

1949

**A PRION FEHÉRJE PEPTIDFRAGMENSEINEK
FÉMION-SZELEKTIVITÁSA**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Fáriné Turi Ildikó Margit

Témavezető: Dr. Sóvágó Imre professzor emeritus

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2014.

*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, 2014. január 21.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Fáriné Turi Ildikó Margit** doktorjelölt **2010 - 2013** 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, 2014. január 21.

a témavezető aláírása

A PRION FEHÉRJE PEPTIDFRAGMENSEINEK FÉMION-SZELEKTIVITÁSA

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

Írta: **Fáriné Turi Ildikó Margit** okleveles vegyész

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

Témavezető: **Dr. Sóvágó Imre** professzor emeritus

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Rábai Gyula	
tagok:	Dr. Kiss Tamás	
	Dr. Lente Gábor	

A doktori szigorlat időpontja: 2014. február 17.

Az értekezés bírálói:

Dr.		
Dr.		
Dr.		

A bírálóbizottság:

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

Az értekezés védésének időpontja: 2014.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Sóvágó Imre* professzor emeritusnak sokoldalú segítségéért, hasznos és értékes tanácsaiért, biztatásáért.

Köszönet illeti *Dr. Farkas Etelka* professzor emeritust, *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi docenst és *Dr. Buglyó Péter* egyetemi docenst, akik szívesen segítettek, ha kérdések merültek fel bennem.

Köszönettel tartozom a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* minden régi és jelenlegi tagjának, külön kiemelve *Dr. Józai Viktóriát*, *Dr. Kállay Csilla* és *Dr. Timári Sarolta* tudományos munkatársat, *Dr. Bíró Linda* és *Szőcs Béla* tudományos segédmunkatársat, *Dr. Szabó Orsolyát*, *Grenács Ágnes*, *Dávid Ágnes*, *Csire Gizella* és *Bihari Zsolt* PhD hallgatókat, valamint *Godó Attila* műszaki ügyintézőt, mert kérdéseimre választ adtak, és baráti légkört biztosítottak a munkám elvégzéséhez.

Köszönöm *Hüse Ilona* vegyésztechnikuskának a gyakorlati tanácsait.

Szeretném megköszönni *Nagyné Dombi Gizella* tanszéki irodavezetőnek a hivatalos ügyek intézésében nyújtott segítségét.

Köszönöm *Dr. Kurtán Tibornak* a cirkuláris dikroizmus mérésekben nyújtott segítségét, *Dr. Giuseppe Pappalardonak* (Department of Chemical Sciences, University of Catania, Szicília), aki egy hónapos cataniai tanulmányutam alatt segített elmélyíteni a peptidszintézis alapjait, valamint *Dr. Eugenio Garribbának* és *Dr. Daniele Sannának* (Department of Chemistry, University of Sassari, Olaszország) az ESR spektrumok felvételét és kiértékelését, valamint a DFT számításokat.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és barátaimnak, külön kiemelve *férjemet*, *szüleimet* és *testvéreimet*, folyamatos támogatásukat, szeretetüket és azt, hogy mindig bátorítottak és mellettem álltak az elmúlt évek során.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program című kiemelt projekt által nyújtott személyi támogatással valósult meg. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. A kutatáshoz a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 (ENVIKUT) projekt is hozzájárult.

TARTALOMJEGYZÉK

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata	V
1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK	3
2.1. A vizsgált fémionok biológiai jelentősége és koordinációs kémiája	3
2.1.1. A réz biológiai jelentősége és koordinációs kémiája	3
2.1.2. A nikkel biológiai jelentősége és koordinációs kémiája	4
2.1.3. A cink biológiai jelentősége és koordinációs kémiája	5
2.2. A peptidek koordinációs kémiája	6
2.2.1. A hisztidintartalmú peptidek koordinációs kémiája	8
<i>Az egy hisztidint tartalmazó peptidek fémkomplexei</i>	8
<i>A több hisztidint tartalmazó peptidek fémkomplexei</i>	10
2.3. A prion fehérje és kölcsönhatásai fémionokkal	13
2.4. A prion fehérje peptidfragmenseinek kölcsönhatása fémionokkal	16
2.4.1. Az oktarepeat tartomány réz(II)ion-koordinációja	17
2.4.2. Az oktarepeat tartományon kívüli hisztidinek réz(II)ion-koordinációja	20
2.4.3. A több hisztidint tartalmazó prion peptidfragmensek réz(II)komplexei	21
2.4.4. A hisztidintartalmú prion peptidfragmensek nikkel(II)komplexei	23
2.5. Célkitűzések	25
3. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
3.1. Használt vegyszerek	26
3.2. Vizsgált ligandumok	26
3.3. Szilárdfázisú peptidszintézis	28
3.4. pH-potenciometria	32
3.5. UV-látható spektrofotometria	34
3.6. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia	36
3.7. Rezonancia spektroszkópia	37
4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	40
4.1. A prion peptidfragmensek komplexképződési folyamatai	40
4.1.1. A prion peptidfragmensek nikkel(II)komplexei	40
4.1.1.1. A két hisztidint tartalmazó prionfragmensek nikkel(II)komplexei	40
4.1.1.2. A négy hisztidint tartalmazó prionfragmensek nikkel(II)komplexei	46

4.1.2. A prion peptidfragmensek nikkel(II)/réz(II) vegyes fémkomplexei ...	49
4.1.3. A prion peptidfragmensek vizsgálata során kapott eredmények összefoglalása	54
4.2. A prion fehérje fémionkötőhelyeit modellező peptidek komplexképződése	56
4.2.1. Az egy hisztidint tartalmazó modellpeptidek fémkomplexei	58
4.2.2. A két hisztidint tartalmazó oktapeptidek	64
4.2.2.1. A szabad aminoterminusú oktapeptidek fémkomplexei	65
<i>Réz(II)komplexek</i>	65
<i>Nikkel(II)komplexek</i>	68
<i>Réz(II)- és nikkel(II)komplexek stabilitásának összehasonlítása</i>	70
<i>Cink(II)komplexek</i>	71
4.2.2.2. A védett aminoterminusú oktapeptid fémkomplexei	72
<i>Réz(II)komplexek</i>	72
<i>Nikkel(II)komplexek</i>	76
<i>Cink(II)komplexek</i>	77
4.2.2.3. Az oktapeptidek nikkel(II)/réz(II) vegyes fémkomplexei	78
4.2.3. A három hisztidint tartalmazó tridekapeptid	82
<i>Réz(II)komplexek</i>	83
<i>Nikkel(II)komplexek</i>	85
<i>Nikkel(II)/réz(II) vegyes fémkomplexek</i>	87
4.2.4. DFT számítások	89
4.2.5. A modellpeptidek vizsgálata során kapott eredmények összefoglalása	91
4.3. A hat hisztidint tartalmazó prion peptidfragmens réz(II)komplexei	94
5. ÖSSZEFOGLALÁS	98
6. SUMMARY	101
7. IRODALOMI HIVATKOZÁSOK	104
8. FÜGGELÉK	114

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

A, Ala	alanin
D, Asp	aszparaginsav
E, Glu	glutaminsav
F, Phe	fenilalanin
G, Gly	glicin
H, His	hisztidin
K, Lys	lizin
M, Met	metionin
N, Asn	aszparagin
P, Pro	prolin
Q, Gln	glutamin
R, Arg	arginin
S, Ser	szerin
T, Thr	treonin
V, Val	valin
W, Trp	triptofán
Y, Tyr	tirozin
Ac	acetyl (védőcsoport)
ACN	acetonitril, CH ₃ CN
AcOH	ecetsav
Ac ₂ O	ecetsavanhidrid
ATCUN	<i>Amino Terminal Cu and Ni binding site</i> (aminoterminális réz- és nikkelkötőhely)
CD	cirkuláris dikroizmus
ChPrP	csirke prion fehérje
CJD	Creutzfeldt-Jakob kór
CT sáv	töltésátviteli sáv (<i>Charge Transfer</i>)
Boc	<i>t</i> -butoxi-karbonil (védőcsoport)
BSE	<i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i> (kergemarha kór)
Bzl	benzil (védőcsoport)
DCM	diklórmétán
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropil-etilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
EDT	etán-1,2-ditiol

EPR (ESR)	elektron paramágneses rezonancia (elektronspin-rezonancia spektroszkópia)
Et ₂ O	dietyl-éter
Fmoc	9-fluorenil-metoxi-karbonil (védőcsoport)
H85A, H96A	a 85., illetve 96. pozícióban hisztidin helyett alanin található
H2, H3, H7, H8, H12	az aminosav-szekvenciában az adott számú pozícióban lévő hisztidin
H _{oktarepeat}	oktarepeat tartománybeli hisztidin
HOBt	<i>N</i> -hidroxi-benzotriazol
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HuPrP	emberi (humán) prion fehérje
Me	metilcsoport
N ⁻	deprotonált amidnitrogén
N _{Im}	imidazolnitrogén
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidon
NMR	magmágneses rezonancia
octarepeat	PHGGGWGQ (monomer)
O _{karbonil}	karboniloxigén
O _{karboxilát}	karboxiláttoxigén
PEG	polietilén-glikol
PrP	prion fehérje
PrP ^C	celluláris prion fehérje
PrP ^{Sc}	kóros szerkezetű prion fehérje
RP-HPLC	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
SOD	szuperoxid-dizmutáz (enzim)
TBTU	2-(1- <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-tetrafluoroborát
<i>t</i> Bu	<i>terc</i> -butil (védőcsoport)
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropil-szilán
Trt	tritol (védőcsoport)
UV-vis	ultraibolya - látható
Z	benziloxi-karbonil (védőcsoport)

1. BEVEZETÉS

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 normális 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 a peptidfragmenseinek réz(II)ionokkal való kölcsönhatását kiterjedten tanulmányozták. A réz(II)ionok felé mutatott nagy affinitás az aminosav-szekvenciában 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)ion-megkötést. Ezen túlmenően megállapították az egyes hisztidil-oldalláncok réz(II)ionmegkötésében mutatkozó preferenciát is, amely a H111 > H96 >> H85 ~ H77 sorrendnek adódott, azaz az oktarepeat tartományon kívül elhelyezkedő hisztidinek nagyobb affinitást mutatnak a réz(II)ion felé, mint az oktarepeatbeliek.

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

Biológiai rendszerekben azonban egyidejűleg van jelen több fémion, ami indokolja a vegyes fémiontartalmú rendszerek vizsgálatát. Így célunk volt egyes

több hisztidint tartalmazó prion peptidfragmensek vegyes nikkel(II)/réz(II)-rendszereiben zajló komplexképződési folyamatok tanulmányozása is.

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 nikkel(II)/réz(II) vegyes fémkomplexek képződését.

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1. A vizsgált fémionok biológiai jelentősége és koordinációs kémiája¹

2.1.1. A réz biológiai jelentősége és koordinációs kémiája^{2,3}

A biológiai szempontból létfontosságú réz gyakoriságát biológiai rendszerekben az átmenetifémek között csak a vas és a cink mennyisége haladja meg.²⁻⁴ Egy felnőtt emberi szervezet kb. 100 mg rezet tartalmaz. Nagy komplexképző készsége révén az élő szervezetekben többnyire kötött formában, rézproteinekben fordul elő. Ezek a fehérjék sokféle funkciót tölthetnek be, részt vesznek például az oxigén szállításában (hemocianin), redoxi folyamatok katalizálásában (szuperoxid-dizmutázok, oxidázok, reduktázok stb.), valamint a réz szállításában és tárolásában (metallothionein).

A réztartalmú fehérjéket alapvetően három típusba sorolhatjuk. Ezek közül az elsőbe tartoznak a főként növényekben előforduló kékréz fehérjék, amelyek a fotoszintézisben játszanak szerepet elektrontranszfer proteinekként. Ezekben egy rézatom található 2 N- és 2 S-donoratomhoz kötve. Az így kialakult geometria átmenetet képez a Cu(II)-komplexekre jellemző tetragonálisan torzult oktaéderes és a Cu(I)-komplexekre jellemző tetraéderes koordináció között. Redoxi átalakulásokra rendkívül hajlamos, és intenzív kék szín jellemzi, ami a 600 nm körüli S-Cu töltésátviteli sávától származik ($\epsilon \sim 3000\text{-}5000 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A második típus a nemkékréz fehérjék, ahol közel síknégyzetes geometria jön létre a rézion körül nagyon gyenge axiális kölcsönhatásokkal és jellemző ESR paraméterekkel, ami a szabályos monomer réz(II)komplexekre jellemző. Ilyen rézcentrum található például a Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz enzimben. A harmadik típusba az ESR-inaktív rézproteineket soroljuk. Ezen belül két altípust különböztetünk meg. Az egyikben két egymáshoz közeli, de független Cu(I)-ion található, amelyek hisztidil-oldalláncokon keresztül kapcsolódnak a fehérjékhez. Ez alkalmas az oxigénmolekula transzportjára és aktiválására (pl. hemocianin). A másik altípusba sorolhatóak a két antiferromágnesesen csatolt Cu(II)-iont tartalmazó fehérjék.¹

A rézkomplexeket számos betegséggel kapcsolatosan is tanulmányozták. Például a Menkes-kór 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. A Wilson-kór a szervezet réztároló képességének örökletes

zavara, amely súlyos agyi rendellenességeket idéz elő. A betegség kezelése kelátterápiával történhet. Még ma is folyamatosan kutatják azokat a biológiai makromolekulák bizonyos funkcióit utánzó kismolekulákat, amelyek alkalmasak a betegség hatékony kezelésére.⁵

A réz oxidációs száma a komplexeiben 0-tól +4-ig terjedhet. A leggyakoribb a +2-es oxidációs állapot, de jelentős még a +1-es is. Vizes oldatban a Cu(I)-ion erősen szoft karakterű és nagyon könnyen diszproporcionálódik. A d^{10} elektronkonfigurációjának megfelelően diamágneses és színtelen komplexeket képez, amelyek könnyen Cu(II)-komplexxé oxidálódnak. A Cu(II)-ion elektronkonfigurációja d^9 , a komplexei paramágnesesek, színük kék, zöld vagy lila, és egy széles elnyelési sávval rendelkeznek. Ennek köszönhetően a Cu(II)-komplexek jól vizsgálhatók ESR-spektroszkópiával, UV-látható spektrofotometriával, valamint CD spektroszkópiával, ha a ligandum optikailag aktív. Leggyakoribb koordinációs számai: 4, 5 és 6. A komplexek szerkezete általában tetragonálisan torzult oktaéderes vagy síknégyszetes. Stabilis komplexeket hoz létre aminosavakkal, peptidekkel, fehérjékkel. A réz(II)ion képes elősegíteni az amidnitrogén deprotonálódását és koordinációját már alacsonyabb pH-n is.¹

2.1.2. A nikkell biológiai jelentősége és koordinációs kémiaja

A nikkell egyes mikroorganizmusok és a növények számára létfontosságú nyomelem, de szerepét az ember és más emlősök esetén még nem bizonyították. Vegyületei általában mérgezőek, a nikkell-tetrakarbonil erősen mérgező, bőrön át is könnyen felszívódik, a nikkell-oxidok és -szulfidok pedig rákkeltőek. Ezen kívül az érzékeny bőrtípusú embereknél a nikkell allergiás reakciókat válthat ki (használati tárgyakból kioldódó nikkell vagy beépített pótlásokból való felszívódás eredményeként).^{1, 6}

A nikkeltartalmú enzimeknek négy főbb típusa van. Az ureáz enzimek számos baktériumban és növényben megtalálhatók, és a karbamid hidrolízisét katalizálják.⁷ Egyes hidrogenázok is tartalmazzák nikkelt, például a baktériumokban előforduló [NiFe]- és [NiFeSe]-hidrogenázok, amelyek a hidrogén vízzé történő oxidációját katalizálják, illetve a szénmonoxid-dehidrogenáz enzim is, amely a szénmonoxid széndioxiddá való oxidációját katalizálja. Ni(I)-ion található a metil-koenzim-M-reduktázban, amely a széndioxid metánná való konverziójában vesz részt.^{6, 8} A szuperoxid-dizmutáz enzimek legfrissebben azonosított formája a mikroorganizmusokban található nikkell-SOD, ahol a nikkell atomok megkötésében

a ciszteinkén-donoratomoknak van meghatározó szerepe, és a működése során Ni(II) – Ni(III) átalakulás valósul meg.

A nikkal +4-től 0-ig terjedő oxidációs állapotokban található, bár fémorganikus vegyületeiben –1-es és –2-es oxidációs számmal is előfordul. A d^8 elektronszerkezetű +2-es oxidációs állapot kiugróan stabilis és szinte valamennyi anionnal sőt képez. Erős komplexképző ligandumok hiányában, vizes oldatokban mindig a zöld színű, oktaéderes $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -ion van jelen.^{1, 6} A Ni(II)-ion paramágneses tulajdonságú, oktaéderes geometriájú komplexeket képez oxigén és/vagy nitrogén donoratomot tartalmazó, mono- és polifunkciós ligandumokkal, például ammóniával, aminosavakkal és dipeptidekkel. A komplexek színe halványkék vagy -zöld. Síknégyszetes szerkezetű, diamágneses tulajdonságú Ni(II)-komplexek szinte kizárólag erős terű ligandumokkal képződnek, ide tartoznak a S- és N-donoratomot tartalmazó ligandumok, például a tiolvegyületek, peptidek, makrociklusok. Az ilyen komplexek színe a vöröstől a sárgáig terjed. Peptidkomplexek esetében a Ni(II)-ion a nitrogén felé mutat nagyobb affinitást, így a koordináció az aminos csoporton indul meg. A peptidkötés nitrogénje is kelátképző helyzetben van az aminos csoporttal, de a koordináció létrejöttéhez szükséges az amidcsoport deprotonálódása is. A Ni(II)-ion képes elősegíteni a deprotonálódást és az amidnitrogén koordinációját. A Ni(II)-oligopeptidkomplexek másik fontos jellemzője a különböző deprotonáltsági fokú formák lassú kialakulása és a deprotonált amidcsoportok számának növekedésével a Ni(II)-komplexek növekvő inertsége.^{1, 6, 9}

2.1.3. A cink biológiai jelentősége és koordinációs kémiája^{3, 10, 11}

A cink a második leggyakoribb átmenetifém az élő szervezetben és egyben a legkevésbé toxikus nyomelem, amely valamennyi élőlényben megtalálható és változatos biológiai feladatokat lát el. A metalloenzimekben katalitikus (szénsavanhidráz, karboxipeptidáz) és szerkezetalkító (redoxi katalizátorok, alkohol dehidrogenázok, Cu,Zn-SOD és cink-ujj fehérjék) szerepet tölthet be. Biológiai rendszerekben kizárólag fehérjékhez kötődik, ahol hisztidin, cisztein, glutaminsav és aszparaginsav oldalláncbéli donorcsoportjai az elsődleges kötőhelyek számára. A Zn(II)-ion kötődése reverzibilis folyamat és más fémionnal való helyettesítésének mértékét a következő sorrend mutatja: Co(II) > Mn(II) > Ni(II), Cu(II), Cd(II).

A $3d^{10}$ elektronszerkezetű Zn(II)-ion közepes termodinamikai stabilitású és kinetikailag labilis, színtelen, diamágneses komplexeket képez. Változó koordinációs számú komplexei közül leggyakoribbak a tetraéderes és az oktaéderes geometriájúak. Mivel a Zn(II)-ion a hard-szoft savbázis elmélet alapján átmeneti elemnek számít, így hard és szoft bázisokkal egyaránt stabilis kölcsönhatást létesít, a donorumokat tekintve $S > N > O$ sorrendben csökkenő stabilitással. Peptidekkel is komplexet képez, amelyek savas és enyhén lúgos oldatban csapadék leválása nélkül vizsgálhatóak.¹² pH 5,0 felett kelátgyűrű képződik a terminális aminos csoport és a szomszédos karbonilcsoport részvételével, azonban az oldalláncban donorumot nem tartalmazó peptidek amidnitrogénjének Zn(II)-ion hatására bekövetkező deprotonálódását nem mutatták ki. Ez a fémion nagymértékű hidrolízishajlamával és a ligandumtér-stabilizáció hiányával indokolható. Egyes esetekben beszámoltak Zn(II)-ion jelenlétében pH 7,0 körül bekövetkező amiddeprotonálódásról, például a GlyHis dipeptid esetében.¹³

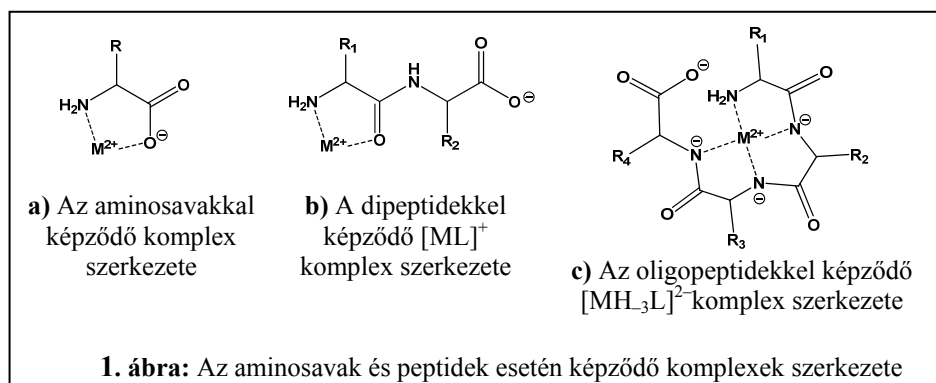
2.2. A peptidek koordinációs kémiája

Az aminosavak és peptidek koordinációs kémiáját különböző fémionokkal már alaposan tanulmányozták és számos összefoglaló mű jelent meg ebben a témában.¹⁴⁻²⁰ A képződő komplexek szerkezete és stabilitása a fémion sajátosságaitól, valamint az oldalláncbeli donorcsoportok jelenlététől függ.

Ahhoz, hogy jobban megérthessük a peptidek kölcsönhatását a fémionokkal, az aminosavak komplexkémiái tulajdonságait is érdemes megemlíteni. Az oldalláncukban donorcsoportot nem tartalmazó α -aminosavak öttagú kelátgyűrűt alakítanak ki az amino- és karboxilátcsoporton keresztül koordinálódva a fémionhoz (1.a ábra). Ez az úgynevezett aminosavszerű koordináció számos átmenetifém-ion esetén stabilis komplexet eredményez. A képződő komplexek szerkezetét és stabilitását jelentősen befolyásolhatja az oldalláncban található koordinálódó donorumok minősége és helyzete.^{21, 22}

A peptidekben a két terminális funkciós csoport távolsága megnő, így a fémion megkötésekor nem képesek egyidejűleg ugyanabban a stabilis kelátgyűrűben részt venni. Ilyenkor a fémion karaktere határozza meg, hogy melyik csoport az elsődleges kötőhely. Az átmenetifém-ionok nagyobb affinitást mutatnak a nitrogénatom felé, így esetükben az aminos csoport viselkedik horgonydonorként, és az amidcsoport oxigénjéhez való kötődéssel öttagú kelátgyűrű képződik. Az így kialakuló $(NH_2, O_{karbonil})$ koordinációjú $[ML]^+$ összetételű komplex (1.b ábra)

kiseb stabilitású, mint az aminosavakkal alkotott ($\text{NH}_2, \text{O}_{\text{karboxilát}}$) koordinációs móddal rendelkező komplex.



A peptidkötés, más néven amidkötés két újabb donoratomot (nitrogén- és oxigénatom) tartalmaz, amelyek kelátképző helyzetben vannak az aminosocsoporttal, ezáltal lehetővé teszik további koordinációs módok kialakulását. A nitrogénatom koordinálódásához azonban szükséges az amidcsoport deprotonálódása, ez szabad ligandum esetén erősen lúgos pH-tartományban (>14) következik be. Néhány fémion versengeni tud az amidkötés protonjával és képes azt koordináció közben helyettesíteni. A Pd(II)-, Cu(II)- és Ni(II)-ionok képesek elősegíteni az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját, aminek következtében nagy stabilitást biztosító csatolt 5-tagú kelátgyűrűs $[\text{MH}_1\text{L}]$ komplex alakul ki ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{O}_{\text{karboxilát}}$), illetve oligopeptidek esetén ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{O}_{\text{karbonil}}$) koordinációs móddal. A peptidlánc növekedésével az amidcsoportok száma is nő. Ezek deprotonálódásával és koordinálódásával $[\text{MH}_1\text{L}]$, $[\text{MH}_2\text{L}]^-$, $[\text{MH}_3\text{L}]^{2-}$ összetételű komplexek keletkezhetnek, amelyekben csatolt kelátrendszer alakul ki (1.c ábra).¹⁹

Az eddigi megállapítások oldalláncban donoratomot nem tartalmazó, szabad terminussal rendelkező peptidekre vonatkoznak. Azonban az oldalláncban jelenlevő donorcsoportok nagyban befolyásolhatják a ligandumok komplexképző tulajdonságait. A hatás mértéke függ a donorcsoportok minőségétől.

Ha az oldallánc nem tartalmaz koordinálódó donoratomot (alanin, fenilalanin, valin), akkor nincs lehetőség újabb koordinációs módok kialakulására, viszont a különböző oldalláncok hatással vannak a képződött komplex stabilitására.²³

Oldalláncban található gyengén koordinálódó funkciós csoport (a szerin és a treonin alkoholos hidroxilcsoportja, a lizin ϵ -aminocsoportja, a metionin

tioétercsoportja, az aszparaginsav és a glutaminsav β -, illetve γ -karboxilcsoportja hatására megnőhet a képződő komplexek stabilitása, illetve új koordinációs módok megjelenése tapasztalható.

Erősen koordinálódó oldallánc például a cisztein tiolesoportja és a hisztidin imidazolil-oldallánca. Legnagyobb mértékben ezek módosítják a peptidok komplexkémiai viselkedését, és mindkét oldallánc betöltheti a horgonydonor szerepét. N-terminális helyzetben stabilis biszkomplexekeket képeznek, ciszteinszerű (NH_2, S^-), illetve hisztaminszerű ($\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}$) koordinációval. Ha C-terminális, illetve közbenső helyzetben található, akkor elősegítik az előtte lévő amidcsoport koordinálódását, és megakadályozzák a következő amidnitrogén deprotonálódását.¹⁵

Munkánk egyik célja olyan peptidok komplexkémiai vizsgálata, amelyek a prion fehérje fémionkötőhelyeit modellezik. Ezek mindegyike tartalmaz hisztidint, így a hisztidintartalmú peptidok fémkomplexeire vonatkozó irodalmi előzményeket külön alfejezetként ismertetjük.

2.2.1. A hisztidintartalmú peptidok koordinációs kémiája

A metalloproteinek és fehérjék fémionmegkötésében a hisztidin imidazolcsoportja az egyik legfontosabb donorcsoport. Ennek következtében a hisztidintartalmú peptidok réz(II)- és nikkel(II)komplexeit már alaposan tanulmányozták, valamint ezekből számos összefoglaló mű is született.^{9, 14, 15, 18, 19, 24-26} A komplexképződést számos tényező befolyásolja, például a fémion természete, a fémion-ligandum arány, a peptid oldalláncainak minősége, száma, elhelyezkedése a peptidláncban, illetve a terminális funkciós csoportok védettsége.

Az egy hisztidint tartalmazó peptidok fémkomplexei

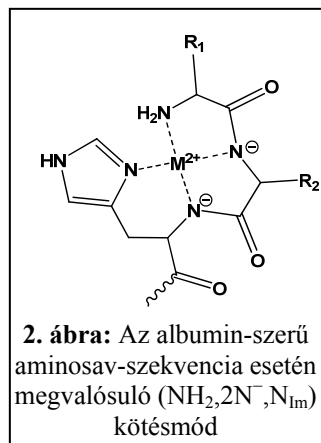
Az egy hisztidint tartalmazó, szabad aminotermínusú peptidkomplexek esetén meghatározó az imidazolil-oldalláncok szekvenciában elfoglalt pozíciója. Ilyenkor úgymond kettős horgony található a peptidmolekulában, nevezetesen az amino- és az imidazolnitrogén.

N-terminális hisztidin jelenlétében egy stabilis 6-tagú kelátgyűrű alakulhat ki az imidazolnitrogén és a terminális aminocsoport részvételével. Ez a kölcsönhatás jelentősen megnöveli a mono- és biszkomplexelek termodinamikai stabilitását, valamint meggátolja az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját.^{18, 27, 28} Cu(II)- és Ni(II)-komplexelek esetében a fémion-ligandum aránytól függően

képződő $[ML]^+$ és $[ML_2]$ összetételű komplexekben hisztaminszerű (NH_2, N_{Im}) koordináció valósul meg.

Az aminoterminustól számítva 2. helyen található hisztidin növeli az amidkötésű részecskék képződésének lehetőségét, de a szekvenciában a következő amiddeprotonálódást korlátozza. Fiziológias pH-tartományban stabilis (5,6)-tagú csatolt kelátrendszer tartalmazó $[MH_{-1}L]$ sztöchiometriájú részecske alakul ki (NH_2, N^-, N_{Im}) tridentát koordinációval. Ilyen peptideknél nem csak a Cu(II)- és Ni(II)-ionok képesek előidézni az amiddeprotonálódást és koordinációt, hanem egyes esetekben pH 7,0 körül a Zn(II)-ionok is.^{29, 30}

Peptidek komplexképződésére legnagyobb hatással a 3. pozícióban található hisztidin van. Ez a $H_2N-XaaYaaHis-$ szekvencia kiváló réz(II)- és nikkell(II)ion-kötőképességgel rendelkezik. A szekvenciát gyakran albumin modellként vagy ATCUN motívumként (*Amino Terminal Cu and Ni binding Site*) is emlegetik, és rengeteg közlemény áll rendelkezésünkre az albumin N-terminusának modellezésével kapcsolatban.³¹⁻⁴² Fiziológias pH-tartományban az amidnitrogének egyidejű deprotonálódásával és koordinációjával (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer keletkezik (2. ábra), amely nagy stabilitást biztosít az ($NH_2, 2N^-, N_{Im}$) koordinációval rendelkező, $[MH_{-2}L]$ összetételű részecskének ($M = Cu(II), Ni(II)$).^{43, 44} A koordinációt kristályszerkezeti vizsgálatokkal is alátámasztották.^{43, 45} Ez a kötés mód felelős a humán szérumban albumin kiugróan nagy réz(II)- és nikkell(II)ion-kötőképességéért. Ilyen szerkezetű komplexek létezését Pd(II)- és Au(III)-ionok esetében is leírták⁴⁶, viszont hasonló összetételű Zn(II)- és Co(II)-komplexek jelenlétét nem mutatták ki.



A 4. vagy távolabbi helyzetben hisztidint tartalmazó peptideknél savas pH-n makrokelát szerkezetű részecskék jelennek meg az aminocsoport és az imidazolnitrogén egyidejű koordinálódásával, valamint az aminocsoporttal kelátképző helyzetben levő karboniloxigén is részt vehet a komplexképzésben.⁴⁷ A stabilitás a gyűrű méretének növekedésével csökken. Cu(II)-^{47, 48} és Ni(II)-komplexek⁴⁹ esetén is a pH növekedésével bekövetkezik az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja, így $[MH_{-1}L]$, $[MH_{-2}L]^-$ és $[MH_{-3}L]^{2-}$ összetételű komplexek keletkeznek. A deprotonálódás irányáról az irodalomban ellentmondások is találhatóak, viszont többségében kisebb tagszámú peptidek

esetén ($\text{NH}_2, 3\text{N}^-$), míg nagyobb peptidmolekulák esetén ($\text{N}_{\text{Im}}, 3\text{N}^-$) koordinációs módról számoltak be.²⁵

Védett N-terminussal rendelkező, egy hisztidint tartalmazó peptidkomplexekben a terminális aminos csoport hiánya miatt az imidazolnitrogén-donoratom egyedül tölt be horgonydonor szerepet. Ebben az esetben a fémion körül (Pd(II) , Cu(II) , Ni(II)) 6- és 7-tagú kelátgyűrűk kialakítására van lehetőség az amidnitrogének részvételével, amelyek deprotonálódása az aminosav-szekvenciától függően az N-, illetve a C-terminális irányba mehet végbe. A 6-tagú kelátgyűrűk termodinamikai stabilitása mindig nagyobb, mint a 7-tagúaké, ezért kedvezőbb az N-terminus felé végbemenő deprotonálódás, aminek eredményeként egy nagy stabilitást biztosító (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer jön létre. Azonban abban az esetben, ha a hisztidin N-terminális pozícióban van (például Ac-HGGG^{50}) vagy egy olyan aminosav előzi meg a szekvenciában, ahol az amidnitrogén nem rendelkezik disszociálható protonnal (például prolin^{18, 51} vagy szarkozin⁵² esetén), akkor az amiddeprotonálódás és -koordináció a C-terminus irányban zajlik, amely eredményeként (7,5,5)-tagú csatolt kelátgyűrűs rendszer képződik. *Ez a kétféle irányú deprotonálódás a prion peptidfragmensek fémionnal való kölcsönhatása során is fontos szerepet kap.*

A több hisztidint tartalmazó peptidok fémkomplexei

A több hisztidint tartalmazó peptidok biztosítják a legjobb feltételeket makrokelátgyűrűk képződésére. Ilyen szerkezet kialakulása már rövidebb peptidok esetében is megfigyelhető, azonban a hosszabb változataik alkalmasabbak erre. Természetes fehérjék peptidfragmensei is nagyon jó modellek a makrokelát képződésre (például a prion fehérjék peptidfragmensei,⁵³⁻⁵⁶ a hiszton fehérjék,^{57, 58} az amiloid- β peptidok⁵⁹⁻⁶¹).

A szabad N-terminális aminos csoportot tartalmazó multihisztidin peptideknél az aminonitrogén és az imidazolcsoportok nitrogénatomjai együttesen potenciális horgonydonorok.

A HH dipeptid réz(II)ionnal való kölcsönhatása során a pH függvényében háromféle koordinációs mód alakulhat ki.⁶² pH 4,0 körül hisztaminszerű koordinációval a $[\text{CuHL}]$ komplex jelenik meg, ahol az aminos csoport és az N-terminális hisztidin vesz részt a koordinációban. Az 5,0 és 6,0 közötti pH-tartományban a fémion koordinációs szférájában átrendeződés következik be, a

kialakuló $[\text{CuL}]$ komplexben a fémion ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}(\text{His}_2)}$) koordinációval kapcsolódik a peptidhez. pH 7,0 felett $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2]$ dimer komplex van jelen az oldatban, amelyben mindkét fémion körül azonos koordinációs környezet alakul ki ($\text{NH}_2, \text{N}^-, 2\text{N}_{\text{Im}}$). Ni(II)-ionok esetében is beszámoltak az amidnitrogének koordinálódásáról, azonban Zn(II)-ion nem képes indukálni az amiddeprotonálódást, ez esetben hisztaminszerű koordinációt írtak le.^{63, 64}

A Cu(II)-HVVH rendszerben⁶⁵ is hasonló összetételű komplexek jelennek meg, savas pH-n $[\text{CuHL}]^{2+}$ és $[\text{CuL}]^+$ komplexek képződnek hisztaminszerű koordinációval. Fiziológias pH-tartományban ($\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációjú $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ komplex, illetve nagyobb pH-n egy makrokelátot tartalmazó szerkezet képződését írták le ($\text{NH}_2, \text{N}_{\text{Im}}, \text{N}_{\text{Im}}$). A tripeptid Zn(II)-komplexeit tanulmányozva kiderült, hogy savas pH-n kialakuló kötésmód megegyezik a Cu(II)-komplexeknél találtakkal, viszont lúgos pH-n nincs amiddeprotonálódás, és vegyes hidroxidokomplexek keletkeznek.⁶⁶

A HHGG tetrapeptid esetében a HH dipeptidhez képest nem változnak meg a komplexképző sajátságok.⁶⁷ A HGHG tetrapeptid Cu(II)-ionnal alkotott komplexében a fémion a GGH peptidre is jellemző donoratomokon keresztül koordinálódik.^{67, 68} Ezzel szemben a fordított szekvenciájú GHGH tetrapeptid komplexképződése bonyolultabb.⁶⁹ Savas pH-n tetragonális geometriájú $[\text{CuL}]$ komplex alakul ki az amino-, egy amid- és egy imidazolnitrogén részvételével. pH 6,0 körül megváltozik a szerkezete, ugyanis az imidazolnitrogén axiális kötődésével négyzetes piramisos geometria jön létre. Ezt a folyamatot egy további átrendeződés követi pH 7,0 körül, ahol további amiddeprotonálódás és -koordináció kiszorítja az imidazolnitrogént az ekvatoriális síkból, ami egy torzult trigonális bipiramisos szerkezetet eredményez $(\text{NH}_2, 2\text{N}^-)_{\text{ekv}} + (2\text{N}_{\text{Im}})_{\text{ax}}$ koordinációs móddal.

A HGHGHGHG oktapeptid pH 5,0 körül négy imidazolnitrogéneken keresztül koordinálódik a Cu(II)- és Ni(II)-ionhoz is, viszont nagyobb pH-n csak Cu(II)-ion esetében számoltak be az amidnitrogének deprotonálódásáról és koordinációjáról.⁷⁰ Azt is leírták, hogy a Ni(II)-ion nagymértékben képes arra készíteni a lineáris peptidmolekulákat, hogy egy bizonyos térbeli elrendeződést vegyenek fel az imidazolnitrogének koordinációja által. Ezzel szemben 1. és 3., valamint 2. és 3. pozícióban hisztidint tartalmazó peptidek (HRHRHEQQGHDSAKHGH⁷¹, SHHK⁷²) esetében az albuminszerű aminosav-szekvenciához hasonlóan síknégyzetes Ni(II)-komplexek képződnek, ahol a Ni(II)-ionhoz amino-, imidazol- és amidnitrogének koordinálódnak. Hasonló viselkedést tapasztaltak a polihisztidin

esetén is, amelynek oldatában a semleges pH-tartományban imidazol- és amidnitrogénekhez kötődik a Cu(II)-ion⁷³.

Fehérjék fémionkötőhelyeinek modellezésére gyakran használnak különböző védőcsoporttal blokkolt amino- és karboxilcsoportot tartalmazó peptideket, így a hisztidin veszi át a horgonydonor szerepét, ahogy az a természetes fehérjékben is gyakran előfordul.

A kutatócsoportunkban korábban már számos **védett N-terminusú multihisztidin peptid** oldategyensúlyi viselkedését tanulmányozták réz(II)ionok jelenlétében. Ac-HHVGDNH₂, Ac-HVGDH-NH₂,⁷⁴ Ac-HVVH-NH₂,⁷⁵ Ac-HGH-OH, Ac-HGH-NHMe, Ac-HHGH-OH, Ac-HHGH-NHMe,⁷⁶ Ac-HVVH-NH₂, Ac-HAAHVH-NH₂,⁷⁷ peptidek és Ac-HXHYH-NH₂ szekvenciájú pentapeptidek⁷⁸ tanulmányozása során savas pH-tartományban makrokelát szerkezetek jelenlétét írták le, ahol két vagy több imidazolnitrogén donoratom egyetlen réz(II)ionhoz koordinálódik. Viszont ez a szerkezet fiziológiás pH-n nem képes megakadályozni az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódását, és a koordinációjukat követően a fémion koordinációs szférájában egy imidazolnitrogén és amidnitrogének találhatók. A vizsgálati eredmények arra is rávilágítottak, hogy stabilisabb [ML] komplexek keletkeznek, ha a hisztidinek egymástól egy aminosav távolságra helyezkednek el a szekvenciában. A makrokelátok képződése -HXHYH- szekvencia esetén képes a legnagyobb mértékben visszaszorítani az amidnitrogének deprotonálódását, de teljes mértékben nem tudja azt megakadályozni. Ezen szekvencia esetén végeztek egy olyan kísérlet sorozatot is, ahol a hisztidineket összekötő aminosavakat szarkozinra cserélték⁵². Az Ac-(His-Sar)_n-His-NH₂ (n = 1, 2, 3) általános képlettel jellemezhető ligandumok esetében gátolt az amidnitrogének deprotonálódása. A réz(II)ionok jelenlétében kialakuló makrokelátok széles pH-tartományban stabilisak maradnak. A szerzők arra is rámutattak, hogy a makrokelát szerkezetet tartalmazó komplexek termodinamikai stabilitása függ a peptidláncban található hisztidinek számától, illetve egymáshoz viszonyított helyzetétől és pozíciójától.

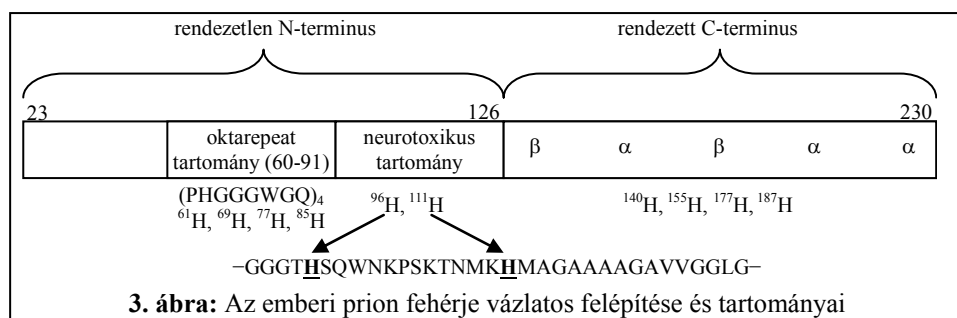
Két- vagy három hisztidint tartalmazó peptidek (Ac-HGH-NHMe, Ac-HGGH-NH₂, Ac-HHGH-NH₂, Ac-HAHVH-NH₂, Ac-HGHVH-NH₂, Ac-HVHGH-NH₂) Ni(II)-komplexeiben⁷⁹ fiziológiás pH-tartományban két-, illetve három imidazolnitrogén koordinációjával kialakuló [ML] komplexek a domináns részecskék. Ezen részecskék stabilitását befolyásolja az aminosavláncban helyet foglaló hisztidinek száma (minél nagyobb a koordinálódott imidazolnitrogének

száma, annál nagyobb stabilitású komplexek keletkeznek) és a hisztidinek egymáshoz viszonyított helyzete (HXH szekvenciát tartalmazóaké a legstabilisabb komplexek). A pH emelésével az amidnitrogének deprotonálódása kooperatív módon megy végbe. A -HXH- szekvenciát tartalmazó peptidek esetében a kialakuló $[\text{NiH}_2\text{L}]$ részecskében ($\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordináció valósul meg. Nagy pH-n lejátszódik a harmadik amidnitrogén deprotonálódása is $[\text{NiH}_3\text{L}]^-$ komplex képződését eredményezve ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötésmóddal. Amennyiben a hisztidinek távolabb (-HXXH- szekvencia) helyezkednek el egymástól, a három amidnitrogén egy lépésben történő deprotonálódása figyelhető meg. A pentapeptidek fémionfelesleget tartalmazó oldataiban kétmagvú komplexek is képződnek.

2.3. A prion fehérje és kölcsönhatásai fémionokkal

A prion betegségek a neurodegeneratív rendellenességek közé tartozó, halálos kimenetelű megbetegedések, amelyek ritkák, viszont fertőzőek. Több fajtája is létezik, a legismertebbek a szarvasmarhákban megjelenő kergemarhahórnak is nevezett szivacsos agyvelősrövadás (BSE = *bovine spongiform encephalopathy*), a juhokat és kecskéket sújtó surlókór (scrapie), valamint az emberek esetében a Creutzfeldt-Jacob-kór (CJD = *Creutzfeldt-Jacob disease*). A betegséget a prion fehérje (PrP^{C}) megváltozott térszerkezetű formája (PrP^{Sc} , Sc = *scrapie*) váltja ki.

A celluláris prion fehérje (PrP^{C}) egy közel 250 aminosavból álló sejtfelületi glikoprotein, amely minden emlőssejtben megtalálható. Sok ismert szerkezetű emlős PrP^{C} szerkezete két jellegzetes részt tartalmaz. Az egyik egy kb. 100 aminosavból álló, rendezetlen N-terminális rész, a másik egy globuláris szerkezetű C-terminális rész, ami az emberi PrP^{C} -ben a 127-228 közötti aminosav-tartománynak felel meg, és három α -hélixet (144-154, 173-194, 200-228), valamint két rövid antiparallel állású β -redőt (128-131, 161-164) tartalmaz (3. ábra).⁸⁰⁻⁸⁴



A betegség kialakulása során a konformációváltozás egy tisztázatlan mechanizmusú folyamatban a helikális részen következik be, és ennek eredményeként a β -redőkben gazdag kóros formájú PrP^{Sc} alakul ki. A két fehérje csak térszerkezetében tér el egymástól,⁸⁵ viszont ebből adódóan, a két fehérje fizikai kémiai tulajdonságai jelentősen eltérnek egymástól. Az α -hélix szerkezetekben gazdag PrP^C oldható és proteáz enzimek lebontják. Ezzel szemben a β -redőben gazdag PrP^{Sc} gyakorlati szempontból fontos tulajdonsága a nagyfokú hőállóképessége, a fertőtlenítőszerrel, UV sugárzással, ionizáló sugárzással szembeni fokozott ellenállóképessége, rossz oldhatósága, valamint nem lebontható. Ezeknek köszönhetően a kóros formájú prion fehérjék aggregálódnak, úgynevezett plakkokat alkotnak és lerakódnak az idegsejtekben, ami azok pusztulásához vezet.⁸⁶ Ezen kívül a kóros forma templáthatással is rendelkezik, azaz képes saját szerkezetét rákényszeríteni a normál konformációjú fehérjére.⁸⁷ Tehát a PrP^{Sc} kétszeresen káros, hiszen egyrészt proteázrezisztens, másrészt pedig „fertőzi” a normál prion fehérjét. A betegségek kialakulásának pontos oka egyelőre ismeretlen, ezért nem gyógyíthatók.

A fehérje fiziológiás szerepe is tisztázatlan.⁸⁸ Beszámoltak a PrP hosszú távú memóriafolyamatokban való részvételéről,⁵⁴ de az oxidatív stressz elleni védekezésben tulajdonított szerepéről is említést tesznek az irodalomban.^{54, 89} Mások redoxi szenzorként való működését feltételezik, azonban ennek a mechanizmusa tisztázatlan maradt.⁹⁰ Olyan elmélet is létezik, amely szerint a PrP a Cu,Zn-SOD enzim számára tárolja a rezet,⁹¹ de van olyan is, ahol részt vesz a sejthalál elleni védekezésben, habár ez utóbbi esetben is, mint sok másban a mechanizmus vitatott.⁹² A legelfogadottabb nézet szerint a PrP a rézhez való nagy affinitása következtében egy rézszállító, illetve réztároló fehérje. De valószínűleg nem ez a PrP fő, illetve egyetlen feladata.^{90, 93-95} Az már széles körben elfogadott, hogy a fehérje specifikusan köti a rezet,⁹⁶⁻⁹⁸ és kimutatták, hogy konformációs változásokat indukál a PrP^C-ben, továbbá a PrP^C-hez kapcsolódó különböző kofaktorok között a rézről bizonyosodott be, hogy képes módosítani a prion betegség kifejlődését.⁹⁹⁻¹⁰¹ Egyre több kísérlet támasztja alá a prion protein rézhomoeosztázisban való részvételét, beleértve a fémion sejtbejuttatását, illetve a fémfelesleg összegyűjtését a sejtek védelme érdekében.^{96, 102, 103} Mindent összevetve számos kísérleti bizonyíték megerősíti, hogy a fémionok, különösen a réz(II)ionok, részt vesznek a prion fehérje normális működésével kapcsolatos biokémiai folyamatokban és/vagy konformációs átalakulásokban. Az utóbbi időben nagy számban jelentek meg tanulmányok a különböző prion fehérjék, valamint

fragmenseik fémionokkal való kölcsönhatásáról. Az elmúlt pár évben számos összefoglaló művet,^{26, 54, 90, 93, 104-112} illetve könyvet^{86, 113, 114} is publikáltak ebben a témában.

A prion fehérje kiváló fém(II)ion-kötőképességgel rendelkezik és elsődleges fémionkötőhelyként a könnyebben hozzáférhető, rendezetlen N-terminális részt nevezik meg. Az átmenetifém-ionok közül a réz(II) – prion fehérje kölcsönhatását tanulmányozták a legkiterjedtebben. A rézkötőhelyek számát vizsgálva kiderült, hogy ez a pH-tól függően 2 és 5,6 között változik.^{96, 98, 102, 115-117} Arról is beszámoltak, hogy a fő réz(II)ion-kötőhely egy jellegzetes nyolc aminosavból álló ismétlődő egységet -PHGGGWGQ-⁸⁷ tartalmazó régió (3. ábra). Az ismétlődés fajtoktól függően 4-6 egységig terjed, az emlősnél 4 egység, és oktarepeat tartománynak (*HuPrP(60-91): octarepeat region*) hívják. Minden oktapeptid aminosavai között található egy hisztidin, a teljes oktarepeat tartomány tehát összesen négy hisztidint tartalmaz, amely bizonyos fémionokhoz horgonycsoportként kötődik. Meg is állapították, hogy az ismétlődő oktapeptidek számával arányos a megkötött réz(II)ionok száma.

További két réz(II)ion kötődhet a PrP^C-hez az oktarepeat tartományon kívül (3. ábra), amely a 90-126-os neurotoxikus tartományban található. Ez a szekvencia további két hisztidint tartalmaz (*HuPrP* esetén H96 és H111). A kutatók többsége egyetért abban, hogy ezek a hisztidinek egymástól függetlenül működnek,¹¹⁸ illetve a H111 a kedvezőbb rézkötőhely az emberi prion fehérje esetében.¹⁰⁵ A prion fehérje 106-126-ig terjedő -KTNMKHMAAGAAAGAVVGGLG- szekvenciáját két részre oszthatjuk. Egyik fele (113-126) hidrofób, sok glicint és alanint tartalmaz, ez szükséges, de nem elégséges feltétele a neurotoxicitásnak; a másik fele (106-112) hidrofil, és fontos kötőhelyként szerepel a fémionok számára. A teljes hosszúságú prion fehérjét fokozatosan telítik a réz(II)ionok, az első két ekvivalens a (90-126)-os részhez kötődik, majd ezt követi az oktarepeat tartomány (58-91) koordinációja.¹¹⁹ Összességében megállapítható, hogy a maximálisan megköthető hat réz(II)ionból négyet az oktarepeat tartomány koordinál, kettőt pedig a külső hisztidinek (H96 és H111).

A C-terminus rész nincs hatással a réz(II)ion megkötésre,⁵⁴ és eltávolítása sem okoz változást a rendezetlen N-terminális domén (PrP(23-126)) koordinációjában.¹¹⁹ Azonban újabb vizsgálati eredmények azt mutatják, hogy a C-terminális tartományban található, szintén oktarepeaten kívüli H187 is koordinálja a réz(II)iont,^{120, 121} viszont itt fontos megjegyezni, hogy ezeket a vizsgálatokat nem

a teljes hosszúságú fehérje esetén végezték, ahol a meghatározott szerkezet következtében a fémionnak csekély esélye van a hisztidil-oldallánc elérésére.

Más fémionok tanulmányozása során a Zn(II)-, Ni(II)- és Mn(II)-ionok lehetséges koordinációját javasolták.¹²² Habár a fehérje Zn(II)-ionok felé mutatott csekély affinitása megkérdőjelezi ezt a javaslatot. Az oktarepeat tartomány képes koordinálni a Zn(II)-ionokat az imidazolnitrogének egyidejű koordinációja által, azonban a réz(II)ionokénál sokkal kisebb stabilitású komplexeket képeznek, ami az amidkoordináció hiányának köszönhető.¹¹¹ A Zn(II)-ionok még nagy koncentrációban sem képesek kiszorítani a Cu(II)-ionokat sem az oktarepeat tartományból sem a teljes hosszúságú prion fehérjéből, másrésről viszont fiziológias körülmények között módosíthatják a Cu(II)-ionok eloszlását az egyes PrP komplexek között.^{122, 123} A prion fehérje Mn(II)-ionokkal való kölcsönhatása pedig még mindig egy nyitott kérdés.¹²⁴⁻¹²⁷ CJD-ben szenvedő betegek agyából izoláltak mangántartalmú PrP^{Sc}-t,¹²⁸ azonban ez a kötés inkább a betegség következménye lehet, nem pedig a kiváltó oka. A vasionok kölcsönhatását elhanyagolhatónak vélték, mivel biológiai körülmények között az erre a célra specializálódott fehérjék elfoglalják a vasat a prion fehérje előtt.¹²⁹

A teljes hosszúságú prion fehérje rossz oldhatósága következtében számos peptidfragmensének vizsgálták a koordinációs kémiáját, amelyet a következő fejezet foglal össze.

2.4. A prion fehérje peptidfragmenseinek kölcsönhatása fémionokkal

A prion peptidfragmensek tárgyalásánál előjáróban fontos kiemelni, hogy a fehérje koordinációs kémiai szempontból kétféle hisztidint tartalmaz az N-terminális régiójában. Az egyik a -PHGGGWGQ- szekvenciában található, oktarepeat tartománybeli hisztidin, amely 4N-es [MH₃L] komplexében (N_{Im},3N⁻) koordinációs mód alakul ki (természetesen olyan fémionok esetében, amelyek indukálják az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját). Ebben az esetben a hisztidin előtt található prolin disszociábilis proton hiányában meggátolja az amidnitrogén deprotonálódást és koordinációt az N-terminus irányba, így az csak a C-terminus irányban indulhat el,¹⁸ melynek következtében (7,5,5)-tagú csatolt kelátrendszer jön létre. A hisztidinek másik csoportja esetén nincs akadályozó tényező, így az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja az N-terminus felé zajlik, ezzel (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszert kialakítva a [MH₃L] részecskében, amely nagyobb termodinamikai stabilitással rendelkezik,

mint a (7,5,5)-tagú.¹⁹ Ez a helyzet az oktarepeat tartományon kívüli hisztidinek esetében is.

Számos tanulmány megállapította, hogy a hisztidintartalmú prionfragmenseknek jelentős affinitásuk van a Cu(II)-ionok felé, de sok más átmenetifém-ionnal is kölcsönhatnak. A prion proteinnel való kölcsönhatásban mind az esszenciális, mind a nagyon toxikus átmenetifémek potenciális jelöltek biológiai körülmények között. A rézionon kívül több átmenetifém-ion kölcsönhatását vizsgálták prion fehérjével, illetve fragmenseivel; többek között az esszenciális Zn(II)-, Co(II)-, Ni(II)-, Mn(II)-ionét, valamint a nagyon toxikus Cd(II)- és Pd(II)-ionét. Mint más hisztidintartalmú peptideknél is, a legstabilisabb komplexek Pd(II)-ionnal képződnek, ahol az amidnitrogének deprotonálódása és a komplexképződés erősen savas közegben következik be. A Zn(II)-, Ni(II)-, Co(II)-, Mn(II)- és Cd(II)-ionoknak sokkal kisebb affinitása van a peptidekkel való kölcsönhatásra, és az imidazolil-oldallánc deprotonálódásának pH-tartománya alatt ($\text{pH} < 6$) nem észleltek komplexképződést. A ligandum ezen fémekhez való koordinációja az imidazolnitrogénen keresztül történik (egyfogú ligandumként), aminek következtében nem tudja oldatban tartani az adott fémiont, a hidrolízisének tartományát elérve a fémion hidrolizál. Egyedül a Ni(II)-ion esetén számoltak be a csapadék visszaoldódásáról lúgosabb pH-értéken, amikor az megindítja az amidnitrogének deprotonálódását.¹³⁰ A fémkomplexek stabilitása alapján a prion-modellekhez való affinitás a következő sorrendet mutatja: Pd(II) >> Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) > Cd(II) ~ Co(II) > Mn(II).

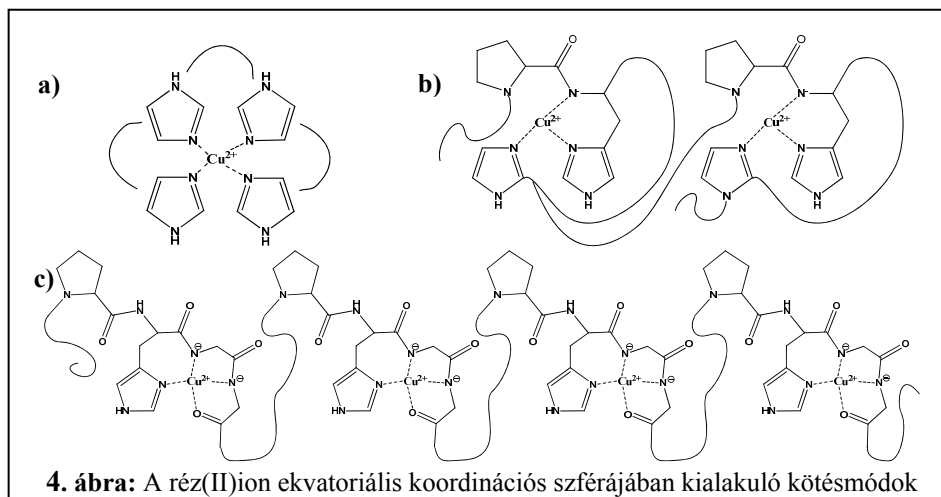
2.4.1. Az oktarepeat tartomány réz(II)ion-koordinációja

Az elmúlt 10-15 évben számos kutatócsoport tanulmányozta a prion fehérjének, valamint különböző fragmenseinek réz(II)ionnal való komplexképződési folyamatait és általánosan elfogadottnak tekinthető, hogy az oktarepeat tartomány az elsődleges fémkötőhely.^{102, 131, 132} Azonban még mindig heves viták folynak (i) az egyes peptidfragmensekre és a teljes fehérjére meghatározott disszociációs állandó értékek helytállóságáról; (ii) a PrP^C molekulánként megkötött réz(II)ionok számáról; valamint (iii) a fő réz(II)komplexek szerkezetéről. Ez valószínűleg a különböző mérési körülményekből is ered (pl. a teljes fehérje, vagy csak fragmenseinek vizsgálata; eltérő fémion-ligandum arány, pH, puffer, stb. alkalmazása).

A **monomer oktarepeat** peptidfragmensekre irányuló vizsgálatokból egyértelműen kiderült, hogy a réz(II)ionok megkötéséhez szükséges minimális aminosav-szekvencia a -HGGSW- szegmens.¹¹⁷ Potenciometriás titrálással meghatározták a képződő komplexek sztöchiometriáját, spektroszkópiai módszerekkel tanulmányozták a képződő komplexek szerkezetét,^{117, 131} illetve az Ac-HGGSW-NH₂ szegmens röntgen kristályszerkezetét is azonosították.¹³² A komplexképződés savas pH-tartományban kezdődik az imidazolnitrogén-donoratom egyfogú koordinációjával, majd ezt követi a C-terminus irányban kelátképző helyzetben levő amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja. Fiziológias pH-n jelenlevő fő részecske [CuH₂L] sztöchiometriájú és a réz(II)ion koordinációs szférájában (N_{Im}, 2N⁻_(Gly1, Gly2), O_{karbonil(Gly2)}) donoratom szett található az ekvatoriális síkban, valamint hidrogénkötést azonosítottak egy axiálisan koordinált vízmolekula és a triptofán oldalláncbeli indolcsoportja között. Lúgos pH-n további amiddeprotonálódások következnek be, amelyek során (N_{Im}, 3N⁻) kötésmódú [CuH₃L]⁻, illetve pH 10,0 felett (4N⁻) kötésmódú [CuH₄L]²⁻ részecskék képződnek.

A **dimer és tetramer oktarepeat** peptidfragmenseket is számos kutatócsoport tanulmányozta, azonban az eredmények alapján levont konklúziók az eltérő kísérleti körülmények alkalmazása következtében óvatosságra intenek. A megjelent közleményekből jól látszik, hogy a tartománynak fontos szerepe van a réz(II)ion megkötésében, viszont arról már megoszlanak a vélemények, hogy van-e kapcsolat az egyes rézcentrumok között, mivel egyes szerzők kooperatív folyamatként jellemzik a réz(II)ion kötést.^{53, 54, 133, 134} Fontos szem előtt tartani, hogy a réz(II)komplexek képződése erősen függ a fémion-ligandum aránytól és a pH-tól.

Millhauser és kutatócsoportja különböző oktarepeat-peptidszármazékok sorozatának ESR spektroszkópiás tanulmányozása alapján három jól elkülönülő kötésmódot javasoltak a fémion-ligandum arány függvényében, 7,4-es pH-értéken (4. ábra).¹³⁵ Alacsony réz(II)ion-koncentrációnál (4.a ábra) egyetlen réz(II)ionhoz három vagy négy hisztidin imidazolnitrogénje koordinálódik, úgy nevezett makrokelátok jönnek létre, a ligandum pedig gombolyagszerűen veszi körbe a fémiont. Ezzel szemben nagy réz(II)ion-koncentráció mellett (4.c ábra) minden réz(II)ion körül az ekvatoriális síkban (N_{Im}, 2N⁻, O_{karbonil}) koordinációs mód alakul ki egyetlen hisztidil-oldallánc részvételével. Ebben az esetben a réz(II)ionok elhelyezkedése egy gyöngyfüzérhez hasonlít. Köztes réz(II)ion koordináció esetén (4.b ábra) egy réz(II)ionhoz két hisztidin koordinálódik az imidazolnitrogénjén keresztül, amelynek következtében a ligandumon belül nagy hurkok képződnek.



Több egymás melletti oktarepeat egység nagyobb affinitással rendelkezik a réz(II)ionok felé, mint a monomer önmagában.¹³⁶ Kozłowski és kutatócsoportja potenciometriás és spektroszkópiás módszerek kombinált alkalmazásával tanulmányozta az oktarepeat dimer és tetramer (Ac-(PHGGGWGQ)₂-NH₂, Ac-(PHGGGWGQ)₄-NH₂) esetén képződő réz(II)komplexeket, azonban a rossz oldékonyság következtében szerves oldószerkeletben történtek a vizsgálatok.⁵³ Az általuk leírt [CuL] részecske, amely pH 7,0 körül képződik ekvimoláris oldatban, jó egyezést mutat az a) szerkezeti résszel (4. ábra). pH 7,0 felett négy ekvivalens réz(II)ion mellett képződő fő részecske [Cu₄H₉L] sztöchiometriájú és szerkezete hasonló az 4. ábrán látható c) szerkezeti részhez. Azonban meg kell jegyezni, hogy nem teljesen helytálló a rendszer leírása, mert egymástól függetlenül kezeli az egyes fémion-ligandum arányoknál képződő többmagvú komplexek képződését.

A vízdoldhatóságai probléma kiküszöbölését kutatócsoportunkban az Ac-(PHGGGWGQ)₂-NH₂ és Ac-(PHGGGWGQ)₄-NH₂ szekvencia polietilén-glikol láncsal ellátott N-terminális véggel rendelkező származékok előállításával oldották meg, amely így vízdoldható fémkomplexeket képez. Lehetővé vált így módon a potenciometriás vizsgálatok kivitelezése ($T = 298\text{ K}$, $I = 0,2\text{ mol/dm}^3\text{ KCl}$) különböző fémion-ligandum arányoknál, valamint spektroszkópiás módszerek (UV-vis, CD és ESR) kombinált alkalmazásával tanulmányozhatóvá vált a képződő részecskék koncentráció-eloszlása és szerkezete, a ligandum fémion-affinitása, valamint a kötési sajátosságok is.¹³⁷ Megállapították, hogy az egyes ligandumok annyi ekvivalens réz(II)ion megkötésére képesek, ahány hisztidil-oldallánc

található a szekvenciában, és ezek mindegyike független kötőhelyként viselkedik. A dimer komplexképződési folyamatai nagyon hasonlóak más multihisztidin peptidekéhez.⁷⁸ Ekvimoláris mintákban a pH növekedésével négy fő részecske létezését detektálták. pH 6,0 alatt a $[\text{CuL}]^{2+}$ makrokelát két imidazolnitrogén koordinációjával valósul meg. pH 6,0 és 9,0 között uralkodó a $[\text{CuH}_2\text{L}]$ részecske ($\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-$) koordinációs móddal, de a másik imidazolil-oldallánc hozzájárulás nem zárható ki teljesen. Lúgos pH-n további amiddeprotonálódás következtében kialakul a $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$ részecske ($\text{N}_{\text{Im}}, 3\text{N}^-$) kötésmóddal, majd nagyon lúgos pH-tartományban képződő $[\text{CuH}_4\text{L}]^{2-}$ részecskében négy amidnitrogén található az ekvatoriális síkban. Fémionfelesleg esetén is ugyanezek a kötésmódok valósulnak meg, azonban a fiziológiás pH-n uralkodó $[\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}]$ komplex ($\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-$) koordinációs móddal rendelkezik.

A Cu(II)–tetramer oktarepeat rendszerben a komplexképződés nagyon függ a fémion-ligandum aránytól. A képződő részecskék hasonló koordinációs móddal rendelkeznek, mint a dimer esetén észleltek. Egy ekvivalens réz(II)ionot tartalmazó oldatban pH 6,0 alatt a $[\text{CuL}]^{2+}$ makrokelát négy imidazolnitrogén koordinációjával valósul meg (4.a ábra) és ennek a makrokelátnak a megnövekedett stabilitása eredményezi, hogy az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja eltolódik enyhén lúgos pH-tartományba ($\text{pH} > 7,5$). Azonban a réz(II)ion-koncentráció növekedése megtöri ezt a makrokelát szerkezetet és elősegíti az amidnitrogének deprotonálódását kisebb pH-értéken ($\text{pH} > 6,0$). Ezt korábban az emberi prion fehérje oktarepeat tartományának a rézmegkötésében kooperativitásként értelmezték.^{53, 54} Azonban ez a tanulmány arra enged következtetni, hogy nem kooperativitásról van szó és az első réz(II)ion megkötése nem könnyíti meg más fémionok megkötését. Fontos még kiemelni, hogy 1:1 és 2:1 fémion-ligandum aránynál fiziológiás pH-n jelenlévő komplexek kötésmódjai különböznek egymástól. Amíg 1:1 arány esetében fiziológiás pH-tartományban a $[\text{CuL}]^{2+}$ részecske dominál (4N_{Im}) koordinációs móddal, addig 2:1 aránynál ugyanezen pH-tartományban már az amidnitrogének is részt vesznek a koordinációban, $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}]$ sztöchiometriát és ($\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-$) + (3N_{Im}) kötésmódot eredményezve.

2.4.2. Az oktarepeat tartományon kívüli hisztidinek réz(II)ion-koordinációja

Publikációk sorozata támasztja alá, hogy az emberi prion fehérje összesen tíz hisztidinjéből legalább hat (H61, H69, H77, H85, H96, H111) hatékonyan köt meg

réz(II)ionokat.¹³⁸⁻¹⁴⁴ A szerzők egy csoportja úgy találta, hogy az oktarepeat tartomány nagyobb affinitással rendelkezik a réz(II)ionok felé, mint az azon kívül esők.¹⁴⁵ Ezzel szemben mások kompetíciós módszert alkalmazva bizonyították, hogy az oktarepeaten kívüli tartomány elvonja a réz(II)iont az oktarepeat tartománytól.¹³⁸ Mostanra a külső H96-,^{130, 141} H111-^{130, 146} és H187¹²⁰-ról is egyértelműen bebizonyosodott, hogy kiváló réz(II)ionkötők. Ezen három hisztidint külön-külön tartalmazó rövid prion peptidfragmensek vizsgálatán alapuló tanulmányok kimutatták, hogy az imidazolnitrogének horgonydonorként viselkednek és elősegítik a következő, N-terminus irányban velük kelátképző helyzetben lévő amidnitrogének deprotonálódását és fémionhoz történő koordinációját. A szerzők három fő részecske létezését detektálták a pH függvényében: $[CuL]$, $[CuH_2L]$ és $[CuH_3L]$, (N_{Im}) , $(2N^-, N_{Im})$ és $(3N^-, N_{Im})$ kötésmóddal. Az első két amidnitrogén deprotonálódása kooperatív folyamat és pH 6,0 körül következik be, a harmadik amiddeprotonálódás az adott szekvenciától függően 7,0 és 9,0 közötti pH-tartományban zajlik. Megállapították, hogy fiziológiás pH-tartományban a H111 környéke valamivel jobb fémionmegkötő, mint a H96 körüli, és mindkettő jobb, mint az oktarepeat monomer, aminek oka az oktarepeatben található prolinra és a miatta kialakult kisebb termodinamikai stabilitású (7,5,5)-tagú kelátrendszerre vezethető vissza. A H96 és H111 körüli aminosavsorrendet modellező két legegyszerűbb tetrapeptid $[HuPrP(94-97) (Ac-GTHS-NH_2)]$ és $HuPrP(109-112) (Ac-MKHM-NH_2)]$ aminosav-szekvenciáját nézve az utóbbi tartalmaz egy lizint. A liziloldalláncok ϵ -aminocsoportjainak koordinációját ugyan nem mutatták ki, viszont a sztöchiometria megállapításánál figyelembe kell venni, mivel pH 9,5 alatt protonált formában van jelen.¹³⁰ Ezzel szemben a 109-es pozícióban található metionin esetében egy stabilizáló hatású, gyenge kölcsönhatást fedeztek fel a fém(II)ion és a tioéterkén között az átmeneti 3N-es komplexben.¹³⁰ Ugyanebben a pozícióban szerint tartalmazó mutánsok tanulmányozása azt sugallja, hogy a 109-es pozíciójú aminosavnak stabilizáló hatása van.¹⁴⁷

2.4.3. A több hisztidint tartalmazó prion peptidfragmensek réz(II)komplexei

Az egyetlen hisztidint tartalmazó prion peptidfragmensek hasznos információt szolgáltatnak a specifikus kötőhelyek fémion-kötőképességéről, azonban nem a legalkalmasabb modellek a több hisztidint tartalmazó ligandumok

komplexbépződési folyamatainak jellemzésére. Ebből kifolyólag kutatócsoporthunkban olyan több hisztidint tartalmazó prion peptidfragmensek komplexképződési folyamatait jellemezték, amelyek oktarepeat és külső hisztidint is tartalmaznak, valamint a hisztidinek alaninra cserélésével mutáns fragmenseket is tanulmányoztak:^{148, 149}

valódi:	HuPrP(91-115)	[H96, H111]
	HuPrP(84-114)	[H85, H96, H111]
	HuPrP(76-114)	[H77, H85, H96, H111]
mutáns:	HuPrP(84-114)H85A	[H96, H111]
	HuPrP(84-114)H96A	[H85, H111]
	HuPrP(84-114)H111A	[H85, H96].

Mind a hat peptid hatékony ligandum a réz(II)ion megkötésében. A hisztidin imidazolnitrogénjei az elsődleges koordinációs helyek valamennyi peptid esetén, és eredményként makrokelát szerkezetek alakulnak ki (4.a és 4.b ábra), amelyek stabilitása a donorumok számától és térbeli viszonyától egyaránt függ.⁵² Az egy hisztidint tartalmazó fragmensekkel összehasonlítva a multihisztidin peptidfragmensek esetében nagyobb stabilitású imidazolnitrogén által koordinált részecskék keletkeznek, amely annak köszönhető, hogy egyetlen réz(II)ionhoz egyidejűleg szekvenciától függően kettő, három vagy négy imidazolnitrogén koordinálódik. A pH növelésével bekövetkezik az amidcsoportok deprotonálódása és a fémionhoz történő koordinációja. Az első két amidcsoport deprotonálódása 5,5 és 7,0 közötti pH-tartományban kooperatív módon játszódik le és a réz(II)ion körül ($2N^-, N_{lm}$) kötőmód alakul ki. A harmadik amidcsoport csak enyhén lúgos közegben koordinálódik, ezáltal ($3N^-, N_{lm}$) koordinációjú 4N-es komplexeket eredményezve. Ezekben a komplexekben valamennyi hisztidin független kötőhelynek tekinthető és a peptidek annyi ekvivalens réz(II)ion megkötésére képesek, ahány hisztidint tartalmaz a szekvenciájuk. Ez lehetővé teszi többmagvú komplexek kialakulását és a statisztikai megfontolásokkal egyezésben, többmagvú komplexek már ekvimoláris oldatokban is képződnek, rézionfelesleg esetén pedig a többmagvú komplexek képződése közel 100 %-os. Általában a többmagvú komplexekben két vagy több fémiont egy kis hídligandum köt össze. Esetünkben ezt a hidat a peptidváz jelenti, amely „fűzészerűen” köti össze a fémionokat, és a továbbiakban az összekötött fémionok számától függően, erre az egy-, kettő-, stb.-többmagvú kifejezést használjuk. A stabilitási állandókat összevetve elmondható, hogy az oktarepeat tartományon kívül elhelyezkedő hisztidinek fémionkötőképessége nagyobb, mint az oktarepeaten belülieké. Ez a jelenség a

kelátgyűrűk eltérő tagszámával értelmezhető. A több hisztidin jelenléte koordinációs izomerek keletkezését eredményezi, amelyekről CD spektroszkópia segítségével tanulmányozva megállapították a hisztidinek kötődési sorrendjét: H111 > H96 >> H85 ~ H77. Azaz a stabilitási állandók és a spektroszkópiás adatok is azt támasztják alá, hogy az oktarepeaten kívüli tartomány nagyobb réz(II)ion-kötőképességgel rendelkezik, mint az azon belül elhelyezkedőek. A külső hisztidinek kiemelt rézmegkötését számos más kutatócsoport is alátámasztotta különböző spektroszkópiai módszerekkel,^{26, 138, 140, 142, 143, 150, 151} illetve a csirke és a hal prion fehérjék esetén is beszámoltak ugyanilyen koordinációs környezet létezéséről.^{26, 152}

2.4.4. A hisztidintartalmú prion peptidfragmensek nikkell(II)komplexei

A torzult oktaéderes geometriájú paramágneses réz(II)komplexek szerkezeti modellezésére kiválóan alkalmasak a hasonló szerkezetű, ám diamágneses nikkell(II)komplexek, mivel kényelmesen tanulmányozhatók olyan vizsgáló módszerekkel (pl. ¹H NMR), amelyek a réz(II)ion esetében nem alkalmazhatók. Így értékes szerkezeti információk nyerhetők a különböző fémion-ligandum aránynál képződő komplexek szerkezetéről. A prion fehérje peptidfragmensei esetében is alkalmazható ez a megoldás. Mivel az oktarepeat tartomány nikkellokoordinációja elhanyagolható jelentőségű, ezért a kutatások inkább a neurotoxikus tartományban elhelyezkedő, emberi prion protein esetében H96 és H111, illetve a csirke prion protein ennek megfelelő H110 és H124 nikkell(II)ion-kötőképességére irányultak.^{130, 139, 141, 144, 153, 154} Mindegyik esetben beszámoltak arról, hogy a Ni(II)-ionok kisebb affinitással rendelkeznek a prionmodellek felé, mint a réz(II)ion, valamint megerősítették a hisztidin imidazolnitrogénjének a horgonydonor szerepét is. Azonban a Ni(II)-ion hidrolízis-tartományában a ligandum fémhez való imidazolnitrogénnel keresztüli, egyfogú koordinációja nem tudja oldatban tartani a fémiont, viszont lúgosabb pH-n beszámoltak a csapadék visszaoldódásáról, illetve az amidnitrogén deprotonálódásáról és fémion-koordinációjáról.¹³⁰ Több hisztidint tartalmazó ligandumok esetén nem számoltak be a fémion hidrolíziséről,^{140, 142, 154} amely a több imidazolnitrogén egyidejű koordinációjával kialakuló komplexek nagyobb stabilitásával magyarázható. Lúgos pH-n a kooperatív amiddeprotonálódást követően síknégyszetes geometriájú, diamágneses komplexek képződését feltételezik (3N⁻,N_{Im}) koordinációs móddal, a réz(II)ionokhoz hasonlóan. Ezzel ellentmondásban olyan nikkell(II)komplexeiről is

beszámoltak, ahol két Ni(II)-centrumot egy hidroxidcsoport hídként köt össze, és a kialakuló különböző koordinációs mód következtében a szerzők nem javasolják a nikkell(II)ion modellként való alkalmazását.¹⁵³ A különböző fajoknál a prion fehérje kedvezményezett kötőhelyeit vizsgálva megállapították, hogy Ni(II)-ionok számára a H96 a preferált kötőhely az emberi prionban,^{130, 142, 153} és ennek a pozíciónak megfelelő H110 a csirke prion fehérjében, ahol a 109-es pozícióban elhelyezkedő tirozin aromás gyűrűjének stabilizáló hatását is kimutatták.¹⁵⁴

2.5. Célkitűzések

Az eddig fellelhető irodalom koordinációs kémiai szempontból a prion fehérje peptidfragmenseinek főként a réz(II)ionnal való komplexképződési folyamatainak megismerésével foglalkozik. A réz(II)ionhoz képest kevés közlemény tárgyalja az egyéb átmenetifém-ionokkal való kölcsönhatásokat, és azok sokszor ellentmondásban is vannak egymással. Ezen kívül a rézzel kapcsolatos vizsgálatok során is maradtak még tisztázatlan kérdések. 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. Az irodalomból ismert, hogy a nikkel(II)ion elég gyakran hasonló módon koordinálódik, mint a réz(II)ion, ezért nikkel(II)ion esetén is érdemes folytatni a vizsgálatokat a több hisztidint tartalmazó ligandumokkal kapcsolatban, és ezek a komplexek egyúttal modellek is lehetnek a réz(II)komplexek szerkezetének megértésében.

Az irodalomban fellelhető ellentmondások, valamint a nikkel(II)komplexek szerkezeti modellként való alkalmazhatósága indokolta a prion peptidfragmensek nikkel(II)komplexeinek szisztematikus vizsgálatát. Ennek megfelelően célkitűzéseinket két részre bontva fogalmaztuk meg.

1. Egyrészt célul tűztük ki olyan természetes és mutáns prion peptidfragmensek nikkel-kötőképességének vizsgálatát, amelyek egyszerre eltérő tartományokból tartalmaznak hisztidineket, 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 prion peptidfragmens vegyes nikkel(II)/réz(II) rendszereiben zajló komplexképződési folyamatok tanulmányozása is.

2. 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.

3. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Használt vegyszerek

Az oldategyensúlyi vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek:

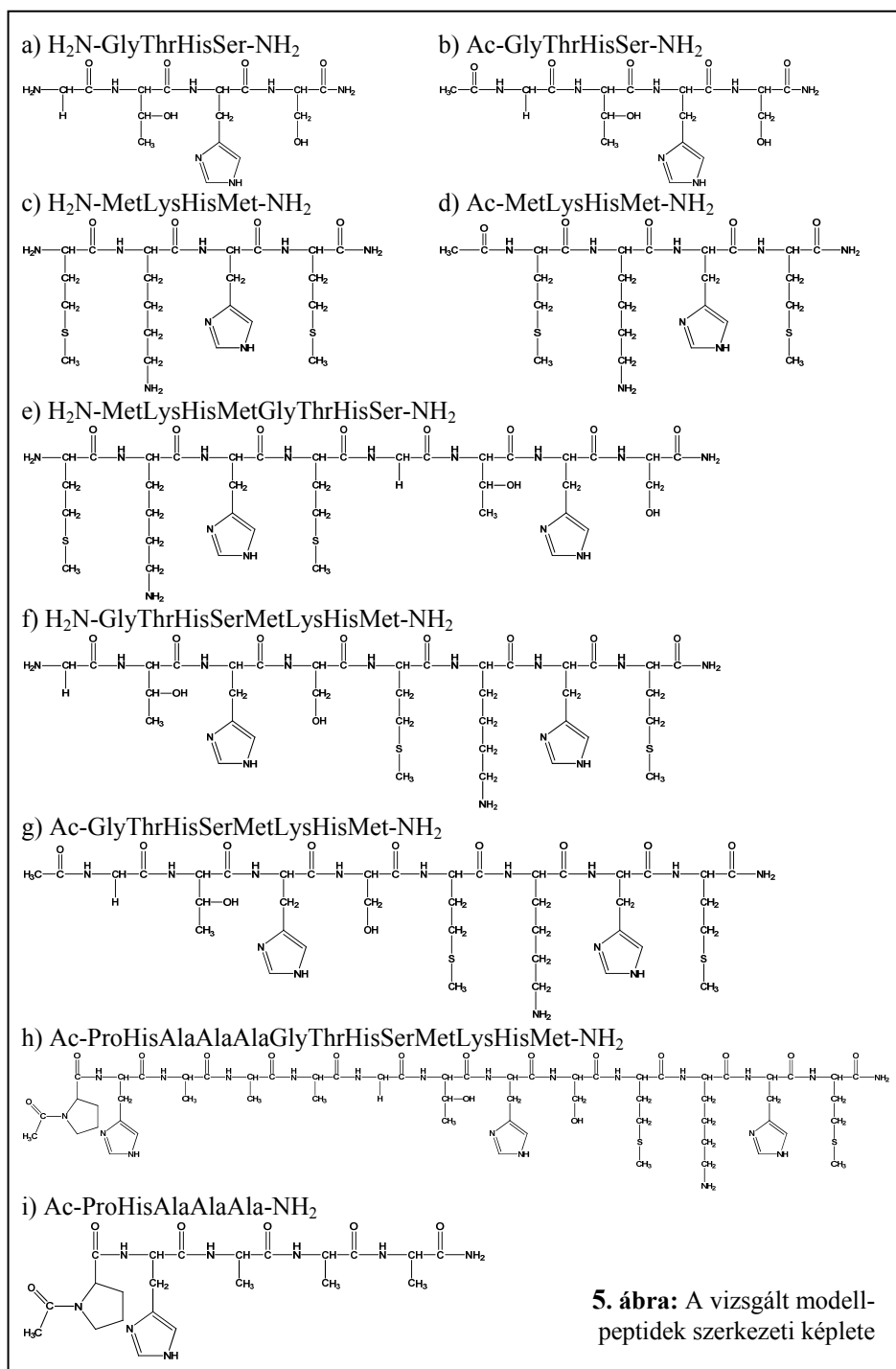
A titrálásokat kb. $0,2 \text{ mol/dm}^3$ -es, pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes, argon alatt tárolt KOH-oldattal végeztük. A mérőoldat karbonátmentességét a koncentráció meghatározására alkalmazott potenciometriás méréssel ellenőriztük. A CuCl_2 -, NiCl_2 és ZnCl_2 -törzsoldatok a.l.t. minőségű, a Reanal cég által gyártott vegyszerekből készültek. A pontos fémion-koncentrációkat gravimetriásan, oxinát formájában, a savkoncentrációkat pH-potenciometriásan határozták meg. A pH-potenciometriás mérésekhez használt kálium-hidrogén-ftalát, KCl- és KOH-oldatok szilárd vegyszerekből készültek háromszor ioncserélt víz felhasználásával.

A peptidszintézis során alkalmazott vegyszerek:

Szintézishez használt minden vegyszer és oldószer kereskedelmi forrásból származik és további tisztítás nélkül kerültek alkalmazásra. Minden 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) védőcsoportot tartalmazó aminosav (Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Ala-OH és Fmoc-Pro-OH), valamint 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronium-tetrafluoroborát (TBTU) és Rink Amide AM gyanta a Novabiochem-től (Svájc) származik. Peptidszintézis tisztaságú *N,N*-dimetil-formamidot (DMF), *N,N*-diizopropil-etilamint (DIEA), etán-1,2-ditiolt és trifluorecetsavat (TFA) a Merck Kft forgalmazza. *N*-hidroxibenzotriazol (HOBt), *N*-metil-2-pirrolidon (NMP), triizopropil-szilán (TIS), 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol, dietil-éter (Et_2O) és 2-metil-bután-2-ol pedig Sigma-Aldrich termékek. Piperidin, diklórmetán (DCM) és ecetsav (96%) Molar által forgalmazott oldószerek, míg acetonitril (ACN) és ecetsavanhidrid a VWR-től származik.

3.2. Vizsgált ligandumok

A jelen tanulmány során szilárdfázisú peptidszintézissel előállított modell-peptidek szerkezete az 5. ábrán látható.



A munka során vizsgált két természetes és két mutáns prion peptidfragmenset az olaszországi Cataniai Egyetemen (University of Catania) készültek szintén szilárdfázisú peptidszintézissel, amelyek közül a HuPrP(60-114) előállításában és tisztításában én is részt vettem. A peptidfragmensek aminosav-szekvenciái (hárombetűs rövidítésekkel) a következők:

HuPrP(84-114)His85Ala: Ac-ProAlaGlyGlyGlyTrpGlyGlnGlyGlyGlyThr**His**SerGlnTrpAsnLysPro-SerLysProLysThrAsnMetLys**His**MetAlaGly-NH₂

HuPrP(84-114)His96Ala: Ac-Pro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnGlyGlyGlyThrAlaSerGlnTrpAsnLysPro-SerLysProLysThrAsnMetLys**His**MetAlaGly-NH₂

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

HuPrP(60-114): Ac-Pro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnPro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnPro**His**GlyGlyGly-TrpGlyGlnPro**His**GlyGlyGlyTrpGlyGlnGlyGlyGlyThr**His**SerGlnTrpAsnLysProSerLysProLysThr-AsnMetLys**His**MetAlaGly-NH₂.

3.3. Szilárdfázisú peptidszintézis

R.B. Merrifield a szilárdfázisú peptidszintézis-módszer¹⁵⁵ kidolgozásáért 1984-ben Nobel-díjat kapott. A szilárdfázisú peptidszintézis módszereit többféle szempont szerint csoportosíthatjuk. Az alkalmazott technika alapján beszélhetünk lépésenkénti szintézisről vagy fragmenskondenzációról; a kivitelezés módja alapján lehet szakaszos vagy áramló oldatos; valamint a szintetikus eljárás alapján alkalmazhatunk Fmoc/*t*Bu¹⁵⁶ vagy Boc/Bzl¹⁵⁷ stratégiát. Ennél a besorolásnál az első esetben az *N*-terminális aminosavakat 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) csoporttal védjük, míg a másik esetben a védelmét a *t*-butoxi-karbonil (Boc) csoport biztosítja.

A Gyanták. A Merrifield-féle szintézis szilárd, oldhatatlan hordozón, úgynevezett gyantán történik, amely egy finomszemcsés műanyag. A szemcsék felületén és azok belsejében olyan funkciós csoportok vannak, amelyek lehetővé teszik, hogy a szemcsékhez aminosavakat kapcsolhassunk kémiai kötással. 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. A szilárd hordozó szemcsemérete, alakja, homogenitása, duzzadási tulajdonsága és a funkciós csoport kiépítésének lehetősége alapvető jelentőségű a szintézis sikerességének szempontjából. A szilárd hordozónak számos követelménynek kell

megfelelnie. Például tartalmazzon a következő aminosav felkapcsolásához alkalmas funkciós csoportot, viszont ne tartalmazzon a szintézis során zavaró egyéb funkciós csoportokat. Elengedhetetlen, hogy mentes legyen mindenféle szennyezésektől. Valamint a kialakított peptid-gyanta kötés könnyen hasítható legyen a szintézis végeztével, de a szintézis során végig állandó maradjon. Ezen kívül a növekvő peptidláncok a szintézis során az oldószeres és a reagensek számára végig jól hozzáférhetőek legyenek, el kell kerülni a térgátlást. Fontos a jó duzzadásképeség, hiszen a reakciók egy szerves oldószerrel szolvatált térhálós polimer-mátrixban játszódnak le. A gyantának stabilnak kell lennie a fizikai és kémiai behatásokkal szemben a szintézis körülményei között, ne reagáljon reagensekkel, oldószerrel, és az épülő peptidlánccal sem.

A peptidláncvégek kialakítása alapján különböző gyanták vannak forgalomban. Szabad C-terminusú peptidek előállításához alkalmazhatunk Wang¹⁵⁸, 2-klorotritil, illetve CLEAR^{159, 160} (*Cross-Linked Ethoxylate Acrylate Resins*) típusú gyantát, peptidamidok előállítására pedig Rink Amide¹⁶¹ gyantákat.

Az oldallánc-védőcsoportok. 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 alkalmazni, amelyek a szintézis során változatlanok maradnak, de a szintézis befejezése után könnyedén eltávolíthatóak legyenek. A szilárdfázisú peptidszintézisben két meghatározó védőcsoport kombináció közül a legjobban automatizálható a *terc*-butil alapú oldallánc-védőcsoportokkal kiegészített 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) átmeneti α -aminocsoport védelem (Fmoc/*t*Bu)^{162, 163}. Az általunk használt aminosavakat és az alkalmazott oldallánc-védőcsoportokat az 1. táblázat foglalja össze. A feltüntetett aminosavakon kívül glicint, alanint, prolint és metionint használtunk, amelyek nem igényelnek oldalláncvédelmet.

1. Táblázat: A felhasznált, védőcsoporttal rendelkező aminosavak

aminosav			oldalánc funkció	védőcsoport
H	His	hisztidin	imidazolil	tritol (Trt)
S	Ser	szerin	hidroxil	<i>t</i> -butil (<i>t</i> Bu)
T	Thr	treonin	hidroxil	<i>t</i> -butil (<i>t</i> Bu)
K	Lys	lizin	ϵ -amino	<i>t</i> -butil-oxikarbonil (Boc)

A peptidlánc felépítése. Munkánk során a szintéziseket automatizált módon a mikrohullámú Liberty peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) végeztük. Az N-terminuson acilezett, illetve szabad aminosocsoporttal rendelkező modellpeptideket Fmoc/*t*Bu technikával állítottuk elő, ehhez a C-terminuson amid végződést biztosító Rink Amide AM típusú gyantát használtunk, amely 1% divinilbenzollal 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 Rink-amid gyanta Fmoc csoporttal védve kerül forgalomba, ezért erről az első aminosav kapcsolása előtt ezt el kell távolítani. Ennek eltávolítását a készülék 20 % piperidin – 80 % DMF elegyben hajtotta végre 180 másodpercig 80°C-on 30 W teljesítményű mikrohullámú sugárzás segítségével. A soron következő aminosav kapcsolása négyszeres aminosav-felesleg mellett, szintén 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. Ebből a két műveletből álló ciklus addig ismétlődött, míg felépült a kívánt aminosav-szekvencia. Az egyes reakciók után oldószeres mosásokkal és szűrésekkel távolítottuk el a reagensek feleslegét. A módszer ciklikus ismétlődése tette lehetővé annak automatizálását.¹⁶⁴ Az N-terminuson acilezett modellpeptidek esetén utolsó lépés az acetylcsoporthoz való kiépítése. Így az előállított peptidet tartalmazó gyantát, az Fmoc védőcsoport eltávolítása után, a készülék 6 V/V% ecetsavanhidridet és 5 V/V% DIEA-t tartalmazó DMF oldattal kezelte.

A peptidek hasítása gyantáról. A peptid gyantáról való lehasítását szobahőmérsékleten végeztük 94,0 % TFA, 1,0 % 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol, 2,5 % TIS, 2,5 % H₂O elegyével egy óra alatt, amely egyúttal az oldalláncbéli védőcsoportokat is eltávolította a peptidről. Általában a metionintartalmú peptidek esetében, valamint tritilcsoportok jelenlétében a víz mellett etán-ditiolt^{165, 166} vagy 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiolt alkalmaznak. Minden nyers peptidet hideg dietil-éteres kicsapással kaptunk meg. A csapadékot centrifuga segítségével választottuk el, majd hideg dietil-éterrel való mosást követő szárítás után a csapadékot újra feloldottuk, ezúttal vízben, és liofilizáltuk.

A peptidek tisztítása és azonosítása. A peptidlánc előállítása során a kizárólagos tisztítási eljárás a gyanta mosása és szűrése. Mivel esetenként sem a kapcsolási reakció, sem a védőcsoport eltávolítása nem játszódik le teljesen, kis mennyiségben hiányos szekvenciájú, illetve rövidebb peptidek is keletkezhetnek. Ha ez

bekövetkezik, a peptid a szintézis végén, a lehasítás után nem lesz homogén. A hibás peptidek mennyisége csökkenthető, ha a kapcsolási és hasítási reakciók hatásfoka megközelíti a 100 %-ot. Ez a kapcsolási lépés ismétlésével, hosszabb reakcióidővel, vagy a reagensek nagy feleslegének alkalmazásával érhető el.

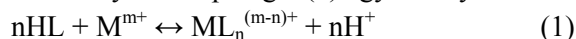
A nyers peptidek tisztaságát fordított fázisú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) technikát alkalmazva ellenőriztük, egy Jasco MD-2010 plus multiwavelength detektorral ellátott Jasco készülék segítségével. Az analízishez analitikai Vydac C₁₈ (300 Å pórusméret, 5 µm részecskeméret) 250×4,6 mm átmérőjű kolonnát 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 amidcsoport, mint kromofórcsoport elnyelését 222 nm hullámhosszon követtük. A jobb elválasztás érdekében a peptidek esetén célszerű gradiens elúciót alkalmazni. Ez azt jelenti, hogy az oldószerösszetétel fokozatosan változik, az eluensben nő a szerves oldószer mennyisége. 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 tizenháromtagú peptid kivételével minden előállított modellpeptidet sikerült tisztán előállítani, amit az ESI-MS analízis is a helyes molekulatömegekkel alátámasztott. Továbbá a potenciometriás vizsgálatok megerősítették a peptidek azonosságát és tisztaságát, amely 94 %-nál nagyobbak adódott minden esetben.

Mivel a hiányos vagy oldallánc-védőcsoportot tartalmazó peptid tulajdonságai csak kis mértékben különböznek a hibátlan peptidtől, a hagyományos szintetikus elválasztási technikák, mint az átkristályosítás vagy kirázás, nem vezet eredményre vagy csak nagyon nehezen kivitelezhető. Ennek következtében a tridekapeptid tisztítása preparatív HPLC segítségével történt. A tisztításhoz félpreparatív Vydac 218TP C₁₈ (300 Å pórusméret, 5 µm részecskeméret) 250×10 mm átmérőjű kolonnát és gradiens elúciót használtunk (3 ml/min áramlási sebesség mellett). Az eluálószer 0,1 % TFA-t tartalmazó víz, illetve 0,1 % TFA-t tartalmazó acetonitril volt. Az elúció során 30 perc alatt az acetonitril-oldat aránya 5 %-ról 15 %-ra nőtt, és 10 percen keresztül 15 % CH₃CN és 85 % víz eleggyel izokratikus elúciót folytattunk. A detektáláshoz az amidcsoport, mint kromofórcsoport elnyelését követtük 222 nm-en.

A természetes és mutáns prion peptidfragmensek szintézise és tisztítása Cataniában (Olaszország) történt.

3.4. pH-potenciometria

A pH-potenciometria az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatára alkalmas módszer. Az alkalmazhatóságának feltétele, hogy a komplexképződés a ligandum protonálódási egyensúlyára hatással legyen, azaz pH-effektussal járjon. A komplexképződés kompetitív reakciót jelent a H^+ -ion és a fémion között, amely az (1) egyenlettel jellemezhető általánosan, a komplexképződés bruttó folyamatát pedig a (2) egyensúllyal lehet leírni:



(M: fémion, H: proton, L: teljesen deprotonált ligandum; p, q, r: sztöchiometriai együtthatók; a részecskék töltését az egyszerűbb kezelhetőség miatt nem tüntettük fel.) A pH-potenciometriás vizsgálatok célja, hogy a képződő komplexek összetételét és stabilitási állandóit meghatározzuk. A komplex részecskék stabilitási szorzatát a (3) egyenlet mutatja:

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

A kísérleti adatokból a fémkomplexekre meghatározott stabilitási szorzatokat a PSEQUAD¹⁶⁷ számítógépes program segítségével számítottuk ki. A térfogat – pH adatpárok mellett bemenő adatként meg kell adnunk a komponensek, valamint az asszociátumok (a ligandum különböző protonáltsági fokú részecskéi, a különböző $M_pH_qL_r$ fémkomplexek, illetve hidroxidokomplexek) számát, azok összetételét az M, H és L komponensekre nézve (p, q, r), és az asszociátumok ismert protonálódási állandóit vagy stabilitási szorzatait. Az ismeretlenek esetében közelítő értékekre van szükség. Ezen kívül meg kell adnunk a komponensek kiindulási teljes koncentrációit, a titráló oldat koncentrációját, a vízionszorzatot és az Irving korrekciós tényezőt, mert a diffúziós potenciál kiküszöbölésére az Irving és munkatársai által kidolgozott módszert alkalmaztuk.¹⁶⁸ A keresett stabilitási szorzatok értékeit a kiindulási komponensekre felírható anyagmérleg-egyenletek (4-6) megoldásai adják.

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

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

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

A kiindulási adatok alapján a program Newton-Raphson iterációval közelíti az ismeretlen stabilitási állandók értékét addig, amíg az ismert koncentrációjú titráló oldatra megadható $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}})^2$ összefüggés értéke eléri a minimumot. A számítási sorozat végén megkapjuk a keresett állandók finomított értékeit és azok hibáit (az adatok megadásakor az utolsó tizedesjegy hibája a zárójelben van feltüntetve). Ezek alapján a program a titrálási görbe minden egyes pontjában kiszámítja az egyes részecskék egyensúlyi koncentrációját és a hozzájuk tartozó standard deviáció értékét. A közelítés jóságát az illesztési paraméter ($|V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}}|$ átlagértéke) fogja megadni. Végül a program egy általunk kiválasztott komponensre vonatkozóan (általában a fémion, de vegyes fémkomplexek esetén a ligandum célszerűbb) a pH függvényében kirajzolja a részecskék koncentráció-eloszlási görbéjét is. Ezt különállóan a SED¹⁶⁹ program Windows alatt futó változata segítségével, a MEDUSA-val is megszerkeszthetjük a kiindulási koncentrációk, valamint az asszociátumok stabilitási szorzatainak ismeretében.

Gyakran használunk úgy nevezett származtatott állandókat a fémkomplexek protonálódási folyamatainak jellemzése során. Ez a stabilitási állandók megfelelő kombinációit jelenti, amelyek lehetővé teszik a különböző ligandumokkal képzett komplexek összehasonlítását. Az imidazolnitrogének koordinálódásával kialakuló makrokelátot tartalmazó komplexek stabilitásának jellemzésére vezettük be a $\log K(M+N_{\text{Im}})$ értéket. Abban az esetben, ha valamennyi oldalláncban megtalálható imidazolgyűrű deprotonált formában van jelen, és koordinálódik, ezen állandók értéke megegyezik az [ML] komplex $\log \beta$ értékével. Azonban ha protonált funkciós csoportot tartalmaz, akkor ezt az értéket a megfelelő protonálódási állandó kivonásával kapjuk. Például lizil-oldallánc jelenlétében a (7) egyenletben feltüntetett reakció stabilitási állandóját a (8) egyenlet szemlélteti:



$$\log K(M+N_{\text{Im}}) = \log \beta(MHL) - pK(\text{Lys}) \quad (8)$$

Minden általunk vizsgált rendszert vizes oldatban tanulmányoztuk. A ligandum-törzsoldatokat szilárd vegyszerek bemérésével készítettük el, ahol a teljes koncentráció 1×10^{-3} - 2×10^{-3} mol/dm³ koncentrációtartományba esett. A ligandum tisztaságát és protonálódási állandóit szintén potenciometriás mérésekkel határoztuk meg. A kiértékeléshez a SUPERQUAD¹⁷⁰ nevű számítógépes szoftver segítségével számítottuk a ligandumok koncentrációját, tisztaságát és a protonálódási állandóit. 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

kizárásának céljából az oldat fölé argongázt vezetünk. A minta kevertetését mágneses keverőtest végezte. A titrálásokat kb. $0,2 \text{ mol/dm}^3$ -es, pontosan ismert koncentrációjú, karbonátmentes, argon alatt tárolt KOH-oldattal végeztük. A mérőoldat koncentrációját szintén ismert koncentrációjú ($0,050 \text{ mol/dm}^3$) kálium-hidrogén-ftalát törzsoldat segítségével határoztuk meg. A minták készítéséhez használt HCl-oldat koncentrációját ($\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$) a már ismert koncentrációjú KOH-oldattal való titrálással határoztuk meg. A koncentrációk meghatározását a titrálási görbék Gran-féle linearizálásával végeztük. A minták állandó ionerősségét $1,0 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú KCl-oldat segítségével állítottuk be $0,2 \text{ mol/dm}^3$ -re. Ez az ionerősség jóval nagyobb, mint a titrálandó oldat fémion- és ligandumkoncentrációjának összege, és megegyezik a mérőoldat koncentrációjával. A fémion-ligandum arányt adott rendszertől függően 1:1 és 4:1 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 üvegelektrodot használtunk. A lúgoldatot $0,5 \text{ cm}^3$ végtérfogatú Hamilton fecskendővel adagoltuk.

Komplexxémiai vizsgálatokban a pH-potenciometria, az általa nyert információk következtében, alapvető fontosságú, azonban vannak hiányosságai. Előfordulhat, hogy egy rendszer több, kémiaiailag reális modellel is közelítőleg egyformán jól leírható, vagy két részecske képződése azonos pH-effektussal jár és ezzel a módszerrel egymástól nem különböztethetők meg. Továbbá a meghatározott stabilitási állandók nem adnak felvilágosítást arról, hogy a képződő komplexekben milyen kötésmód valósul meg, milyen a komplex geometriája. Így az oldategyensúlyi jellemzéshez más, szerkezeti információkat nyújtó vizsgálatok is szükségesek (pl. UV-látható spektrofotometria, cirkuláris dikroizmus, NMR vagy ESR spektroszkópia) a pH-potenciometriás mérések eredményeinek alátámasztásához.

3.5. UV-látható spektrofotometria

A spektrális vizsgálatokat Cu(II)- és Ni(II)-ionokat tartalmazó rendszerekben végeztük $300\text{--}800 \text{ nm}$ hullámhossztartományban. A spektrumokat Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras UV-vis spektrofotométeren vettük fel különböző pH-értékeken, különböző fémion-ligandum arányoknál. A ligandumkoncentráció

1×10^{-3} - 2×10^{-3} mol/dm³ koncentrációtartományba esett. 1,000 cm úthosszú kvarc küvettát használtunk. A felvett spektrumok elemzését a gyártó cég által biztosított szoftverrel végeztük, valamint a kapott adatokat MS Excel táblázatkezelő program segítségével ábrázoltuk.

Az átmenetifém-komplexekben d-d átmenetek játszódnak le. A központi ion d-pályái a ligandumok elektromos terének hatására eltérő energiájúak lesznek, és felhasadnak. A felhasadó d-pályák közötti elektronátmenetek következménye a jellemző fényelnyelés. A spektrumok elemzésével a képződött komplexek szerkezetére, geometriájára, a donorumok számára és kémiai jellegére lehet következtetni. Az említett fémionok komplexeinek spektroszkópiai sajátosságait már széles körben vizsgálták, így az irodalomban számos adat áll rendelkezésünkre.

A réz(II)komplexekre jellemző tetragonálisan torzult oktaéderes térben az ²E_g alap- és ²T_{2g} gerjesztett állapotú energiaszintek négyfelé hasadnak (gyenge és erősterű ligandumok esetén egyaránt, bár különbözőképpen), és az abszorpciós spektrumban az ezek közötti háromféle d-d átmenetnek ($d_{xz}(d_{yz}) \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$; $d_z^2 \rightarrow d_{x^2-y^2}$) kellene megjelennie. Azonban nagyon gyakori az egyetlen sávra való összeolvadásuk. Intenzitásuk nagymértékben függ a rézhez koordinálódó donorumok számától és minőségétől, illetve a pontos térbeli szerkezettől is.

Korábban megfigyelték, hogy csak az ekvatoriális síkban koordinált donorumoknak van nagymértékű hatása az abszorpciós spektrumra. A N-, illetve kisebb mértékben az O-donorumok a rövidebb hullámhosszak tartományába tolják el az abszorpciós maximumot, továbbá megállapították, hogy a donorumok koordinálódásához rendelhető hatás additív. Axiális koordináció hiányában Sigel és Martin által felírt empirikus egyenlet alapján a várható $\lambda_{\max}$ közelítő értéke számolható (9. egyenlet). Spektrofotometriás mérések alapján számos aminosav és peptid jellemző donorumjainak hozzájárulási tényezőit (x_i) adták meg.¹⁴ (n: a $\lambda_{\max}$ értékére hatással lévő (hozzájárulási tényezővel rendelkező) donorumok száma)

$$\lambda_{\max} = \frac{1000}{\sum_{i=1}^n x_i} \quad [\text{nm}] \quad (9)$$

Az alkalmazását azonban az korlátozza, hogy az összefüggés nem veszi figyelembe a kelátgyűrű méretét és a ligandumban jelen lévő, koordinációban nem résztvevő szubsztituenseket.

Komplexeiben a Ni(II)-ion leggyakoribb koordinációs száma 4 és 6. A 6-os koordinációs számú, oktaéderes geometriájú, nagy spinszámú komplexek gyenge terű ligandumokkal képződnek, amelyhez három, a Laporte-szabályban

megfogalmazott tiltás következtében viszonylag kis intenzitású ($\epsilon_{\max} < 30 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) spinmegengedett d-d átmenet tartozik. A három elnyelési sáv a látható (és azzal határos UV/NIR) tartományban található: $^3\text{A}_2 \rightarrow ^3\text{T}_2$ 1430-770 nm, $^3\text{A}_2 \rightarrow ^3\text{T}_1$ (F) 910-500 nm, $^3\text{A}_2 \rightarrow ^3\text{T}_2$ (P) 520-370 nm. Ezeken kívül létezik egy még kisebb intenzitású, spin tiltott ($^3\text{A}_2 \rightarrow ^1\text{E}$) átmenet is, amely általában csak vállként jelenik meg valamelyik csúcson. A 4-es koordinációs számú, tetraéderez Ni(II)-komplexek spektrumában már nagyobb intenzitású ($\epsilon_{\max} \sim 100 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sávok találhatók az 500-900 nm hullámhossztartományban. A szintén 4-es koordinációs számú, síknégyszetes térbeli szerkezetű, kis spinszámú komplexek gyakran képződnek, különösen erős terű ligandumok (pl. peptidek amidnitrogénje) esetén. Ezek a komplexek 400-550 nm körüli elnyelési sávval rendelkeznek, amelyek nagy intenzitásúak ($\epsilon_{\max} \sim 50\text{-}500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Mindemellett egy második, még intenzívebb sáv található 430 nm alatt, amely gyakran töltésátviteli eredetű.^{1, 171}

3.6. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia¹⁷² a polarizált fény és egy optikailag aktív anyag kölcsönhatásán alapul. A síkban polarizált fény egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált fénysugár összegének tekinthető, amelyek azonos fázisban vannak és amplitúdójuk megegyezik. Az optikailag aktív anyagok különböző abszorpciós (extinkciós) koefficiensekkel és törésmutatóval rendelkeznek a kétféle cirkulárisan polarizált fénysugárral szemben, így abszorpciós különbség mutatkozik, ami elliptikusan polarizált kilépő fényt eredményez. (Az abszorpcióban mutatkozó különbség a teljes abszorpciónak csupán kb 1 %-a.)

A cirkuláris dikroizmus (CD) görbét úgy kapjuk, hogy a kétféle fénysugár abszorpciós különbségét ($\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$) mérjük a hullámhossz függvényében. Tulajdonképpen a cirkuláris dikroizmus (más néven Cotton-effektus) a síkban polarizált fény két összetevőjének különböző abszorpciója. A CD görbe maximumai és minimumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz közel jelentkeznek, valamint viszonylag keskeny Gauss-görbék, ellentétben az elektrongerjesztési spektrummal. Csak azoknak a molekuláknak van CD spektrumuk, amelyek optikailag aktívak, azaz nem tartalmazznak másodrendű szimmetriaelemet.

A fémkomplexek optikai aktivitása származhat a komplex molekula aszimmetriájától, vagy a ligandum saját aszimmetriájától. Ezt az optikai aktivitását

okozhatja egyrészt a központi atom körüli aszimmetrikus elrendeződés, másrészt a komplexképződés hatására a ligandum donoratomján kialakuló aszimmetria. Ha a komplex optikai aktivitása a komplexképződés alatt alakul ki, akkor a komplexképződéssel a két enantiomer racém elegyét kapjuk, amelyekhez azonos értékű, de ellentétes előjelű Cotton-effektus tartozik, így kioltják egymást. Ezeket az enantiomereket csak kinetikailag inert komplexek esetében lehet elválasztani és vizsgálni.

A Ni(II)- és Cu(II)-peptidkomplexeinek vizsgálatára széleskörűen alkalmazott szerkezetvizsgálati módszer a CD spektroszkópia.^{173, 174}

Egyszerű di- és tripeptidkomplex CD spektroszkópiás tanulmányozása során kapott eredményeket és az ezekből levonható következtetéseket Sigel és Martin foglalta össze.¹⁴ A hexadekán-szabályt¹⁷⁵ is figyelembe véve megállapították, hogy egy XYZ tripeptid fémkomplexének Cotton-effektusa adott hullámhosszon a következőképpen számítható (G glicint jelöl):

$$\Delta\epsilon_{\lambda}^{XYZ} = \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GYG} + \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGZ} \quad (10)$$

Továbbá a komplexekben azonos kémiai minőségű, de különböző pozícióban lévő optikailag aktív csoportok különböző nagyságú Cotton-effektust eredményeznek: $\Delta\epsilon_{\lambda}^{GXG} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGX} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG}$. Ez magyarázható azzal, hogy a központi fémionhoz, mint kromoforcsoporthoz kapcsolódó különböző donorcsoportok nem azonos hatásfokkal továbbítják a királis információt. Hatásuk aminonitrogén < karboxilátotigén < amidnitrogén sorrendben növekszik. Továbbá minél távolabb van egy kiralitáscentrum a kromoforcsoporttól, annál gyengébb effektust eredményez.

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. A kiértékeléshez a gyártó által biztosított szoftvert használtuk, a spektrumok ábrázolásához pedig a MS Excel táblázatkezelő programot.

3.7. Rezonancia spektroszkópia

¹H NMR spektroszkópia

Az általunk szintetizált ligandumok tisztaságát ¹H NMR mérésekkel is ellenőriztük, valamint felvettük a szabad ligandumok spektrumait különböző pH-értékeken. Az általunk vizsgált komplexek közül egyes Ni(II)- és Zn(II)-

komplexek körében végeztünk ^1H magmágneses-rezonancia méréseket is. A síknégyzetes nikkell(II)komplexek minden esetben diamágnesesek a d-pályák nagymértékű felhasadása miatt. Az NMR időskálájához viszonyítva ezekben a komplexekben a ligandumcsere sebessége többnyire lassú, ami azt eredményezi, hogy a szabad és a koordinált ligandum jelei különböző kémiai eltolódás (δ) értékeknél jelennek meg. A kémiai eltolódás értékének változása (a szabad liganduméhoz viszonyítva), a jelek száma és felhasadása információt szolgáltat a komplexek koordinációs módjáról. A cink(II)komplexek esetében a gyors ligandumcsere miatt sokszor az egyes asszociátumok jelei nem különülnek el. Mivel e komplexek vizsgálatára a spektrofotometria és a CD spektroszkópia nem alkalmazható, néhány esetben informatív lehet a ^1H NMR.

Méréseinkhez 99,8%-os izotóptisztaságú D_2O -t (ISOTEC Inc.) használtunk oldószerként. A minták koncentrációja a rendelkezésünkre álló ligandum mennyiségétől függött, ligandumra nézve 0,01-0,002 mol/dm³ koncentrációjúak, a fém-ligandum arány 1:2 volt. Az oldatok pH-ját NaOD és DCl vagy DNO_3 oldatok segítségével állítottuk be, belső standardként nátrium-2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonátot (DSS) használtunk. A mérések során vizes oldatbeli pufferre kalibrált elektróddal felszerelt pH-mérő által kijelzett értékek a D_2O -oldatokban pH*-értékeknek felelnek meg, amelyeket a Gross-Butler-Purlée egyenlet¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ (11. egyenlet) segítségével tudjuk átszámolni a pD-skálára:

$$\text{pD} = \text{pH}^* + 0,44 \quad (11)$$

Az ^1H NMR spektrumokat Bruker AM 360 MHz FT-NMR készüléken vettük fel, a kiértékeléshez pedig az 1D WIN-NMR Bruker szoftvert használtuk.

ESR spektroszkópia

A párosítatlan elektront tartalmazó, azaz paramágneses részecskék tanulmányozására alkalmas módszer az elektronspin-rezonancia spektroszkópia (ESR), amelyet elektron paramágneses rezonanciának (EPR) is neveznek. Az általunk vizsgált tetragonálisan torzult oktaéderes Cu(II)-komplexek is paramágneses sajátosságúak. Az ESR spektrális paramétereket ($g_{\parallel}$, $A_{\parallel}$) összevetve már ismert szerkezetű komplexek paramétereivel, következtethetünk a fémion körül kialakuló koordinációs módra, a koordinálódó donoratomok kémiai minőségére, valamint az esetleges térbeli szerkezet változásaira.

Az ESR méréseket olaszországi Sassari Egyetemen a kutatócsoportunkkal szakmai együttműködésben álló bioszervetlen kutatócsoport tagjai végezték. HP53150A mikrohullámú frekvencia számlálóval felszerelt Bruker EMX

A prion fehérje peptidfragmenseinek fémion-szelektivitása

spektrométer segítségével vették fel az ESR spektrumokat 120 K-re lefagyasztott mintákban, különböző pH-kon és különböző fémion-ligandum arányoknál. A mérésekhez használt fémtörzsoldat $^{63}\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ -ot tartalmazott.

4. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1. A prion peptidfragmensek komplexképződési folyamatai

Az értekezésben tárgyalt három prion peptidfragmens (HuPrP(84-114)H85A, HuPrP(84-114)H96A és a HuPrP(76-114)) sav-bázis tulajdonságait és réz(II)komplexeit kutatócsoportunkban korábban már jellemezték.^{148, 149} A 2. táblázatban tájékoztatólag tüntettük fel a három peptid protonálódási állandóit.

2. táblázat: A HuPrP(84-114)H85A,¹⁴⁸ HuPrP(84-114)H96A¹⁴⁸ és a HuPrP(76-114)¹⁴⁹ prion peptidfragmensek protonálódási állandói ($\log\beta$), $I = 0,2 \text{ mol/dm}^3$ (KCl), $T = 25^\circ\text{C}$

	HuPrP(84-114)H85A	HuPrP(84-114)H96A	HuPrP(76-114)
$[\text{HL}]^+$	10,65	10,65	11,16
$[\text{H}_2\text{L}]^{2+}$	21,06	21,01	21,59
$[\text{H}_3\text{L}]^{3+}$	31,04	30,99	31,57
$[\text{H}_4\text{L}]^{4+}$	40,35	40,32	40,71
$[\text{H}_5\text{L}]^{5+}$	46,94	46,87	47,67
$[\text{H}_6\text{L}]^{6+}$	52,72	52,64	54,05
$[\text{H}_7\text{L}]^{7+}$	-	-	60,07
$[\text{H}_8\text{L}]^{8+}$	-	-	65,43
$\text{pK}(\text{His})_{\text{átlag}}$	6,19	6,16	6,18
$\text{pK}(\text{Lys})_{\text{átlag}}$	10,09	10,08	10,18

4.1.1. A prion peptidfragmensek nikkel(II)komplxei

4.1.1.1. A két hisztidint tartalmazó prionfragmensek nikkel(II)komplexei

A két hisztidint tartalmazó HuPrP(84-114)H85A és HuPrP(84-114)H96A peptidek a prion fehérjének olyan mutáns részletei, ahol három hisztidinből egyet alanin helyettesít. A HuPrP(84-114)H85A esetében a H85 helyett van alanin, így ez az oligopeptid a két oktarepeat tartományon kívüli H96-t és H111-t tartalmazza. A HuPrP(84-114)H96A azonban a H85-t és a H111-t, azaz mindkét tartományból tartalmaz hisztidint. Ennek megfelelően a komplexképződésben is vannak különbségek. Ez a mutáció kiváló lehetőséget nyújt a különböző tartományokból származó hisztidinek koordinációs kémiai összehasonlítására. Potenciometriás titrálással meghatároztuk mindkét 31 aminosavegységet tartalmazó oligopeptid protonálódási állandóit, amely értékek jó egyezést mutatnak a korábban már közölt

adatokkal. 1:1 és 2:1 nikkellion-ligandum arányú rendszerek pH-potenciometriás titrálásával meghatározott Ni(II)-komplexek stabilitási állandóit a 3. táblázatba gyűjtöttük össze.

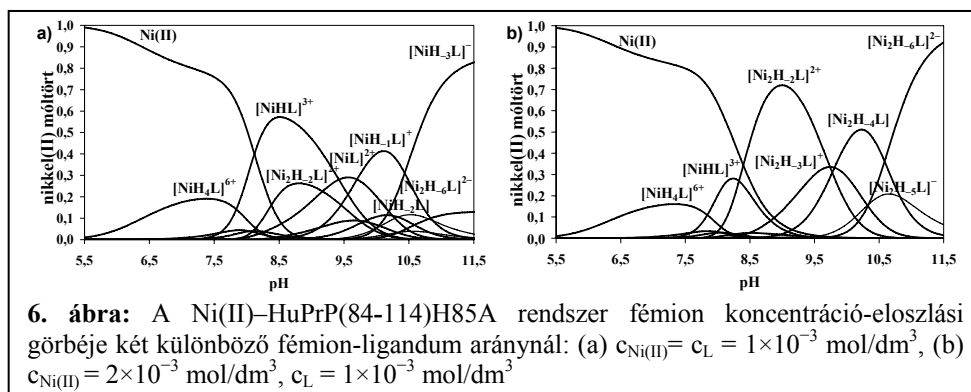
3. Táblázat: A HuPrP(84-114)H85A és a HuPrP(84-114)H96A prionfragmensek Ni(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\log\beta$), $I = 0,2 \text{ mol/dm}^3$ (KCl), $T = 25^\circ\text{C}$ (a zárójelben lévő értékek a standard deviációt mutatják)

	HuPrP(84-114)H85A	HuPrP(84-114)H96A
$[\text{NiH}_4\text{L}]^{6+}$	42,68(4)	42,76(2)
$[\text{NiH}_3\text{L}]^{5+}$	34,33(17)	34,53(4)
$[\text{NiH}_2\text{L}]^{4+}$	26,28(20)	26,08(5)
$[\text{NiHL}]^{3+}$	19,16(2)	18,46(5)
$[\text{NiL}]^{2+}$	9,74(3)	9,07(2)
$[\text{NiH}_{-1}\text{L}]^+$	0,04(2)	-0,89(2)
$[\text{NiH}_{-2}\text{L}]$	-10,83(6)	-11,37(2)
$[\text{NiH}_{-3}\text{L}]^-$	-20,83(2)	-21,93(2)
$[\text{Ni}_2\text{H}_{-2}\text{L}]^{2+}$	-3,16(2)	-
$[\text{Ni}_2\text{H}_{-3}\text{L}]^+$	-12,91(3)	-
$[\text{Ni}_2\text{H}_{-4}\text{L}]$	-22,72(3)	-
$[\text{Ni}_2\text{H}_{-5}\text{L}]^-$	-33,55(7)	-
$[\text{Ni}_2\text{H}_{-6}\text{L}]^{2-}$	-43,89(2)	-
$\log K(\text{Ni}+\text{N}_{\text{Im}})$	2,33	2,44

A Ni(II)–HuPrP(84-114)H85A rendszer titrálása során az oldat mindkét arányú rendszer esetén valamivel pH 8,0 alatt sárgulni kezdett, tehát itt indul meg az amidnitrogének deprotonálódása és ezzel együtt a síknégyzetes komplexek kialakulása. Ez extra lúgfogyasztást eredményezett. Tehát ennek megfelelően ez a ligandum képes két ekvivalens Ni(II)-iont oldatban tartani erősen lúgos körülmények között is. A Ni(II)–HuPrP(84-114)H96A rendszer titrálása során 1:1 fémion-ligandum aránynál szintén valamivel pH 8,0 alatt sárgulni kezdett az oldat, itt kezdődött el az amidnitrogének deprotonálódása, és ezzel együtt a síknégyzetes komplexek kialakulása. Ez extra lúgfogyasztást eredményezett. 2:1 fémion-ligandum arány esetén is megjelent a sárga szín, azonban 8-as pH-tól már csapadék jelent meg az oldatban. Ez arra utal, hogy a fémion hidrolizál, a ligandum csak egy

ekvivalens Ni(II)-iont képes komplexek formájában oldatban tartani. Ennek lehetséges oka az, hogy az oktarepeat tartománybeli hisztidinek affinitása a Ni(II)-ionok felé jóval kisebb, mint a tartományon kívülieké.

A fémion koncentráció-eloszlását a 6. ábra szemlélteti a Ni(II)–HuPrP(84-114)H85A rendszer példáján, két különböző fémion-ligandum arány esetén. A másik rendszer (Ni(II)–HuPrP(84-114)H96A) koncentráció eloszlási görbéje is hasonló, azzal az eltéréssel, hogy csak egymagvú komplexek képződésével tudtuk a rendszert modellezni. A komplexképződés pH 6,0 körül kezdődik, és a spektroszkópiás adatok (7. ábra) is alátámasztják, hogy az imidazolnitrogén donoratomok a kizárólagos fémion-kötőhelyek ezen a pH-n. Az ekkor megjelenő részecskének a sztöchiometriája $[\text{NiH}_4\text{L}]^{6+}$, a stabilitási állandóját $[\log K(\text{Ni}+\text{N}_{\text{Im}})]$ a $\text{Ni(II)} + \text{H}_4\text{L}$ reakcióra számolhatjuk, ami a 3. táblázat utolsó sorában van feltüntetve mindkét peptidre. Ezek a $\log K$ -értékek nem nagyobbak annál, amit az egy imidazolil-oldalláncot tartalmazó monodentát koordinációra közöltek ($\log K = 2,48$).^{130, 146} A két imidazolil-oldallánc jelenléte makrokelát szerkezet képződését eredményezheti, de a kis stabilitási állandó azt sugallja, hogy a $\text{Ni(II)}+2\text{N}_{\text{Im}}$ és a $\text{Ni(II)}+\text{N}_{\text{Im}}$ tartalmú komplexek aránya az utóbbi felé van eltolva. Ez utalhat arra, hogy a makrokelátok nagy tagszámú gyűrűinek képződése kevésbé kedvezményezett Ni(II)-ion esetén, mint Cu(II)- és Zn(II)-ion esetében.⁵²

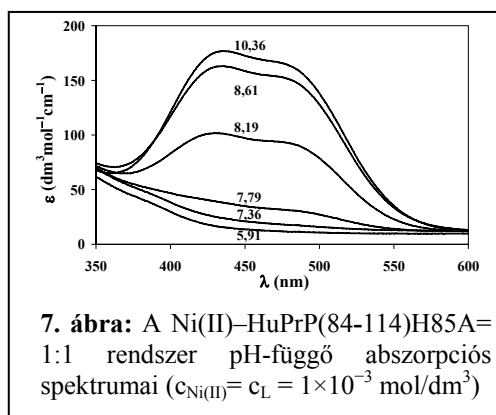


A HuPrP(84-114)H85A és HuPrP(84-114)H96A ligandumok makrokelát szerkezetű komplexeire számolható kis stabilitási állandók különböző tényezők együttes hatásával magyarázhatók, úgymint (1) a $[\text{NiH}_4\text{L}]^{6+}$ részecske nagy pozitív töltésével, (2) az atomok számának növekedésével a lehetséges makrokelátokban (31 aminosavrész), (3) a nem-koordinálódó oldalláncok jelenlétével, valamint

valószínűleg a (4) két N_{Im} nem elegendő a nagy molekula rögzítéséhez. Ezen komplexeknek csak a nagyon kis intenzitású abszorpciós és CD spektruma rögzíthető, amely alátámasztja a várakozást, miszerint azok a Ni(II)-peptidkomplexek, amelyekben a Ni(II)-ion imidazolil-oldalláncokhoz koordinálódik, és oktaéderes szerkezetűek.

Egy extra bázist fogyasztó folyamat kezdődik 7,5-8,0-as pH felett, amellyel együtt jár a jellegzetes sárga szín megjelenése. Hasonlóan más Ni(II)-peptidkomplexekhez, ez arra utal, hogy az imidazolnitrogénnel keláthelyzetben lévő peptidkötés amidnitrogénje deprotonálódik és koordinálódik a fémionhoz síknégyszetes szerkezetű diamágneses Ni(II)-komplexet eredményezve. A 6. ábrán lévő koncentráció-eloszlási görbén látható, hogy $[NiH_4L]^{6+}$ és $[NiHL]^{3+}$ a fő részecskék pH 9,0 alatt, amikor a nem-koordinálódó lizinek ammóniumcsoportjai még protonált formában vannak jelen. A három amidnitrogén deprotonálódása és a fémionhoz történő koordinációja kooperatív módon játszódik le, és $(3N^-, N_{Im})$ koordinációs mód alakul ki. A 2N-es és 3N-es komplexek ($[NiH_3L]^{5+}$ és $[NiH_2L]^{4+}$) elhanyagolható koncentrációban vannak jelen.

A Ni(II)–HuPrP(84-114)H85A rendszer abszorpciós spektrumainak változását szemlélteti a 7. ábra. Két egymást átfedő abszorpciós sáv jelenik meg 430 és 490 nm-nél, amely a minták sárga színével együtt a síknégyszetes nikkell(II)komplexek képződésére utal. A pH-függő spektrumok egyetlen koordinációs mód jelenlétét támasztják alá pH 7,0 és 10,0 között, ami egyezésben van a



$[NiHL]^{3+}$ részecske uralkodó jelenlétével és a $[NiH_4L]^{6+}$ makrokelát kis intenzitású spektrumával. A pH növekedése pH 10,0 felett nem eredményez spektrumbeli változást, az ekkor bekövetkező deprotonálódások a négy lizin ϵ -ammóniumcsoportjához rendelkezhetőek, aminek következtében a $[NiHL]^{3+}$ -tól $[NiH_{-3}L]^-$ -ig keletkeznek részecskék változatlan ($N_{Im}, 3N^-$) kötésmóddal.

Csak a Ni(II)–HuPrP(84-114)H85A rendszer esetén van lehetőség stabilis kétmagvú komplexek képződésére pH 8,5 felett. Különböző sztöchiometriájú kétmagvú komplexek képződnek $[Ni_2H_{-2}L]^{2+}$ -tól $[Ni_2H_{-6}L]^{2-}$ -ig. Az abszorpciós (7. ábra) és a CD spektrumok pH-függése nem mutat változást pH 9,5 felett, ami arra

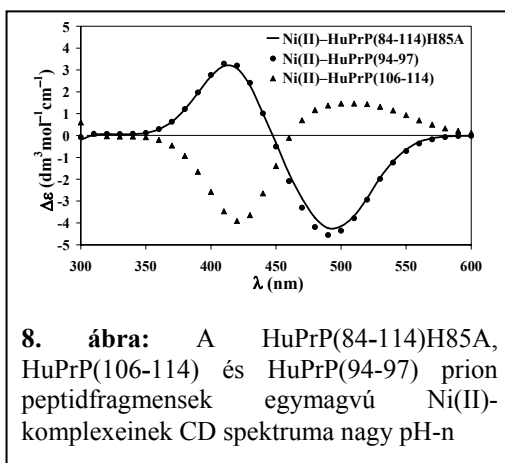
utal, hogy az utolsó négy deprotonálódási reakció a lizil-oldallánc aminocsoportjához rendelhető, és így a $[\text{Ni}_2\text{H}_{-2}\text{L}]^{2+}$ sztöchiometria tulajdonképpen $[(\text{Ni}_2\text{H}_{-6}\text{L})\text{H}_4]^{2+}$ összetételnek felel meg. A kétmagvú komplexek jelenléte ekvimoláris oldatban nem meglepő, és hasonló megállapításokat már korábban a rendszer Cu(II)-komplexeire is közöltek. Ez a tapasztalat a fémion ekvivalens kötőhelyek közötti statisztikus megoszlásával magyarázható.^{148, 149} Általában a kétmagvú komplexek teljes koncentrációja 20-30 % körül van, ami kevesebb, mint statisztikus esetben (50 %), de hasonló arány figyelhető meg réz(II)komplexek esetén is.¹⁴⁸

4. Táblázat: A prion fehérje mutáns peptidfragmensei esetében képződő 4N-es Ni(II)-komplexeinek spektrális paraméterei

Ligandum	Részecske	UV-vis (λ_{max} / ϵ)	CD (λ_{max} / $\Delta\epsilon$)
		[(nm)/(dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)]	[(nm)/(dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)]
HuPrP(84-114)H85A	$[\text{NiH}_3\text{L}]^-$	435/172	412/+3,21
		480/160 (váll)	492/-4,26
	$[\text{Ni}_2\text{H}_6\text{L}]^{2-}$	435/190	405/+0,80
		485/164 (váll)	492/1,93
HuPrP(84-114)H96A	$[\text{NiH}_3\text{L}]^-$	440/158	420/-2,35
			505/+1,02

A Ni(II)–HuPrP(84-114)H96A rendszerben fémionfelesleg mellett $\text{Ni}(\text{OH})_2$ csapadék jelenik meg pH 8,0 felett, amely ellehetetleníti a kétmagvú komplexek stabilitási állandóinak számolását, viszont a spektrális változások arra utalnak, hogy erősen lúgos körülmények között ezek a folyamatok is bekövetkeznek, így lehetőség nyílt a teljesen deprotonált komplexek spektrális paramétereinek számolására. A képződő 4N-es Ni(II)-komplexek spektrális paramétereit a 4. táblázatba gyűjtöttük össze. Mivel a HuPrP(84-114)H85A peptid két fémionkötőhelyet tartalmaz, lehetőség van amidkötésű $[\text{NiH}_3\text{L}]^-$ koordinációs izomerek keletkezésére. Abban az esetben, ha a H96 és H111 teljesen ekvivalens kötőhelyek, két különböző fémion-ligandum aránynál felvett abszorpciós és/vagy a CD spektrumok intenzitásának csak a teljes fémion-koncentrációtól kellene függnie. A 4N-es Ni(II)-komplexek abszorpciós spektrumai meglehetősen hasonlóak, viszonylag széles intenzív sávot mutatnak 400 és 500 nm között. Tehát a látható abszorpciós spektrum fémion-koncentráció és pH-függése nem eléggé érzékeny a koordinációs izomerek meghatározására. Azonban az 1:1 és 2:1 arányú

minták CD spektruma különbözik, ami arra enged következtetni, hogy a két kötőhely nem ekvivalens. Az 1:1 arány CD spektruma kifejezhető az egy- és a kétmagvú komplexek spektrumainak szuperpozíciójából. Ebben az esetben számításba kell venni az eloszlásgörbét (6. ábra) és a kétmagvú komplex spektrumát is, hogy a valódi egymagvú komplex CD spektrumát kapjuk meg. Ezek a spektrumok a 8. ábrán együtt láthatók az egy hisztidint tartalmazó fragmensek Ni(II)-komplexeinek spektrumával. A HuPrP(94-97) (Ac-GlyThrHisSer-NH₂) tetrapeptid a H96 körüli koordinációs helyeket modellezi, míg a HuPrP(106-114) (Ac-LysThrAsnMetLysHisMetAlaGly-NH₂) nonapeptid a H111 körülit. Ezen



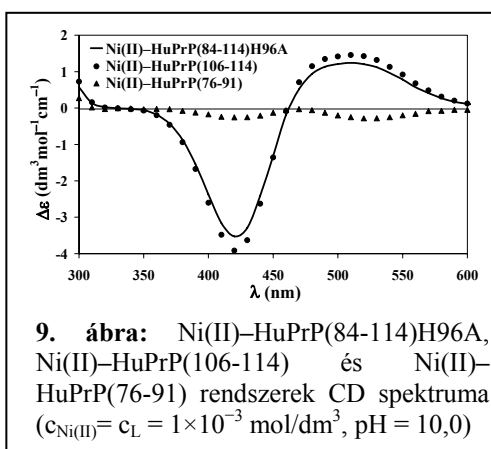
8. ábra: A HuPrP(84-114)H85A, HuPrP(106-114) és HuPrP(94-97) prion peptidfragmensek egymagvú Ni(II)-komplexeinek CD spektruma nagy pH-n

komplexek stabilitási állandóit nem lehetséges meghatározni pH-metriásan a pH 8,0 körül képződő nikkell(II)-hidroxid csapadék miatt. Ugyanakkor ez a csapadék további extra lúg hatására visszaoldódik, és a 4N-es komplexek UV-látható és CD spektrumai felvehetők. A H96-t és H111-t modellező tetra-, illetve nonapeptid CD spektruma teljesen különböző, így alkalmazható H96-ot és H111-et tartalmazó mutáns koordinációs izomereinek

meghatározására. Hasonló modellpeptidek spektrumáról Viles és munkatársai is ugyanezt közölték.¹³⁹ A 8. ábrán látható Ni(II)-HuPrP(84-114)H85A = 1:1 rendszerben képződő egymagvú komplexeinek spektruma nagyon hasonló a HuPrP(94-97) rendszeréhez. Ez alátámasztja azt, hogy a Ni(II)-ionok számára a H96 a preferált kötőhely. Az egymagvú komplexek spektrumának matematikai kiértékelése lehetővé tette a koordinációs izomerek arányának a becslését, és a következő értéket kaptuk a HuPrP(84-114)H85A ligandumra: H96:H111 = 98:2. Ez az eredmény ellentéte annak, amit réz(II)ionok esetén megállapítottak. Abban az esetben, ha mind a két kötőhely (H111 és H96) rendelkezésre áll, a réz(II)ionok nagyobb mértékben koordinálnak a 111-es hisztidinhez.^{148, 149}

A Ni(II)-HuPrP(84-114)H96A = 1:1 rendszer pH-függő CD spektrumán 420 nm-nél egy negatív és 505 nm-nél egy pozitív csúcs jelenik meg (4. táblázat). Ezek helyzete a pH emelésével nem változik, csak a sávok intenzitása nő kb. pH 9,5-ig. A nikkell(II)-HuPrP(84-114)H85A = 1:1 rendszer spektrális

paramétereivel összehasonlítva, szembeötlő a két rendszer CD aktivitásának különbsége. Ahol az egyik esetben pozitív csúcsot észlelünk, azon a helyen a másik rendszer spektrumában negatív csúcs található. Azaz tükörképei egymásnak. Mivel a Ni(II)-ion különböző hisztidinekhez való koordinációjakor felvehető CD spektrumok jelentősen eltérnek egymástól, ebben az esetben is alkalmas összehasonlító vizsgálatok elvégzésére. A Ni(II)–HuPrP(84-114)H96A rendszer CD spektrumának lefutása 10,0-es pH-értéken pontosan olyan, mint a nonapeptid Ni(II)-komplexeié, ami alátámasztja a H111 kötőhely uralkodó jellegét az oktarepeat tartománybeli H85-hez képest (9. ábra). Az oktarepeatbeli hisztidinhez kötődő Ni(II)-ionok esetén is ezen a helyen tapasztalunk elnyelést, de ez csak nagyon nagy pH-értéken (>11,5) számottevő mértékű.

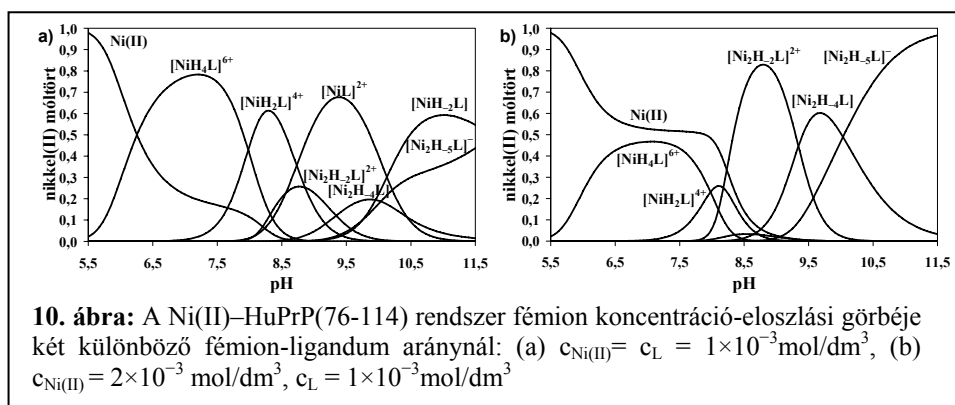


4.1.1.2. A négy hisztidint tartalmazó prion fragmensek nikkel(II)komplexei

A peptid protonálódási állandóira kapott értékek jó egyezésben voltak a réz(II)komplexeik vizsgálatokor már korábban közölt állandókkal.¹⁴⁹ Azt találták, hogy a ligandum négy ekvivalensnyi réz(II)iont képes megkötni egy-, két-, három- és négymagvú komplexek formájában. Ennek megfelelően a potenciometrikus titrálásokat a Ni(II)–HuPrP(76-114) rendszer esetében is négy különböző fémion-ligandum aránynál végeztük 1:1 és 4:1 között. Azonban 3:1 és 4:1 arány esetében nikkel(II)-hidroxid csapadék volt megfigyelhető pH 8,0 felett, amely pH 12,0 alatt nem is oldódott vissza teljes mértékben. Ennek következtében a rendszer egyensúlyi elemzése a homogén 1:1 és 2:1 arányú mintákra korlátozódott. A képződő Ni(II)-komplexeire kapott stabilitási állandók az 5. táblázatban találhatóak, illetve a koncentráció-eloszlási görbéket a 10. ábra szemlélteti 1:1 és 2:1 nikkel(II)ion-ligandum arány esetén.

5. Táblázat: A HuPrP(76-114) prionfragmens Ni(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)

HuPrP(76-114)	
$[\text{NiH}_4\text{L}]^{6+}$	44,80(5)
$[\text{NiH}_2\text{L}]^{4+}$	28,84(6)
$[\text{NiL}]^{2+}$	11,38(6)
$[\text{NiH}_2\text{L}]$	-8,88(6)
$[\text{Ni}_2\text{H}_{-2}\text{L}]^{2+}$	-1,50(6)
$[\text{Ni}_2\text{H}_{-4}\text{L}]$	-20,18(4)
$[\text{Ni}_2\text{H}_{-5}\text{L}]^-$	-30,32(5)
$\log K(\text{Ni}+\text{N}_{\text{Im}})$	4,09



Összehasonlítva a 6. és a 10. ábrát, nagyobb fémion-megkötőképesség mutatkozik HuPrP(76-114) esetén, mint a két hisztidint tartalmazó fragmenseknél. Az abszorpciós és CD spektrumok alapján a síknégyszetes Ni(II)-komplexek pH 7,0-ig nincsenek jelen, és a $[\text{NiH}_4\text{L}]^{6+}$ részecske oktaéderes komplex, amelyben a Ni(II)-ion a hisztidin imidazolil-oldallánca által koordinált makrokelát formájában található. A lizil-oldalláncok pK-értékeit figyelembe véve, amelyek ebben a pH-tartományban protonáltak, a $\text{Ni(II)} + \text{H}_4\text{L}$ reakcióra kapható $\log K$ -érték 4,09 (5. táblázat). Ez az érték jelentősen nagyobb a két hisztidint tartalmazó peptidek esetén számolt értékeknél (3. táblázat). Mivel itt összesen négy imidazolnitrogén áll rendelkezésre a makrokelát kialakulásához, ez lehet a magyarázata, hogy a HuPrP(76-114) peptid képes megkötni a Ni(II)-ionok kb.

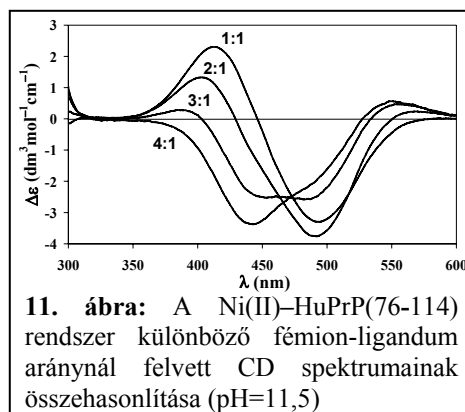
80 %-át 10^{-3} mol/dm³ koncentrációjú oldatban pH 7,0 körül. Azt is érdemes megjegyezni, hogy a számolt logK-érték sokkal kisebb, mint a réz(II)-, illetve cink(II)komplex esetében (8,84, illetve 5,58).⁵² Ezek az adatok arra utalnak, hogy a szabályos oktaéderez szerkezetű Ni(II)-ionoknak csökkent hajlamuk van a makrokelát képződésre.

pH 7,0 felett minden fémion-ligandum aránynál extra bázist fogyasztó folyamat kezdődik, és ez jelentős spektrális változással jár együtt, amely a síknégyzetes geometriájú diamágneses Ni(II)-komplexek képződésére jellemző. Ez a változás 10-es pH-ra 1:1 és 2:1 arányú nikkell(II)-peptid rendszereknél befejeződik, ami arra utal, hogy az amidnitrogének által koordinált komplexek képződése 7,0 és 10,0 közötti pH-tartományban zajlik, és a további deprotonálódási reakciók a lizinek ammóniumcsoportjaihoz tartoznak. Másrésztől meglepő, hogy az egymagvú komplexek esetén néhány részecske stabilitási állandója nem számolható (pl. $[\text{NiHL}]^{3+}$ és $[\text{NiH}_2\text{L}]^{4+}$). Ez lehet annak az eredménye is, hogy az amidcsoportok és a lizin ammóniumcsoportok deprotonálódása nagyban átfednek egymással, és a kétmagvú komplexek képződése is ebben a pH-tartományban következik be. Ezek a hiányzó részecskék jelen lehetnek a rendszerben, de túl kis koncentrációban ahhoz, hogy klasszikus analitikai módszerekkel detektáljuk. A nagy koncentrációban jelenlevő $[\text{NiH}_2\text{L}]^{4+}$ egymagvú komplex koncentráció-maximuma pH 8,0-8,5 körül van. Itt a ($\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációs mód kialakulása feltételezhető két hisztidin részvételével. Ez is egy 4N-es komplex, de csak szűk pH-tartományban létezik, mert pH 9,0 felett a makrokelátban résztvevő imidazolnitrogén az öttagú kelátgyűrűben egy harmadik amidnitrogénnel helyettesítődik. 1:1 fémion-ligandum arány esetében pH 9,5 körül $[\text{NiL}]^{2+}$ az uralkodó részecske, amelynél figyelembe véve a minta spektrumait, és az első lizin viszonylag kis pK-értékét, a valódi sztöchiometria a következőképpen adható meg: $[(\text{NiH}_3\text{L})\text{H}_3]^{2+}$, ahol ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötés mód valósul meg és három lizil-oldallánc még protonálva van.

A 10. ábrán látható, hogy a kétmagvú komplexek is jelen vannak ekvimoláris oldatban viszonylag kis koncentrációban. Azt már korábban tárgyaltuk, hogy több kötőhely együttes jelenléte eredményezheti a többmagvú komplexek képződését; ahogyan azt a két hisztidint tartalmazó peptideknél is megállapítottuk, valamint a megfelelő réz(II)komplexekre korábban közölték.¹⁴⁹ A koncentráció-eloszlási görbékből világosan látszik, hogy kétmagvú komplexek csak pH 8,0 felett képződnek, ahol az imidazolil-oldalláncot is független fémionkötőhelyként kell tekinteni, és a mellette lévő amidcsoport is részt vesz a fémion koordinálásában.

9-es pH-értéknél a fő részecske sztöchiometriája: $[\text{Ni}_2\text{H}_2\text{L}]$, ami $(3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ kötismódot foglal magába, azonban a valódi sztöchiometriája: $[(\text{Ni}_2\text{H}_{-6}\text{L})\text{H}_4]$. A spektrális adatok összhangban vannak ezzel a megállapítással, mivel pH 9,0 felett nem tapasztalható változás.

Az egyensúlyi vizsgálatok nem teszik lehetővé a rendelkezésre álló hisztidil-oldalláncok megkülönböztetését. A cirkuláris dikroizmus spektroszkópia alkalmas technika a prion fehérje független kötőhelyeinek tisztázására a Cu(II) - és Ni(II) -komplexekben.^{139, 141} A CD spektrumok fémion- és pH-függésének kiértékelése, valamint összehasonlításuk a kis peptidmodellekével, amelyek csak egy hisztidint tartalmaznak, lehetővé teszi a hisztidinek megkülönböztetését. A pH 8,0 felett 3:1 és 4:1 nikkell(II)–HuPrP(76-114) rendszerekben képződött csapadék lehetetlenné tette a három- és négytagú komplexek stabilitási állandóinak számolását, de nagy pH-értéken a spektrumaik regisztrálhatók, ahol a csapadék részlegesen visszaoldódott. A 11. ábra a Ni(II) –HuPrP(76-114) rendszer CD spektrumait szemlélteti négy különböző fémion-ligandum aránynál (1:1-től 4:1-ig) 11,5-ös pH-értéken. Ez összehasonlítható az egy és a két hisztidint tartalmazó peptidfragmensek nikkell(II)komplexeinek CD spektrumával (8. és 9. ábra). Az összehasonlításból világosan látszik, hogy HuPrP(76-114) fragmensnek nikkell(II)ionok részére az elsődleges fémionkötőhelye a H96, amelyet a H111 követ. Mindkét hisztidin az oktarepeat tartományon kívül helyezkedik el, és a fémionok megkötése 7,5 és 9,5 közötti pH-tartományban zajlik. pH 10,0 felett 3:1 és 4:1 arány esetében további spektrális változás figyelhető meg, amely utal arra, hogy a Ni(II) -ionok az oktarepeat tartománybeli hisztidinekhez is koordinálódhatnak.



11. ábra: A Ni(II) –HuPrP(76-114) rendszer különböző fémion-ligandum aránynál felvett CD spektrumainak összehasonlítása (pH=11,5)

4.1.2. A prion peptidfragmensek nikkell(II)/réz(II) vegyes fémkomplexei

A HuPrP(84-114)H85A peptidfragmens réz(II)- és nikkell(II)ionokkal is képez kétmagvú komplexeket; míg a HuPrP(84-114)H96A csak réz(II)ionnal képez kétmagvú komplexeket. Ezért célunk volt megvizsgálni, hogy mindkét fémion

jelenléte esetén van-e lehetőség vegyes fémkomplexek kialakulására, ahol a réz(II)ion az egyik, a nikkel(II)ion a másik koordinációs helyet foglalja el. Így ekvimoláris koncentrációban Cu(II)- és Ni(II)-iont, valamint ligandumot tartalmazó mintákban potenciometriásan meghatároztuk a képződő vegyes fémkomplexek stabilitási állandóit (6. táblázat), ezt követően pedig UV-látható és CD spektroszkópia alkalmazásával alátámasztottuk a titrálás alapján számított modellrendszert és meghatároztuk a komplexekben megvalósuló szerkezeteket, illetve kötésmódokat.

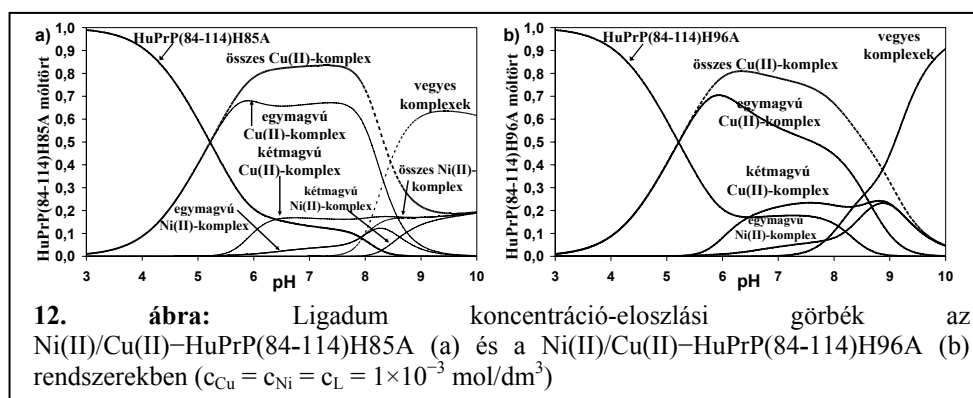
6. Táblázat: A HuPrP(84-114)H85A és a HuPrP(84-114)H96A prionfragmensek Ni(II)/Cu(II) vegyes fémkomplexeinek stabilitási állandói ($\log\beta$), $I = 0,2 \text{ mol/dm}^3$ (KCl), $T = 25^\circ\text{C}$ (a zárójelben lévő értékek a standard deviációt mutatják)

	HuPrP(84-114)H96A	HuPrP(84-114)H85A
$[\text{CuNiL}]^{4+}$	19,11 (8)	–
$[\text{CuNiH}_1\text{L}]^{3+}$	–	11,23 (15)
$[\text{CuNiH}_2\text{L}]^{2+}$	1,24 (7)	3,48 (6)
$[\text{CuNiH}_3\text{L}]^+$	-7,88 (5)	-6,28 (10)
$[\text{CuNiH}_4\text{L}]$	-18,37 (15)	-16,09 (10)
$[\text{CuNiH}_5\text{L}]^-$	-28,31 (10)	-27,01 (15)
$[\text{CuNiH}_6\text{L}]^{2-}$	-39,03 (8)	-37,53 (12)

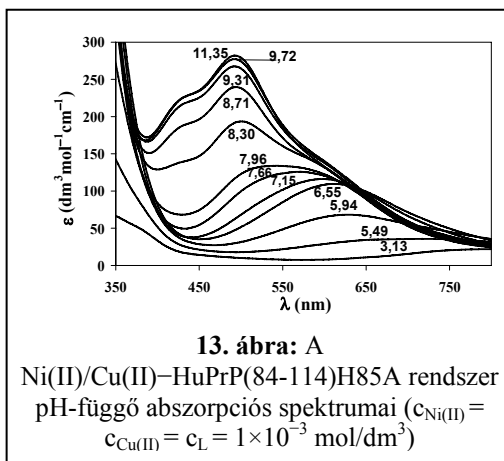
A kísérleti adatok értelmezése előtt fontos megemlíteni, hogy mindkét ligandum négy lizil-oldalláncot tartalmaz, amelyeket nem tekintünk fémionkötőhelynek. Ezen kívül pH 9,0 alatt protonált formában vannak jelen, azaz a képződő komplexek sztöchiometriájának megadásánál ezt célszerű figyelembe venni. Ezen kívül a Ni(II)-törzsrendszerek esetében az amidnitrogének deprotonálódása mindig kooperatív módon zajlik és átfed a lizil-oldalláncok deprotonálódásával. Ennek következtében adott részecskében a koordinálódott amidnitrogének és deprotonált lizil-oldalláncok számát nem lehet egyértelműen meghatározni. Ezzel az átfedéssel magyarázható az egyes sztöchiometriájú részecskék hiánya. Ezek a részecskék ugyan képződhetnek, viszont koncentrációjuk túl kicsi ahhoz, hogy a klasszikus technikákkal detektálni tudjuk.

A 12. ábrán egyszerűsített koncentráció-eloszlási görbéket láthatunk, amelyek az egy- és kétmagvú Cu(II)-, illetve Ni(II)-komplexek összesített móltörtjét, valamint az összes Cu(II)-, Ni(II)- és vegyes fémkomplex móltörtjét ábrázolja a pH

függvényében (figyelembe véve a réz(II)¹⁴⁸ - és nikkel(II)komplexek (3. táblázat), illetve a vegyes fémkomplexek stabilitási állandóit (6. táblázat) is). A vizsgálatokból két fontos következtetést vonhattunk le. Egyrészt a makroelát szerkezetű részecskék, ahol az imidazolnitrogének a kizárólagos kötőhelyek, csak egymagvú fémkomplexek esetén képződnek. Másrészt a vegyes fémkomplexek képződése csak abban a pH-tartományban lehetséges, ahol a réz(II)- és nikkel(II)ionok is elősegítik az amiddeprotonálódást, azaz pH 8,0 felett. Mindkét koncentráció-eloszlási görbéről (12. ábra) egyértelműen látszik, hogy pH 8,0 alatt mindkét ligandum többnyire Cu(II)-komplexben kötött. A 3N- és 4N-es kötőmódok kialakulása szabaddá teszi a második hisztidil-oldalláncot, így az nagyobb pH-értéken elérhetővé válik a Ni(II)-ionok számára. Ennek következtében vegyes fémkomplexek alakulnak ki, amelyben mindkét fémion körül (3N⁻, N_{Im}) koordinációs mód alakul ki.

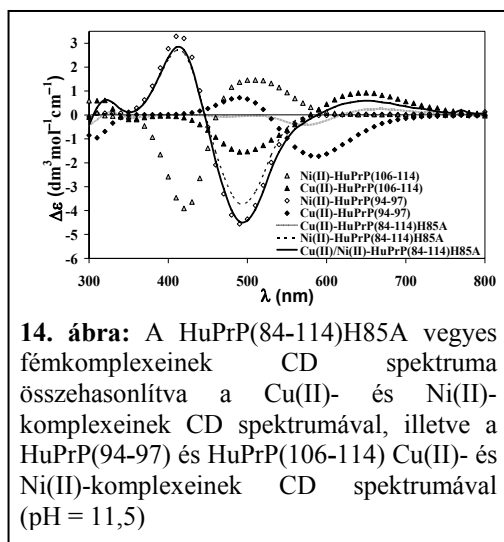


A két rendszer koncentráció-eloszlását összehasonlítva különbség figyelhető meg nagy pH-n. A Ni(II)/Cu(II)-HuPrP(84-114)H85A rendszerben a vegyes fémkomplexek mennyisége már 9-es pH-értéknél maximumot ér el, és a ligandumnak körülbelül 60 %-a ilyen formában van jelen. Ezzel szemben a Ni(II)/Cu(II)-HuPrP(84-114)H96A rendszerben a vegyes fémkomplexek jelenléte majdnem kizárólagos. Azonban ez nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy a kétmagvú komplexek csak a Cu(II)-törzsrendszerek esetében képződtek, ahol az oktarepeat tartománybeli H85 és a külső H111 is réz(II)ion-kötőhelyként viselkedik; és a Ni(II)-törzsrendszerekben képződő egymagvú komplexeknél csak a H111 a fémkötőhely. Mindazonáltal a két fémion egyidejű koordinálása arra enged következtetni, hogy a Ni(II)-ion módosíthatja a Cu(II)-ion eloszlását a



a koordinációs szférában résztvevő nitrogéndonorok számának növekedése következtében. Enyhén lúgos pH-n 490 nm-en egy intenzív sáv jelentkezik, amely a síknégyszetes geometriájú Ni(II)-komplexek képződéséhez rendelhető. Tehát a peptidfragmens képes egyidejűleg megkötni a két fémiont, azonban az UV-látható spektrofotometria nem alkalmas az egyes kötőhelyek megkülönböztetésére, azonban a CD spektroszkópia igen.

A 14. ábra 11,5-ös pH-értéken hasonlítja össze a HuPrP(84-114)H85A peptidfragmens vegyes fémkomplexeinek CD spektrumát a Cu(II)- és Ni(II)-komplexeinek CD spektrumával,



koordináció egy intenzív negatív sávot eredményez 490 nm-en és egy pozitív sávot 410 nm-en, amelyek szintén megtalálhatóak a Ni(II)/Cu(II)-HuPrP(84-114)H85A

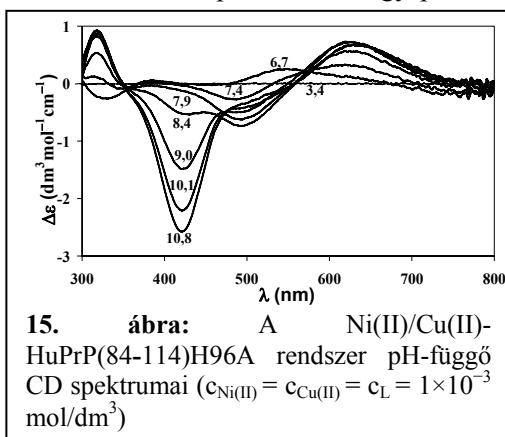
rendelkezésre álló kötőhelyek között. Ezeket a megállapításokat az abszorpciós és CD mérések is meggyőzően alátámasztják.

A 13. ábrán a Ni(II)/Cu(II)-HuPrP(84-114)H85A rendszer pH-függő abszorpciós spektrumai láthatóak. 5,0 és 7,0 közötti pH-tartományban csak a Cu(II)-komplexekre jellemző abszorpciós sáv észlelhető 600 nm körül, amely a pH emelkedésével kékeltołodást szenved

komplexeinek CD spektrumával, illetve kisebb, egy hisztidint tartalmazó prion peptidfragmens (HuPrP(94-97) és HuPrP(106-114)) megfelelő Cu(II)- és Ni(II)-komplexeinek CD spektrumával. Egyértelműen látszik, hogy sem a Ni(II)-H96, sem a Cu(II)-H96 koordinációt tartalmazó komplexeknek nincs pozitív Cotton-effektusa 600 nm felett. A 630 nm-nél lévő pozitív sáv a Cu(II)-H111 koordinációra jellemző, ami szintén megfigyelhető a vegyes rendszer esetén. Ezen kívül a Ni(II)-H96

rendszer CD spektrumában. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy mindkét fémion jelenléte esetén a Ni(II)-ion számára a H96 a kedvezményezett kötőhely, ez összhangban van a Ni(II)–HuPrP(84-114)H85A rendszernél tett megállapítással is. A Cu(II)-ionoknál ez a preferáltság éppen ellenkező, többségük a H111-hez kötődik, ami szintén megfelel a korábbi eredményeknek.^{148, 149}

A Ni(II)/Cu(II)–HuPrP(84-114)H96A rendszer pH-függő CD spektrumait a 15. ábra szemlélteti. pH 8,0 alatt egy pozitív sáv jelenik meg 620 nm-nél, illetve egy



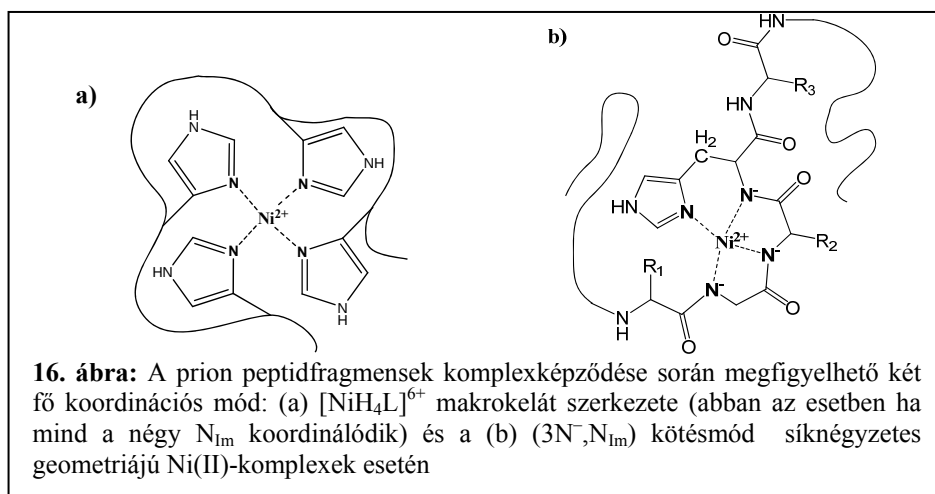
15. ábra: A Ni(II)/Cu(II)-HuPrP(84-114)H96A rendszer pH-függő CD spektrumai ($c_{\text{Ni(II)}} = c_{\text{Cu(II)}} = c_L = 1 \times 10^{-3}$ mol/dm³)

negatív 490 nm-nél. Összehasonlítva a 14. ábrával, ezek a sávok a Cu(II)-H111 koordinációhoz rendelhetők. A pH további növekedése egy viszonylag intenzív negatív sáv megjelenését eredményezi 430 nm körül. Ilyen körülmények között az oktarepeat (-PHGGGWGQ-) rész nem köti meg a nikkel(II)ionokat, így valószínűleg ez a Cotton-effektus nem a Ni(II)-H85 koordinációhoz tartozik.

Továbbá a Ni(II)-H111 koordináció hasonló CD aktivitással rendelkezik. Ez az új 430 nm körüli negatív sáv megjelenése azonban nem jár együtt a Cu(II)-H111 koordináció pozitív Cotton-effektusának eltűnésével, valamint a Cu(II)-H85 koordinációra is pozitív Cotton-effektus jellemző 575 nm-en. Arra következtethetünk, hogy a Cu(II)-ion kötődik a H111-hez és a H85-höz is. Tehát összefoglalva a Cu(II)-ionok egyaránt megtalálhatóak mindkét kötőhelyen (H111 és H85), ezzel szemben a Ni(II)-ionok csak a H111-hez kötődnek, illetve egy részük csapadék formájában leválik az oldatból, mivel nem teljesen rendezi át a Cu(II)-ionok eloszlását a rendelkezésre álló kötőhelyek között. A koordinációs izomerek arányát azonban nem áll módunkban kvantitatívan megadni. Ennek oka, hogy (1) nagyon lúgos pH-n nem zárható ki a nikkel(II)-hidroxid csapadék jelenléte, ami nikkel(II)-biszoktarepeat spektrumot bizonytalanná teszi, valamint (2) a Ni(II)-H111 és a Cu(II)-H111 kölcsönhatások CD aktivitása sokkal nagyobb, mint a biszoktarepeat-kölcsönhatásoké. Így ezek a hatások együttesen már nagy hibát okozhatnak a számolásnál. Azonban egyértelműen látszik, hogy a nikkel(II)ionok módosíthatják a réz(II)ionok eloszlását a rendelkezésre álló kötőhelyek között.

4.1.3. A prion peptidfragmensek vizsgálata során kapott eredmények összefoglalása

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 kiderült, hogy ezek a peptidek annyi ekvivalens Ni(II)-ion megkötésére képesek, ahány oktarepeat tartományon kívüli hisztidint tartalmaznak a szekvenciájukban, illetve a hisztidil-oldalláncok független fémionkötőhelyként viselkednek. A komplexképződés során két fő koordinációs mód figyelhető meg (16. ábra). pH 6,0 körül a hisztidil-oldalláncok imidazolnitrogénjeinek elsődleges és kizárólagos koordinációjával makrokelát szerkezetű részecskék a meghatározóak. Majd 7,5 és 10,0 közötti pH-tartományban három amidnitrogén N-terminus felé lezajló kooperatív deprotonálódása és koordinációja következtében 4N-es, egy- vagy kétmagvú sárga színű, síknégyszetes geometriájú, diamágneses nikkell(II)komplexek képződnek ($3N^-, N_{Im}$) koordinációs móddal.



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).

A HuPrP(84-114)H85A és HuPrP(84-114)H96A mutáns prion peptidfragmensek nikkel(II)/réz(II) vegyes fémiontartalmú rendszerek ekvimoláris oldatban képesek 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 ($3N^-,N_{Im}$) kötésmódot 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 magvú fémkomplexek képződése, amelyekben mind a két fémiont imidazol- és amidnitrogének koordinálják. A Ni(II)-ionok kedvezményezett kötőhelye a H96, míg réz(II)ionoké H111 (ami az eddigi tapasztalattal nagyon jó egyezésben van), illetve a Ni(II)ionok nem helyettesítik a Cu(II)-ionokat, viszont befolyásolják annak egyes kötőhelyek közötti eloszlását.

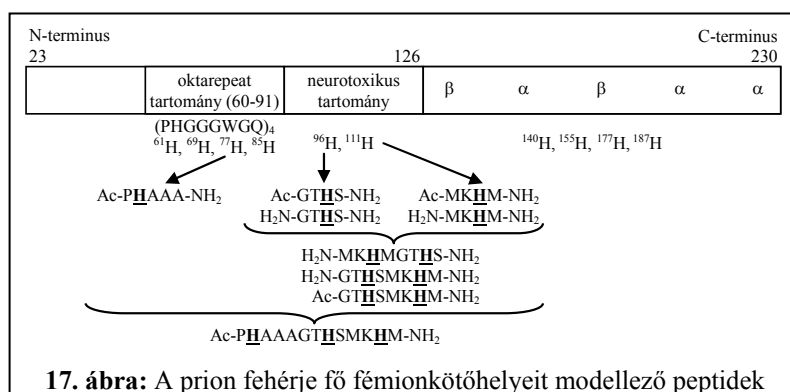
4.2. A prion fehérje fémionkötőhelyeit modellező peptidek komplexképződése

A prion peptidfragmensek réz(II)-^{148, 149} és nikkel(II)komplexeinek, valamint nikkel(II)/réz(II) vegyes fémkomplexeinek tanulmányozása során kiderült, hogy az oktarepeat tartományon kívül elhelyezkedő H111 és H96 a kedvezményezett kötőhelyek az oktarepeat tartománybeli hisztidinekkel szemben. Ez az eltérés könnyen értelmezhető a kialakuló kelátgyűrűk eltérő termodinamikai stabilitásával. Ugyanis az aminosav-szekvenciában az oktarepeatbeli hisztidint egy prolin előzi meg, amely megakadályozza az amidnitrogének deprotonálódását és koordinálódását az N-terminus irányban, így az a C-terminus irányban következik be, ami (7,5,5)-tagú csatolt kelátrendszer kialakulását eredményezi.^{53, 132, 137} Ilyen koordinációval rendelkező komplexek termodinamikai stabilitása kisebb, mint a H96 és H111 esetében képződő (5,5,6)-tagú kelátrendszereké.^{138, 146, 148, 149} Viszont annak ellenére, hogy a H96 és a H111 esetében a kelátgyűrű mérete, illetve a koordinálódó donoratomok száma és minősége megegyezik, a réz(II)ionok nagyobb stabilitású komplexeket képeznek a H111 kötőhelyen, a nikkel(II)ionok pedig a H96 kötőhelyen. Ezt a megállapítást elsősorban a CD spektroszkópiás mérések támasztják alá. Figyelembe véve a réz(II)- és a nikkel(II)komplexek koordinációs módjában és geometriájában jelentkező hasonlóságokat nem könnyű magyarázni az észlelt különbségeket. A nem-koordinálódó oldalláncok és a távoli oldalláncok is felelősek lehetnek a két fémion kötési preferenciájában mutatkozó eltérésért. A különbségek felderítése érdekében az egyes hisztidinek körüli aminosavsorrendet modellező peptideket szintetizáltunk és vizsgáltuk a komplexképző sajátosságait Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionnal. Az egyes hisztidinek körüli, a koordinációban közvetlen részt vevő aminosav-szekvenciát (MetLys¹¹¹HisMet, GlyThr⁹⁶HisSer és Pro⁸⁵HisAlaAlaAla) tartalmazó peptidek szisztematikus vizsgálata során kapott eredményeket részletezi az értekezés második része. A 17. ábra vázlatosan mutatja be a vizsgált ligandumokat.

Vizsgálataink első lépéseként valamennyi esetben a ligandumok protonálódási állandóit határoztuk meg, majd a fémiont is tartalmazó rendszerekben a képződő komplexek stabilitási állandóit. Az egy hisztidint tartalmazó tetrapeptidek állandóit a 7. táblázat tartalmazza, illetve a több hisztidint tartalmazó modellpeptidekre kapott protonálódási és stabilitási állandókat a 10. és 13. táblázat foglalja össze. A számolt stabilitási állandók alapján koncentráció-eloszlási görbéket szerkesztettünk, valamint a komplexekben megvalósuló szerkezetek és kötémódok felderítésére

A prion fehérje peptidfragmenseinek fémion-szelektivitása

további mérési módszereket is alkalmaztunk (UV-vis spektrofotometria, CD, NMR és ESR spektroszkópia).



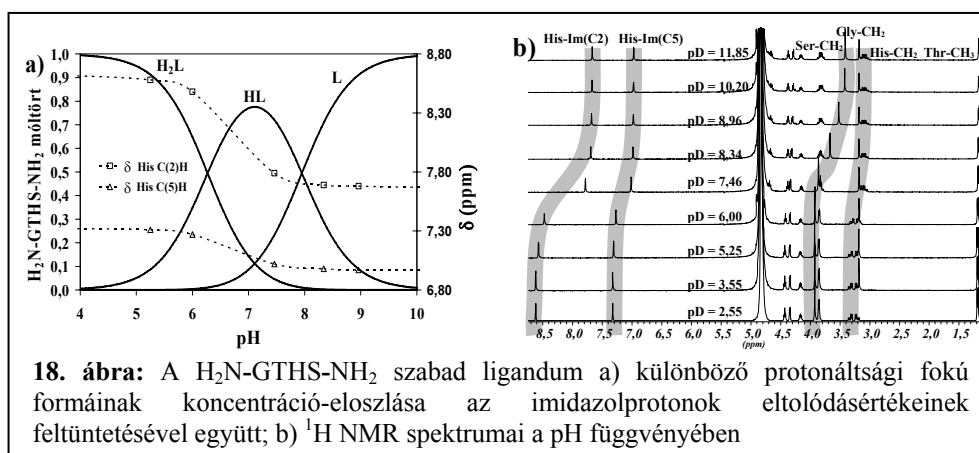
7. Táblázat: Egy hisztidint tartalmazó tetrapeptidek protonálódási és deprotonálódási állandói, valamint a Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\log\beta$), $I=0,2 \text{ mol/dm}^3$, $T=25^\circ\text{C}$ (a zárójelben lévő értékek a standard deviáció értékét mutatják)

részecske	Ac-GTHS-NH ₂ ¹³⁰	Ac-MKHM-NH ₂ ¹⁴⁶	H ₂ N-GTHS-NH ₂	H ₂ N-MKHM-NH ₂
HL	6,35	10,28	7,95(1)	10,18(2)
H ₂ L	–	16,5	14,22(2)	17,39(3)
H ₃ L	–	–	–	23,40(3)
pK(Im)	6,35	6,22	6,27	6,01
pK(amino)	–	–	7,95	7,21
pK(Lys)	–	10,28	–	10,18
CuHL	–	13,98	–	17,70(3)
CuL	3,94	–	7,72(5)	–
CuH ₁ L	–2,59	2,7	–	9,76(1)
CuH ₂ L	–8,21	–6,26	–0,75(1)	–0,71(2)
CuH ₃ L	–16,18	–16,32	–12,21(3)	–12,02(1)
logK(Cu+L)	3,94	3,6	7,72	7,52
NiHL	–	13,09	–	13,2(28)
NiL	2,82	5,08	4,67(12)	–
NiH ₁ L	–	–	–	2,62(6)
NiH ₂ L	–	–	–6,45(1)	–7,51(9)
NiH ₃ L	–	–	–17,6(2)	–
logK(Ni+L)	2,82	2,81	4,67	3,02
ZnHL	–	12,99	–	12,41(12)
ZnL	2,80(7)	5,47	4,46(12)	5,65(4)
ZnH ₁ L	–4,96(6)	–	–3,29(14)	–
logK(Zn+L)	2,8	2,71	4,46	2,23

4.2.1. Az egy hisztidint tartalmazó modellpeptidek fémkomplexei

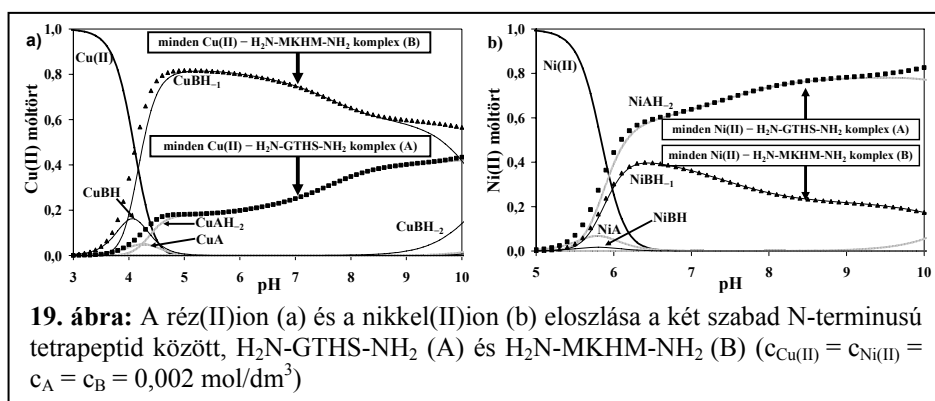
Korábban az Ac-GT⁹⁶HS-NH₂ és Ac-MK¹¹¹HM-NH₂ Cu(II),^{130,146}- és Ni(II)-komplexeit már jellemezték,¹³⁰ így ezek esetében kiegészítő méréseket végeztünk, amelyeket az összehasonlító elemzésekhez használtunk fel, valamint meghatároztuk a Ac-GT⁹⁶HS-NH₂ tetrapeptid Zn(II)-komplexeinek stabilitási állandóit.

A 7. táblázatban található deprotonálódási állandók a H₂N-GTHS-NH₂ esetében kettő, a H₂N-MKHM-NH₂ esetében három deprotonálódási helyet mutatnak. A legnagyobb pK-érték (amely csak H₂N-MKHM-NH₂ esetén jelentkezik) határozottan a lizil-oldallánc ε-aminocsoportjának deprotonálódásához rendelhető, míg a másik két deprotonálódás átfed egymással. A szabad ligandumok pH-függő NMR spektrumai (18. ábra) azonban egyértelműen mutatják az imidazolprotonok kémiai eltolódás változását pH 5,5-8,0 között, illetve a glicin α-protonjainak eltolódás változását pH 6,5-9,0 között. Ezen adatok szerint az imidazols csoport deprotonálódása következik be alacsonyabb pH-értéken.



A szabad N-terminussal rendelkező tetrapeptidek aminosav-szekvenciája nagyon hasonlít a humán szérum albumin N-terminusához, ami kiváló réz(II)- és nikkell(II)-ion-kötőképességet biztosít (ATCUN motívum, *Amino Terminal Cu and Ni binding Site*). A várakozásoknak megfelelően a védett tetrapeptidekkel összehasonlítva kiugróan nagy stabilitású réz(II)- és nikkell(II)-komplexeiket képez mindkét tetrapeptid. A 19. ábrán lévő fémion koncentráció-eloszlási görbék elemzése, hasonlóság figyelhető meg a két fémion komplexképződési

folymataiban. Mindkét esetben 10,0-es pH alatt csak két részecske van jelen mérhető koncentrációban. A $[\text{CuL}]$ és $[\text{NiL}]$ részecskék ($\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$ szekvencia esetében a sztöchiometria $[\text{MHL}]$ a protonált lizil-oldallánc miatt) ugyan kis koncentrációban vannak jelen, bár nagyobb stabilitási állandóval rendelkeznek, mint a közönséges peptidek. Ez a tény arra enged következtetni, hogy a horgonycsoportként viselkedő aminocsoport, valamint a szomszédos karbonilcsoport mellett az imidazolnitrogén is részt vesz a fémion-koordinációban ($\text{NH}_2, \text{O}_{\text{karbonil}}, \text{N}_{\text{Im}}$) kötémódot kialakítva. Ezt a megállapítást tovább erősíti a Cu(II) -komplexek abszorpciós spektrumában 750 nm körül megjelenő igen kis intenzitású sáv és a Ni(II) -komplexek nagyon kis intenzitású abszorpciós és CD spektruma.



A $\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$ esetében $[\text{MH}_2\text{L}]$, illetve a $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$ esetében $[\text{MH}_1\text{L}]$ sztöchiometriájú részecske széles pH-tartományban van jelen (réz(II)komplex pH 5,0-10,0; nikkell(II)komplex pH 7,0-10,0).

A Cu(II) -iont tartalmazó minták abszorpciós spektrumában látható kékeltozódás és a komplexek koncentrációjának növekedésével párhuzamos abszorbancia növekedés, valamint a CD spektrumokban is megfigyelhető $\text{N}^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ töltésátviteli sávok jelenléte ($\lambda_{\text{max}} = 240\text{-}345 \text{ nm}$) együttesen alátámasztják azt, hogy az amidnitrogének kooperatív módon koordinálódnak a réz(II)ionhoz. Ez a kooperativitás biológiai körülmények között lehet igazán fontos, ugyanis azt jelenti, hogy a pH kismértékű változása jelentős változást idéz elő a szabad és a kötött réz(II)ionok arányában. Más hisztidintartalmú peptidkomplexek esetében is beszámoltak hasonló kooperativitásról.^{53, 75, 130}

A Ni(II)-iont tartalmazó minták színe a titrálás során pH 6,0 körül sárgulni kezdett és extra bázist fogyasztó folyamat indult el. Ez az abszorpciós spektrumban 425 és 480 nm hullámhosszértéknél megjelenő két egymást átfedő abszorpciós sáv megjelenésével együtt a síknégyzetes Ni(II)-komplexek képződésére utal. A 412 nm-nél megjelenő pozitív, és 480 nm-nél megjelenő negatív Cotton-effektus változatlansága kooperatív amidnitrogén koordinációját jelzi.

A 4N-es komplexekben ($\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötőmód valósul meg és (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszerrel rendelkeznek. A komplexek spektrális paramétereit a 8. táblázat tartalmazza, amelyek alátámasztják az előbb említett kötőmód jelenlétét.

8. táblázat: $\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$ és $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$ esetében képződő 4N-es réz(II)- és nikkell(II)komplexek spektrális adatai (λ_{max} [nm], ϵ [$\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$], $A_{\parallel}$ [10^{-4}cm^{-1}])

	Cu(II)-komplexek		Ni(II)-komplexek	
	$\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$	$\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$	$\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$	$\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$
UV-vis				
($\lambda_{\text{max}}/\epsilon$)	530/125	525/111	480/88(+ váll)	480/59(+ váll)
			425/142	425/76
CD	572/-1,04	560/-0,85	480/-2,93	475/-2,17
($\lambda_{\text{max}}/\Delta\epsilon$)	488/+0,54	485/+0,52	412/+1,68	410/+1,48
	309/+1,94	310/+1,15		
EPR	200/2,192	202/2,191		
($A_{\parallel}/g_{\parallel}$)				

A 19. ábráról egyrészt kitűnik, hogy a különböző ligandumokkal képződő fémkomplexek aránya pH-függő, ami könnyen magyarázható a képződő komplexek töltésével. A $\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$ ligandum esetében a ($\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációs móddal rendelkező $[\text{MH}_2\text{L}]$ komplex töltése nulla, azaz semleges részecske a teljes pH-tartományban. Ezzel szemben az $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$ esetében ugyanez a koordinációs mód kétféle sztöchiometriájú részecskében is megvalósul: $[\text{MH}_2\text{L}]$ és $[\text{MH}_2\text{L}]^-$, és ez a töltésszemlegesítés hatással van a termodinamikai stabilitásra is. Másrészt, a réz(II)- és nikkell(II)ionok $\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$ és $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$ tetrapeptidok közötti koncentráció-eloszlása (19. ábra) arra is rámutat, hogy a két peptid különböző affinitással rendelkezik a két fémion irányába. Nevezetesen a réz(II)ion kötődése az $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$ felé kedvezményezett a teljes pH-tartományban, míg a nikkell(II)ionhoz kedvezőbben koordinálódik a $\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$ tetrapeptid. Ez a trend jó egyezésben van a prion peptidfragmenseknél tapasztaltakkal is.

Mindkét tetrapeptid síknégyzetes geometriájú diamágneses tulajdonságú nikkell(II)komplexei esetében lehetőség nyílt ^1H NMR vizsgálatok kivitelezésére is,

a Ni(II)–H₂N–GTHS–NH₂ rendszer adatait a 9. táblázat tartalmazza. Az imidazolgyűrű protonok eltolódás értékei csökkenek a nikkell(II)iont tartalmazó rendszerekben a szabad liganduméhoz képest, amely bizonyíték arra, hogy a nikkell(II)ionhoz imidazolnitrogén koordinálódik. Ezen kívül a treonin –CH₃ jelének eltolódásértéke arra enged következtetni, hogy az amidnitrogének is részt vesznek a nikkell(II)ionhoz való koordinációban.

9. táblázat: Az Ni(II)–H₂N–GTHS–NH₂ rendszer ¹H NMR vizsgálata során mért eltolódásértékek (δ, ppm)

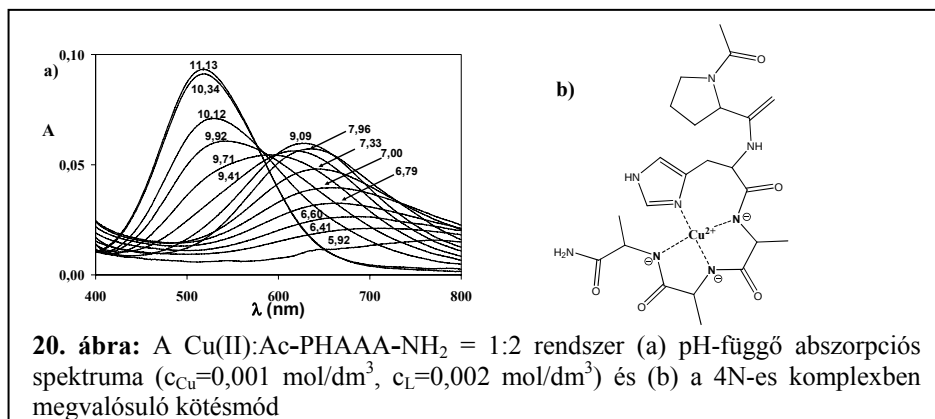
pD	Imidazol C2 p ⁺ (His) (δ, ppm)		Imidazol C5 p ⁺ (His) (δ, ppm)		–CH ₃ (Thr) (δ, ppm)	
	Szabad ligandum	Komplex	Szabad ligandum	Komplex	Szabad ligandum	komplex
3,50	8,62	–	7,32	–	1,18	–
9,00	7,67	7,42	6,97	6,89	1,16	1,34
11,50	7,67	7,21	6,97	6,79	1,16	1,34

A szabad aminoterminusú tetrapeptidek cink(II)ionokkal való kölcsönhatását pH-potenciometria és ¹H NMR spektroszkópia segítségével tanulmányoztuk. A szabad aminoterminussal rendelkező tetrapeptidek csak ligandumfelesleg mellett képesek oldatban tartani a cink(II)ionokat, ahol a koordinációban egy amino- és egy imidazolnitrogén vesz részt. A vizsgálatok során nem tapasztaltunk amiddeprotonálódásra és -koordinációra utaló bizonyítékokat, így a protonvesztés következtében kialakuló cink(II)komplexek vegyes hidroxidokomplexek. Tehát a cink(II)ion nem segíti elő az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját, így a pH emelkedésével elérve a cink(II)ion hidrolízisének tartományát, a fémion hidrolizál.

Az Ac-PHAAA–NH₂ pentapeptid egyetlen disszociábilis protont tartalmaz, amely lúggal titrálva válik le és a hisztidin imidazolil-csoportjának deprotonálódásához rendelhető. A makroszkópikus termodinamikai (deprotonálódási) állandó értéke: pK(His) = 6,43(1), amely jó egyezésben van az oktarepeatbeli hisztidin pK-értékével.^{131, 137}

Az Ac-PHAAA–NH₂ pentapeptid esetében a hisztidin imidazolnitrogénje tölt be horgonydonor szerepet, amely enyhén savas pH-tartományban koordinálódik a réz(II)ionhoz. A pH emelkedésével azonban a hisztidin előtti prolin következtében (7,5,5)-tagú csatolt kelátrendszer képződik az amidnitrogének koordinációjával (20.b ábra). Ez azonban kisebb stabilitású és kialakulása is nagyobb

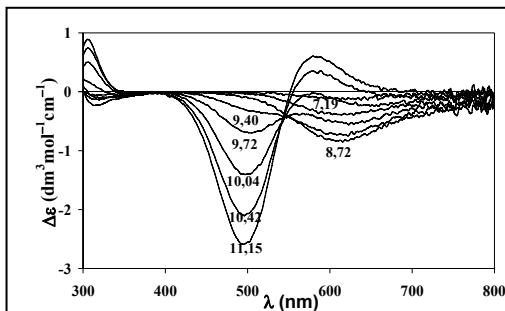
pH-tartományba tolódik el, mint az (5,5,6)-tagú kelátrendszereké. Ennek következményeként a hidrolízis és a komplexképződés egymással konkuráló folyamat és párhuzamosan zajlik. Azaz titrálás során pH 6,0 körül a világoskék színű mintában finomeloszlású csapadék figyelhető meg. Azonban ha a titrálást fordított irányból végezzük el, azaz lúgos tartományból haladva a savas felé, nem tapasztalható csapadékképződés. Valószínűleg a lúgos tartományban azonnal telítődik a réz(II)ion koordinációs szférája, és a kialakuló $(3N^-, N_{Im})$ kötősmódú 4N-es komplex, valamint a fokozatosan csökkenő számú koordinálódott N-donoratomot tartalmazó komplexek elég stabilisak ahhoz, hogy megakadályozzák a réz(II)ionok hidrolízisét.



A 20.a ábrán a látható abszorpciós spektrumok pH-függését láthatjuk, amelyek felvétele nagy pH-ról folyamatos visszasavanyítás mellett történt. Két abszorpciós sáv figyelhető meg, amelyek viszonylag élesen elkülönülnek egymástól. 520 nm-nél található maximum jellegzetesen a koordinációs szférájában négy nitrogén-donoratomot tartalmazó réz(II)komplex jelenlétére utal. A sáv intenzitása a pH csökkenésével 10,0-es pH-ig csökken, majd tovább csökkentve a pH-t fokozatosan a nagyobb hullámhosszak felé tolódik el (vöröseltolódás). Ebből arra következtethetünk, hogy a réz(II)ion körüli koordinációs szférában folyamatosan a nitrogén-donoratomok vízmolekulák oxigénjeire cserélődnek, valamint a peptidváz amidnitrogénjei folyamatosan protonálódnak. A második abszorpciós sáv 630 nm-nél figyelhető meg. A λ_{max} értékből és a nagy intenzitás alapján ebben a pH-tartományban uralkodó komplex még mindig tartalmaz amidnitrogént. A pH további csökkentése intenzitáscsökkenést és a λ_{max} vöröseltolódását eredményezi. A 6,5-ös pH-n megjelenő 650-700 nm körüli kis intenzitású maximum azt jelzi,

hogy ebben a pH-tartományban csak az imidazolnitrogén maradt a réz(II)ion koordinációs szférájában.

A 21. ábrán a $\text{Cu(II):Ac-PHAAA-NH}_2 = 1:2$ rendszer pH-függő CD



21. ábra: A $\text{Cu(II):Ac-PHAAA-NH}_2 = 1:2$ rendszer pH-függő CD spektruma ($c_{\text{Cu}}=0,001 \text{ mol/dm}^3$, $c_{\text{L}}=0,002 \text{ mol/dm}^3$)

spektrumait figyelhetjük meg, amelyben a $\text{N}^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ töltésátviteli sáv jelenléte ($\lambda_{\text{max}} = 305\text{-}310 \text{ nm}$) tovább erősíti az amidnitrogén jelenlétét a réz(II)ion koordinációs szférájában.

A képződő réz(II)komplexek csökkent stabilitása összecseng azzal, amit kutatócsoportunkban, valamint Kozłowski és munkatársai is tapasztaltak. Azaz ha a szekvenciában a hisztidin körüli aminosavak helyett

alanin található, akkor azonos sztöchiometria, kötésmód és geometria ellenére kisebb stabilitású komplexek keletkeznek.^{179, 180}

Az Ac-PHAAA-NH_2 pentapeptid Ni(II) -ionokkal való kölcsönhatása elhanyagolható, amely egyúttal jól modellezi a prion fehérje oktarepeat tartományának kedvezőtlen nikkel(II)ion-megkötését, és összhangban van azzal, amit a 4.1. fejezetben is láthattunk.

4.2.2. A két hisztidint tartalmazó oktapeptidek

10. Táblázat: A két hisztidint tartalmazó peptidek protonálódási és deprotonálódási állandói, valamint a Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-komplexeinek stabilitási állandói ($\log\beta$), $I=0,2 \text{ mol/dm}^3$, $T=25^\circ\text{C}$ (a zárójelben lévő értékek a standard deviáció értékét mutatják)

részecske	H ₂ N-GTHSMKHM-NH ₂	H ₂ N-MKHMGTSH-NH ₂	Ac-GTHSMKHM-NH ₂
HL	10,25(2)	10,18(2)	10,19(2)
H ₂ L	18,09(3)	17,42(4)	16,80(3)
H ₃ L	24,56(3)	23,89(4)	22,60(3)
H ₄ L	30,36(3)	29,66(4)	–
pK(Im1)	5,80	5,77	5,80
pK(Im2)	6,47	6,47	6,61
pK(NH ₂)	7,84	7,24	–
pK(ϵ -NH ₂)	10,25	10,18	10,19
CuHL	19,60(3)	19,46(10)	15,72(1)
CuL	15,49(1)	16,33(1)	9,16(4)
CuH ₁ L	9,19(4)	9,88(5)	2,67(3)
CuH ₂ L	–1,19(6)	–0,50(7)	–5,50(5)
CuH ₃ L	–12,51(6)	–11,58(6)	–15,78(6)
Cu ₂ H ₂ L	6,82(4)	7,76(5)	0,18(3)
Cu ₂ H ₃ L	0,50(3)	1,34(4)	–6,32(2)
Cu ₂ H ₄ L	–7,33(4)	–5,89(5)	–14,00(3)
Cu ₂ H ₅ L	–17,28(5)	–16,06(4)	–22,86(3)
Cu ₂ H ₆ L	–	–	–33,43(3)
NiHL	–	–	13,71(3)
NiL	9,97(6)	9,40(4)	–
NiH ₁ L	3,49(8)	2,93(4)	–
NiH ₂ L	–6,59(11)	–7,35(7)	–10,92(3)
NiH ₃ L	–17,50(9)	–18,32(5)	–20,62(3)
Ni ₂ H ₂ L	–2,29(22)	–2,34(12)	–7,99(4)
Ni ₂ H ₄ L	–18,53(8)	–18,18(5)	–
Ni ₂ H ₅ L	–27,89(8)	–28,04(6)	–33,22(3)
Ni ₂ H ₆ L	–	–	–43,59(6)
ZnHL	14,38(5)	14,07(5)	13,16(2)
ZnL	5,89(22)	6,07(13)	–
ZnH ₁ L	–1,58(5)	–1,68(6)	–

A H₂N-MKHMGTSH-NH₂, H₂N-GTHSMKHM-NH₂ és Ac-GTHSMKHM-NH₂ oktapeptidekkel a két oktarepeat tartományon kívüli kötőhelyet (H96 és H111) kívántuk modellezni a két tetrapeptid-szekvencia összekapcsolásával, amelyek felvilágosítást adhatnak a távoli oldalláncok szerepére. A potenciometriás titrálás adatai alapján számolt protonálódási

állandókat és a képződő fémkomplexek stabilitási állandóit a 10. táblázat tartalmazza.

Az oldategyensúlyi vizsgálatokból kiderült, hogy mindhárom oktapeptid két ekvivalens Cu(II)- vagy Ni(II)-iont tud megkötni, azonban Zn(II)-ionokat csak ligandumfelesleg mellett képes oldatban tartani. Az egyes fémkomplexek stabilitásának összehasonlítása alapján elmondható, hogy a képződő réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexek stabilitása az Irving-Williams sort követi.

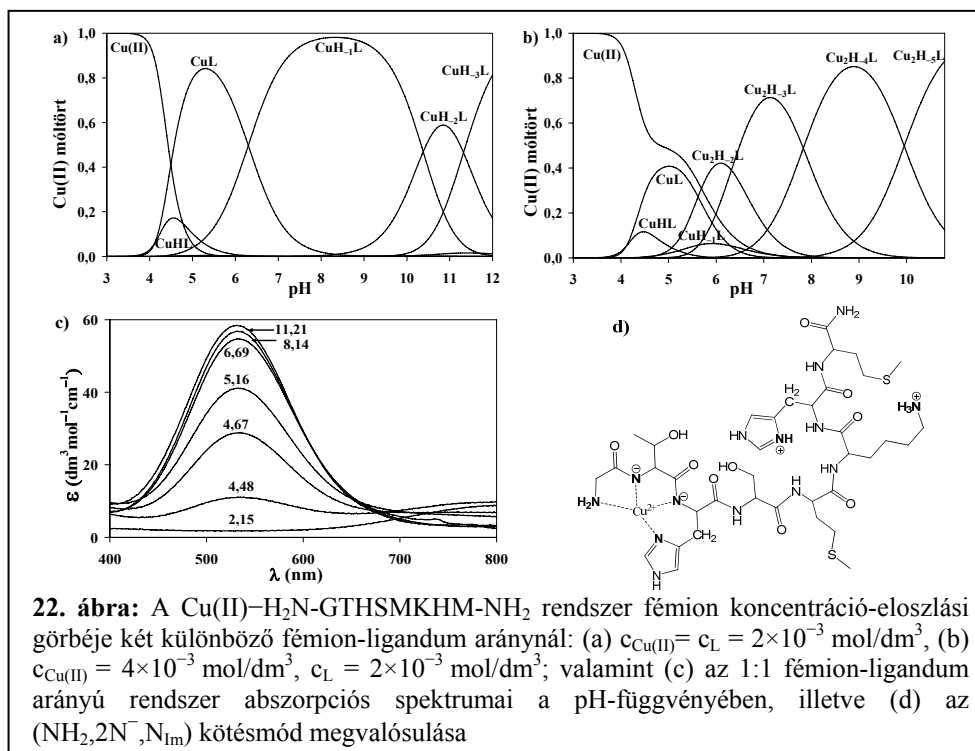
4.2.2.1. A szabad aminos terminusú oktapeptidek fémkomplexei

Az $\text{H}_2\text{N-MKHMGTSH-NH}_2$ és $\text{H}_2\text{N-GTHSMKHM-NH}_2$ oktapeptidek 10. táblázatban összefoglalt állandóiból is látszik, hogy ez a két ligandum négy deprotonálódási állandóval rendelkezik. A két hisztidil-oldallánc protonált imidazolnitrogénjének deprotonálódása pH 5,0 és 7,0 között egymással átfedő folyamatban következik be; a két legkisebb állandó azonban nem rendelhető egyértelműen az egyes hisztidil-oldalláncokhoz, azaz makroszkópikus termodinamikai állandóként kell kezelni. A közepes érték a láncvégi ammóniumcsoport deprotonálódásához rendelhető, a legnagyobb érték pedig mindkét esetben a lizil-oldallánc ϵ -aminocsoportjának deprotonálódásához tartozik. A szabad ligandumok ^1H NMR spektrumában a pH emelkedés hatására megjelenő eltolódásértékek változása egyértelműen alátámasztja az előbbi megállapításokat. A két oktapeptid esetében hasonló következtetésekre jutottunk, ezért az ismétlések elkerülése végett a két oktapeptid eredményeit együtt tárgyaljuk és a szemléltető ábrákat nem tüntettük fel mindkét ligandumra külön-külön.

Réz(II)komplexek

A képződő rézkomplexek stabilitási állandói alapján szerkesztett fémion koncentráció-eloszlási görbék láthatóak a 22. ábrán két különböző fémion-ligandum arányánál (*a és b diagram*). Titrálás során mindkét arány esetében a minta színe 4,5-ös pH-nál halvány lilás-rózsaszín, amely a pH emelkedésével fokozatosan erősödik. Az ekkor megjelenő komplex sztöchiometriája $[\text{CuHL}]$ és meglehetősen kis mennyiségben képződik. Egy protonvesztés a $[\text{CuL}]$ komplexet eredményezi, amely pH 5,0 és 6,0 között uralkodó részecske. Az abszorpciós spektrum (22.c ábra) azonban egyetlen szerkezet kialakulását mutatja, amely 4,5-ös pH-tól már jelen van, és annak csak a mennyisége növekszik. Ez arra utal, hogy már ekkorra bekövetkezik az amidnitrogén deprotonálódása, valamint az egyik

hisztidin és a lizin még protonált formában van jelen (22.d ábra). Tehát a valódi sztöchiometria tulajdonképpen $[(\text{CuH}_2\text{L})\text{H}_2]$. pH 7,0 és 9,0 között egy további deprotonálódási folyamat következtében megjelenő komplex sztöchiometriája $[\text{CuH}_2\text{L}]$. Az abszorpciós spektrum változatlansága alapján itt ugyanaz a kötőmód valósul meg és bekövetkezik a protonált formájú imidazolnitrogén deprotonálódása, viszont a lizil-oldallánc még protonált formában van jelen. A CD spektrumokban is látható a $\text{N}^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ töltésátviteli sávok jelenléte ($\lambda_{\text{max}} = 240\text{--}345\text{ nm}$) tovább erősíti a rézionhoz koordinálódott amidnitrogének jelenlétét (11. táblázat).

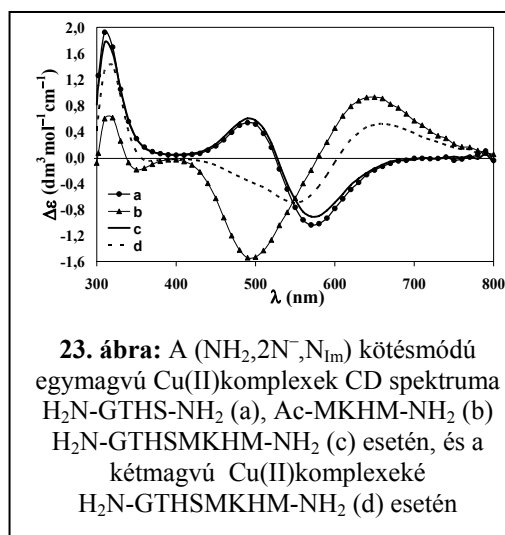


11-es pH-ra kialakuló fő részecske sztöchiometriája $[\text{CuH}_2\text{L}]$, azonban a spektrális paraméterek változatlansága alapján ez a protonvesztés a lizin ϵ -aminocsoportjának deprotonálódásához rendelhető és nem okoz változást a kötőmódban, illetve a geometriában. A további deprotonálódás nagyon lúgos pH-n következik be és valószínűleg egy pirrol-típusú nitrogén deprotonálódásához rendelhető.

11. Táblázat: A szabad N-terminusú oktapeptidek réz(II)rendszereiben képződő fő részecskék spektrális adatai ($\lambda_{\max}$ [nm], ϵ [dm³mol⁻¹cm⁻¹], $A_{\parallel}$ [10⁻⁴ cm⁻¹])

koordinációs mód	módszer	H ₂ N-GTHSMKHM-NH ₂	H ₂ N-MKHMGTSH-NH ₂
	UV-vis ($\lambda_{\max}/\epsilon$)	530/58	520/108
(NH ₂ ,2N ⁻ ,N _{Im})	CD ($\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$)	570/-0,91	560/-0,79
		480/+0,51	482/+0,62
		311/+1,83	308/+1,27
	EPR ($A_{\parallel}/g_{\parallel}$)	202 / 2,188	201 / 2,192
(NH ₂ ,2N ⁻ ,N _{Im}) + (3N ⁻ ,N _{Im})	UV-vis ($\lambda_{\max}/\epsilon$)	528/121	530/108
		655/+0,52	582/-0,86
		550/-0,70	492/+1,03
	CD ($\lambda_{\max}/\Delta\epsilon$)	315/+1,48	335/+0,12

A 23. ábrán az (NH₂,2N⁻,N_{Im}) koordinációjú 4N-es Cu(II)-komplexek CD spektruma látható H₂N-GTHS-NH₂ (a), Ac-MKHM-NH₂ (b) és



H₂N-GTHSMKHM-NH₂ (c) ligandum esetén, valamint a kétmagvú Cu(II)-komplexeké H₂N-GTHSMKHM-NH₂ (d) esetén. A CD spektrumok összehasonlításával a lehetséges koordinációs izomereket vizsgálhatjuk, amelyek alapján megállapítottuk, hogy az H₂N-GTHSMKHM-NH₂ oktapeptid [CuH₄L] sztöchiometriájú komplexében a réz(II)ionok 100 %-ban az N-terminus felőli hisztidinhez kötődnek, és ott (NH₂,2N⁻,N_{Im}) kötőmód alakul ki. Az N-terminus felőli koordinációt

az ESR paraméterek is megerősítik (11. táblázat). A

$\text{Cu(II):H}_2\text{N-GTHSMKHM-NH}_2 = 2:1$ rendszer esetében is az első ekvivalens réz(II)ion az N-terminuson kötődik, a második ekvivalens réz(II)ion pedig az -MKHM- részhez kerül ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötés móddal.

Tehát a prion peptidfragmenseknél megállapított preferencia itt nem érvényesül, ami magyarázható a kétféle koordinációs mód stabilitásával. Azonban a két peptidet összehasonlítva különbség figyelhető meg a $\log\beta$ -értékekben.

Nikkel(II)komplexek

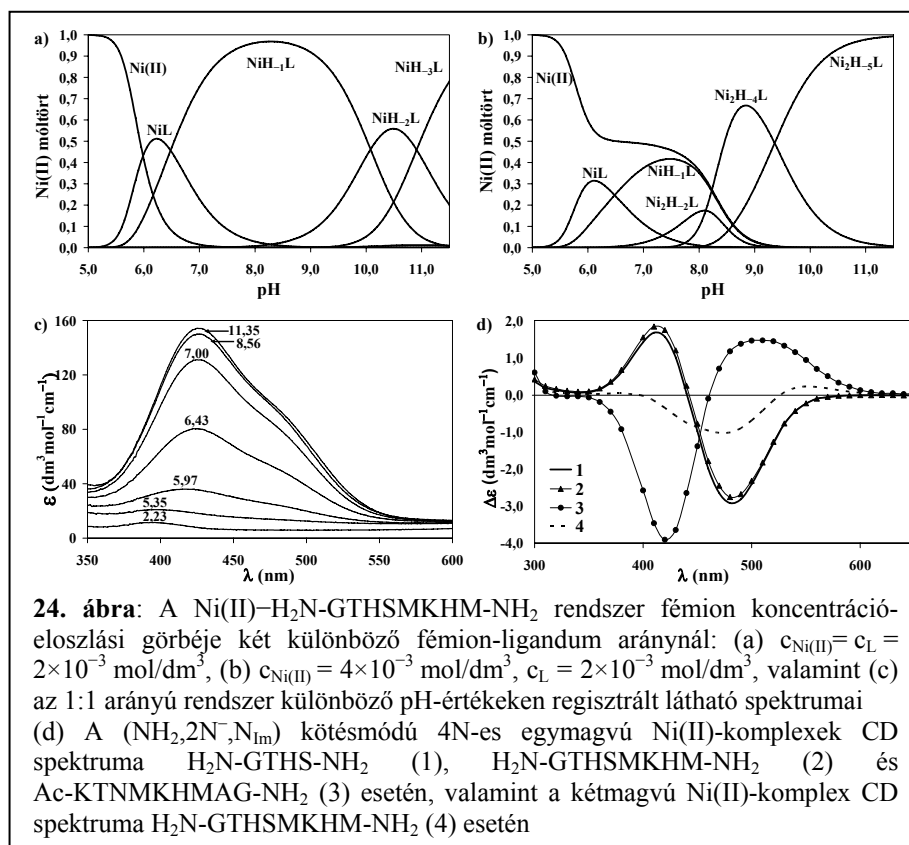
A $\text{H}_2\text{N-GTHSMKHM-NH}_2$ és a $\text{H}_2\text{N-MKHMGTHS-NH}_2$ oktapeptidek Ni(II)-rendszereinek vizsgálatánál a titrálás során a minták színe valamivel 7,0-es pH alatt sárgulni kezdett, amely a látható abszorpciós, valamint CD spektrumokkal együtt, az amidnitrogének deprotonálódására és ezzel együtt a síknégyzetes diamágneses Ni(II)-komplexek kialakulására utal (12. táblázat).

12. Táblázat: A szabad N-terminusú oktapeptidek nikkel(II)rendszereiben képződő fő részecskék spektrális adatai (λ_{max} [nm], ϵ [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$], δ [ppm])

koordinációs mód	módszer	$\text{H}_2\text{N-GTHSMKHM-NH}_2$	$\text{H}_2\text{N-MKHMGTHS-NH}_2$
$(\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$	UV-vis ($\lambda_{\text{max}}/\epsilon$)	480/95 (váll) 425/154	480/66 (váll) 423/137
	CD ($\lambda_{\text{max}}/\Delta\epsilon$)	480/-2,77 412/+1,85	480/-2,66 412/+2,06
	$^1\text{H NMR}$ ($\text{H}\delta_1/\text{H}\delta_2$)	7,39/6,89	7,49/6,93
$(\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ + $(3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$	UV-vis ($\lambda_{\text{max}}/\epsilon$)	480/119 (váll) 430/163	480/81 (váll) 425/117
	CD ($\lambda_{\text{max}}/\Delta\epsilon$)	550/+0,22 472/-1,03	488/-2,55 413/+2,70

Titrálás során 7,0-es pH-tól extra lúgfogyasztás figyelhető meg. Azonban elengedhetetlen megjegyezni, hogy pH 6,0 és 7,0 között nagyon lassú volt az egyensúly beállása, amelyet az amidkötésű részecskék lassú képződésével bekövetkező geometriaváltozással magyarázhatunk. A fémion koncentráció-eloszlási görbe alapján (24.a és 24.b ábra) a komplexképződést a pH

függvényében elemezve azt mondhatjuk, hogy az pH 6,0 körül kezdődik a [NiL] részecske megjelenésével.



Az elemzéshez nem hagyhatjuk figyelmen kívül a rendszer abszorpciós spektrumait. pH 2,25 és 5,35 között egy kis intenzitású csúcs látható 395 nm-nél, majd a pH emelkedésével ez folyamatosan eltolódik 425 nm-re, pH 6,5 felett pedig csak az intenzitások nőnek. Ezt a tapasztalatot azzal értelmezhetjük, hogy 5,35-ös pH-n oktaéderes $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ komplex van jelen, majd a Ni(II)-ion koordinációs szférájában a pH növekedésével az O-donoratomok folyamatosan cserélődnek le N-donoratomokra. 6,5-ös pH felett síknégyzetes, diamágneses Ni(II)-komplexek képződnek (NH₂, 2N[−], N_{lm}) koordinációs móddal. Tehát ez alapján a [NiL] részecske pontos sztöchiometriája: $[\text{NiH}_2\text{L}]_2$, azaz már bekövetkezett a két amidnitrogén kooperatív deprotonálódása, de egy hisztidil- és a lizil-oldallánc még protonált formájú. A spektrális adatok (12. táblázat) is alátámasztják a feltételezett

koordinációs módot. Ebből egy protonvesztéssel képződő részecske sztöchiometriája: $[\text{NiH}_1\text{L}]$ (azaz $[(\text{NiH}_2\text{L})\text{H}]$). pH 9,5 felett pedig egy újabb protonvesztés a lizil-oldallánc deprotonálódásához rendelhető, amely következtében kialakuló komplex $[\text{NiH}_2\text{L}]$ összetételű, és a spektrális adatok változatlanságára alapozva változatlan kötésmóddal rendelkezik. A lizin deprotonálódását támasztja alá az is, hogy a deprotonálódásra jellemző pK-érték ($[\text{NiH}_1\text{L}]-[\text{NiH}_2\text{L}] = 10,08$ és $10,28$ a két oktapeptidre) megfelel a szabad ligandum esetében a lizin deprotonálódását jellemző pK-értéknek ($10,28$ és $10,10$). Még lúgosabb pH-n bekövetkező protonvesztés minden valószínűséggel egy pirrol-típusú nitrogén deprotonálódásához tartozik.

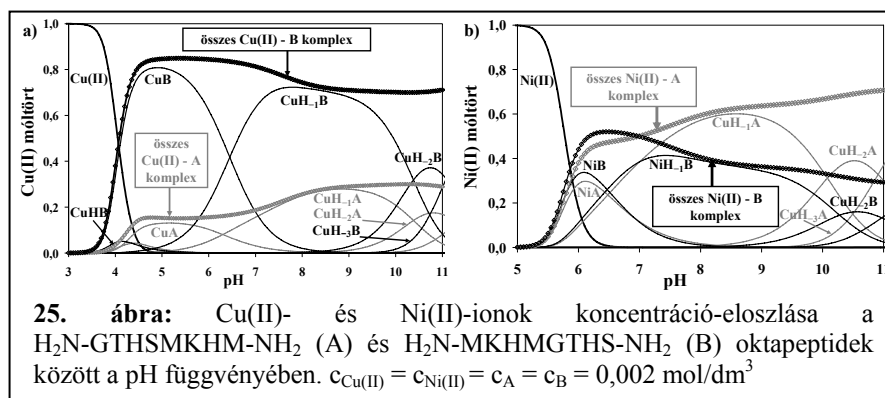
A 24.d ábra a $(\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ kötésmódú 4N-es egymagvú Ni(II)-komplexek CD spektrumát mutatja $\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$ (1), $\text{H}_2\text{N-GTHSMKHM-NH}_2$ (2) és Ac-KTNMKHMAG-NH_2 (3), valamint kétmagvú Ni(II)-komplexekét $\text{H}_2\text{N-GTHSMKHM-NH}_2$ (4) esetén. Ezzel az összehasonlítással a képződő koordinációs izomereket tanulmányozhatjuk, amely szerint az első ekvivalens nikkell(II)ion 100 %-ban az N-terminushoz kötődik, majd 2:1 fémion-ligandum arány esetén az N-terminus felőli hisztidin „telítődése” után a második hisztidinhez kötődnek a nikkell(II)ionok ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációs módot kialakítva.

Tehát a kétféle koordinációs mód eltérő stabilitása miatt a prion peptidfragmenseknél megállapított preferencia itt sem érvényesül.

Réz(II)- és nikkell(II)komplexek stabilitásának összehasonlítása

Az eltérő koordinációs módok eltérő stabilitással rendelkeznek, így az első ekvivalens fémiont (Cu(II)- vagy Ni(II)-iont) a nagyobb stabilitású, $(\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ kötésmód kialakítására képes N-terminus koordinálja mindkét oktapeptid esetében. Ennek következtében a két peptid azonos koordinációs móddal rendelkező komplexeinek stabilitását is összehasonlítottuk. A réz(II)- és nikkell(II)komplexek stabilitásának összehasonlítását a 25. ábra szemlélteti, amelyet a képződő komplexek stabilitási állandója alapján szerkesztettünk. A két diagram a Cu(II)- (a) és a Ni(II)-ion (b) két oktapeptid közötti megoszlását mutatja a pH függvényében. Világosan látszik, hogy a réz(II)ion stabilisabb komplexeket képez azzal a peptiddel, amely N-terminusán -MKHM- található, azaz a 111-es hisztidinnek megfelelő szekvencia; a nikkell(II)ion esetén viszont akkor képződnek stabilisabb komplexek, ha az N-terminus oldalon -GTHS- szekvencia található, azaz a H96-ot modellező. Fontos kiemelni, hogy bár a kialakuló koordinációs mód nem ugyan az,

mint a nagy tagszámú prion fragmenseknél, mégis közvetett módon érzékelhetők a kötőhelyek irányába megmutatkozó különbségek.



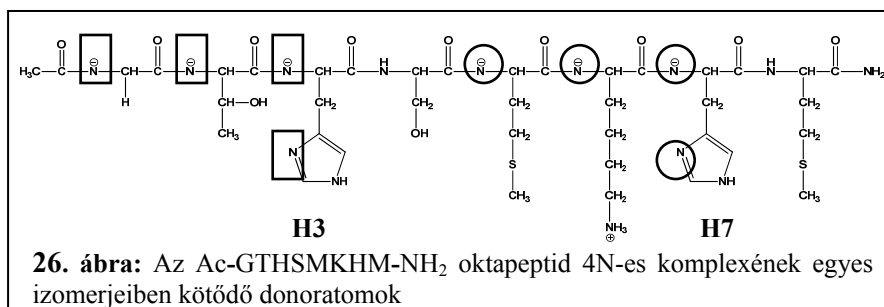
Cink(II)komplexek

A szabad aminoterminusú peptidek cink(II)ionokkal való kölcsönhatását pH-potenciometria és ¹H NMR spektroszkópia segítségével tanulmányoztuk. 1:1 fémion-ligandum aránynál pH 6,5 felett cink(II)-hidroxid csapadék képződése figyelhető meg, azonban ligandumfelesleg mellett képesek oldatban tartani a fémiont. Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy az oktapeptidek nagyobb affinitást mutatnak a cink(II)ionok felé, mint a tetrapeptidek (4.2.1. fejezet). Ezzel kapcsolatban, az irodalomban is találunk hasonlóságokat, amely szerint a cink(II)ion stabil megkötéséhez két vagy több horgony szükséges.⁶⁴ A potenciometriás adatok számítógépes kiértékelése során három részecske képződésével tudtuk a rendszert modellezni, amelyek stabilitási állandója a 10. táblázatban található. pH 7,0 körül a [ZnHL] komplex képződik, amelyben a lizil-oldallánc még protonált formában van jelen és valószínűleg az amino- és az imidazolnitrogének koordinációjával valósul meg. Figyelembe véve a lizin deprotonálódási állandóját, a következő $\log K = 4,13$ (H₂N-GTHSMKHM-NH₂) és $\log K = 3,89$ (H₂N-MKHMGTHS-NH₂) származtatott állandók számolhatóak az imidazolkoordináció jellemzésére. Ezek az értékek nagyobbak, mint a monodentát imidazolkoordinációra irodalomban fellelhető adat, közvetve alátámasztva ezzel az aminocsoport részvételét a koordinációban, valamint a [ZnHL] részecske makrokelát jellegét is, azaz, a cink(II)ionhoz mindkét imidazolnitrogén koordinálódik. Az imidazolnitrogén donoratomok koordinációban való részvételét a ¹H NMR spektrumok is megerősítik, azonban a deprotonálódott amidnitrogének

koordinációjára semmiféle utalás nem mutatkozik. Ennek következtében a számolt $[ZnL]$ és $[ZnH_{-1}L]$ sztöchiometriájú részecskék nagy valószínűséggel vegyes hidroxidokomplexek lehetnek.

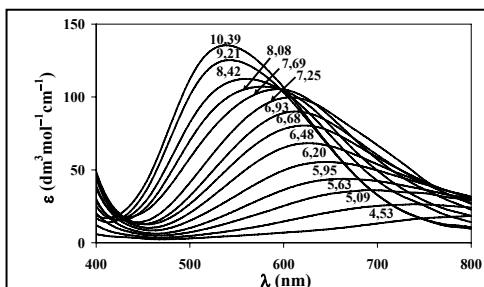
4.2.2.2. A védett aminotermínusú oktapeptid fémkomplexei

A védett N-terminusú oktapeptid koordinációs kémiai szempontból két azonos kötőhellyel rendelkezik, ahol $(3N^-, N_{Im})$ koordinációs mód alakulhat ki a 4N-es fémkomplexekben (26. ábra). A ligandum sav-bázis tulajdonságait tekintve három deprotonálódási helyet tartalmaz, ami két hisztidil- és egy lizil-aminosavrésznek felel meg. Először a protonált állapotú hisztidil-oldalláncok imidazolnitrogénje deprotonálódik pH 5,0 és 7,0 között két egymással átfedő lépésben, a pK-értékek közötti kis különbség is erre utal (hisztidin átlag pK-értéke 6,21). Ezt alá is támasztják a pH függvényében regisztrált 1H NMR spektrumok is, ahol pH 5,0 és 7,0 között megfigyelhető az imidazolgyűrű protonjainak, valamint a $-CH_2-$ protonok jeleinek eltolódása. Az 1H NMR spektrumokban a lizin ϵ -aminocsoportja melletti $-CH-$ proton eltolódása értéke pH 8,7 és 11,0 között változik, amely igazolja, hogy a 10,19-es pK-érték valóban a lizin ϵ -ammóniumcsoport deprotonálódásához tartozik. Ez a korábbi tapasztalatokkal és tanulmányokkal is jó egyezésben van.^{130, 146}



Réz(II)komplexek

A Cu(II)-komplexek stabilitási állandóit (10. táblázat) pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg két különböző (1:1, 2:1) fémion-ligandum arányú rendszer titrálása során. A ligandum a teljes pH-tartományban képes volt oldatban tartani a réz(II)ionokat, csapadék (Cu(OH)₂) jelenlétét egyik arány esetén sem tapasztaltuk, amelyet az abszorpciós spektrumok is alátámasztanak (27. ábra). Ez a megfigyelés összhangban van az eddigi tapasztalatokkal, amelyek szerint a prion

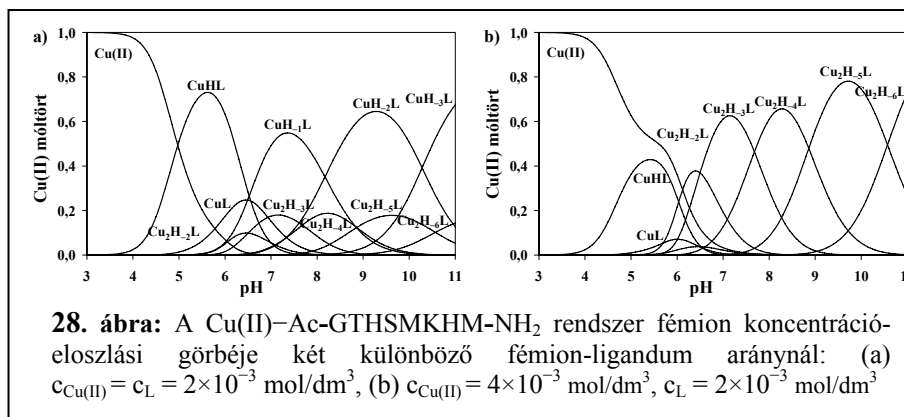


27. ábra: A Cu(II)-Ac-GTHSMKHM-NH₂ = 1:1 rendszer különböző pH-értékeken regisztrált abszorpciós spektrumai ($c_{\text{Cu(II)}} = c_L = 1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

peptidfragmensek annyi ekvivalens réz(II)ion megkötésére képesek, ahány hisztidint tartalmaznak a szekvenciájukban. A titrálás folyamán pH 5,0 körül halványkék szín jelenik meg a mintában, amely a pH emelkedésével fokozatosan erősödik és pH 8,5 felett lilára változik. Ezt a színváltozást kékeltozódásként az abszorpciós spektrumokon is megfigyelhetjük (27. ábra) és amely a réz(II)ion koordinációs szférájában lévő

nitrogénatomok minőségének és számának változásával magyarázható.

A komplexképződés értelmezésének szemléltetésére a képződő réz(II)komplexek stabilitási állandóit alapul véve szerkesztettük meg a réz(II)ion koncentráció-eloszlási görbéjét két különböző fémion-ligandum aránynál, amelyet a 28. ábra szemléltet. A pH függvényében követve a komplexképződést, azt látjuk, hogy a szabad N-terminusú származékokhoz képest a komplexképződés magasabb pH-értékekre tolódik. pH 5,0 és 6,0 között nagy mennyiségben van jelen a protonált $[\text{CuHL}]^{3+}$ összetételű részecske. Az ebben a pH-tartományban jelentkező kis intenzitású abszorpciós spektrumok 650-700 nm körüli maximuma (27. ábra) és a CD aktivitás (29. ábra) hiánya alátámasztja azt a feltevést, amely szerint ebben a pH-tartományban kizárólag az imidazolnitrogének koordinálnak a réz(II)ionhoz.

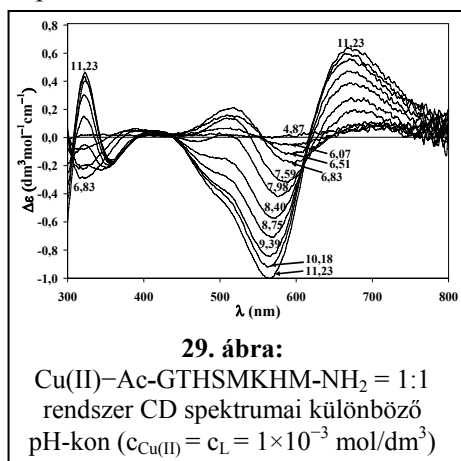


28. ábra: A Cu(II)-Ac-GTHSMKHM-NH₂ rendszer fémion koncentráció-eloszlási görbéje két különböző fémion-ligandum aránynál: (a) $c_{\text{Cu(II)}} = c_L = 2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, (b) $c_{\text{Cu(II)}} = 4 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, $c_L = 2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

Tehát ebben az esetben a horgonydonor szerepét a hisztidil-oldalláncok imidazolnitrogénjei töltik be. A sztöchiometriát figyelembe véve, a lizin ammóniumcsoportja még protonált formában van jelen.

Az imidazolkoordináció jellemzésére számolt $\log K(\text{Cu}+\text{N}_{\text{Im}})$ származtatott állandó értéke 5,53, ami belesik a 2N_{Im} koordinációja által létrejövő makrokelátokra jellemző tartományba ($\log K(\text{Cu}+\text{N}_{\text{Im}}) = 4,55\text{--}6,90$).⁵² Ez arra enged következtetni, hogy két hisztidin vesz részt a fémion-koordinációban, valamint két különböző formájú komplex létezik. Az egyik az úgynevezett „zárt” forma, amelyben mindkét imidazolnitrogén a fémionhoz kötött, a másik a „nyitott” forma, ahol csak az egyik hisztidin koordinálódik, de a másik is deprotonált állapotban van. Ezek arányát az állandó értékek alapján nem lehet pontosan megadni, viszont lehet becsülni fotometriás vizsgálatok és más hasonló ligandumok $\log K(\text{Cu}+\text{N}_{\text{Im}})$ értékeivel való összehasonlítás alapján. Ebben az esetben azonban a hisztidinek viszonylag közeli pozíciója kedvez a második hisztidin koordinációjának.

A 7,0-es pH körül uralkodó részecske sztöchiometriája $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]^+$. Az abszorpciós spektrumban (27. ábra) látható kékeltolódás a réz(II)ionhoz koordinálódott nitrogénatomok számának emelkedését jelzi. Az intenzitásnövekedés és eltolódás pH 6,0 felett jelentősebb, ahol ugyanis a $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]^+$ részecske képződik. Ez azt jelenti, hogy az imidazolnitrogénhez való koordinálódás lehetővé teszi a hisztidint megelőző két amidnitrogén deprotonálódását és ezt követően annak réz(II)ionhoz való koordinációja



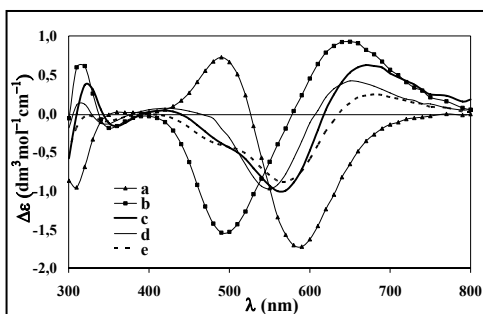
következik be. A spektrális jellemzők (27. és 29. ábra), és a sztöchiometria alapján ebben a komplexben ($2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációs mód valósul meg. Az amidnitrogén koordinációs szférában való jelenlétére a CD spektrumok is bizonyítékot szolgáltatnak. Az 1:1 arány CD spektrumát figyelve 6-os pH-ig kialakult spektrum lefutása megváltozik (összhangban az abszorpciós spektrumokkal is), innentől kezdve egyre jelentősebbé válik az amidnitrogének

deprotonálódása, illetve koordinációja, és a koordinációs szférában lévő donortatomok megváltoznak. A $[\text{CuL}]^{2+}$ részecske kis mennyiségét azzal magyarázhatjuk, hogy az első két amidnitrogén deprotonálódása kooperatív

folyamatban játszódik le, amely egyébként a szekvenciájukban belső hisztidint tartalmazó peptidok általános jellemzője.

pH 8,0 és 10,0 közötti tartományban $[\text{CuH}_2\text{L}]$ összetételű részecske jelenléte a meghatározó, amely egy 4N-es ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötés mód valószínűsíthető az abszorpciós spektrumban látható további jelentős kékeltolódással összhangban (27. ábra). Így egy (5,5,6)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki. pH 10,0 körül egy következő deprotonálódást követően $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$ részecske képződik, amelyben tulajdonképpen a koordinációs mód és geometria változatlan, csupán a lizin ε -ammóniumcsoport deprotonálódása következik be. Erre adnak bizonyítékot az abszorpciós és CD spektrumok is, amelyek változatlanok, csak az intenzitások nőnek. Fémionfelesleg esetében a többmagvú fémkomplexek jelenléte a meghatározó, ahol szintén az előbb említett koordinációs mód valósul meg.

Az egymagvú komplexek esetében a ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációs mód kialakulhat a H3 és H7 helyen is (26. ábra). A két hisztidin jelenléte következtében kialakuló koordinációs izomerek vizsgálatára a CD spektroszkópia alkalmas eszköz, mert a 3N és 4N-es komplexek látható spektrumát nagymértékben befolyásolja a koordinációban résztvevő aminosavak minősége. A két hisztidin körüli aminosav-szekvencia eltér egymástól (-GTH-, -MKH-), így a kialakuló koordinációs izomerek tanulmányozhatóak a különböző Cotton-effektusok összehasonlítása alapján. A 30. ábra az Ac-GTHSMKHM-NH₂ $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$ és $[\text{Cu}_2\text{H}_6\text{L}]^{2-}$

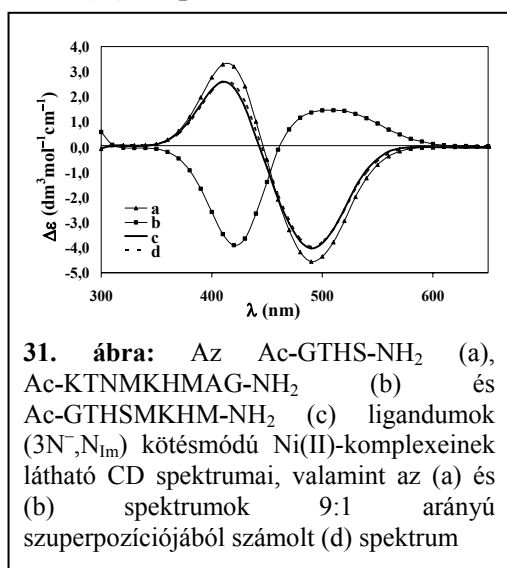


30. ábra: A ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötés módú réz(II)komplexek látható CD spektrumai az Ac-GTHS-NH₂ (a) és Ac-MKHM-NH₂ (b) tetrapeptidok esetében; és az Ac-GTHSMKHM-NH₂ $[\text{CuH}_3\text{L}]^-$ (c) valamint $[\text{Cu}_2\text{H}_6\text{L}]^{2-}$ (d) komplexek mért CD spektrumai; illetve az (e) spektrum az (a) és (b) szuperpozíciójából számolt spektrum

stöchiometriájú komplexek CD spektrumát hasonlítja össze az Ac-GTHS-NH₂ és Ac-MKHM-NH₂ tetrapeptidok 4N-es Cu(II)-komplexeinek CD spektrumával. Az ábrán a két tetrapeptid Cu(II)-komplexének CD-spektrumának szuperpozíciójából számolt spektrum is fel van tüntetve. A CD spektrumok összehasonlításából világosan látszik, hogy Cu(II)-ionok összemérhető mennyiségben vannak jelen mindkét kötőhelyen, erre utal az is, hogy az összehasonlításhoz használt tetrapeptidokkal modellezhető az 1:1 arányú rendszer CD spektruma, valamint a

2:1 fémion-ligandum arányú rendszer CD spektrumának lefutása az 1:1 arányéhoz képest jelentősen nem változik. Tehát kijelenthetjük, hogy a prion peptidfragmensektől eltérően, az Ac-GTHSMKHM-NH₂ oktapeptid esetén a Cu(II)-ion nem mutat preferenciát a H111 irányába.

Nikkel(II)komplexek



A nikkel(II)ionokat tartalmazó rendszerekben a komplexképződési folyamat a réz(II)ionokat tartalmazó-akhoz nagyon hasonló. pH 6,0 és 8,0 között uralkodó részecske [NiHL] sztöchiometriájú és oktaédres geometriával rendelkezik, amelyben a nikkel(II)ionhoz csak imidazolnitrogének koordinálódnak, ezt a CD aktivitás hiánya is alátámasztja. Az imidazolkoordináció jellemzésére bevezetett $\log K(\text{Ni} + \text{N}_{\text{Im}})$ származtatott állandó értéke (3,52) megfelel a két imidazolnitrogént tartalmazó makrokelátok értékeinek.⁷⁹ pH 8,0

felett a minta sárgulni kezdett, illetve az abszorpciós spektrumban két egymást átfedő abszorpciós sáv jelenik meg 410 és 490 nm-nél, amelyeknek csak az intenzitása növekszik a pH további emelésével. Ez arra utal, hogy a megjelenő egyetlen koordinációs mód (3N⁻,N_{Im}). Az imidazolnitrogénnel kelátképző helyzetben lévő amidnitrogének kooperatív deprotonálódásával és koordinációjával egy szerkezeti átrendeződést követően síknégyszetes geometriájú, diamágneses [NiH₂L] részecske képződik. Hasonló kooperativitást tapasztaltak olyan esetekben, ahol a peptidlánc belső pozíciójában tartalmaz hisztidint.¹⁹ További deprotonálódás a lizil-oldallánchoz rendelhető és nincs hatása a nikkel(II)ion koordinációs szférájára.

Nikkel(II)ion feleslege esetén a kétmagvú komplexek képződése a meghatározó. A fő részecskék sztöchiometriája a lizil-oldallánc protonáltságának megfelelően [Ni₂H₅L] és [Ni₂H₆L], amelyben mindkét nikkel(II)ion körül (3N⁻,N_{Im}) kötőmód alakul ki.

A nikkel(II)ion rendelkezésre álló kötőhelyek közötti eloszlása eltér a réz(II)ionétól. A 2:1 fémion-ligandum arányú minták CD abszorpciója a kétmagvú komplexek képződésével párhuzamosan csökken, azonban figyelembe véve, hogy az eltérő helyen koordinálódó nikkel(II)ionok ellenkező CD aktivitást eredményeznek, nem meglepő ez a tapasztalat. A koordinációs izomerek vizsgálatához a 31. ábra nyújt segítséget, amely az Ac-GTHS-NH₂ (a), Ac-KTNMKHMAG-NH₂ (b) és Ac-GTHSMKHM-NH₂ (c) ligandumok (3N⁻,N_{Im}) kötőmódú nikkel(II)komplexek látható CD spektrumait, valamint az (a) és (b) spektrumok 9:1 arányú szuperpozícióját (d) mutatja. Egyértelműen kitűnik, hogy az Ac-GTHSMKHM-NH₂ (3N⁻,N_{Im}) kötőmódú nikkel(II)komplexeinek látható CD spektruma az Ac-GTHS-NH₂ (azaz a H96-t modellező) liganduméhoz hasonló lefutású, illetve intenzitású. Ez a megfigyelés igazolja azt, hogy az oktapeptid H3 kötőhelye a kedvező a nikkel(II)ionok számára, a nikkel(II)ionok 90 %-a a -GTHS-szekvenciánál található. Ez a megállapítás összhangban van a számolt (d) spektrum, illetve a prion peptidfragmensek eredményeivel (4.1.1. fejezet). Tehát a nikkel(II)ion esetében mindig mutatkozik preferencia a H96 irányába, amely összefüggésben lehet a H96 körül elhelyezkedő rövid oldallánccal rendelkező aminosavak jelenlétével, és ezek következtében szigorúan síknégyzetes geometria kialakulására van lehetőség.

Cink(II)komplexek

Az Ac-GTHSMKHM-NH₂ oktapeptidek cink(II)ionokkal való kölcsönhatását pH-potenciometria és ¹H NMR spektroszkópia segítségével tanulmányoztuk. Azt tapasztaltuk, hogy a ligandumfelesleg képes megkötni a fémiont. A potenciometriás adatok számítógépes kiértékelése során egyetlen részecske képződésével tudtuk a rendszert modellezni, amely stabilitási állandója a 10. táblázatban található. pH 6,5 körül a [ZnHL] komplex képződik, amelyben a lizil-oldallánc még protonált formában van jelen és valószínűleg csak az imidazolnitrogének koordinációja valósul meg. Figyelembe véve a lizin deprotonálódási állandóját (pK), a következő logK = 2,97 származtatott állandó számolható az imidazolkoordináció jellemzésére. Ez az érték a két imidazolnitrogén koordinációjára jellemző tartományba esik [logK(Zn+2N_{Im}) = 2,55-3,96],⁵² közvetve alátámasztva ezzel a [ZnHL] részecske makrokelát jellegét, azaz, a cink(II)ionhoz mindkét imidazolnitrogén koordinálódik. Ez az állandó kisebb, mint a szabad N-terminusú oktapeptideknél képződő [ZnLH] makrokelátra számolható érték, amely megerősíti azt, hogy a

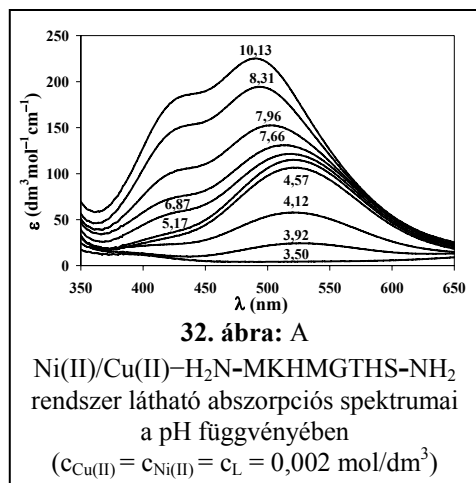
szabad N-terminusú oktapeptideknél az aminocsoport is részt vesz a komplexképződésben (4.2.2.1. fejezet). Az imidazolnitrogén donoratomok koordinációban való részvételét a ^1H NMR spektrumok is megerősítik, azonban semmiféle utalás nem mutatkozik a cink(II)ion által indukált amidnitrogének deprotonálódására és koordinációjára. A Zn(II)-ion jelenlétében kialakuló [ZnHL] komplex nem elég stabilis ahhoz, hogy megakadályozza a fémion hidrolízisét, így a lúgos pH-tartományban csapadékképződés volt megfigyelhető.

4.2.2.3. Az oktapeptidek nikkel(II)/réz(II) vegyes fémkomplexei

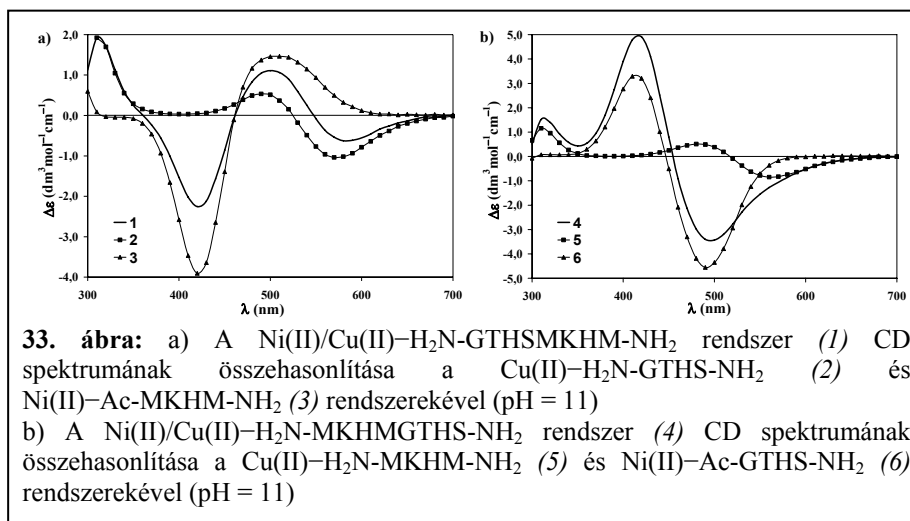
A törzsrendszerek eredményei nagy fémion-szelektivitást mutatnak. Mindhárom oktapeptid stabilis egy- és kétmagvú komplexeket képez réz(II)- és nikkel(II)ionokkal, viszont csak kis stabilitású egymagvú komplexeket detektáltunk cink(II)ionokkal. Ennek következtében csak a nikkel(II)/réz(II) vegyes fém-peptid rendszereket tanulmányoztuk pH-potenciometriás és spektroszkópiás módszerek kombinált alkalmazásával.

Korábban a szabad aminotermusú oktapeptideknél azt tapasztaltuk (4.2.2.1. fejezet), hogy az első ekvivalens fémion (akár réz(II)-, akár nikkel(II)ion) az aminotermus felőli részen kötődik, függetlenül a szekvenciától. Vegyes rendszereknél a réz(II)ion kötődését követően megjelenő nikkel(II)-hidroxid csapadék megakadályozta a képződő vegyes fémkomplexek stabilitási állandójának meghatározását. Mivel a réz(II)ion stabilisabb komplexeket képez, a nikkel(II)ion a maradék még szabad koordinációs helyre képes kötődni. Ennek a folyamatnak a pH-tartománya pH 8,0 felett van, amely egyben átfed a nikkel(II)ion hidrolízisével is. Ez a kevés csapadék a pH emelésével visszaoldódik és a fő részecskék spektrumai nagy pH-értékeken regisztrálhatóvá válnak.

A vegyes rendszerek esetében savas pH-n az ESR és az abszorpciós spektrumok alapján csak a réz(II)ionok kötődnek a ligandumhoz, míg a nikkel(II)ionok számottevő mértékben csak pH 7,0 felett. A nikkelkoordinációval a

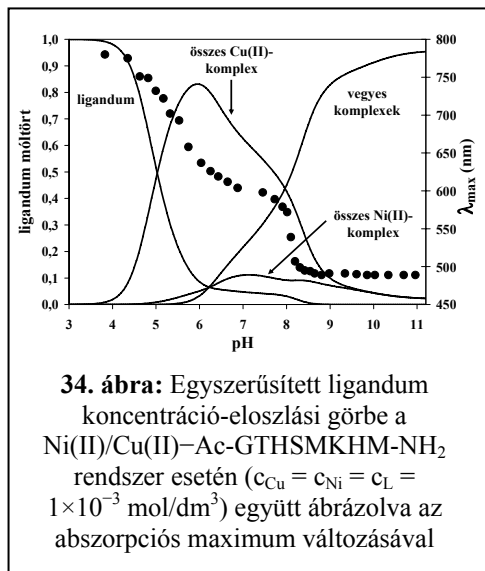


vegyes magvú komplexek képződése is elkezdődik, amelyben mindkét fémionhoz nitrogénatomok koordinálódnak. Ezt a megállapítást az abszorpciós spektrumok is megerősítik, a 32. ábra a nikkel(II)/réz(II)–H₂N-MKHMGTSHS-NH₂ rendszer mért látható abszorpciós spektrumait szemlélteti a pH függvényében. Ezen kívül a vegyes rendszerek ESR spektrumai egyértelműen a (NH₂, 2N[−], N_{Im}) kötésmódot jeleznek a réz(II)ion körül, ami a pH további növelése során is változatlan marad mindkét szabad N-terminusú oktapeptid esetén. Ez azt jelenti, hogy a nikkel(II)ion síknégyzetes és diamágneses környezetben van, és ez nem zavarja a paramágneses rézcentrumok ESR detektálhatóságát. A CD spektrumok összehasonlítása (33. ábra) is egyértelműen mutatja, hogy a réz(II)ionhoz az aminocsoportokhoz közeli hisztidil-oldallánc (H3) koordinálódik, majd a szabadon maradt helyre (H7) kötődik a nikkel(II)ion.



Az előző fejezetben (4.2.2.2. fejezet) az Ac-GTHSMKHM-NH₂ ligandum törzskomplexei esetén megállapítottuk, hogy a réz(II)ionok azonos mértékben oszlanak el a rendelkezésre álló kötőhelyek között, viszont a nikkel(II)ionok 90 %-a a H3 kötőhelyen található. A Ni(II)/Cu(II)–Ac-GTHSMKHM-NH₂ vegyes rendszer esetében a ligandum egy egyszerűsített koncentráció-eloszlási görbéjét mutatja a 34. ábra az abszorpciós maximumok változásával együtt ábrázolva. Egyértelműen látszik, hogy ebben a vegyes rendszerben savas pH-tartományban csak a réz(II)komplexek detektálhatóak, ahol a folyamatos kékeltoلدás a nitrogénatomok számának növekedését jelzi a réz(II)ion koordinációs szférájában. pH 7,0 felett a nikkelkoordinációval párhuzamosan vegyes fémkomplexek

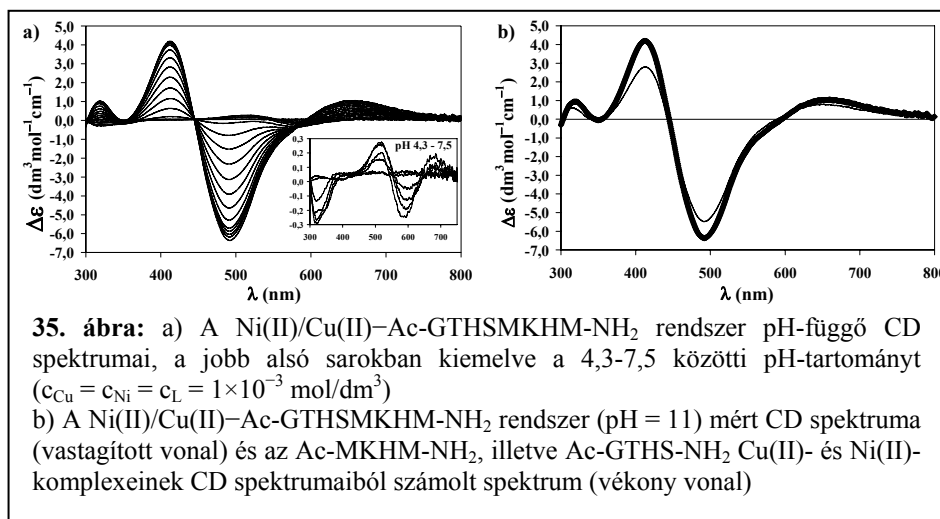
képződése is egyre számottevőbb mértékű a pH növekedésével, ahol a



fémionokhoz imidazol- és amidnitrogének koordinálnak, amelyet az ESR és spektrofotometriás paraméterek is alátámasztanak.

A keletkező koordinációs izomerek CD spektroszkópiás vizsgálatának eredményeit a 35. ábrán látható összehasonlítás segít értelmezni. Az a) diagramon az ekvimoláris mennyiségben réz(II)- és nikkel(II)ion, valamint ligandumot tartalmazó rendszer látható CD spektrumainak változását láthatjuk a pH függvényében. Savas pH-n csak a réz(II)komplexek spektrumai láthatóak, amely alapján azt

mondhatjuk, hogy a réz(II)ion a két kötőhely között (H3, H7) azonos mértékben oszlik el. A pH emelkedésével pedig a Ni(II)-komplexekre jellemző intenzív CD aktivitás figyelhető meg. A 11,0-es pH-ra kialakult Cotton-effektus a [NiCuH₆L] részecskéhez rendelhető, amelyben a réz(II)- és a nikkel(II)ion körül is (3N⁻, N_{lm}) donoratomok találhatóak.



A 35.b ábrán a 11,0-es pH-n mért CD spektrumot összehasonlítva láthatjuk az egyes hisztidinek körüli aminosav-szekvenciát tartalmazó peptidek réz(II)- és nikkell(II)komplexeinek CD spektrumával. Azt találtuk, hogy akkor kapjuk a legjobb illesztést a számolt spektrumra, ha azt feltételezzük, hogy a Cu(II)-ionok 90 %-a az -MKHM- szekvenciánál (H111), illetve a Ni(II)-ionok 90 %-a a -GTHS- szekvenciánál (H96) kötődik. Ez az eredmény jó egyezésben van olyan prion peptidfragmensek esetében tapasztaltakkal (4.1.2. fejezet), amelyek a H96 és H111 hisztidineket tartalmazzák,¹⁸¹ azaz a Ni(II)-ionok nem tudják kiszorítani a Cu(II)-ionokat, azonban képesek módosítani annak eloszlását a rendelkezésre álló kötőhelyek között.

4.2.3. A három hisztidint tartalmazó tridekapeptid

13. Táblázat: A három hisztidint tartalmazó tridekapeptid protonálódási és deprotonálódási állandói, valamint a réz(II)- és nikkel(II)komplexeinek stabilitási állandói ($\log\beta$), $I=0,2$ mol/dm³, $T=25^\circ\text{C}$ (a zárójelben lévő értékek a standard deviáció értékét mutatják)

részecske	Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH ₂	
HL	10,06(6)	
H ₂ L	17,01(3)	
H ₃ L	23,21(3)	
H ₄ L	28,80(3)	
pK(Im1)	5,59	
pK(Im2)	6,20	
pK(Im3)	6,95	
pK(NH ₂)	–	
pK(ε-NH ₂)	10,06	
	Cu(II)	Ni(II)
MH ₂ L	22,10(2)	–
MHL	16,89(2)	14,19(2)
ML	9,88(8)	5,83(8)
MH ₁ L	2,60(6)	–
MH ₂ L	–5,10(5)	–11,12(5)
MH ₃ L	–15,26(5)	–20,95(6)
M ₂ H ₁ L	7,13(8)	–
M ₂ H ₂ L	1,26(2)	–7,31(5)
M ₂ H ₃ L	–6,03(4)	–
M ₂ H ₄ L	–13,68(3)	–24,48(5)
M ₂ H ₅ L	–22,14(3)	–33,36(4)
M ₂ H ₆ L	–31,17(2)	–43,73(6)
M ₃ H ₃ L	–1,89(12)	–
M ₃ H ₄ L	–8,45(13)	–
M ₃ H ₅ L	–15,27(9)	–
M ₃ H ₆ L	–23,23(13)	–
M ₃ H ₇ L	–31,70(10)	–
M ₃ H ₈ L	–42,59(28)	–
M ₃ H ₉ L	–52,96(10)	–

A prion fehérje rendezetlen, N-terminális régiójának három fő kötőhelyét modellező szekvenciák összekapcsolásával a Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH₂ tridekapeptidet kaptuk, amely így három hisztidint tartalmaz (H2, H8, H12). Első

lépésként itt is a ligandum sav-bázis tulajdonságait jellemeztük. A pH-potenciometriás titrálás adataiból számolt deprotonálódási állandók a 13. táblázatban vannak feltüntetve. Látható, hogy a peptid négy deprotonálódási helyet tartalmaz, ami három hisztidil- és egy lizil-aminosavréshoz rendelhető. Először a hisztidil-oldalláncok imidazolnitrogénjei veszítenek protont pH 5,0 és 7,0 között egymással átfedő folyamatban (a hisztidinek átlag pK-értéke: 6,58). Ezt követően egy elkülönülő lépésben a lizil-oldallánc ε -ammóniumcsoportja deprotonálódik. A lépcsőzetes állandók nem rendelhetők egyértelműen az egyes hisztidil-oldalláncokhoz és minden adatot egyszerű makroszkópikus állandóként kell kezelni.

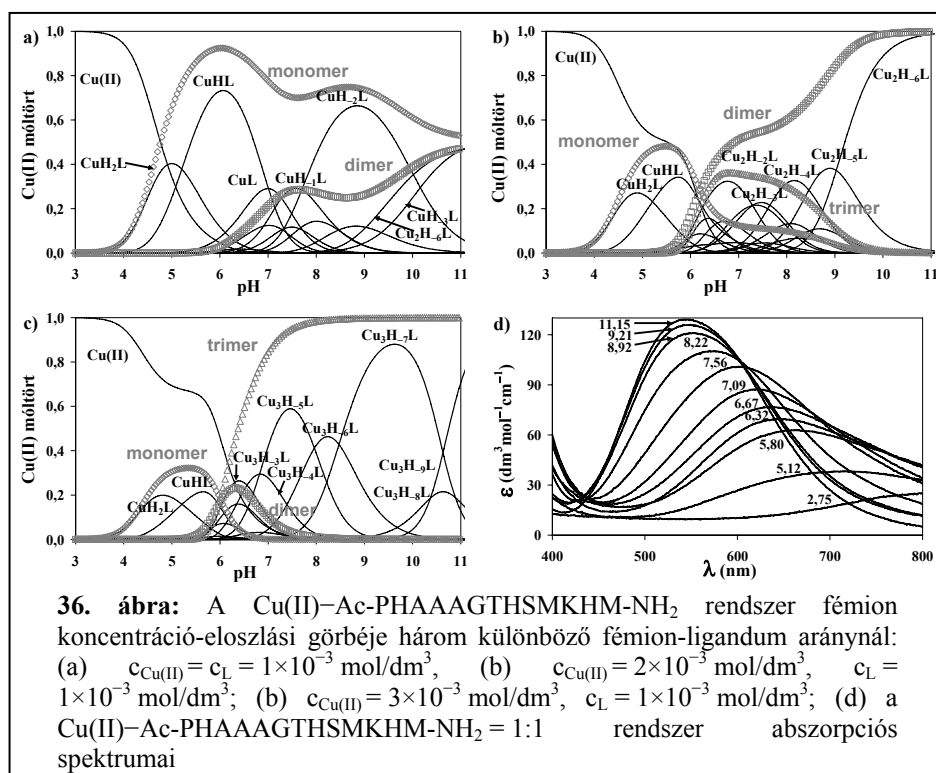
Réz(II)komplexek

Az Cu(II)–Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH₂ rendszert három különböző fémion-ligandum aránynál vizsgáltuk, a képződő réz(II)komplexek stabilitási állandója a 13. táblázatban található, valamint az állandók alapján szerkesztett fémion koncentráció-eloszlási görbéket a 36.a és 36.b ábra szemlélteti. A tridekapeptid három ekvivalens réz(II)iont képes oldatban tartani. Mindhárom fémion-ligandum aránynál az abszorpciós spektrumban pH 4,0 és 6,0 között kis intenzitású sáv látható 650-700 nm körüli maximummal (pl. 36.d ábrán is szemléltetve), amely az imidazolnitrogének kizárólagos koordinációját támasztja alá, illetve ezt tovább erősíti a CD aktivitás hiánya ebben a pH-tartományban. A [CuH₂L] részecskében a lizil-oldalláncon kívül valószínűleg az egyik imidazolnitrogén is protonált formában van jelen, a másik két imidazolnitrogén donoratom pedig horgonyként a réz(II)ionhoz koordinálódik. Ezzel a részecskével majdnem párhuzamosan képződik a [CuHL] sztöchiometriájú komplex, amely $\log K(\text{Cu(II)} + \text{N}_{\text{lm}})$ értéke 6,83. Ez az érték a három és két imidazolnitrogén koordinációjára jellemző értékek közé esik,⁵² ami arra enged következtetni, hogy főként a kettő és három imidazolnitrogén koordinációjával megvalósuló makrokelát részecskék vannak jelen.

A pH emelkedésével az abszorpciós maximumok folyamatosan a kisebb hullámhosszak irányába tolódnak el. Ez a folyamatos kékeltolódás a nitrogén-donoratomok számának emelkedését jelzi a réz(II)ion koordinációs szférájában. Az intenzitásnövekedés és eltolódás jelentősebb pH 6,0 felett, ahol, figyelembe véve a képződő komplex sztöchiometriáját is, a deprotonált amidnitrogének koordinálódnak a fémionhoz. A pH növekedésével fokozatosan deprotonálódnak és

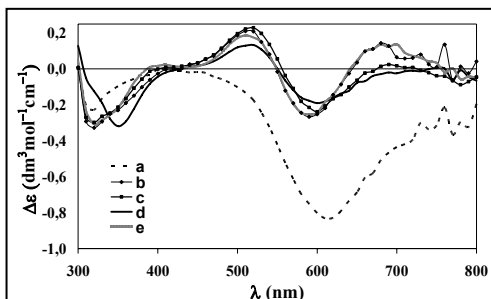
koordinálódnak az amidnitrogének, amely következtében képződik a 2N-es $[\text{CuL}]$, a 3N-es $[\text{CuH}_1\text{L}]$, majd a 4N-es $[\text{CuH}_2\text{L}]$ részecske ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötőmóddal, amely nagy stabilitással rendelkezik és uralkodó jellegű pH 8,0 és 10,0 között. Az amidkoordinációt a CD spektrumban 310 nm-nél megjelenő töltésátviteli sáv is megerősíti (37. ábra). A pH további növekedése nincs hatással a koordinációs szférára, a bekövetkező protonvesztési folyamat a lizin ϵ -ammóniumcsoportjának deprotonálódásához rendelhető.

Már 1:1 réz(II)ion-ligandum aránynál számottevő mértékű a kétmagvú komplexek képződése (36.a ábra). A kétmagvú komplexek képződésének statisztikus valószínűsége három kötőhely és egy fémion esetén 44 %. Ennél valamivel kisebb arányban (30%) képződnek kétmagvú komplexek, ami arra enged első körben következtetni, hogy a három kötőhely nem teljesen ekvivalens egymással. Viszont még mindig nagyobb mértékben képződnek kétmagvú komplexek, mint a két hisztidint tartalmazó Ac-GTHSMKHM-NH₂ esetében (20 %, 28. ábra).



Érdemes megjegyezni azt is, hogy pH 10,0 felett, ahol már a lizil-oldallánc is deprotonált, összemérhető mennyiségben van jelen az egymagvú és a kétmagvú 4N-es komplex. A réz(II)ion mennyiségének növelésével a többmagvú komplexek dominálnak.

A 37. ábrán 7,5-ös pH-n összehasonlítva látható a Cu(II)–Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH₂ rendszer három különböző fémion-ligandum aránynál felvett CD spektruma a Cu(II)–Ac-GTHSMKHM-NH₂ = 1:1 rendszerével. A CD görbék lefutását tanulmányozva, első ránézésre azt



37. ábra: A (3N⁺,N_{lm}) kötősmódú réz(II)komplexek látható CD spektrumai az alábbi rendszerekben (pH = 7,5): Cu(II) : Ac-PHAAA-NH₂ = 1:1 (a), Cu(II) : Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH₂ = 1:1 (b), 2:1 (c), 3:1 (d); Cu(II) : Ac-GTHSMKHM-NH₂ = 1:1 (e)

mondhatjuk, hogy az 1:1 és 2:1 fémion-ligandum arány görbéje megegyezik, ami arra utal, hogy a réz(II)ion ugyanarra a helyre kötődik. Ezeket összehasonlítva a réz(II)–Ac-GTHSMKHM-NH₂ rendszer CD spektrumaival, nagyon nagy hasonlóságot találunk pH 7,0 és 8,0 között. Ebből következtethetünk arra, hogy a két hisztidint tartalmazó ligandumhoz hasonló módon kötődik az első két ekvivalens réz(II)ion, azaz a -GTHS- és -MKHM- szekvenciák összemérhető mértékben koordinálódnak

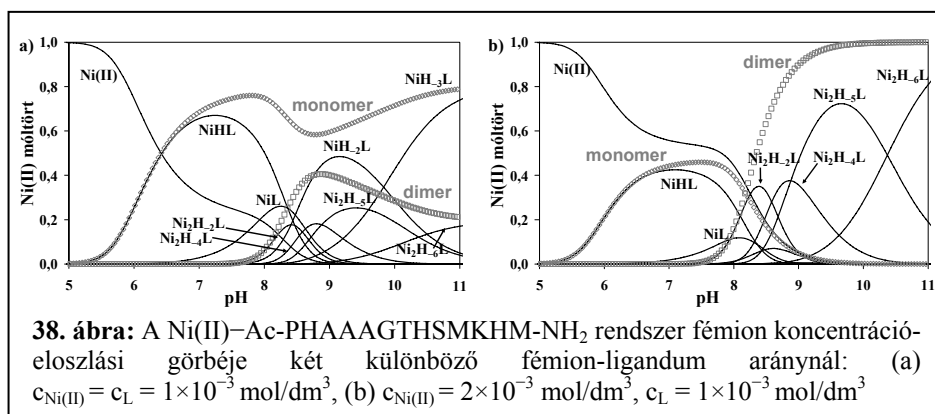
a réz(II)ionhoz. A 3:1 aránynál viszont változásokat tapasztaltunk, az előbbi kettőhöz képest, amelyet a -PHAAA- szekvenciához való kötődés okoz.

Tehát a rézmegkötésben mutatkozó preferencia a H12 ~ H8 > H2 sorrendnek adódott. Azaz az oktarepeat tartományon kívüli kötőhelyeket modellező hisztidinek azonos mértékben kötik a réz(II)ionokat és az oktarepeatbelieket modellezők csökkent affinitással rendelkeznek a réz(II)ionok felé.

Nikkel(II)komplexek

Az Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH₂ tridekapeptid Ni(II)-rendszereinek vizsgálata során kiderült, hogy a három hisztidin ellenére csak két ekvivalens nikkel(II)ion megkötésére képes. Ez a megállapítás összhangban van olyan prion peptidfragmensek Ni(II)-rendszereinél tapasztaltakkal, amelyek tartalmaznak oktarepeat tartománybeli hisztidineket (lásd: a 4.1.1. fejezetben tárgyalt HuPrP(84-114)H96A). A képződő komplexek pH-potenciometriás titrálással

meghatározott stabilitási állandóit a 13. táblázat tartalmazza, valamint az állandók alapján szerkesztett koncentráció-eloszlási görbéket a 38. ábra szemlélteti. A 6,0 és 8,0 közötti pH-tartományban a $[\text{NiHL}]$ sztöchiometriájú részecske képződik. A CD aktivitás hiánya arra enged következtetni, hogy ebben a pH-tartományban oktaéderes geometriájú komplex van jelen, amely az imidazolnitrogének koordinációja által megvalósuló makrokelát jellegű részecske. A $[\text{NiHL}]$ komplex viszonylag nagy stabilitását az imidazolkoordináció jellemzésére számolt állandó ($\log K(\text{Ni(II)} + \text{N}_{\text{Im}}) = 4,13$) is mutatja. Hiszen a koordinálódott imidazolnitrogének számával a makrokelátok stabilitása is növekszik,^{52, 79} valamint ez az érték azt is jelzi, hogy a nikkell(II)ionhoz legalább két imidazolnitrogén koordinálódik.⁷⁹

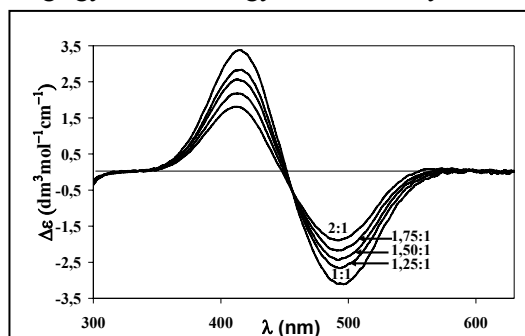


Titrlás során valamivel pH 8,0 felett a minták sárgulni kezdtek, illetve extra lúgfogyasztó folyamat zajlott. Ez a 430 és 480 nm hullámhosszértéknél található abszorpciós maximumokkal együtt egyértelműen síknégyzetes, diamágneses komplexek képződését jelzi. Figyelembe véve a részecskék sztöchiometriáját is, megállapíthatjuk, hogy az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja következik be. Az első képződő amidkötésű részecske összetétele $[\text{NiL}]$, azonban a pontos sztöchiometriája a protonált lizil-oldallánc figyelembe vételével $[(\text{NiH}_{-1}\text{L})\text{H}]$. Az itt feltételezhető koordinációs mód ($\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$), de nem kizárt a ($\text{N}^-, 2\text{N}_{\text{Im}}$) sem. Ennél a ligandumnál a három imidazolnitrogén miatt nem teljesen kooperatív az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja. A pH 8,8 és 10,0 között uralkodó fő részecske sztöchiometriája $[\text{NiH}_2\text{L}]$ (azaz $[(\text{NiH}_3\text{L})\text{H}]$). Az abszorpciós spektrumokat szemlélve az látható, hogy a hullámhosszmaximumok nem változnak, csak az intenzitások növekednek. Ezek alapján egyetlen koordinációs mód ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) azonosítható, amely következtében (5,5,6)-tagú

csatolt kelátrendszer alakul ki. pH 10,0 felett egy további protonvesztés következtében $[\text{NiH}_3\text{L}]$ sztöchiometriájú részecske kialakulása nem jár spektrális változással és ez a lizil-oldallánc ε -aminocsoportjának deprotonálódásához rendelhető.

Már 1:1 nikkell(II)ion-ligandum aránynál a kétmagvú komplexek mennyisége körülbelül 20 %, fémionfelesleg esetén pedig jelenlétük kizárólagos az amidkötésű részecskék képződésekor, amelyekben szintén az előbb említett kötésmód valósul meg.

A több hisztidin jelenléte következtében lehetőség van koordinációs izomerek képződésére, amelyek arányáról a CD spektrumok nyújtanak felvilágosítást. A 39. ábra azt mutatja, hogyan változik a $\text{Ni(II)-Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH}_2$ rendszer CD spektruma növekvő nikkell(II)ion-koncentrációnál pH 10,5-n. Megfigyelhető, hogy 1:1 aránynál a görbe alakja és intenzitása a

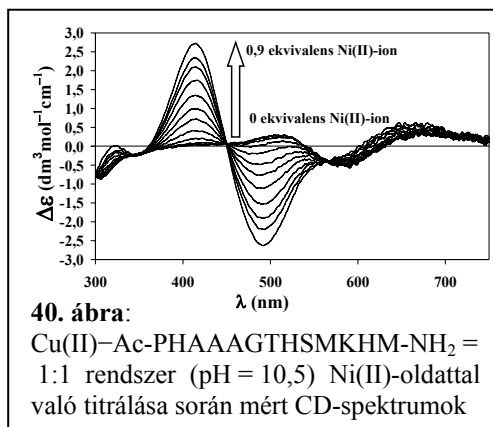


39. ábra:
 $\text{Ni(II)-Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH}_2$
rendszer CD spektrumának változása
növekvő Ni(II) ion koncentráció hatására
(pH = 10,5)

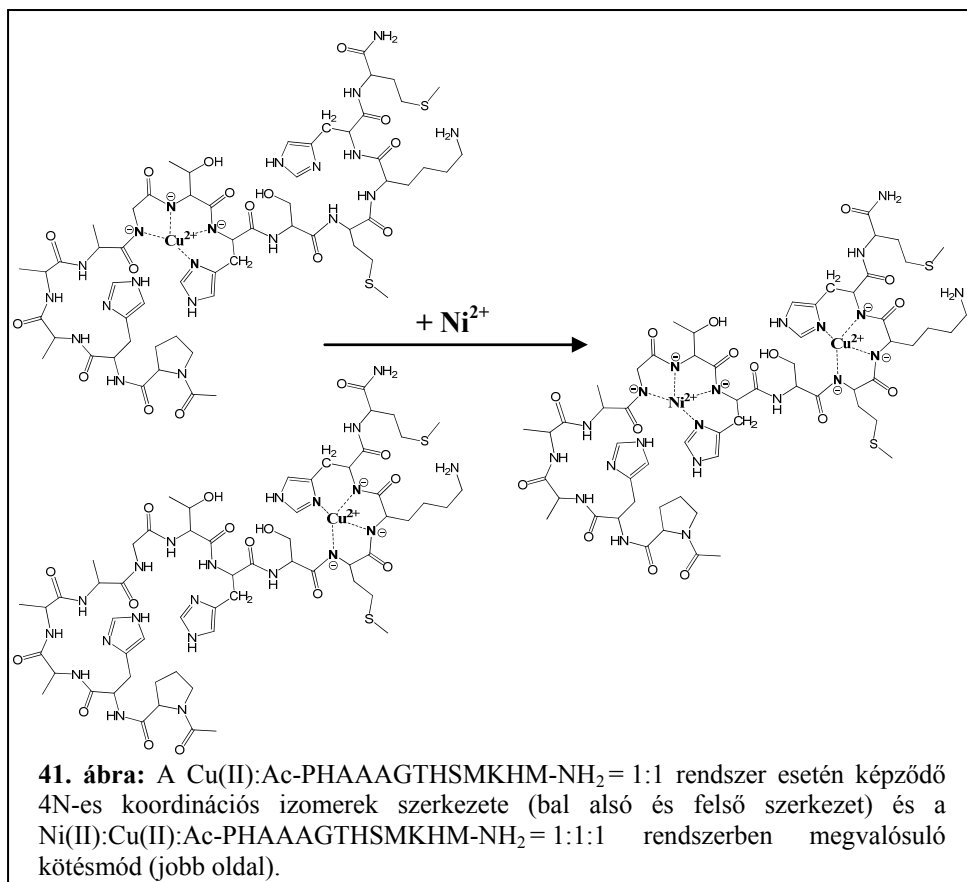
$\text{Ni(II)-Ac-GTHS-NH}_2$ rendszeréhez hasonló, ami arra enged következtetni, hogy az első ekvivalens nikkell(II)ion a H96-t reprezentáló -GTHS- szekvenciához kötődik. Az egyre növekvő nikkell(II)ion koncentráció hatására az intenzitások csökkennek, amit azzal magyarázhatunk, hogy az -MKHM- szekvenciához kötődő nikkell(II)ion ellentétes CD aktivitást eredményez, így csökkenti a jelek intenzitását.

Nikkel(II)/réz(II) vegyes fémkomplexek

Az $\text{Ac-PHAAAGTHSMKHM-NH}_2$ tridekapeptid Cu(II) - és Ni(II) -törzsrendszereinél azt tapasztaltuk, hogy a réz(II)ionból képes három ekvivalensnyit megkötni, a nikkell(II)ionból azonban csak kettőt. Részletesen a $\text{Ni(II):Cu(II):L} = 1:1:1$ rendszer vegyes fémkomplexeit tanulmányoztuk, mivel a ligandum nem tudja oldatban tartani a három ekvivalens fémiont, ha az nem csupán Cu(II) -ion. A 8,0-as pH felett megjelenő, valószínűleg nikkell(II)-hidroxid csapadék megjelenése miatt a képződő komplexek stabilitási állandóit nem tudtuk meghatározni. Azonban a pH emelkedésével a csapadék visszaoldódott és nagy



spektruma szerint a réz(II)ion összemérhető mennyiségben van jelen a két külső hisztidint modellező aminosav-szekvenciánál (-GTHS-, -MKHM-), a megvalósuló szerkezeteket a 41. ábra szemlélteti (bal oldali szerkezetek).



A 40. ábrán megfigyelhető, hogy a jelenlevő réz(II)komplexek CD spektrumára fokozatosan ráépül a sokkal nagyobb intenzitású nikkel(II)-koordinációra jellemző CD jel. Az uralkodó jellegű vegyes fémkomplexben megvalósuló kötésmódokat a 41. ábra jobb oldalán láthatjuk. A nikkel(II)ion nem szorítja ki a réz(II)ionokat, viszont átrendezi az eloszlását a rendelkezésre álló kötőhelyek között.

4.2.4. DFT számítások

Egy nemzetközi együttműködés keretein belül az ESR mérések mellett DFT számításokra is lehetőség nyílt, amelyek segítettek megérteni ennek a fémion-szelektivitásnak az eredetét. A DFT számításokat Olaszországban a Sassari Egyetemen végezték a kutatócsoportunkkal szakmai együttműködésben álló bioszervetlen kutatócsoport tagjai, Dr. Eugenio Garribba és Dr. Daniele Sanna.

A számítások síknégyszetes és (torzult) négyszetes piramisos geometriájú nikkel(II)- és réz(II)komplexek esetén történtek, ahol a ligandumok $\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$ (A) és $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$ (B) tetrapeptidek, valamint a kérdéses komplexekben ($\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációs mód valósul meg.

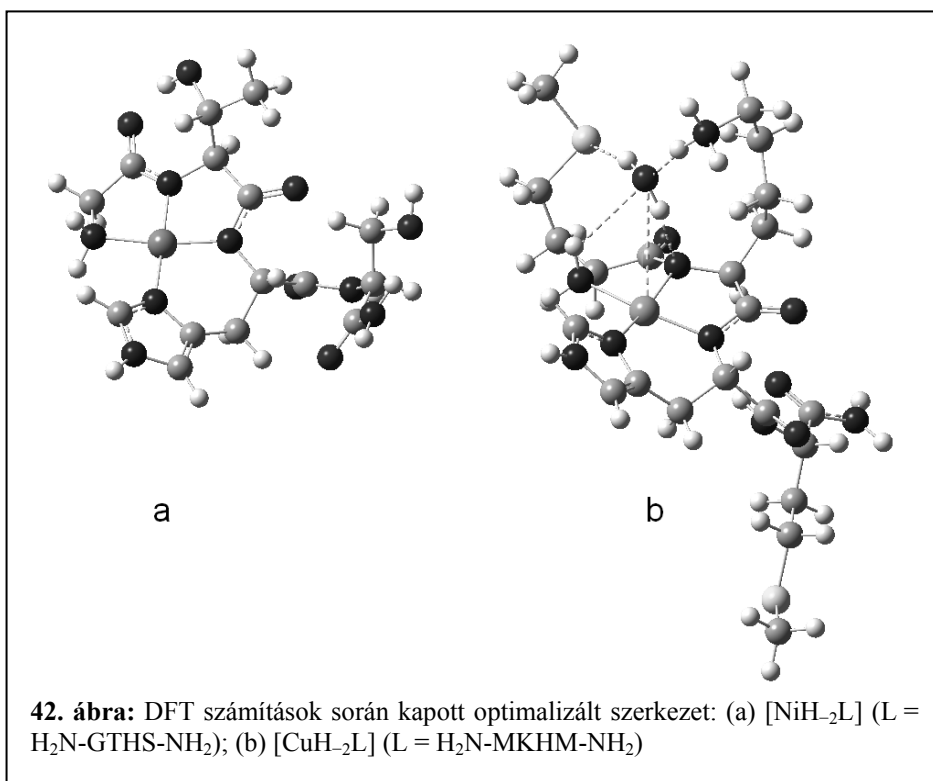
14. Táblázat: DFT számítások eredménye
(A = $\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$; B = $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$)

REAKCIÓK	ΔG^{total} (kJ/mol)
$[\text{NiH}_2\text{A}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{NiH}_2\text{A}(\text{H}_2\text{O})]$	35,1
$[\text{NiH}_1\text{B}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{NiH}_1\text{B}(\text{H}_2\text{O})]$	7,0
$[\text{NiH}_2\text{A}] + [\text{BH}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{NiH}_1\text{B}(\text{H}_2\text{O})] + [\text{A}]$	14,2
$[\text{CuH}_2\text{A}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuH}_2\text{A}(\text{H}_2\text{O})]$	20,1
$[\text{CuH}_1\text{B}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuH}_1\text{B}(\text{H}_2\text{O})]$	-21,5
$[\text{CuH}_2\text{A}] + [\text{BH}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuH}_1\text{B}(\text{H}_2\text{O})] + [\text{A}]$	-9,9

A 14. táblázatban látható adatokat röviden összefoglalva elmondható, hogy a Ni(II)-komplexeznél nagyon kedvezőtlen hatással van egy vízmolekula hozzáadása a síknégyszetes komplexhez (a $\Delta G^{\text{tot}}_{\text{aq}}$ értékek alapján), $\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$ esetén sokkal kedvezőtlenebben hat, mint $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$ ligandum esetén. A Cu(II)-

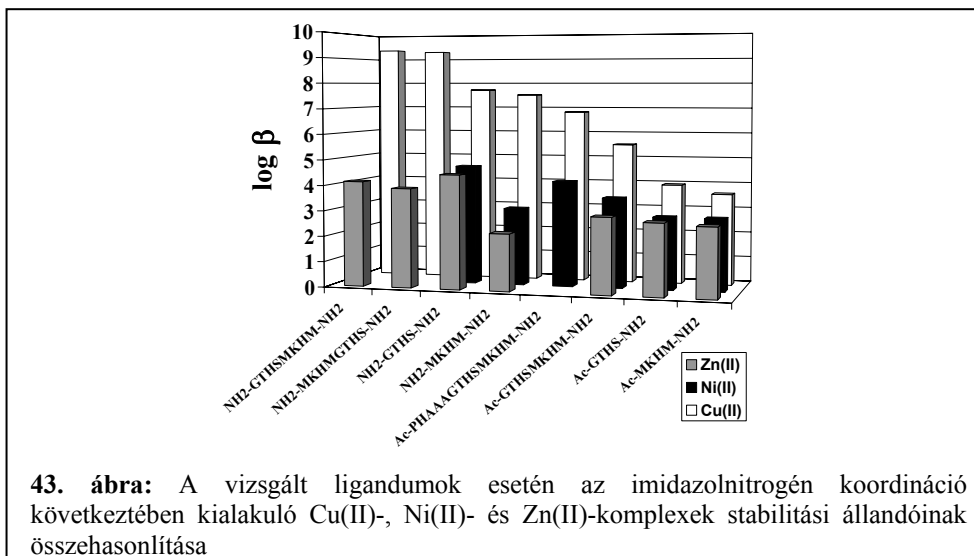
komplexekeket illetően az értékek azt mutatják, hogy egy vízmolekula hozzáadása a síknégyzetes komplexhez kedvezőtlenül hat a $\text{H}_2\text{N-GTHS-NH}_2$ ligandummal képződő $[\text{CuH}_2\text{A}]$ részecskére, viszont kedvező a $[\text{CuH}_2\text{B}]$ esetén, ahol a ligandum $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$. A számításokat követően meghatározott optimalizált szerkezetet láthatjuk a 42. ábrán.

Azt tapasztaltuk, hogy a -GTHS- szekvencia jobban megfelel a Ni(II)-komplexekekre jellemző szabályos síknégyzetes geometria kialakulásához. A 42.a ábrán is látható, hogy a nikkel(II)ion körül ilyen módon helyezkednek el a donoratomok. Ezzel szemben az -MKHM- szekvencia jobban kedvez olyan Cu(II)-komplexeke kialakulásának, ahol a Cu(II)-ion körül öt donoratom található a koordinációs szférában, ebből az ekvatoriális síkban egy amino-, két amid- és egy imidazolnitrogén, valamint axiálisan egy (az intramolekuláris hidrogénkötés-rendszerbe beépült) vízmolekula oxigénje (42.b ábra).



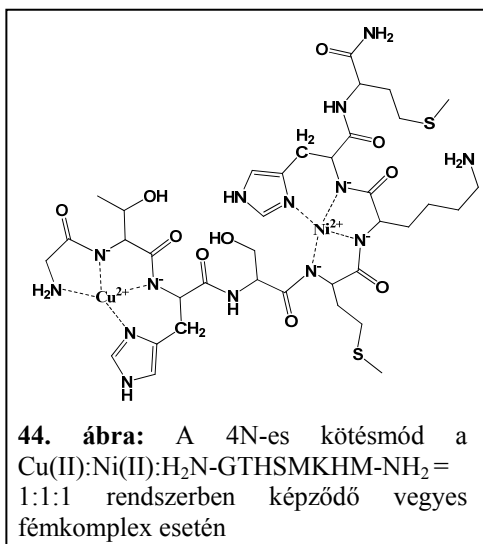
4.2.5. A modellpeptidek vizsgálata során kapott eredmények összefoglalása

A prion peptidfragmensek komplexkémiai viselkedését modellező egy, kettő, illetve három hisztidint tartalmazó peptidek Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-rendszerének vizsgálata során kimutattuk, hogy a peptidek fémion-szelektivitását az aminosav-szekvencia lényegesen befolyásolja és a képződő komplexek stabilitása megfelel az Irving-Williams sornak. A vizsgált peptidek Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionokat tartalmazó rendszerében fiziológiás pH-tartományban az imidazolnitrogének koordinációjával megvalósuló komplexek stabilitási állandóinak összehasonlítását mutatja a 43. ábra. Ez az összehasonlítás tovább erősíti az irodalomban is fellelhető eddigi tapasztalatokat, amely szerint (1) az imidazolnitrogének száma befolyásolja a fémkomplexek stabilitását (minél nagyobb, annál stabilisabb), valamint (2) a kettős horgony donor ($\text{NH}_2, \text{N}_{\text{Im}}$) jelenléte megnöveli a képződő komplex stabilitását.



43. ábra: A vizsgált ligandumok esetén az imidazolnitrogén koordináció következtében kialakuló Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-komplexek stabilitási állandóinak összehasonlítása

A szabad N-terminussal rendelkező peptidek nagy affinitást mutatnak a Cu(II)- és Ni(II)-ionok felé, mivel szekvenciájuk megfelel az ATCUN motívumnak, azaz albuminszerű szekvenciával rendelkeznek (terminális $-\text{NH}_2$ csoport és 3. pozícióban hisztidin). Ezekben az esetekben az elsődleges fémionkötőhely az aminos csoport és az ahhoz legközelebbi hisztidil-oldallánc, az így kialakuló komplexekben ($\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötőmód alakul ki az amidnitrogének



koordinációját követően. Az oktapetidek esetében a 7. pozícióban lévő hisztidin körül az előzőtől eltérő koordinációs környezet alakul ki, a második ekvivalens Cu(II)- , illetve Ni(II)-ion ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötésmóddal kötődik ezen a részen.

Vegyes fémiontartalmú rendszerekben a Cu(II)-ion teljes mértékben az N-terminális aminosoporthoz közelebbi hisztidinhez kötődik ($\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációs móddal, míg a távolabbi hisztidinhez a Ni(II)-ion ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötésmóddal (44. ábra). Fontos

kiemelni, hogy a különböző koordinációs mód ellenére, ugyanaz a fémionpreferencia valósul meg, mint a nagy tagszámú prion peptidfragmensek esetén. Azaz a Ni(II)-ionok a H96-t tartalmazó szekvenciával, a Cu(II)-ionok a H111-et modellező szekvenciával képeznek stabilisabb komplexeket.

Az N-terminuson védett származékok esetén csak egyféle koordinációs környezet valósulhat meg a 4N-es komplexekben ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$). Ezek eredményeit összefoglalva megállapítottuk, hogy a külső hisztidinek (H96 és H111) a réz(II)ion számára az elsődleges, a nikkell(II)ion részére pedig kizárólagos kötőhelyek, amelyek egyben független kötőhelyeknek is minősülnek. A fémeket és ligandumokat azonos arányban tartalmazó rendszereket tanulmányozva kiderült, hogy preferencia figyelhető meg a kötőhelyek irányában. Nevezetesen a nikkell(II)ion kedvezményezett kötőhelye mindig a H96-t modellező -GTHS-szekvencia, míg a réz(II)ion azonos mértékben oszlik meg a -GTHS- és -MKHM-szekvenciák között.

A preferencia elsődleges okaként a két fém közötti koordinációs geometriában megnyilvánuló különbséget említhetjük. Amíg a nikkell(II)ion a síknégyszetes geometriát, addig a réz(II)ion a síknégyszeteshez ugyan hasonló, de torzult oktaéderes geometriát kedveli, tehát érthető, hogy a nikkell(II)ion kedvezőbben kötődik a rövidebb oldalláncokat tartalmazó -GTHS- szekvenciánál; a réz pedig előnyben részesíti az axiális koordinációra hajlamos, hosszabb oldalláncokat tartalmazó -MKHM- szekvenciát. Ezeket a megállapításokat a DFT számolások is alátámasztották.

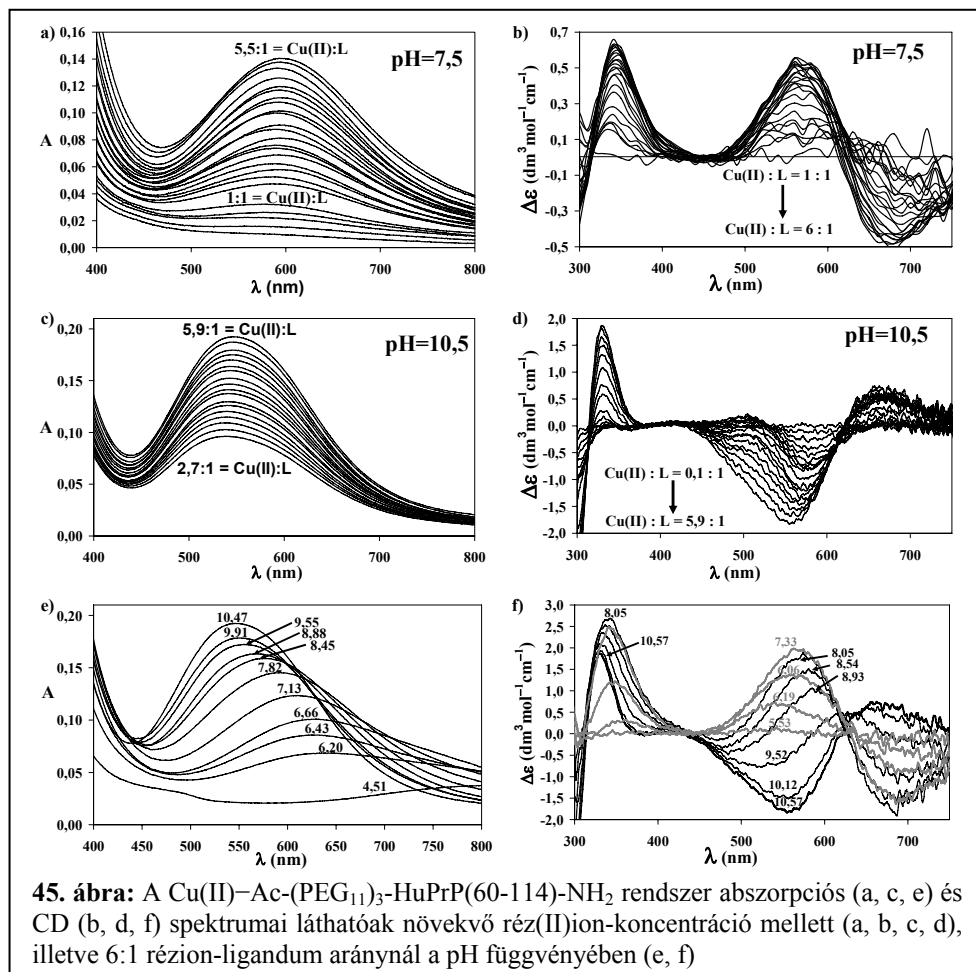
A két fémion konkrét százalékos eloszlása a modellpeptidek kötőhelyei között nem teljesen ugyanaz, mint a prion peptidfragmenseknél, ami arra enged következtetni, hogy nem kizárólag a közvetlen kapcsolatot biztosító aminosav-szekvenciától függ a fémion-szelektivitás, hanem a távoli oldalláncok is befolyásoló szerephez jutnak. Azaz a réz(II)ion kötődése egyaránt függ a közvetlen és a távoli aminosavaktól is. Ennek feltérképezése egy további lehetséges kutatási útvonalat nyithat meg.

4.3. A hat hisztidint tartalmazó prion peptidfragens réz(II)komplexei

A prion peptidfragmensok és a modellpeptidek komplexképződési vizsgálataiból levont következtetések minden esetben olyan peptidekre vonatkoznak, amelyek a kötőhelyeknek csak egy részét tartalmazzák. Ezért olyan prion peptidfragens feltérképező vizsgálatát kezdtük el, amely a prion fehérje rendezetlen tartományában lévő valamennyi kötőhelyet tartalmazza. Így került sor az összesen hat hisztidint tartalmazó HuPrP(60-114) prion peptidfragens szintézisére egy külföldi tanulmányút során (Catania, Olaszország). Ez a ligandum tartalmazza mind a négy oktarepeat tartománybeli hisztidint (H61, H69, H77, H85), valamint az ezen kívüli két hisztidint (H96, H111).

A ligandummal kapcsolatban első lehetséges probléma az oldékonyság kérdése volt. Korábban az oktarepeat tartomány vizsgálatánál kiderült, hogy ez a rész nem oldódik vízben. Ezzel szemben azok a prion peptidfragmensok, amelyek külső hisztidint is tartalmaznak, nagyon jól oldódtak vízben. Esetünkben az oktarepeat tartományon kívüli rész jelenléte ellenére is vízoldhatósági problémába ütköztünk. Ennek kiküszöbölésére a szekvencia polietilén-glikol láncsal ellátott N-terminális véggel rendelkező származékára volt szükség, amely elősegíti a peptid oldódását vízben. Többszöri szintézis után az Ac-(PEG₁₁)₃-HuPrP(60-114)-NH₂ peptidszármazék mutatott megfelelő oldékonyságot a vizsgálataink kivitelezéséhez. Mindezek ellenére a konkrét oldategyensúlyi viszonyokat nem állt módunkban jellemezni, mert a ligandum csak savas pH-tartományban oldódik jól vízben, pH 5,0 felett az imidazolnitrogének deprotonálódásával egyidejűleg finomeloszlású csapadék jelenik meg az oldatban, amely nem oldódik vissza a lúgos pH-tartományban. A csapadék ellenére a spektroszkópai vizsgálatok kivitelezhetőek voltak. A 45. ábrán a Cu(II)-Ac-(PEG₁₁)₃-HuPrP(60-114)-NH₂ rendszer abszorpciós (*a*, *c*, *e*) és CD (*b*, *d*, *f*) spektrumai láthatóak növekvő réz(II)ion koncentráció mellett (*a*, *b*, *c*, *d*), illetve a 6:1 rézion-ligandum arány esetén a pH függvényében (*e*, *f*). Az 1:1 réz(II)ion-ligandum arány 7,5-ös pH-értéknél (*a*) megjelenő 600 nm körüli, kis intenzitású abszorpciós maximuma arra utal, hogy imidazolnitrogén donortomok találhatóak a réz(II)ion koordinációs szférájában. Ez összhangban van a csekély CD aktivitással is (*b*). 10,5-ös pH-értéknél (*c*) látható abszorpciós sáv a réz(II)ionhoz koordinált amidnitrogének jelenlétét támasztja alá, amelyet a CD (*d*) spektrumok is tovább erősítenek. A Cu(II)-Ac-(PEG₁₁)₃-HuPrP(60-114)-NH₂ = 6:1 rendszer pH-függő abszorpciós (*e*) és CD spektruma (*f*) szerint a pH növekedésével egy szerkezeti átrendeződés

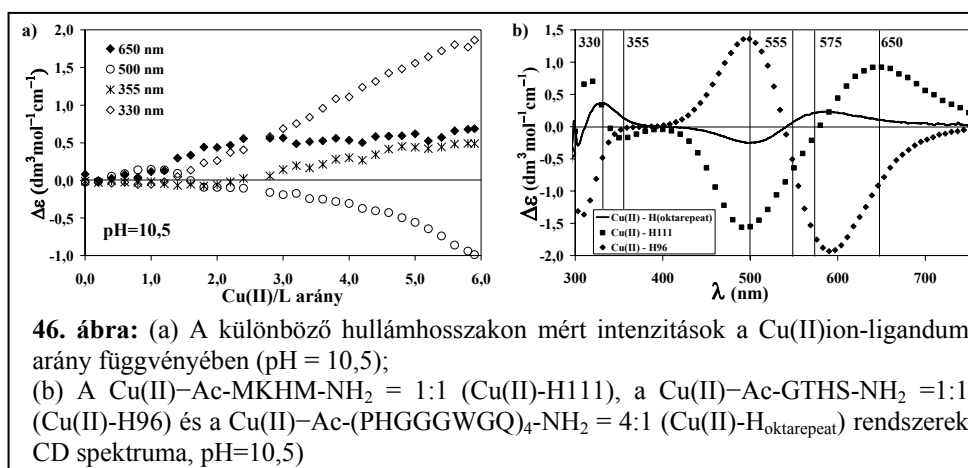
következik be. Az abszorpciós maximum folyamatos kékeltolódása és a CD spektrumban megjelenő jelek egyértelműen a deprotonálódott amidnitrogének koordinációját jelzik.



Az előbb említett vizsgálatokból megállapíthatjuk, hogy a réz(II)komplexek szerkezete erősen függ a pH-tól és a réz(II)ion-koncentrációjától. Kis réz(II)ion-koncentráció mellett fiziológiás pH-tartományban makroelát szerkezetű részecskék jelenléte a meghatározó, ahol egyszerre több imidazolnitrogén koordinálódik egyetlen fémionhoz. Ezek az imidazolnitrogének egyaránt lehetnek oktarepeatbeli és külső hisztidinek funkciós csoportjai. A makroelát ezen koordinációs izomereit a jelenleg rendelkezésre álló módszerekkel nem áll

módunkban tanulmányozni. A makrokelát szerkezet nagy stabilitása következtében széles pH-tartományban uralkodó jellegű, és az amidnitrogének deprotonálódása nagyobb pH-értékekre tolódik el. A réz(II)ion-koncentráció növelése megtöri ezt a makrokelát szerkezetet, és az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja semleges, majd savas pH-tartományban következik be, a réz(II)ionok mennyiségének növekedésével párhuzamosan.

A CD spektrumok összehasonlítása a korábban vizsgált prion peptidfragmensek, illetve modellpeptidek CD spektrumaival lehetőséget nyújtanak a koordinációs izomerek vizsgálatára. A 46. ábra a) diagramján 10,5-ös pH-értéken, különböző hullámhosszakon mért CD intenzitások láthatók a réz(II)ion-ligandum arány függvényében. A b) diagramon az összehasonlításához használt rendszerek (Cu(II)–Ac-MKHM-NH₂ = 1:1 /Cu(II)-H111/, Cu(II)–Ac-GTHS-NH₂ = 1:1 /Cu(II)-H96/ és Cu(II)–Ac-(PHGGGWGQ)₄-NH₂ = 4:1 /Cu(II)-H_{oktarepeat}/) CD spektrumaik vannak feltüntetve 10,5-ös pH-értéken. A 650 nm-nél jelentkező pozitív Cotton-effektus a Cu(II)-H111 koordinációhoz rendelhető (b) diagram. A 46.a ábra szerint a 650 nm-nél (◆) jelentkező pozitív sáv intenzitása 2:1 réz(II)ion-ligandum arányig növekszik, majd további réz(II)ion-ligandum arány növekedése nem okoz számottevő változást, ami arra enged következtetni, hogy a H111 kötőhely az első két ekvivalens réz(II)ion hozzáadására telítődik.



A 46.a ábrán az 500 nm (○) hullámhossznál megjelenő CD aktivitás először kissé pozitív, majd fokozatosan csökken. Ezen a hullámhosszon csak a Cu(II)-H96 kölcsönhatás rendelkezik pozitív Cotton-effektussal, amiből arra lehet

következtetni, hogy az első ekvivalens réz(II)ion a H96-hoz kötődik. Az is megfigyelhető, hogy 330 nm-nél ($\diamond$) az intenzitás értékek 2:1 fémion-ligandum arány felett nőnek jelentősen. Ezen a hullámhosszon pozitív csúcsot ad a Cu(II)-H_{oktarepeat} és a Cu(II)-H96, negatív pedig a Cu(II)-H111 kölcsönhatás. A 2:1 arány feletti intenzitásnövekedés magyarázható azzal, hogy az első két ekvivalens réz(II)ion a H96 és H111 helyekhez kötődik, amelyek azonos nagyságú, de ellentétes CD aktivitással rendelkeznek, így azok kioltják egymást, majd a további réz(II)ionok az oktarepeat tartománybeli hisztidinekhez kötődnek, amelyek 330 nm-nél mutatnak pozitív CD aktivitást. Hasonló következtetést vonhatunk le a 355 nm-nél ($\ast$) látható CD jel intenzitásváltozásából, mivel itt a Cu(II)-H96 mutat negatív CD aktivitást, az oktarepeatbeli pedig pozitívat. Arra következtethetünk, hogy először a H96 és a H111 koordinálódik a réz(II)ionhoz, majd ezt követően az oktarepeat tartománybeli hisztidinek is.

Ugyan az oldategyensúlyi viszonyok jellemzése nem történt meg, de összevetve a tanszéken korábban vizsgált prion peptidfragmensek eredményeivel, valamint a vizsgált modellpeptidek eredményeivel, megállapíthatjuk, hogy alacsony réz(II)ion-koncentráció mellett (azaz 1:1 rézion-ligandum aránynál, ami a hisztidinekre nézve valójában 1:6 rézion-hisztidin arányt jelent) fiziológias pH-n stabilis makrokelát szerkezetű komplexek képződnek. Biológiai körülmények között is ez valószínűsíthető, mivel a réz mennyisége általában kevesebb a fehérjékhez viszonyítva. Ez a gombolyagszerű makrokelát szerkezet olyan stabilis, hogy lúgos pH-tartományba tolja el az amidnitrogének deprotonálódását és koordinációját. Nagyobb réz(II)ion-koncentráció mellett (azaz 1:1 rézion-hisztidin aránynál) megfigyelhető, hogy az amidnitrogének koordinációja már fiziológias pH-ra bekövetkezik. Azaz a réz(II)ion mennyiségének növelésével az amiddeprotonálódás és koordináció egyre kevésbé lúgos, majd semleges pH-ra tolódik el.

A CD spektroszkópiás összehasonlítások alapján elmondható, hogy nagy pH-értékeken a réz(II)ionok kedvezőbben kötődnek a külső (H96, H111) hisztidinekhez.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A doktori munkám során a prion betegségekkel összefüggésbe hozható prion fehérje N-terminális rendezetlen régiójában található kötőhelyek fémion-szelektivitását tanulmányoztuk. Ehhez hisztidintartalmú prion peptidfragmensek nikkel(II)ionokkal, illetve nikkel(II)/réz(II)ionokkal alkotott vegyes rendszereinek, valamint a kötőhelyeket modellező peptidek réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionokkal alkotott rendszereinek az oldategyensúlyi vizsgálatát végeztük el.

Munkánk *első részében* célunk volt a prion peptidfragmensek nikkel-kötőképességének vizsgálata, valamint a vegyes réz(II)/nikkel(II) rendszereiben zajló komplexképződési folyamatok tanulmányozása. A munka *második részében* célul tűztük ki annak a tanulmányozását, hogy milyen tényezők befolyásolják az eltérő szelektivitást, illetve a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplex, valamint vegyes magvú nikkel(II)/réz(II)komplexek képződését az egyes kötőhelyeket modellező egy, kettő, illetve három hisztidint tartalmazó modellpeptidekben.

A ligandumok protonálódási állandóit és a különböző sztöchiometriájú fémkomplexek stabilitási állandóit pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg. A kialakuló szerkezetek igazolására spektrofotometriát, CD, ^1H NMR és ESR spektroszkópiát alkalmaztunk. A koordinációs izomerek tanulmányozásához CD spektroszkópiás összehasonlításokat végeztünk.

A vizsgálataink során megállapítottuk, hogy réz(II)- és nikkel(II)ionok számára is az oktarepeaten kívüli hisztidinek (H96, H111) az elsődleges kötőhelyek. Mindkét fémion esetében jellemző a makrokelát szerkezetű komplexek megjelenése, majd a pH növekedésével az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja, amely következtében a 4N-es komplexekben ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációs mód valósul meg. A réz(II)- és nikkel(II)ion között mutatkozó nagy hasonlóság alapján elmondható, hogy a nikkel(II)ion valóban alkalmazható szerkezeti modellként az egyes kötőhelyek tanulmányozására. Ugyanakkor a különbségeket sem szabad figyelmen kívül hagyni. Például minden esetben a réz(II)ion képez stabilisabb komplexeket. Ezen kívül a nikkel(II)ion esetén minimum két hisztidin jelenléte szükséges, hogy a stabilis makrokelát szerkezet oldatban tudja tartani a fémiont. Továbbá a 4N-es komplexek a réz(II)ion esetén alacsonyabb pH-értéken képződnek.

A réz(II)- és a nikkel(II)ion esetén is a külső hisztidinek játszanak meghatározó szerepet a koordinációban. Viszont ezeken belül egy fordított preferencia figyelhető meg a kötőhelyek irányában. Ez a fordított preferencia nem csak a prion

peptidfragmenseknél jelentkezik, hanem az előállított modellpeptideknél is hasonló tapasztaltunk. Elsődleges okként a két fémion közötti koordinációs geometriában megnyilvánuló különbség említhető. Amíg a nikkel(II)ion mindig szigorúan a síknégyzetes geometriát, addig a réz(II)ion a síknégyzeteshez hasonló, de torzult oktaéderes geometriát kedveli. Ennélfogva érthető, hogy a nikkel(II)ion kedvezőbben kötődik a rövidebb oldalláncokat tartalmazó -GTHS- szekvenciához; ezzel szemben a réz(II)ion előnyben részesíti az axiális koordinációra hajlamos, hosszabb oldalláncokat tartalmazó -MKHM- szekvenciát. Ezeket a megállapításokat a DFT számolások is alátámasztották. A fémionok konkrét százalékos eloszlása a modellpeptidek kötőhelyei között nem teljesen ugyanaz, mint a prion peptidfragmenseknél, ami arra enged következtetni, hogy (főként a réz(II)ion esetében) nem csak a közvetlen kapcsolatot biztosító aminosav-szekvenciától függ a fémion-szelektivitás, hanem a távoli oldalláncok is befolyásoló szerephez jutnak.

A prion fehérje rendezetlen tartományában lévő összes kötőhelyet tartalmazó peptidfragmensének feltérképező vizsgálata során egyszerre tanulmányozhattuk a prion fehérje rendezetlen régiójának tényleges kötőhelyeit. Az oldhatósági problémák miatt arra nem volt lehetőségünk, hogy az összes hisztidint tartalmazó prion peptidfragmens konkrét oldategyensúlyi viszonyait jellemezzük, de a réz(II)iont is tartalmazó minták spektroszkópiai vizsgálatából kiderült, hogy a képződő komplexek összetételét a pH és a fémion-koncentráció jelentősen befolyásolja; valamint ugyanazok a kötési preferenciák valósulnak meg, mint amit korábban is tapasztaltunk a prion peptidfragmenseknél. 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. A pH növekedésével párhuzamosan pedig bekövetkezik az amidnitrogének deprotonálódása és koordinációja. Ezen felül itt is egy kötési preferencia figyelhető meg a külső hisztidinek irányába.

Ezen vizsgálatok alátámasztják a prion peptidfragmensek kiugró affinitását a réz(II)ionok irányába, valamint a nikkel(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 a különböző kötőhelyek eltérő fémion-affinitásának értelmezéséhez, valamint 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.

6. SUMMARY

During my PhD work I studied the metal ion selectivity of the binding sites at the unstructured N-terminal region of the prion protein related to prion diseases. Solution equilibrium studies on complexes formed between four prion peptide fragments and Ni(II), Ni(II)/Cu(II) or in one case Cu(II) ions have been performed. Afterwards we studied the interaction between nine histidine containing model peptides and Cu(II), Ni(II) and Zn(II) ions and in the case of multihistidine peptides the Ni(II)/Cu(II) mixed metal systems also.

Our aims were to characterize the nickel(II) binding affinity of the prion peptide fragments and the complex formation processes in the Ni(II) and in the Ni(II)/Cu(II) mixed metal – peptide systems. In the second phase of the work we studied the factors influencing the metal selectivity and the Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Ni(II)/Cu(II) mixed complex formation processes with one, two and three histidine containing peptides modelling the binding sites of the prion protein.

The protonation constants of the ligands and the stability constants of the various copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes were determined by potentiometric titration. The structures of the complexes were confirmed by UV-vis, CD, ^1H NMR and EPR spectroscopy, and then we performed CD spectroscopic comparisons to study the coordination isomers.

In our research we have stated that the histidines outside the octarepeat (H96, H111) are the primary binding sites for Cu(II) and Ni(II) ions. In the case of both metal ions the formation of macrochelates is characteristic at low pH which is followed by the deprotonation and coordination of amide nitrogens with increasing pH resulting in 4N complexes with $(3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ coordination mode. On the basis of the high similarity between the Cu(II) and Ni(II) ion we can state that the Ni(II) ion can be applied effectively as a model for Cu(II) ion in the studies of certain binding sites. At the same time we can not ignore the differences. For instance, in all cases the Cu(II) forms more stable complexes than Ni(II), besides for Ni(II) at least two histidines are necessary for forming stable macrochelate while keeping the metal ion in solution. Furthermore the 4N Cu(II) complexes are formed at lower pH than that of Ni(II) complexes.

In the case of both metal ions the histidines outside the octarepeat play a key role in the coordination, but within this a reverse preference can be observed towards the direction of binding sites. This reverse preference exists not only in the case of the prion fragments but also in the case of the model peptides also. Its

primary cause can be the distinction between the coordination geometry of the two metal ions. While the Ni(II) ion prefers square planar geometry strictly, the Cu(II) ion prefers distorted octahedral that geometry similar to the square planar one. Therefore it is understandable that Ni(II) is bound more favourably to -GTHS-sequence containing short side chains; in contrast Cu(II) favours -MKHM-sequence containing longer side chains that tend to coordinate axially. These statements are supported by DFT calculations. The concrete distribution of metal ions among the binding sites of model peptides is not exactly the same, which led us to the conclusion that in the case of Cu(II) the selectivity depends not only on the neighbouring amino acids but the distant amino acids also have an influencing role.

With the study of the prion peptide fragment containing all the N-terminal binding sites we had the opportunity to investigate the actual binding sites at the same time. Because of the solubility problem we were not able to give the full characterization of its solution equilibrium, but from the spectroscopic studies of the Cu(II) ion containing samples it is clear that the composition of the complexes strongly depends on the pH and concentration of the metal ion. Furthermore the same coordination preferences exist as found earlier in the case of the prion peptide fragments. At physiological pH the presence of species containing macrochelate is dominant, in the coordination sphere of Cu(II) ion there are only imidazole nitrogens of histidines both from inside and outside of octarepeat. Parallel with increasing pH the deprotonation and coordination of amide nitrogens take place. Moreover, a binding preference can be observed in the direction of histidines outside the octarepeat.

These studies support the high Cu(II) ion affinity of prion peptide fragments and the Ni(II) ion can be effectively applied as a structural model for the comparisons. In the case of Zn(II) ion binding, however, only slight interaction can be detected. This observation strengthens the assumption further, that if the metal ions take part in the biological function of the prion protein, the Cu(II) ion has a primary role in this field.

Our results contribute to the better understanding of the factors influencing the metal ion binding of the proteins related to the neurodegenerative disorders (*e.g.* Alzheimer disease, Parkinson disease, prion disease). These can provide valuable information for biological investigations aimed at determining the cause of neurodegenerative diseases. They may also provide information for planning new

and more efficient medicines and therapies for the treatment of patients suffering from neurodegenerative disorders.

7. IRODALOMI HIVATKOZÁSOK

1. N.N. Greenwood; A. Earnshaw *Az elemek kémiája*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, (1999).
2. K.D. Karlin; Z. Tyeklar (eds.), *Bioinorganic chemistry of copper*, Chapman and Hall, New York, (1993).
3. W. Kaim; B. Schwedersk "Bioinorganic chemistry" in *Inorganic elements in the chemistry of life*, Wiley, Chichester, 187-214 rézre, 242-266 cinkre (1994).
4. M.C. Linder, *Biochemistry of copper*, Plenum Press, New York, (1991).
5. T. Kiss; T. Gajda; B. Gyurcsik, *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, (2007).
6. H. Sigel "Nickel and its role in biology" in *Metal ions in biological systems*, Dekker, New York, 23, (1988).
7. N.E. Dixon; R.L. Blakeley; B. Zerner "Jack bean urease (ec 3.5.1.5). 1. A simple dry ashing procedure for the micro-determination of trace-metals in proteins - the nickel content of urease" *Canadian Journal of Biochemistry*, 58, 469-473 (1980).
8. J.R. Lancaster (ed.), *The bioinorganic chemistry of nickel*, VCH, Weinheim, (1988).
9. 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).
10. A.S. Prasad, *Biochemistry of zinc*, Plenum Press, New York, (1993).
11. D. Bryce "Zinc deficiency - the neglected factors" *Chemistry in Britain* 25, 783-786 (1989).
12. 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).
13. 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).
14. 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).
15. I. Sóvágó "Coordination equilibria in biologically active systems" in *Biocoordination chemistry*, K. Burger (Ed) Ellis Horwood, Chichester, Ch. 4, 135-184 (1990).
16. L.D. Pettit; J.E. Gregor; H. Kozłowski "Complex formation between metal ions and peptides" in *Perspectives in bioinorganic chemistry*, R. W. Hay; J. R. Dilworth; K. B. Nolan (Eds) Jai Press Ltd., London, 1, (1991).
17. L.D. Pettit; R. L.A. "Metal-peptide complex formation" in *Handbook of metal-ligand interaction in biological fluids*, G. Berthon (Ed) Marcel Dekker Inc., New York, Ch. 2, 1, 636-647 (1995).
18. H. Kozłowski; W. Bal; M. Dyba; T. Kowalik-Jankowska "Specific structure-stability relations in metallopeptides" *Coordination Chemistry Reviews*, 184, 319-346 (1999).
19. I. Sóvágó; K. Ósz "Metal ion selectivity of oligopeptides" *Dalton Transactions*, 3841-3854 (2006).
20. 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).
21. T. Kiss "Coordination equilibria in biologically active systems" in *Biocoordination chemistry*, K. Burger (Ed) Ellis Horwood, Chichester, Ch. 3, 56-134 (1990).
22. S.H. Laurie "Bioinorganic chemistry" in *Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids*, G. Berthon (Ed) Marcel Dekker Inc., New York, Ch. 2, 1, 603-619 (1995).
23. 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).

24. 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).
25. 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).
26. 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).
27. G. Brookes; L.D. Pettit "Thermodynamics of formation of complexes of copper(II) and nickel(II) ions with glycylhistidine, β -alanylhistidine, and histidylglycine" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 2112-2117 (1975).
28. I. Sóvágó; E. Farkas; A. Gergely "Studies on transition-metal-peptide complexes. 7. Copper(II) complexes of dipeptides containing L-histidine" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 2159-2163 (1982).
29. 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).
30. 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. 21. The complexation of zinc by glycylhistidine and alanylhistidine peptides" *Journal of the American Chemical Society*, 107, 6435-6439 (1985).
31. 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).
32. Y.Y. Fang; B.D. Ray; C.A. Claussen; K.B. Lipkowitz; E.C. Long "Ni(II) Arg-Gly-His - DNA interactions: Investigation into the basis for minor-groove binding and recognition" *Journal of the American Chemical Society*, 126, 5403-5412 (2004).
33. C. Conato; H. Kozłowski; P. Mlynarz; F. Pulidori; M. Remelli "Copper and nickel complex-formation equilibria with Lys-Gly-His-Lys, a fragment of the matricellular protein SPARC" *Polyhedron*, 21, 1469-1474 (2002).
34. G.F. Bryce; R.W. Roeske; F.R.N. Gurd "L-histidine-containing peptides as models for the interaction of copper(II) and nickel(II) ions with sperm whale apomyoglobin" *Journal of Biological Chemistry*, 241, 1072-1080 (1966).
35. S.L. Lau; T.P.A. Kruck; B. Sarkar "A peptide molecule mimicking the copper(II) transport site of human serum albumin" *Journal of Biological Chemistry*, 249, 5878-5884 (1974).
36. T.P.A. Kruck; S. Lau; B. Sarkar "Molecular design to mimic copper(II) transport site of human-albumin - studies of equilibria between copper(II) and glycylglycyl-L-histidine-N-methyl amide and comparison with human-albumin" *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 54, 1300-1308 (1976).
37. T. Gajda; B. Henry; A. Aubry; J.J. Delpuech "Proton and metal ion interactions with glycylglycylhistamine, a serum albumin mimicking pseudopeptide" *Inorganic Chemistry*, 35, 586-593 (1996).
38. E.K. Quagraine; H.B. Kraatz; R.S. Reid "Peptides mimicking the N-terminal Cu(II)-binding site of bovine serum albumin: Synthesis, characterization and coordination with Cu(II) ions" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 85, 23-32 (2001).
39. Y. Zhang; D.E. Wilcox "Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin" *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7, 327-337 (2002).
40. P. Mlynarz; D. Valensin; K. Kociolk; 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).

41. 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 alanylglycylhistamine, a mimicking pseudopeptide of the serum albumine N-terminal residue" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 1182-1192 (2005).
42. R. Sankaramakrishnan; 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).
43. 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 monoqua complex" *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 54, 1309-1316 (1976).
44. 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).
45. 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 [Ni^{II}(glycyl-glycyl-L-histidine)] occurs via Ni^{III} - X-ray crystal-structure of [Ni^{II}(glycyl-glycyl- α -hydroxy-D,L-histamine)] $\cdot$ 3H₂O" *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 1889-1890 (1994).
46. S.L. Best; T.K. Chattopadhyay; M.I. Djuran; R.A. Palmer; P.J. Sadler; I. Sóvágó; K. Várnagy "Gold(III) and palladium(II) complexes of glycylglycyl-L-histidine: Crystal structures of [Au^{III}(Gly-Gly-L-His-H₂)]Cl $\cdot$ H₂O and [Pd^{II}(Gly-Gly-L-His-H₂)] $\cdot$ 1.5H₂O and His ⁶NH deprotonation" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 2587-2596 (1997).
47. 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).
48. L.D. Pettit; S. Pyburn; W. Bal; H. Kozłowski; 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).
49. W. Bal; H. Kozłowski; 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).
50. M. Orfei; M.C. Alcaro; G. Marcon; M. Chelli; M. Ginanneschi; H. Kozłowski; 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).
51. M. Bataille; G. Formicka-Kozłowska; H. Kozłowski; 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).
52. 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).
53. D. Valensin; M. Luczkowski; F.M. Mancini; A. Legowska; E. Gaggelli; G. Valensin; K. Rolka; H. Kozłowski "The dimeric and tetrameric octarepeat fragments of prion protein behave differently to its monomeric unit" *Dalton Transactions*, 1284-1293 (2004).
54. D.R. Brown; H. Kozłowski "Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases" *Dalton Transactions*, 1907-1917 (2004).
55. P. Stanczak; M. Luczkowski; P. Juszczuk; Z. Grzonka; H. Kozłowski "Interactions of Cu²⁺ ions with chicken prion tandem repeats" *Dalton Transactions*, 2102-2107 (2004).
56. P. Stanczak; D. Valensin; P. Juszczuk; Z. Grzonka; C. Migliorini; E. Molteni; G. Valensin; E. Gaggelli; H. Kozłowski "Structure and stability of the Cu^{II} complexes with tandem repeats of the chicken prion" *Biochemistry*, 44, 12940-12954 (2005).

57. W. Bal; V. Karantza; E.N. Moudrianakis; K.S. Kasprzak "Interaction of nickel(II) with histones: In vitro binding of nickel(II) to the core histone tetramer" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 364, 161-166 (1999).
58. M. Mylonas; J.C. Plakatouras; N. Hadjiliadis "Interactions of Ni(II) and Cu(II) ions with the hydrolysis products of the C-terminal -ESHH-motif of histone H₂A model peptides. Association of the stability of the complexes formed with the cleavage of the -ES-bond" *Dalton Transactions*, 4152-4160 (2004).
59. C. Damante; K. Ósz; Z. Nagy; G. Pappalardo; G. Grasso; G. Impellizzeri; E. Rizzarelli; I. Sóvágó "Metal ion interactions within the 1-16 N-terminal region of β -amyloid" *Journal of Peptide Science*, 14, 87-87 (2008).
60. C.A. Damante; K. Ósz; 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 glycol-ylated analogue" *Inorganic Chemistry*, 48, 10405-10415 (2009).
61. É. Józsa; K. Ósz; C. Kállay; P. De Bona; C.A. Damante; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; I. Sóvágó "Nickel(II) and mixed metal complexes of amyloid- β N-terminus" *Dalton Transactions*, 39, 7046-7053 (2010).
62. C.E. Livera; L.D. Pettit; M. Bataille; B. Perly; H. Kozłowski; B. Radomska "A thermodynamic and spectroscopic study of the proton and copper(II) complexes of L-prolyl-L-histidine, D-prolyl-L-histidine, L-histidyl-L-histidine, and D-histidyl-L-histidine" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 661-666 (1987).
63. R.P. Agarwal; D.D. Perrin "Stability-constants of complexes of copper(II) and zinc(II) ions with histidylhistidine" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 89-92 (1976).
64. R. Vogler; H. Vahrenkamp "Zinc complexes of amino acids and peptides. Part 15. Dipeptides made up solely from histidine: Solution behaviour and zinc complexation" *European Journal of Inorganic Chemistry*, 761-766 (2002).
65. A. Myari; G. Malandrinos; Y. Deligiannakis; J.C. Plakatouras; N. Hadjiliadis; Z. Nagy; I. Sóvágó "Interaction of Cu²⁺ with His-Val-His and of Zn²⁺ with His-Val-Gly-Asp, two peptides surrounding metal ions in Cu,Zn-superoxide dismutase enzyme" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 85, 253-261 (2001).
66. A. Myari; G. Malandrinos; J. Plakatouras; N. Hadjiliadis; I. Sóvágó "Interaction of Cu(II) with His-Val-Gly-Asp and of Zn(II) with His-Val-His, two peptides at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase" *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 1, 99-112 (2003).
67. J. Ueda; N. Ikota; A. Hanaki; K. Koga "Copper(II) complexes of L-histidylglycyl-L-histidylglycine and L-histidyl-L-histidylglycylglycine - coordination mode of histidyl residues" *Inorganica Chimica Acta-Bioinorganic Chemistry*, 135, 43-46 (1987).
68. M. Casolaro; M. Chelli; M. Ginanneschi; F. Laschi; M. Muniz-Miranda; A.M. Papini; G. Sbrana "Spectroscopic and potentiometric study of copper(II) complexes with L-histidyl-glycyl-L-histidyl-glycine in aqueous solution" *Spectrochimica Acta Part A - Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55, 1675-1689 (1999).
69. R.P. Bonomo; F. Bonsignore; E. Conte; G. Impellizzeri; G. Pappalardo; R. Purrello; E. Rizzarelli "Thermodynamic and spectroscopic characterization and invitro O₂⁻ scavenger activity of copper(II) glycyl-L-histidyl-glycyl-L-histidine complexes" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 1295-1300 (1993).
70. R.P. Bonomo; L. Casella; L. DeGioia; H. Molinari; G. Impellizzeri; T. Jordan; G. Pappalardo; R. Purrello; E. Rizzarelli "Metal ion and proton stabilisation of turn motif in the synthetic octapeptide histidyltris(glycylhistidyl) glycine" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 2387-2389 (1997).
71. F.W. Sunderman; A.H. Varghese; O.S. Kroftova; S. GrbacIvankovic; J. Kotyza; A.K. Datta; M. Davis; W. Bal; K.S. Kasprzak "Characterization of pNiXa, a serpin of xenopus laevis oocytes and embryos, and its histidine-rich, Ni(II)-binding domain" *Molecular Reproduction and Development*, 44, 507-524 (1996).

72. W. Bal; J. Lukszo; K. Bialkowski; K.S. Kasprzak "Interactions of nickel(II) with histones: Interactions of nickel(II) with CH₃CO-Thr-Glu-Ser-His-His-Lys-NH₂, a peptide modeling the potential metal binding site in the "C-tail" Region of histone H₂A" *Chemical Research in Toxicology*, 11, 1014-1023 (1998).
73. A. Levitzki; I. Pecht; A. Berger "Copper-poly-L-histidine complexes. II. Physicochemical properties." *Journal of American Chemical Society*, 94, 6844-6849 (1972).
74. C. Kállay; Z. Nagy; K. Várnagy; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; I. Sóvágó "Thermodynamic and structural characterization of the copper(II) complexes of peptides containing both histidyl and aspartyl residues" *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 1-9 (2007).
75. B. Bóka; A. Myari; I. Sóvágó; N. Hadjiliadis "Copper(II) and zinc(II) complexes of the peptides Ac-HisValHis-NH₂ and Ac-HisValGlyAsp-NH₂ related to the active site of the enzyme cuznsod" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 113-122 (2004).
76. D. Sanna; G. Micera; C. Kállay; V. Rigó; I. Sóvágó "Copper(II) complexes of N-terminal protected tri- and tetrapeptides containing histidine residues" *Dalton Transactions*, 2702-2707 (2004).
77. S. Rajkovic; C. Kállay; R. Serényi; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; D. Sanna; I. Sóvágó "Complex formation processes of terminally protected peptides containing two or three histidyl residues. Characterization of the mixed metal complexes of peptides" *Dalton Transactions*, 5059-5071 (2008).
78. C. Kállay; K. Várnagy; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; D. Sanna; I. Sóvágó "Copper(II) complexes of terminally protected pentapeptides containing three histidyl residues in alternating positions, Ac-His-Xaa-His-Yaa-His-NH₂" *Dalton Transactions*, 4545-4552 (2006).
79. S. Timári; C. Kállay; K. Ösz; I. Sóvágó; K. Várnagy "Transition metal complexes of short multihistidine peptides" *Dalton Transactions*, 1962-1971 (2009).
80. R. Riek; S. Hornemann; G. Wider; M. Billeter; R. Glockshuber; K. Wuthrich "NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231)" *Nature*, 382, 180-182 (1996).
81. R. Zahn; A.Z. Liu; T. Luhrs; R. Riek; C. von Schroetter; F.L. Garcia; M. Billeter; L. Calzolari; G. Wider; K. Wuthrich "NMR solution structure of the human prion protein" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 145-150 (2000).
82. R. Riek; S. Hornemann; G. Wider; R. Glockshuber; K. Wuthrich "NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)" *FEBS Letters*, 413, 282-288 (1997).
83. F.L. Garcia; R. Zahn; R. Riek; K. Wuthrich "NMR structure of the bovine prion protein" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 8334-8339 (2000).
84. D.G. Donne; J.H. Viles; D. Groth; I. Mehlhorn; T.L. James; F.E. Cohen; S.B. Prusiner; P.E. Wright; H.J. Dyson "Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): The N terminus is highly flexible" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 13452-13457 (1997).
85. S.B. Prusiner "Shattuck lecture - neurodegenerative diseases and prions" *New England Journal of Medicine*, 344, 1516-1526 (2001).
86. R.R. Crichton; R. Ward, *Metal-based neurodegeneration*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, (2006).
87. S.B. Prusiner "Prions" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 13363-13383 (1998).
88. L. Westergaard; H.M. Christensen; D.A. Harris "The cellular prion protein (PrP^C): Its physiological function and role in disease" *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1772, 629-644 (2007).
89. A.I. Bush "Metals and neuroscience" *Current Opinion in Chemical Biology*, 4, 184-191 (2000).
90. R.P. Bonomo; D. La Mendola; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; I. Sóvágó "Coordination features of prion protein domains" in *Recent development in bioinorganic chemistry: Metal complexes of bioactive molecules*, M. Saviano (Ed) Kerala, India, 133-160 (2006).

91. D.R. Brown; A. Besinger "Prion protein expression and superoxide dismutase activity" *Biochemical Journal*, 334, 423-429 (1998).
92. N. Vassallo; J. Herms; C. Behrens; B. Krebs; K. Saeki; T. Onodera; O. Windl; H.A. Kretschmar "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by cellular prion protein and its role in cell survival" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332, 75-82 (2005).
93. G.L. Millhauser "Copper binding in the prion protein" *Accounts of Chemical Research*, 37, 79-85 (2004).
94. D.J. Waggoner; T.B. Bartnikas; J.D. Gitlin "The role of copper in neurodegenerative disease" *Neurobiology of Disease*, 6, 221-230 (1999).
95. R. Zahn "The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site" *Journal of Molecular Biology*, 334, 477-488 (2003).
96. J. Stöckel; J. Safar; A.C. Wallace; F.E. Cohen; S.B. Prusiner "Prion protein selectively binds copper(II) ions" *Biochemistry*, 37, 7185-7193 (1998).
97. M.P. Hornshaw; J.R. McDermott; J.M. Candy "Copper-binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207, 621-629 (1995).
98. M.P. Hornshaw; J.R. McDermott; J.M. Candy; J.H. Lakey "Copper-binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein - structural studies using synthetic peptides" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214, 993-999 (1995).
99. N. Hijazi; Y. Shaked; H. Rosenmann; T. Ben-Hur; R. Gabizon "Copper binding to PrP^C may inhibit prion disease propagation" *Brain Research*, 993, 192-200 (2003).
100. E.M. Sigurdsson; D.R. Brown; M.A. Alim; H. Scholtzova; R. Carp; H.C. Meeker; F. Prelli; B. Frangione; T. Wisniewski "Copper chelation delays the onset of prion disease" *Journal of Biological Chemistry*, 278, 46199-46202 (2003).
101. I.H. Pattison; J.N. Jebbett "Histopathological similarities between scrapie and cuprizone toxicity in mice" *Nature*, 230, 115-117 (1971).
102. D.R. Brown; K.F. Qin; J.W. Herms; A. Madlung; J. Manson; R. Strome; P.E. Fraser; T. Kruck; A. von Bohlen; W. Schulz-Schaeffer; A. Giese; D. Westaway; H. Kretschmar "The cellular prion protein binds copper in vivo" *Nature*, 390, 684-687 (1997).
103. E.D. Walter; M. Chattopadhyay; G.L. Millhauser "The affinity of copper binding to the prion protein octarepeat domain: Evidence for negative cooperativity" *Biochemistry*, 45, 13083-13092 (2006).
104. G.L. Millhauser "Copper and the prion protein: Methods, structures, function, and disease" in *Annual review of physical chemistry*, 58, 299-320 (2007).
105. H. Kozłowski; M. Luczkowski; M. Remelli "Prion proteins and copper ions. Biological and chemical controversies" *Dalton Transactions*, 39, 6371-6385 (2010).
106. 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).
107. H. Kozłowski; M. Luczkowski; M. Remelli; D. Valensin "Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases)" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2129-2141 (2012).
108. I. Zawisza; M. Rozga; W. Bal "Affinity of copper and zinc ions to proteins and peptides related to neurodegenerative conditions (A β , APP, α -synuclein, PrP)" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2297-2307 (2012).
109. V. Tougu; P. Palumaa "Coordination of zinc ions to the key proteins of neurodegenerative diseases: A β , APP, α -synuclein and PrP" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2219-2224 (2012).
110. J.H. Viles "Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2271-2284 (2012).

111. C. Migliorini; E. Porciatti; M. Luczkowski; D. Valensin "Structural characterization of Cu^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} binding sites of model peptides associated with neurodegenerative diseases" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 352-368 (2012).
112. G. Arena; D. La Mendola; G. Pappalardo; I. Sóvágó; E. Rizzarelli "Interactions of Cu^{2+} with prion family peptide fragments: Considerations on affinity, speciation and coordination" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2202-2218 (2012).
113. H. Kozłowski; D.R. Brown; G. Valensin "Prion diseases and redox active metals" in *Metallochemistry of neurodegeneration*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K., Ch. 9, 141-181 (2006).
114. D. Milardi; E. Rizzarelli (Eds), *Neurodegeneration*, Royal Society of Chemistry, Chambridge, U.K., (2011).
115. R.M. Whittal; H.L. Ball; F.E. Cohen; A.L. Burlingame; S.B. Prusiner; M.A. Baldwin "Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry" *Protein Science*, 9, 332-343 (2000).
116. J.H. Viles; F.E. Cohen; S.B. Prusiner; D.B. Goodin; P.E. Wright; H.J. Dyson "Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 2042-2047 (1999).
117. E. Aronoff-Spencer; C.S. Burns; N.I. Avdievich; G.J. Gerfen; J. Peisach; W.E. Antholine; H.L. Ball; F.E. Cohen; S.B. Prusiner; G.L. Millhauser "Identification of the Cu^{2+} binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by epr and cd spectroscopy" *Biochemistry*, 39, 13760-13771 (2000).
118. M. Remelli; D. Valensin; D. Bacco; E. Gralka; R. Guerrini; C. Migliorini; H. Kozłowski "The complex-formation behaviour of His residues in the fifth Cu^{2+} binding site of human prion protein: A close look" *New Journal of Chemistry*, 33, 2300-2310 (2009).
119. M. Klewpatinond; P. Davies; S. Bowen; D.R. Brown; J.H. Viles "Deconvoluting the Cu^{2+} binding modes of full-length prion protein" *Journal of Biological Chemistry*, 283, 1870-1881 (2008).
120. D. Grasso; G. Grasso; V. Guantieri; G. Impellizzeri; C. La Rosa; D. Milardi; G. Micera; K. Ősz; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; D. Sanna; I. Sóvágó "Environmental effects on a prion's helix II domain: Copper(II) and membrane interactions with PrP180-193 and its analogues" *Chemistry - a European Journal*, 12, 537-547 (2006).
121. D.R. Brown; V. Guantieri; G. Grasso; G. Impellizzeri; G. Pappalardo; E. Rizzarelli "Copper(II) complexes of peptide fragments of the prion protein. Conformation changes induced by copper(II) and the binding motif in C-terminal protein region" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 133-143 (2004).
122. F. Stellato; A. Spevacek; O. Proux; V. Minicozzi; G. Millhauser; S. Morante "Zinc modulates copper coordination mode in prion protein octa-repeat subdomains" *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 40, 1259-1270 (2011).
123. E.D. Walter; D.J. Stevens; M.P. Visconte; G.L. Millhauser "The prion protein is a combined zinc and copper binding protein: Zn^{2+} alters the distribution of Cu^{2+} coordination modes" *Journal of the American Chemical Society*, 129, 15440-15441 (2007).
124. D.R. Brown; F. Hafiz; L.L. Glasssmith; B.S. Wong; I.M. Jones; C. Clive; S.J. Haswell "Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance" *EMBO Journal*, 19, 1180-1186 (2000).
125. J. Levin; U. Bertsch; H. Kretzschmar; A. Giese "Single particle analysis of manganese-induce prion protein aggregates" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329, 1200-1207 (2005).
126. R.N. Tsenkova; I.K. Iordanova; K. Toyoda; D.R. Brown "Prion protein fate governed by metal binding" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, 1005-1012 (2004).
127. A. Giese; J. Levin; U. Bertsch; H. Kretzschmar "Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 1240-1246 (2004).

128. B.S. Wong; S.G. Chen; M. Colucci; Z.L. Xie; T. Pan; T. Liu; R.L. Li; P. Gambetti; M.S. Sy; D.R. Brown "Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease" *Journal of Neurochemistry*, 78, 1400-1408 (2001).
129. D.R. Brown "Prions and manganese: A maddening beast" *Metallomics*, 3, 229-238 (2011).
130. V. Józai; Z. Nagy; K. Ösz; 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).
131. M. Luczkowski; H. Kozłowski; M. Stawikowski; K. Rolka; E. Gaggelli; D. Valensin; G. Valensin "Is the monomeric prion octapeptide repeat PHGGGWGQ a specific ligand for Cu²⁺ ions?" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 2269-2274 (2002).
132. C.S. Burns; E. Aronoff-Spencer; C.M. Dunham; P. Lario; N.I. Avdievich; W.E. Antholine; M.M. Olmstead; A. Vrielink; G.J. Gerfen; J. Peisach; W.G. Scott; G.L. Millhauser "Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein" *Biochemistry*, 41, 3991-4001 (2002).
133. A.P. Garnett; J.H. Viles "Copper binding to the octarepeats of the prion protein - affinity, specificity, folding, and cooperativity: Insights from circular dichroism" *Journal of Biological Chemistry*, 278, 6795-6802 (2003).
134. M.L. Kramer; H.D. Kratzin; B. Schmidt; A. Romer; O. Windl; S. Liemann; S. Hornemann; H. Kretschmar "Prion protein binds copper within the physiological concentration range" *Journal of Biological Chemistry*, 276, 16711-16719 (2001).
135. M. Chattopadhyay; E.D. Walter; D.J. Newell; P.J. Jackson; E. Aronoff-Spencer; J. Peisach; G.J. Gerfen; B. Bennett; W.E. Antholine; G.L. Millhauser "The octarepeat domain of the prion protein binds Cu(II) with three distinct coordination modes at pH 7.4" *Journal of the American Chemical Society*, 127, 12647-12656 (2005).
136. G.M. Cereghetti; A. Schweiger; R. Glockshuber; S. Van Doorslaer "Electron paramagnetic resonance evidence for binding of Cu²⁺ to the C-terminal domain of the murine prion protein" *Biophysical Journal*, 81, 516-525 (2001).
137. G. Di Natale; K. Ösz; C. Kállay; G. Pappalardo; D. Sanna; G. Impellizzeri; I. Sóvágó; E. Rizzarelli "Affinity, speciation, and molecular features of copper(II) complexes with a prion tetraoctarepeat domain in aqueous solution: Insights into old and new results" *Chemistry - a European Journal*, 19, 3751-3761 (2013).
138. C.E. Jones; S.R. Abdelraheim; D.R. Brown; J.H. Viles "Preferential Cu²⁺ coordination by His(96) and His(111) induces β -sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein" *Journal of Biological Chemistry*, 279, 32018-32027 (2004).
139. C.E. Jones; M. Klewpatinond; S.R. Abdelraheim; D.R. Brown; J.H. Viles "Probing copper²⁺ binding to the prion protein-using diamagnetic nickel²⁺ and ¹H NMR: The unstructured N terminus facilitates the coordination of six copper²⁺ ions at physiological concentrations" *Journal of Molecular Biology*, 346, 1393-1407 (2005).
140. C.S. Burns; E. Aronoff-Spencer; G. Legname; S.B. Prusiner; W.E. Antholine; G.J. Gerfen; J. Peisach; G.L. Millhauser "Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein" *Biochemistry*, 42, 6794-6803 (2003).
141. M. Klewpatinond; J.H. Viles "Fragment length influences affinity for Cu²⁺ and Ni²⁺ binding to His(96) or His(111) of the prion protein and spectroscopic evidence for a multiple histidine binding only at low pH" *Biochemical Journal*, 404, 393-402 (2007).
142. B. Belosi; E. Gaggelli; R. Guerrini; H. Kozłowski; M. Luczkowski; F.M. Mancini; M. Remelli; D. Valensin; G. Valensin "Copper binding to the neurotoxic peptide PrP106-126: Thermodynamic and structural studies" *Chembiochem*, 5, 349-359 (2004).
143. F. Berti; E. Gaggelli; R. Guerrini; A. Janicka; H. Kozłowski; A. Legowska; H. Miecznikowska; C. Migliorini; R. Pogni; M. Remelli; K. Rolka; D. Valensin; G. Valensin "Structural and dynamic characterization of copper(II) binding of the human prion protein outside the octarepeat region" *Chemistry - a European Journal*, 13, 1991-2001 (2007).

144. M. Klewpatinond; J.H. Viles "Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu^{2+} and Ni^{2+} histidine complexes: Applications to the prion protein" *FEBS Letters*, 581, 1430-1434 (2007).
145. A.R. Thompsett; S.R. Abdelraheim; M. Daniels; D.R. Brown "High affinity binding between copper and full-length prion protein identified by two different techniques" *Journal of Biological Chemistry*, 280, 42750-42758 (2005).
146. G. Di Natale; G. Grasso; G. Impellizzeri; D. La Mendola; G. Micera; N. Mihala; Z. Nagy; K. Ősz; G. Pappalardo; V. Rigó; E. Rizzarelli; D. Sanna; I. Sóvágó "Copper(II) interaction with unstructured prion domain outside the octarepeat region: Speciation, stability, and binding details of copper(II) complexes with PrP106-126 peptides" *Inorganic Chemistry*, 44, 7214-7225 (2005).
147. C. Kállay; I. Turi; S. Timári; Z. Nagy; D. Sanna; G. Pappalardo; P. De Bona; E. Rizzarelli; I. 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, 411-419 (2011).
148. 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).
149. 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).
150. L.R. Brown; D.A. Harris "Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the golgi" *Journal of Neurochemistry*, 87, 353-363 (2003).
151. M. Remelli; M. Donatoni; R. Guerrini; A. Janicka; P. Pretegiani; H. Kozłowski "Copper-ion interaction with the 106-113 domain of the prion protein: A solution-equilibria study on model peptides" *Dalton Transactions*, 2876-2885 (2005).
152. E. Gralka; D. Valensin; K. Gajda; D. Bacco; L. Szyrwił; M. Remelli; G. Valensin; W. Kamysz; W. Baranska-Rybak; H. Kozłowski "Copper(II) coordination outside the tandem repeat region of an unstructured domain of chicken prion protein" *Molecular Biosystems*, 5, 497-510 (2009).
153. J. Shearer; P. Soh "Ni K-edge XAS suggests that coordination of Ni^{II} to the unstructured amyloidogenic region of the human prion protein produces a Ni_2 bis- μ -hydroxo dimer" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101, 370-373 (2007).
154. D. Valensin; K. Gajda; E. Gralka; G. Valensin; W. Kamysz; H. Kozłowski "Copper binding to chicken and human prion protein amyloidogenic regions: Differences and similarities revealed by Ni^{2+} as a diamagnetic probe" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104, 71-78 (2010).
155. R.B. Merrifield "Solid phase peptide synthesis I.: The synthesis of a tetrapeptide" *Journal of American Chemical Society*, 85, 2149-2154 (1963).
156. L.A. Carpino; G.Y. Han "The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group" *Journal of Organic Chemistry*, 37, 3404-3409 (1972).
157. E. Atherton; D.L.J. Clive; R.C. Sheppard "Polyamide supports for polypeptide-synthesis" *Journal of the American Chemical Society*, 97, 6584-6585 (1975).
158. S. Wang "p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase peptide synthesis of protected peptide fragments" *Journal of American Chemical Society*, 95, 1328-1333 (1973).
159. M. Kempe; G. Barany "Clear: A novel family of highly cross-linked polymeric supports for solid-phase peptide synthesis" *Journal of the American Chemical Society*, 118, 7083-7093 (1996).
160. M. Kempe; G. Barany "Novel highly cross-linked polymeric supports for solid phase applications" in *Solid phase synthesis (fourth international symposium, edinburgh, scotland)*, R. Epton (Ed) Mayflower, London, 191-194 (1996).

161. H. Rink "Solid-phase synthesis of protected peptide-fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin" *Tetrahedron Letters*, 28, 3787-3790 (1987).
162. 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).
163. 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).
164. 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).
165. F. Aberico; N. Kneib-Cordonier; S. Biancalana; L. Gera; R.I. Masada; D. Hudson; G. Barany "Preparation and application of the 5-(4-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions" *Journal of Organic Chemistry*, 55, 3730-3743 (1990).
166. D.S. King; C.G. Fields; G.B. Fields "A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid-phase peptide-synthesis" *International Journal of Peptide and Protein Research*, 36, 255-266 (1990).
167. 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).
168. 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).
169. G. Eriksson "Algorithm for the computation of aqueous multicomponent, multiphase equilibria" *Analytica Chimica Acta-Computer Techniques and Optimization*, 3, 375-383 (1979).
170. P. Gans; A. Sabatini; A. Vacca "SUPERQUAD - an improved general program for computation of formation-constants from potentiometric data" *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 1195-1200 (1985).
171. H.A. Blatt, *Organic synthesis*, Wiley, New York, Vol. 2, (1943).
172. R. Cantor; P.R. Schimmel, *Biophysical chemistry, part 2: Techniques for the study of biological structure and function*, W. H. Freeman and Company, (1980).
173. R.B. Martin in *Metal ions in biological systems*, H. Sigel (Ed) Marcel Dekker, New York, Ch. 4, 1, 129-156 (1974).
174. H. Kozłowski; G. Micera in *Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids*, G. Berthon (Ed) Marcel Dekker Inc., New York, 1, 566-582 (1995).
175. C.J. Hawkins; E. Larsen "Absolute configuration of octahedral metal complexes: The octant sign" *Acta Chemica Scandinavica*, 19, 185-190 (1965).
176. E.L.J. Purlee "On the solvent isotope effect of deuterium in aqueous acid solutions" *Journal of American Chemical Society*, 81, 263-272 (1959).
177. K. Mikkelsen; S.O.J. Nielsen "Acidity measurements with the glass electrode in H₂O-D₂O mixtures" *Journal of Physical Chemistry*, 64, 632-637 (1960).
178. P.K. Glasoe; F.A. Long "Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide" *Journal of Physical Chemistry*, 64, 188-190 (1960).
179. M. Luczkowski; H. Kozłowski; A. Legowska; K. Rolka; M. Remelli "The possible role of Gly residues in the prion octarepeat region in the coordination of Cu²⁺ ions" *Dalton Transactions*, 619-624 (2003).
180. Á. Grenács; A. Kaluha; C. Kállay; V. Józai; D. Sanna; I. Sóvágó "Binary and ternary mixed metal complexes of terminally free peptides containing two different histidyl binding sites" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 128, 17-25 (2013).
181. V. Józai; I. Turi; C. Kállay; G. Pappalardo; G. Di Natale; E. Rizzarelli; I. Sóvágó "Mixed metal copper(II)-nickel(II) and copper(II)-zinc(II) complexes of multihistidine peptide fragments of human prion protein" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 112, 17-24 (2011).

8. FÜGGELÉK

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 Jósza, 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: 2
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: 9
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: 6
Impakt faktor: 1,356 (2011)

Tudományos folyóiratban még meg nem jelent közlemények

1. Sarolta Timári, Ildikó Turi, Káta 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 (lectures)

1. Turi Ildikó, Sóvágó Imre: **A prion protein peptidfragmenseinek fémion-szelektivitása**, 47. *Komplexxémiai 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 poszterek (posters)

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- September 3, Budapest (Book of Abstract, p.288)
7. I. Turi, V. Józai, I. Sóvágó, G. Di Natale, G. Pappalardo, E. Rizzarelli: **Több hisztidint tartalmazó peptidek 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. Ősz, 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. Ősz, I. Sóvágó, G. Di Natale, G. Pappalardo and E. Rizzarelli: **Metal Binding Selectivity of the Peptide Fragments of Prion Protein**, *10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry*, 2009. szeptember 25-28., Debrecen. (Book of Abstract, p.125)