

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A PRION FEHÉRJE PEPTIDFRAGMENSEINEK FÉMION-
SZELEKTIVITÁSA**

Fáriné Turi Ildikó Margit

Témavezető: Dr. Sóvágó Imre professzor emeritus



Debreceni Egyetem
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2014.

I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

A neurodegeneratív rendellenességek közé tartozó prion betegségek, mint például a Creutzfeldt-Jakob, a sűrű- vagy a kergemarhakór kialakulásában a megváltozott szerkezetű prion fehérjét tartják felelősnek. A normál prion protein (PrP^{C}) tényleges biológiai szerepe, valamint a megváltozott kóros forma (PrP^{Sc}) kialakulásának mechanizmusa még nem tisztázott. Az utóbbi időben azonban egyre több kísérleti bizonyíték támasztja alá, hogy a fémionok, különösen a réz(II)ionok részt vesznek a prion fehérje normális működésével kapcsolatos biokémiai folyamatokban és/vagy konformációs átalakulásokban. Ebből kifolyólag a fehérje, illetve peptidfragmenseinek réz(II)ionokkal való kölcsönhatását kiterjedten tanulmányozták. A réz(II)ionok felé mutatott nagy affinitás az aminosav-szekvenciájában található hisztidin imidazolil-oldalláncokkal értelmezhető, amelyek elsődleges kötőhelyek a fémionok számára.

A *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén* működő *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban* a prion fehérje peptidfragmensein korábban végzett komplexkémiai tanulmányok is alátámasztják a kiváló réz(II)ionmegkötést. Ezen túlmenően megállapították az egyes hisztidin-oldalláncok rézkötésében mutatkozó preferenciát is, amely a $\text{H111} > \text{H96} \gg \text{H85} \sim \text{H77}$ sorrendnek adódott, azaz az oktarepeat tartományon kívül elhelyezkedő hisztidinek nagyobb affinitással rendelkeznek a réz(II)ionok felé, mint az azon belüliek.

Eddigi irodalmi adatok főként a réz(II)ionnal való komplexképződési folyamatok megismerésére irányultak. A peptidek koordinációs kémiájára vonatkozó ismeretek alapján azonban nyilvánvaló volt, hogy a peptidek más átmenetifém-ionokkal is stabilis kölcsönhatásra képesek, ami indokolja az egyes fragmensek fémion-szelektivitásának tanulmányozását is. Várhatóan a nikkel(II)ionokat is számottevő mértékben megkötik és ezek a komplexek egyúttal modellek is lehetnek a réz(II)komplexek szerkezetének megértésében.

Mivel a hisztidintartalmú szekvenciák a nikkel(II)ionokkal is komplexet képeznek, célul tűztük ki olyan természetes és mutáns prion peptidfragmensek nikkel-kötőképességének vizsgálatát, amelyek egyszerre eltérő tartományokból tartalmaznak hisztidineket, valamint a komplexképződés jellemzése mellett arra is fókuszálva, hogy milyen arányban és hol kötik a nikkel(II)iont.

Biológiai rendszerekben azonban egyidejűleg több fémion együttesen van jelen, ami indokolja a vegyes fémiontartalmú rendszerek vizsgálatát. Így célunk volt egyes több hisztidint tartalmazó természetes prion peptidfragmensek vegyes nikkel(II)/réz(II) rendszereiben zajló komplexképződési folyamatok tanulmányozása.

A kapott eredmények alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a vizsgált prion peptidfragmensek megkötik a nikkel(II)ionokat, azonban a kötődési preferenciában jelentős különbség mutatkozott a réz(II)- és nikkel(II)ion között. Így munkánk második felében a különbség okának felderítése érdekében az egyes kötőhelyeket modellező egy, kettő, illetve három hisztidint tartalmazó modellpeptideken tanulmányoztuk, hogy milyen tényezők befolyásolják a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplex, valamint vegyes magvú nikkel(II)/réz(II)komplexek képződését.

II. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Szilárdfázisú peptidszintézis: Munkánk során a prion fehérje kötőhelyeit modellező peptidek szintézisét automatizált módon a mikrohullámú Liberty1 peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) végeztük. Az N-terminuson acilezett, illetve szabad aminocsoporttal rendelkező modellpeptideket Fmoc/tBu technikával állítottuk elő, amelyhez a C-terminuson amid végződést biztosító Rink Amide AM típusú gyantát használtunk. Az aminosavak aktiválása a TBTU/HOBt/DIEA technika segítségével zajlott. Az előállítások során alkalmazott oldószer *N,N*-dimetil-formamid (DMF). Az előállított peptidek aminosav-szekvenciája és szerkezete az 1. ábrán látható. A prion peptidfragmensek szintézise Cataniában (Olaszország) történt.

pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg a ligandumok protonálódási állandóit, valamint a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexek stabilitási állandóit. A méréseket vizes oldatban kiviteleztük ($T = 298 \text{ K}$; $I = 0,20 \text{ mol/dm}^3$) különböző fémion-ligandum aránynál. A kísérleti adatokból a fémkomplexekre meghatározott stabilitási szorzatokat a PSEQUAD és SUPERQUAD számítógépes programokkal számítottuk ki. A rendszerekre jellemző koncentráció-eloszlási görbéket a kapott stabilitási állandó értékek alapján a SED program segítségével szerkesztettük meg.

UV-látható spektrofotometriás vizsgálatokat végeztünk a réz(II)- és nikkel(II)ionokat tartalmazó rendszerekben 300-800 nm-es hullámhossztartományban. A spektrumokat Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras UV-vis spektrofotométeren vettük fel különböző pH-értékeken, különböző fémion-ligandum arányoknál. A ligandumkoncentráció $1 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ koncentráció-tartományba esett. 1,000 cm úthosszú kvarc küvettát használtunk.

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia optikailag aktív fémkomplexek szerkezetének felderítésében széles körben használt módszer. Ezen módszert mi

réz(II)- és nikkel(II)-peptidkomplexek tanulmányozására használtuk. A CD méréseket a *Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén* végeztük egy JASCO-810 típusú spektrométeren. A spektrumokat különböző fémion-ligandum arányoknál, illetve különböző pH-értékeknél rögzítettük 200-800 nm hullámhossztartományban, szobahőmérsékleten, 0,100 és 1,000 cm úthosszúságú küvetákban.

¹H NMR spektroszkópiás méréseket végeztünk néhány szabad ligandum és egyes síknégyszetes nikkel(II)komplexek esetében. Az ¹H NMR spektrumokat BRUKER AM 360 MHz FT-NMR készüléken vettük fel, a kiértékeléshez pedig az 1D WIN-NMR Bruker szoftvert használtuk. A kémiai eltolódás értékének változása (a szabad liganduméhoz viszonyítva), a jelek száma és felhasadása információt szolgáltatott a komplexek koordinációs módjáról, illetve az esetleges izomerekről.

III. VIZSGÁLT LIGANDUMOK

A munka során vizsgált két természetes, illetve két mutáns prion peptidfragmens egyaránt tartalmaz oktarepeatbeli és azon kívüli hisztidineket is, amely kiváló lehetőséget nyújt a két tartománybeli hisztidinek összehasonlítására. Ezek a peptidek az olaszországi Cataniai Egyetemen (University of Catania) készültek szilárdfázisú peptidszintézissel, amelyek közül a *HuPrP(60-114)* szintézisében én is részt vettem. A peptidfragmensek aminosav-szekvenciái (hárombetűs rövidítésekkel) a következők:

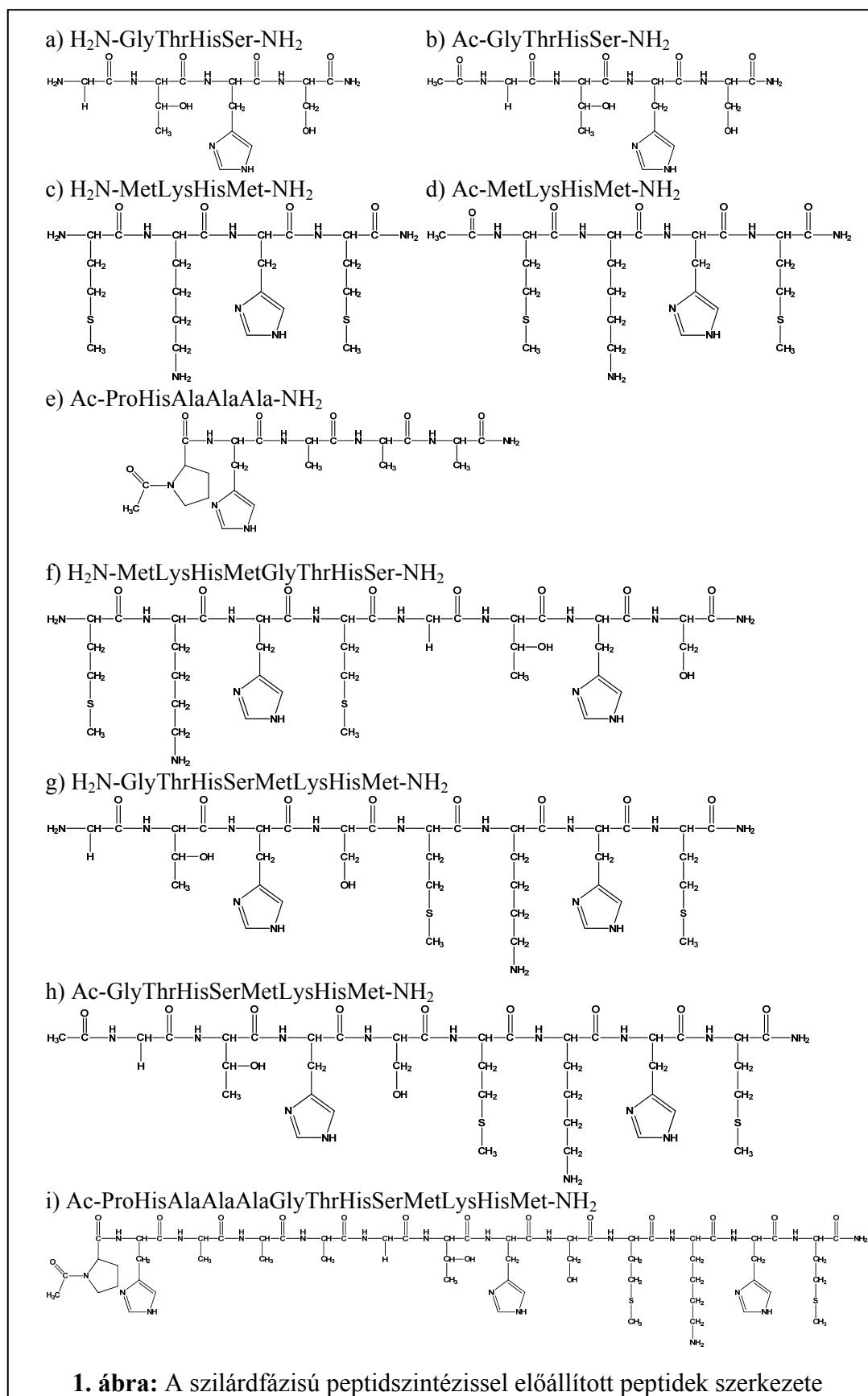
HuPrP(84-114)His85Ala: Ac-ProAlaGlyGlyGlyTrpGlyGlnGlyGlyGlyThr**His**SerGlnTrp-AsnLysProSerLysProLysThrAsnMetLys**His**MetAlaGly-NH₂

HuPrP(84-114)His96Ala: Ac-Pro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnGlyGlyGlyThrAlaSerGlnTrp-AsnLysProSerLysProLysThrAsnMetLys**His**MetAlaGly-NH₂

HuPrP(76-114): Ac-Pro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnPro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnGlyGlyGly-Thr**His**SerGlnTrpAsnLysProSerLysProLysThrAsnMetLys**His**MetAlaGly-NH₂

HuPrP(60-114): Ac-Pro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnPro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnPro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnPro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnGlyGlyGlyThr**His**SerGlnTrpAsnLysProSer-LysProLysThrAsnMetLys**His**MetAlaGly-NH₂.

A szilárdfázisú peptidszintézissel előállított egy, kettő és három hisztidint tartalmazó peptidek szerkezete az 1. ábrán látható.



IV. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A jelen doktori munka során oldategyensúlyi vizsgálatokat végeztünk három prion peptidfragmens Ni(II)-ionokkal, illetve Ni(II)/Cu(II)-ionokkal alkotott vegyes rendszereire, valamint egy 55 aminosavból felépülő prion peptidfragmens Cu(II)-rendszereire. Majd ezt követően kilenc hisztidintartalmú modellpeptid Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionokkal alkotott törzsrendszerét, illetve több hisztidint tartalmazó peptidok esetében a Ni(II)/Cu(II) vegyes rendszereket tanulmányoztuk. Vizsgálataink első lépéseként valamennyi esetben a ligandumok protonálódási állandóit határoztuk meg, majd a fémiont is tartalmazó rendszerekben a képződő komplexek stabilitási állandóit, illetve az állandók alapján koncentráció-eloszlási görbéket szerkesztettünk. A komplexekben megvalósuló szerkezetek, kötési módok felderítésére további mérési módszereket is alkalmaztunk (UV-vis spektrofotometria, CD, NMR és ESR spektroszkópia).

A doktori értekezés felépítését tekintve három részre bontható. Az *első* részben célkitűzéseinknek megfelelően a prion fehérje három peptidfragmensének Ni(II)-komplexeit, és két peptidfragmens Ni(II)/Cu(II) vegyes fémkomplexeit tanulmányoztuk.

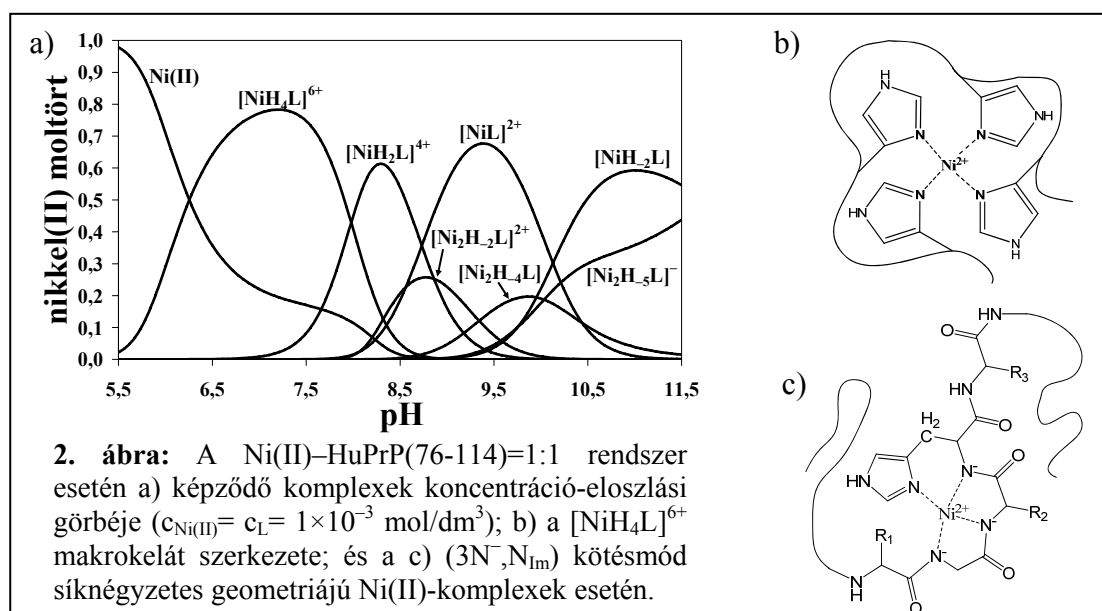
1. A Prion peptidfragmensek komplexképződési folyamatai

1.1. A Prion peptidfragmensek nikkell(II)komplexei

A két hisztidint tartalmazó HuPrP(84-114)H85A és HuPrP(84-114)H96A, illetve a négy hisztidint tartalmazó HuPrP(76-114) peptidfragmensek kiváló lehetőséget nyújtanak a különböző tartományokból származó hisztidinek koordinációs kémiai összehasonlítására. A Ni(II)-rendszereknél az alábbi megállapítások tehetők.

- A prion peptidfragmensek hatékonyan kötik a nikkell(II)ionokat (2.a ábra).
- Annyi nikkell(II)ion megkötésére képesek, ahány oktarepeat tartományon kívüli hisztidint tartalmaznak a szekvenciájukban (az oktarepeat tartomány csak extrém lúgos körülmények között képes koordinálni a nikkell(II)ionokat).
- A hisztidil-oldalláncok független fémionkötőhelyként viselkednek.
- Réz(II)ionokkal összehasonlítva az Irving-Williams sornak megfelelően kisebb stabilitású nikkell(II)komplexek képződnek.
- Két fő koordinációs mód figyelhető meg (2. ábra):
 - pH 6 körül a hisztidil-oldalláncok imidazolnitrogénjeinek elsődleges és kizárólagos koordinációjával makroelát szerkezetű részecskék jönnek létre (2.b ábra);

- 7,5-10 közötti pH-tartományban három amidnitrogén N-terminus felé lezajló kooperatív deprotonálódása és koordinációja következtében 4N-es, egy- vagy kétmagvú sárga színű, síknégyszetes geometriájú, diamágneses Ni(II)-komplexek képződnek ($3N^-, N_{Im}$) koordinációs móddal (2.c ábra).
- Hidroxohidas komplexek létezésére egyik esetben sem találtunk bizonyítékot.
- Lizil-oldalláncok ε -aminocsoportjának koordinációját egyik esetben sem lehetett kimutatni.
- A komplexek stabilitásának és a koordinációs izomerek CD spektrumának összehasonlításával megállapítható, hogy Ni(II)-ionok számára a H96 környéke a kedvezményezett kötőhely a H111 környékével szemben (ez pont ellentétes a Cu(II)-ionokénál tapasztaltakkal).



1.2. Prion peptidfragmensek réz(II)/nikkel(II) vegyes fémkomplexei

A HuPrP(84-114)H85A és HuPrP(84-114)H96A mutáns prion peptidfragmensek nikkel(II)/réz(II) vegyes fémiontartalmú rendszereit tanulmányozva a következő megállapítások tehetők.

- Ekvimoláris oldatban mindkét ligandum képes a kétféle fémiont egyszerre oldatban tartani.
- Enyhén savas és semleges oldatban kizárólag Cu(II)-komplexek képződnek két imidazolnitrogén koordinációjával, a pH emelkedésével bekövetkezik az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja ($2N^-, N_{Im}$), illetve ($3N^-, N_{Im}$) kötőmódot eredményezve.
- A Ni(II)-ionokkal való kölcsönhatás pH 8,0 felett számottevő, ahol a koordinációban imidazolnitrogén és amidnitrogének vesznek részt.

- Lúgos pH-tartományban jellemző a vegyes fémkomplexek képződése, amelyekben mind a két fémiont imidazol- és amidnitrogének koordinálják.
- A HuPrP(84-114)H85A ligandum estében képződő koordinációs izomerek vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy Ni(II)-ionok kedvezményezett kötőhelye a H96, míg réz(II)ionoké H111 (a törzsrendszereknél tapasztaltakkal nagyon jó egyezésben).
- A HuPrP(84-114)H96A mutáns peptidfragmens képes megkötni az egyszerre jelenlevő két fémiont ekvimoláris oldatban. pH 10,0 felett kizárólag kétmagvú vegyes komplexek képződnek, ahol a Ni(II)-ionok többsége a H111 környékéhez kötődik, míg a Cu(II)-ion többsége az oktarepeat tartománybeli H85 környékéhez;
- A Ni(II)-ionok nem helyettesítik a Cu(II)-ionokat, viszont befolyásolják annak egyes kötőhelyek közötti eloszlását.

2. A prion fehérje fémionkötőhelyeit modellező peptid komplexképződési folyamatai

A dolgozat *második* részében a fémion-szelektivitás megértése céljából a prion peptidfragmensek komplexkémiái viselkedését modelleztük egy, kettős, illetve három hisztidint tartalmazó peptidok Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-rendszereinek tanulmányozásával, amelyek során kimutattuk, hogy a peptidok fémion-szelektivitását az aminosav-szekvencia lényegesen befolyásolja és a képződő komplexek stabilitása megfelel az Irving-Williams sornak. Vizsgálataink tovább erősítik az irodalomban is fellelhető eddigi tapasztalatokat, amely szerint a fémkomplexek stabilitását:

- (1) befolyásolja az imidazolnitrogének száma (minél nagyobb, annál stabilisabb)
- (2) megnöveli a kettős horgony donor ($\text{NH}_2, \text{N}_{\text{Im}}$) jelenléte.

2.1. Egy hisztidint tartalmazó modellpeptidok fémkomplexei

Korábban az Ac-GT⁹⁶HS-NH₂ és Ac-MK¹¹¹HM-NH₂ Cu(II)- és Ni(II)-komplexeit már jellemezték, ezek esetében csak kiegészítő méréseket, illetve összehasonlító elemzéseket végeztünk. A prion fehérje N-terminális részén elhelyezkedő hisztidinjei (H111, H96 és H_{oktarepeat}) körül található aminosav-szekvenciát modellező peptidok (GTHS, MKHM, PHAAA) fémion-koordinációjának tanulmányozása során tett megállapításokat a peptidok összehasonlításával együtt foglaltuk össze.

- Az albuminszerű szekvencia következtében a szabad α -aminocsoporttal rendelkező tetrapeptidok a védett származékokkal szemben nagy affinitással rendelkeznek a Cu(II)- és a Ni(II)-ionok felé. Ennek magyarázata, hogy az N-terminustól függően eltérő kötőmód valósul meg a 4N-es komplexekben:
 - ($\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) szabad N-terminus esetében

- $(3N^-, N_{Im})$ védett N-terminus esetében.
- Zn(II)-ionnál egyik esetben sem következik be amiddeprotonálódás, így elérve a cink(II)ion hidrolízisének tartományát, a fémion hidrolizál.
- A szabad és védett N-terminusú tetrapeptidok a prion peptidfragmenseknél tapasztaltakkal megegyező fémion-szelektivitást mutatnak, azaz a Cu(II)-ionok stabilisabb komplexet képeznek az -MKHM- szekvenciával, míg a Ni(II)-ionok a -GTHS- szekvenciájú tetrapeptidekkel.
- DFT számolások alapján a -GTHS- szekvencia jobban megfelel a Ni(II)-komplexekre jellemző szabályos síknégyszetes geometria kialakulásának, az -MKHM- szekvencia pedig olyan Cu(II)-komplexek kialakulásának, ahol a Cu(II)-ion körül öt donoratomb található $[(NH_2, 2N^-, N_{Im})_{ekv} + (O_{H_2O})_{ax}]$.
- A pentapeptid jól modellezi az oktarepeat tartományt, hiszen Cu(II)-ionokkal való komplexképződése során a tetrapeptidekkel összehasonlítva kisebb stabilitású részecskék képződnek, ami a C-terminus irányban lezajló amiddeprotonálódás és -koordináció következtében kialakuló (7,5,5)-tagú csatolt kelátgyűrűk képződésével értelmezhető; valamint Ni(II)-ionnal való kölcsönhatása elhanyagolható.

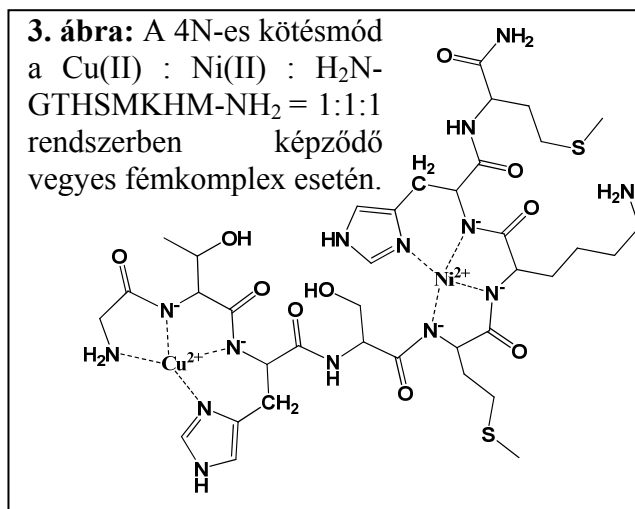
2.2. Két hisztidint tartalmazó modellpeptidek fémkomplexei

Az H_2N -MKHMGTHS- NH_2 , H_2N -GTHSMKHM- NH_2 és Ac-GTHSMKHM- NH_2 oktapeptidekkel két oktarepeat tartományon kívüli kötőhelyet (H96 és H111) kívántunk modellezni a két tetrapeptid-szekvencia összekapcsolásával. Mindhárom oktapeptid két ekvivalens Cu(II)- vagy Ni(II)-iont tud megkötni, azonban Zn(II)-ionokat csak ligandumfelesleg mellett képes oldatban tartani. A szekvenciákban található mindkét hisztidin független kötőhelyként viselkedik Cu(II)- és Ni(II)-ion számára.

A szabad N-terminusú oktapeptidek kétféle lehetséges kötésmódú komplex kialakulására alkalmas kötőhelyet tartalmaznak $((NH_2, 2N^-, N_{Im})$ az N-terminushoz közeli hisztidin részvételével, illetve $(3N^-, N_{Im})$ a belső hisztidinnél).

- Nagy affinitással rendelkeznek a réz(II)- és nikkel(II)ionok felé az albuminszerű szekvencia következtében.
- Cu(II)- és Ni(II)-rendszereikben széles pH-tartományban uralkodó részecske a $(NH_2, 2N^-, N_{Im})$ kötésmódú $[MH_{-1}L]$ ($=[MH_{-2}LH]$).
- Koordinációs izomerek vizsgálata alapján szekvencia-specifikusság nem mutatható ki, az első ekvivalens fémion (Cu(II) vagy Ni(II)) kizárólag az N-terminushoz kötődik.

- Komplexek stabilitásának összehasonlításával megállapítható, hogy a Ni(II)-ion stabilisabb komplexet képez a H₂N-GTHSMKHM-NH₂, míg a Cu(II)-ion az H₂N-MKHMGTSH-NH₂ oktapeptiddel.
- Ni(II)/Cu(II) vegyes rendszerben a pH függvényében a Cu(II)-ionok kötődnek először, ezzel elfoglalva az aminoterminust, a Ni(II)-ionok a maradék helyre kerülnek (3. ábra).



A védett N-terminusú oktapeptid koordinációs kémiai szempontból két azonos kötőhelyet tartalmaz.

- A szabad N-terminusú származékokhoz képest a komplexképződés magasabb pH értékekre tolódik.
- Cu(II)-rendszerben pH 5-6 között 2N_{Im} koordinációjával [CuHL] részecske képződik, majd két amidnitrogén kooperatív deprotonálódása és koordinációja következtében pH 7 körül [CuH₋₁L], majd pH 8 körül egy további amidkoordináció következtében [CuH₋₂L] jön létre (3N⁻, N_{Im}) kötősmóddal. További protonvesztési folyamatok nem eredményeznek változást a koordinációs szférában. Koordinációs izomerek vizsgálata kimutatta, hogy a réz(II)ionok azonos mértékben oszlanak el a két hisztidil-oldallánc között. Fémionfelesleg esetén a kétmagvú komplexek jelenléte a meghatározó.
- Ni(II)-rendszerben pH 6-8 között uralkodó részecske a csupán N_{Im}-ek koordinációjával létrejövő, oktaéderes geometriájú [NiHL]. pH 8 felett az amidnitrogének kooperatív deprotonálódásával és koordinációjával egy szerkezeti átrendeződést követően síknégyszetes geometriájú, diamágneses [NiH₋₂L] részecske képződik. Koordinációs izomerek vizsgálata kimutatta, hogy a Ni(II)-ionok 90%-a a -GTHS- szekvenciához kötődik. Fémionfelesleg esetén a kétmagvú komplexek jelenléte a meghatározó.
- Ni(II)/Cu(II) vegyes rendszerben 11,0-es pH-értékre kialakuló [NiCuH₋₆L] részecskében a Cu(II)-ionok 90%-a az -MKHM-, valamint Ni(II)-ionok 90%-a a -GTHS- szekvenciánál található.

2.3. Három hisztidint tartalmazó modellpeptid fémkomplexei

Az Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH₂ tridekapeptid három hisztidint tartalmaz a prion fehérje három különböző tartománybeli fémionkötőhelyét modellezve.

- Ennek megfelelően ez a ligandum három ekvivalens Cu(II)-iont vagy két ekvivalens Ni(II)-iont képes megkötni a teljes pH-tartományban. Mindhárom hisztidin független kötőhelyként viselkedik.
- Az első két ekvivalens Cu(II)-ion a külső hisztidineket modellező (-GTHS- és -MKHM-) szekvenciákhoz kötődik összemérhető mértékben.
- Az első ekvivalens Ni(II)-ion a H96-t modellező -GTHS- résznél található.
- A Ni(II)/Cu(II) vegyes rendszerben a Ni(II)-ionok többsége a H96-ot modellező szekvenciához (-GTHS-) kötődik, míg a Cu(II)-ionok többsége H111-t modellezőhöz (-MKHM-).

3. Hat hisztidint tartalmazó prion peptidfragmens réz(II)komplexeinek vizsgálata

A prion fehérje rendezetlen tartományában lévő összes kötőhelyet tartalmazó HuPrP(60-114) feltérképező vizsgálata során egyszerre tanulmányozhattuk a prion fehérje rendezetlen régiójának tényleges kötőhelyeit. Az oldhatósági problémák miatt arra nem volt lehetőségünk, hogy a peptid konkrét oldategyensúlyi viszonyait jellemezzük, de a réz(II)iont is tartalmazó minták spektroszkópai vizsgálata alapján az alábbi megállapításokat tehetjük.

- A képződő komplexek összetételét a pH és a rézion-koncentráció jelentősen befolyásolja.
- Ugyanazok a kötési preferenciák valósulnak meg, mint amit korábban is tapasztaltunk a prion peptidfragmenseknél.
 - o A fiziológiás pH-tartományban a makrokelát szerkezetű részecskék jelenléte a meghatározó, ahol a réz(II)ion koordinációs szférájában az oktarepeat és a külső hisztidinek egyaránt részt vehetnek.
 - o A pH növekedésével párhuzamosan pedig bekövetkezik az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja.
- A makrokelát szerkezet nagy stabilitása következtében az amidnitrogének deprotonálódása magasabb pH-tartományba tolódik el.
- A rézion-koncentráció növelése megtöri ezt a makrokelát szerkezetet, és az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja eltolódik semleges, majd savas pH-tartományba, illetve ezzel párhuzamosan az oldékonyság is megnövekszik.
- A réz(II)ionok jelenléte visszaszorítja a csapadékképződést
- Preferencia figyelhető meg a külső hisztidinek irányába.

V. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

Vizsgálataink alap kutatás jellegűek. A munka első részében a Ni(II) és Ni(II)/Cu(II) - prion peptidfragmens rendszerekben képződő komplexek stabilitási viszonyait és lehetséges szerkezetüket derítettük fel, valamint a kötőhelyek nikkell-kötőképességének sorrendjét. A munka második részében a prion fehérje kötőhelyeit modellező peptidek komplexképződési folyamatait tanulmányoztuk Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionok jelenlétében. A munka harmadik fázisában a prion fehérje rendezetlen tartományában lévő összes kötőhelyet tartalmazó prionfragmens feltérképező vizsgálata történt meg. Kutatásaink közelebb vittek minket a prion fehérje kötőhelyei esetén jelentkező eltérő fémion-preferencia okának felderítéséhez, réz(II)-, nikkell(II)- és cink(II)komplexek esetén egyaránt.

Ezen vizsgálatok alátámasztják a prion peptidfragmensek kiugró affinitását a réz(II)ionok irányába, valamint a nikkell(II)ion, mint szerkezeti modell jól alkalmazható az összehasonlításokhoz. Ugyanakkor a cink megkötését bármely prion peptidfragmens és modellpeptid esetén vizsgálva, csak nagyon gyenge kölcsönhatás volt kimutatható. Ez tovább erősíti azt a feltételezést, amely szerint, ha a fémionok részt vesznek a prion fehérje biológiai működésében, akkor a réz(II)ionoknak van elsődleges szerepük ezen a téren.

Eredményeink hozzájárulnak ahhoz, hogy jobban megértsük, milyen tényezők befolyásolják a neurodegeneratív betegségekkel (pl. Alzheimer-kórral, Parkinson-kórral, prion betegségekkel) összefüggésbe hozható fehérjék fémionmegkötését. Ezek értékes információt nyújthatnak olyan biológiai kutatásokhoz, amelyek célja a neurodegeneratív megbetegedések kiváltó okának felderítése. Ezen eredmények lehetővé teszik a jövőben új, hatékonyabb, a neurodegeneratív betegségek kezelésére alkalmas gyógyszerek és terápiák kifejlesztését.

VI. TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapját képező közlemények

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

1. Ildikó Turi, Daniele Sanna, Eugenio Garribba, Imre Sóvágó, **Studies on the comparison of the metal ion binding affinities of model peptides related to human prion protein**, *Polyhedron*, 62 (2013) 7-17.
Impakt faktor: 1,813 (2012)
2. Viktória Józai, Ildikó Turi, Csilla Kállay, Giuseppe Pappalardo, Giuseppe Di Natale, Enrico Rizzarelli, Imre Sóvágó: **Mixed Metal Copper(II)-Nickel(II) and Copper(II)-Zinc(II) Complexes of Multihistidine Peptide Fragments of Human Prion Protein**, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 112 (2012) 17–24.
Független idéző közlemények száma: 1
Impakt faktor: 3,354 (2012)
3. Ildikó Turi, Csilla Kállay, Dorina Szikszai, Giuseppe Pappalardo, Giuseppe Di Natale, Paolo De Bona, Enrico Rizzarelli, Imre Sóvágó, **Nickel(II) Complexes of the Multihistidine Peptide Fragments of Human Prion Protein**, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104 (2010) 885-891.
Független idéző közlemények száma: 6
Impakt faktor: 3,317 (2010)
4. Csilla Kállay, Ildikó Turi, Sarolta Timári, Zoltán Nagy, Daniele Sanna, Giuseppe Pappalardo, Paolo de Bona, Enrico Rizzarelli, Imre Sóvágó, **The Effect of Point Mutations on Copper(II) Complexes With Peptide Fragments Encompassing the 106–114 Region of Human Prion Protein**, *Monatshefte für Chemie*, 142 (2011) 411–419.
Független idéző közlemények száma: 3
Impakt faktor: 1,356 (2011)

Tudományos folyóiratban még meg nem jelent közlemények

1. Sarolta Timári, Ildikó Turi, Katáin Várnagy, Daniele Sanna, Eugenio Garribba, Imre Sóvágó, **Studies on the formation of coordination isomers in the copper(II) and nickel(II) complexes of peptides containing histidyl residues** (közlésre előkészítve)
2. Ildikó Turi, Imre Sóvágó, **Studies on the binding preferences of copper(II) and nickel(II) ions to the histidyl sites of oligopeptides** (közlésre előkészítve)

Tudományos könyvben megjelent fejezet

1. Csilla Kállay, Ildikó Turi, Sarolta Timári, Zoltán Nagy, Daniele Sanna, Giuseppe Pappalardo, Paolo de Bona, Enrico Rizzarelli, Imre Sóvágó, **The Effect of Point Mutations on Copper(II) Complexes With Peptide Fragments Encompassing the 106–114 Region of Human Prion Protein**, in *Metal ions in Neurological Systems*, W. Linert and H. Kozłowski (eds.), © Springer-Verlag Wien 2012, (DOI 10.1007/978-3-7091-1001-0_16) p.189-197.

Konferenciakötetben megjelent tanulmány

1. I. Sóvágó, I. Turi, Á. Grenács: Factors influencing the formation of mixed metal complexes of the peptide fragments of prion protein, *11th European Biological Inorganic Chemistry Conference*, 12-16 September 2012, Granada, Spain, MEDIMOND International Proceedings, p. 31-36.
2. Turi Ildikó, Sóvágó Imre: Multihisztidin peptidok vegyes fémkomplexeinek komplexképződését befolyásoló tényezők vizsgálata, *XXXIII. Kémiai Előadói Napok*, 2010, JATEPress, Szeged (ISBN 978-963-315302037).

Az értekezés anyagához kapcsolódó előadások

1. Turi Ildikó, Sóvágó Imre: **A prion protein peptidfragmenseinek fémion-szelektivitása**, *47. Komplexkémiái Kollokvium, Koordinációs Kémiai Munkabizottság ülése*, 2013. május 29-31., Mátraháza.

2. I. Sóvágó, I. Turi, Á. Grenács: **Factors influencing the formation of mixed metal complexes of the peptide fragments of prion protein**, 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 12-16 September 2012, Granada, Spain (Book of Abstract: p.111)
3. Turi Ildikó és Sóvágó Imre: **Multihisztidin peptidok vegyes fémkomplexeinek komplexképződését befolyásoló tényezők vizsgálata**, 46. *Komplexxémiai Kollokvium*, 2012. május 21-23., Mátrafüred.
4. Turi Ildikó: **Multihisztidin peptidok vegyes fémkomplexeinek komplexképződését befolyásoló tényezők vizsgálata**, XXXIII. *Kémiai Előadói Napok*, 2010. október 25-27., Szeged.
5. Turi Ildikó és Sóvágó Imre: **Multihisztidin peptidok vegyes fémkomplexeinek komplexképződését befolyásoló tényezők vizsgálata**, XLV. *Komplexxémiai Kollokvium*, 2010. május 26-28., Mátraháza.
6. Kállay Csilla, Turi Ildikó, Szikszai Dorina és Sóvágó Imre: **Többmagvú vegyes fémkomplexek képződése hisztidin tartalmú peptidokkal**, XLIV. *Komplexxémiai Kollokvium*, 2009. május 27-29., Siófok.
7. Turi Ildikó: **A prion protein peptidfragmensei és a nikkel(II)ionok közötti komplexképződési folyamatok vizsgálata**, XXIX. OTDK, *Kémiai és vegyipari Szekció, Koordinációs és Szervetlen kémiai tagozat*, 2009. április 6-8., Debrecen.

Az értekezés anyagához kapcsolódó posztterek

1. I. Turi, I. Sóvágó: **Metal Complexes of Model Peptides Related to the Metal Binding Site of Prion Protein**, 12th International Symposium on Biochemistry, 2013. 08.28.-09.01., Wrocław (Book of Abstract: P-40)
2. S. Timári, I. Turi, K. Várnagy, I. Sóvágó: **Metal binding properties of prion protein mutant peptides**, 12th International Symposium on Biochemistry, 2013. augusztus 28. – szeptember 1., Wrocław (Book of Abstract: P-54)
3. I. Turi, I. Sóvágó: **Metal Complexes of Model Peptides Related to the Metal Binding Site of Prion Protein**, 16th International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2013. július 22-26., Grenoble
4. I. Turi, I. Sóvágó: **Mixed Transition Metal Complexes of Model Peptides Related to the Metal Binding Site of Prion Protein**, International Symposium on Metal Complexes, 2012. június 18-22., Lisszabon (Acta of international Symposia on metal complexes, Vol. 2., ISSN: 2239-2459, 2012, p.163-164)
5. I. Turi, I. Sóvágó: **Copper(II) and Nickel(II) Complexes of Model Peptides Related to the Metal Binding Site of Prion Protein**, 11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2011. December 2-5., Barcelona (Book of Abstract: P-156)
6. V. Józai, I. Turi, I. Sóvágó, G. Di Natale, G. Pappalardo, E. Rizzarelli: **Mixed Transition Metal Complexes of Histidine Containing Peptide Fragments of Prion Protein and Their Mutants**, 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences (4ECCLS), 2011. augusztus 31. - szeptember 3., Budapest (Book of Abstract: p.288)
7. I. Turi, V. Józai, I. Sóvágó, G. Di Natale, G. Pappalardo, E. Rizzarelli: **Több hisztidint tartalmazó peptidok vegyesfémkomplexeinek képződését befolyásoló tényezők vizsgálata**, MKE 1. Nemzeti Konferencia, 2011. május 22-25., Sopron (Book of Abstract: p.223)
8. C. Kállay, I. Turi, V. Józai, K. Ósz, I. Sóvágó, G. Di Natale, G. Pappalardo, E. Rizzarelli: **Metal Binding Selectivity of the Peptide Fragments of Prion Protein**, 10th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2010. Június 22-26, Thessaloniki (Book of Abstract: PO-118)
9. C. Kállay, V. Józai, I. Turi, D. Szikszai, I. Sóvágó, G. Di Natale, G. Pappalardo, E. Rizzarelli: **Mixed Metal Complexes of the Peptide Fragments of Prion Protein**, 10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2009. szeptember 25-28., Debrecen. (Book of Abstract: p.126)
10. V. Józai, I. Turi, C. Kállay, D. Szikszai, K. Ósz, I. Sóvágó, G. Di Natale, G. Pappalardo and E. Rizzarelli: **Metal Binding Selectivities of the Peptide Fragments of Prion Protein**, 10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2009. szeptember 25-28., Debrecen. (Book of Abstract: p.125)