egy modelljének. Az a modell fogadható el, mely kémiai megfontolások alapján értelmezhető, és amelynél az illesztési paraméter a legkisebb.

A dolgozatban szereplő koncentrációeloszlási görbéket a SED¹⁷⁵ program Windows alatt futó változatával, a MEDUSA-val szerkesztettük meg a képződő komplexek összetételének és stabilitási állandóinak, és a komponensek koncentrációinak felhasználásával.

A ligandum-törzsoldatokat szilárd vegyszerek bemérésével készítettük el, ahol a teljes koncentráció 1×10^{-3} – 4×10^{-3} mol/dm³ koncentrációtartományba esett.

A törzsoldat koncentrációját és a ligandum protonálódási állandóit a SUPERQUAD¹⁷⁶ nevű számítógépes programmal számítottuk ki. A pH-mérő kalibrálására 0,050 mol/dm³ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldatot használtunk, amelynek pH-ja 298 K hőmérsékleten 4,005. Az állandó hőmérsékletet ultratermosztát biztosította.

Az oxigén kizárását az oldat fölé vezetett argongázzal oldottuk meg, míg a minta kevertetését mágneses keverőtest végezte. A titrálásokat kb. 0,2 mol/dm³-es, pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes, argon alatt tárolt KOH-oldattal végeztük. A mérőoldat koncentrációját szintén ismert koncentrációjú (0,050 mol/dm³) kálium-hidrogén-ftalát törzsoldat segítségével határoztuk meg. A minták készítéséhez használt HCl-oldat koncentrációját (~0,2 mol/dm³) a már ismert koncentrációjú KOH-oldattal való titrálásból számoltuk. A koncentrációk meghatározását a titrálási görbék Gran-féle linearizálásával oldottuk meg.

A minták állandó ionerősségét 1,0 mol/dm³ koncentrációjú KCl-oldat segítségével állítottuk be 0,2 mol/dm³-re. Ez az ionerősség ugyanis jóval nagyobb, mint a titrálandó oldat fémion- és ligandum-koncentrációinak összege, illetve megegyezik a mérőoldat koncentrációjával, így az ionerősség gyakorlatilag állandó maradt a mérés során. A fémion-ligandum arányt adott rendszertől függően 1:3 és 2:1 között változtattuk. A titrálások során fellépő térfogatnövekedést a kiértékelésre használt számítógépes program figyelembe vette.

A méréseket számítógép által vezérelt Mol-AcS mikrobüretta és MOLSPIN pH-mérő segítségével végeztük, amelyhez Metrohm 6.0234.110 kombinált üvegelektrodát használtunk. A lúgoldatot 1 cm³ vagy 0,5 cm³ végtérfogatú Hamilton fecskendővel adagoltuk.

A pH-potenciometriás mérések információt nyújtanak a képződő komplexek összetételére vonatkozóan. Arra azonban nem ad választ, hogy az adott sztöchiometria milyen donatoratomokhoz történő koordinációval valósul meg, vagy milyen a képződött komplexek geometriája.

A módszer hiányossága az is, hogy néha egy-egy rendszer több, kémiaiailag reális modellel is jól leírható, vagy két részecske képződése azonos pH-effektussal jár. Ilyen esetekben ezzel a technikával nem juthatunk egyértelmű következtetésre. Az előbbieken okán az oldategyensúlyi jellemzéshez más, szerkezeti információkat nyújtó vizsgálatok is szükségesek (pl. UV-látható spektrofotometria, CD, NMR vagy ESR spektroszkópia).

4.2.3. UV-látható spektrofotometria

Spektrofotometriás méréseinket 200-900 nm-es hullámhossz tartományban végeztük. A spektrumokat Hewlett-Packard HP 8453 típusú egysugaras, diódasoros, illetve Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras fotométereken, 1,000 cm-es küvettában vettük fel különböző pH-értékeken, különböző fémion-

ligandum arányoknál. Utóbbiakat minden esetben a pH-potenciometriás méréseink alapján választottuk meg.

A spektrumok kiértékelésével a képződött komplexek szerkezetére és a geometriájára tudunk következtetni.

A tetragonálisan torzult, oktaéderes szerkezetű komplexekben gyenge és erős terű ligandumokkal bár másképpen, de mindkét esetben négyfelé hasad az energiadiagram (a d^9 -elektronok energiaszintje oktaéderes térben kétfelé hasad a ligandum kristálytérerősségének megfelelő mértékben, majd a tetragonális torzulás mindkét energiaszintet újabb két-két szintre hasítja).

Az így létrejött négy (d_{xz} (d_{yz}) $\rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_z^2 \rightarrow d_{x^2-y^2}$) között háromféle energiájú d-d átmenetnek kellene megjelennie. Ezek az átmenetek gyakran összeolvadnak egyetlen elnyúltabb sávzá, és az energiájuk, illetve az intenzitásuk kiváltképp függ attól, hogy a ligandumnak hány donoratomja koordinálódik a fémionhoz (8. táblázat).¹⁷⁷

8. táblázat: A Cu(II)-komplexek spektrális paramétereinek függése a koordinált nitrogénatomok számától

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

Ezen kívül a $\lambda_{\max}$ értékeket befolyásolja a komplex pontos geometriája és a donoratomok kémiai minősége is. Ez utóbbinak a hatását Sigel és Martin, valamint Pettit és munkatársai¹⁷⁷ vizsgálták. Abban az esetben, amennyiben nincs számottevő axiális koordináció, a Cu(II) - komplexek várható abszorpciós maximuma a Sigel és Martin által felírt empirikus egyenlettel⁸⁸ (6. egyenlet) számolható. A számoláshoz szükséges donoratomok ún. hozzájárulási tényezőit (x_i) számos aminosav és peptid, nagyszámú spektrofotometriás mérései alapján határozták meg.

$$\lambda_{\max} [\text{nm}] = \frac{10^3}{1,18 + 0,052(\text{COO}^-) + 0,166(\text{NH}_2) + 0,200(\text{N} =) + 0,140(\text{Im})} \quad (6)$$

Az egyenlet alapján a vizes oldatban jelenlévő $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ ion négy ekvatoriális vízmolekulájának oxigén- vagy nitrogéndonorokkal történő szubsztitúciója az abszorpciós maximumot a kisebb hullámhosszak felé tolja el. Ez az effektus különösen nitrogéndonoroknál jelentős.

A fenti kvantitatív összefüggésből azonban nem minden esetben lehet egyértelmű következtetéseket levonni, hiszen az effektus nagysága a donoratom kémiai természetén kívül függ a kelátgyűrű méretétől, valamint a ligandumhoz kapcsolódó, de a koordinációban részt nem vevő szubsztituensektől is.

Emellett ezek az összefüggések axiális koordináció esetében sem alkalmazhatók, mivel ez a $\lambda_{\max}$ értékének vörös eltolódásához vezet.

A Ni^{2+} -komplexek két leggyakoribb koordinációs száma 6 és 4.

A 6-os koordinációs számú, *oktaéderes* komplexekhez három, viszonylag kis intenzitású d–d átmenet tartozik ($\epsilon_{\max} < 30 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$):

- 770 - 1430 nm (${}^3A_2 \rightarrow {}^3T_2$),
- 500 - 910 nm (${}^3A_2 \rightarrow {}^3T_1(F)$)
- 370 - 520 nm (${}^3A_2 \rightarrow {}^3T_2(P)$) hullámhossz tartományokban

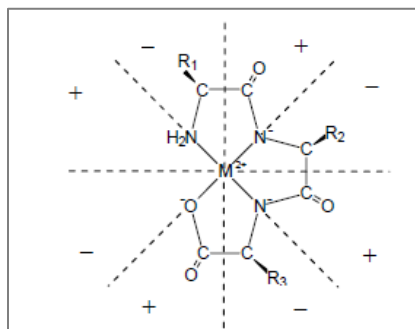
A fentiek mellett vállként jelenhet meg egy kisebb intenzitású, spin tiltott átmenet is a spektrumban. A 4-es koordinációs számú, *tetraéderes* Ni^{2+} -komplexek spektrumában az 500 - 900 nm hullámhossz tartományban már nagyobb intenzitású ($\epsilon_{\max} \sim 10^2 - 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) sávok is megjelennek.

A 4-es koordinációs számú, diamágneses sajátságú, *siknégyzetes* geometriájú komplexek 400–550 nm körül mutatnak egy meglehetősen intenzív sávot ($\epsilon_{\max} \sim 50 - 500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A spektrumban megjelenik egy töltésátviteli eredetű sáv is 430 nm alatt.¹⁷⁸

4.2.4. A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia egyike azoknak a spektroszkópiás módszereknek, amelyek a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapulnak. A síkban polarizált fény egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár összege. Az optikailag aktív anyagok abszorpciós koefficiense és törésmutatója különbözik a kétféle cirkulárisan polarizált fénysugár esetében, az anyagon áthaladva az abszorpcióban különbség adódik. Ezt az abszorpciós különbséget nevezzük cirkuláris dikroizmusnak (másként pedig Cotton-effektusnak). A cirkuláris dikroizmus görbét akkor kapjuk, ha a kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét ($\lambda_{\max} = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$) ábrázoljuk a hullámhossz függvényében. A CD görbe maximumai és minimumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz igen közel jelentkeznek, és viszonylag keskeny Gauss-görbék, ellentétben az elektrongerjesztési spektrummal.

A fémkomplexek optikai aktivitása a komplexmolekula aszimmetriájától vagy a ligandum saját – a komplexképződés előtt is meglévő – aszimmetriájából adódik. Ha a komplex optikai aktivitása a komplexképződés alatt alakul ki, akkor a komplexképződéssel a két enantiomer racém elegyét kapjuk, melyekhez ellentétes előjelű, azonos értékű Cotton-effektus tartozik, így kioltják egymást. Ezeket az enantiomereket csak kinetikailag inert komplexek esetében lehet elválasztani és vizsgálni.



7. ábra: A dupla-oktánnak a koordinációs sík feletti szektorai, illetve az azokban lévő csoportok Cotton-effektusának az előjele

A Cu(II)-, Ni(II)- és a Pd(II)- peptidkomplexeinek képződése jól vizsgálható CD spektroszkópiával. A különböző di- és tripeptidek tanulmányozása során bizonyos törvényszerűségeket figyeltek meg, amelyeket Sigel és Martin⁸⁸ foglalt össze.

Megállapították, hogy ezen peptidek komplexeinek CD spektrumai jól értelmezhetők az ún. dupla-oktán vagy hexadekán szabállyal. Eszerint ha a komplex koordinációs síkja alatti és feletti teret 8-8 szektorra osztjuk, és minden szomszédos szektornak ellentétes előjelet tulajdonítunk, akkor az adott szektorban található optikailag aktív csoport hatására bekövetkező Cotton-effektus előjelét a szektor előjele adja meg. Két szomszédos szektorban az előjel mindig ellentétes. Ennek segítségével magyarázható az a kísérleti tapasztalat, hogy valamennyi L-aminosavakból felépülő, csak nemkoordinálódó oldalláncot tartalmazó tripeptid [MLH₂] összetételű komplexének d-d átmenetéhez negatív Cotton effektus tartozik, hiszen az oldalláncok minden esetben olyan térrészbe esnek, amelyhez negatív előjel rendelhető (7. ábra).

A komplexek CD spektrumának másik jellemzője, hogy az egyes (nem koordinálódó) oldalláncok hatása összeadódik. Ezek alapján Sigel és Martin felírtak egy összefüggést, amelynek segítségével egy X-Y-Z tripeptid komplexének várható Cotton-effektusa adott hullámhosszon megadható:

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{X-Y-Z} = \Delta\epsilon_{\lambda}^{X-Gly-Gly} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{Gly-Y-Gly} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{Gly-Gly-Z}, \quad (7)$$

ahol $\Delta\epsilon_{\lambda}^{X-Y-Z}$ az adott X-Y-Z tripeptid MLH₂ komplexének λ hullámhosszon mért Cotton-effektusa.

Megállapították azt is, hogy a komplexben különböző helyzetben lévő, de azonos kémiai minőségű optikailag aktív csoportok különböző nagyságú Cotton-effektust eredményeznek:

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{Gly-X-Gly} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{Gly-Gly-X} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{X-Gly-Gly} \quad (8)$$

Ezt azzal magyarázták, hogy a központi fémionhoz mint kromofor csoporthoz kapcsolódó különböző donorcsoportok nem azonos hatásfokkal továbbítják a királis információt. Az általuk nyert információk alapján az alábbi sorrend adódott: *amidnitrogén* > *karboxiláttoxigén* > *aminonitrogén*.

A CD méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén egy JASCO J-810 spektrométeren végeztük. A spektrumokat szobahőmérsékletű vizes oldatokban vettük fel különböző pH-értékeknél és különböző fémion-ligandum arányokat alkalmazva. Méréseinkhez 0,1 és 1,0 cm úthosszúságú küvetákat használtunk, a spektrumokat 220-800 nm hullámhossz tartományban rögzítettük.

A kapott CD görbék elemzését egyrészt a gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő programmal végeztük, másrészt a CCA+ program segítségével az egyes komplexek egyedi spektrumát is meghatároztuk.

A spektrumok elemzésével a képződött komplexek szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donoratomok számára és kémiai jellegére lehetett következtetni.

4.2.5. A spektrumok kiértékeléséhez használt programok

A spektrumok kiértékeléséhez a CCA+ és a PSEQUAD programot használtuk.

A „Convex Constraint Analysis” (CCA+) program alapja, hogy a már meglévő spektrumsorozatot matematikai elven összetevőire bontja, így megkülönböztethetővé válnak a sorozatot meghatározó néhány komponens jellemző spektrumai. A spektrumok mellett bemeneti adatnak csak a fényelnyeléssel rendelkező részecskék számát szükséges megadni. A módszerrel egyedi spektrumok, eloszlási diagramok nyerhetőek.

A spektrumok kiértékelése során a PSEQUAD programot is használtuk adataink elemzéséhez. Ebben a programban több bemeneti adatot szükséges megadni, ugyanakkor több információt is szolgáltat. Az UV-Vis spektrumsorozat mellett a komponensek kiindulási koncentrációját, az oldat térfogatát, a hozzáadott lúg koncentrációját és térfogatát, valamint az oldatok pH-ját is bevittük a programba. A program segítségével viszont nem csak egyedi spektrumokat és eloszlási diagramokat, hanem az egyes komplexek stabilitási állandóit is meghatározhattuk.

4.2.6. ESR spektroszkópia

Az elektrospin-rezonancia spektroszkópia módszere olyan részecskék tanulmányozására alkalmas, amelyek párosítatlan elektront tartalmaznak, azaz paramágneses sajátságúak. A spektroszkópia másik neve, az elektron paramágneses rezonancia (EPR) is erre utal. A Cu(II)-ion paramágneses volta miatt ez a módszer kiválóan alkalmas komplexei vizsgálatára.

Az ESR spektrumok jellemzői közé tartozik a hiperfinom szerkezet. A szerkezet létrejöttének oka, hogy az a mágneses tér, amely a magok mágneses momentumától származik, hatással van a párosítatlan elektronok mágneses momentumára. Általánosan megállapítható, hogy egy I spinszámú mag a spektrumban $(2I + 1)$ számú, azonos intenzitású finomszerkezetet hoz létre. A Cu(II)-ionra az $I = 3/2$, ami azt jelenti, hogy a réz(II)komplexek esetén 4 vonalból áll a hiperfinom szerkezet. Az ESR spektrumok hiperfinom szerkezete alapján a komplexek szerkezeti változásaira lehet következtetni.

A komplexek ESR paraméterei (A_{II} és g_{II}) az alábbi összefüggések alapján számolhatók:

$$g_{II} = g_{II}^0 \frac{H_0}{H_{II}} \quad (7)$$

$$A_{II} [\text{cm}^{-1}] = \frac{g_{II} \cdot \mu_B \cdot a_{II}}{h \cdot c} \quad (8)$$

ahol H_{II} : a mintában mért mágneses térerő [Gauss]

H_0 : a standardra kapott mágneses térerő [Gauss]

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

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

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

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

A kiszámított paraméterekből a már ismert szerkezetű komplexek paramétereivel való összehasonlítás alapján a fémion körül kialakuló koordinációs módra és a koordinálódó atomok kémiai minőségére lehet következtetni.

A méréseket Olaszországban (*Department of Chemistry, University of Sassari*) a kutatócsoportunkkal szakmai együttműködésben álló bioszervetlen kutatócsoport tagjai végezték.

A spektrumokat Bruker EMX spektrométeren, etilén-glikol hozzáadása után 120 K hőmérsékletűre lehűtött oldatokban vették fel különböző pH-értékeknél, illetve különböző fémion/ligandum aránynál. A mérésekhez használt fémtrózsoldat ^{63}Cu izotópot tartalmazott, koncentrációja a mintában 5 mM volt. Külső standardként difenil-pikril-hidrazint használtak, melyre a $g_{\parallel}^0$ értéke 2,0028.

4.2.7. Disszociálabilis protont nem tartalmazó ligandumaink koncentrációjának meghatározása

Az amilinfragmensek koncentrációját pH-potenciometriás titrálással nem lehetett meghatározni, mivel a vegyületek a mérhető pH-tartományban nem tartalmaztak disszociálabilis protont (pl. terminális aminocsoportot, imidazolilnitrogént), így közvetett módon, UV-Vis spektrofotometriával határoztuk ezen tetrapeptidek koncentrációját. Ehhez egy, az irodalomban már leírt mérési eljárást alkalmaztunk.¹⁷⁹ A Ménagé és munkatársai által leírt módszer alkalmas guanidinocsoport tartalmazó peptidek koncentrációjának meghatározására. A meghatározás alapja, hogy az α -naftol bután-2,3-dion jelenlétében az argininnel adduktumot képez, amelynek 530 nm körül van abszorpciós maximuma.

Az „A”-oldat 100 ml-e 4 ml α -naftolt, 2,5 ml 1%-os buta-2,3-diont tartalmaz etilén-glikol-víz 1:1 arányú elegyében. A leírt módszer szerint, használat előtt az oldatot 60 °C-ra kell melegíteni. A mintaoldat összetétele a következő volt: a ligandum 0,25 ml térfogatú oldatához további 0,25 ml 2 M-os NaOH-oldatot és 0,5 ml „A”-oldatot adtunk. Ezt elegyítettük, majd szobahőmérsékleten 25 perc várakozási idő után hozzáadtunk még 2 ml etilén-glikol-víz (1:1) elegyet. Ezt követően felvettük a spektrumot.

A módszert ismert koncentrációjú peptidekkel ($\text{NH}_2\text{-RA-OH}$, $\text{NH}_2\text{-AR-OH}$, $\text{NH}_2\text{-RS-OH}$) standardizáltuk.

Az eljárás alkalmazása során számos problémával szembesültünk. Ez a módszer rendkívül érzékeny volt a mérési körülményekre. Emellett a reakció

időfüggést mutatott, így körülményes volt a kalibráló egyenes felvételéhez szükséges relatíve több, és egyenként is többkomponensű minta vizsgálata. A munka első felében optimalizáltuk a megvalósítás módját, így méréseink 5-10%-os pontossággal reprodukálhatók lettek. Ehhez elvégeztünk néhány gyakorlati szempontból szükséges mérést és ellenőrzést is. Ezek közül a legfontosabb, hogy a reagenseket azonos időközönként kellett a mintához adagolni.

Megállapítottuk a mérés optimális koncentrációtartományát, ez az $1 \cdot 10^{-5}$ – $3 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ tartományba esett. A továbbiakban olyan kicsire szűkítettük ezt a tartományt, hogy feltételezhetően lineáris legyen az abszorbancia-koncentráció összefüggés, és így interpolálással meghatározhatóak legyenek az amlinfragmensek koncentrációi.

5. A KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. A PATKÁNY AMILIN Cu(II)-IONKÖTŐHELYÉNEK MODELLEZÉSE

5.1.1. A patkány amilin védett fragmenseinek vizsgálata

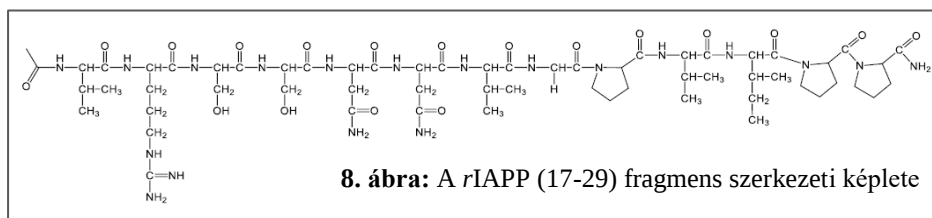
A szakirodalomban fellelhető adatok szerint a patkány és a humán amilin eltérő viselkedésében a szekvenciális eltéréseknek, poláris oldalláncoknak, különösképpen a poláris szerin- és/vagy az aszparagin-oldalláncoknak együttesen lehet jelentősebb szerepe. A Cu(II)-ion megkötésének pontos módja ugyanakkor mind ez ideig megválaszolatlan maradt, így ez további vizsgálatokat irányozott elő ebben a témakörben.

Munkám első szegmense a patkány amilin humán amilintől eltérő szakaszának (rIAPP 17-29) vizsgálata során nyert, korábbi irodalmi adatok kiegészítése volt. Az egyes oldalláncok szerepének és a Cu(II)-ion megkötésének módját vizsgálendő rövidebb, *terminálisan védett* fragmensek és mutánsok pH-potenciometriás és spektroszkópiás vizsgálatait végeztük el.

A 4.2.6. pontban leírt módszerrel meghatároztuk a védett, disszociábilis protonnal nem rendelkező fragmensek és ligandumok koncentrációját. Az ezzel a módszerrel nyert koncentrációadatokkal, valamint a Hyperquad, a Superquad, és a CCA+ program segítségével kiértékelhetővé vált oldategyensúlyi szempontból az összes olyan rendszer, melyekben a fémion koordinálódott a ligandumokhoz.

5.1.1.1. Patkány amilin (17-29): Új eredmények

A kutatócsoportunkban korábban végzett méréseket és eredményeket⁸⁷ több szempontból, illetve több technikával is kiegészítettük a rIAPP 17-29-es szakaszának koordinációs kémiai sajátosságainak feltérképezésére vonatkozóan. A tridekapeptid szerkezeti képlete a 8. ábrán látható.



A koncentrációk ismeretében már ki tudtuk értékelni a korábbi pH-potenciometriás adatokat. A Hyperquad programmal történő számolást követően a rIAPP (17-29) – Cu(II) rendszerek komplexképződési folyamatait a $[\text{CuLH}_2]$, $[\text{CuLH}_3]^-$ és $[\text{CuLH}_4]^{2-}$ összetételű részecskékkel írtuk le, az ezen komplexek stabilitását jellemző állandókat a 9. táblázatban foglaltam össze.

Egy olaszországi együttműködés keretében ESR adatokat is nyertünk, melyek világosan mutatták, hogy a komplexképződés valóban megindul pH 6 körül és a ligandum képes megkötni a fémiont a jól ismert horgonycsoportok hiányában is. Nem csak a „szabad” Cu(II)-ion jele, hanem a Cu(II)-komplexek jelei is láthatóak voltak a spektrumokban (10. táblázat, 9a. ábra).

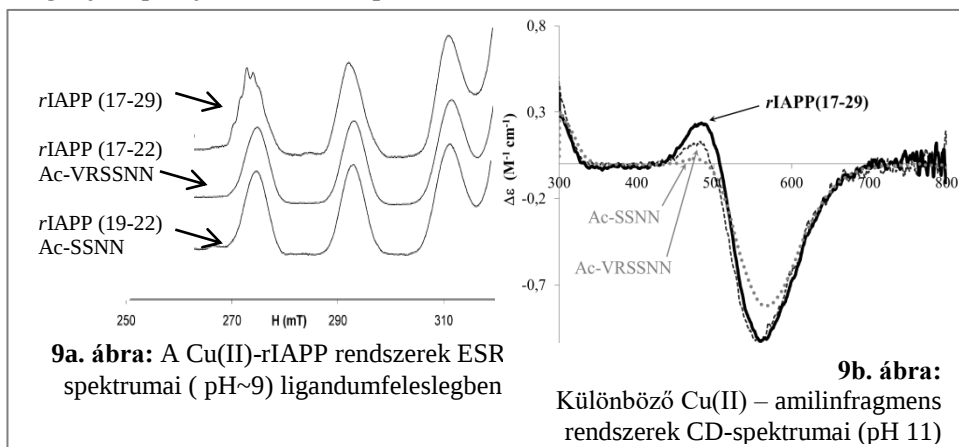
9. táblázat: A rIAPP (17-29) és fragmensek Cu(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\log\beta$), $I = 0,2 \text{ mol/dm}^3$ (KCl), $T = 25^\circ\text{C}$ (A zárójelben lévő értékek a standard deviációt mutatják.)

	rIAPP(17–29)	Ac–VRSSNN	Ac–SSNN
[CuH ₂ L]	–9,36(9)	–9,80(1)	–10,64(2)
[CuH ₃ L] [–]	–17,41(12)	–17,33(2)	–18,52(3)
[CuH ₄ L] ^{2–}	–26,18(12)	–26,64(3)	–27,95(4)

10. táblázat: A rIAPP (17-29) tridekapeptid, hexapeptid és tetrapeptid fragmenseinek ⁶³Cu(II)-komplexeire kapott ESR paraméterek (Az A_z értékek 10^{–4} cm^{–1} egységben értendőek.)

	Ac–SSNN		Ac–VRSSNN		rIAPP(17–29)	
	g _z	A _z	g _z	A _z	g _z	A _z
[CuH ₂ L]	2,238	194,5	2,234	195,7	2,234	200,7
[CuH ₃ L] [–]	2,225	189,3	2,223	191,1	2,230	194,8
[CuH ₄ L] ^{2–}	2,224	190,2	2,223	192,7	2,221	197,1

A korábbi pH-potenciometriás vizsgálatok és a titrálás során az volt a tapasztalat, hogy az oldat színe pH ~7 körül kékre változott, majd a 10-es pH értéket meghaladva már rózsaszínű lett. A jól követhető színváltozás ellenére az ESR paraméterek változása ebben a tartományban viszont csak kismértékű volt. A szuperhiperfinom csatolási állandó alapján 7-es pH körül a Cu(II)-ion két ekvivalens nitrogéndonorhoz koordinálódik. Ez a kettő azonban nem lehet peptidvázbeli (amid)nitrogén, hiszen azok ebben a pH-tartományban csak horgonycsoport jelenlétében deprotonálódnak.



A különböző pH-kon felvett spektrofotometriás spektrumokat a CCA+ programmal is felbontottuk és kiértékeljük. Mind az egyedi spektrumok, mind az eloszlási diagramok jó egyezést mutatnak a Hyperquad programmal nyert modellel, a rendszer mindkét módszerrel azonos módon volt leírható (9. és 11. táblázat).

11. táblázat: A rIAPP (17-29) és a fragmensek esetében képződő Cu(II)-komplexek UV-Vis paraméterei (CCA+ programmal nyert adatok)

	rIAPP(17-29)	Ac-VRSSNN	Ac-SSNN
[CuH ₂ L]	608/56	609/46	615/39
[CuH ₃ L] ⁻	577/120	576/122	577/104
[CuH ₄ L] ²⁻	540/94	540/97	538/110

12. táblázat: A rIAPP (17-29) és a fragmensek esetében képződő Cu(II)-komplexek UV-Vis paraméterei (Psequad programmal nyert adatok)

	Ac-VRSSNN	Ac-SSNN
[CuH ₂ L]	600/106	615/41
[CuH ₃ L] ⁻	575/120	580/110
[CuH ₄ L] ²⁻	540/112	540/98

Az erősen lúgos közegben felvett CD-spektrumot a 9b. ábra szemlélteti. A megjelenő új sáv (egy pozitív Cotton-effektus 480 nm körül) szokatlan szerkezetű Cu(II)-komplex(ek) képződésére, esetleg az oldalláncok koordinálódására utal.

A nyert ESR paramétereket összehasonlítva a már ismert modellek jellemző paramétereivel azt találtuk, hogy azok nincsenek jó egyezésben a [CuLH₂], [CuLH₃] és [CuLH₄] sztöchiometriával.

Figyelembe véve azonban azt is, hogy ez a rendszer jelentősen eltér a megszokott peptidek koordinációs kémiai viselkedésétől, és nincs is példa hasonlóan szabálytalan koordinációs kémiai viselkedésű más rendszerre, ezért nem igazán célszerű alapvetően más típusú rendszerekkel összehasonlítani, melyekben a peptidek jól ismert mintázat szerint viselkednek.

Érdekesebb kérdésnek mutatkozott azonban az előbb felsorolt összetételű Cu(II)-komplexek szerkezete. Sztöchiometriájuk alapján leginkább 2, 3, illetve 4 deprotonálódott funkciós csoportra és donoratomra következtethetünk, melyek az eddigi szakirodalmi tapasztalatok alapján leginkább amidnitrogének lehetnek, de az arginin/szerin/aszparagin oldalláncok bármelyikének közreműködése sem zárható ki.

Ha a poláris oldalláncok donorcsoportjainak deprotonálódását vizsgáljuk, akkor első megközelítésben a szerin OH-csoportjának deprotonálódása jöhet szóba. Aminocukrok esetében ugyanis már beszámoltak egy hasonló módon megvalósuló koordinációs módról; ugyanakkor abban az esetben a koordináció együttjárt a CD-spektrumban egy karakterisztikus töltésátviteli sáv megjelenésével a közeli UV-tartományban.

A Cu(II)-*rIAPP* rendszer spektrumaiban 320 nm körül látható egy ilyen sáv a $6 < \text{pH} < 8$ tartományban, amely származhat a szerin-Cu koordinációból is, viszont az így kialakuló kelátgyűrű miatt nem volna stabilis a komplex. A pH emelésével ez a sáv el is tűnik, így az erősen lúgos közegben jelenlévő $[\text{CuLH}_4]$ összetételű komplex esetében leginkább a négy nitrogéndonorral megvalósuló koordináció a legvalószínűbb.

Mindezen kérdések okán további vizsgálatok váltak szükségessé, és a rendszer jobb megértésének céljából az *rIAPP* (17-29) szekvencia rövidebb fragmenseinek vizsgálatát kezdtük el.

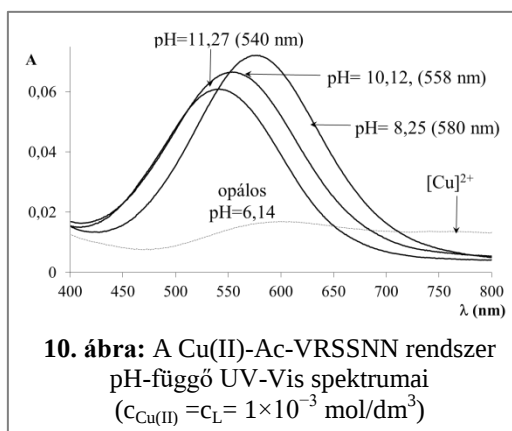
5.1.1.2. Az Ac-VRSSNN vizsgálata

Az Ac-VRSSNN hexapeptid fragmens a *rIAPP* (17-29) patkány amilin fragmensének az a szakasza, mely tartalmazza mind a háromféle poláris oldalláncot, de a 22-es tagot követő, zömében apoláris szekvenciaszakaszt már nem foglalja magába (6/1. ábra).

A hexapeptid-Cu(II) rendszer igen hasonló komplexkémiaili viselkedést mutatott a *rIAPP* (17-29) ligandumhoz. Akárcsak az utóbbi fragmens, az Ac-VRSSNN hexapeptid fragmens vizsgálata során is azt láthattuk, hogy 5-ös pH fölött megindult a komplexképződés, majd az oldat lila színű lett, illetve az abszorpciós maximumokhoz tartozó hullámhosszak fokozatosan a kisebb értékek felé tolódtak el (10. ábra). A pH = 6-8 közötti tartományban opálosodást, valamint kisebb mértékű csapadékképződést észleltünk, a csapadék azonban pH 8 fölött már teljesen visszaoldódott. Kb. 9-es pH-n a csapadék visszaoldódását és az oldat kitisztulását követően jelentős kék eltolódás volt megfigyelhető a spektrumokban. Az Ac-VRSSNN hexapeptid spektroszkópiás viselkedését tekintve is hasonlóságot mutatott a *rIAPP* (17-29) fragmenséhez. A spektrofotometriás spektrumokon 580 nm-es hullámhossz értéknél jelentkező abszorpciós maximum 3 amidnitrogén koordinációjára utalt (10. ábra).

Lúgosabb közegben (~ 10-es pH érték fölött) a spektrumok abszorpciós maximuma 540 nm-nél volt megfigyelhető, amely négy nitrogén koordinációjára utal.

A csapadékképződést leszámítva megállapítható, hogy mind az UV-Vis, mind a CD spektrumokat (11-12. táblázat) tekintve a hexapeptidfragmens viselkedése a *rIAPP* 17-29 fragmenséhez hasonlít, itt is megjelenik egy pozitív Cotton-effektus 480 nm körül (11. ábra).



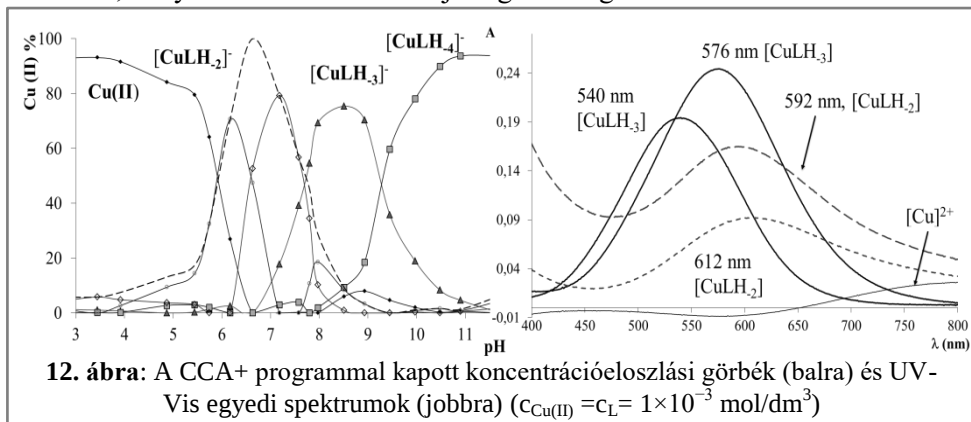
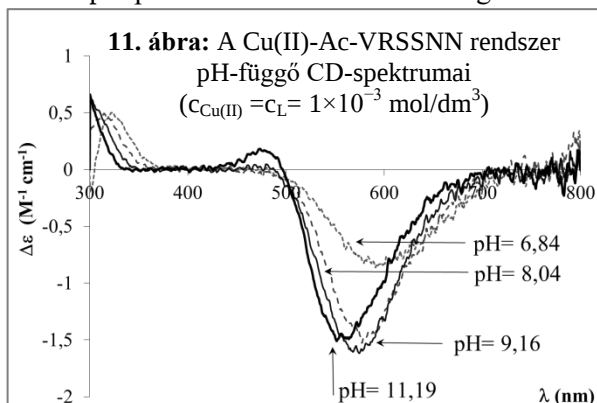
Az csapadék megjelenése miatt a pH-potenciometriás adatokat megbízhatóan nem lehetett kiértékelni a pH 6-8 tartományban, de az UV-Vis spektrumokat két számítógépes programmal is elemeztük (Psequad, CCA+).

A Psequad programmal az egyedi spektrumok mellett stabilitási állandókat is nyerhettük, melyek kiváló egyezést mutatnak a rIAPP (17-29) fragmens Cu(II)-komplexeinek megfelelő értékeivel (11. táblázat). Hasonlóan a rIAPP (17-29) fragmenshez szintén a $[\text{CuLH}_2]$, $[\text{CuLH}_3]$, és $[\text{CuLH}_4]$ sztöchiometriájú komplexekkel írhattuk le a legjobban a rendszert.

Az 12-13. ábrán azt is láthatjuk, hogy mindkét technikával jól egyező modellre következtethettünk. Ugyanezek az ábrák azonban az is kivehető, hogy a csapadékos tartományból származó adatok bizonytalanabbak, emiatt a $[\text{CuLH}_2]$ összetételű komplexekre nyert értékek (pl. ϵ_{max}) nincsenek jó egyezésben. A pH 9 fölötti tartomány elemzéséből kapott adatok azonban nagyon jól összevethetőek egymással.

Hozzá kell azonban azt fűznünk, hogy bár csak a fenti három komplexszel számoltunk a modellben, a szakirodalmi tapasztalatok alapján – és figyelembe véve a fémionnak a gyengén savas pH-tartományban történő oldatban tartását – egy $[\text{CuL}]$ összetételű részecskének is kellene képződnie. Ugyanakkor a $[\text{CuL}]$ komplexnek mind a pH effektusa, mind az UV-Vis effektusa igen kicsi, valamint az Ac-VRSSNN-Cu(II) rendszerben úgy tűnik, kisebb a kölcsönhatás a fémion és a ligandum között, ezért válik dominánssá a hidrolízis. Nagyobb pH-n a koordinációs mód megváltozásának következtében ez a csapadék feloldódik.

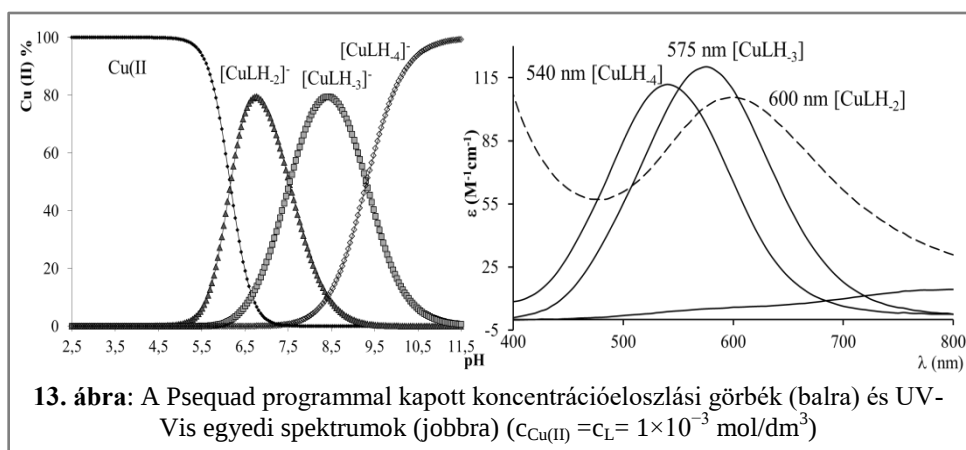
A 10. táblázatból az is nyomon követhető, hogy az ESR paraméterek ugyancsak jó egyezést mutatnak a rIAPP (17-29) fragmens komplexeinek értékével, mely hasonló szerkezeti sajátosságokra enged következtetni.



Ezen eredmények alapján tehát jól látszik, hogy a rIAPP (17-29) és a rIAPP (17-22) (Ac-VRSSNN) között igen nagy az egyezés, tehát a fémionmegkötés szempontjából a kötőhelynek a –VRSSNN– domén alkalmas modellje.

Figyelembe véve, hogy a rIAPP (1-37) szekvenciája képes kölcsönhatni a Cu(II)-ionnal, de az irodalomban egyelőre nem lelhető fel információ arra vonatkozóan, hogy pontosan hogyan és miért is képes erre, ezért figyelmünk az egyes poláris oldalláncok hatásaira/részvételére irányult. *Az egyértelműen látszik eredményeinkből, hogy ebben a ligandumban is lehet egy szokatlan, eddig nem ismert horgonycsoport a tizenháromtagú patkány amilin fragmenshez hasonlóan.*

Minthogy az irodalmi ismereteink szerint ezek az oldalláncok külön-külön (tehát ha egyedül vannak jelen) nem képesek oldatban tartani a fémiont (**2.4.2. fejezet**), ezért a domén hosszát tovább csökkentettük, és két-két, illetve egyféle poláris oldallánc szerepét is tanulmányoztuk az Ac-VRSSNN fragmenseinek és bizonyos mutánsok vizsgálatával. Előállítottuk az Ac-VRSS és az Ac-SSNN fragmenseket, melyek kétféle poláris oldalláncot tartalmaznak és a –VRSSNN– domén két terminusát modellezzik. Szintetizáltuk az Ac-VRAA és Ac-VASS mutánsokat is annak céljából, hogy az arginin- és szerin-oldalláncok szerepével kapcsolatban további információkat nyerjünk.



13. ábra: A Pseudoad programmal kapott koncentrációeloszlási görbék (balra) és UV-Vis egyedi spektrumok (jobbra) ($c_{\text{Cu(II)}} = c_L = 1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

5. 1. 1. 3. Az Ac-VRAA és az Ac-VASS vizsgálata

A rövidebb fragmensek és mutánsok vizsgálatát a címben szereplő két tetrapeptid tanulmányozásával kezdtük. Szerettük volna megtudni, hogy az arginin- és a szerin-oldalláncnak egymáshoz képest milyen a hatása a komplexképzésre ezen tetrapeptid esetén. Ezért vizsgáltuk meg az Ac-VRSSNN N-terminusának két olyan mutánsát, amelyben az arginint, illetve a két szerint alaninra cseréltük. Az így előállított Ac-VASS és az Ac-VRAA ligandumok szerkezete a 6/1. ábrán látható.

A két peptid–Cu(II) rendszer titrálása során a fiziológiás pH-tartományban csapadék vált ki az oldatból, mely az Ac–VASS esetében nagyobb pH-értékeken

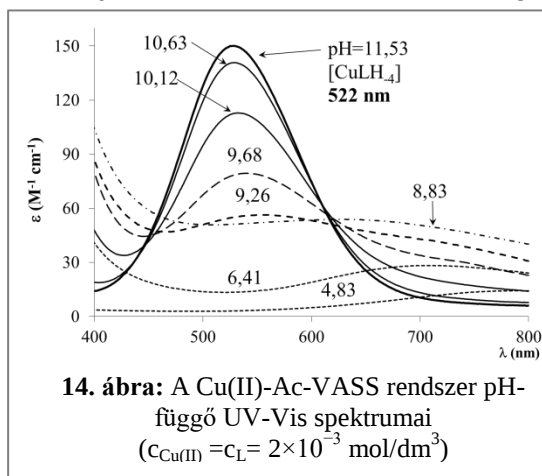
visszaoldódott, míg az Ac–VRAA esetében nem is oldódott fel teljesen az erősen lúgos (pH > 11) tartományban sem.

A jelentékeny csapadékképződés miatt a rendszerek kvantitatív leírására nem volt módunk, a CD- és UV-Vis spektrumokból azonban mégis nyerhettünk ki információkat arról, hogy erősen lúgos közegben, egymáshoz képest milyen mértékű az arginin, illetve a szerin oldalláncának részvétele a mutánsok fémmegkötő képességében.

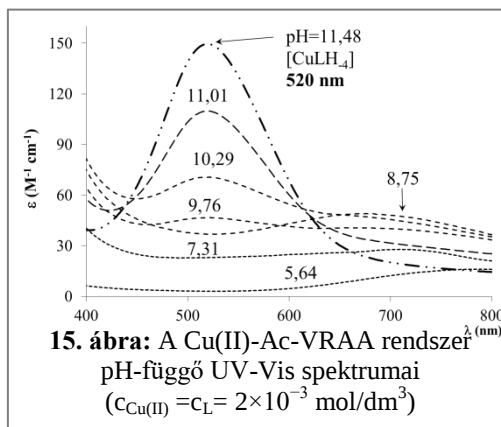
Az UV-Vis spektrumok megemelkedése is mutatja, hogy már ~ 6-os pH-n mindkét mutáns esetén csapadék vált ki az oldatból, amely csak az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját követően oldódott fel ismét (14-15. ábra).

A spektrofotometriás vizsgálat az Ac–VASS és az Ac–VRAA ligandum esetében alátámasztotta, hogy a csapadékképződés ellenére, ~ 10-11-es pH fölött a Cu(II)-ionok egy része kötődik a ligandumhoz. A spektrum egyetlen, 522 nm-es, valamint 520 nm-es hullámhosszon jelentkező abszorpciós maximummal jellemezhető komplex jelenlétére utal, ezen abszorpciós maximum megjelenését pedig már csak intenzitásnövekedés kíséri. Ez azt erősíti, hogy erősen lúgos közegben négy amidnitrogén koordinálódik a Cu(II)-ionhoz. Az erősen lúgos közegben felvett CD-spektrumok a két mutáns esetében egymáshoz jó egyezést mutatnak.

Eltérés mutatkozott azonban a két vizsgált mutáns esetében a fémion-megkötés mértékében. Az Ac–VRAA peptidnél jelentkező jelentősebb alapvonalemelkedés egyértelműen arra utal, hogy ennek a ligandumnak kisebb a fémmegkötő képessége.



14. ábra: A Cu(II)-Ac-VASS rendszer pH-függő UV-Vis spektrumai ($C_{\text{Cu(II)}} = C_L = 2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)



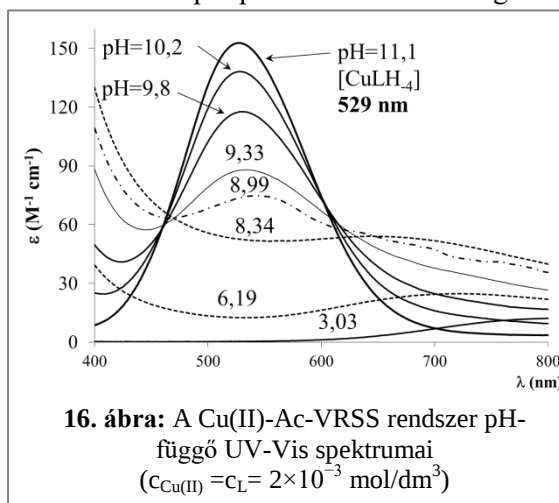
15. ábra: A Cu(II)-Ac-VRAA rendszer pH-függő UV-Vis spektrumai ($C_{\text{Cu(II)}} = C_L = 2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

5.1.1.4. Az Ac-VRSS vizsgálata

A mutánsok vizsgálatából kitűnik, hogy a rIAPP (17-29) fémmegekötéséért többféle poláris oldallánc lehet felelős, így az Ac-VRSSNN ligandum N-terminusát, a kétféle poláris oldalláncot is tartalmazó Ac-VRSS ligandumot (6/1. ábra) tanulmányoztuk munkánk következő szakaszában.

Elsőként a Cu(II)-iont tartalmazó minták pH-potenciometriás vizsgálatát végeztük el. Hasonlóan a mutánsokhoz, ezen ligandum esetében is már a 6-os pH-n csapadék vált ki az oldatból. A két ekvivalens lúgfogyás, valamint a csapadékvizsgálat alapján arra következtethetünk, hogy a kivált anyag a $\text{Cu}(\text{OH})_2$ volt.

Bár a jelentősebb mértékű csapadékkiválás miatt ezen rendszer megbízható kvantitatív leírása sem lehetséges, mégis nyerhető információ az UV-Vis

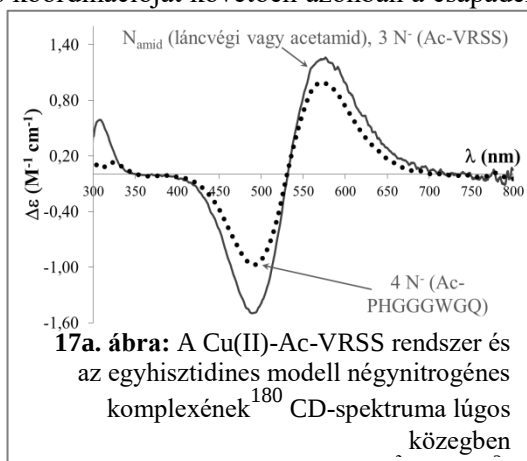


16. ábra: A Cu(II)-Ac-VRSS rendszer pH-függő UV-Vis spektrumai ($C_{\text{Cu(II)}} = C_L = 2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

spektrumokból az esetleges komplexképződésre vonatkozóan. Az alapvonal megemelkedése jól mutatja, hogy a pH 6 és 10 közötti tartományban volt uralkodó a $\text{Cu}(\text{OH})_2$, erősen lúgos közegben az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját követően azonban a csapadék feloldódott (16. ábra).

Az utóbbi folyamat azonban a rIAPP (17-29) és Ac-VRSSNN (rIAPP (17-22)) ligandumok komplexkémiailag viselkedésével összehasonlítva sokkal nagyobb pH-n történt csak meg.

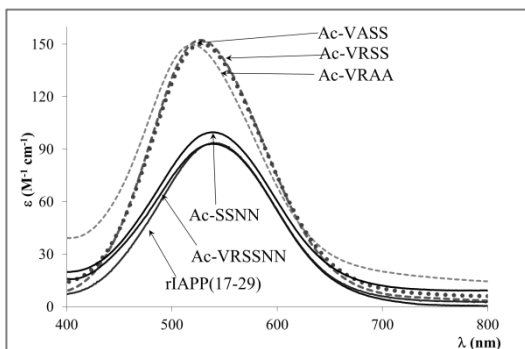
A spektrofotometriás vizsgálat ugyanakkor alátámasztotta, hogy a csapadékképződés ellenére erősen lúgos közegben a Cu(II)-ionok egy része itt is kötődik a ligandumhoz. Az UV-Vis spektrumok – a rIAPP (17-29) fragmenstől és a hexapeptidtől eltérően – egyetlen, 529 nm-es elnyelési maximummal rendelkező komplex jelenlétére utalnak, amelynek megjelenését már csak intenzitásnövekedés kíséri.



17a. ábra: A Cu(II)-Ac-VRSS rendszer és az egyhisztidines modell négynitrogénes komplexének 180 CD-spektruma lúgos közegben

Ebből arra következtethetünk, hogy a csapadék visszaoldódását követően közvetlenül a $[\text{CuLH}_4]^{2-}$ összetételű komplex képződik. A Cu(II)-Ac-VRSS rendszer erősen lúgos közegben felvett CD-spektrumának kiváló egyezése az egyhisztidines modell négynitrogénes komplexének spektrumával¹⁸⁰ arra utal, hogy a koordinálódó nitrogének a peptidvázbeli nitrogének lehetnek (17a. ábra).

Ha a lúgos tartományban jelentkező $[\text{CuLH}_4]^{2-}$ összetételű komplexek abszorpciós maximumait összevetjük, akkor az UV-Vis spektrumok alapján megállapítható, hogy az Ac-VRSS tetrapeptid komplexénél 529 nm-en, míg a rIAPP (17-29) és az Ac-VRSSNN hexapeptid komplexeinek esetében 538 nm-nél, illetve 542 nm-nél jelentkezik az abszorpciós maximum (17b. ábra).

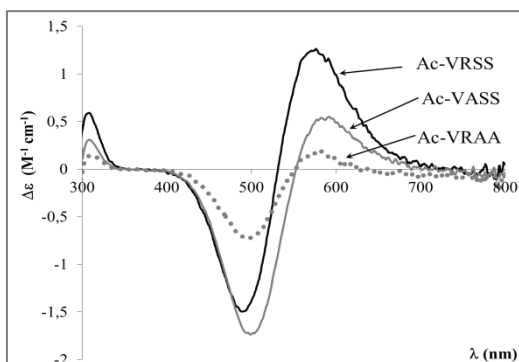


17b. ábra: A vizsgált ligandum-Cu(II) rendszerek erősen lúgos közegben felvett CD-spektrumai ($C_{\text{Cu(II)}} = C_L = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$)

Szembevetőbb a különbség, ha a lúgos közegben felvett CD-spektrumokat hasonlítjuk össze. A 18. ábra is jól szemlélteti, hogy az Ac-VRSS négynitrogénes Cu(II)-komplexéhez rendelhető spektrum gyakorlatilag tükörképe az rIAPP (17-29), illetve Ac-VRSSNN négynitrogénes Cu(II)-komplexéhez rendelhető spektrumának, ami igen eltérő koordinációs módra utal (vö. 9b. ábra).

A mérések eredményeként megállapíthattuk, hogy az Ac-VRSS a 6 és 10 közötti pH-tartományban nem képes oldatban tartani a Cu(II)-iont. Ez a ligandum nem lehet a fémkötőhely modellje, és ezek szerint nem a szerin és az arginin oldalláncok játszik a szerepet a Cu(II)-ion megkötésében.

Az erősen lúgos közegben felvett CD-spektrumokon (18. ábra) is látható, hogy az Ac-VRSS, az Ac-VASS, illetve az Ac-VRAA spektrumai lefutásukat tekintve egymáshoz jó egyezést mutatnak, különbség csak intenzitásukban jelentkezik.



18. ábra: A Cu(II)-tetrapeptid rendszerek CD-spektruma lúgos közegben ($C_{\text{Cu(II)}} = C_L = 2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

Ezek az eredmények arra mutatnak rá, hogy sem a két szerin-oldallánc, sem az arginin-oldallánc, sem pedig a három oldallánc együttese nem képes oldatban tartani a Cu(II)-iont. A spektrális adatok pedig azt is megerősítették, hogy a csak

arginin-oldalláncot tartalmazó mutáns gyengébb kölcsönhatást tud kialakítani a fémionnal, mint a két szerint tartalmazó peptidek.

Ezen mérések eredményei alapján a korábbi feltevésekkel ellentétben az arginin koordinációs kémiai szerepe tehát elhanyagolható, míg a szerin oldalláncnak szerepe lehet az amilin fémmegekötő képességében. Ez az eredmény jó egyezésben van az irodalomban fellelhető, arginin szerepére vonatkozó megállapításokkal (2.4.2.1. *Az arginin és az arginintartalmú peptidek c. fejezet*).

5.1.1.5. Az Ac-SSNN vizsgálata

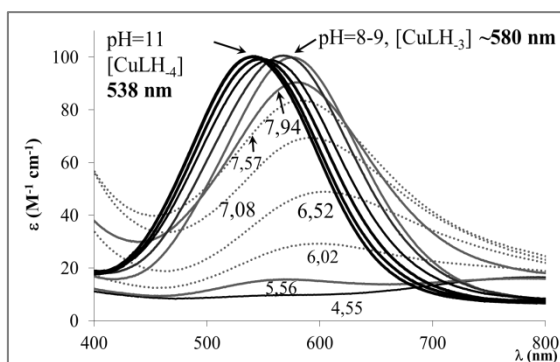
Munkám folytatásában így az Ac-VRSSNN C-terminális fragmensét, az SSNN szekvenciát (6/1. ábra) tanulmányoztuk annak felderítésére, hogy a két szerin és a két aszparagin együttes jelenléte hogyan hat a tetrapeptid fémion megkötő képességére.

Az Ac-SSNN tetrapeptid fragmensnél (hasonlóan a hexapeptid fragmenshez) szintén megindult a komplexképződés pH = 5 fölött.

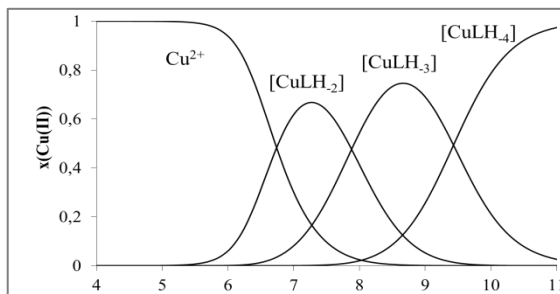
A Cu(II)-iont is tartalmazó minta titrálási görbéje azt mutatta, hogy a Cu:L=1:2 arányú rendszer esetében extra ekvivalens lúg fogyott, így ez alapján, illetve a korábbi tapasztalatokból kiindulva az amidnitrogének deprotonálódására és koordinációjára

következtettünk. Az Ac-SSNN – Cu(II) rendszer titrálása során a pH = 6-8 közötti tartományban az Ac-VRSSNN fragmenshez hasonlóan opálosodást, kisebb mértékű csapadékképződést tapasztaltunk. A pH~9 értéket elérve a csapadék visszaoldódott és az oldat kitisztult. Nagyobb pH-n az oldat egyre lilább lett.

Érdeemes megfigyelni, hogy a közbenső, pH = 6-9 közötti tartományban az abszorpciós sáv maximuma 570-580 nm körül van, mely szintén jelentkezik a



19. ábra: A Cu(II)-Ac-SSNN rendszer pH-függő UV-spektrumai ($c_{\text{Cu(II)}} = c_L = 2 \times 10^{-3}$ M)



20. ábra: A Cu(II)-Ac-SSNN rendszer fémion koncentráció-eloszlási görbéi ($c_{\text{Cu(II)}} = c_L = 1 \times 10^{-3}$ M)

hexapeptid és a rIAPP spektrumaiban is, ugyanakkor nem lelhető fel az Ac-VRSS és mutánsainak spektrumsorozatában.

Az ~580 nm-en jelentkező abszorpciós maximum három amidnitrogén koordinációjára utal a pH = 6-9 tartományban (19. ábra). Mindez azt is mutatja, hogy ez a szekvenciaszakasz a hasnyálmirigy szöveteit jellemző pH-n (8-9) is képes koordinálni a fémiont.

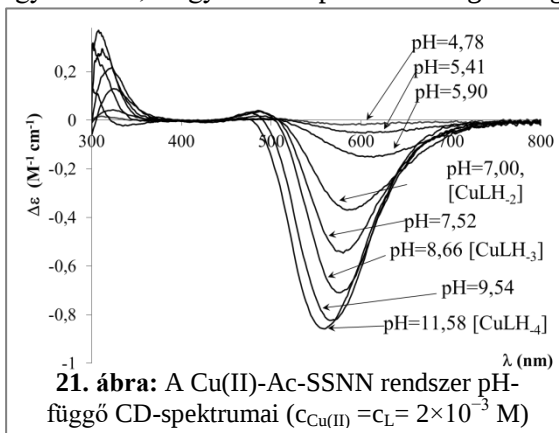
Erősen lúgos közegben az abszorpciós maximum 538 nm-re tolódik, hasonlóan a rIAPP (17-29) fragmens és a hexapeptid UV-Vis spektrumainak abszorpciós maximumaival (17b. ábra).

Az Ac-VRSSNN ligandumhoz hasonlóan itt is két számítógépes program segítségével nyertünk ugyan kevésbé pontos, de az összehasonlítás céljából megfelelő adatokat. Ebben az esetben is a három már bemutatott sztöchiometriájú komplexszel illeszthettünk legjobban az adatainkat.

A $[\text{CuLH}_2]$, $[\text{CuLH}_3]$, és $[\text{CuLH}_4]$ összetételű részecskék stabilitása és pH szerinti eloszlása nagyon jó egyezésben volt a rIAPP (17-29) és az rIAPP (17-22) (Ac-VRSSNN) ligandumokkal (9. táblázat és 20. ábra).

Az Ac-SSNN-Cu(II) rendszerek különböző pH értékeken felvett CD-spektrumait is elemeztük. Megfigyelhettük, hogy a CD-spektrumok igen nagy hasonlóságot mutatnak a hosszabb fragmensek megfelelő spektrumaival (9b. ábra), mindez a végbemenő komplexképződési folyamatok hasonlóságára utal.

Érdeemes megfigyelni, hogy – bár kisebb intenzitással – 480 nm körül itt is megjelenik a már említett pozitív Cotton-effektus a spektrumokon hasonlóan a hosszabb fragmensekhez (21. ábra).



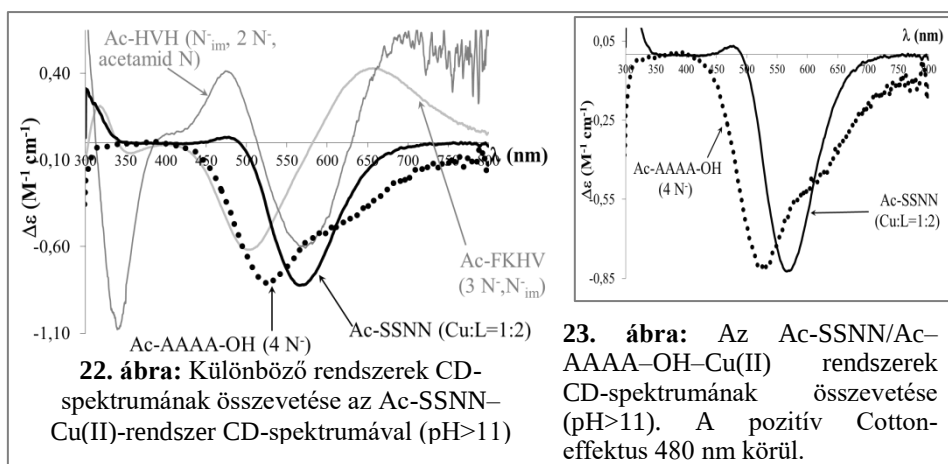
21. ábra: A Cu(II)-Ac-SSNN rendszer pH-függő CD-spektrumai ($c_{\text{Cu(II)}} = c_{\text{L}} = 2 \times 10^{-3}$ M)

A 22-23. ábrán az Ac-AAAA-OH-Cu(II)-rendszer (pontosított vonal), illetőleg az imidazolil-oldalláncukkal a koordinációban résztvevő (hisztidintartalmú) peptid-Cu(II)-rendszerek (Ac-FKHV¹⁸¹ és Ac-HVH¹⁸²) erősen lúgos közegben felvett spektrumait vethetjük össze. Látható, hogy nem koordinálódó oldalláncokkal rendelkező ligandumok Cu(II)-komplexeinek CD-spektrumában csupán negatív Cotton-effektusok jelentkeznek ebben a hullámhossz-tartományban. Mindez azt támasztja alá, hogy az Ac-SSNN valamely oldallánca is részt vesz a koordinációban és horgonycsoportként szolgál a folyamatban.

Jelentős különbség továbbá, hogy ezen ligandum és a hosszabb fragmensek esetében az ún. *köztes* állapotú komplexek a „fiziológias” és a hasnyálmirigy szöveteire jellemző 8-9-es pH körül is képződtek szemben az Ac-VRSS és a mutánsaival, ahol csak az erősen lúgos pH-tartományban beszélhettünk komplexképződésről.

Ha a CD-spektrumokat hasonlítjuk össze, még szembetűnőbb a különbség. A tetrapeptidok spektrumai gyakorlatilag tükörképei a rIAPP (17-29), az Ac-VRSSNN, illetve az Ac-SSNN hexapeptid spektrumainak, ami szintén eltérő koordinációs módra utal.

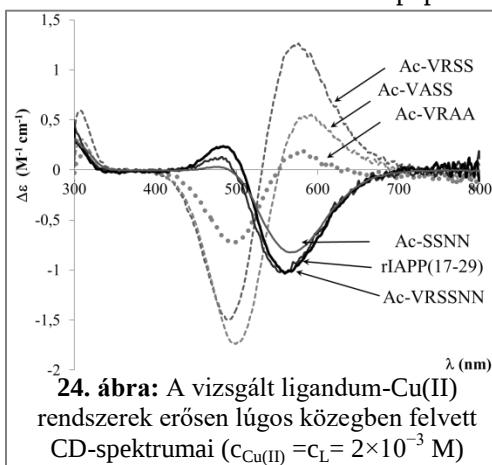
Összehasonlítva a hat peptid (Ac-VRSSNN, Ac-VRSS, Ac-SSNN, a rIAPP (17-29), az Ac-VRAA, valamint az Ac-VASS) megfelelő spektrumait pedig megállapíthattuk, hogy kétféle spektrumtípust különböztethetünk meg (24. ábra).



Az egyik típusba az Ac-VRSS, az Ac-VRAA és az Ac-VASS tetrapeptidok tartoznak. A másik típushoz az Ac-SSNN és az Ac-VRSSNN fragmensek rendelhetők. Abból kiindulva, hogy a rIAPP (17-29) spektrális viselkedése az SSNN-típusúakhoz mutat hasonlóságot, bizonyítottuk, hogy a Cu(II)-iont kötő legrövidebb szekvenciaszakasz az -SSNN- szakasz, így ez a legrövidebb szakasz, mely a fémionkötőhely modellje lehet.

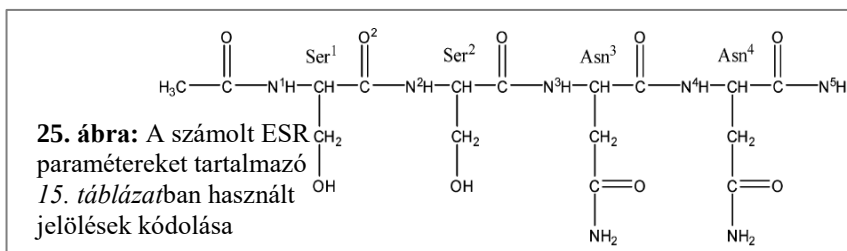
Az Ac-SSNN ligandum mintáit is vizsgáltuk **ESR-spektroszkópiával**, a kapott adatok nagy hasonlóságot mutatnak a koordinációs módot tekintve a rIAPP (17-29) és a hexapeptid fragmensevel (10. táblázat). Emellett DFT-számolásokat is végeztek a fenti három sztöchiometriájú komplexre vonatkozóan, és az így kapott g_z és A_z adatokat összevetettük a mért értékekkel.

A 13. táblázatban összehasonlítás céljából szerepelnek az $\text{NH}_2\text{-GGGG-OH}$, az $\text{NH}_2\text{-GGH-OH}$ és a ciklo- $\beta\text{AG}\beta\text{AG}$ ligandumok Cu(II)-komplexeinek ESR paraméterei. Ezek koordinációs módja már tisztázott, így paraméterek



kiindulópontként szolgálhatnak a Cu(II)-iont koordináló donoratomok hozzárendelésére a rIAPP (19-22) esetében.

Az Ac-SSNN ligandum [CuLH₂], [CuLH₃], valamint [CuLH₄] komplexeinek koordinációs módjára vonatkozóan több lehetséges mód¹⁸³ is fölmerül, ezeket is összefoglaltam a 13. táblázatban. Zömében a második aszparagin-oldallánc deprotonálódásából és koordinációjából indultunk ki, ezt feltételeztük horgonycsoportnak.



A legelfogadhatóbb modelleket félkövéren szedtem, és ezek kiváló egyezésben vannak a mért A_z értékekkel.

A [CuLH₂] sztöchiometriájú részecskének szerkezetére két igen jó közelítést is kaptunk. Az egyikben a 4-es aszparagin-oldallánc koordinálja a fémiont és csak ezután koordinálódik a fémion peptidvázbeli amidnitrogén(ek)hez, a másik esetben viszont a vázban lévő, láncvégi amidcsoport nyújtja az első kötőhelyet (Asn₄, N₄, CO, H₂O [6+7] típusú kelát, illetve N₅, N₄, CO, H₂O [5+7] tagszámú kelát). Az adatok alapján ugyanakkor nehezen dönthető el, hogy mely modell a jobb, horgonycsoport nélkül azonban elképzelhetetlen volna a vázbeli amidcsoportok deprotonálódása, ezért az elsőt fogadjuk el. *Mindezek alapján azt találtuk, hogy az aszparagin-oldallánc mint horgonycsoport funkcionál.*

A [CuLH₃] sztöchiometriájú részecskének lehetséges szerkezetét tekintve a legjobb modellnek az bizonyult, amikor az aszparagin-oldallánc koordinálódását követően két további, peptidvázbeli amidnitrogén deprotonálódásával és koordinációjával számoltunk (Asn₄, N₄, N₃, H₂O). Egy másik aszparagin-oldallánc részvételét, illetve a második szerintag OH-csoportjának koordinálódását is számba vettük, azonban az ezekre számolt paraméterek nem mutattak olyan jó egyezést, mint az előbbi esetben. Az axiális koordináció lehetőségét (pl. amidcsoport karbonilcsoportjával a 3. helyen) a paraméterek és irodalmi tapasztalatok alapján kizárhatónak ítéltük.

A [CuLH₂] és a [CuLH₃] komplexek számolt paraméterei igen hasonlóak egymáshoz, ez azt is megmagyarázza, hogy miért tapasztaltuk az ESR paraméterek igen csekély mértékű megváltozását a felvett spektrumokban. A DFT-számítások alapján feltételezhető volna az is, hogy egynél többféle részecske volna oldatban, de az ESR adatok ezt kizárják.

A [CuLH₄] összetételű részecske szerkezetét vizsgálva is több modellt vettünk számításba. A legvalószínűbbnek itt is azt találtuk, hogy a negyedik koordinációs helyet egy következő peptidvázbeli amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja szolgáltatja.

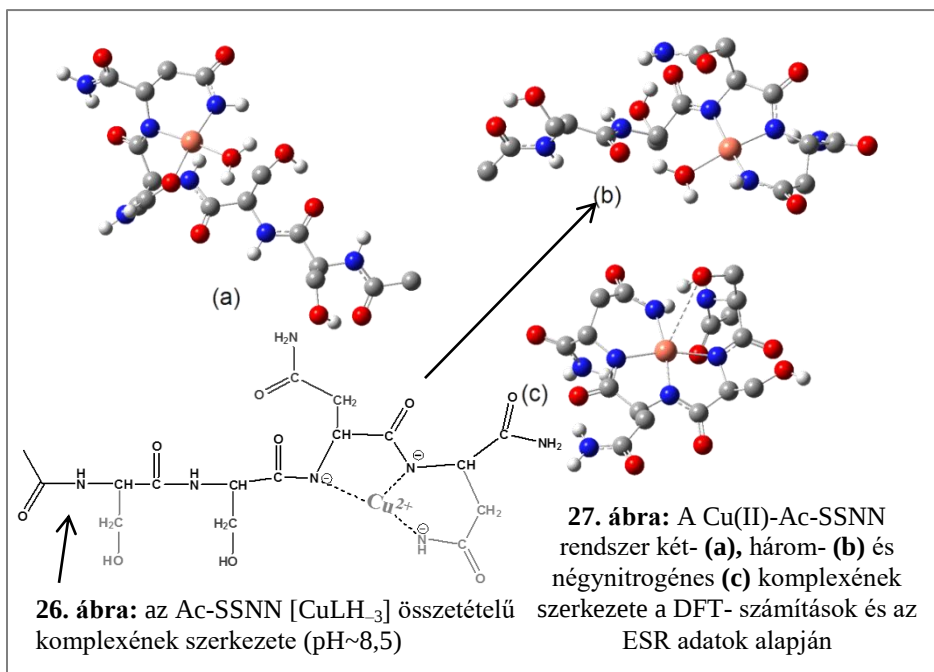
13. táblázat: A H-GGGG-OH, H-GGH-OH, cyclo- β AG β AG és az Ac-SSNN Cu(II)-komplexeinek számolt és mért ESR paraméterei Az A_z értékek 10^{-4} cm^{-1} egységben értendőek. A donoratomok kódolása az 25. ábrán található.

Komplex		Koordinációs mód	B3PW91 (g_z , $ A_z $) ^c	B3LYP (g_z , $ A_z $) ^c	Mért adatok (g_z , $ A_z $) ^c
Irodalmi adatok	$[\text{CuH}_3\text{L}]^{2-}$	NH_2 , N^- , N^- , N^-	2,125	2,124	2,170
	H-GGGG-OH		205,8	200,8	204
	$[\text{CuH}_2\text{L}]^-$	NH_2 , N^- , N^- , $\text{N}_{(\text{His})}$	2,115	2,115	2,169
	H-GGH-OH		208,3	203,9	207
	$[\text{CuH}_4\text{L}]^{2-}$	N^- , N^- , N^- , N^-	2,121	2,120	2,147
	cyclo- β AG β AG		213,1	207,9	212
[CuH ₂ L] Ac-SSNN		$\text{NH}^-_{(\text{Asn4})}$, N_4^- , $\text{CO}_{(\text{Asn3})}$; H_2O	2,154 198,7	2,152 195,2	2,238 194,5
[CuH ₂ L] Ac-SSNN		N_5^- , N_4^- , $\text{CO}_{(\text{Asn3})}$; H_2O	2,151 200,0	2,149 196,1	2,238 194,5
[CuH ₂ L] Ac-SSNN		$\text{NH}^-_{(\text{Asn4})}$, N_4^- ; H_2O ; H_2O	2,168 174,5	2,166 170,6	2,238 194,5
[CuH ₃ L] Ac-SSNN		$\text{NH}^-(\text{Asn}_4)$, N_4^- , N_3^- és H_2O	2,147 197,9	2,145 193,5	2,225 189,3
[CuH ₃ L] Ac-SSNN		$\text{NH}^-(\text{Asn}_4)$, N_4^- , N_3^- és $\text{OH}(\text{Ser}_2)^{\text{ax}}$; H_2O	2,156 173,8	2,154 169,8	2,225 189,3
[CuH ₃ L] Ac-SSNN		$\text{NH}^-(\text{Asn}_4)$, N_4^- , $\text{NH}^-(\text{Asn}_3)$; H_2O	2,157 172,2	2,154 168,1	2,225 189,3
[CuH ₃ L] Ac-SSNN		$\text{NH}^-(\text{Asn}_4)$, N_4^- , N_3^- és $\text{OH}(\text{Ser}_2)$	2,133 180,8	2,132 176,3	2,225 189,3
[CuH ₃ L] Ac-SSNN		$\text{NH}^-(\text{Asn}_4)$, N_4^- , N_3^- és $\text{OH}(\text{Ser}_2)$, CO^2_{ax}	2,146 157,2	2,144 153,1	2,225 189,3
[CuH ₄ L] ²⁻ Ac-SSNN		$\text{NH}^-(\text{Asn}_4)$, N_4^- , N_3^- és $\text{O}^-(\text{Ser}_2)$	2,132 213,5	2,131 208,4	2,224 190,2
[CuH ₄ L] ²⁻ Ac-SSNN		$\text{NH}^-(\text{Asn}_4)$, N_4^- , N_3^- , N_2^- ; $\text{OH}(\text{Ser}_1)^{\text{ax}}$	2,144 192,8	2,142 187,9	2,224 190,2
[CuH ₄ L] ²⁻ Ac-SSNN		$\text{NH}^-(\text{Asn}_4)$, N_4^- , N_3^- , N_2^-	2,136 196,3	2,135 191,3	2,224 190,2
[CuH ₄ L] ²⁻ Ac-SSNN		$\text{NH}^-(\text{Asn}_4)$, N_4^- , N_3^- ; OH^-	2,143 211,5	2,141 206,5	2,224 190,2

Vizsgáltuk annak lehetőségét is, hogy a második szerin OH-csoportja deprotonálódása révén nyújthat-e kötőhelyet a Cu(II)-ion számára. Ugyanilyen módon egy deprotonálódott vízmolekula ekvatoriális helyzetű részvételével is számoltunk. A legvalószínűbb ($\text{NH}^-(\text{Asn}_4)$, N_4^- , N_3^- , N_2^-) koordinációs mód

azonban együttjár az első szerin tag (Ser₁) OH-csoportjának gyenge axiális kölcsönhatásával is (27. ábra). A szerkezet úgy stabilizálódik, hogy a szerin OH-csoportja és a koordinálódó NH-csoportok között intramolekuláris hidrogénkötés létesül. Ez a kölcsönhatás igen hasonlónak tűnik az 25. oldalon taglalt katalitikus triád jelenségéhez.

Az SSNN-domén speciális koordináló hatását azonban az oldalláncok szokatlan együttműködésével lehet megmagyarázni, melyre azonban találhatunk irodalmi előzményeket (ld. 2.4.2. fejezet).



A poláris oldalláncok (szerin, aszparagin, jóval kisebb mértékben az arginin) között kialakuló kölcsönhatások egy olyan molekuláris környezetet hoznak létre, melyben a C-terminális aszparagin-oldallánc horgonycsoportként indukálja a fémion megkötését, valamint a peptidvázbeli amidnitrogének egymást követő deprotonálódását és koordinációját. Emellett azt is kimutattuk, hogy az aszparagin-oldallánc koordinációja jól jellemezhető egy tipikus CD-sávval 480 nm körül.

Eredményeink jelentősége abban áll, hogy az eddigi irodalmak alapján eleddig csak az erősen lúgos közegben tudták kimutatni az aszparagin-oldallánc deprotonálódását és koordinációját. Munkánk eredményeként ennek a speciális szekvenciának a hasnyálmirigy szöveteit jellemző pH-tartományban végbemenő, szokatlan koordinációs kémiai viselkedését tudtuk leírni és jellemezni.

5.1.2. Szabad N-terminusú mutánsok vizsgálata Cu(II)-ionnal

További munkánk során arra voltunk kíváncsiak, hogy az egyes oldalláncoknak számszerűsíthetően milyen és mekkora szerepe lehet a szokatlan komplexképzésben, emiatt elvégeztük a védett peptidekkel analóg, szabad terminális aminos csoportot tartalmazó peptidek, valamint néhány további N-terminálisan nem védett patkány amilin mutáns szintézisét és fémionkomplexeiknek pH-potenciometriás, valamint spektroszkópiás vizsgálatát. Arra is kerestük a választ, hogy a szabad aminos csoport jelenléte hogyan változtatja meg a különböző fragmensek fémionmegkötő képességében jelentkező hasonlóságot/különbséget, illetőleg az aminos csoport jelenlétében is kitüntetett szerepe van-e a 22. pozícióban található aszparagin-oldalláncnak a Cu(II)-ionok megkötése szempontjából.

5.1.2.1. Tetrapeptid vizsgálata

Az oldalláncok szerepének tisztázására előállítottuk a $\text{NH}_2\text{-VRSS}$, az $\text{NH}_2\text{-SSNN}$, az $\text{NH}_2\text{-SSNA}$ és az $\text{NH}_2\text{-AANN}$ tetrapeptid ligandumokat. A ligandumok szerkezeti képleteit szintén a 6/2-3. ábra szemlélteti.

A tetrapeptid deprotonálódási állandóit és Cu(II)-komplexeiknek stabilitási állandóit az 14. táblázatban foglaltam össze. Összehasonlításként egyszerűbb tetrapeptid irodalmi adatait is összegyűjtöttem ugyanott. Szembeötlő, hogy az N-terminusaikon és mellette szerint tartalmazó tetrapeptid aminos csoportjának pK értékei rendre kisebbek a többi ligandum megfelelő értékeinél, és hasonló tendencia figyelhető meg a $\text{NH}_2\text{-SSS-OH}$ (a továbbiakban: *triszerin*) ligandum esetében is ($\text{pK}_{\text{triszerin}} : 7,13$; $\text{pK}_{\text{triglicin}} : 7,93$). Ez azt mutatja, hogy a szerin OH-csoportja és az aminos csoport között létesülő hidrogénkötés elősegíti az utóbbi deprotonálódását, azaz a poláris oldalláncok jelenléte kedvező az aminos csoport deprotonálódásának szempontjából.

A Cu(II)-ligandum minták titrálási görbéiből (28. ábra) és a komplexek stabilitási állandóiból is jól látható, hogy komplexkémiailag viselkedésüket tekintve két csoport különíthető el a vizsgált ligandumok Cu(II)-tartalmú mintáinak esetében. Az egyik csoport az aszparagint a 3. helyen tartalmazó ligandumoké (a továbbiakban: „*Asn-típusú*”), a másik csoport pedig a 3. pozícióban aszparagint nem tartalmazó ligandumok csoportja (a továbbiakban: „*nem Asn-típusú*”).

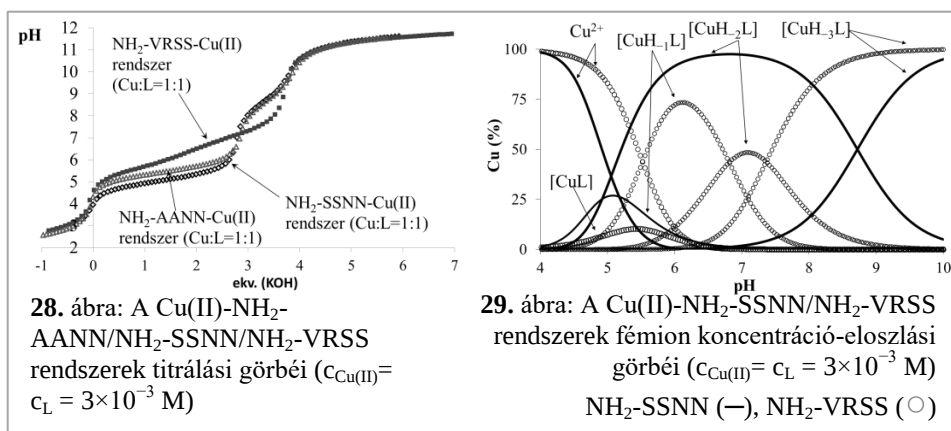
Az $\text{NH}_2\text{-RRRR-OH}$ (a továbbiakban: *tetraarginin*) fémionkomplexeinek stabilitása összemérhető az $\text{NH}_2\text{-GGGG-OH}$ (a továbbiakban: *tetraglicin*) és az $\text{NH}_2\text{-AAAA-OH}$ (a továbbiakban: *tetraalanin*) értékeivel. Mindez arra utal, hogy az arginin oldalláncok nagy száma nem okozója a fémionkomplexek kiemelkedő stabilitásának.

Másrészről az 14. táblázatból az is nyilvánvaló, hogy a komplexképzési folyamatok alapvetően minden ligandum esetében ugyanolyanok, csupán az egyes komplexek pH szerinti eloszlása mutat eltérést.

14. táblázat: A vizsgált tetrapeptidek deprotonálódási állandói és a Cu(II)-komplekek stabilitási állandói ($\log \beta_{\text{pqr}}$), T = 298 K, I = 0.2 M (KCl)

	$\text{NH}_2\text{-SSS}$	$\text{NH}_2\text{-AANN}$	$\text{NH}_2\text{-SSNA}$	$\text{NH}_2\text{-SSNN}$	$\text{NH}_2\text{-VRSS}$	$\text{NH}_2\text{-AAAA-OH}^{184}$	$\text{NH}_2\text{-GGGG-OH}^{185}$	$\text{NH}_2\text{-RRRR-OH}^{186}$
$\text{pK}(-\text{COOH})$	—	—	—	—	—	3,52	3,24	3,00(2)
$\text{pK}(-\text{NH}_3^+)$	7,46(1)	7,86(2)	7,01(1)	6,99(1)	7,46(1)	8,13	7,94	7,13(1)
$[\text{CuL}]$	4,03(9)	—	—	—	4,03(9)	4,77	5,06	—
$[\text{CuHL}_1\text{L}]$	-0,85(1)	-0,28(2)	-0,29(2)	-0,35(3)	-0,85(1)	-0,45	-0,50	-1,11(2)
$[\text{CuHL}_2\text{L}]$	-7,66(2)	-5,59(1)	-5,33(7)	-5,27(1)	-7,66(2)	-8,09	-7,41	-8,32(4)
$[\text{CuHL}_3\text{L}]$	15,02(1)	-14,36(2)	-13,97(2)	-13,99(3)	15,02(1)	-17,33	-16,59	-17,22(5)
$\text{pK}(\text{H}_1/\text{H}_2)$	6,81	5,31	5,04	4,92	6,81	7,64	6,91	7,21
$\text{pK}(\text{H}_2/\text{H}_3)$	7,36	8,77	8,64	8,72	7,36	9,24	9,18	8,90
$\text{Log } \beta_{1-11}-\text{pK}(-\text{NH}_3^+)$	-8,31	-8,14	-7,30	-7,34	-8,31	-8,58	-8,44	-8,24

Ezt a különbséget a 29. ábra mutatja be a legszemléletesebben, ahol két modellként szolgáló ligandum pH szerinti eloszlását ábrázoltam.



A NH₂-VRSS és a NH₂-AAAA esetében a Cu:L=1:1 arányú rendszerek komplexeire nyert adatokból az is megállapítható (14. táblázat), hogy poláris oldalláncok (Asn-, Ser-, Arg-) jelenlétében jelentősen kisebb pH-tartományra tolódnak ezek a folyamatok és az átfedés is nagyobb az oldalláncok hatása miatt. Ha az NH₂-VRSS és NH₂-SSNN rendszereit leíró eloszlásokat összevetjük (29. ábra), az is megállapítható, hogy hogy az ún. „Asn-típusú” ligandumok [CuLH₂] összetételű komplexeinek képződése igen kedvezményezett és széles pH-tartományban uralkodóak.

A 3. helyen (vagy 3-4. helyen) lévő aszparagin-oldallánc lényegi eltérést okoz a kialakuló koordinációs módokban. Szerin(ek) jelenlétében (NH₂-SSNN, NH₂-SSNA vs. NH₂-AANN) viszont még kisebb pH-n mennek végbe ezen folyamatok. Az NH₂-SSS-OH (a továbbiakban: triszerin) vizsgálata során – aszparagintagok hiányában – nem tapasztaltunk lényeges eltérést az egyszerűbb oligopeptidek adataihoz képest, így ebből is világosan látszik, hogy a minőségi változást az aszparagin oldallánca okozza, míg a szerin (csak) modulálja/növelheti a hatását.

A szakirodalomban fellelhető hasonló jelenség, miszerint ha egy jól koordinálódó (jellemzően imidazolil) oldallánc van a harmadik a pozícióban, akkor jelentősen megnövekedik egy köztes állapotú komplex (itt pl. a [CuLH₂]) stabilitása. Mindez továbbra is alátámasztja, hogy az aszparagin-oldalláncoknak szerepe lehet a fémion koordinációs szférájának kialakításában.

Megemlítendő, hogy a 14. táblázatban az „Asn-típusú” ligandumok esetében a [CuL] komplex nem szerepel a modellben. A többi vizsgált ligandum komplexképződési folyamatai ugyanis a savas pH-tartományban kezdődnek meg egy (NH₂, CO) típusú koordinációval megvalósuló, [CuL] összetételű komplex képződésével. Minden valószínűség szerint valamennyi ligandum esetében képződik ez a részecske, de a koncentrációja legtöbbször olyan kicsi, hogy nincs módunk megbízható pontosságú stabilitási állandót rendelni hozzá, kivéve a

tetraglicint, a tetraalanin és az NH_2 -VRSS ligandumokat. (Ebből eredően az első amidnitrogén deprotonálódására vonatkozó érték nem mindenhol számolható, így csak az aminocsoport protonálódási állandójával korrigált stabilitási állandók összehasonlítása volt lehetséges a 14. táblázat utolsó sorában).

Másrészről a táblázat adataiból arra is figyelhetünk, hogy az NH_2 -VRSS ligandum $[\text{CuLH}_3]$ komplexe kedvezményezett és dominál a lúgos tartományban. Ennek lehetséges magyarázatára a ***Spektroszkópiás vizsgálatok*** c. részben térek ki.

Vizsgált peptidjeinkben (ellentétben a védett rIAPP (17-29) fragmensekkel) nem az aszparagin oldallánca az elsődleges horgonycsoport, hanem a N-terminális aminocsoport, ugyanakkor a kapott pH-potenciometriás adatok, valamint a stabilitási állandók az aszparagin-oldalláncnak jelentősebb stabilizáló szerepét, valamint a poláris oldallancok együttesének speciális hatását bizonyították.

Spektroszkópiás vizsgálatok

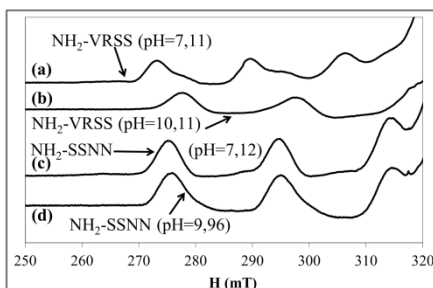
A Cu(II)-tetrapeptid rendszerekben képződött főbb részecskék spektroszkópiai paramétereit a 15. táblázatban foglaltam össze.

Elsőként az ***ESR-vizsgálatok*** eredményeit mutatom be. Minthogy az NH_2 -VRSS- NH_2 -Cu(II) rendszerben a $[\text{CuL}]$ sztöchiometriájú komplex igen kis mennyiségben keletkezik, a $[\text{CuLH}_2]$ komplexek pedig a $[\text{CuLH}_1]$, valamint a $[\text{CuLH}_3]$ összetételű komplexekkel átfedésben jelennek meg, így az ESR-paramétereket csak a $[\text{CuLH}_1]$ és a $[\text{CuLH}_3]$ komplexekre tudták meghatározni. A $[\text{CuLH}_1]$ komplex paraméterei jó egyezést mutatnak az NH_2 -GGGG-OH megfelelő komplexével, amely alapján ugyanaz a (NH_2 , N^-) donorokkal megvalósuló koordináció valószínűsíthető. A $[\text{CuLH}_3]$ összetételű komplex az NH_2 -GGGG-OH (NH_2 , N^- , N^- , N^-) koordinációs módjával vethető össze. Ezek alapján látszik, hogy az arginin és két szerin oldallánc együttes hatása elhanyagolható.

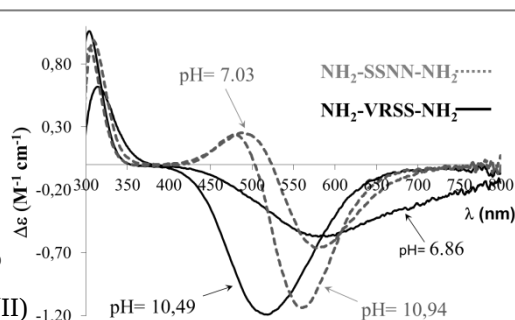
Az NH_2 -SSNN és a NH_2 -SSNA ligandum esetében a $[\text{CuLH}_2]$ (pH~7) és a $[\text{CuLH}_3]$ (pH~10 fölött) összetételű komplexekre határozták meg az ESR paramétereket. A $[\text{CuLH}_2]$ komplex koordinációs módja ez alapján a tetraglicin (NH_2 , N^- , N^- , CO) típusú koordinációs módjához tűnt hasonlóknak.

Az ESR paraméterekből ugyanakkor az is látszik, hogy erősen lúgos közegben, pH 11 körül a $[\text{CuLH}_2]$ komplex vagy nem alakul át teljesen a $[\text{CuLH}_3]$ komplexszé, vagy ha átalakul, akkor ennek a paraméterei nem egyeznek meg a NH_2 -GGGG-OH $[\text{CuLH}_3]$ komplexének (NH_2 , N^- , N^- , N^-) koordinációs módjával. A szokatlan ESR paraméterek – *hasonlóan az Ac-SSNN és a hosszabb patkány amilin fragmensek ESR adataihoz* – arra utalnak tehát, hogy az „*Asn-típusú*” ligandumok esetében mégis rendhagyó szerkezettel kell számolnunk (30. ábra, 15. táblázat).

A Cu(II)-tetrapeptid rendszerek 1:1 és 1:2 arányú mintáinak **UV-Vis és CD-spektroszkópiás vizsgálatát** is elvégeztük. A spektrumsorozatokból ezúttal is a CCA+ programmal nyertünk egyedi spektrumokat. A spektrumok is alátámasztják, hogy a komplexképződés minden vizsgált tetrapeptid esetében pH 4 körül elkezdődik, és több különböző koordinációs módú komplex egyedi spektruma különíthető el.



30. ábra: Az $\text{NH}_2\text{-VRSS/SSNN-Cu(II)}$ rendszerek ESR-spektrumainak összehasonlítása



31. ábra: Az $\text{NH}_2\text{-VRSS/SSNN-Cu(II)}$ rendszerek CD-spektrumainak összehasonlítása ($c_{\text{Cu(II)}} = c_{\text{L}} = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$)

A $\text{NH}_2\text{-VRSS}$ esetében az UV-Vis spektrumok alapján három különböző komplex egyedi spektrumát, míg az $\text{Cu(II)-NH}_2\text{-SSNN}$ rendszer különböző pH-értékeken felvett spektrofotometriás spektrumaiból mindössze kétféle komplex egyedi spektrumát azonosíthattuk, mindez összhangban volt az eloszlási adatokkal (15. táblázat). A pH növelésével az abszorpciós maximumok kisebb hullámhosszak felé történő eltolódása figyelhető meg. Ez azzal értelmezhető, hogy a Cu(II) -ion koordinációs szférájában ekvatoriálisan elhelyezkedő vízmolekulák a ligandum amidnitrogénjeinek deprotonálódása és fémionhoz történő koordinációja révén nitrogéndonorokkal helyettesítődnek.

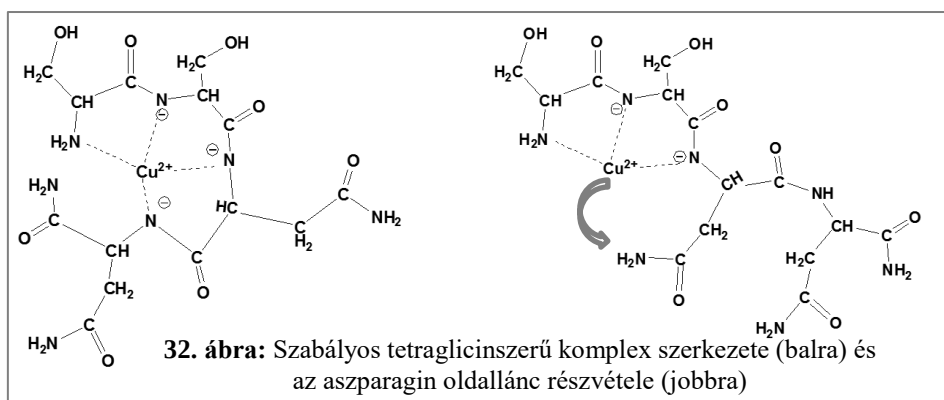
Minthogy a korábbi irodalmakban fölvetődött az arginin oldalláncának koordinálódása, ezért különös figyelmet érdemel a spektrum adott irányba történő eltolódása.

Amennyiben az arginin-oldallánc is részt venne a fémion megkötésében, akkor a guanidinocsoporttal megvalósuló axiális koordináció miatt vörös eltolódással kellene számolnunk, ezt azonban a vizsgálatok eredményei nem támasztják alá.

Eltérés mutatkozik azonban a spektrális paraméterekben (15. táblázat) a különböző oldalláncokat tartalmazó vizsgált tetrapeptidek esetében. Ez az eltérés leginkább az „*Asn-típusú*” ligandumok háromnitrogénes (CuLH_2) komplexeinek egyedi spektrumait érinti. Minthogy az UV-Vis spektroszkópiában az eltolódás nagysága függ a ligandumhoz kapcsolódó egyéb szubsztituensektől, és így az oldalláncok kémiai természetétől, elektrosztatikus és szterikus hatásaitól is, így ez felveti az oldalláncok részvételét és stabilizáló/destabilizáló hatását a koordináció létrejöttében.

15. táblázat: A ekvimoláris tetrapeptid-Cu(II) rendszerekben képződő Cu(II)-komplexek spektrális paraméterei

		[CuL]	[CuH ₂ L], 4N	
NH ₂ -AAH-OH ¹⁸⁷	UV-vis (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	680/39	522/101	
	CD (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)		476/+0,18	
			554/-0,93	
Peptid	Módszer	[CuH ₁ L]	[CuH ₂ L]	[CuH ₃ L]
NH ₂ -AAAA-OH	UV-vis (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	652 / 93	563 / 138	515 / 165
	CD (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	680 / -0,30	564 / -0,88	527 / -1,19
		300 / +0,76	304 / +0,90	304 / +0,56
	ESR A (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹) / g	—	280 / -0,60	280 / -2,0
NH ₂ -Arg ₄ -OH ¹⁸⁶	UV-vis (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	—	—	517 / 187
	CD (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	—	—	—
	ESR A (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹) / g	175 / 2,252	179 / 2,216	206 / 2,173
NH ₂ -VRSS	UV-vis (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	664 / 66	552 / 111	515 / 139
	CD (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	679 / -0,47	568 / -0,79	517 / -1,30
		320 / +0,52	313 / +0,71	304 / +1,13
	ESR A (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹) / g	177 / 2,254	?	203 / 2,182
NH ₂ -SSNN	UV-vis (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	—	550 / 128	516 / 121
	CD (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	—	586 / -0,63	560 / -1,14
			492 / +0,26	479 / +0,23
			309 / +0,99	304 / +0,94
NH ₂ -SSNA	ESR A (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹) / g	—	205 / 2,209	200 / 2,180
	UV-vis (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	—	550 / 105	519 / 92
	CD (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	—	577 / -0,61	562 / -1,00
			490 / +0,20	483 / +0,36
NH ₂ -AANN			309 / +0,68	307 / +0,63
	ESR A (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹) / g	—	208 / 2,203	200 / 2,181
	UV-vis (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	—	547 / 109	510 / 103
	CD (nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	—	580 / -0,46	554 / -0,84
			492 / +0,16	470 / +0,05
			306 / +0,68	303 / +0,55
	ESR A (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹) / g	—	202 / 2,207	204 / 2,177



Az általam vizsgált ligandumok [CuLH₃] összetételű komplexek UV-spektrális paramétere – ellentétben az előzővel – már nem utalnak jelentősebb szerkezeti különbségre az egyszerűbb tetrapeptidekhez képest.

Érdekes eredmény volt, hogy az összes „Asn-típusú” ligandum CD-spektrumsorozatában jelentkezett egy pozitív Cotton-effektus a 480-500 nm körüli hullámhossz tartományban – hasonlóan az Ac-SSNN Cu(II)-komplexeinek spektrumaihoz (31. ábra).. A szokatlan mintázat az aszparagin oldalláncok valamilyen részvételét irányozza elő a koordinációban. Úgy tűnik, ebben a pH-tartományban nem ugyanolyan három nitrogén donor koordinálódik a Cu(II)-ionhoz, mint az egyszerűbb tetrapeptidek esetében.

A 15. táblázatban félkövérrel szedett paraméterek arra is rámutatnak, hogy az NH₂-AAH-OH ligandum négynitrogén Cu(II)-komplexének szerkezete nagy hasonlóságot mutat az Asn-típusú ligandumaink komplexeinek koordinációs módjával, legalábbis a spektrumok lefutása és adatai alapján ez látszik. (Az NH₂-AAH-OH esetében NH₂, 2N⁻, N⁻_{im} típusú kötőmódot azonosítottak, azaz a 3. helyen lévő oldallánc is részt vett a koordinációban).¹⁸⁷

Ennek alapján nem zárhatjuk ki, hogy az aszparagin-oldallánc amidcsoportja deprotonálódik és koordinálódik a Cu(II)-ionhoz. Hasonló koordinációs környezetet írtunk le és bizonyítottunk az 5.1.1.5. fejezetben az Ac-SSNN ligandum esetében annak két-, három és négynitrogén komplexeire vonatkozóan.

Érdemes szót ejteni arról is, hogy az NH₂-VRSS-Cu(II)-rendszerben a [CuLH₃] részecske nagyfokú preferenciája figyelhető meg (28. ábra, 14. táblázatban). Adatainkból az tűnik ki, hogy a triszerin és az NH₂-VRSS esetében a 3. és/vagy a 4. helyen lévő szomszédos szerin-oldalláncok a pK(H₋₁/H₋₂) és a pK(H₋₂/H₋₃) értékek csökkenését okozzák. Ennek magyarázatára kézenfekvő volna azt feltételezni, hogy a két szomszédos szerin-oldallánc közreműködik a Cu(II)-ion koordinációjában, de sem a CD-, sem az ESR-spektrumok, sem pedig a korábbi irodalmak nem támasztják alá ezt a feltételezést. A jelenség egyik magyarázatául szolgálhat a szerin-oldallánc OH-csoportjának elektronszívó karaktere, valamint a C-terminuson lévő karboxilcsoport hiánya. Az elektronszívó tulajdonságú hidroxilcsoport közvetve ugyanis elősegítheti a szomszédos amidcsoport deprotonálódását, ilyen típusú molekulán belüli

kölcsönhatás feltételezésével már találkoztunk az Ac-SSNN DFT-eredményeinek taglalásánál, emellett azonban a biokémiai szakirodalomban is jól ismertek ilyen „oldallánc-kölcsönhatások, együttműködések” (pl. *katalitikus triád*). A második helyen lévő szerin is növelheti az (NH_2 , N^-) koordinációjú komplex stabilitását, ahogy azt láttuk a NH_2 -SSNN és NH_2 -SSNA ligandumok és triszerin esetében.

Másrészről fontos lehet azt is figyelembe venni, hogy az összehasonlításként szerepeltetett három egyszerűbb tetrapeptid esetében a szabad karboxilcsoport jelenléte megváltoztatja a komplex töltését, a karboxilcsoport jelenléte azonfelül hozzájárulhat a kétnitrogénes és háromnitrogénes komplexek kiemelkedő stabilitásához. Az NH_2 -VRSS esetében ráadásul nem számolhatunk azzal, hogy az aszparagin-oldalláncok megnövelik a háromnitrogénes komplexek stabilitását, így a négynitrogénes komplexek kisebb pH-n is tudnak képződni.

Kísérleteinkkel demonstráltuk, hogy a szabad aminoterminussal rendelkező ligandumok esetében aszparagin-oldallánc hatására még *szerin-oldalláncok hiányában* (NH_2 -AANN) is tapasztalható stabilitásnövekedés, valamint az aszparagin-oldallánc részvételére utaló Cotton-effektus is jelentkezett. Ugyanakkor szerin-oldalláncok jelenlétében (NH_2 -SSNN, NH_2 -SSNA) kifejezettebb volt a hatás, nagyobb volt a stabilitásnövekedés és intenzívebb a pozitív Cotton-effektus is.

Ezen eredményekkel és vizsgálatokkal egyben a terminálisan védett patkány amilin fragmensek oldalláncainak szerepére/részvételére vonatkozó megállapításainkat is alátámasztottuk (*ld. 5.1.1.5. fejezet*).

5.1.2.2. Az NH_2 -VRSSNN és mutánsainak vizsgálata

Ahhoz, hogy jobban megértsük az SSNN-szekvenciaszakasz szokatlan hatásának mibenlétét, további információkat nyerhettünk az NH_2 -VRSSNN és mutánsainak, az NH_2 -VRSSAA, valamint az NH_2 -VRAANN vizsgálatából (6/2. ábra). A deprotonálódási állandókat és a Cu(II)-komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás vizsgálatokkal határoztam meg, és a 16. táblázatban foglaltam össze az adatokat.

16. táblázat: A vizsgált hexapeptidek deprotonálódási állandói és a Cu(II)-komplexek stabilitási állandói ($\log \beta_{\text{pqr}}$), $T = 298 \text{ K}$, $I = 0.2 \text{ M}$ (KCl) ekvimoláris rendszerben

Species	NH_2 -VRSSNN	NH_2 -VRSSAA	NH_2 -VRAANN
[HL]	7,50(3)	7,53(2)	7,55(2)
[CuL]	3,76(18)	4,22(8)	4,11(9)
[CuH ₁ L]	-0,61(1)	-0,69(1)	-0,65(1)
[CuH ₂ L]	-7,13(5)	-7,47(2)	-7,80(2)
[CuH ₃ L]	-14,20(3)	-14,71(2)	-15,45(2)
[Cu ₂ H ₄ L]	-16,11(2)	—	—
[Cu ₂ H ₅ L]	-23,74(4)	—	—
[Cu ₂ H ₆ L]	-33,37(7)	—	—
[Cu ₂ H ₇ L]	-42,25(4)	—	—
pK(H ₁ /H ₂)	6,52	6,78	7,15
pK(H ₂ /H ₃)	7,07	7,24	7,65

Az egymagvú részecskékre kapott stabilitási állandók nagyfokú hasonlóságot mutatnak egymáshoz minhárom hexapeptid esetében. A $[\text{CuL}]$ komplex minden esetben igen kis koncentrációban volt mérhető, a rendszerben alapvetően a $[\text{CuLH}_{-1}]$, $[\text{CuLH}_{-2}]$, $[\text{CuLH}_{-3}]$ összetételű komplexek voltak jelen nagyobb mennyiségben.

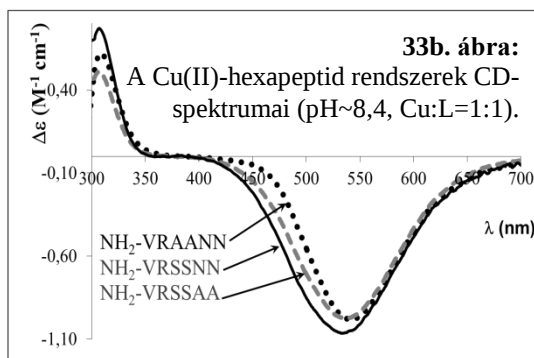
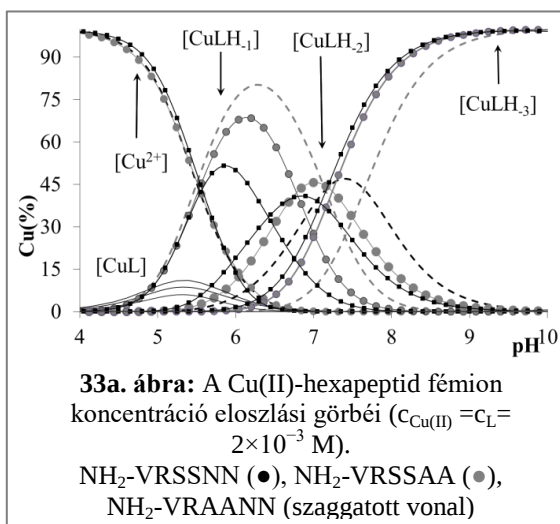
Továbbá megállapítható, hogy a stabilitási állandók és az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódási állandói legjobban az NH_2 -VRSS ligandum értékeivel vethetőek össze (14. táblázat).

A termodinamikai adatokban jelentkező hasonlóság arra utal, hogy közösleges $[\text{NH}_2, \text{N}^-]$, $[\text{NH}_2, 2 \text{N}^-]$ és $[\text{NH}_2, 3 \text{N}^-]$ típusú koordinációs móddal számolhatunk a $[\text{CuLH}_{-1}]$, $[\text{CuLH}_{-2}]$ és $[\text{CuLH}_{-3}]$ komplexek szerkezetére vonatkozóan. Más szóval ez azt jelenti, hogy az oldalláncoknak csak kis hozzájárulása van a termodinamikai stabilitáshoz az

egymagvú komplexek esetében. Bár az oldalláncok részvétele kizárható a fémion megkötésében, ha a hexapeptidek értékeit összehasonlítjuk egymással, akkor a kisebb $\text{pK}(\text{H}_{-1}/\text{H}_{-2})$ és $\text{pK}(\text{H}_{-2}/\text{H}_{-3})$ értékekben a 3. és 4. helyen lévő szerinek OH-csoportjainak közvetett hatása mégis tükröződik (33a. ábra). A szerint nem tartalmazó hexapeptidben az amidnitrogének deprotonálódási folyamatai ugyanolyan pH tartományban játszódnak le, mint ahol az megtörténik a közösleges oligopeptidek esetében (például: $\text{NH}_2\text{-Gly}_5\text{-OH}$ $\text{pK}_{2, \text{amid}} = 6,81$ és $\text{pK}_{3, \text{amid}} = 7,89$).¹⁸⁸

A háromnitrogénes $[\text{CuLH}_{-2}]$ komplexek átfednek a két-, illetve négynitrogénes komplexekkel és így igen nehézkes pontos spektroszkópiai paramétereket rendelni ezekhez a részecskékhöz (17. táblázat).

A 33b. ábrán jól látható, hogy 480 nm körül, a karakterisztikusnak mondható pozitív Cotton-effektus nem lelhető föl a $[\text{CuH}_{-3}\text{L}]$ komplexek egyedi CD-spektrumában, ugyanakkor a háromnitrogénes, $[\text{CuH}_{-2}\text{L}]$ komplex egyedi spektrumában sem.

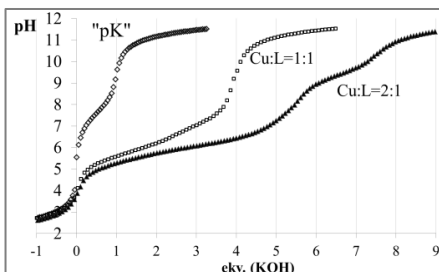


17. táblázat: A ekvimoláris hexapeptid-Cu(II) rendszerekben képződő Cu(II)-komplexek spektrális paraméterei

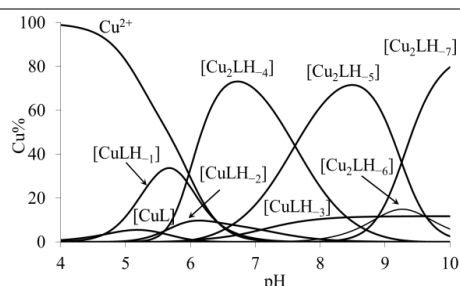
Peptid	Módszer	[CuH ₁ L]	[CuH ₂ L]	[CuH ₃ L]
NH ₂ -VRSSNN	UV-vis	652 / 78	563 / 128	517 / 189
	(nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)			
	CD	692 / -0,47	576 / -0,78	532 / -1,21
	(nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	322 / +0,42	313 / +0,78	307 / +0,83
	ESR A (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹) / g	176 / 2,256	—	206 / 2,183
NH ₂ -VRSSAA	UV-vis	673 / 70	564 / 138	520 / 194
	(nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)			
	CD	675 / -0,23	565 / -0,50	531 / -0,97
	(nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	318 / +0,29	314 / +0,39	307 / +0,45
	ESR A (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹) / g	—	—	—
NH ₂ -VRAANN	UV-vis	652 / 88	559 / 140	513 / 182
	(nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)			
	CD	679 / -0,51	552 / -0,82	537 / -1,33
	(nm / M ⁻¹ cm ⁻¹)	316 / +0,63	317 / +1,01	310 / +0,72
	ESR A (x 10 ⁻⁴ cm ⁻¹) / g	—	—	—

Mindez arra enged következtetni, hogy a hexapeptidek egymagví komplexeiben kizárható az aszparagin-tagok oldalláncainak részvétele a fémion koordinációjában. Ez a megfigyelés ugyanakkor ellentmondásban van a NH₂-SSNN, NH₂-SSNA és NH₂-AANN tetrapeptidekre kapott adatokkal, ahol az „aszparagin-szakasz” jelentékeny köreműködése volt felelős a [CuH₂L] kimagasló stabilitásáért. Minél hosszabb azonban a peptid, az aszparagin-szakasz annál messzebb esik az első három vagy négy aminosav tag nitrogéndonorjait által létrehozott csatolt kelát gyűrűktől. Ez a kötésmód lehetőséget nyújt ezen tagok szabad rotációjára, így – bár jelen vannak a poláris oldalláncok – hatásuk nem érvényesül a Cu(II)-ion koordinációs szférájában.

A Cu(II)-iont főlegesen tartalmazó minták vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy az NH₂-VRSSNN ligandum képes két ekvivalens Cu(II)-iont is oldatban tartani (16. táblázat, 34. ábra). A pH 6-7-es tartományban csekély mértékű opálosodás volt megfigyelhető, de a Cu(OH)₂ csapadék fokozatosan



34. ábra: A Cu(II)-NH₂-VRSSNN rendszerek titrálási görbéi ($c_{\text{Cu(II)}} = c_L = 3 \times 10^{-3}$ M és $c_{\text{Cu(II)}} = 1,5 \times 10^{-3}$ M $c_L = 3 \times 10^{-3}$ M)



35. ábra: A Cu(II)-NH₂-VRSSNN rendszer fémionkoncentráció-eloszlási görbéi ($c_{\text{Cu(II)}} = c_L = 3 \times 10^{-3}$ M)

visszaoldódott. A képződő részecskék pH szerinti eloszlását a 35. ábrán figyelhetjük meg.

Ezenfelül az ESR-spektrumok (36. ábra) és az ESI-MS mérések szintén bizonyították a kétmagvú részecskék létezését. A 8,4-es pH-ra beállított minták tömegspektrumában a $[\text{Cu}_2\text{LH}_5]$ összetételű komplexek jelenlétét mutattuk ki.

Az 36. ábrán három különböző pH-n felvett ESR-spektrumot hasonlítottunk össze. A a) spektrumot ekvimoláris rendszerben, pH 6,86 értéken vették fel. Bár az egymagvú részecskék átfednek, ez a spektrum leginkább a kétnitrogénes koordinációjú $[\text{CuH}_2\text{L}]$ komplexhez rendelhető. Az b) spektrum a $[\text{CuH}_3\text{L}]$ komplexhez tartozik, mely az egyetlen részecske pH 9 fölött. A c) spektrum a 2:1 arányú rendszert jellemzi, enyhén lúgos közegben (pH 9,17). Ez utóbbi spektrum megfelel a dimer részecskének.

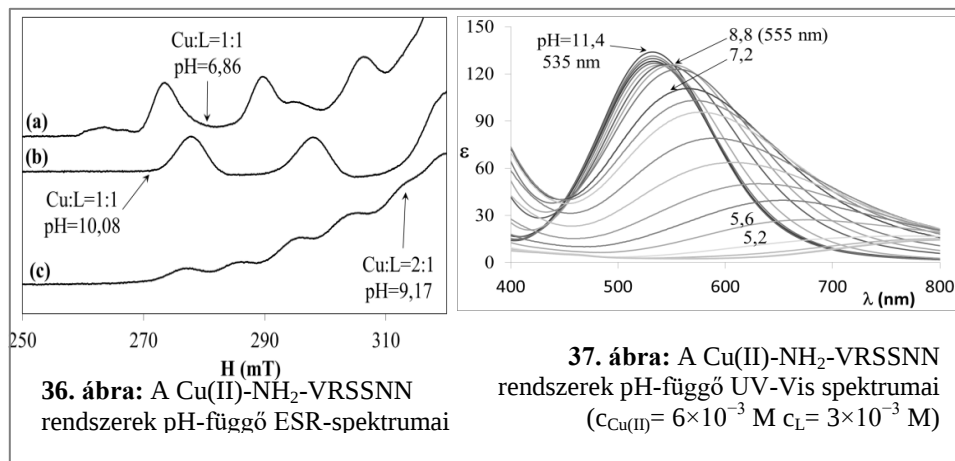
Habár az ESR és ESI-MS vizsgálatok elegendő bizonyítékot nyújtanak a kétmagvú részecskék képződésére, de a koordinációs mód karakterizálása már bonyolultabb feladat. Az ESR-spektrumok alapján (36. ábra) arra következtettek, hogy a $[\text{Cu}_2\text{LH}_5]$ komplex esetében a két Cu(II)-ion ekvivalens környezetben van, illetve két ugyanolyan, háromnitrogénes centrum a legvalószínűbb.

A 37. ábrán a fémiont főlegben tartalmazó minták különböző pH értékeken felvett UV-Vis spektrumait mutatom be. A spektrumsorozat is alátámasztja, hogy a ligandum képes két ekvivalens fémiont oldatban tartani. A 7-es pH körül az alapvonal enyhén megemelkedett kisebb mértékű csapadékképződést jelezve, de a pH 8,8 értéktől már az összes fémion koordinálódik a ligandumhoz.

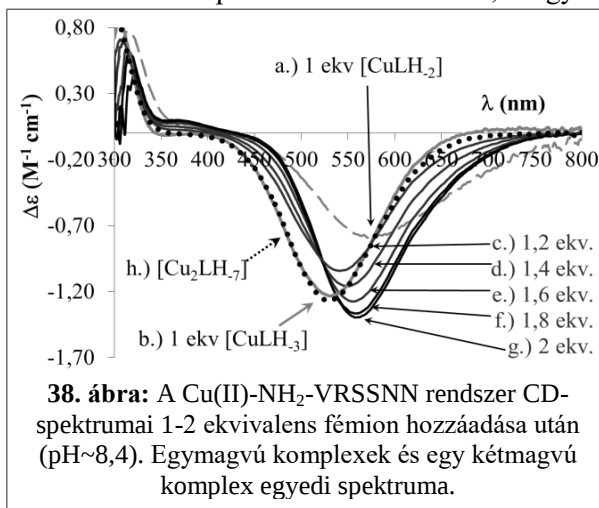
Erősen lúgos közegben 535 nm-en található az abszorpciós maximum, mely nagyobb az egyszerűbb peptidekkel képződő négynitrogénes komplexek jellemző értékénél (510 nm), míg hasonló az Ac-SSNN esetében pH 11 fölött detektált 540 nm-hez.

Minthogy az ESR-vizsgálatok egy részét és a tömegspektrometriai méréseket is pH 8-9 körüli értéken végeztük, a CD-spektrumok elemzése során is különös figyelmet szenteltünk az ebbe a pH-tartományba eső spektrumoknak.

A 38. ábrán egy olyan spektrumsorozatot szemléltetünk, melynek első tagját (a-jelű) ekvimoláris rendszerben és pH 8,4 körül vettem föl. Ezen a pH-n az



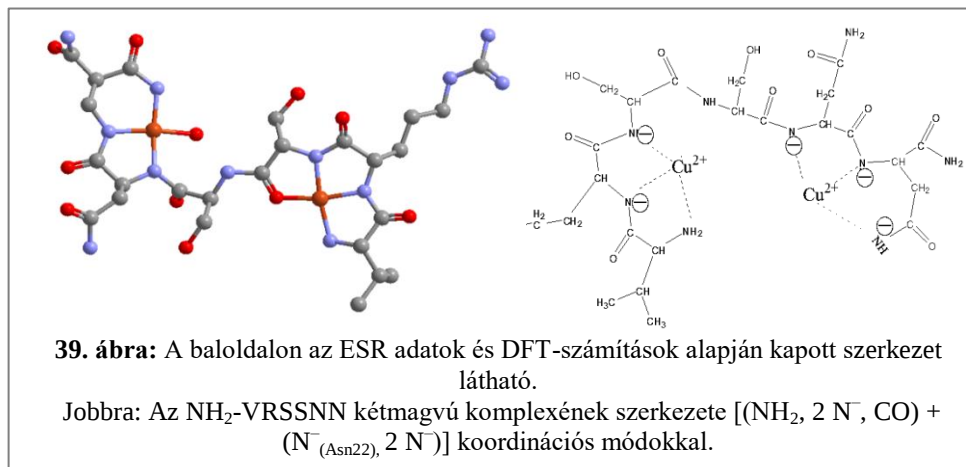
eloszlások alapján $[\text{CuLH}_2]$ komplexek vannak jelen (35. ábra) háromnitrogénes koordinációs móddal (NH_2 , N^- , N^-). A 38. ábra *b*-jelű spektruma a $[\text{CuLH}_3]$ sztöchiometriájú, négynitrogénes Cu(II) -komplex egyedi spektruma, melyben egy további amidnitrogén deprotonálódik és koordinálódik a fémionhoz. A pH állandó értéken tartása mellett 10 adagban 0,1 ekvivalens Cu(II) -oldatot adtam a mintához, majd rendre felvettem ezek CD-spektrumát. Jól látszik, hogy a spektrumok maximuma a Cu(II) -ion arányának növekedésével fokozatosan a nagyobb hullámhosszak felé tolódik (*c-g*). Két ekvivalens fémion jelenlétében és pH 8,4 értéken a CD-spektrum abszorpciós maximuma már a háromnitrogénes komplex spektrumával vethető össze (*g és a*). Lévén, hogy a *g*-jelű spektrum kétmagvú részecskét reprezentál, ezt egy-egy $[3+3]$ nitrogénes centrummal lehet értelmezni. Ezzel a következtetéssel az ESR paraméterek is jó egyezésben vannak.



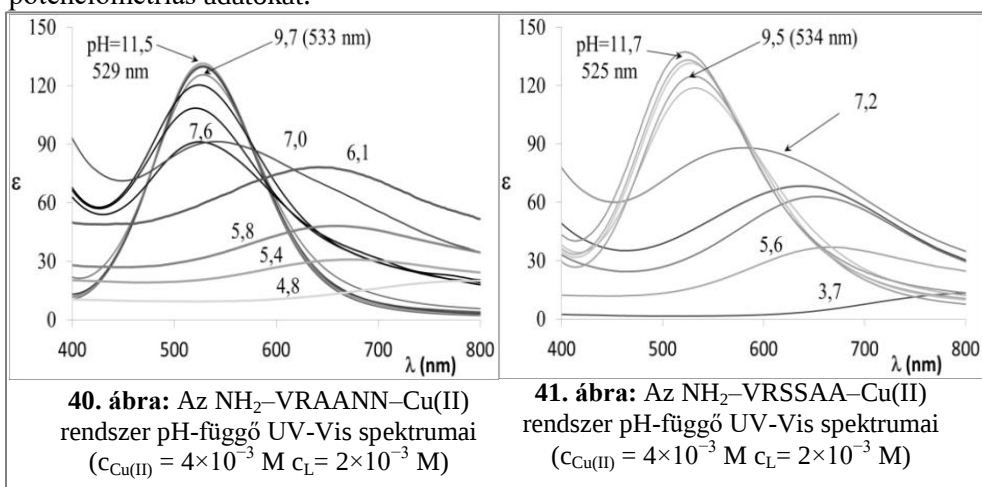
38. ábra: A $\text{Cu(II)-NH}_2\text{-VRSSNN}$ rendszer CD-spektrumai 1-2 ekvivalens fémion hozzáadása után (pH~8,4). Egymagvú komplexek és egy kétmagvú komplex egyedi spektruma.

Ugyanezen az ábrán a $[\text{Cu}_2\text{LH}_7]$ összetételű, kétmagvú komplex egyedi spektrumát is megfigyelhetjük (*h*-jelű). Lefutásában jó egyezést mutat a négynitrogénes egyedi spektrummal (*b*-jelű), így annak koordinációs módja valóban $[4+4]$ nitrogéndonorral modellezhető. Ez a komplex sztöchiometriájával is jó egyezést mutat, így ez megerősíti, hogy az SSNN-rész másodlagos kötőhely lehet.

A molekula C-terminusán történő háromnitrogénes fémionmegkötés megvalósulhat több módon, beleértve a peptidláncban lévő és az aszparagin oldallánc amidnitrogénjei által megvalósuló koordinációt is (39. ábra).



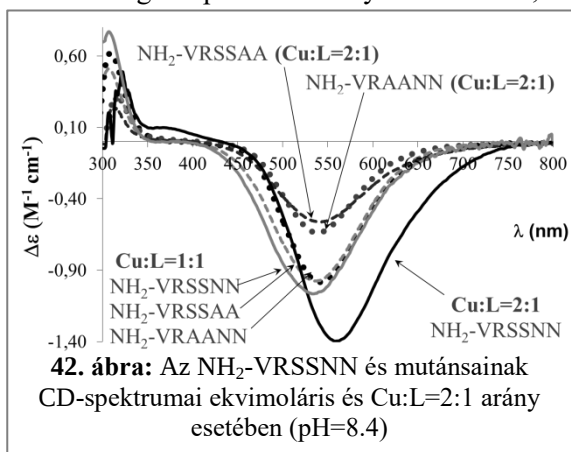
Mindkét mutáns ($\text{NH}_2\text{-VRSSAA}$ és $\text{NH}_2\text{-VRAANN}$) esetében a Cu(II) -iont **feleslegben tartalmazó mintáinak titrálása során nagy mennyiségű Cu(OH)_2 csapadék vált le 6-os pH fölött, emiatt nem lehetett kiértékelni a kapott pH-potenciometriás adatokat.**



Az UV-Vis spektrumok is jól mutatták, hogy az alapvonal jelentősen megemelkedett (40-41. ábra) Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy mindkét esetben megfigyelhető volt a csapadék visszaoldódása pH 11 fölött, jelezve, hogy mindhárom hexapeptid esetében képződhet kétmagvú részecske Cu(II) -ionnal, de az $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$ esetében ez a fiziológiás pH tartományban történik, a mutánsok esetében pedig csak az erősen lúgos közegben.

A mutánsok esetében is végeztünk MS méréseket fémionok fölöslegében, 8,4 pH-jú rendszerben is, de kétmagvú részecskéket nem tudtunk kimutatni.

A 42. ábra a három hexapeptid- Cu(II) rendszerben ekvimoláris és $\text{Cu:L}=2:1$ arányú minták esetében, a 8,4-es pH-n felvett CD-spektrumokat szemlélteti. Az



ábrán látható egyrészt három, ekvimoláris rendszerben felvett CD-spektrum (szürke vonalakkal), ezek egymáshoz jó egyezést mutatnak, minden esetben tetraglicinszerű, háromnitrogén Cu(II) -komplexek keletkeznek ezen a pH-n. Kisebb intenzitással látszik a két mutáns fémionfölösleg mintájának spektruma is (fekete vonalakkal), a CD-spektrumok lefutásából és intenzitásából arra következtethetünk, hogy csupán egymagvú komplexek képződnek, azaz csak szerin- vagy csupán aszparagin-oldalláncok jelenlétében a C-terminuson nem

alakul ki újabb kötőhely. A legnagyobb intenzitású, fekete folytonos vonallal jelölt CD-spektrum azt mutatja ugyanakkor, hogy az $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$ esetében képződnek kétmagvú komplexek, az oldat nem volt opálos, az abszorpciós maximumok pedig eltolódást is mutattak, ami a komplexek szerkezetének megváltozására utal.

A Cu(II) -ion főlegében végzett vizsgálatok által az aszparagin-oldallánc koordinációban való részvételét más oldalról is bizonyítottuk a hasnyálmirigy szöveteit jellemző pH-tartományban. A Cu(II) -ion számára az N-terminus az elsődleges kötőhely, ugyanakkor az -SSNN- domén még a terminális aminosoport mellett is másodlagos kötőhelyként funkcionálhat.

Megállapítottuk azt is, hogy sem a szerin-oldalláncok, sem az aszparagin-oldalláncok külön-külön, önmagukban nem képesek a fémion számára másodlagos kötőhelyet kialakítani, szükséges mind a négy aminosavtag (SSNN) jelenléte a koordinációhoz.

5.1.2.3. Az $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$ vizsgálata

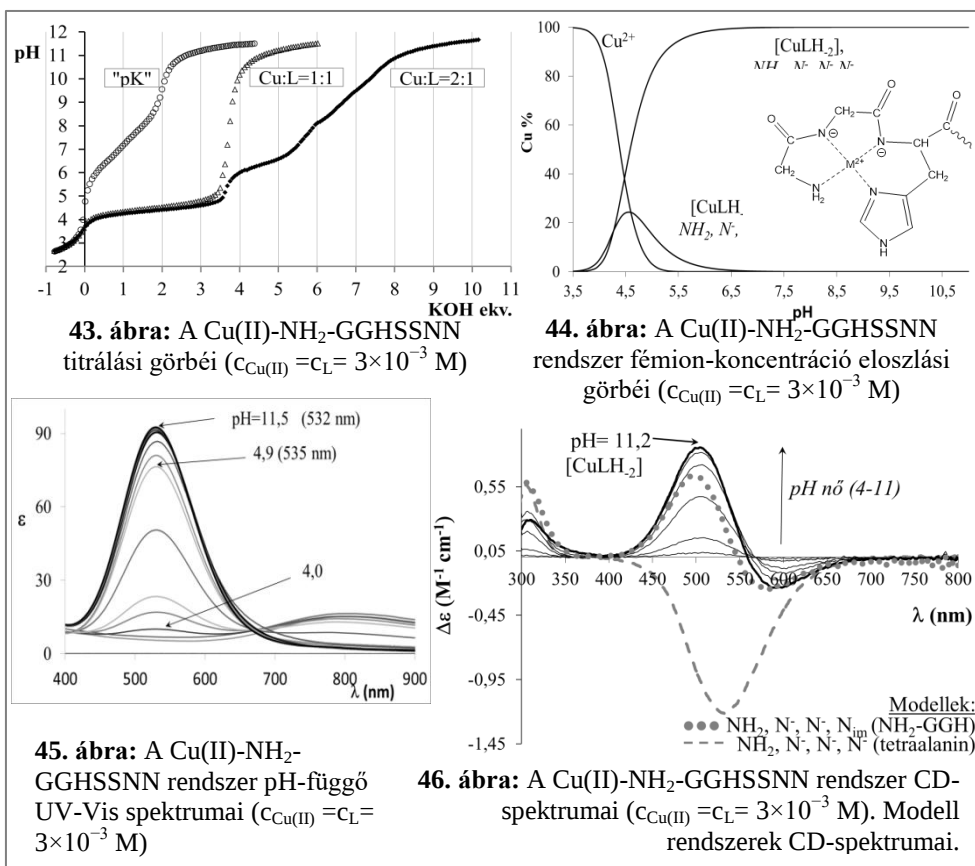
A $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$ (6/2. ábra) heptapeptid tulajdonképpen a humán amilin és a patkány amilin elemeit is tartalmazza. Megtalálható benne ugyanakkor a nagy hatékonyságú fémionkötőhely, az ún. albumin-típusú (a továbbiakban: *albuminszerű*) kötőhely. A peptid vizsgálatával szerettük volna egyrészt bizonyítani az SSNN-domén fémionkötő képességét, valamint a lehetséges kötőhelyek összehasonlítására is törekedtünk.

18. táblázat: Az $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$ deprotonálódási állandói és a Cu(II) -komplexek stabilitási állandói ($\log \beta_{\text{pqr}}$), $T = 298 \text{ K}$, $I = 0.2 \text{ M}$ (KCl)

Species	$\log \beta_{\text{pqr}}$	UV-vis $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	CD $\lambda_{\text{max}}/\Delta\epsilon$	ESR $A_{\text{H}}(\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}) / g_{\text{H}}$
[HL]	7,91(1)	–	–	
[H ₂ L]	14,19(1)	–	–	
[CuHL]	11,43(31)	–	–	
[CuH ₁ L]	3,41(5)	–	–	
			590 / –0,24	
[CuH ₂ L]	–0,82(4)	530 / 93	500 / +0,85 306 / +0,30 276 / –0,25	198 / 2,192
[Cu ₂ H ₄ L]	–11,14(19)	–	–	
[Cu ₂ H ₅ L]	–19,12(19)	–	–	
[Cu ₂ H ₆ L]	–27,84(13)	534 / 103	574 / –0,55 491 / +0,42	

Az 18. táblázat tartalmazza a ligandum deprotonálódási állandóit és a fémionkomplexek stabilitási állandóit, valamint azok spektroszkópiás adatait.

A vizsgált ligandum a várakozásainknak megfelelően ekvimoláris rendszerben az $\text{NH}_2\text{-XXH}$ szekvenciájú peptidekhez hasonló komplexkéimiai viselkedést mutatott.¹⁸⁷ A 18. táblázat és a 44. ábra is mutatja, hogy a két peptidvázbeli amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja kooperatív úton

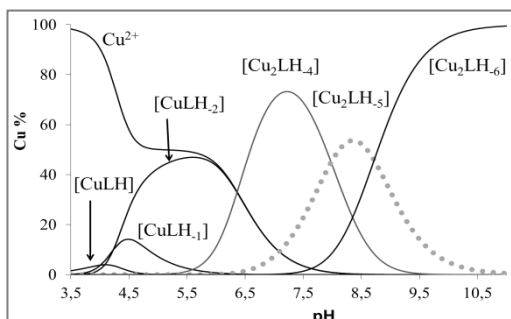


megy végbe.¹⁸⁹ Az (NH₂, N⁻, N⁻, N_{im}) koordinációjú komplexek széles pH-tartományban uralkodóak. A [CuHL] és [CuH₋₁L] komplexek stabilitási állandója szintén számolható, de ezek a részecskék elhanyagolható mennyiségben vannak jelen az enyhén savas tartományban. Az uralkodó [CuH₋₂L] komplex spektrális paraméterei jó egyezésben vannak a már közölt, hasonló szekvenciájú peptidek adataival. Mindez azt jelenti, hogy ekvimoláris rendszerekben a Cu(II)-ion számára az N-terminus az elsődleges kötőhely és az aszparagin- és szerin-oldalláncoknak (illetve magának az SSNN-szekvenciának) nincs hozzájárulása a Cu(II)-komplexek stabilitásához. Az ún. albumin-domén igen hatékony kötőhely a fémion számára, és a jelenlévő SSNN-szekvencia poláris oldalláncainak együttese sem képes ezt a hatást felülmúlni vagy módosítani.

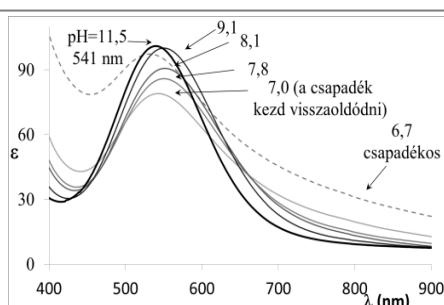
A 45. ábrán a spektrofotometriás spektrumokat szemléltetem. Jól látszik, hogy az eloszlási görbéknek megfelelően már pH 4 fölött kialakul a négynitrogénes albumin kötőmódú komplex, mely uralkodó lesz a teljes vizsgált pH-tartományban. A CD-spektrumokon (a 46. ábrán) összehasonlításképp feltüntettem az NH₂-GGH négynitrogénes Cu(II)-komplexének spektrumát, valamint a tetraalanin szabályos (NH₂, 3N⁻) kötőmódját reprezentáló spektrumot is. A folytonos vonalak az NH₂-GGHSSNN Cu(II)-komplexeinek különböző pH-n felvett spektrumait jelölik. Világosan látszik az ábrán, hogy ligandumunk

négynitrogénes komplexének szerkezete az albuminszerű szerkezettel modellezhető ekvimoláris rendszerben.

Érdekes eredmény volt azonban, hogy ez a ligandum **a Cu(II)-iont főlösléghben** tartalmazó rendszerben képes volt egy második ekvivalens Cu(II)-iont megkötni (43. ábra). A spektrofotometriás spektrumok is mutatják, hogy 6-7-es pH körül megemelkedett az alapvonal, illetve a mérések során szabad szemmel is látható volt a csapadékképződésre utaló opálosság (48. ábra). A csapadék azonban pH 7,8 fölött itt is fokozatosan visszaoldódott, és a kiértékelés során kétmagvú részecskékkel sikerült modellezni a komplexképződési folyamatokat (47. ábra).



47. ábra: A Cu(II)-NH₂-GGHSSNN rendszer fémion-koncentráció eloszlási görbéi ($c_{\text{Cu(II)}} = 6 \times 10^{-3}$ M; $c_{\text{L}} = 3 \times 10^{-3}$ M)



48. ábra: A Cu(II)-NH₂-GGHSSNN rendszer pH-függő UV-Vis-spektrumai ($c_{\text{Cu(II)}} = 6 \times 10^{-3}$ M; $c_{\text{L}} = 3 \times 10^{-3}$ M)

Az opálós-csapadékos tartomány adatai természetesen nem megbízhatóak, de ez a csapadék a releváns pH-tartományban visszaoldódott, így erre a tartományra nézve eredményeink már informatívak lehetnek.

A [Cu₂LH₄], [Cu₂LH₅], [Cu₂LH₆] kétmagvú komplexek értelmezése során azonban mindenképpen felvetődik, hogy a második ekvivalens fémiont az SSNN-szakasz köti-e meg.

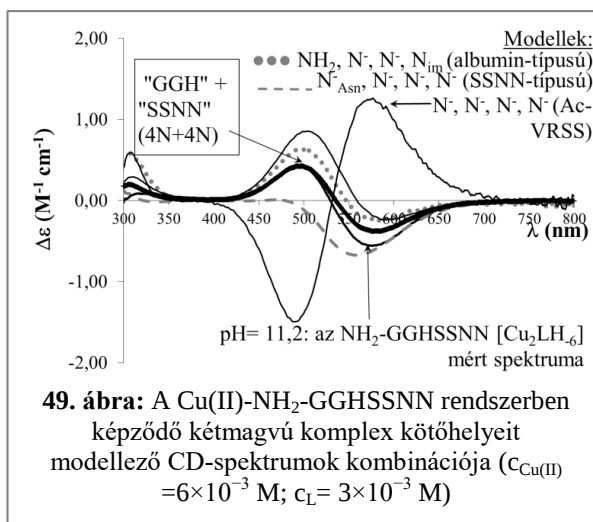
Az erősen lúgos közegben felvett UV-Vis spektrumokban 541 nm-en jelentkezik az abszorpciós maximum, ez az eddigiekben az SSNN-részhez történő koordinációt jellemezte.

A kötőhelyek hozzárendelésének érdekében a fémiont főlösléghben tartalmazó mintáink esetében felvett CD-spektrumokat olyan spektrumokkal hasonlítottam össze, melyeket a megfelelő modellrendszerek CD-spektrumainak kombinációjával állítottam elő.

A kétmagvú részecskék képződése meglehetősen kicsi spektrális változással járt együtt, így megbízható paramétereket csak a pH 10 fölött uralkodó részecskére vonatkozóan lehetett nyerni ([Cu₂LH₆]).

A spektrumok kombinációjakor az albumin-típusú kötőhelyet és az „SSNN-típusú” kötőhelyet modellező rendszerek egyedi spektrumait adtam össze különböző százalékos arányban. Az így kapott, a mért spektrummal legjobb egyezésben lévő görbét mutatom be az 49. ábrán. Eredményeinkből látszik, hogy

mindkét Cu(II)-ion négy nitrogénhez kötődik a ligandum esetében, és a második ekvivalens Cu(II)-ion kötőhelye modellezhető az SSNN-típusú kötőhellyel is. Hozzá kell azonban tenni, hogy a heptapeptid szerkezetében van elég peptidvázbeli amidnitrogén, így nem szükségszerű az oldalláncok részvétele a koordinációba. Ezt a lehetőséget ellenőriztük, és megállapíthattuk, hogy az így kapott kombinációs spektrum lefutása egyáltalán nem egyezik a mért spektrumával, gyakorlatilag tükörképe annak. Mindebből nyilvánvaló, hogy sikerült egy újabb módon bizonyítanunk az SSNN-szekvencia szokatlan Cu(II)-ion kötő képességét.



A fémion kétszeres mennyiségben tartalmazó rendszer Cu(II)-komplexének CD-spektrumait elemezve azt is bizonyítottuk, hogy az SSNN rész az irodalomból jól ismert, nagy hatékonyságú albumin-kötőhely mellett is képes a másodlagos kötőhely szerepét betölteni.

Ezen eredmények nagyban megerősítik a deprotonálódott aszparagin oldallánc(ok) részvételét a fémion megkötésében, akár csak az előbb tárgyalt ligandumokra (NH₂-SSNN, NH₂-AANN, NH₂-VRSSNN) vonatkozó eredmények.

5.1.3. Szabad N-terminusú mutánsok vizsgálata Ni(II)- és Zn(II)-ionnal

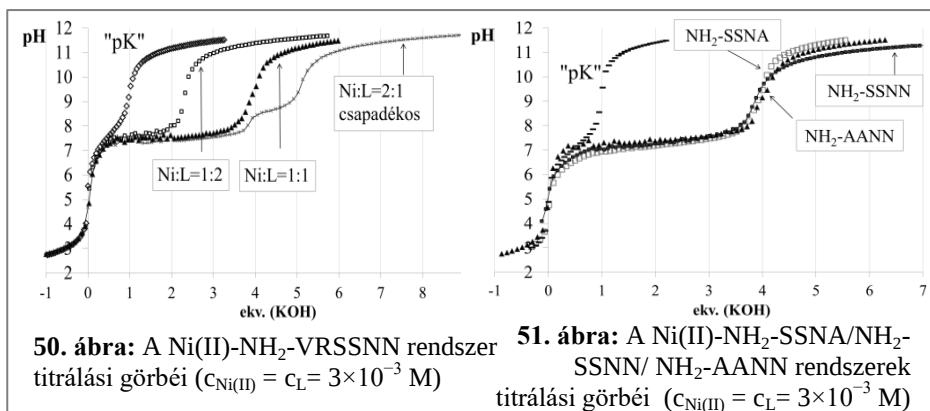
Ugyanezen fragmensek egy jelentős részét az egyes oldalláncok sajátos komplexkéimiai szerepének felderítésére, illetőleg megerősítő és összehasonlító információk nyerésének céljából az élettani szempontból jelentős Ni(II)-ion és Zn(II)-ion jelenlétében is tanulmányoztuk.

5.1.3.1. Patkány amilin mutánsok vizsgálata Ni(II)-ionnal

Kiindulva az irodalmi adatokból és a Cu(II)-ionnal végzett vizsgálatok eredményeiből, a ligandumoknak csak egy bizonyos körét ($\text{NH}_2\text{-SSNN}$, $\text{NH}_2\text{-AANN}$, $\text{NH}_2\text{-SSNA}$, $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$, $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$) vizsgáltuk Ni(II)-ion jelenlétében is, hiszen ezek is választ adhatnak alapvető kérdéseinkre a poláris oldalláncok szerepére vonatkozóan.

Elsőként a ligandumok és a Ni(II)-iont is tartalmazó rendszerek pH-potenciometriás vizsgálatát végeztük el (50-51. ábra).

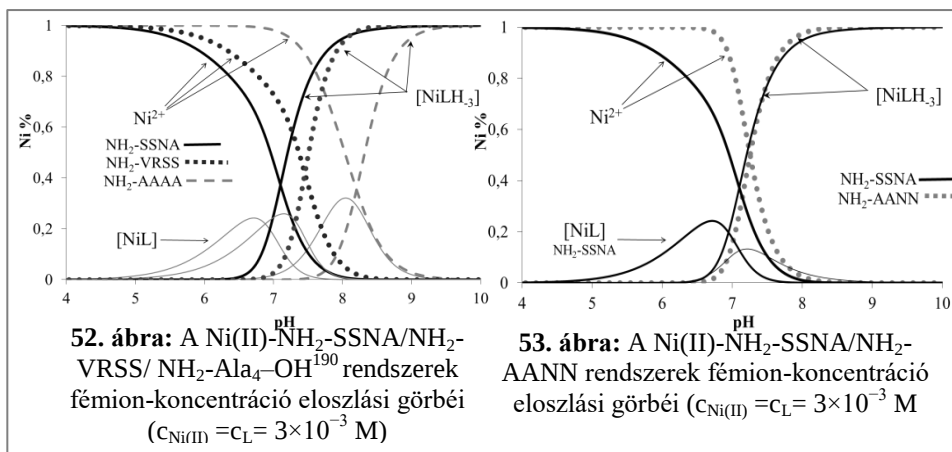
Az 1:1 és 1:2 Ni(II)-ion-ligandum arányú rendszerek pH-potenciometriás titrálásával meghatározott Ni(II)-komplexek stabilitási állandóit a 19. táblázatban gyűjtöttük össze.



A Ni:L=1:1 és a Ni:L=1:2 összetételű minták esetében a pH növelésével az oldat fokozatosan megsárgult, ez jelezte, hogy komplexképződési folyamatok játszódtak le pH 7 fölött. A titrálási görbék extra lúgfogyásai és a kiértékelés alapján is egymagvú komplexek képződésre következtethettünk, biszligandumú részecskék még Ni:L=1:2 arányú rendszerekben sem képződtek.

A titrálási görbéken az is jól látható, hogy a Ni(II)-komplexekre jellemző geometriaváltás is végbemegy, melynek következményeként oktaéderesből síknégyszetes geometriájú komplexek képződnek. A görbe hosszú vízszintes szakasza alapján – az irodalmi tapasztalatokkal is egybehangzóan – az amidnitrogének kooperatív deprotonálódására és koordinációjára következtethettünk. A kapott adatokból az állapítható meg, hogy a

tanulmányozott ligandumok komplexképzése jó egyezést mutat az egyszerűbb tetrapeptidekkel.^{190,191} A hisztidint nem tartalmazó ligandumok esetében a fő komplex a $[\text{NiLH}_3]$ összetételű komplex, amelyben a terminális aminocsoport és három amidnitrogén koordinációja valósulhat meg. A köztes állapotú komplexek képződése nem jellemző. A hisztidintartalmú ligandum ($\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$) adatai ugyancsak jó egyezésben vannak a megfelelő modell szakirodalmi adataival (az $\text{NH}_2\text{-GTHS}$ és $\text{NH}_2\text{-GGH}$ ligandumával).



A koncentráció-eloszlási görbék (52-53. ábra) azt mutatják, hogy a Ni(II) -ion esetében is (hasonlóan a Cu(II) -peptid rendszerekben tapasztaltakkal) a poláris oldalláncok helyzete és száma meghatározó. Minél több poláris oldallánc van a horgonyként funkcionáló aminoterminushoz közel, annál inkább növekszik a megfelelő komplexek stabilitása és rendre kisebb pH-tartományba tolódnak a komplexképződési folyamatok.

Ebből arra következtethetünk, hogy az aszparagin- és szerin-oldalláncok jelenléte elősegíti a komplexképződést, az amidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását. A pH-potenciometriás vizsgálatokkal tehát kimutattuk, hogy az SSNN-szekvencia és az aszparagin-oldalláncok szokatlan hatása a Ni(II) -ion komplexeiben is érvényesül.

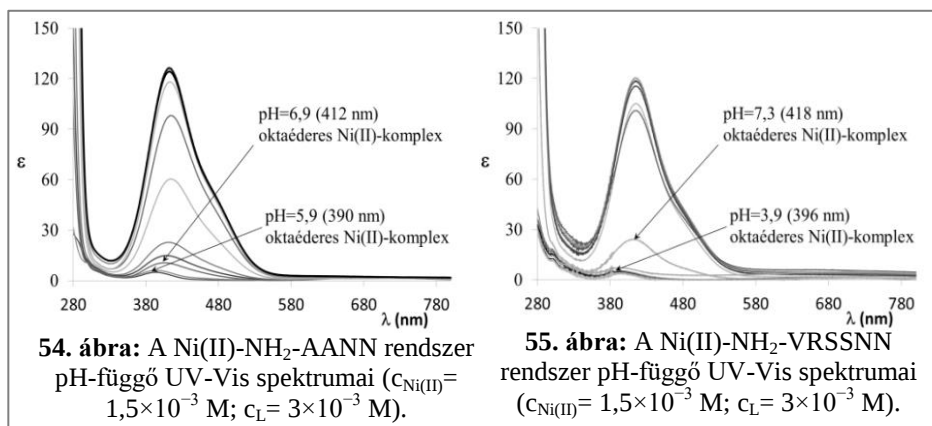
Spektrofotometriás vizsgálatok

A vizsgált ligandumok fémiont is tartalmazó mintáinak ($\text{Ni:L}=1:1$ és $\text{Ni:L}=1:2$ arány) UV-Vis vizsgálatát is elvégeztük. Az 54. ábrán az AANN- Ni(II) rendszer UV-Vis spektrumai láthatóak. Az oktaéderez Ni(II) -akvakomplexek kis intenzitású sávja 390 nm körül jelentkezik; a pH növelésével viszont mindkét fémion/ligandum arányú rendszer esetében láthatóvá válik a jellemzően 412 nm körül jelentkező abszorpciós maximum, ami a síknégyszetes, négynitrogénes, tetraglicinszerű kötésmóddal megvalósuló komplexek képződését támasztja alá.

19. táblázat: A vizsgált Ni(II)-komplexek stabilitási állandóinak összehasonlítása egyszerűbb oligopeptidek Ni(II)-komplexeinek stabilitási állandóival ($\log \beta_{\text{pqf}}$), T = 298 K, I = 0.2 M (KCl)

	NH ₂ ⁻ VRSSNN	NH ₂ ⁻ SSNN	NH ₂ ⁻ SSNA	NH ₂ ⁻ AANN	NH ₂ -SSS- OH	NH ₂ ⁻ GGHSSNN	NH ₂ ⁻ GTHS ₁₉₃	NH ₂ ⁻ GGH ₁₉₂	NH ₂ ⁻ Ala ₁₉₀ ⁻ OH	NH ₂ ⁻ Gly ₁₉₁ ⁻ OH
pK(COOH)	—	—	—	—	3,09(1)	—	—	—	3,52	3,18
pK(N_{im})	—	—	—	—	—	6,29 (2)	6,27	6,82	—	—
pK(NH₃⁺)	7,50 (3)	6,92 (1)	7,00 (2)	7,83 (1)	7,13(1)	7,98 (2)	7,95	8,06	8,13	7,97
[NiLH]	—	—	—	—	—	—	—	11,35	—	—
[NiL]	2,88 (4)	—	2,65 (7)	3,67 (7)	2,87(9)	—	4,67	—	—	3,65
[NiLH₁]	—	—	—	—	—	-1,08 (9)	—	—	-4,97	-4,45
[NiLH₂]	—	—	-11,56(4)	—	-11,25(5)	-6,15 (1)	-6,45	-6,83	—	—
[NiLH₃]	-19,08 (4)	18,99(7)	-18,42(2)	-18,55 (3)	—	-16,49 (4)	-17,6	—	21,29	-20,90
pK₁(amid)	7,32	nem számolh.	7,02	7,41	7,06	—	5,56	6,06	—	8,1
pK₂(amid)						5,07			8,16	8,23
pK₃(amid)						10,34				

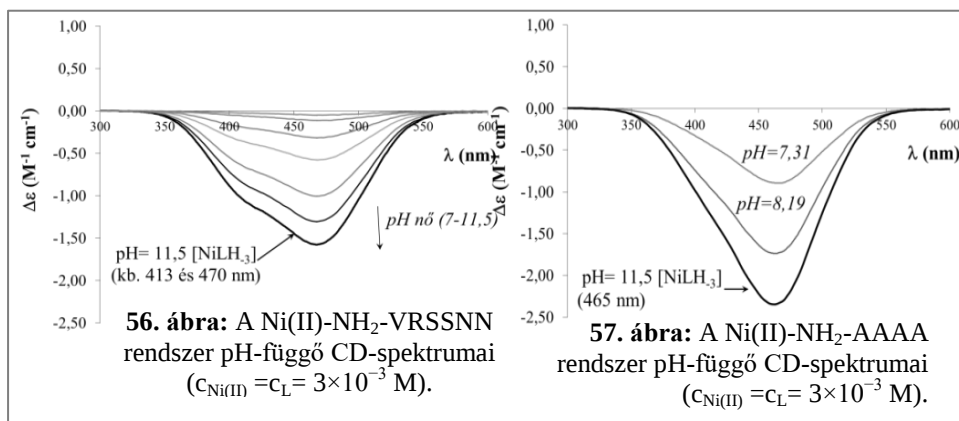
A pH-függő spektrumok egyféle komplex jelenlétére utalnak pH 7 és 11 között, ami egyezésben van a $[\text{NiLH}_3]$ sztöchiometriájú részecske uralkodó jelenlétével ebben a pH-tartományban (52-53. ábra). Mind az $\text{NH}_2\text{-SSNN}$, mind az $\text{NH}_2\text{-SSNA}$ ligandum hasonló módon viselkedett, így egyező komplexképződési folyamatokra és hatásokra következtethetünk.



Az 55. ábrán az is jól látható, hogy a szintén poláris oldalláncokat is tartalmazó $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$ ligandum négynitrogénes Ni(II) -komplexéhez ugyancsak egy 417 nm-es abszorpciós maximum rendelhető. Ez alapján, úgy tűnik, hogy nincsen jelentősebb szerkezetbeli különbség akkor, ha van jelen aszparagin oldallánc a koordinációs szférában, vagy ha nincsen jelen.

CD-spektroszkópiás vizsgálatok

A spektrofotometriás vizsgálatok mellett a ligandum- Ni(II) rendszerek CD-spektroszkópiás vizsgálatát is elvégeztük. Összehasonlításképpen egy egyszerűbb tetrapeptid, az $\text{NH}_2\text{-AAAA-OH-Ni(II)}$ rendszer spektrumait is fölvevük különböző pH-kon (57. ábra). Az adatok alapján a Cu(II) -komplekekhez hasonló tendencia látszik, itt is két csoportra oszthatóak a ligandumok a komplexképződési folyamatok jellegének szempontjából. Az egyik csoport az ún.



tetraglicinszerű komplexkémiail viselkedést mutató ligandumoké ($\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$ és az összehasonlításként szereplő $\text{NH}_2\text{-AAAA-OH}$). A másik csoportot pedig ezúttal is az eltérő komplexkémiail viselkedést mutató, az aszparagint a horgonycsoporthoz közel (3. helyen) tartalmazó ligandumok ($(\text{NH}_2\text{-SSNN}, \text{NH}_2\text{-AANN}, \text{NH}_2\text{-SSNA})$) képezik. Ez utóbbi csoport CD-görbéit az $\text{NH}_2\text{-AANN}$ spektrumsorozatával szemléltetem (58. ábra).

Szembetűnik, hogy az „Asn-típusú” ligandum(ok) esetében jelentkezik egy pozitív Cotton-effektus 400 nm körül, ami a tetraglicinszerűen viselkedő ligandumok esetében nem jelenik meg a spektrumokban (56. és 57. ábra). Ezen csúcs intenzitása a pH növelésével növekszik, de nem tolódik el.

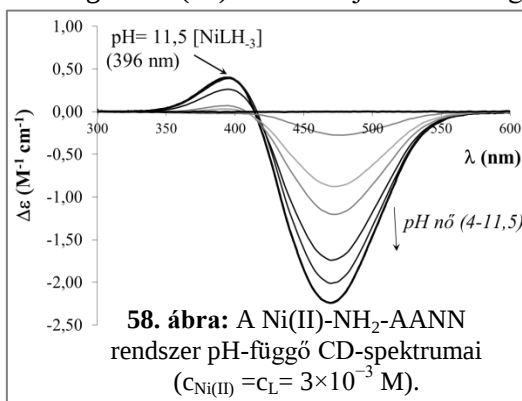
Az „Asn-típusú” ligandumok CD-spektrumaiból az is látszik, hogy a pozitív Cotton-effektus megjelenése a 3. helyen lévő aszparagin-oldallánchoz köthető.

A mutánsok ($\text{NH}_2\text{-AANN}$, $\text{NH}_2\text{-SSNA}$) vizsgálatával további bizonyítékot nyertünk arra vonatkozóan, hogy az aszparagin-oldallánc okozza a fragmensek/mutánsok szokatlan viselkedését, de a szerin-oldalláncok befolyásoló/módosító hatással bírnak, ezen ligandumok esetében ugyanis nagyobb intenzitású volt a jellemző sáv (59. ábra).

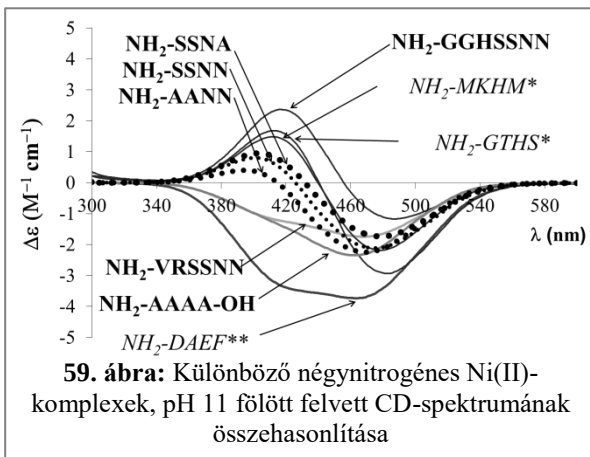
Ha az SSNN-szakasz a horgonyként szolgáló terminális aminocsoporttól viszont távolabb helyezkedik el (az $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$ ligandum esetében), akkor hatása a Ni(II) -tartalmú rendszerekben sem mutatható ki hasonlóan a Cu(II) -rendszerekhez.

Korábbi rendszereinkben, védett és nem védett peptidek Cu(II) -komplexeinek CD-spektrumában minden esetben megfigyelhető volt egy karakteres CD-sáv.

Figyelembe véve, hogy 420 nm körül csak olyan peptidek Ni(II) -komplexeinek CD-spektrumában jelenik meg pozitív sáv, melyek esetében az oldallánc részt vesz a fémion koordinálásában, méréseink alapján az aszparagin-oldallánc részvételére következtethetünk. Eddigi eredményeinkkel ez összhangban van, és további bizonyítékként alátámasztja az aszparagin oldallánc részvételét a koordinációban – még Ni(II) -ion esetében is.



58. ábra: A $\text{Ni(II)-NH}_2\text{-AANN}$ rendszer pH-függő CD-spektrumai ($C_{\text{Ni(II)}} = C_L = 3 \times 10^{-3}$ M).



59. ábra: Különböző négynitrogén Ni(II) -komplexeik, pH 11 fölött felvett CD-spektrumának összehasonlítása

Az 59. ábrán különböző ligandum-Ni(II) rendszerek CD spektrumainak összehasonlítása látható.

Minden esetben olyan spektrumokat választottunk, melyek a Ni(II)-ion négynitrogén, síknégyszetes komplexeihez rendelhetők. Az $\text{NH}_2\text{-xxNy-Ni(II)}$ komplexek egyedi spektrumait más Ni(II)-peptid rendszerek ($\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$, $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$, $\text{NH}_2\text{-AAAA-OH}$, $\text{NH}_2\text{-GTHS}^{193(*)}$, $\text{NH}_2\text{-MKHM}^{193(*)}$, $\text{NH}_2\text{-DAEF}^{194(**)}$) megfelelő pH-n felvett spektrumaival összevetve az is jól látszik, hogy ha az oldallánc (hisztidin, aszparagin) részt vesz a fémion megkötésében, akkor megjelenik a pozitív sáv 400-420 nm körül. A másik csoportot az olyan ligandumok négynitrogén Ni(II)-komplexeinek CD-spektrumai jelentik, mely esetében vagy nincs a molekulában koordinálódó oldallánc, vagy jelenléte ellenére nem vesz abban részt. Ezekben a spektrumokban csak negatív Cotton-effektus jelenik meg. Az „Asn-típusú” ligandumok mindegyikében azonban pozitív Cotton-effektus is detektálható a megfelelő hullámhossz tartományban.

A spektrumokat összehasonlítva és figyelembe véve a más, korábban vizsgált aszparagintartalmú peptidok Cu(II)- és Ni(II)-komplexeire kapott eredményeket, arra következtethetünk, hogy az $\text{NH}_2\text{-xxNy}$ ligandum eltérő módon köti meg a Ni(II)-iont, mint az egyszerűbb molekulák. Úgy tűnik, hogy az oldallánc valamilyen módon jelen van a Ni(II)-komplexek koordinációs szférájában.

A Ni(II)-iont főlegben tartalmazó mintáink mérése során azt találtuk, hogy az $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$ ekvimoláris rendszerében a megszokott módon az N-terminus szolgáltatja az elsődleges kötőhelyet, de egynél több ekvivalens Ni(II)-iont ez a ligandum nem volt képes oldatban tartani, Ni(OH)_2 vált ki az oldatból. Szemben a Cu(II)-ionnal – a Ni(II)-ion nem volt képes előidézni a C-terminuson lévő SSNN-domén aszparagin-oldalláncainak deprotonálódását és koordinációját.

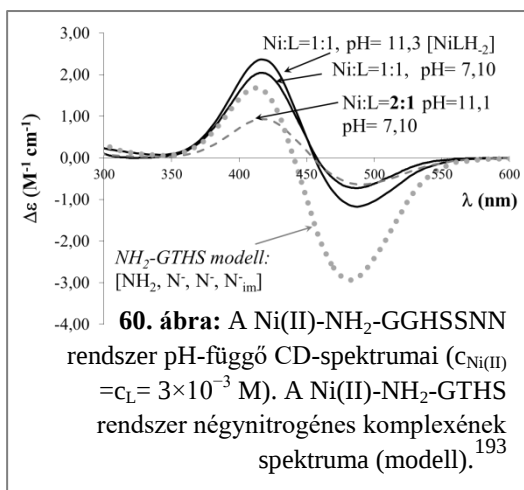
5.1.3.2. Az $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$ vizsgálata Ni(II)-ionnal

Munkánk során arra is kíváncsiak voltunk, hogy vajon az SSNN-szekvencia az albumin-domén mellett szolgálhat-e másodlagos kötőhelyként a Ni(II)-ion számára is hasonlóan a Cu(II)-ionhoz.

Az $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$ esetében – szakirodalmi adatok alapján is – az előző ligandumcsoportéhoz képest más típusú folyamatok várhatóak, hiszen ez a ligandum tartalmazza a nagy hatékonyságú ATCUN-motívumot. A pH-potenciometriás vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy ekvimoláris rendszerben a kapott adatok megfelelnek a várakozásainknak, albuminszerű koordinációjú komplexek képződtek, az ezeket jellemző stabilitási állandók is összemérhetőek voltak az összehasonlításként feltüntetett $\text{NH}_2\text{-GTHS-Ni(II)}$ és a $\text{NH}_2\text{-GGH-Ni(II)}$ rendszerek irodalmi adataival (19. táblázat).

Eredményeinkkel egyértelműen kimutattuk, hogy ekvimoláris rendszerben a Ni(II)-ion számára kizárólagosan az albumin-domén kínálikozik kötőhelyként, melyet a CD-spektrumok ismert modellekkel történő összehasonlítása is alátámasztott (60. ábra).

A Ni(II)-iont főlegben tartalmazó minták esetében ugyanakkor Ni(II)-hidroxid csapadék képződését tapasztaltuk mind a pH-potenciometriás titrálás, mind pedig a spektroszkópiás vizsgálatok során. A csapadék eltávolítása után felvett CD-spektrumban eltolódást nem tapasztaltam, lefutásuk megegyezik az egymagvú komplexek spektrumával (60. ábra). Mindez arra utal, hogy a Cu(II)-ionnal ellentétben a Ni(II)-ion számára nem szolgálhat másodlagos kötőhelyként az SSNN-szakasz és a Ni(II)-ion nem képes előidézni a C-terminális aszparagin-oldallánc(ok) deprotonálódását és koordinációját még albumin-típusú kötőhely jelenlétében sem.



5.1.3.3. Az NH₂-SSNA vizsgálata Zn(II)-ionnal

A Zn(II)-ion esetében jóval gyengébb koordináló képességre számítottunk, éppen ezért a kevés poláris oldalláncot tartalmazó ligandumokkal nem végeztünk méréseket. Arra voltunk kíváncsiak, hogy Zn(II)-ion jelenlétében tapasztalunk-e eltérő koordinációs kémiai viselkedést az egyszerű oligopeptidekhez képest, illetve hogy a Zn(II)-ion képes-e elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását a szokatlan sajátságokat mutató SSNx-oldallánc együttes hatására.

A Zn(II)-NH₂-SSNA rendszerben várakozásainknak megfelelően az enyhén savas pH-tartományban, pH 5 fölött [ZnL] összetételű komplexek képződtek az aminos csoport és a szomszédos karboniloxigén részvételével. Ennél nagyobb pH-n azonban a fémion hidroxidcsapadékként kivált az oldatból. A 61. ábrán látható titrálási görbén bekarikázott töréspont jól demonstrálja, hogy a szakirodalmi tapasztalatoknak megfelelően pH 7 fölött a Zn(II)-ion hidrolízist szenved.

Az köztudott, hogy ez a fémion nem képes az egyszerű peptidok amidnitrogénjének deprotonálódását előmozdítani, eredményeink alapján azt találtuk, hogy még az SSNx-poláris oldalláncok által létrehozott sajátos környezetben sem mehet végbe azok deprotonálódása.

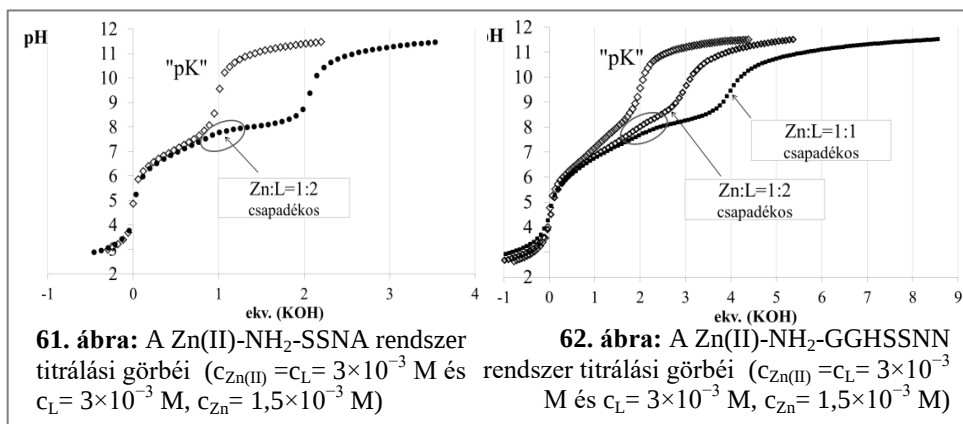
A Zn(II) nem képes erős kölcsönhatást kialakítani az SSNx-szakasszal.

5.1.3.4. Az NH₂-GGHSSNN vizsgálata Zn(II)-ionnal

A 62. ábra a különböző NH₂-GGHSSNN-Zn(II) arányú rendszerek titrálási görbéjét szemlélteti. Hasonlóan az előző tanulmányozott ligandumhoz ezúttal is csapadékképződést tapasztaltunk az oldatok titrálása során – mind ekvimoláris,

mind pedig ligandumfőlölesleges rendszerekben. A töréspont szintén jól kivehető a görbéken pH 7 fölött.

Az $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN-Zn(II)}$ rendszerben sem mutattuk ki az SSNN-szakasz extra hatását, csupán az irodalomban már leírt (NH_2 , N_{im}) koordinációs módú komplexek képződését igazoltuk. A 7-es pH fölött ebben a rendszerben is Zn(OH)_2 csapadék vált ki az oldatból.



Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy sem az aszparagin-oldalláncok, sem az SSNx-szekvencia, sem pedig az „albumin”+”SSNN” motívumok együttesen nem elégségesek a Zn(II) -ion fiziológias és enyhén lúgos (pH 8-9) tartományban történő oldatban tartására, koordinálására. Így általánosan elmondhatjuk, hogy az SSNN szekvencia hatása a komplexképződési folyamatokra a $\text{Cu(II)} > \text{Ni(II)} > \text{Zn(II)}$ sorrendben csökken.

20. táblázat: Az $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$ és az $\text{NH}_2\text{-SSNA}$ ligandumok deprotonálódási állandói, illetve Zn(II) -komplexeinek stabilitási állandói ($\log \beta_{\text{pqr}}$, $T = 298 \text{ K}$, $I = 0.2 \text{ M (KCl)}$) A javasolt koordinációs módokat is feltüntettük.

	$\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$	Koordinációs mód	$\text{NH}_2\text{-GTHS}^{193}$
pK (N(im))	6,29 (2)	–	6,25
pK (NH_3^+)	7,98 (2)	–	7,95
[ZnHL]	10,61(3)	N_{im}	–
[ZnL]	3,78(1)	NH_2 , N_{im}	4,46
[ZnLH ₋₁]	–3,76(1)	hidroxokomplex	–3,29

	$\text{NH}_2\text{-SSNA}$	Koordinációs mód	$\text{NH}_2\text{-SSS-OH}$	$\text{NH}_2\text{-Gly}$
pK (COO^-)	–	–	3,09(1)	–
pK (NH_3^+)	7,00 (2)	–	7,13 (1)	8,02 ¹⁹⁵
[ZnL]	2,79 (22)	NH_2 , CO	2,46 (7)	3,28 ¹⁹⁶
[ZnLH ₋₁]	–4,60 (12)	hidroxokomplex	–5,14(3)	–

5. 2. A HUMÁN AMILIN Cu(II)-ION KÖTŐHELYÉNEK MODELLEZÉSE

Munkánk negyedik vizsgálati csoportját a terminálisan védett *humán amilin fragmensek mutánsai* (Ac-AAAHSSNN, Ac-AAAHAAAA) képezték, melyek Cu(II)-komplexeinek tanulmányozásával szerettünk volna választ kapni arra, hogy a patkány és a humán amilin eltérő plak-képzési hajlama együttjár-e eltérő koordinációs kémiai sajátságokkal. Arra is kíváncsiak voltunk, hogy van-e eltérés a fémion-kötőhely(ek) jellegében a két amilin esetében.

Méréseinket Cu(II)-ionnal végeztük, eddigi eredményeink alapján ezzel a fémionnal volt várható a legnagyobb mértékű kölcsönhatás.

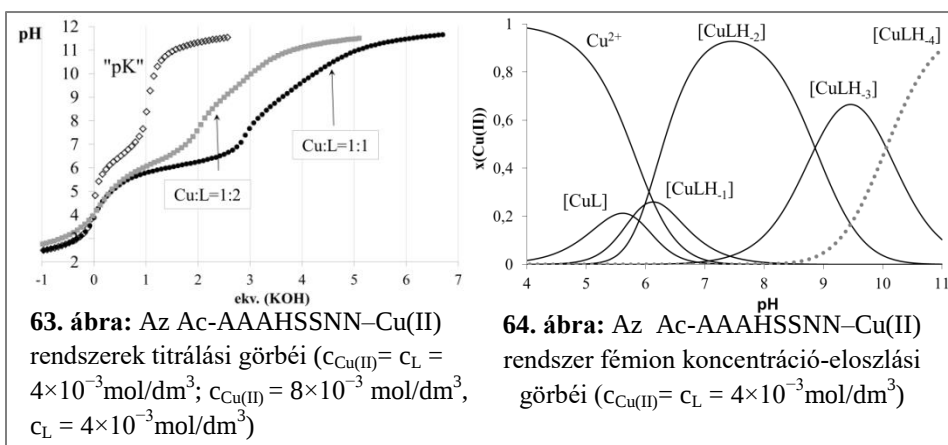
Mint az irodalmi szakaszban utaltam rá, a humán amilin vizsgálata igen nehézkes annak nagy aggregációs hajlama és a hisztidin előtti apoláris szakasz (Ac-ANFLVHSSNN) miatt, amely miatt a peptidek igen kis vízdékonyságúak.

Mindezek miatt kutatócsoportunkban szintetizáltuk egy mutánsát, az Ac-AAAHSSNN ligandumot. Összehasonlítási célból az egyhisztidines kötőhelyet (N_{im} , 3 N_{amid}^-) modellező mutánszt, az Ac-AAAHAAAA oktapeptidet is előállítottuk (6/3. ábra).

Az NH_2 -GGHSSNN ligandum vizsgálata során meglepő eredmény volt, hogy bár az aminoterminus az elsődleges fémkötőhely, az SSNN-szekvencia másodlagos kötőhelyként képes volt a Cu(II)-ion megkötésére. Minthogy azonban a természetes szekvenciának ezen szakaszában nincs szabad aminocsoport, ezért az Ac-AAAHSSNN és az Ac-AAAHAAAA ligandumok vizsgálatával a humán hormon és patkány hormon, valamint a két kötőhely valódi összehasonlítását végezhetjük el.

5.2.1. Az Ac-AAAHSSNN ligandum vizsgálata

Elsőként ezúttal is a pH-potenciometriás vizsgálat eredményeit taglalom. A ligandumot egy pK érték jellemzi, mely a hisztidin oldalláncának deprotonálódásához rendelhető (21. táblázat). A Cu(II)-ion 1:1, valamint 1:2 fémion-ligandum arányú mintáinak titrálási görbéit a 63. ábra szemlélteti. A fémiont Cu:L=2:1 arányban tartalmazó oldatok titrálása során csapadékkiválást észleltünk, így a pH-potenciometriás mérések során arra következtettünk, hogy ez a ligandum nem képes két ekvivalens fémion koordinálására. Önmagában nem volt meglepő ez az eredmény, hiszen korábbi eredményeink tükrében az SSNN-típusú kötőhely pH 8 fölött képes koordinálni a Cu(II)-iont, és ezen a pH-n már a Cu(II)-ion hidrolízisével kell számolnunk.



21. táblázat: Az Ac-AAAHSSNN ligandum deprotonálódási állandója, illetve Cu(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\log \beta_{\text{pqr}}$, $T = 298 \text{ K}$, $I = 0.2 \text{ M}$ (KCl))

A javasolt koordinációs módokat is feltüntettük.

	Ac-AAAHSSNN–NH ₂	Koordinációs mód
HL	6,38 (1)	–
[CuL]	3,02(16)	N _{im} (+CO)
[CuLH ₁]	–2,77(7)	N _{im} , N [–]
[CuLH ₂]	–8,76(5)	N _{im} , N [–] , N [–]
[CuLH ₃]	–17,62(7)	N _{im} , N [–] , N [–] , N [–]
[CuLH ₄]	–27,68(7)	átrendeződés → izomerek

A pH 5,5 fölött tapasztalt extra lúgfogyás az amidnitrogének és/vagy oldalláncok koordinációjára utal. A pH-potenciometriás adatok szoftveres kiértékelést követően a 21. táblázatban feltüntetett modellel jellemeztük a rendszert. A 22. táblázatban az eddigi tapasztalataink és a szakirodalmi ismeretek alapján feltételezett koordinációs módokat is összegyűjtöttük.

A [CuLH₂], [CuLH₃] összetételű részecskék képződése könnyen értelmezhető mindezek alapján; három és négynitrogénes koordinációs móddal, illetőleg egyhisztidines (3N[–], N_{im}) koordinációval. Enyhén savas és semleges pH-n az imidazolnitrogén szolgál horgonycsoportként, ennek koordinációját a peptidvázbeli amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja követi. Ha

22. táblázat: A lehetséges négynitrogénes koordinációs módok és modelljeik*

N _{im} , N-terminus felé: 3 N [–] _{amid}	egyhisztidines kötőhely, Ac-FKHV, Ch-PrP(Ac122-125NH ₂) ¹⁸¹ és Ac-GTHS, HuPrP(Ac94-97NH ₂) ¹⁸¹
N [–] _{Asn} , 3 N [–]	SSNN-kötőhely (rIAPP 19-22)
4 N [–] _{amid}	Ac-PHGGGWGQ: HuPrP(Ac84-91NH ₂) ¹⁸⁰
N _{im} , C-terminus felé: 3 N [–]	Ac-PHAAA ¹⁹⁷
N _{im} , 2 N [–] _{amid} , N [–] _{acetamid}	Ac-HVH ¹⁸²
3 N [–] _{amid} , N [–] _{láncvégi} vagy acetamid	Ac-VRSS

*A N[–]_{amid} vagy az egyszerűsített N[–] jelölés peptidvázbeli amidnitrogénre értendő.

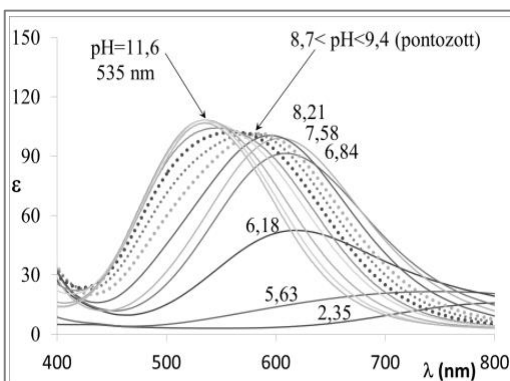
megfigyeljük a 64. ábrán lévő eloszlási görbéket, akkor feltűnik a $[\text{CuLH}_4]$ összetételű komplex is. Sztöchiometriája alapján további egy deprotonálódott csoportra következtethetünk, illetve izomer-átrendeződés valószínűsíthető.

A spektrofotometriás mérések során minden Cu(II) -ligandum rendszerben a pH növelésével a λ_{max} értékek kisebb hullámhosszak felé történő eltolódását tapasztaltuk (65. ábra). A pH 11 fölött felvett spektrumok abszorpciós maximuma 535 nm-es értéken végződik, mely eddigi szakirodalmi tapasztalataink alapján négynitrogénes, SSNN-szerű koordinációra utal a leginkább. Szembetűnő az is, hogy a pH 8,5-10 tartományban regisztrált spektrumokat széles abszorpciós maximum jellemzi, ami megerősíti az izomerek jelenlétének lehetőségét.

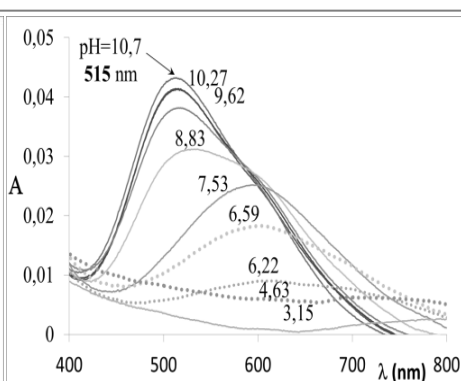
Az összehasonlítás céljából előállított Ac-AAAHAAA ligandum spektrofotometriás spektrumai tökéletes egyezést mutattak a megfelelő prion- és amiloid- β modellekével (Ac-FKHV, Ac-SKTKNAKHA,¹⁹⁸ Ac-DAEFRH, A β -1-6¹⁹⁹); az imidazolnitrogén és három peptidvázbeli amidnitrogén koordinálódik az N-terminus irányában (66. ábra). A 65. és az 66. ábrát összevetve is észrevehető, hogy az Ac-AAAHSSNN ligandum esetében a (3N^- , N_{im}) koordináción túl is számolnunk kell egy vagy több extra folyamattal.

Ugyanezen rendszerek esetében CD-vizsgálatokat is végeztünk, hogy pontosabb szerkezeti információkat szerezhessünk a komplexekben koordinálódó donoratomokról. Az ligandumfölsőleget tartalmazó (67. ábra) és az ekvimoláris (68. ábra) oldat CD-görbéin is feltűnő a pH 7-10 között felvett spektrumok összetettebb jellege. Az enyhén savas és semleges pH-tartományban a szakirodalmi előzményeknek megfelelő lefutású és spektrális adatokkal rendelkező görbéket kaptunk. A 69. ábrán ismert modellekkel vetettük össze a pH 7 körüli görbéinket, és jól látszik, hogy a hisztidines kötőhely a kedvezményezett az (N_{im} , 3N^-) típusú koordinációs móddal.

A 70. ábrán és a 22. táblázatban felsorolt lehetséges modellek négynitrogénes Cu(II) -komplexeinek CD-spektrumai hasonlítottak össze. Sötétebb vonallal



65. ábra: Az Ac-AAAHSSNN– Cu(II) rendszer pH-függő UV-Vis spektrumai ($c_{\text{Cu(II)}} = c_{\text{L}} = 4 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)



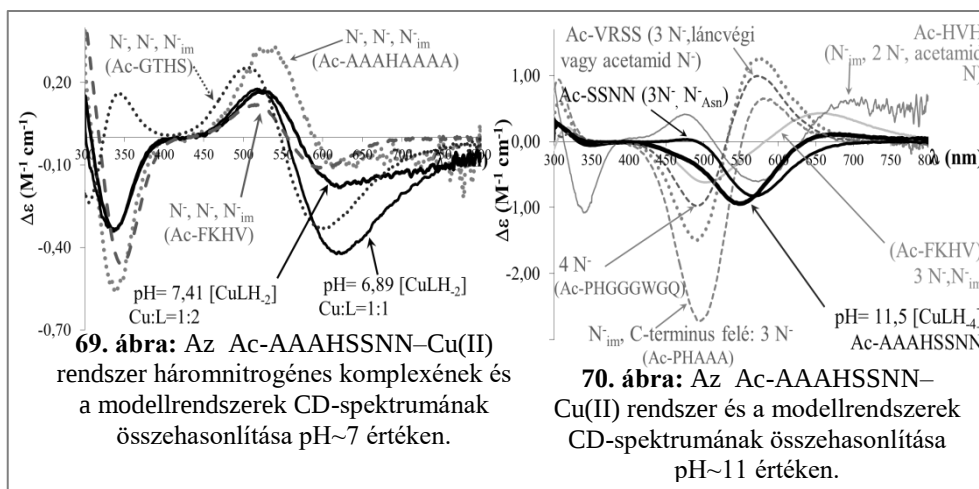
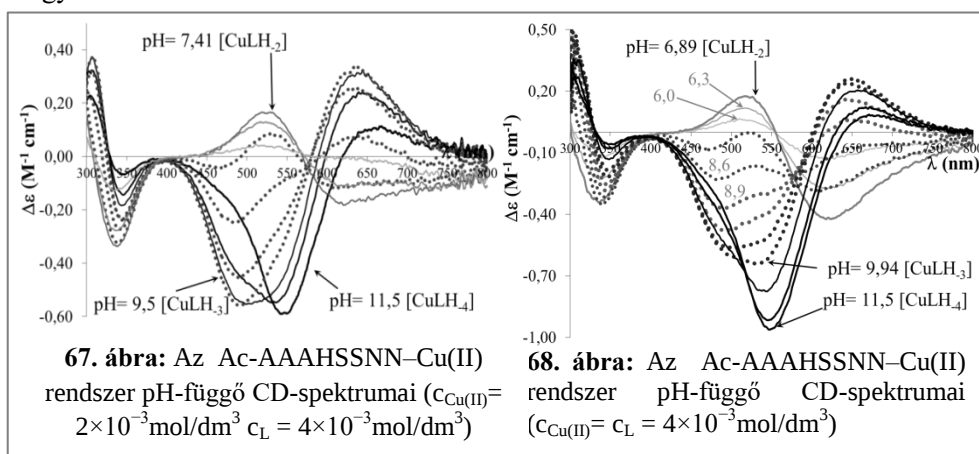
66. ábra: Az Ac-AAAHAAA– Cu(II) rendszer pH-függő UV-Vis spektrumai ($c_{\text{Cu(II)}} = c_{\text{L}} = 4 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

jelöltem az Ac-AAAHSSNN Cu(II)-komplexével leginkább egyező lefutású modell spektrumát.

Noha nem beszélhetünk kiváló egyezéstről, az mégis jól látszik, hogy az SSNN-típusú kötőhely szignifikánsan megjelenik a komplexekben. Mindezek alapján az erősen lúgos tartományban egy (N_{im} , $3N^-$) típusú és az SSNN-típusú kötőhely között oszlik meg a fémion. Ki kell emelnünk, hogy ez az átrendeződés nem csak ekvimoláris rendszerben, hanem ligandumfölségben is jelentkezik, bár kisebb mértékben (67. ábra).

Annak érdekében, hogy számszerűsíthető adatokat is nyerjünk az izomerek egymáshoz viszonyított arányára vonatkozóan, a két kötőhelyet modellező CD-görbéket különböző százalékos arányban kombináltuk egymással. Ehhez a csupán alanin- és hisztidin-oldalláncot tartalmazó Ac-AAAHAAAA ligandum megfelelő spektrumait használtuk, hiszen azt találtuk, hogy ez is tökéletesen modellezi az (N_{im} , $3N^-$) típusú kötőhelyet, viszont egyszerűbb oldalláncokat tartalmaz.

Ezúttal egy olyan pH-t választottunk, mely az élőszervezet szempontjából is releváns, így információt nyertünk arra vonatkozóan, hogy pH 9 körül a ligandum mely részein és milyen arányban kötődik a Cu(II)-ion. A legjobb egyezést a 71. ábra szemlélteti.

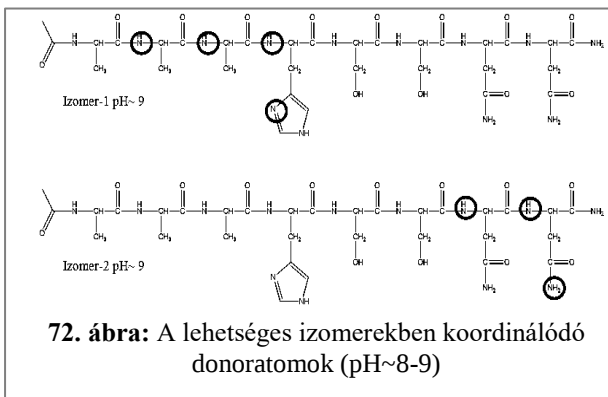
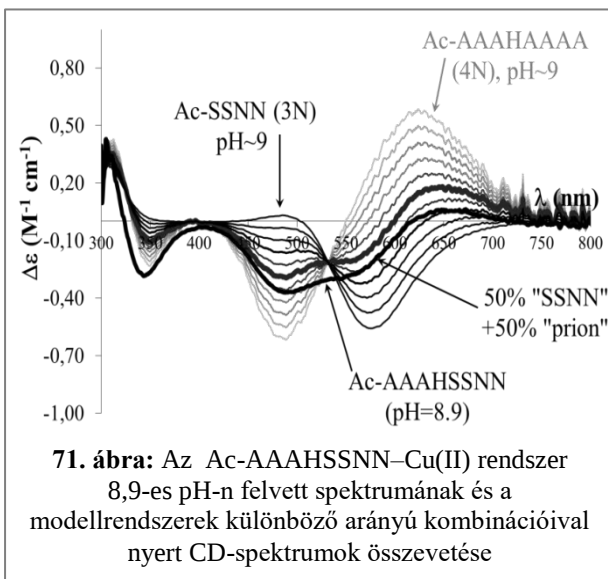


Ugyanitt feltüntettem a modellek spektrumát is, illetve ezek kombinációját 10%-onként változtatva hozzájárulásukat a feketével jelölt, mért (Ac-AAAHSNN [CuLH₃] pH=8,9) spektrumhoz.

Érdekes eredményt kaptunk, mely szerint a (N_{im}, 3N⁻) típusú és az SSNN-kötőhely között tulajdonképpen egyenlő arányban oszlik meg a Cu(II)-ion.

Kiindulva abból, hogy a hisztidin köztudottan jó fémkötőhely, alapvetően az SSNN-szakasz kisebb hozzájárulása volt a valószínűbb. Érdekes ehhez azonban hozzáfűzni azt is, hogy a hisztidin-oldallancának koordinálódása inkább a fiziológias, pH 7 körüli tartományban jellemző.

Az olaszországi együttműködésünk keretében a tanulmányozott ligandum-Cu(II) rendszerek ESR-vizsgálatát is elvégezték. A nyert adatokat a 23. táblázatban gyűjtöttük össze. Az aszparagintartalmú eddigi ligandumainkhoz hasonlóan ezúttal is szokatlan, nem „szabályos” szerkezetre utaló paramétereket kaptunk. Ekvimoláris rendszerben a pH 11 fölött felvett ESR-spektrumok leginkább az NH₂-GTHS-Cu(II) rendszer koordinációs módjára utalnak (N_{im} 3N⁻), ugyanakkor nem teljes az egyezés.



23. táblázat: Az Ac-AAAHSNN oktapeptid ⁶³Cu(II)-komplexeinek ESR paraméterei
(Az A_z értékek 10⁻⁴ cm⁻¹ egységben értendők.)

pH	g _z	A _z
5,61	2,356	163,4
7,52	2,235	165,6
11,3	2,194	204,7

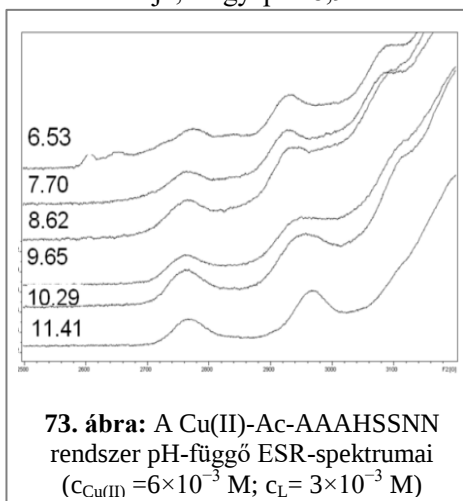
Az ESR-mérések ugyanakkor más, meglepő információt is szolgáltatottak. Annak ellenére, hogy a pH-potenciometriás vizsgálataink során **fémionfölösleg esetén** csapadékkiválást tapasztaltunk, az ESR-vizsgálat (73. ábra) során azt találták, hogy képes a ligandum két ekvivalens Cu(II)-ion oldatban tartására.

(Megjegyzendő, hogy hasonló jelenséget az NH_2 -VRSSNN, NH_2 -GGHSSNN rendszereiben is megfigyeltünk.)

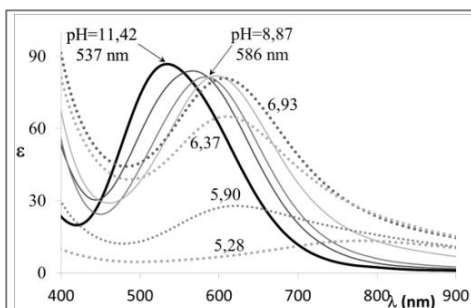
Ennek okán Cu:L=2:1 arányú rendszerek spektrofotometriás és CD-vizsgálatát is elvégeztük. A 74. ábra jól demonstrálja, hogy pH 8,9 fölött már nincs megemelkedve az alapvonal.

A 75. ábra a spektrumok fémion-koncentrációtól való függését szemlélteti pH 8 körül. A méréseket pH 8,7 és 9,4 között végeztük, és tizedekvivalens $CuCl_2$ -oldatot adagoltunk a kezdetben Cu:L=1:1 arányú mintához. Ebben a pH-tartományban – amennyiben az SSNN-rész felé történő átrendeződéssel számolunk – az SSNN-Cu(II) komplex háromnitrogénes, így ha kétmagvú részecskék keletkeznek, akkor 4N+3N koordinációra számíthatunk. A fémion koncentrációjának növekedésével vöröseltolódást tapasztaltunk, mely alátámasztja azt a feltételezést, hogy az ekvimoláris 4N fémion-centrumokat 4N+3N centrumok váltják föl 2 ekvivalens fémion jelenlétében.

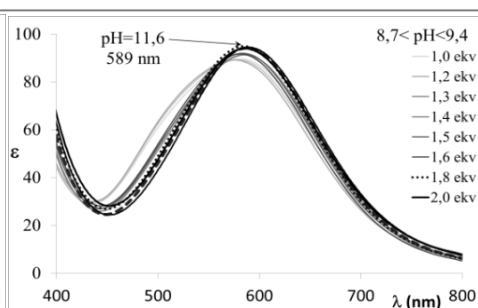
A Cu:L=2:1 arányú rendszerek CD-spektrumait is fölveztük 8,5-ös pH körül hasonlóan a UV-Vis méréshez, ebben az esetben is tizedekvivalensenként adagoltam a Cu(II)-oldatot a mintákhoz. A spektrumon jól kivehető, hogy a fémion mennyiségének növekedésével a spektrumok fokozatosan a nagyobb hullámhosszak felé tolódnak el, mely jelentékeny szerkezetváltozásra utal (76. ábra).



73. ábra: A Cu(II)-Ac-AAAHSSNN rendszer pH-függő ESR-spektrumai ($C_{Cu(II)} = 6 \times 10^{-3}$ M; $c_L = 3 \times 10^{-3}$ M)



74. ábra: A Cu(II)-Ac-AAAHSSNN rendszer pH-függő UV-Vis-spektrumai ($C_{Cu(II)} = 6 \times 10^{-3}$ M; $c_L = 3 \times 10^{-3}$ M)



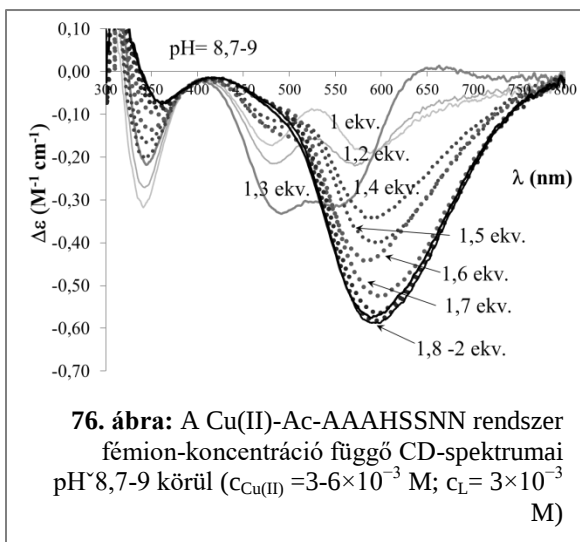
75. ábra: A Cu(II)-Ac-AAAHSSNN rendszer fémion-koncentráció függő UV-Vis-spektrumai ($C_{Cu(II)} = 3-6 \times 10^{-3}$ M; $c_L = 3 \times 10^{-3}$ M)

Annak eldöntésére, hogy a lúgos közegben főlvelt fémionfölösleges minták spektruma milyen koordinációs módú Cu(II)-centrumoknak felelnek meg, ezúttal is kombináltuk a releváns modellek spektrumait.

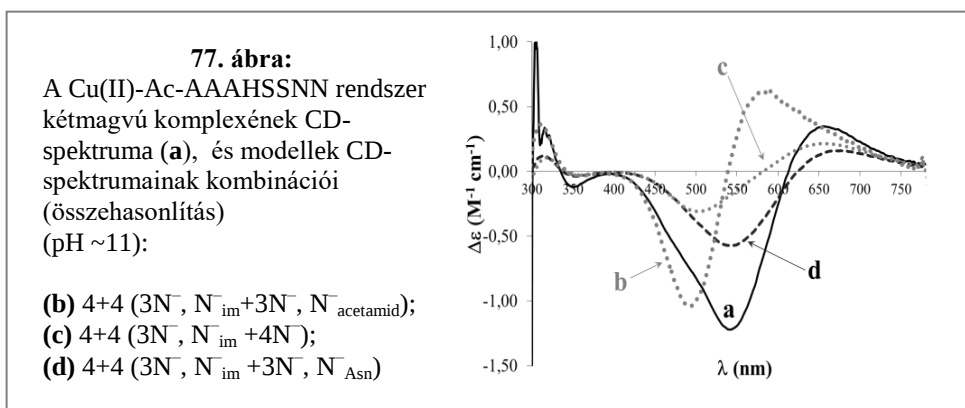
A spektrumok ilyen elemzését pH 11 fölötti rendszerek esetében végeztük el. (A 9-es pH-n jelentkező spektrum felbontását is elvégeztük, de minthogy a 8-9-es pH-tartományban a folyamatok jobban átfednek, ezért erre a rendszerre vonatkozóan nem lehet megfelelő megállapítást tenni.)

A 77. ábrán fekete, szaggatott vonal jelzi a $[(N_{im}, 3N^-)+SSNN]$ kötőhelyeket modellező spektrumot (**d-jelű**), melynek lefutása a legjobban hasonlít az Ac-AAAHSSNN kétmagvú Cu(II)-komplexéhez tartozó spektrumhoz (**a-jelű**). Az ábrán az is látszik, hogy az egyéb kötőmódok feltételezésével nem kaptunk megfelelő eredményeket (**b és c**).

Eredményeink jelentősége abban áll, hogy méréseinkkel kimutattuk, hogy az SSNN-szakasz a hisztidint tartalmazó kötőhely mellett egy új, egyenrangú fémion-koordináló helyként szolgál a humán amilin esetében lúgos közegben (pH 9 körül). Munkánk során egyértelmű különbséget találtunk a humán és a patkány amilin Cu(II)-kötőhelye(i)ben és a Cu(II)-ion megkötés módjában.



76. ábra: A Cu(II)-Ac-AAAHSSNN rendszer fémion-koncentráció függő CD-spektrumai pH 8,7-9 körül ($c_{Cu(II)} = 3 \cdot 10^{-3}$ M; $c_L = 3 \cdot 10^{-3}$ M)



6. Összefoglalás

Doktori értekezésemben és az elmúlt évek alatt végzett kutatási munkám alatt a 2-es típusú cukorbetegség kialakulásában szerepet játszó patkány és az emberi (humán) amilin 17-29 szakaszának fragmenseinek és mutánsainak koordinációs kémiai sajátosságait vizsgáltam különböző átmenetifémionok jelenlétében. A patkány amilin ugyanis nem képez olyan amiloid lerakódásokat, melyeknek a cukorbetegséggel való szoros kapcsolata közismert a szakirodalomban. Ugyanakkor a patkány amilin, amely nem tartalmaz a fémion megkötésében fontos szerepet játszó oldalláncbeli horgonycsoportokat, képes egy ekvivalens Cu(II)-ion megkötésére. A patkány és a humán amilin eltérő viselkedésében, illetve a szokatlan fémionmegkötő képességében a szekvenciális eltéréseknek, poláris oldalláncoknak együttesen lehet jelentős szerepe, így vizsgálataink során ezeknek a hatásoknak a felderítésére törekedtünk.

A tanulmányozott peptideket szilárdfázisú peptidszintézissel állítottuk elő. Az előállított és liofilizált oligopeptidek tisztaságát minden esetben nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) és ESI-MS analízissel ellenőriztünk. Az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatához pH-potenciometriás technikát alkalmaztunk. A képződő komplexek szerkezetét UV-Vis, CD- és ESR-spektroszkópiával vizsgáltuk.

A patkány amilin vizsgálata során sikerült meghatározni a szekvencia legrövidebb szakaszát (SSNN), mely modellezi a fémkötőhelyet. Maga a szekvenciarész azonban több kérdést vetett föl, hiszen a jól ismert horgonycsoportok hiányában a megszokottól igen eltérő koordinációs kémiai sajátságokra utaltak eredményeink.

Ezért a kutatások során olyan szisztematikusan tervezett és előállított N-terminálisan védett és nem védett 4-8 tagú peptidek vizsgálatát végeztük el, amelyből választ kaphattunk az egyes poláris oldalláncok, illetve az oldalláncok különböző kombinációjának hatására a komplexképzési folyamatokra.

Ezek során bizonyítottuk, hogy a korábbi feltevésekkel ellentétben nem az arginin tagnak, hanem a szerin és az aszparagin tagoknak van szerepe a fémion koordinálásában. Kimutattuk, hogy a 22-es pozícióban lévő aszparagin-oldallánc már fiziológiás pH-n is képes deprotonálódni és koordinálódni a Cu(II)-ionhoz. Ennek az eredménynek a jelentősége abban áll, hogy az irodalomban az oldallánc deprotonálódását csak erősen lúgos közegben írták le. Méréseink során így egy új horgonycsoportot (aszparagin oldalláncbeli amidcsoportja), illetőleg egy speciális oldalláncgyűtest találtunk, mely(ek) által a patkány amilin képes koordinálni a Cu(II)-iont a rIAPP (19-22) doménnél. Azt is bemutattuk, hogy az aszparagin-oldallánc koordinációja jól jellemezhető egy bizonyos karakteres CD-sávval. A CD-, UV- és ESR-spektroszkópiás adatok elemzésével bizonyítottuk, hogy az aszparagin-oldallánc még szabad N-terminus mellett is részt vesz a Cu(II)-ion koordinálásában, mely hatást a szerin oldalláncok elősegítenek.

Az NH₂-VRSSNN és az NH₂-GGHSSNN ligandumoknak a fémiont főlegben tartalmazó mintáinak vizsgálatával bizonyítottuk, hogy az –SSNN–

domén még a terminális aminos csoport vagy albumin-domén mellett is funkcionálhat másodlagos kötőhelyként.

Munkánk második szakaszában azt vizsgáltuk, hogy milyen hasonlóság és különbség van a Ni(II) komplexképzésében a szabad aminos csoporttal rendelkező patkány amilin mutánsok esetében. Kimutattuk, hogy az SSNN-szekvencia és az aszparagin-oldallánc szokatlan hatása a Ni(II)-ion komplexeiben is érvényesül. Igazoltuk az aszparagin-oldallánc jelentős részvételét a Ni(II)-ion koordinációs szférájának kialakításában egy jellemző CD-sáv hozzárendelésével. Mutánsok vizsgálatával további bizonyítékot nyertünk arra vonatkozóan, hogy az aszparagin-oldallánc okozza a fragmensek/mutánsok szokatlan viselkedését, de a szerin oldalláncok befolyásoló/módosító hatással bírnak. Demonstráltuk, hogy a Cu(II)-ionnal ellentétben a Ni(II)-ion számára nem szolgálhat másodlagos kötőhelyként az SSNN-szakasz terminálisan nem védett aminos csoport és/vagy albumin-típusú kötőhely jelenlétében.

Az előbbi fémionok mellett a Zn(II) és a patkány amilin kölcsönhatását is tanulmányoztuk. Demonstráltuk, hogy a Zn(II) – hasonlóan a Ni(II)-ionhoz – nem képes erős kölcsönhatást kialakítani az SSNN-szakasszal, valamint igazoltuk, hogy a Zn(II) sem képes elősegíteni a aszparagin-oldalláncok deprotonálódását és koordinációját. Sem az aszparagin-oldalláncok, sem az SSNN-szekvencia, sem pedig az albumin-SSNN motívumok együttesen nem elégségesek a Zn(II) fiziológiás és enyhén lúgos (pH 8-9) tartományban történő koordinálására.

A patkány amilintől eltérően a humán amilin nem csak az SSNN-domént, hanem egy hisztidin tagot is tartalmaz, így lehetőséget nyújt egy egyhisztidines kötőhely kialakítására. Cirkuláris dikroizmus, UV-Vis és ESR módszerrel is bizonyítottuk, hogy a Cu(II)-iont tartalmazó rendszerekben kétmagvú komplexek képződnek, azaz az SSNN-szakasz a hisztidint tartalmazó hisztidin-kötőhely mellett egy új, egyenrangú fémion-koordináló helyként szolgál a humán amilin esetében. Izomerek kimutatásával bizonyítottuk, hogy nincsen nagyságrendi különbség a Cu(II)-ion számára a két kötőhely között, csupán a kötőhely-preferenciának a pH-tól való függését azonosítottuk.

Mindez megmagyarázza a patkány amilin és a humán amilin eltérő viselkedését. Kézenfekvő különbségnek mutatkozna ugyanis a szekvenciális eltérés, ugyanakkor a patkány amilin különleges fémionmegkötő képességéért felelős SSNN-szakasz a humán amilinben is megtalálható, tehát ez a szekvenciális rész csak a patkány amilin fémionkötő képessége szempontjából lehet releváns és ez alapján nem kellene eltérő módon viselkednie a két szekvenciának.

Figyelembe véve, hogy az élő szövetekben a fémionok lokálisan feldúsulhatnak, változatos ligandum-fémion arányú rendszerek alakulhatnak ki.

A patkány amilin esetében csak egy kötőhely kínálkozik a Cu(II)-ion számára, az SSNN-domén. A humán amilinben egy ennél bonyolultabb rendszer jön/jöhet létre, hiszen a fémion/hormonligandum arányból kifolyólag kétféle kötőhely között oszlanak meg a fémionok – izomereket, vagy kétmagvú komplexeket képezve más és más centrumokat kialakítva polipeptiden belül. Az utóbbi rendszerben egészen más típusú másodrendű és elektrosztatikus

kölcsönhatásokat alakíthatnak ki a speciális oldallánc-együttesek, így eltérő jellegű konformációváltozás várható.

Mindennek tükrében alap kutatásaink során a humán és a patkány amilin hormon koordinációs kémiai viselkedésének egyértelmű eltéréseit írtuk le és jellemeztük befolyásoló tényezőit, mely adatok hozzájárulhatnak ahhoz is, hogy biológiai, orvosi, biokémiai vizsgálatokban azok eltérő plakkképzési hajlamát minél széleskörűbben feltérképezhessék.

7. Summary

My research work performed in course of the PhD studies is linked to the chemical background of development type 2 diabetes.

Based on preliminaries the different behavior of the *human* and *rat* amylin are caused by sequential differences, polar side chains (mainly the asparagine, serine, occasionally arginine). Polar side chains collectively may contribute to the metal binding ability of *rIAPP* (17-29).

Table 24: Sequences of the human and rat amylin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>hIAPP</i>	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	H
<i>rIAPP</i>	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	R
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
S	S	N	N	F	G	A	I	L	S	S	T	N	V	G	S	N	T	Y
S	S	N	N	L	G	P	V	L	P	P	T	N	V	G	S	N	T	Y

For this reason in the course of our research work firstly we focused on the *description of the special binding sites and the binding donor atoms* in the case of terminally protected rat amylin fragments and its mutants.

The second part of our work was the *studying of the earlier investigated sequences, but in form of N-terminally unprotected fragments and mutants*. The results of combined potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes of *rat* amylin fragments and their mutants provide sufficient information for the understanding of the possible role of arginine-, serine- and asparagine side chains in copper(II) binding. We carried out this study in order to get more information and further comparison about the metal binding affinity of the polar side chains in the presence of a strongly coordinating group (amino group, albumine sequence).

Additionally, we were wondering the special binding site of molecules predominated *in the presence of the Ni(II) and Zn(II)*.

The fourth studied subjects were the *terminally protected human amylin fragments and its mutants*. Our aims were to characterize and compare the Cu(II) binding affinity of the central region of *rIAPP* and *hIAPP*. In course of my work I measured in aqueous media in case of all peptide-metal ion systems, furthermore, I focused on the relevant pH-range (in the pancreas: pH 8-9).

Solid phase peptide synthesis was performed using a microwave-assisted Liberty Peptide Synthesizer (CEM, Matthews, NC), introducing the amino acid derivatives following the TBTU/HOBt/DIEA activation strategy on NovaSyn TGR resin. The crude peptides were purified by preparative reverse phase liquid chromatography (RP-HPLC). The identity of the peptides was confirmed by ESI-MS experiments. To determine the protonation constants of the ligands and the stability constants of the Cu(II), Ni(II) and Zn(II) complexes in aqueous solution

pH-potentiometric measurements were used UV-Visible, circular dichroism (CD) and electron paramagnetic resonance (ESR) spectroscopy were used to determine the structures of the complexes.

We have gained the following results during our work:

1. Modeling of metal binding site of rat amylin (17-29): Terminally protected rat amylin fragments and its mutants

As the fragments are protected at both termini and do not contain any dissociable proton in the measurable pH range, we had determined the concentration of our ligands by optimization of a literature-method. After that, we have calculated the stability constants of Cu(II)–amylin (17-29) complexes and its concentration distribution as a function of pH. Additionally, we have identified the individual UV-Vis spectra of formed Cu(II)-complexes. Coordination behavior of five, new amylin fragment (Ac-VRSSNN, Ac-VRSS, Ac-SSNN) and its mutants (Ac-VRAA, Ac-VASS) were described by the same methods. We have calculated the individual UV-Vis spectra of Cu(II)-complexes, as well. We have proved that the role of the arginine side chain is negligible, while the serine and asparagine side chains may play a role in the metal binding of rat amylin. Besides, the Ac-SSNN tetrapeptide fragment was identified as the shortest sequence, which is responsible for metal binding. Our findings strongly support the participation of the deprotonated amide nitrogen of asparagine side chain in the metal binding of Ac-SSNN and the former discussed longer ligands (rIAPP 17-29, Ac–VRSSNN) even in the physiological and weakly alkaline pH range. A characteristic positive Cotton effect around 480–500 nm in the CD spectra can be assigned to the interaction of the asparaginyl side chains. Moreover, the results of this study reveal that (in addition to the well-known anchoring capability of the side chains of His and/or Cys residues) the amide group of asparagine can also be a primary metal binding site. However, in the latter case, the presence of a single Asn moiety is not satisfactory for effective metal binding, which means that it requires the involvement of a specific sequence containing polar amino acids.

2 Relative role of polar side chains (Cu(II)-complexes): Terminally unprotected rat amylin fragments and its mutants

Copper(II) complexes of peptides modeling the sequence of the 17–22 residues of rat amylin have been synthesized and studied by potentiometric, UV-Vis, CD and ESR spectroscopic methods. We have confirmed that the comparison of the data obtained for the N-terminally free peptides unambiguously demonstrates the dominating role of the terminal amino group over the asparaginyl side chains in copper(II) binding. The coordination behaviors of the tetra- and hexapeptides are, however, slightly different. In the case of tetrapeptides, when the side chains of asparagine are in the close vicinity of the coordinated peptide backbone a significant enhancement of thermodynamic stability can be observed, although the major binding modes are

basically the same. On the contrary, this stability enhancement was not observed for the corresponding hexapeptides when the free rotation of the potential coordinating side chains can occur. The primary ligating sites of these molecules are, however, always the amino terminus, but a structure-influencing role of asparagine side chains is suggested on the base of the pH-potentiometric and stability data.

Based on our results from CD-, UV- and ESR-spectroscopic measurements we can state, that the asparagine side chains and the SSNN-domain even in of presence strongly coordinating groups (free amino group) take part in the binding of the Cu(II)-ion. In the cases of NH₂-xxNy (peptides containing asparagine in the third position) ligands, the deprotonation and coordination of asparagine amide nitrogen cannot be excluded. Similar coordination sphere around copper(II) ion was supported in the case of [CuH₄L] of Ac-SSNN. The presence of asparagine in the third position – even in the lack of serine side chains - results a stability enhancement of Cu(II)-complexes and the earlier mentioned characteristic CD-band could be detected. However, if serines are present in the sequence, the Cotton-effect is more expressed. The formation of dinuclear complexes in the copper(II)-NH₂-VRSSNN system, however, gives an unambiguous proof for the anchoring capacity of the free asparagine side chains. Both ESR spectra and ESI-MS measurements provide a clear-cut evidence for the existence of dinuclear complexes in the 2:1 copper(II):peptide systems. These results demonstrated that all the serines and asparagines are necessary for the binding of the second equivalent Cu(II) at the C-terminus. We have found that the formation of dinuclear complexes is characteristic only for the copper(II)-NH₂-VRSSNN system in the physiological pH range.

The heptapeptide NH₂-GGHSSNN was synthesized, which heptapeptide provided a good chance to compare the binding affinities of the GGH and SSNN sequences. We have proved that (in agreement with the expectations) in equimolar samples of copper(II) and NH₂-GGHSSNN the amino terminus is the exclusive copper(II) binding site and the polar side chains of Ser and Asn residues do not have any contribution to the stability of copper(II) complexes. We have shown that the heptapeptide can bind two equivalents of copper(II) ions, stable dinuclear complexes are formed in the presence of excess of copper(II) ions indicating that the SSNN domain can be an independent binding site.

3. Relative Role of polar side chains: (Ni(II)- and Zn(II)-complexes)

3.1. Ni(II)-complexes

The comparison of Ni(II)-complexes of common oligopeptides with Ni(II)-complexes of these ligands reveals a significant impact of the polar side chains. These observations suggest that the presence of two adjacent asparaginyl and/or seryl residues may enhance the stability of their Ni(II)-complexes, but we have to notice that the anchoring group is the amino group in case of the unprotected ligands.

We stated that the Ni(II)-complexes formed at lower pH in the presence of asparagine residues, so the unusual impact of asparagine side chain(s) predominate even in the case of Ni(II). We detected the significant involvement of the asparagine side chain in the Ni(II)-binding assigning that with a characteristic CD-band around 400 nm.

We have compared more relevant CD-spectra of Ni(II)-ligand systems at strongly alkaline solutions. It is apparent; if positive Cotton-effect is found around 400 nm, the ligand has a strongly coordinating side chain (e.g. imidazolyl). In case of ligands not having coordinating groups, positive CD-band cannot be seen. Our ligands, which contains asparagine side chains in the third positions, possess this characteristic positive Cotton-effect.

The investigation of mutants confirmed, the exclusive effect of asparagine side chains: in lack of serine side chains, the characteristic CD-band was also observed, suggesting only a slight effect of this side chain group. At the same time, this effect especially depends on the length of the peptides and on the presence of other strongly coordinating groups. If the SSNN-type domain is found far away from the primary anchoring amino group (e.g. NH₂-GGHSSNN, NH₂-VRSSNN), the unusual influence cannot be detected (similarly to the Cu(II)-complexes). We obtained evidence for that the SSNN sequence cannot provide a secondary metal binding site in presence of strongly coordinating donor groups. However, in presence of other strongly coordinating group (e.g. terminal amino group), the SSNN-domain can enhance the stability of Ni(II)-complexes.

3.2. Zn(II)-complexes

Starting from the literature fact that imidazolyl group of histidine is able to take part in Zn(II)-ion binding, we wondered whether the asparagine side chains or the specific SSNN-motif could promote the deprotonation of the amide nitrogens in the peptide backbone or maybe the side chains. In the case of Zn(II)-ion, however, only weak interaction can be detected. This metal ion has no special affinity to bind to the SSNNx-sequence. The polar side chains of serine and asparagine residues do not have any contribution to the stability of Zn(II)-complexes, and Zn(II)-ion is not able to induce the deprotonation and coordination of amide nitrogen. Extraordinary effect of the SSNN-sequence did not prevail – not even in presence of albumin-binding site and SSNN-polar side chain set. These statements suggest that none of the amino group, histidine, or asparagine side chain(s) and the specific SSNN-domain are sufficient anchors for Zn(II) binding in the slightly alkaline conditions (for example pH 8-9).

4. Modeling of metal binding site of human amylin (15-22):

As the native sequence of hIAPP (15-22) does not contain terminally free amino group, therefore these studies provide a chance for the real comparison of possible binding sites and binding modes in the central region of *human* and *rat* amylin.

Since the low solubility of the native sequence (*hIAPP* (15-22); Ac-ANFLVHSSNN) hinders the investigations, the Ac-AAAHSSNN mutant of *hIAPP* (15-22) was synthesized, which involves two independent binding sites for Cu(II)-ion; a histidine-binding site (AAAH) and the SSNN-domain. For comparison and to obtain more information about the possible binding mode, the Ac-AAAHAAAA mutant was also synthesized and studied, which can be the simplest model of the histidine-binding site.

We have shown that – in equimolar systems – Cu(II)-ion is bound not only to the „histidine-binding site”, but also the SSNN-domain takes part in metal binding. As a result of our work, we detected isomer binding modes for the Cu(II)-ion. In agreement with the expectations, below pH 7 the peptide offered binding site at the histidine-containing part ($3N^-$, N_{im}). Surprisingly, in the pH 8-9 range a second isomer was also found. The stoichiometry of the formed complexes and also the concentration distribution of the major species as a function of pH suggested the existence of coordination isomers.

The measured CD spectra of the Cu(II)-ligand solution at 1:1, 1:2 and 2:1 metal to ligand ratios can be well fitted with a simple superposition of the CD spectra of the $[CuH_3L]$ complex of Ac-FKHV and $[CuH_3L]$ of Ac-SSNN (at pH 8-9).

Stable dinuclear complexes are formed in the presence of the excess of Cu(II)-ion representing that the SSNN domain can be a new, independent binding site, which was also confirmed by CD-, UV-Vis and ESR-spectroscopy.

In the case of rat amylin, the Cu(II)-ion can be coordinated only by SSNN sequence, while the model peptide of sequence of *hIAPP* (15-22) (Ac-AAAHSSNN) offers more different binding sites. The complex formation processes in this Cu(II)-peptide system are more complicated ; at pH 8-9 range isomers and dinuclear complexes are also present. As the (pancreas) tissues are not homogeneous solutions, the metal ions are able to accumulate locally, so all the species previously mentioned are real possibilities.

In the cases of *rat* and *human* amylin fragments and mutants, we have found that the coordination modes and binding sites of Cu(II)-ions differ significantly. It means that the different coordination behaviour of *rat* and *human* amylin can cause different conformational changes.

Although we performed basic studies, our results may also provide information and useful models for the quantitative description of the interaction between biomolecules and metal ions. These results can be used in biological investigations *in vivo*. In other words, our results contribute to the better understanding of the factors influencing the metal ion binding of the proteins related to the neurodegenerative and hormone disorders (e.g. Alzheimer disease, diabetes, Parkinson disease, prion disease).

8. Irodalomjegyzék

- ¹ H. King; R. E. Aubert; W. H. Herman „Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections” *Diabetes Care*, 21(9), 1414-1431. (1998)
- ² „Global report on diabetes”, <http://www.who.int/diabetes/en/> (utolsó letöltés: 2016. július 25.)
- ³ Nagy Gyuláné Tajti É.: „A hipertonia és a 2-es típusú diabétesz étrendi kezelése” *Hypertonia*, <http://www.diabetes.hu/cikkek/hypertonia/0802/a-hipertonia-es-a-2-es-tipusu-diabetes-etrendi-kezelese/> (2008/2) (utolsó letöltés: 2016. július 25.)
- ⁴ Webbeteg.hu; „Rohamosan terjed a cukorbetegség” <http://www.webbeteg.hu/cikkek/cukorbetegseg/16899/> (utolsó letöltés: 2016. július 25.)
- ⁵ J. T. Jarrett; P. T. Lansbury „Seeding one dimensional crystallization of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?” *Cell*, 73, 1055-1058. (1993)
- ⁶ P. Tompa „Barátból ellenség; „Hibás fehérjék; az Alzheimer-betegségtől a kergemarhakórig” /internetes elérés: <http://beszelo.c3.hu/cikkek/baratbol-ellenseg/> (2005) (utolsó letöltés: 2016. július 25.)
- ⁷ S. B. Prusiner, "Prions", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 13363-13383. (1998).
- ⁸ R. R. Crichton; R. Ward „Metal-based neurodegeneration” *John Wiley & Sons Ltd.*, Chichester, England, (2006).
- ⁹ Gy. Múzes „Amyloidosis” (In: *A belgyógyászat alapjai 2. kötet*, Szerk: Tulassay Zsolt), Medicina Könyvkiadó Zrt., (2011)
- ¹⁰ Cs. Trinn „Amyloidosis” *Orvosi Hetilap*, 151. évf., 29. szám, 1182–1189., DOI: [10.1556/OH.2010.28919](https://doi.org/10.1556/OH.2010.28919) (2010)
- ¹¹ A kép innen származik: <http://www.medicalnewstoday.com/articles/286192.php> (utolsó letöltés: 2016. július 29.)
- ¹² E. L. Opie „The relation of diabetes mellitus to lesions of the pancreas: hyaline degeneration of the islands of Langerhans” *The Journal of Experimental Medicine*, 5, 527- 40. (1901)
- ¹³ P. Westermark „Quantitative studies on amyloid in the islets of Langerhans” *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 77, 91–94. (1972)
- ¹⁴ P. Westermark; C. Wernstedt; E. Wilander; K. Sletten, „ A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 140, 827–831. (1986)
- ¹⁵ P. Westermark; C. Wernstedt; E. Wilander; D. Hayden; T. O'brien; K. Johnson, „Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 3881–3885. (1987)
- ¹⁶ G. J. S. Cooper; B. Leighton; G. D. Dimitriadis; M. Parry-Billings; J. M. Kowalchuk; K. Howland; J. B. Rothbard; A. C. Willis; K. B. M. Reid, „Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that

regulates glycogen metabolism in skeletal muscle" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 7763-7766. (1988)

¹⁷ K. L. Luskey, „Possible links between amylin and diabetes. Amylin is released into the blood stream along with insulin" *Diabetes Care*, 41, 297–299. (1992)

¹⁸ R. Muff; W. Born; J. A. Fischer „Calcitonin, calcitonin related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions" *European Journal of Endocrinology*, 133, 17 (1995)

¹⁹ J. W. Höppener; B. Ahrén; C. J. Lips "Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus" *The New England Journal of Medicine*, 343 (6), 411–419. (2000)

²⁰ S. Gebre-Medhin; C. Olofsson; H. Mulder, „Islet amyloid polypeptide in the islets of Langerhans: friend or foe?" *Diabetologia*, 43, 687–695. (2000)

²¹ H. Kozłowski; A. Janicka-Kłos; J. Brasun; E. Gaggelli; D. Valensin; G. Valensin "Copper, iron and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation)" *Coordination Chemistry Reviews*, 253, 2665-2685. (2009)

²² S. B. Prusiner "Shattuck lecture – neurodegenerative diseases and prions" *The New England Journal of Medicine*, 344, 1516-1526. (2001)

²³ D. R. Brown; H. Kozłowski "Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases" *Dalton Transactions*, 13, 1907-1917. (2004)

²⁴ C.D. Syme; J.H. Viles "Solution ¹H NMR investigation of Zn²⁺ and Cd²⁺ binding to amyloid-β peptide (Aβ) of Alzheimer's disease." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, 246-256. (2006)

²⁵ C. J. Sarell; S.R. Wilkinson; J.H. Viles "Substoichiometric levels of Cu²⁺ ions accelerate the kinetics of fiber formation and promote cell toxicity of amyloid-β from Alzheimer-disease." *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 41533-41540. (2010)

²⁶ B. Liu; A. Moloney; S. Meehan; K. Morris; S.E. Thomas; L.C. Serpell; R. Hider; S.J. Marciniak; D.A. Lomas; D.C. Crowther "Iron promotes the toxicity of the amyloid-β peptide by impeding its ordered aggregation." *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 4248-4256. (2011)

²⁷ N.D. Younan; M. Klewpatinond; P. Davies; A.V. Ruban; D.R. Brown; J.H. Viles "Copper(II)-induced secondary structure changes and reduced folding stability of the prion protein" *Journal of Molecular Biology*, 410, 369-382. (2011)

²⁸ S. Leal; H.M. Botelho; C.M. Gomes "Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2253-2270. (2012)

²⁹ N. T. Watt, I.J. Whitehouse; N. M. Hooper „The role of zinc in Alzheimer's Disease" *International Journal of Alzheimer's Disease*, Vol. 2011, DOI:10.4061/2011/971021 (2011)

³⁰ N.N. Greenwood; A. Earnshaw „Az elemek kémiája, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, (1999).

³¹ K. D. Karlin; Z. Tyeklar (eds.) „Bioinorganic chemistry of copper", Chapman and Hall, New York, (1993)

³² W. Kaim; B. Schwedersk "Bioinorganic chemistry" in *Inorganic elements in the chemistry of life*, Wiley, Chichester, 187-214 rézre, 242-266 cinkre (1994)

³³ M.C. Linder „Biochemistry of copper" *Plenum Press*, New York (1991)

- ³⁴ T. Kiss; T. Gajda; B. Gyurcsik „Bevezetés a Bioszervetlen Kémiába” Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2007)
- ³⁵ H. Sigel "Nickel and its role in biology" In *Metal ions in biological systems*, Dekker, New York, 23, (1988)
- ³⁶ A. Volbeda; J. C. Fontecilla-Camps „Structure-function relationships of nickel-iron sites in hydrogenase and a comparison with the active sites of other nickel-iron enzymes”, *Coordination Chemistry Reviews*, 249, 1609-1619. (2005)
- ³⁷ U. Ermler, „On the mechanism of methyl-coenzyme M reductase”, *Dalton Trans.*, 3451-3458. (2005)
- ³⁸ C.L. Drennan; J. Heo; M.D. Sintchak; E. Schreiter; P. W. Ludden „Life on carbon monoxide: X-ray structure of Rhodospirillum rubrum Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (21), 11973-11978. (2001)
- ³⁹ D.P. Barondeau; C.J. Kassmann; C.K. Bruns; J. A. Tainer; E. D. Getzoff „Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism”, *Biochem.*, 43, 8038-8047. (2004)
- ⁴⁰ C.F. Howard Jr., „Insular amyloidosis and diabetes mellitus in Macaca Nigra” *Diabetes*, 27, 357–364. (1978)
- ⁴¹ C. F. Schlotthaur, J. A. S. Millar „Diabetes mellitus in dogs and cats. Report of nine cases” *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228, 31-35. (1951)
- ⁴² B. L. Yano; D. W. Hayden; K. H. Johnson, „Feline insular amyloid: association with diabetes mellitus.” *Veterinary Pathology*, 18, 621–627. (1981)
- ⁴³ A. Mazzaglia, N. Micali, L. Monsu Scolaro; F. Attanasio; A. Magri; G. Pappalardo; V. Villari, „Aggregation properties of the peptide fragments derived from the 17-29 region of the human and rat IAPP: A Comparative study with two PEG-conjugated variants of the human sequence” *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 705–713. (2010)
- ⁴⁴ P. Westermark; U. Engstrom; K. H. Johnson; G. T. Westermark; C. Betsholtz, „Islet amyloid polypeptide: Pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 5036–5040. (1990)
- ⁴⁵ C. Betsholtz; L. Christmansson; U. Engstrom; F. Rorsman; V. Svensson; K. H. Johnson; P. Westermark, „Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between species” *FEBS Lett.*, 251, 261–264. (1989)
- ⁴⁶ D. F. Moriarty; D. P. Raleigh, „Effects of sequential proline substitutions on amyloid formation by human amylin 20-29” *Biochemistry*, 38, 1811-1818. (1999)
- ⁴⁷ K. Tenidis; M. Waldner; J. Bernhagen; W. Fischle; M. Bergmann; M. Weber; M.-L. Merkle; W. Voelter; H. Brunner; A. Kapurniotu, „Identification of a penta- and hexapeptide of Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties” *Journal of Molecular Biology*, 295, 1055–1071. (2000)
- ⁴⁸ A. Abedini; D. Raleigh, „The role of His-18 in amyloid formation by human Islet Amyloid Polypeptide” *Biochemistry*, 44, 16284–16291. (2005)
- ⁴⁹ Y. Yoshiike; K. Tanemura; O. Murayama; T. Akagi; M. Murayama; S. Sato; X. Sun; N. Tanaka; A. Takashima "New insights on how metals disrupt amyloid beta-aggregation and their effects on amyloid-beta cytotoxicity." *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 32293-32299 (2001)

- ⁵⁰ C. Ha; J. Ryu; C.B. Park "Metal ions differentially influence the aggregation and deposition of Alzheimer's beta-amyloid on a solid template." *Biochemistry*, 46, 6118-6125 (2007)
- ⁵¹ V. Tougu; A. Karafin; K. Zovo; R. S. Chung; C. Howells; A. K. West; P. Palumaa "Zn(II)- and Cu(II)-induced non-fibrillar aggregates of amyloid-beta (1-42) peptide are transformed to amyloid fibrils, both spontaneously and under the influence of metal chelators." *Journal of Neurochemistry*, 110, 1784-1795 (2009)
- ⁵² M. Innocenti; E. Salvietti; M. Guidotti; A. Casini; S. Bellandi; M.L. Foresti; C. Gabbiani; A. Pozzi; P. Zatta; L. Messori "Trace copper(II) or zinc(II) ions drastically modify the aggregation behavior of amyloid-beta1-42: an AFM study." *Journal of Alzheimer's Disease*, 19, 1323-1329 (2010)
- ⁵³ Y. Bin; X. Li; Y. He; S. Chen; J. Xiang "Amyloid-peptide (1-42) aggregation induced by copper ions under acidic conditions" *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 45, 570-577 (2013)
- ⁵⁴ M. Mold; L. Ouro-Gnao; B.M. Wieczkowski; C. Exley "Copper prevents amyloid- β (1-42) from forming amyloid fibrils under near-physiological conditions in vitro" *Scientific Reports*, 3, 1256 (2013)
- ⁵⁵ T.A. Lutz, „The role of amylin in the control of energy homeostasis” *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298, R1475–R1484. (2010)
- ⁵⁶ A. Abedini; A.M. Schmidt, „Mechanisms of islet amyloidosis toxicity in type 2 diabetes” *FEBS Letters*, 587 1119–1127. (2013)
- ⁵⁷ T. Sanke; T. Hanabusa; Y. Nakano; C. Oki; K. Okai; S. Nishimura; M. Kondo; K. Nanjo „Plasma islet amyloid polypeptide (amylin) levels and their responses to oral glucose in type 2 (non-insulindependent) diabetic patients” *Diabetologia*, 34, 129-32. (1991)
- ⁵⁸ M. A. Lovell; J. D. Robertson; W. J. Teesdale; J. L. Campbell; W. R. Markesbery „Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques” *J. Neurol. Sci.*, 158, 47–52. (1998)
- ⁵⁹ A. Mezzetti; S. D. Pierdomenico; F. Costantini; F. Romano; D. De Cesare; F. Cuccurullo; T. Imbastaro; G. Riario-Sforza; F. Di Giacomo; G. Zuliani; R. Fellin „Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases” *Free Radical Biology & Medicine*, 25, 6, 676–681. (1998)
- ⁶⁰ C. R. Flores; M. P. Puga; K. Wrobel; Ma. E. G. Sevilla; K. Wrobel, „Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 91, 333–341. (2011)
- ⁶¹ A. H. Zargar; N. A. Shah; S. R. Masoodi; B. A. Laway; F. A. Dar; A. R. Khan; F. A. Sofi; A. I. Wani „Copper, zinc, and magnesium levels in non-insulin dependent diabetes mellitus” *Postgraduate Medical Journal*, 74(877), 665-8. (1998)
- ⁶² G. L. Millhauser, „Copper Binding in the Prion Protein” *Accounts of Chemical Research*, 37, 79–85. (2004)
- ⁶³ P. Faller; C. Hureau, „Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid- β peptide” *Dalton Trans.*, 1080–1094. (2009)
- ⁶⁴ H. Kozłowski; M. Luczkowski; M. Remelli, „Prion proteins and copper ions. Biological and chemical controversies” *Dalton Trans.*, 39, 6371–6385. (2010)

- ⁶⁵ K. Ősz; Z. Nagy; G. Pappalardo; G. Di Natale; D. Sanna; G. Micera; E. Rizzarelli; I. Sóvágó „Copper(II) interaction with prion peptide fragments encompassing histidine residues within and outside the octarepeat domain: speciation, stability constants and binding details” *Chemistry–A European Journal*, 13, 7129–7143. (2007)
- ⁶⁶ G. Di Natale; K. Ősz; Z. Nagy; D. Sanna; G. Micera; G. Pappalardo; I. Sóvágó; E. Rizzarelli „Interaction of Copper(II) with the prion peptide fragment HuPrP(76-114) encompassing four histidyl residues within and outside the octarepeat domain” *Inorganic Chemistry*, 48, 4239–4250. (2009)
- ⁶⁷ C. A. Damante; K. Ősz; Z. Nagy; G. Pappalardo; G. Grasso; G. Impellizzeri; E. Rizzarelli; I. Sóvágó, „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*, 47, 9669– 9683. (2008)
- ⁶⁸ C. A. Damante; K. Ősz; Z. Nagy; G. Pappalardo; G. Grasso; G. Impellizzeri; E. Rizzarelli; I. Sóvágó, „Metal loading capacity of A β N-terminus: a combined potentiometric and spectroscopic study of zinc(II) complexes with A β (1-16), its short or mutated peptide fragments and its polyethylene glycolylated analogue” *Inorganic Chemistry*, 48, 10405–10415. (2009)
- ⁶⁹ J.T. Pedersen; J. Ostergaard; N. Rozlosnik; B. Gammelgaard; N.H. Heegard "Cu(II) mediates kinetically distinct, non-amyloidogenic aggregation of amyloid- β peptides" *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 26952-26963 (2011)
- ⁷⁰ P. Faller; C. Hureau; O. Berthoumieu "Role of metal ions in the self-assembly of the Alzheimer's amyloid- β peptide" *Inorganic Chemistry*, 52, 12193-12206 (2013)
- ⁷¹ A. Amoresano; A. Flagiello; G. Impellizzeri; A. Magri; G. Pappalardo; P. Pucci; E. Rizzarelli “Cu(II) interaction with amylin's peptide fragments” *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics, Therapeutics, American Peptide Society*, 2003, 771.
- ⁷² B. Ward, K. Walker, C. Exley, „Copper(II) inhibits the formation of amylin amyloid in vitro” *J. Inorg. Biochem.*, 102, 371. (2008)
- ⁷³ A. J. Barrett; J. K. McDonald, *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography*, Vol. I, Endopeptidases; Academic Press: London, (1980)
- ⁷⁴ A. Khan; A. E. Ashcroft; O.V. Korchazhkina; C. Exley, „Metal-mediated formation of fibrillar ABri amyloid” *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98 2006–2010. (2004)
- ⁷⁵ A. Sinopoli; A. Magri; D. Milardi; M. Pappalardo; P. Pucci; A. Flagiello; J.J. Titman; V.G. Nicoletti; G. Caruso; G. Pappalardo “The role of copper(II) in the aggregation of human amylin” *Metallomics*, 6, 1841. (2014)
- ⁷⁶ C. Exley; E. House; T. Patel; L. Wu; P.E. Fraser, „Human pro-islet amyloid polypeptide (ProIAPP1–48) forms amyloid fibrils and amyloid spherulites in vitro” *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104, 1125. (2010)
- ⁷⁷ C. Exley; M. Mold; E. Shardlow; B. Shuker; B. Ikpe; L. Wu; P. E. Fraser, *Journal of Diabetes Research and Clinical Metabolism*, Herbert Open Access Journals, <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2050-0866-1-3.pdf> (2012)
- ⁷⁸ J. R. Brender; K. Hartman; R. P. R. Nanga; N. Popovych; R. de la Salud Bea; S. Vivekanandan; E. N. G. Marsh; Ayyalusamy Ramamoorthy „Role of zinc in Human Islet Amyloid Polypeptide aggregation, *Journal of the American Chemical Society*, 132(26), 8973–8983. (2010)

- ⁷⁹ A. Masad; B. J. Tabner; J. Mayes; D. Allsop, *Free Radical Biology and Medicine*, 51, 869. (2011)
- ⁸⁰ E. C. Lee; E. Ha; S. Singh; L. Legesse; S. Ahmad; E. Karnaukhova; R.P. Donaldson; A. M. Jeremic, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 12558. (2013)
- ⁸¹ L. Ma; X. Li; Y. Wang; W. Zheng; T. Chen., "Cu(II) inhibits hIAPP fibrillation and promotes hIAPP-induced beta cell apoptosis through induction of ROS-mediated mitochondrial dysfunction" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 140, 143. (2014)
- ⁸² Y-P. Yu; P. Lei; J. Hu; W-H. Wu; Y-F. Zhao; Y-M. Li „Copper-induced cytotoxicity: reactive oxygen species or islet amyloid polypeptide oligomer formation, *Chemical Communications*, 46, 6909–6911. (2010)
- ⁸³ F. Bellia; G. Grasso, „The role of copper(II) and zinc(II) in the degradation of human and murine IAPP by insulin-degrading enzyme" *Journal of Mass Spectrometry*, 49, 274. (2014)
- ⁸⁴ H. Li; E. Ha; R. P. Donaldson; A. M. Jeremic; A. Vertes, „Rapid assessment of human amylin aggregation and its inhibition by copper(II) ions by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry with ion mobility separation" *Analytical Chemistry*, 87(19), 9829-37. (2015)
- ⁸⁵ M. J. Kim, H. T. Kim, „Rapid assessment of human amylin Aggregation and its inhibition by copper(II) ions by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry with ion mobility separation" *European Journal of Mass Spectrometry*, 18, 51–58. (2012)
- ⁸⁶ L. Rivillas-Acevedo; C. Sánchez-López; C. Amero; L. Quintanar, „Structural Basis for the Inhibition of Truncated Islet Amyloid Polypeptide Aggregation by Cu(II): Insights into the Bioinorganic Chemistry of Type II Diabetes" *Inorganic Chemistry*, 54, 3788–3796. (2015)
- ⁸⁷ Nagy E. M., Átmenetifém-ionok kölcsönhatása kis biomolekulákkal, Egyetemi Doktori értekezés, Debrecen, 70. oldal (2006)
- ⁸⁸ H. Sigel; R. B. Martin "Coordinating properties of the amide bond - stability and structure of metal-ion complexes of peptides and related ligands" *Chemical Reviews*, 82, 385-426 (1982)
- ⁸⁹ I. Sóvágó; C. Kállay; K. Várnagy, „Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes" *Coordination Chemistry Reviews*, 2012, 256, 2225.
- ⁹⁰ L.D. Pettit; J. E. Gregor; H. Kozłowski "Complex formation between metal ions and peptides" in *Perspectives in bioinorganic chemistry*, In: R. W. Hay; J. R. Dilworth; K. B. Nolan (eds), JAI Press Ltd., London, 1, (1991)
- ⁹¹ L.D. Pettit; R. L. A. "Metal-peptide complex formation" in G. Berthon (ed), *Handbook of metal-ligand interaction in biological fluids*, Marcel Dekker Inc., New York, Ch. 2, 1, 636-647 (1995)
- ⁹² H. Kozłowski; W. Bal; M. Dyba; T. Kowalik-Jankowska "Specific structure-stability relations in metallopeptides" *Coordination Chemistry Reviews*, 184, 319-346 (1999)
- ⁹³ I. Sóvágó; K. Ősz "Metal ion selectivity of oligopeptides" *Dalton Transactions*, 3841-3854. (2006).
- ⁹⁴ I. Sóvágó; C. Kállay; K. Várnagy "Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2225-2233. (2012)

- ⁹⁵ A. Kaneda; A. E. Martell, „Optical rotation studies of copper (II)-tripeptide complexes” *Journal of Coordination Chemistry*, 4, 159-165. (1975)
- ⁹⁶ A. Gergely; I. Nagypál „Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 1. Equilibrium and thermochemical study of the copper(II) complexes of glycylglycine, glycyl-DL- α -alanine, DL- α -alanylglycine, and DL- α -alanyl-DL- α -alanine” *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1104-1108 (1977)
- ⁹⁷ E. Farkas; T. Kiss „Effects of side-chain donor groups on deprotonation of peptide amide in copper(II) complexes at high pH” *Polyhedron*, 8, 2463-2467. (1989)
- ⁹⁸ H. Kozłowski „EPR spectra of some Cu(II)—dipeptide complexes for high pH aqueous solutions” *Chem. Phys. Letters*, 46, 519-522. (1977)
- ⁹⁹ M. Sheinblatt; E. D. Becker „Spectrophotometric Studies of Copper (II) Complexes of Glycylglycine” *The Journal of Biological Chemistry*, 242, 3159. (1967)
- ¹⁰⁰ M. K. Kim; A. E. Martell „Copper(II) Complexes of Triglycine and Tetraglycine” *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 914-918. (1966)
- ¹⁰¹ H. Dobbie; W.O. Kermack „Complex-formation between polypeptides and metals. 3. The reaction between cupric ions and diglycylglycine” *Biochemical Journal*, 59, 257-264. (1955)
- ¹⁰² M. K. Kim; A. E. Martell „Proton nuclear magnetic resonance study of metal-glycine peptide complexes. Copper(II) and nickel(II) complexes” *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 872-878. (1969)
- ¹⁰³ M.T. Barnet; H. C. Freeman; D. A Buckingham; I. Nan Hsu; D. van der Helm, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1523 (1970)
- ¹⁰⁴ I. Sóvágó, *Biocoordination Chemistry in Metal Complexes of Peptides and Derivatives* (ed.: K. Burger), Ellis Horwood, Chichester, p. 135-184. (1990)
- ¹⁰⁵ H. C. Freeman; J. M. Guss; R. L. Sinclair „Crystallographic studies of metal-peptide complexes. X. disodium triglycylglycinatonickelate(II) octahydrate and disodium triglycylglycinatonickelate(II) decahydrate” *Acta Crystallographica Section B*, 34, 2459 (1978)
- ¹⁰⁶ T. F. Dorigatti; E. J. Billo „Solution equilibria of copper(II) and nickel(II) complexes of glycyl peptide amides” *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 37, 1515 (1975)
- ¹⁰⁷ T. Kowalik-Jankowska; H. Kozłowski; E. Farkas; I. Sóvágó "Nickel ion complexes of amino acids and peptides" in *Metal ions in life sciences*, A. Sigel; H. Sigel; R. K. O. Sigel (Eds) John Wiley and Sons, Chichester, Ch. 3, 2, 63-108 (2007)
- ¹⁰⁸ D.L. Rabenstein; S. Libich "Nuclear magnetic resonance studies of the solution chemistry of metal complexes. V. Cadmium, zinc and lead complexes of polyglycine peptides" *Inorganic Chemistry*, 11, 2960-2967 (1972)
- ¹⁰⁹ R. B. Martin; J. T. Edsall "The association of divalent cations with acetylated histidines derivatives" *Journal of the American Chemical Society*, 82, 1107-1111 (1960)
- ¹¹⁰ E. Farkas; I. Sóvágó; A. Gergely, „Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 8. Parent and mixed-ligand complexes of histidine-containing dipeptides” *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1545 (1983)
- ¹¹¹ R. B. Martin; J. T. Edsall, „The association of divalent cations with acylated histidine derivatives” *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 1107 (1960)

- ¹¹² J. Ueda; A. Hanaki; N. Yoshida; T. Nakajima „Proton nuclear magnetic resonance studies of the complexation of zinc(II) with glycyl-L-histidylglycine” *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43, 2042 (1995)
- ¹¹³ P. Mlynarz; T. Kowalik-Jankowska; M. Stasiak; M.T. Leplawy; H. Kozlowski „Impact of alpha-hydroxymethylserine (HmS) residue on the binding ability of the histidyl residue in the HmS-His dipeptide towards Cu-II, Ni-II and Zn-II.” *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3673 (1999)
- ¹¹⁴ J. Ueda; A. Hanaki; N. Yoshida; T. Nakajima „¹H-Nuclear Magnetic Resonance Study of the Interaction of Zinc (II) Ion with a Histidine-Containing Peptide, L-Histidylglycylglycine” *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 33, 3096 (1985)
- ¹¹⁵ J. Ueda; A. Hanaki; N. Yoshida; T. Nakajima „Complex formation of zinc(II) ion with glycylglycyl-L-histidine : an investigation by proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy” *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 1315 (1986)
- ¹¹⁶ A. Myari; G. Malandrinos; Y. Deligiannakis; J.C. Plakatouras; N. Hadjiliadis; Z. Nagy; I. Sóvágó „Interaction of Cu(2+) with His-Val-His and of Zn(2+) with His-Val-Gly-Asp, two peptides surrounding metal ions in Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme” *J. Inorg. Biochem.*, 85, 253 (2001)
- ¹¹⁷ D. Brukes; L.D. Pettit "Thermodynamics of complex formation between hydrogen, copper(II) and nickel(II) ions and dipeptides containing non-coordinating substituent groups" *Journal of American Chemical Society Dalton Transaction*, 2106-2112 (1975)
- ¹¹⁸ B. Noszál; R. Kassai-Tánczos „Microscopic acid-base equilibria of arginine, *Talanta - The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry*, 38(12), 1439-44. (1991)
- ¹¹⁹ C. A. Fitch; G. Platzer; M. Okon; B. Garcia-Moreno; L. P. McIntosh „Arginine: Its pK_a value revisited, *Protein Science*, 24(5), 752–761. (2015)
- ¹²⁰ N.P. Pavletich; C.O. Pabo „Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers., *Science*, 261, 1701. (1993)
- ¹²¹ P.D. Kwong; R.Wyatt; J.Robinson; R.W.Sweet; J.Sodroski; W.A. Hendrickson „Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody” *Nature*, 393, 648. (1998)
- ¹²² L. Chruscinski; M. Dyba; M. Jezowska-Bojczuk; H. Kozlowski; G. Kupryszewski; Z. Mackiewicz; A. Majewska „Specific interactions of cu2-b virus (Ions with fragments of envelopeprotein of hepatitis” *J. Inorg. Biochem.*, 63, 49. (1996)
- ¹²³ M. A. Zoroddu; T. Kowalik-Jankowska; H. Kozlowskib; K. Salnikow; M. Costa „Ni(II) and Cu(II) binding with a 14-aminoacid sequence of Cap43 protein, TRSRSHSTSEGTRSR, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 85, 47–54. (2001)
- ¹²⁴ W. J. Puspita; A. Odani; O. Yamauchi „Copper(II)-dipeptide complexes containing an acidic and a basic amino acid residue. Side chain effects on structures and stabilities, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 73, 203–213. (1999)
- ¹²⁵ H. Kozlowski; B. Radomska; G. Kupryszewski; B. Lammek; C. Livera; L. D. Pettit; S. Pyburn „The unusual co-ordination ability of vasopressin-like peptides; potentiometric and spectroscopic studies of some copper(II) and nickel(II) complexes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 173 (1989)
- ¹²⁶ W. Bal; H. Kozlowski; B. Lammek; K. Rolka; L. D. Pettit „Potentiometric and spectroscopic studies of the Cu(II) complexes of Ala-Arg⁸ vasopressin and oxytocin:

Two vasopressin-like peptides” *Journal of Inorganic Biochemistry*, 45, 3, 15 193-202. (1992)

¹²⁷ W. Bal; H. Kozłowski; G. Kupryszewski; Z. Mackiewicz; L. Pettit; R. Robbins „Complexes of Cu(II) with Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-NH₂; an example of metal ion-promoted conformational organization which results in exceptionally high complex stability” *Journal of Inorganic Biochemistry*, 52, 79. (1993)

¹²⁸ W. Bal; M. Dyba; F. Kasprzykowski; H. Kozłowski; R. Latajka; L. Łankiewicz; Z. Maćkiewicz; L. D. Pettit „How non-bonding amino acid side-chains may enormously increase the stability of a Cu(II)-peptide complex” *Inorganica Chimica Acta*, 283, 1-11. (1998)

¹²⁹ V.S. Sharma „The stability constants of metal complexes of serine and threonine” *Biochimica et Biophysica Acta*, 148(1), 37-41. (1967)

¹³⁰ I. Nagypál; E. Farkas; A. Gergely, „NMR study of the kinetics of the proton-exchange reactions in aqueous solutions of copper(II)-amino acid parent complexes” *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 37, 2145. (1975)

¹³¹ L. D. Pettit; J. L. M. Swash, „Thermodynamics of formation of complexes of nickel(II) and copper(II) with L- and DL-serine and L- and DL-threonine” *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2416. (1976)

¹³² T. Kiss; Cs. Simon; Zs. Vachter, „Copper(II) complexes of ligands containing alcoholic hydroxy groups” *J. Coord. Chem.* 16, 225. (1987)

¹³³ H. Sigel „Ternary complexes in solution. XXIII. Influence of alkyl side chains on the stability of binary and ternary copper(II)-dipeptide complexes” *Inorg. Chem.*, 14, 1535 (1975)

¹³⁴ A. Gergely; E. Farkas „Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 6. Influence of side-chain donor group on the equilibrium and thermodynamics of binary and ternary copper(II)-dipeptide complexes” *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 381 (1982)

¹³⁵ Farkas E.; Tőzsér J.; Gergely A. „Vizsgálatok az átmenetifém-peptid komplexek körében, XI. Az L-szeril-glicin komplexképző sajátosságai” *Magy. Kém. Foly.*, 92, 49. (1986)

¹³⁶ E. Farkas; T. Kiss „Effects of side-chain donor groups on deprotonation of peptide amide in copper(II) complexes at high pH” *Polyhedron* 8, 2463. (1989)

¹³⁷ L. Sportelli; H. Neubacher; W. Lohmann „On the influence of aromatic residues on the interaction of copper (II) with small peptides containing aromatic amino acids: ESR and optical studies” *Zeitschrift für Naturforschung*, 32c, 643, (1977)

¹³⁸ D. N. Shelke „Coordination selectivity in the mixed-ligand formation of copper(II)-glycyl-DL-serine with some amino acids” *Inorg. Chim. Acta*, 80, 255. (1983)

¹³⁹ T. Szabo-Planka; Z. Arkosi; A. Rockenbauer; L. Korecz „An ESR study of the copper(II)-glycyl-L-serine and copper(II)-L-seryl-glycine systems by the simultaneous analysis of multi-component isotropic spectra. Formation constants and coordination modes” *Polyhedron*, 20, 995. (2001)

¹⁴⁰ Grenács Ágnes, „Az aszparagin hatása a peptidek komplexképző sajátosságaira” Szakdolgozat, Debrecen (2009)

¹⁴¹ F.S.Stephens; P.A.Williams „The crystal and molecular structure of bis(L-asparaginato)copper(II), [Cu(OOCCHNH₂CH₂CONH₂)₂]₂” *Acta Crystallographica*, B31, 841. (1975)

- ¹⁴² F. S. Stephens; R. S. Vagg; P. A. Williams „The crystal and molecular structure of bis(L-asparaginato)zinc(II), $[Zn(OOC\cdot CHNH_2\cdot CH_2\cdot CONH_2)_2]_n$ ” *Acta Crystallographica*, B33, 433, (1977)
- ¹⁴³ M. N. Srivastava; R. C. Tewari; V. C. Srivastava; G. B. Bhargava; A. N. Vishnoi „X-ray, spectral and magnetic studies of copper(II) chelates of L-asparagine and L-glutamine” *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 38, 1897, (1976)
- ¹⁴⁴ T. Kiss: Biocoordination Chemistry – Coordination equilibria in biologically active systems, (ed.: K. Burger), Ellis Horwood, Chichester, p. 56-116. (1990)
- ¹⁴⁵ A. Gergely; E. Farkas „Studies on transition-metal–peptide complexes. Part 6. Influence of side-chain donor group on the equilibrium and thermodynamics of binary and ternary copper(II)–dipeptide complexes” *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 381, 1982.
- ¹⁴⁶ J. M. Tsangaris; J. W. Chang; R. B. Martin „Ultraviolet circular dichroism of cupric and nickel ion complexes of amino acids and peptides” *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 726, (1969)
- ¹⁴⁷ Farkas E.; Beke B.; Gergely A.; *Magy. Kém. Foly.*, 86, 345. (1980)
- ¹⁴⁸ A. Gergely; I. Nagypal; E. Farkas „Thermodynamic relations of parent and mixed complexes of asparagine and glutamine with copper(II)” *J. Inorg. Nucl. Chem.* 37, 551 (1975)
- ¹⁴⁹ E. Kamysz; A. Kotynia; Z. Czyznikowska; M. Jaremko; L. Jaremko; M. Nowakowski; J. Brasun „Sialorphin and its analog as ligands for copper(II)ions” *Polyhedron*, 55, 216–224. (2013)
- ¹⁵⁰ Baráth Terézia, „Oldalláncban savamidcsoportot tartamazó peptidek réz(II)komplexei” Diplomamunka, Debrecen (2009)
- ¹⁵¹ P. Tsiveriotis; N. Hadjiliadis "Studies on the interaction of histidyl containing peptides with palladium(II) and platinum(II) complex ions" *Coordination Chemistry Reviews*, 192, 171-184 (1999).
- ¹⁵² H. Kozłowski; T. Kowalik-Jankowska; M. Jezowska-Bojczuk "Chemical and biological aspects of Cu^{2+} interactions with peptides and aminoglycosides" *Coordination Chemistry Reviews*, 249, 2323-2334 (2005).
- ¹⁵³ H. Kozłowski; A. Janicka-Kłos; P. Stanczak; D. Valensin; G. Valensin; K. Kulon "Specificity in the Cu^{2+} interactions with prion protein fragments and related His-rich peptides from mammals to fishes" *Coordination Chemistry Reviews*, 252, 1069-1078 (2008).
- ¹⁵⁴ G. Brookes; L.D. Pettit "Thermodynamics of formation of complexes of copper(II) and nickel(II) ions with glycylhistidine, alanylhistidine, and histidylglycine" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 2112-2117 (1975).
- ¹⁵⁵ E. Farkas; I. Sóvágó; A. Gergely "Studies on transition-metal peptide complexes. 8. Parent and mixed-ligand complexes of histidine-containing dipeptides" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 1545-1551 (1983).
- ¹⁵⁶ D.L. Rabenstein; S.A. Daignault; A.A. Isab; A.P. Arnold; M.M. Shoukry "Nuclear magnetic-resonance studies of the solution chemistry of metal-complexes. The complexation of zinc by glycylhistidine and alanylhistidine peptides" *Journal of the American Chemical Society*, 107, 6435-6439 (1985).
- ¹⁵⁷ P. Mlynarz; D. Valensin; K. Kociolek; J. Zabrocki; J. Olejnik; H. Kozłowski "Impact of the peptide sequence on the coordination abilities of albumin-like

tripeptides towards Cu^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} ions. Potential albumin-like peptide chelators" *New Journal of Chemistry*, 26, 264-268 (2002).

¹⁵⁸ P. Gizzi; B. Henry; P. Rubini; S. Giroux; E. Wenger "A multi-approach study of the interaction of the Cu(II) and Ni(II) ions with alanyl-glycyl-histamine, a mimicking pseudopeptide of the serum albumine N-terminal residue" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 1182-1192 (2005).

¹⁵⁹ R. Sankararamakrishnan; S. Verma; S. Kumar "ATCUN-like metal-binding motifs in proteins: Identification and characterization by crystal structure and sequence analysis" *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 58, 211-221 (2005).

¹⁶⁰ N. Camerman; A. Camerman; B. Sarkar "Molecular design to mimic copper(II) transport site of human-albumin - crystal and molecular-structure of copper(II) - glycylglycyl-L-histidine-N-methyl amide monoaqua complex" *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 54, 1309-1316 (1976)

¹⁶¹ E. Farkas; I. Sóvágó; T. Kiss; A. Gergely "Studies on transition-metal peptide complexes. 9. Copper(II) complexes of tripeptides containing histidine" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 611-614 (1984)

¹⁶² W. Bal; M.I. Djuran; D.W. Margerum; E. T. Gray; M. A. Mazid; R. T. Tom; E. Nieboer; P.J. Sadler "Dioxygen-induced decarboxylation and hydroxylation of [NiII(glycyl-glycyl-L-histidine)] occurs via Ni(II)- X-ray crystal-structure of [NiII(glycyl-glycyl-hydroxy-D,L-histamine)] $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ " *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 1889-1890 (1994)

¹⁶³ K. Várnagy; J. Szabó; I. Sóvágó; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; D. Sanna; G. Micera "Equilibrium and structural studies on copper(II) complexes of tetra-, penta- and hexa-peptides containing histidyl residues at the C-termini" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 467-472 (2000)

¹⁶⁴ L.D. Pettit; S. Pyburn; W. Bal; H. Kozlowski; M. Bataille "A study of the comparative donor properties to Cu(II) of the terminal amino and imidazole nitrogens in peptides" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 3565-3570 (1990)

¹⁶⁵ W. Bal; H. Kozlowski; R. Robbins; L.D. Pettit "Competition between the terminal amino and imidazole nitrogen donors for coordination to Ni(II) ions in oligopeptides" *Inorganica Chimica Acta*, 231, 7-12 (1995).

¹⁶⁶ M. Orfei; M.C. Alcaro; G. Marcon; M. Chelli; M. Ginanneschi; H. Kozlowski; J. Brasun; L. Messori "Modeling of copper(II) sites in proteins based on histidyl and glycyl residues" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97, 299-307 (2003)

¹⁶⁷ M. Bataille; G. Formicka-Kozłowska; H. Kozlowski; L.D. Pettit; I. Steel "The L-proline residue as a break-point in the coordination of metal peptide systems" *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 231-232. (1984)

¹⁶⁸ C. Kállay; K. Várnagy; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; D. Sanna; I. Sóvágó "Thermodynamic and structural characterization of the macrochelates formed in the reactions of copper(II) and zinc(II) ions with peptides of histidine" *Inorganica Chimica Acta*, 362, 935-945 (2009)

¹⁶⁹ L.E. Lammish; S.A. Kates "Instrumentation for automated solid phase peptide synthesis" in *Fmoc solid phase peptide synthesis, a practical approach*, W. C. Chan; P. D. White (Eds) Oxford University Press, Oxford, 277-302. (2000)

¹⁷⁰ H. Rink "Solid-phase synthesis of protected peptide-fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin" *Tetrahedron Letters*, 28, 3787-3790 (1987)

- ¹⁷¹ G. Barany; N. Kneibcordonier; D.G. Mullen "Solid-phase peptide-synthesis - a silver anniversary report" *International Journal of Peptide and Protein Research*, 30, 705-739 (1987)
- ¹⁷² G.B. Fields; Z. Tian; G. Barany "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis" in *Synthetic peptides*, G. A. Grant (Ed) Freeman and Co, New York, 77-183. (1992)
- ¹⁷³ L. Zékány; I. Nagypál "PSEQUAD „A comprehensive program for the evaluation of potentiometric and/or spectrophotometric equilibrium data using analytical derivatives" in *Computational methods for the determination of formation constants*, D. Legett (Ed) Plenum Press, New York, 291-353. (1985)
- ¹⁷⁴ H.M. Irving; M.C. Miles; L.D. Pettit "A study of some problems in determining the stoichiometric proton dissociation constants of complexes by potentiometric titration using a glass electrode" *Analytica Chimica Acta*, 38, 475-488. (1967)
- ¹⁷⁵ G. Eriksson „An algorithm for the computation of aqueous multi-component, multiphase equilibria" *Anal. Chim. Acta*, 112, 375. (1979)
- ¹⁷⁶ P. Gans; A. Sabatini; A. Vacca „*SUPERQUAD: an improved general program for computation of formation constants from potentiometric data*" *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1196. (1985)
- ¹⁷⁷ L. D Pettit.; J. E Gregor; H. Kozlowski „*Perspectives on Bioinorganic Chemistry*, 1, (eds.: Hay, R. W.; Dilworth, J. R.; Nolan, K. B.) (1991). JAI Press, London
- ¹⁷⁸ J. Császár; M. Bán „*Optikai szinképek, ligandumtér-elmélet, komplexszerkezet*" *Akadémiai Kiadó*, Budapest (1972)
- ¹⁷⁹ A. Ménagé; J. Tempe; G. Morel „Analyse des acides amines par chromatographie. II. Detection automatique des guanidines" *Physiol. Veg.* 4, 317, (1966)
- ¹⁸⁰ K. Ősz; „A new, model-free calculation method to determine the coordination modes and distribution of copper(II) among the metal binding sites of multihistidine peptides using circular dichroism spectroscopy" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 2184–2195. (2008)
- ¹⁸¹ V. Józai; Z. Nagy; K. Ősz; D. Sanna; G. Di Natale; D. La Mendola; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; I. Sóvágó „Transition metal complexes of terminally protected peptides containing histidyl residues" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 1399–1409. (2006)
- ¹⁸² A. Myari; G. Malandrinos; Y. Deligiannakis; J.C. Plakatouras; N. Hadjiliadis; Z. Nagy; I. Sóvágó, „Interaction of Cu^{2+} with His-Val-His and of Zn^{2+} with His-Val-Gly-Asp, two peptides surrounding metal ions in Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme", *J. Inorg. Biochem.*, 85, 253-261. (2001)
- ¹⁸³ Á. Dávid, Cs. Kállay, D. Sanna, N. Lihi, I. Sóvágó, K. Várnagy „Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes of rat amylin fragments. The anchoring ability of specific non-coordinating side chains" *Dalton Trans.*, 44, 17091–17099. (2015)
- ¹⁸⁴ J.F. Galey; B. Decock-Le Reverend; A. Lebki; L. D. Pettit; S. I. Pyburn; H. Kozlowski „Specific interactions of the β -carboxylate group of the aspartic acid residue in oligopeptides containing one, two or three such residues with copper(II) ions. A potentiometric and spectroscopic study" *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2281. (1991)

- ¹⁸⁵ I. Sóvágó; D. Sanna; A. Dessi; K. Várnagy; G. Micera; „EPR and potentiometric reinvestigation of copper(II) complexation with simple oligopeptides and related compounds” *J. Inorg. Biochem.*, 63, 99. (1996)
- ¹⁸⁶ Nagy E.M. „Átmenetifém-ionok kölcsönhatása kis biomolekulákkal”, Egyetemi doktori értekezés, Debrecen, 67. oldal (2006)
- ¹⁸⁷ N.I. Jakab; B. Gyurcsik; T. Koertvelyesi; I. Vosekalna; J. Jensen; E. Larsen "Design of histidine containing peptides for better understanding of their coordination mode toward copper(II) by CD spectroscopy" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101, 1376-1385 (2007)
- ¹⁸⁸ K. Várnagy; J. Szabó; I. Sóvágó; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; D. Sanna; G. Micera, „Equilibrium and structural studies on copper (II) complexes of tetra-, penta- and hexa-peptides containing histidyl residues at the C-termini” *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 467. (2000)
- ¹⁸⁹ Á. Grenács; A. Kaluha; C. Kállay; V. Józsa; D. Sanna; I. Sóvágó, „Binary and ternary mixed metal complexes of terminally free peptides containing two different histidyl binding sites” *J. Inorg. Biochem.*, 128, 17. (2013)
- ¹⁹⁰ B. Decock Le-Reverend; L. Andrianarijaona; C. Livera; L.D. Pettit; I. Steel; H. Kozlowski „A potentiometric and spectroscopic study of the interaction of the N terminal tetrapeptide fragment of fibrinopeptide A with Cu(II) and Ni(II)” *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2221. (1986)
- ¹⁹¹ R. B. Martin; M. Chamberlin; J.T. Edsall „The association of nickel(II) ion with peptides” *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 495. (1960)
- ¹⁹² I. Sovago; K. Várnagy; K. Ősz „Metal complexes of peptides containing monodentate or chelating imidazole nitrogen donors: Factors influencing the coordination of amide groups and imidazole side chains” *Journal Comments on Inorganic Chemistry*, 23, 2, 153. (2002)
- ¹⁹³ I. Turi; D. Sanna; E. Garribba; G. Pappalardo; I. Sóvágó „The effect of non-coordinating side chains on the metal binding affinities of peptides of histidine” *Polyhedron*, 62, 7–17. (2013)
- ¹⁹⁴ É. Józsa „Az Alzheimer-kórért felelős amiloid- β (1-16) fragmenseinek Ni(II)-, Cd(II)- és Co(II)-komplexei” Tudományos Diákköri dolgozat, (2008)
- ¹⁹⁵ A. P. Brunetti; E. J. Burke; M. C. Lim; G. H. Nancollas „Thermodynamics of ion association. Part XXIII. Copper, zinc, and cadmium complexes of some dipeptides” *Journal of Solution Chemistry*, Vol. 1, 2, (1972) * T = 298 K, I = 0,1 M (KNO₃)
- ¹⁹⁶ J. Ambrose; A. Covington; H. Thirsk „Standard electrode potential of β -manganese dioxide and its relation to other properties” *Transactions of the Faraday Society*, 65, 1897. (1969)
- ¹⁹⁷ Fáriné Turi Ildikó Margit „A prion fehérje peptidfragmenseinek fémion-szelektivitása” Egyetemi doktori értekezés, Debrecen, 60. oldal (2014)
- ¹⁹⁸ G. Csire; L. Nagy; K. Várnagy; Cs. Kállay „Copper(II) interaction with the human prion 103-112 fragment - Coordination and oxidation” *Journal of Inorganic Biochemistry*, 170, 195-201. (2017)
- ¹⁹⁹ É. Józsa; K. Ősz; Cs. Kállay; P. De Bona; C. Damante; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; I. Sóvágó „Nickel(II) and mixed metal complexes of amyloid- β N-terminus” *Dalton Trans.*, 39, 30, 7046-7053. (2010)

9. Függelék /TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK/ Publications/

Az értekezés alapiát képező közlemények (Publications related to the thesis)

1. Ágnes Dávid, Csilla Kállay, Daniele Sanna, Norbert Lihi, Imre Sóvágó, Katalin Várnagy: *Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes of rat amylin fragments. The anchoring ability of specific non-coordinating side chains*, Dalton Trans., **2015**, 44, 17091–17099.

IF: 4,197

DOI: 10.1039/c1dt10835b

2. Csilla Kállay, Ágnes Dávid, Sarolta Timári, Eszter Márta Nagy, Daniele Sanna, Eugenio Garribba, Giovanni Micera, Paolo De Bona, Giuseppe Pappalardo, Enrico Rizzarelli and Imre Sóvágó: *Copper(II) complexes of rat amylin fragments*, Dalton Trans. **2011**, 40 (38), 9711 – 9721.

IF: 3,838

DOI: 10.1039/c5dt02445e

Az értekezés alapiát képező előadások (Lectures related to the thesis)

1. Katalin Várnagy Ágnes Dávid, Daniele Sanna, Csilla Kállay, Imre Sóvágó: *The anchoring ability of specific non-coordinating side chains in the rat amylin fragments*, 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference (Eurobic 13), Budapest, Hungary, **2016**. 08. 28- 09. 01.

2. Dávid Ágnes, Kállay Csilla, Várnagy Katalin, Daniele Sanna, Hartman Éva, Sóvágó Imre: *Amilinhormonok fémkötőhelyének vizsgálata*, 49. Komplexkémiái Kollokvium, Siófok, **2015**. 05. 26-28.

3. Katalin Várnagy, Gizella Csire, Sarolta Timári, Ágnes Dávid, Csilla Kállay: *The role of side chains in the fine tuning of metal binding ability of peptides*, 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (Eurobic 12) Zürich, Switzerland, **2014**. 08. 24-28.

4. Katalin Várnagy, Ágnes Dávid, Csilla Kállay, Daniele Sanna and Imre Sóvágó: *The role of the polar side chains in the metal binding ability of amylin fragments*, 12th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC12), Guangzhou, Kína, **2013**. 12. 03–06.

5. Dávid Ágnes, Várnagy Katalin, Kállay Csilla, Daniele Sanna, Sóvágó Imre: *Amilinhormonok fémkötőhelyének vizsgálata*, 47. Komplexkémiái Kollokvium, Mátraháza, **2013**. 05. 30.

6. Dávid Ágnes: *Amilinhormonok szintézise és oldategyensúlyi vizsgálata*, Kémiai Előadói Napok, Szeged, **2012**. 10. 29-31.

7. Dávid Ágnes: *Amilinfragmensek szintézise és oldategyensúlyi vizsgálata*, Hatvani István Szakkollégium hallgatói konferenciája, Debrecen, **2012.** 05. 03.
8. Dávid Ágnes: *Amilinfragmensek oldategyensúlyi vizsgálata*, XXX. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs, **2011.** 04. 27–29.
9. Dávid Ágnes: *Amilinfragmensek oldategyensúlyi vizsgálata*, Hatvani István Szakkollégium hallgatói konferenciája, Debrecen, **2011.** 04. 21.
10. Dávid Ágnes: *Amilinfragmensek oldategyensúlyi vizsgálata*, Tudományos Diákköri Konferencia, Debrecen, **2010.** 11. 25.
11. Kállay Cs., Dávid Á., Sóvágó I.: *Amilinfragmensek réz(II)ionokkal való kölcsönhatásának vizsgálata*, XLV. Komplexkémiái Kollokvium, Mátraháza, **2010.** 05. 26–28.

Az értekezés alapját képező poszterek (Posters related to the thesis)

1. Ágnes Dávid, Katalin Várnagy, Csilla Kállay, Daniele Sanna, Imre Sóvágó: *The anchoring ability of specific non-coordinating side chains in fragments of the rat and the human amylin*, 13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC13), Galway, Írország, **2015.** 06. 12-15.
2. Ágnes Dávid, Katalin Várnagy, Csilla Kállay, Daniele Sanna, Imre Sóvágó: *The anchoring ability of specific non-coordinating side chains in fragments of the rat and the human amylin*, XIII. International Symposium on Inorganic Biochemistry, Karpacz, Lengyelország, **2015.** 09. 1-6.
3. Agnes David, Katalin Varnagy, Csilla Kallay, Daniele Sanna and Imre Sovago: *Binding sites of rat amylin fragments*, International Symposium on Metal Complexes 2014 (ISMEC2014), Pavia, Olaszország, **2014.** június 8-12.
4. Ágnes Dávid, Katalin Várnagy, Csilla Kállay, Daniele Sanna and Imre Sóvágó: *Binding sites of rat amylin fragments*, 12th International Symposium on Inorganic Biochemistry, Wroclaw, Lengyelország, **2013.** 08. 28 – 09. 01.
5. Ágnes Dávid, Csilla Kállay, Imre Sóvágó, Daniele Sanna: *Effect of side chains on the copper(II) complexes of rat amylin fragments*, 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Granada, Spanyolország, **2012.** 09. 12–17.
6. Csilla Kállay, Ágnes Dávid, Imre Sóvágó, Paolo De Bona, Giuseppe Pappalardo, Daniele Sanna and Enrico Rizzarelli: *Copper(II) complexes of rat amylin fragments*, 3rd International Symposium on Metallomics, Münster, Németország, **2011.** 06. 15–18.