

DE TTK



1949

**AZ AMILOID- β PEPTID SZÁRMAZÉKAINAK
KOMPLEXKÉPZŐDÉSI FOLYAMATAI
RÉZ(II)-, NIKKEL(II)- ÉS CINK(II)IONOKKAL**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Grenács Ágnes Judit

Témavezető: Dr. Sóvágó Imre professzor emeritus

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi Doktori Tanács

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2015.

*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, 2015. május 19.

a jelölt aláírása

*Tanúsítom, hogy **Grenács Ágnes Judit** doktorjelölt **2011 - 2014** 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, 2015. május 19.

a témavezető aláírása

AZ AMILOID- β PEPTID SZÁRMAZÉKAINAK KOMPLEXKÉPZŐDÉSI FOLYAMATAI RÉZ(II)-, NIKKEL(II)- ÉS CINK(II)IONOKKAL

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

Írta: **Grenács Ágnes Judit** okleveles vegyész

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

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

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Kövér Katalin	
tagok:	Dr. Gajda Tamás	
	Dr. Brücher Ernő	

A doktori szigorlat időpontja: 2015. február 10.

Az értekezés bírálói:

Dr.		
Dr.		
Dr.		

A bírálóbizottság:

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

Az értekezés védésének időpontja: 2015.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
2. Irodalmi előzmények.....	3
2.1. Az amiloid- β peptid szerepe az Alzheimer-kórban.....	3
2.2. Fémionok szerepe az Alzheimer-kór kialakulásában	5
2.3. A tanulmányozott átmenetifém-ionok biológiai jelentősége és koordinációs kémiája.....	8
2.3.1. A réz koordinációs kémiája és biológiai jelentősége.....	8
2.3.2. A nikkel koordinációs kémiája és biológiai jelentősége.....	9
2.3.3. A cink biológiai jelentősége és koordinációs kémiája.....	10
2.4. A peptidek koordinációs kémiája	11
2.4.1. Egyszerű peptidek koordinációs kémiája	11
2.4.2. Aszparaginsav-tartalmú peptidek komplexképződési folyamatai ...	12
2.4.3. Hisztidintartalmú peptidek komplexképződési folyamatai.....	14
2.4.3.1. Egy hisztidint tartalmazó peptidek	14
2.4.3.2. Több hisztidint tartalmazó peptidek	16
2.5. Az amiloid- β peptid szerkezete és fémionmegkötő képessége	18
2.5.1. Az A β N-terminusának fémion-affinitása – az -NH ₂ csoport és a His6	21
2.5.2. Az A β láncközi fragmensének fémion-affinitása – a His13 és His14	22
2.6. Célkitűzések	24
3. Kísérleti módszerek és alkalmazott technikák	26
3.1. Felhasznált vegyszerek.....	26
3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS).....	27
3.2.1. Oldallánc-védelem.....	28
3.2.2. Az aminosav-szekvencia felépítése	30
3.2.3. Hasítás a gyantáról.....	31
3.2.4. Tisztaság-ellenőrzés és azonosítás.....	31

3.3. pH-potenciometria.....	32
3.4. UV-látható spektrofotometria.....	35
3.5. CD-spektroszkópia	36
3.6. Tömegspektrometria (ESI-TOF-MS)	38
3.7. NMR- és ESR-spektroszkópia.....	38
4. Eredmények.....	40
4.1. Elkülönült kelátképző modellvegyületek	40
4.1.1. H ₂ N-AAHAAAHG-OH (<i>oktapeptid</i>)	40
4.1.2. H ₂ N-AHAAAHG-OH (<i>heptapeptid</i>)	46
4.2. Az amiloid-β (1-9) fragmens és származékai.....	55
4.2.1. H ₂ N-DAAAAHAAA-NH ₂ (<i>DA₄HA₃</i>) és H ₂ N-DAAAAAHAA-NH ₂ (<i>DA₅HA₂</i>)	56
4.2.2. H ₂ N-DAEFRHDSG-NH ₂ (<i>Aβ(1-9)</i>)	60
4.3. Az amiloid-β (8-16) fragmens mutánsai	66
4.3.1. Ac-SGAEGAHQK-NH ₂ (<i>Aβ(8-16)AH</i>) és Ac-SGAEGHAQK-NH ₂ (<i>Aβ(8-16)HA</i>).....	67
4.3.2. Ac-SGAEGHHQK-NH ₂ (<i>Aβ(8-16)HH</i>)	71
4.4. Az amiloid-β (1-16) dimer származéka.....	80
5. Összefoglalás.....	84
6. Summary	87
7. Irodalomjegyzék.....	90
8. Függelék.....	104

Az értekezésben előforduló rövidítések jegyzéke

Ala, A	alanin
Arg, R	arginin
Asp, D	aszparaginsav
Gln, Q	glutamin
Glu, E	glutaminsav
Gly, G	glicin
His, H	hisztidin
Lys, K	lizin
Phe, F	fenilalanin
Ser, S	szerin
Tyr, Y	tirozin
Val, V	valin
A β (hA β)	amiloid- β (humán amiloid- β)
Ac	acetyl
ACN	acetonitril
AICD	amiloid intercelluláris domén
APP	amiloid prekursor protein
APPs α	α -szekretáz által hasított amiloid prekursor protein részlet
APPs β	β -szekretáz által hasított amiloid prekursor protein részlet
ATCUN	aminoterminális réz- és nikkelkötő hely (<u>a</u> mino <u>t</u> erminál <u>Cu</u> and <u>Ni</u> binding site)
Boc	<i>tert</i> -butoxi-karbonil
Bzl	benzil
CD	cirkuláris dikroizmus
CTF α	α -szekretáz által hasított C-terminális fragmens
CTF β	β -szekretáz által hasított C-terminális fragmens
(CO)	karbonil
COO ⁻	karboxilát
DCM	diklórmétán
DIEA	<i>N,N</i> -diizopropil-etilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
DMT1	kétértékű fémion-transzporter 1 (<u>d</u> ivalent <u>m</u> etal transporter 1)
DODT	2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol

ESI	elektroporlasztásos ionizáció (electrospray ionization)
ESR (EPR)	elektronspin-rezonancia (elektron paramágneses rezonancia)
Et ₂ O	dietiléter
Fmoc	9-fluorenil-metoxi-karbonil
HOBt	<i>N</i> -hidroxi-benztriazol
MS	tömegspektrometria
N ⁻	amidnitrogén
NH ₂	aminocsoport
N _{im}	imidazolnitrogén
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidon
NMR	magmágneses rezonancia (nuclear magnetic resonance)
O ^t Bu	<i>O</i> - <i>terc</i> -butil
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurán-5-szulfonil
PEG	polietilén-glikol
rAβ	patkány amiloid-β
ROS	reaktív oxigén speciesz
RP-HPLC	fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfia (reversed phase high pressure liquid chromatography)
SOD	szuperoxid dizmutáz
SPPS	szilárdfázisú peptidszintézis (solid phase peptide synthesis)
TBTU	2-(1- <i>H</i> -benztriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-tetrafluoroborát
<i>t</i> Bu	<i>terc</i> -butil
TFA	trifluorecetsav
TIS	triizopropil-szilán
TOF	repülési idő (time of flight)
Trt	tritol
TSP	trimetil-szilil-propánsav
UV-vis	ultraibolya-látható
ZnT3	cink transzporter 3

1. Bevezetés

Napjainkban egyre növekszik azon betegségekben szenvedők száma, melyeket összefoglaló néven neurodegeneratív elváltozásoknak nevezünk. Ezen megbetegedések egyike az Alzheimer-kór, mely főként idős korban gyakori és kialakulásának részletes mechanizmusa eddig ismeretlen. A rendellenesség alapját a 40-43 aminosavból álló ún. amiloid- β peptid (A β) akkumulációja és aggregációja jelenti, mely amiloid plakkok képződéséhez vezet. A folyamat a fehérje neurodegeneratív betegségekre általánosan jellemző kóros konformáció-változásával jár, melynek kiváltó tényezőit illetően számos hipotézis született. A vizsgálatok által leginkább alátámasztott a fémionok, közöttük a réz(II)-, cink(II)- és vas(II/III)ionok szerepe, melyek az agyi szövetekben megnövekedett koncentrációban vannak jelen az egészséges szinthez képest. A feltevést, miszerint az amiloid- β peptid és a felhalmozódó fémionok kölcsönhatása alapvető fontosságú a kór kialakulásában, megerősíti a tény, hogy a peptid számos, fémion-koordinációra alkalmas kötőhellyel rendelkezik.

Az idegejt pusztulását eredményező folyamat mechanizmusa tehát még nem tisztázott, így szükségessé vált az említett fémionok és az amiloid- β peptid komplexképzési folyamatainak vizsgálata. Ezáltal részletesebb képet kaphatunk a fémionoknak a betegség kialakulásában és lejárásában betöltött szerepének kémiai hátteréről. A *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén*, a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban* már több éve folynak kutatások ebben a problémakörben. A peptid komplexképződési reakcióinak tanulmányozása azonban nehézségekbe ütközött, mivel annak egésze és nagyobb fragmensei is rosszul oldódnak a kísérleti technikák alkalmazásához szükséges körülmények között. Az olaszországi *Cataniai Egyetemen* való együttműködés révén a megoldást az jelentette, hogy a peptidhez polietilén-glikol láncot kapcsoltak (pegilálás), ami növelte a molekula oldhatóságát, így lehetővé tette a rendelkezésre álló módszerek használatát. A korábbi vizsgálatok eredménye szerint a peptid fémionmegkötésért felelős szakasza az 1-16 szekvencia, az ebben a molekularészletben található terminális aminocsoport és három további hisztidin bizonyítottan stabil kölcsönhatás kialakítására képes a vizsgált réz(II)-, cink(II)- és nikkel(II)ionokkal. Emellett az aszparaginsav, glutaminsav és egyéb, poláris oldalláncú aminosavak is szerepet játszhatnak fémkomplex kialakításában és stabilizálásában. A vizsgálatok első lépése tehát az amiloid- β (1-16)-PEG tanulmányozása volt, melynek eredményeként megállapították, hogy a peptid maximálisan réz(II)ionokból négy, cink(II)ionokból három, nikkel(II)ionokból két ekvivalens megkötésére képes. A peptid kisebb fragmenseinek – 1-4, 1-6 és 8-16 – tanulmányozása során a fémionok által elfoglalt kötőhelyeket már

tisztázták és a fő koordinációs helyekként a terminális aminocsoportot és a His6, a His13, valamint a His14 környezetét jelölték meg, azonban a koordinációban részt vevő donoratomok pontosítása még nem történt meg.

A megvalósuló koordinációs módok megismerésének érdekében modellpeptidek és a natív peptid további fragmensei illetve mutánsaik szintézise és vizsgálata vált indokoltá. Az A β (1-16) szekvenciában található elkülönült kötőhelyek – terminális aminocsoport és hisztidinek – egy peptiden belüli modellezésére alkalmas ligandumot állítottunk elő és vizsgáltuk a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionok megoszlását. A természetes fragmensek esetén lehetséges kötésmódok több kérdést is felvetettek: az említett fémionok megkötésében részt vevő donoratomok számát, a koordináció irányát és a kialakuló izomerek arányát illetően. Ezek megválaszolásához további peptidfragmenseket illetve azok mutánsait állítottuk elő és vizsgáltuk a felsorolt fémionokkal.

A legutóbbi tanulmányok alátámasztották, hogy az amiloid plakkok kialakulásának meghatározó lépése a konformáció-változást követő, az aggregációt megelőző dimerképződés. A Tanszéken elvégzett vizsgálataink során is hasonló megállapításra jutottunk biskomplexek azonosítása révén. A feltételezés megerősítése érdekében került sor a peptid dimer formájának szintézisére olaszországi együttműködés keretében, melyben két, az első tizenhat aminosavból álló fragmenst kapcsoltunk össze a C-terminuson és egészítettünk ki egy PEG-lánccal, növelve ezzel a peptidszármazék oldhatóságát. Az így kapott ligandum kölcsönhatását vizsgáltuk a kör lefolyásában bizonyítottan nagy szerepet játszó réz(II)- és cink(II)ionokkal.

2. Irodalmi előzmények

2.1. Az amiloid- β peptid szerepe az Alzheimer-kórban

Az Alzheimer-kór az egyik leggyakoribb neurodegeneratív megbetegedés a nyugati társadalmakban, melynek klinikai tünetei idős korban jelentkeznek, 20-30 évvel a folyamat megkezdődését követően.¹ Előfordulása becslések szerint változó, de 1 és 5 % között van a 65 év feletti népesség körében. Kezdetben memóriazavar jelentkezik, majd a kognitív és motoros funkciók elvesztése következik be a kiterjedt idegsejtpusztulás miatt a hippocampusban és bizonyos agykéregbeli területeken.²

A betegség kifejlődésében genetikai és környezeti tényezők is szerepet játszanak: az életkor előrehaladtával és magas vérnyomás, cukorbetegség, elhízás, valamint a fejet ért gyakori ütések hatására nő a kór kialakulásának esélye. A betegség kockázatát csökkenti a mediterrán étrend, a kávéfogyasztás, a B₁₂-, B₃- és a C-vitamin bevitel, valamint a szellemi tevékenységek végzése. A nők sokkal hajlamosabbak a rendellenesség kialakulására, mely a szinaptikus cink transzporter fehérje, a ZnT3 megnövekedett aktivitásához köthető.³

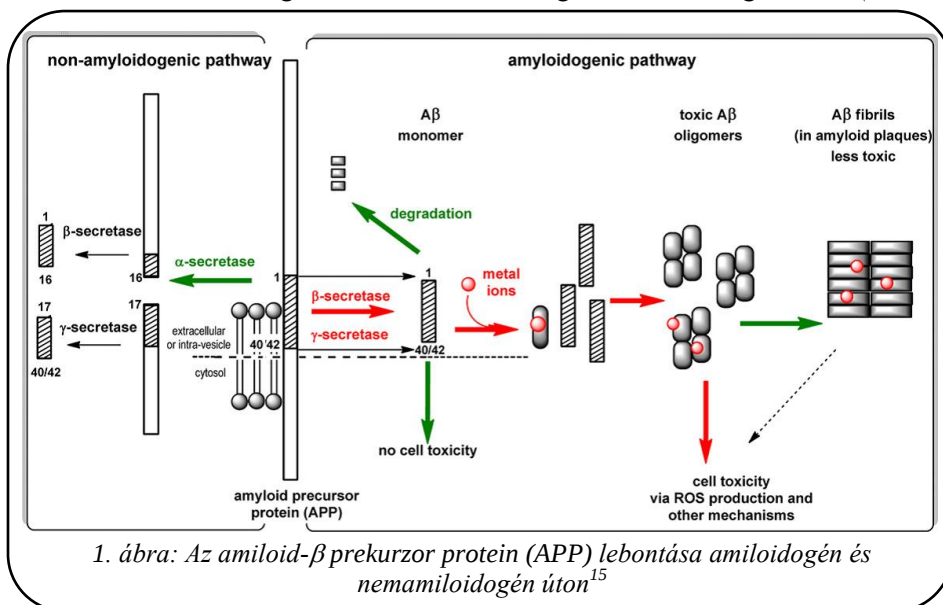
Az amiloid- β peptid az egészséges emberi agyban is megtalálható, élettani folyamatokban játszott szerepe máig tisztázatlan. Ebben a kérdésben leginkább az antioxidánsként betöltött funkcióját tartják valószínűnek, mint a reaktív oxigéntartalmú specieszek (ROS) képződésének egyik szabályozója.⁴⁻⁷ A redoxaktív fémionok megkötése révén a szervezet védekező mechanizmusának egyik eleme is lehet.

A kór létrejöttének okáról több feltételezés is napvilágot látott:⁸ a kolinerg-hipotézis szerint az idegingerület-átvitelben szerepet játszó acetilkolin mennyiségének csökkenése⁹, míg a tauhipotézis alapján a taufehérje normálisnál jelentősen több foszfátcsoportot tartalmazó formája indít be aggregációs folyamatot és a képződő oldhatatlan szálak szintén az idegsejtek kommunikációs képességeinek károsodását okozzák.¹⁰ A neurotrofin fehérjékkel kapcsolatban is folynak kutatások, melyek kölcsönhatását a réz(II)- és cink(II)ionokkal vizsgálják.¹¹

A leginkább elfogadott *amiloidhipotézis* szerint az amiloid- β plakkok lerakódása okozza a tüneteket; az amiloidózis abnormális fehérjemódosulást jelent. Egy polipeptid lánc szerkezeti megváltozása történik egy natív szerkezetű fehérjéből egy hibásan feltekeredett konformációjává. Az Alzheimer-kór esetén az elváltozásokért a 40-43 aminosavból álló β -amiloid peptid a felelős. Az A β kétféle biokémiai formában van jelen az egészséges agyi szövetekben: főként membránhoz kötve és kisebb mennyiségben (0,1-1 nM) oldott állapotban.¹²

Az Alzheimer-kórban szenvedő betegek esetében jelentősen megnövekedett mennyiségű aggregált és oldatbeli A β figyelhető meg a hippocampusban és az agykéregben, ami az idegsejtek pusztulásához vezet.^{13, 14}

Az *amiloid- β peptid keletkezése*¹⁵: Az amiloid prekursor protein (APP) enzimatis hasítása végbemehet nemamiloidogén és amiloidogén úton. (1. ábra)



Az APP egy I. típusú membránfehérje, amit egészséges folyamatban az α -szekretáz enzim hasít a Lys687 és a Leu688 között. Ennek eredményeként APPs α és p3 peptidet tartalmazó C-terminális rész keletkezik, így az A β képződése már nem következhet be. Az α -szekretáz aktivitása azonban nagyobb mennyiségű vas jelenlétében megváltozhat: feltevések szerint a vas kofaktorként vagy allosztérikus módosítóként szerepelhet és csökkentheti az enzim hasító képességét.¹⁶ A γ -szekretáz ezt követően a C-terminális részt (CTF α) a membránon belül p3 peptidre és intracelluláris APP doménre (AICD) hasítja. Amiloidogenezis során az APP-t a β -szekretáz hasítja a Met671 és az Asp672 között APPs β és CTF β fragmensekre, majd a γ -szekretáz enzim az CTF β -ből képi a toxikus A β -peptidet és az AICD-t.¹⁷

Az *oligomer-kaszád hipotézis*¹³ szerint az amiloid plakkok képződésének meghatározó lépése az A β ₄₀₋₄₃ peptid dimer formájának kialakulása. A molekuláris szinten induló dimerképződést már alá is támasztották,^{18, 19} ez a részecske alakítja ki az oligomerizáció magját, amelyhez további peptidek asszociációjával alakul ki az oligomer, majd ennek növekedésével az aggregátum. A dimerszálak kialakulását már az amiloid prekursor protein (APP) esetében is leírták réz(II)ionok hatására.²⁰

Az *amiloid fibrillumok* elágazást nem tartalmazó, 7-12 nm vastag, több mikron hosszú szálak, melyek nagyrészt β -redős szerkezettel rendelkeznek.²¹ A szálak között létrejövő intermolekuláris hidrogén-kötések pedig kereszt- β szerkezetet eredményeznek.²² Kimutatták továbbá, hogy az A β_{42} forma hajlamosabb az aggregációra és megnövekedett arányban β -redős szerkezettel rendelkező oldhatatlan lerakódások kialakítására, mint az A β_{40} .²³

Az amiloid-szálak *toxicitásának* eredetéről számos elképzelés született. A membrán integritásának megszakítása az egyik ilyen feltételezés, melyet a fibrillumok a külső plazmamembránnal kölcsönhatásba lépve érnek el.²⁴ Az A β részvételével lejátszódó ROS-képződés bizonyítja ezt a feltevést,²⁵ ugyanis ezáltal a membránon lipidperoxidáció mehet végbe, melynek következtében a lipidréteg elvékonyodik és pórusok keletkezhetnek.²⁶ Felmerült továbbá, hogy SOD-aktivitást mutathat, megkötheti a koleszterint és a hemmel is közvetlenül kölcsönhatásba léphet, így annak működési zavarát okozhatja.²⁷⁻²⁹

2.2. Fémionok szerepe az Alzheimer-kór kialakulásában

A neurodegeneratív betegségekre általánosan jellemző, hogy a fehérjék struktúrájában változás következik be, ezáltal kóros folyamatokat indítanak el. A fémionok hatására többféle mechanizmus szerint következhet be a fehérjék kicsapódása:

- A fémionok konformációs változást okozhatnak a fehérje harmadlagos szerkezetének módosítása révén.^{30, 31}
- Intermolekuláris keresztkötések alakulhatnak ki a fémionok hatására a fehérjeszálak között.⁶
- A fémion-fehérje komplex kialakulásakor annak nettó töltése neutrálissá válik és felgyorsul a fibrillumok képződése.³²
- A fehérje morfológiájának megváltozását eredményezheti az oligomer forma stabilizálása révén.³³
- A fémion kötődése destabilizálhatja a fehérje natív, nempatogén szerkezetét, így annak letekeredése energetikailag kedvezőbbé válhat.^{34, 35}

A betegség felismerését követően, tanulmányozásának korai fázisában megállapítást nyert, hogy bizonyos fémionoknak kiemelkedő jelentősége van a kór lefolyásában. A további kutatások során két csoport alakult ki: az első elméletek egyike szerint az **alumínium(III)ion** a felelős az elváltozás kialakulásáért, melynek több eredmény is hitelt adott.³⁶⁻⁴⁰ Az utóbbi időben azonban már megdőlni látszik az a tény, miszerint ennek az elemnek tulajdoníthatók a tünetek, bár még mindig folynak vizsgálatok az alumínium és az amiloid peptidek in vivo kölcsönhatásának bizonyítása érdekében. Néhány

tanulmányban a fémion hatására a szabad réz(II)ion koncentrációjának emelkedése tapasztalható,⁴¹ míg egy másik kutatócsoport megnövekedett mértékű szabadgyök-képződésről és az alumínium(III)-A β ₄₂ komplex sejtváz-károsító hatásáról számol be.⁴² A betegség kezelésére potenciálisan alkalmas vegyületek között tehát az alumínium(III)ionnal komplexet képző molekulák is megtalálhatók.⁴³

A kutatók másik csoportja szerint három átmenetifém-ionnak, a **réz(II)-**, **cink(II)-** és **vas(II/III)ionoknak** lehet jelentős szerepe az amiloid- β képződésének és lerakódásának folyamatában, a témában több összefoglaló közlemény is született.^{15, 21, 35, 44-47} Amiloidogén folyamatban ezen ionok homeosztázisának felborulása figyelhető meg, de mindmáig kérdés, hogy mennyiségük megnövekedése a kór *kiváltó oka* vagy *tünete*.

Az Alzheimer-kórban szenvedők agyában a **réz** esetében ez a zavar abban nyilvánul meg, hogy a szinaptikus résben megfigyelhető 15 μ M koncentrációhoz képest bizonyos területeken csökken, míg a plakkokban emelkedik a koncentrációja.⁴⁸ A neuropilban az egészséges 70 μ M koncentrációhoz képest 390 μ M-ra nő a mennyisége.⁴⁹ Réz(II)ionok hatására az A β módosul és felgyorsul az aggregációja,⁵⁰⁻⁵² mely feltehetően a bekövetkező oxidáció következménye,⁵³ de a ditirozin-keresztkötések kialakulása is lehet az oligomerizációs folyamat első lépése.⁵⁴ Más kutatócsoportok szerint a réz hatására létrejövő hisztidinidas oligomerek képesek áthatolni a membránon, így a réz(II)ion hisztidinnel való kölcsönhatása kiemelt jelentőséggel bír.⁵⁵ A réz(II)-A β komplex citotoxikus hatását is kimutatták, méghozzá az A β ₄₂ esetén az A β ₄₀ formáénál nagyobb mértékben.⁵⁶ Az oxidatív stresszben is szerepet játszhat ez a komplex, mivel in vitro tanulmányok szerint katalitikus ciklusban hidrogén-peroxid képződése volt megfigyelhető.⁵⁷ Több tanulmány is feltételezi, hogy a Cu(II)-ionok hatása már az amiloid prekursor proteinnel (APP) való kölcsönhatása során megmutatkozik.^{20, 58}

A szinapszisokba jelentős mennyiségű, 1-100 μ M **cink** szabadulhat ki jelátvitel alkalmával.⁵⁹ A cink koncentrációjának az Alzheimer-kór hatására történő megváltozásának bizonyítására irányuló korai próbálkozások még nem jártak sikerrel, melynek a szövetek kiválasztása és előkészítési módja lehetett az oka.⁶⁰ Később pedig az agy egyes régióit illetően különböző megállapítások születtek, melyek azt bizonyítják, hogy a fémion csak bizonyos területeken halmozódik fel az agyban, más helyeken csökken a mennyisége.^{48, 61, 62} Az amiloid lerakódások megemelkedett cinktartalma mára már elfogadott.⁶³ Későbbi kutatások szerint az egészséges 350 μ M-hoz viszonyítva a plakkot körülvevő neuropil állományban két-háromszoros, míg magában a plakkban

ehhez képest három-négyszeres (1050 μ M) a fémion mennyisége.⁴⁹ A cink(II)ionok szerepét tekintve két, ellentétes elképzelés is jelen van a szakirodalomban. Egyes kutatások a cink protektív hatását támasztották alá, más eredmények szerint a cink felgyorsítja az amiloid- β aggregációját.¹⁹ Az ellentmondó eredmények magyarázataként a cink(II) intermolekuláris komplexeinek képződését feltételezik, mely a szomszédos, His13 és His14 oldalláncokon keresztül jön létre.⁶ A Cu(II)-ionok tehát nem tudják kifejteni toxikus hatásukat amiloid- β -komplexükként, mely reaktív oxigén specieszek képződésében játszik szerepet ugyanezen donorcsoportok koordinációjával.⁶⁴

Az Alzheimer-kórban szenvedők agyában megnövekedett **vaskoncentrációt** már több évtizede megfigyelték,⁶⁵ később háromszoros mennyiséget állapítottak meg a normális szinthez képest: az egészséges neuropil állományban 340 μ M, míg a plakkbán 940 μ M a koncentrációja.^{49, 66} A rendellenesség kialakulásának hátterében ebben az esetben is a fémion homeosztázisának zavara állhat: számos vasszállító – transzferrin,^{67, 68} DMT1⁶⁹ –, -tároló – ferritin⁶⁷ – és ferroxidáz enzim – ceruloplazmin^{70, 71} – mennyisége illetve aktivitása változott meg az egészségeshez képest. Az APP-nek is ferroxidáz viselkedést tulajdonítanak és bár mennyisége nem változott, az aktivitás csökkenését tapasztalták.⁷² Az enzimek aktivitása a kor előrehaladtával bizonyítottan változik, de genetikai tényezők is szerepet játszhatnak a hibás enzimműködés kialakulásában. Az amiloid plakkok megjelenését a vas oxidatív hatásának is tulajdonítják, ami a Fenton-reakció révén ROS képződését eredményezi, így sejthalált okoz.^{33, 73} A peptid ugyanis a membránban oxidálódhat, ami feltehetően az agyban megnövekedett réz- és vaskoncentráció eredménye,⁷⁴ ahol végül oldott formába kerül, hogy amiloid plakkok formájában kicsapódjon.

Fontos azonban különbséget tenni az amiloid lerakódások morfológiáját illetően. Több kutatócsoport is igazolta, hogy a réz(II)- és cink(II)ionok az amorf aggregátumok képződését segítik elő,⁷⁵⁻⁷⁹ az amiloidszálak képződését viszont gátolják,^{75, 80} a vas(III)ionok hatására azonban semleges pH-n fibrillumok jelennek meg.⁷⁶ Mára már megállapították, hogy az amiloid- β peptidhez viszonyítva a sztöchiometrikusnál kisebb mennyiségű Cu(II) jelenlétében illetve kisebb A β -koncentráció esetén az amiloidszálak képződése felgyorsul, míg az ekvimolárisnál nagyobb mennyiségű Cu(II) esetén illetve nagyobb koncentrációjú A β -oldatban a fibrillumok képződése gátolt.^{32, 81, 82}

Az Alzheimer-kór elleni küzdelem alapját az amiloid- β peptid keletkezéséért és lebontásáért felelős enzimek működésének szabályozása jelenti, amit a fémion-koncentrációk normalizálásával próbálnak elérni.^{83, 84} A fő irányvonalat tehát a kelátorok jelentik:⁸⁵ a clioquinol és származékai,⁸⁶ melynek kiemelkedő vas-, réz- és cinkmegkötő képességét kihasználva figyelemre méltó eredményeket értek el. A réz(II) esetén a poliamin származékok,⁸⁷ a kurkumin⁸⁸, a flavonoidok,⁸⁹ a bisz(tioszemikarbazon) és származékaival folynak kutatások.^{90, 91} Réz(II)- és cink(II)ionok eltávolítására nem utolsó sorban multihisztidin peptidek alkalmazása is egy lehetőség.⁹² A platinafémek komplexeit is vizsgálják az Alzheimer-kór kezelésének céljából, így a ciszplatint is, valamint ligandumként további fenantrolin-, fenilpiridin-, és egyéb származékokat.⁹³⁻⁹⁶ Kutatások folynak még a vaskelátorok terén is a deferoxamint és analógjait illetően.⁸⁵

2.3. A tanulmányozott átmenetifém-ionok biológiai jelentősége és koordinációs kémiája⁹⁷

2.3.1. A réz koordinációs kémiája és biológiai jelentősége^{98, 99}

A réz komplexeiben főként +2-es oxidációs számmal szerepel, melyek geometriájukat tekintve tetragonálisan torzult oktaéderes vagy síknégyszetes szerkezetűek. Elektronszerkezetük d^9 , ezért színesek (általában kék színűek) valamint paramágnesesek. Mind az O, N, és S donoratomok felé nagy affinitással rendelkezik a $S > N > O$ sorrendben. A +1-es oxidációs állapotú forma szintelen és diamágneses a d^{10} elektronszerkezet miatt. Komplexei többnyire lineáris vagy tetraéderes szerkezetűek és mivel lágy fémion, a S és N donoratomokat részesíti előnyben. Ritka esetben Cu(III) formában is szerepelhet. Peptidekkel képzett komplexeiben a Cu(II) torzult oktaéderes szerkezetű komplexei a zöldtől a piros színig terjedhetnek a koordinálódó nitrogénatomok számától függően. Az oldalláncokon keresztül létrejövő koordináció eredménye általában kék vagy lila színű részecskét eredményez, ez a fajta kötésmód a leggyakoribb a fehérjékkel kialakított kölcsönhatások során a hisztidin, metionin és aszpartát oldalláncok részvételével. Az amidnitrogének koordinációjával a réz(II)komplexe abszorpciós spektruma további kékeltolódást mutat és a lilától a pirosig változhat a színük. Biológiai rendszerekben ez a kötésmód a prion protein és az albumin esetén is megvalósul.

A növény- és állatvilágban egyaránt fontos szerepet játszik a réz, mely többnyire fehérjéhez kötött formában van jelen – albumin, ceruloplazmin – és számos biológiai redoxifolyamatban részt vesz – szuperoxid-dizmutázok,

oxigenázok, oxidázok –. A felnőtt emberi szervezet 100-150 mg rézet tartalmaz, az ajánlott napi rézfelvétel 3 és 5 mg közötti mennyiség. A vas és a cink után a harmadik leggyakoribb átmenetifém a biológiai rendszerekben, hiánya vérszegénységhez vagy Menkes-kórhoz, feleslege Wilson-kórhoz vezet. A réz számos állapotban és koordinációs módban lehet jelen a fehérjékhez kötve, melyeket a következő csoportokba sorolhatunk:

- 1. típus: A „kék”-rézproteinek olyan erősen torzult szerkezetet alakítanak ki a fémion körül, mely a Cu(II)-re jellemző síknégyzetes (4N-donoratom) és a Cu(I) esetén megvalósuló tetraéderes geometria (4S-atom) közötti átmenet eredménye, ami hajlamossá teszi a redoxi átalakulásokra. A 3+1 koordinációs környezetben két nitrogén és két kén donoratom található az ilyen típusú fehérjékben. Nevüket a 600 nm körüli S→Cu töltésátviteli sáv eredményeként megjelenő intenzív kék színükről kapták.
- 2. típus: A „nemkék”-rézproteinek közel síknégyzetes koordinációjú réz(II)komplexeiket tartalmazzák, melyek gyenge axiális kölcsönhatást is kialakíthatnak és jellemző ESR paraméterekkel rendelkeznek.
- 3. típus: Az „ESR-inaktív”-rézfehérjék egyik altípusa két Cu(I)ionot tartalmaz egymástól 360 pm távolságra, melyek két hisztidin oldalláncon keresztül kötődnek a fehérjéhez. ESR inaktív centrum mind Cu(I), mind Cu(II) állapotban, mely átalakulások az oxigénmolekula transzportja közben mennek végbe. A másik altípusban Cu(II)-ionok találhatók egymáshoz közel, melyek antiferromágneses csatolása magyarázza az ESR-csendes tulajdonságot.

2.3.2. A nikkell koordinációs kémiája és biológiai jelentősége¹⁰⁰

A nikkell komplexeiben +2-es oxidációs számmal, d^8 elektronszerkezettel szerepel leggyakrabban, ritkábban Ni(III)-ion formájában található meg. A nikkell(II)komplexeik kék vagy zöld színű oktaéderes, tetraéderes vagy sárga ill. vörös színű síknégyzetes szerkezetűek. Oktaéderes komplexeik képződnek a peptidek oldalláncon keresztüli koordinációjával, az amidnitrogének belépésével a koordinációs szférába síknégyzetes, diamágneses és sárga színű komplex képződik.

A nikkell szerepét biológiai rendszerekben 1975-ig nem tudták igazolni, amíg az ureáz enzimben fel nem fedezték a jelenlétét. Ezek az enzimek a karbamid hidrolízisét katalizálják számos baktériumban és növényben. A nikkell a vas mellett a hidrogenázokban is fellelhető, melyben koordinációs száma 5 vagy 6 és kén-, nitrogén- és oxigén donoratomok is szerepelnek a koordinációs

szférájában. Oxidációs száma +1 és +3 között változik a redoxifolyamatok során. Ugyancsak vas- és nikkeltartalmú enzim a CO-dehidrogenáz, melyben a négy kénatom által koordinált nikkel jelenlétében megy végbe a szén-monoxid oxidációja szén-dioxiddá. A nikkel koordinációja hisztidinhez és ciszteinhez megvalósul a *Helicobacter pylori* baktérium esetén is, mely a nikkel transzportjában szerepet játszó transzmembrán doménjében tartalmaz hisztidin egységeket.¹⁰¹ A hisztidint tartalmazó peptidekkel való kölcsönhatásának vizsgálata ennek függvényében is jelentős lehet.

2.3.3. A cink biológiai jelentősége és koordinációs kémiaja^{98, 102}

A cink oxidációs száma +2 komplexeiben, d^{10} elektronszerkezetéből következően színtelen, diamágneses és kristálytér-stabilizációs energiája 0. Koordinációs száma 6 vagy 4, így oktaéderes és tetraéderes elrendeződés valósul meg leggyakrabban.

Számos enzim alkotóeleme és az élőlényekben lejátszódó biológiai folyamatok nagy többségéhez nélkülözhetetlen a cink.¹⁰³ Szinte minden emberi sejtben megtalálható különböző enzimek formájában, és mivel mennyisége összesen 2 gramm, koncentrációja igen alacsony. A szénsav-anhidráz az emberi szervezeten kívül növényekben és állatokban is megtalálható, az elsőként felfedezett cinktartalmú enzim. Egy Zn(II)-iont tartalmaz a fehérje egy „zsebében”, melyet három hisztidin koordinál imidazolnitrogénjével és egy vízmolekulával együtt tetraéderes geometria alakul ki. Egy másik ismert cinktartalmú enzim a karboxipeptidáz-A, mely a fehérjék C-terminális peptidkötését hidrolizálja az emésztési folyamatban. Egyetlen cinkatom található benne, melyet két hisztidin nitrogénatomjai, egy glutamát karboxiloxigén és egy vízmolekula koordinálnak, így alakítanak ki tetraéderes szerkezetet a fémion körül. Fontos említést tenni a „cinkujj-fehérjéről” is, melyekben 9-10 Zn-atom található. Mindegyik fémiont négy-négy aminosav (két hisztidin és két cisztein) koordinálja tetraéderes struktúrával, így alakul ki a fehérje különleges szerkezete, melynek a DNS bázisszekvenciájának felismerésében tulajdonítanak szerepet.¹⁰⁴ A szinaptikus rés cinkkoncentrációjának szabályozását a ZnT3 cinktranszporter fehérje végzi, melynek működését az ösztrogén is befolyásolja. Ezzel a megfigyeléssel hozzák összefüggésbe, hogy a nők nagyobb hajlamot mutatnak az Alzheimer-kór kialakulására.¹⁰⁵

2.4. A peptidek koordinációs kémiája

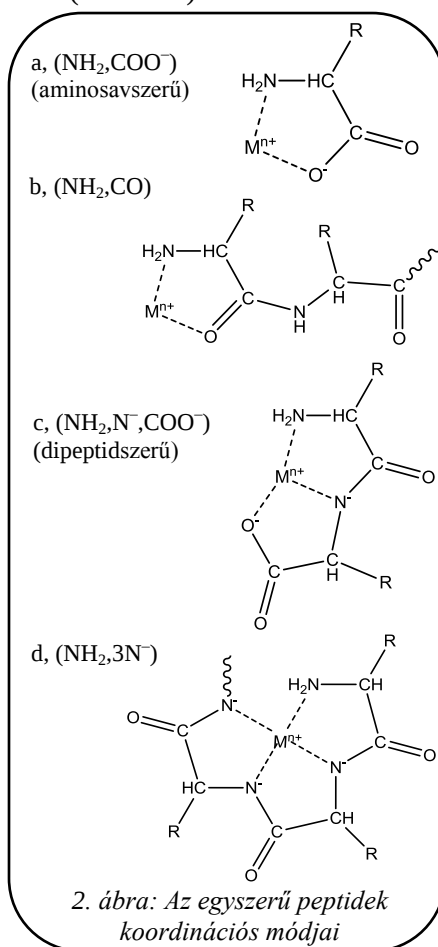
A fehérjék, mint polipeptidek kiemelkedő biológiai szerepének megértése érdekében számos kutatócsoport tanulmányozta az azokat modellező kisebb peptidek komplexkémiái viselkedését. Ennek megfelelően a témában fellelhető irodalom is meglehetősen széles, az alapvető koordinációs viszonyokat már feltérképezték a peptidek körében.¹⁰⁶⁻¹¹² A komplexek képződése a fémion sajátosságaitól, a pH-tól illetve a peptidben megtalálható egyéb oldalláncbéli donoratomoktól is függ. A fémionmegkötésben részt vevő lehetséges fő funkciós csoportok: a terminális aminocsoport és karboxilátcsoport, valamint a peptidkötés amidnitrogénje, mely a mérhető pH-tartományban ($0 < \text{pH} < 14$) nem vesz részt sav-bázis reakcióban. Bizonyos fémionok, például a Pd(II), Cu(II), Ni(II), Au(III) azonban elősegítik az amidkötés deprotonálódását és annak koordinációja is bekövetkezik. A peptidváz koordinációját módosíthatják a peptid oldalláncbéli funkciós csoportjai,^{113, 114} melyek lehetnek erősen és gyengén koordinálódó csoportok is. Míg a karboxilát- (aszparaginsav, glutaminsav), a tioéter- (metionin) az alkoholos hidroxil- (szerin, treonin) és aminocsoport (lizin), kis mértékben, addig az imidazol- (hisztidin) és tiolcsoport (cisztein) lényegesen megváltoztathatja a koordinációs viszonyokat. (A képződő komplexek töltését a jobb átláthatóság miatt nem tüntettem fel ebben a fejezetben.)

2.4.1. Egyszerű peptidek koordinációs kémiája

Az oldalláncban koordinációra nem képes csoportot tartalmazó aminosavakból felépülő peptidek fémion-koordinációja a peptidváz részvételével megy végbe. A terminális amino- és karboxilátcsoport az aminosavakban kellő közelségben van egymáshoz öttagú kelát kialakításához – ezt nevezzük aminosavszerű koordinációnak (2.a ábra) –, azonban dipeptidekben és oligopeptidekben az egyidejű koordinációjuk nem kedvezményezett. A savas pH tartományban létrejövő részecske peptidekkel tehát a fémion karakterétől függően az N- vagy a C-terminuson bekövetkező koordináció eredménye. Az általunk vizsgált fémionok, a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionok jellemzően a nitrogénatomhoz kötődnek, így az [ML] részecske az (NH₂,CO) kötésmóddal írható le (2.b ábra). (A kialakuló komplexek összegképletében azok töltését nem tüntettem fel.) A pH további emelésével [MH₁L] összetételű komplex kialakulásával a kelátképző helyzetben lévő amidnitrogén deprotonálódása és koordinációja történik. Ez dipeptidek esetén az (5,5) tagú csatolt kelátrendszer (NH₂,N⁻,COO⁻) létrejöttét jelenti (2.c ábra). Nagyobb tagszámú peptidek esetén további amidnitrogén-koordináció következik be, lúgos közegben a ligandum

($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-$) donoratomokon keresztül, (5,5,5) tagú csatolt kelátgyűrűk kialakulásával köti a Cu(II) - vagy Ni(II) -iont (2.d ábra).¹¹¹ Az oldalláncban szereplő, koordinációban közvetlenül szerepet nem játszó csoportok a kialakuló komplexek sztöchiometriáját és szerkezetét ugyan nem befolyásolják, de hatással lehetnek azok stabilitására.¹¹⁵

Munkánk során olyan oligopeptid vizsgálatát végeztük el, melyekben hisztidin(ek)e-t és/vagy terminális aminocsoportot tartalmazó kötőhelyek találhatók egy molekulában, így a hisztidintartalmú peptid komplexképzési sajátosságainak összefoglalása külön fejezetként található. Az amiloid- β peptid 1-es és 7-es pozícióban is tartalmaz aszparaginsavat, így említést kell tennünk az oldalláncban karboxilátcsoportot tartalmazó peptid kötésmódjairól. A fémion-koordinációt ugyanis kisebb mértékben, de befolyásolhatja az aszparaginsav oldallánca is, így az oldalláncbeli karboxilcsoport komplexképződésre gyakorolt hatását ismertetném a következő fejezetben.



2. ábra: Az egyszerű peptid koordinációs módjai

2.4.2. Aszparaginsav-tartalmú peptid komplexképződési folyamatai

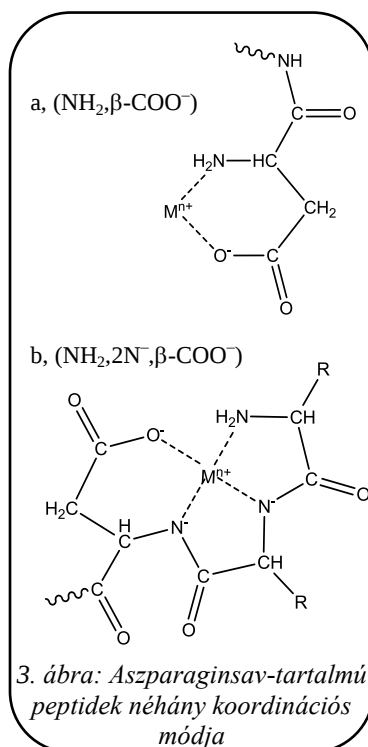
A fémionok koordinációja különböző fehérjékhez az oldalláncbeli karboxilátcsoportokon keresztül is történhet, például a Cu, Zn-SOD enzim,¹¹⁶ a transzketoláz enzim,¹¹⁷ a fibrinopeptid A^{118} és az amiloid- β peptid esetén is.^{119, 120} Az aszparaginsav jelenléte képes változtatni a fémionok koordinációs viszonyain, a kialakuló komplexféleségek stabilitása a karboxilát oldalláncok számától és peptidben elfoglalt helyzetétől is függ.¹⁰⁷ Ugyanakkor a glutaminsav γ -karboxilátcsoportjának jelenléte nem jár a koordinációs módok hasonló mértékű módosulásával.¹²¹

Az aszparaginsav az N-terminálison β -alaninszerű koordinációt tesz lehetővé ($\text{NH}_2, \beta\text{-COO}^-$) kötésmóddal, ezáltal stabilis 6-tagú kelát jön létre

(3.a ábra), míg a glutaminsav γ -karboxilátcsoportjával 7-tagú, ami magyarázza utóbbi kisebb hatását a képződő komplexfeleségekre. Az átmenetifémek esetén ez a dipeptidszerű koordinációhoz képest az [ML] és [ML₂] komplexek nagyobb stabilitásában nyilvánul meg. A pH emelésével bekövetkezik az amidnitrogének koordinációja, azonban a glicilglicinhez képest nagyobb pH értéken. A második vagy harmadik helyen található aszparaginsav esetén tehát (NH₂,nN⁻,β-COO⁻) donoratomok kötődnek a fémionhoz (3.b ábra).¹²² A közbelső pozícióban aszparaginsavat tartalmazó peptidok is hatással vannak az átmenetifém-ionok koordinációjára.^{116-118, 123-128} C-terminális

helyzetben aszparaginsavat tartalmazó dipeptidok vizsgálata során Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionok [ML] komplexeire is nagyobb stabilitási állandót számoltak.^{121, 122, 129-131} [CuL] komplexekben a glicilglicinéhez hasonló koordinációs módot írtak le, azonban a kialakuló részecske megnövekedett stabilitását tapasztalták a karboxilátcsoport hatására. Ezzel együtt az amidnitrogének deprotonálódásának pK-értéke is megemelkedik, tehát a kölcsönhatás gátolja az amidkoordinációt.^{129, 131} Réz(II)ionok esetén a második helyen lévő aszparaginsavat tartalmazó peptiddel [CuH₁L] komplex, míg a harmadik helyen lévővel [CuH₂L] részecske képződik a β-COO⁻-csoport részvételével (3.b ábra). A kialakuló kötési mód nagy stabilitása tükröződik abban is, hogy utóbbi esetben a további amidnitrogén-deprotonálódás még nagy pH-n sem megy végbe.

Az egyszerű peptidokkal képzett [NiL] komplexéhez képest az első helyen aszparaginsavat tartalmazók hasonló részecskéi két nagyságrenddel nagyobb stabilitással bírnak és 7-es pH-ig nagy mennyiségben vannak jelen. Ehhez a részecskéhez hasonlóan a [NiL₂] részecske is oktaéderes elrendeződésű, ami egyszerű oligoglicinek esetén nem képződik. Szintén nem mutatható ki [CuL₂] komplex az N-terminálison aszparaginsavat tartalmazó peptidokkal, ami a koordinációs geometriával magyarázható.¹³⁰ [NiH₁L] komplex csak 9-es pH felett és kis mennyiségben mutatható ki, [NiH₂L] részecske pedig nem is jelenik meg, ami az amidnitrogének kötődésének akadályozását igazolja a nagy



stabilitású ($\text{H}_2\text{N}, \beta\text{-COO}^-$) koordináció miatt.¹³¹ A második helyen lévő aszparaginsav β -karboxilátcsoportja nem rendelkezik ilyen mértékű stabilizáló hatással. A $[\text{NiH}_1\text{L}]$ részecske nem mutatható ki, a $[\text{NiH}_2\text{L}]$ komplex jelenléte azonban nagyobb pH-tartományba tolja el a $[\text{NiH}_3\text{L}]$ részecske megjelenését.^{118, 131} Harmadik helyen aszparaginsavat tartalmazó peptidek koordinációja nikkell(II)ionokhoz a $[\text{NiH}_1\text{L}]$ részecske hiányát, azonban a $[\text{NiH}_2\text{L}]$ és $[\text{NiH}_3\text{L}]$ sztöchiometriájú 2 ill. 3N-es komplex képződését eredményezi, utóbbiak síknégyzetes elrendeződésűek. A réz(II)komplexeiktől eltérően a nikkellel tehát megvalósul az aszparaginsavat követő amidnitrogén koordinációja, bár nagyobb pH-n, mint az egyszerű oligopeptidek esetén.

Cink(II)ionokkal az első helyen aszparaginsavat tartalmazó peptidek $[\text{ZnL}]$, $[\text{ZnH}_1\text{L}]$ és $[\text{ZnH}_2\text{L}]$ összetételű részecskét képeznek, melyek közül az utolsó kettő vegyes hidroxokomplex. Az amidnitrogén deprotonálódás nem következik be, polimer szerkezetű komplex is csak 10-es pH felett alakul ki, ami az ($\text{NH}_2, \text{CO}, \beta\text{-COO}^-$) koordináció jelenlétére utal a $[\text{ZnL}]$ részecskében. A láncközi aszparaginsav stabilizáló hatása már kevésbé érvényesül, 7-es pH-n megjelenik a cink(II)-hidroxid csapadék.¹³¹

2.4.3. Hisztidintartalmú peptidek komplexképződési folyamatai

A hisztidin hatása a fémion-koordinációra a képződő komplexek stabilitás-növekedésében nyilvánul meg, így a természetben előforduló hisztidintartalmú fehérjék fontos szerepet kapnak a biológiai folyamatokban. Az imidazolil oldallánc horgonycsoportként viselkedik számos átmenetifém-ion megkötésében, melynek tanulmányozásával több közlemény is foglalkozott az elmúlt évtizedekben, különösen a réz(II)- és nikkell(II)ionokat illetően.^{106, 107, 110, 111, 132-135} A hisztidint tartalmazó peptidek komplexképződési folyamatait számos tényező befolyásolja, úgy, mint a fémion minősége, a ligandum aránya a fémionhoz képest, a hisztidin aminosavak száma, pozíciója és más, a koordinációt befolyásoló donorcsoportokhoz viszonyított helyzete a szekvenciában, illetve a terminális csoportok jelenléte (szabad vagy védett peptid).

2.4.3.1. Egy hisztidint tartalmazó peptidek

Azokban a peptidekben, melyekben **az amino terminus szabad**, a hisztidin azzal együtt szerepel horgonydonorként a fémionok számára. Meg kell különböztetnünk azonban a hisztidin aminosavat különböző pozícióban tartalmazó ligandumokat.

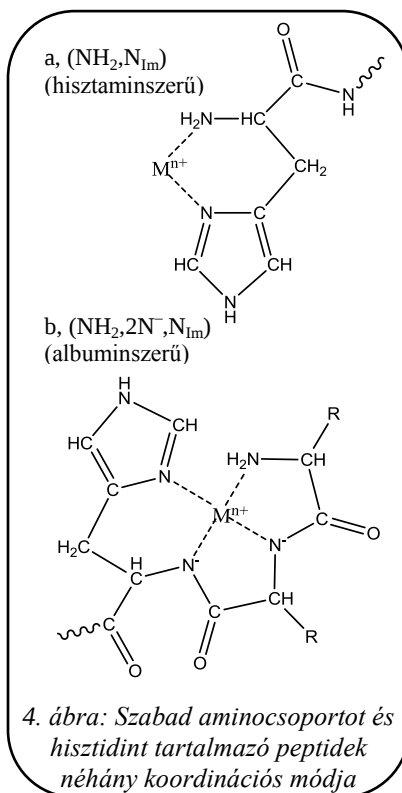
Az amino terminális lánccvégen hisztidin jelenlétében ($\text{NH}_2, \text{N}_{\text{Im}}$) kötésmódú, hisztaminszerű koordinációjú komplex képződik savas pH-n

(4.a ábra). A kialakuló stabilis hattagú kelát megnöveli a mono- és biszkomplexek stabilitását, ezáltal gátolja az amidnitrogének koordinációját.^{110, 136, 137} A ligandum arányától függően [ML] vagy [ML₂] részecskék képződnek réz(II)- és nikkel(II)ionokkal, hisztaminszerű koordinációval. Az (NH₂,N⁻) kötémód csak nagy pH-n, és egy másik peptid imidazolnitrogénjének kiegészítő koordinációjával jön létre, dimer részecskét eredményezve. A H₂N-XH- szekvenciájú peptidekben már egymagvú komplexben is lehetőség nyílik amidnitrogén kötődésére a fémionhoz, mely nagy stabilitású részecskét eredményez, azonban a további N⁻ koordinációja ezáltal gátoltta válik. Az így kialakuló [MLH₁] összetételű komplex tehát tridentát koordinációval jön létre. A második helyen hisztidint tartalmazó peptidekkel nem csak a Cu(II)- és Ni(II)-, hanem a Zn(II)-ionok is képesek elősegíteni az amidnitrogén deprotonálódását és (NH₂,N⁻,N_{Im}) kötémód kialakítását 7-es pH körül.^{138, 139}

A szabad amino terminussal és harmadik helyen hisztidinnel rendelkező peptidek kínálják a legkedvezőbb koordinációs lehetőséget réz(II)- és nikkel(II)ionok számára. Ezek a ligandumok már enyhén savas pH-n nagy stabilitású [MLH₂] komplexek kialakítására képesek Cu(II)- és Ni(II)-ionokkal a két amidnitrogén egyidejű kötődésével és így (5,5,6) tagú csatolt kelátrendszer kialakításával

(4.b ábra).^{140, 141} A fémmegkötésben részt vevő (NH₂,N⁻,N⁻,N_{Im}) donortatomok az ún. albuminszerű koordinációt hozzák létre – az albumin nagy réz- és nikkelkötő képessége is ennek köszönhető –, melyet ATCUN motívumként is neveznek a szakirodalomban (Amino Terminal Cu and Ni Binding Site). A kötőhely modellezésére alkalmas H₂N-XaaYaaHis- szekvenciájú peptidek komplexképzési sajátságait számos tanulmány leírja¹⁴²⁻¹⁵³ és kristályszerkezeti vizsgálatok is bizonyítják.^{140, 154}

A réz(II)- és nikkel(II)ionok mellett palládium(II)- és arany(III)ionok is képeznek



hasznló részecskéket,¹⁵⁵ azonban kobalt(II)- és cink(II)ionok esetén nem mutatható ki ilyen típusú komplex.

A hisztidin negyedik vagy távolabbi pozícióban az aminocsoporttal való egyidejű koordinációval eredményezi az [ML] komplexet, melynek kialakításában az aminocsoporttal kelátképző helyzetben lévő karboniloxigén is részt vehet.¹⁵⁶ A makrokelát szerkezet stabilitása a gyűrű tagszámával ellentétesen változik. A pH emelésével az amidnitrogének is bekerülnek a koordinációs szférába,¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ azonban vitatott, hogy melyik horgonycsoporttól kezdődően. Kisebb oligopeptidek esetén többnyire ($\text{NH}_2, 3\text{N}^-$), míg nagyobb ligandumokban ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}$) kötésmódot írtak le.¹³⁴ A kétféle koordinációs mód egyidejűleg is jelen lehet, mely az amiloid- β peptid esetén is bekövetkezik és az értekezés későbbi fejezetében kifejtésre kerül.

Védett aminoterminussal rendelkező peptidekben csak a hisztidin oldallánc játszik fémmegkötő szerepet, a szomszédos amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódásával és koordinációjával. A folyamat mind az amino-, mind a szénterminus irányába végbemehet, így (6,5,5) illetve (7,5,5) tagú csatolt kelátgyűrűk jönnek létre. A kelátképződés kedvezőbb hattagú, mint héttagú gyűrű esetén, így az N-terminus felé kedvezményezettebb az $[\text{MH}_3\text{L}]$ komplex kialakulása. Abban az esetben, ha a hisztidin az N-terminálison található,¹⁵⁹ vagy olyan aminosav áll előtte, mely tercier amidcsoportot tartalmaz a láncban (prolin^{110, 160} vagy szarkozin¹⁶¹), erre nincs lehetőség és az amidnitrogén-koordináció a C-terminális irányba mehet végbe. Az amiloid- β peptidben speciális esetet jelent a két szomszédos hisztidin, ekkor lehetőség van az aminoterminus irányába megvalósuló koordinációra, azonban ezen kötőhely elfoglalása után egy következő fémion megkötődése már csak a C-terminus felé történhet meg a másik hisztidintől kiindulva.

2.4.3.2. Több hisztidint tartalmazó peptidek

A hisztidineket tartalmazó ligandumok modelleznek a legmegfelelőbbben számos természetes fehérjeszekvenciát, úgy, mint az amiloid- β peptidet,¹⁶²⁻¹⁶⁴ az amiloid prekursor proteint (APP),^{165, 166} a prion proteint^{31, 167-169} és még számos multihisztidin peptidet. Ezek a ligandumok makrokelát szerkezetű komplexek kialakítására alkalmasak, melyek stabilitása a lánc hosszától függ.

A hisztidinek mellett **szabad aminocsoportot tartalmazó peptidekben** ezek a funkciós csoportok mind horgonydonorokként szerepelnek. A dihisztidin a legegyszerűbb multihisztidin peptid. Réz(II)ionokkal a kis pH-n hisztaminszerű kötésmóddal létrejövő $[\text{MLH}]^+$ részecskét követően a pH emelésével a glicilhisztidinhez hasonlóan ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}$) donatoratomok kerülnek a koordinációs szférába. Tovább emelve a pH-t 7-ig a $[\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2]$ sztöchiometriájú komplex

képződik, melyben mindkét réz(II)ion körül ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}, \text{N}_{\text{Im}}$) donoratomok vannak jelen.^{170, 171} Nikkel(II)ionoknál is tapasztalták az amidkoordinációt, míg cink(II)ionokkal csak a hisztaminszerű kötésmód alakult ki.^{171, 172} Egyéb aminosavakkal kiegészítve a szekvenciát, például a HisHisGlyGly esetén nincs változás a koordinációs viszonyokban.¹⁷³

A $-\text{HisHis}-$, $-\text{HisXaaHis}-$, $-\text{HisXaaYaaHis}-$ és/vagy $-\text{HisXaaYaaZaaHis}-$ szekvenciákat tartalmazó peptidek esetén réz(II)- és nikkel(II)ionokkal is az imidazolnitrogének keresztül jön létre makrokelát szerkezetű komplex. A pH növelésével az albuminszerű koordinációt részesítik előnyben, amennyiben erre lehetőség van, más esetben az imidazolnitrogént nagyobb pH-n a deprotonált amidnitrogén váltja fel a koordinációs szférában. Ennek eredményeként az ($\text{NH}_2, \text{nN}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötésmód ($n = 0-2$) változik (NH_2, nN^-) koordinációra ($n = 1-3$), melyeket axiálisan egészíthet(nek) ki imidazol oldallánc(ok). Ezáltal a hisztidinek egymáshoz és az amino terminushoz viszonyított helyzetétől függően változatos szerkezetű részecskék alakulhatnak ki különböző pH értékeken.¹⁷³⁻¹⁷⁶ A komplexképződés sokszínűségét fokozza a több imidazolcsoport jelenléte a terminális aminocsoport mellett, mely nagy pH-n a kötőhelyek elkülönülését és az egyes fémionok esetén eltérő preferenciát is mutathat.¹⁷⁷

A cink(II)ionnal a hisztaminszerű kötésmód a meghatározó, amennyiben az első aminosav hisztidin,¹⁷⁸ amidnitrogén deprotonálódás pedig a második pozícióban hisztidint tartalmazó peptidek komplexében következik be, melyben ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordináció valósul meg.

Védett aminoterminussal rendelkező peptidekben az amino terminus horgonycsoportként már nem játszik szerepet. Az így nyert ligandumok megfelelő modellként szolgálnak a fehérjék láncközi szakaszának tanulmányozására.

A védett aminoterminusú multihisztidin peptidek esetén olyan kis tagszámú ligandumokat vizsgáltak, melyek szomszédos ill. egy, két vagy három aminosav távolságban tartalmazzák a hisztidineket.^{116, 179-182} A kis pH-n, egy vagy két imidazolnitrogén részvételével kialakuló komplex a pH emelésével nem képes megakadályozni az amidnitrogének deprotonálódását. Összehasonlítva a különböző távolságra lévő hisztidineket tartalmazó peptidek komplexképződési viszonyait a $-\text{HisXaaHisYaaHis}-$ szekvencia képes legnagyobb mértékben az amidnitrogének deprotonálódását megakadályozni. A hisztidint és szarkozint felváltva tartalmazó szekvencia, az $\text{Ac}-(\text{HisSar})_n\text{His-NH}_2$ ($n=1-3$) meggátolja a fémion hatására bekövetkező amiddeprotonálódást, a széles tartományban

makrokelát szerkezetű komplex stabilitása pedig a hisztidinek számától és azok egymáshoz viszonyított helyzetétől függően változik.¹⁶¹

A nikkel(II)ionok komplexképződési sajátosságait is vizsgálták hasonló szekvenciájú peptidekkel.¹⁸³ A koordináció az imidazol oldalláncokon keresztül jön létre, így a fő részecske az [ML] összetételű komplex a semleges körüli pH-tartományban. A makrokelát szerkezetű részecskék stabilitása a réz(II)komplexekéhez hasonlóan változik a hisztidinek számát és egymáshoz viszonyított helyzetét illetően. A pH emelésével bekövetkezik az amidnitrogének kooperatív deprotonálódása, azonban a –HXH– szekvencia esetén az ($N_{Im}, 2N^-, N_{Im}$) koordinációs mód válik kedvezményezetté. Az $[MLH_3]$ komplex képződése csak nagy pH következik be, –HXXH– szekvencia esetén kooperatív módon az imidazol oldallánc-koordinációt követően.

Több hisztidin jelenlétében, védett amino terminus esetén az imidazolil horgonycsoportok elkülönült kötőhelyekként viselkedhetnek, így több fémion koordinációja is bekövetkezhet. A két hisztidin egymáshoz közel összetett komplexképződési folyamatokat eredményez számos izomer szerkezet kialakulása mellett. Független kötőhelyeket akkor kapunk, ha az imidazol oldalláncok egymástól távol vannak jelen a szekvenciában, ezáltal többmagvú részecskék jönnek létre. Ilyen komplexféleségek jelennek meg a prion fehérje fragmenseiben, amelyek a hisztidinek számával megegyező számú réz(II)ion megkötésére képesek molekulájukban.^{31, 135, 184}

2.5. Az amiloid- β peptid szerkezete és fémionmegkötő képessége

Az amiloid- β peptid két formája az $A\beta_{40}$ és $A\beta_{42}$, a negyven aminosavból álló forma szerkezetét tekintve két hélixben gazdag régióból – 15-23 és 31-35 – és az ezeket összekötő rendezetlen szakaszból áll. A negyvenkét tagú peptid szabályos I. típusú β -redőt tartalmaz, így meghatározza a molekula harmadlagos szerkezetét.¹⁸⁵ A hisztidinben gazdag N-terminális rész számos poláris oldalláncot tartalmaz, ezáltal alkalmassá válik fémionok koordinációjára. A molekula további részében apoláris csoportokat találunk, melyek a hidrofób kölcsönhatások révén felelősek lehetnek az oligomerizációs és aggregációs folyamatokért. (5. ábra) Az apoláris szakasz egyúttal rontja a peptid oldhatóságát, ami megnehezíti az oldategyensúlyi vizsgálatokat. A probléma megoldását a polietilén-glikolláncsal történő módosítás (pegilálás) jelentette, mely növelte a molekula hidrofíl jellegét, ezáltal javította az oldhatóságot és lehetővé tette a peptid sav-bázis tulajdonságainak és fémkomplexeinek leírását. A natív peptid és a pegilált származék CD-spektrumainak összehasonlításával

kizárták a módosítás konformációra gyakorolt hatását: mindkét molekula rendezetlen szerkezettel rendelkezik.¹²⁰

	1	10	20	30	40
hA β ₄₃ :	DAEFRHDSG	YEVHHQKLVF	FAEDVGSNKG	AIIGLMVGGV	VIAT
rA β ₄₃ :	DAEFGHDSG	FEVRHQKLVF	FAEDVGSNKG	AIIGLMVGGV	VIAT

5. ábra: Az ember és a patkány amiloid- β peptidjének szekvenciája

Régóta elfogadott, hogy a fémionok megkötése a peptid 1-16 szakaszában megy végbe, a peptid és fragmenseinek komplexképződési folyamatait kutatócsoportunkban is tanulmányozták.^{120, 163, 164, 186} A fő koordinációs helyeket a terminális aminoscsoport, valamint a His6, His13 és His14 jelenti (1. táblázat), így az N-terminális hexadekapeptid négy ekvivalens réz(II)iont képes koordinálni az említett kötőhelyek környékén.¹²⁰ Nikkel(II)ionok számára a terminális aminoscsoport illetve a 13-as és 14-es hisztidinek környezete kínálja a legmegfelelőbb koordinációs lehetőségeket, így két ekvivalens fémion kötődött meg a molekulában.¹⁶⁴ A peptid továbbá három cink(II)iont képes koordinálni a terminális amino- és a His6 illetve a szomszédos hisztidinek környezetében, utóbbi kötőhely két fémiont is képes megkötni.¹⁶³ Továbbá a cink(II)ionok nem szorítják ki, de átrendezik a réz(II)ionokat az egyes kötőhelyek között.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

1. táblázat: Átmenetifém-ionok megoszlása az amiloid- β (1-16) fragmens kötőhelyei között

	-NH ₂ (terminális)	His6	His13	His14	Koordinált fémionok száma
Cu(II)	1	1	1	1	4
Ni(II)	1	-	1		2
Zn(II)	1		2		3

A fémionok szerepét a betegség kialakulásában alátámasztja a humán (hA β) és a patkány (rA β) amiloid- β peptid közötti különbség: az Arg5 helyett Gly5, a Tyr10 helyett Phe10 és a His13 helyett Arg13 szerepel, tehát csökken a poláris, illetve horgonydonorként szereplő aminosavak száma. (5. ábra) Ezek az eltérések összefüggésben állhatnak azzal a megfigyeléssel, hogy a patkányok agyi szöveteiben nem tapasztalható az amiloid plakkok kialakulása. A pH-potenciometriás vizsgálatok segítségével tehát megadták az amiloid- β peptiddel képződő részecskék sztöchiometriáját, azonban a koordinálódó donoratombok teljes leírására még nem került sor. A peptid egyes kisebb fragmenseit és azok származékait tanulmányozták a fém megkötés szempontjából, melyek az egyes kötőhelyeket tartalmazzák molekulájukban (2. táblázat).

2. táblázat: Az előzményekként szereplő (A), az általunk tanulmányozott (B) és néhány egyéb vizsgált A β -peptidfragmens és -származék (C) (a szürke színnel jelölt kötőhely/szakasz nem szerepel az adott fragmensben)

	NH ₂ (terminális)	His6	His13	His14	apoláris szakasz
A	Aβ(1-16): H ₂ N-DAEFRHDSGYEVHHQK-NH ₂ ^{6,119,163,189,191}				
	Aβ(1-16)PEG: H ₂ N-DAEFRHDSGYEVHHQK-PEG ^{120,163,186}				
	Aβ(1-16)Y10A: H ₂ N-DAEFRHDSGAEVHHQK-NH ₂ ^{120,163,164}				
	Aβ(1-6) ^{120,163,164,186}				
			Ac-Aβ(8-16)Y10A ^{120,163,164,186}		
	Aβ(1-4) ^{120,163,164}				
		Ac-Aβ(1-6) ^{120,163,164}			
B	Aβ(1-9): H ₂ N-DAEFRHDSG-NH ₂				
	H ₂ N-DAAAAHAAA-NH ₂				
	H ₂ N-DAAAAAHAA-NH ₂				
			Ac-Aβ(8-16)Y10A V12G: Ac-SGAEGHHQK-NH ₂		
			Ac-SGAEGHAQK-NH ₂		
				Ac-SGAEGAHQK-NH ₂	
	Aβ(1-16) ₂ PEG: (H ₂ N-DAEFRHDSGYEVHHQK) ₂ -C ₆ H ₄ -ON ₄ -PEG				
C	Aβ(1-28): H ₂ N-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-NH ₂ ^{6,190,191}				
		Ac-Aβ(1-28) ^{6,190,191}			
			Aβ(1-28)H6A ^{6,190,191}		
	Aβ(1-28)H13A ^{6,190,191}				
	Aβ(1-28)H14A ^{6,190,191}				
	Aβ(1-16)D1N; Aβ(1-16)E3Q; Aβ(1-16)D7N; Aβ(1-16)E11Q; Aβ(1-16)Y10F ¹⁸⁹ ; Aβ(3-16) ¹¹⁹				
		Ac-Aβ(1-16) ^{119,189,191}			
			Aβ(1-16)H6A ¹⁸⁹		
	Aβ(1-16)H13A ¹⁸⁹				
	Aβ(1-16)H14A ¹⁸⁹				
	Aβ(1-11) ¹⁹⁰				
			Ac-Aβ(10-16) ^{6,190}		

2.5.1. Az A β N-terminusának fémion-affinitása – az -NH₂ csoport és a His6^{120, 163, 164}

Legnagyobb affinitást az említett fémionok közül a réz(II) felé mutat az amiloid- β peptid, ami tükröződik abban is, hogy 4 ekvivalens réz(II)ion megkötésére képes. Az amiloidózis kialakulásában nem tulajdonítanak szerepet a nikkelnak, azonban komplexeinek oldategyensúlyi tanulmányozása közelebb vihet a réz(II)komplexek koordinációs viszonyainak megértéséhez. Cink(II)ionokkal is történtek vizsgálatok, azonban a spektroszkópai információk hiánya miatt számos megválaszolatlan kérdés maradt, csakúgy, mint az előbb említett fémionok esetén.

Az **A β (1-4)** tetrapeptid szekvenciája H₂N-DAEF-NH₂, tehát a terminális aminocsoport környezetében kialakuló koordinációs módok írhatók le a segítségével. Savas tartományban az aminocsoport és az aszparaginsav együttes kötődésével jön létre a [CuLH]⁺ komplex (NH₂, β -COO⁻) koordinációval és ezáltal 6-tagú kelát képződésével. A glutaminsav deprotonálódásával és axiális koordinációjával jön létre az [CuL] komplex. Az amidnitrogén-deprotonálódással létrejövő [CuH_nL]⁻ⁿ részecskék képződése (NH₂,nN⁻) kötésmóddal így némileg nagyobb pH-tartományba tolódik el. Nikkel(II)ionokkal csak 5-ös pH-n, a [NiL] és kis mennyiségben [NiL₂]²⁻ részecskével indul a komplexképződés, amelyekben – hasonlóan a [CuLH]⁺ komplexhez – (NH₂, β -COO⁻) koordináció alakul ki. A [NiH₃L]³⁻ közvetlenül ebből a részecskéből képződik a réz(II)ionokhoz hasonlóan. A [CuL] komplexéhez hasonló makrokelát szerkezet alakul ki a [ZnL] részecskében is (NH₂, β -COO⁻, γ -COO⁻) koordinációval.

A 6-os hisztidin környezetének jellemzésére az **Ac-A β (1-6)**, azaz az Ac-DAEFRH-NH₂ szekvenciát választották. Az [ML] komplex makrokelát szerkezettel, az Asp1, a Glu3 és a His6 oldalláncok részvételével jön létre. További különbséget jelent az amidnitrogének deprotonálódása, mely előbbi esetben jól elkülöníthető, azonban a His6-ról induló koordináció esetén kooperatív módon megy végbe az első két amidcsoporttal. Így a következő uralkodó részecske az [MH₂L]²⁻, mely már CD-aktivitást is mutat, tehát az amidnitrogének is kötődnek a fémionhoz: (2N⁻,N_{im}) kötésmód alakul ki, amit a [NiH₂L]²⁻ komplexben egy karboxilátcsoport is kiegészít. Nagyobb pH-n (3N⁻,N_{im}) koordináció alakul ki, nikkelt esetén csak erősen lúgos közegben. Cink(II)ionok nem indukálják az amidnitrogén-deprotonálódást, hidrolízis következik be a [ZnL] komplex képződését követően.

A natív peptidben azonban mindkét horgonycsoport jelen van, amit az **A β (1-6)** (H₂N-DAEFRH-NH₂) fragmens segítségével tanulmányozták. A két kötőhely egyidejűleg szerepelhet, így egy- és kétmagvú réz(II)komplexek is

kialakultak. A szabad aminocsoport és az imidazolil oldallánc továbbá együttesen vesznek részt makrokelát szerkezet kialakításában az [ML] komplexben, melyet az aszparaginsav β -karboxilátcsoportja (Zn(II)komplexben a glutaminsav γ -COO⁻ csoportja is) egészíti ki. A [CuH₁L]⁻ részecskében (NH₂,N,N_{lm}) koordinációs módot írtak le a hisztidin axiális kötődésével, a további deprotonálódással kialakuló komplexek azonban (NH₂,nN⁻) és (nN⁻,N_{lm}) izomer szerkezetekkel is leírhatók. A két forma egyidejűleg van jelen a rendszerben, azonban az (NH₂,3N⁻) kötőmód a meghatározó. A [NiH₃L]³⁻ komplex kooperatív módon jön létre az amino terminus egyértelmű preferenciájával. A cink(II)ionok esetén szokatlan amidnitrogén-koordinációt is feltételezték a [ZnH₁L]⁻ és [ZnH₂L]²⁻ részecskében.

Kétmagvú komplexben a két horgonycsoport elkülönült kötőhelyként csak 5,5-ös pH-tól szerepel, azaz az amidnitrogének deprotonálódásától kezdődően, melyek száma azonban csupán 5, tehát nem alakulhat ki mindkét fémion körül 4N-koordináció. A maximálisan deprotonált [Cu₂H₅L]³⁻ részecskében így az egyik fémion körül 3N, míg a másik réz(II)ion körül 4N kötőmód jön létre, ami azonban mindkét horgonycsoport környezetében előfordulhat. Ezáltal összesen 4 koordinációs mód lehet jelen: (NH₂,3N⁻) és (2N⁻,N_{lm}) illetve (H₂N,2N⁻) és (3N⁻,N_{lm}), melyek közül az első kötőmódpárt találták uralkodónak. A közbelső pH-értékeken jelen lévő [Cu₂H₃L]⁻ és [Cu₂H₄L]²⁻ komplexekben még nagyobb a lehetséges koordinációs variációk száma, melyek megvalósulásának arányára csupán feltételezéseket lehetett tenni. Ni(II)- és Zn(II)-ionokkal nem alakul ki kétmagvú komplex.

Az amiloid- β peptid természetes szekvenciájában tehát megtalálható az amino terminus és a His6 is, melyek mindegyike horgonycsoportként szerepel. Az 1-6 fragmens azonban nem minden szempontból megfelelő modell a tényleges oldatbeli viszonyok feltérképezésére. Ez a megállapítás szolgált kiindulópontként a meghosszabbított, A β (1-9) fragmens vizsgálatára, melyben – csakúgy, mint az A β peptidben – a C-terminális irányba is megvalósulhat a fémion-koordináció.

2.5.2. Az A β láncközi fragmensének fémion-affinitása – a His13 és His14^{120, 163, 164}

A His13 és His14 szerepelnek az amiloid- β peptid további, fémionmegkötésre alkalmas egységeként. A két hisztidin mindegyike szerepelhet horgonycsoportként a fémionok számára, tehát az amidnitrogén-koordináció a 13-as ill. a 14-es helyzetű aminosavtól is indulhat mind az N-, mind a C-terminus irányába.

Az **Ac-A β (8-16)Y10A**, azaz az Ac-SGAEVHHQK-NH₂ peptid tanulmányozása révén számos fontos megállapításhoz jutottak a szomszédos hisztidinek környezetét illetően. A komplexképződés 4-es pH felett kezdődik, tehát a Glu11 γ -karboxilcsoportja már deprotonált formában van, azonban a lizin ϵ -ammónium oldallánca az amidnitrogének koordinációja közben protonált állapotú. A [CuLH₂]³⁺ és [CuLH]²⁺ komplexek egy ill. két hisztidin oldallánc kötődésével alakulnak ki. A réz(II)ionokkal alkotott (2N_{im}) makrokelát azonban kisebb stabilitású a HGH szekvenciáéhoz képest a két hisztidin közelsége és emiatt feszült szerkezet kialakulása miatt. Nikkel esetén a [NiLH]²⁺ részecskével kezdődik a komplexképződés, csakúgy, mint a cink(II)ionokkal, ahol a glutamát oldallánc koordinációjáról is beszámoltak. A cink(II)komplexek nagyobb stabilitásúak savas közegben, mint az N-terminális fragmenssel képzett részecskék. Az amidnitrogének koordinációja csak 5,5-ös pH felett jelentkezik, a [CuL]⁺ és [CuH₁L] részecskék nagyon hasonló paraméterei azok azonos kötőmódjára utalnak. Ez abban az esetben valósulhat meg, amikor nem csupán a lizin, de az egyik hisztidin is protonált, ezáltal a (2N⁺,N_{im}) koordináció van jelen, a deprotonálódási lépés pedig az imidazólium oldallánchoz tartozik. Így a tényleges sztöchiometria [CuH₂LH₂]⁺ és [CuH₂LH] képletekkel írható le pontosan. A Ni(II)-komplexekben az első két amidnitrogén kooperatíván deprotonálódik 8-as pH felett, [NiL]⁺ komplex nem számolható. A pH növelésével képződő [MH₂L]⁻ és [MH₃L]²⁻ komplexek szintén azonos, (3N⁻,N_{im}) koordinációval írhatók le, ezúttal a deprotonálódás a lizin ammóniumcsoportján játszódik le. A (3N⁻,N_{im}) koordináció bármelyik hisztidintről indulhat, így szerkezeti izomerek jöhetnek létre, azonban ezek jelenlétéről és arányáról nem volt információ. A [ZnH₁L] és [ZnH₂L]⁻ részecskékre is meglepő módon amidkoordinációt írtak le.

Kétmagvú réz(II)komplexek is kialakulnak a peptiddel, melyek ekvimoláris oldatban is megjelennek 5-ös pH felett, az A β (1-6) fragmenshez hasonlóan az amidnitrogén-deprotonálódás és így a kötőhelyek elkülönülése mellett. A kialakuló részecskék maximálisan hat amid koordinációjával és számos izomer szerkezettel adhatók meg. Hasonló paraméterekkel rendelkeznek, mint az egymagvú [MH₃L]²⁻ komplexek, azonban vannak apró eltérések. A feltételezések szerint az első számú kötőhely a His13, melyről az N-terminális irányába indul a koordináció, a második réz(II)ion pedig a His14-től kiindulva a C-terminális irányba kötődik az amidnitrogénekhez. Nikkel(II)ionokkal nem képződnek kétmagvú részecskék. Az érdekes módon nagy cink(II)ion-affinitás megmutatkozik a dinukleáris komplexek képződésében is pH~7 felett, egy vagy két amidnitrogén koordinációja mellett.

2.6. Célkitűzések

Az utóbbi pár évben megnövekedett az amiloid- β peptid és fragmenseinek tanulmányozásával foglalkozó közlemények száma. A toxicitás vizsgálata fémionok jelenlétében számos ellentmondó eredménnyel járt a réz(II)-, cink(II)- és vas(II/III)ionokat illetően. A fémkomplexek tanulmányozása szintén az érdeklődés középpontjába került, melyben az egyes kötőhelyek szelektivitását tanulmányozták a peptid természetes fragmensein, illetve azok mutánsain keresztül. Vizsgálataink tárgyát tehát egyrészt olyan modellvegyületek jelentették, melyek egy molekulában tartalmaznak elkülönült kötőhelyeket, így affinitásuk közvetlenül összehasonlítható az egyes fémionok felé. Az e célból előállított és tanulmányozott peptidek $\text{H}_2\text{N-AAHAAAHG-OH}$ (*oktapeptid*) és $\text{H}_2\text{N-AHAAAHG-OH}$ (*heptapeptid*) szekvenciával rendelkeznek.

Az amiloid- β peptiddel képződő fémkomplexek koordinációs módjaira fiziológiás pH-n több, hasonló elképzelés is született. A vizsgálatok azonban sok esetben csupán erre a szűk pH-tartományra és mononukleáris komplexekre vonatkoznak. Munkánk második részében ezért célul tűztük ki az egyes kötőhelyeket tartalmazó fragmensek teljes körű oldategyensúlyi tanulmányozását, valamint a létrejövő izomer részecskék pontos kötémódjainak leírását, amire eddig nem került sor az irodalomban. Az ehhez szükséges természetes és mutáns peptidek egyik csoportját az N-terminális régió 1-9 szakasza jelentette – $\text{H}_2\text{N-DAEFRHDSG-NH}_2$ ($A\beta(1-9)$) –, mely két kötőhelyet, a terminális aminocsoportot és a 6-os hisztidint tartalmazza. A korábban vizsgált natív fragmenshez képest meghosszabbított peptid a valóshoz közelebbi képet adhat a kialakuló koordinációs módokról és a szerkezeti izomerek arányát is megadhatjuk CD-spektroszkópia alkalmazásával. A poláris oldalláncok hatásának igazolására és további szerkezeti kérdések megválaszolására a fragmens két, a fő kötőhelyek (Asp1 és His) kivételével oldalláncoktól mentes mutánsát, a $\text{H}_2\text{N-DAAAAHAAA-NH}_2$ (DA_4HA_3) és $\text{H}_2\text{N-DAAAAAHAA-NH}_2$ (DA_5HA_2) peptideket is tanulmányoztuk.

A peptid másik kötőhelyét a 13-as és 14-es hisztidin jelentik, melynek korábbi, Y10A mutánsát tovább módosítottuk a V12G cserével, így szekvenciája Ac-SGAEGHHQK-NH_2 ($A\beta(8-16)HH$). A kiegészítő módosítás oka a glicin speciális CD-spektroszkópiai tulajdonsága, melyet a szerkezet-meghatározás érdekében tettünk meg. Az izomer komplexfeleségek között további két származék segítségével tehetünk különbséget, melyet az említett mutációkon felül a H13A és H14A cserékkel kaptunk: Ac-SGAEGAHQK-NH_2 ($A\beta(8-16)AH$) és Ac-SGAEGHAQK-NH_2 ($A\beta(8-16)HA$). Az így kapott

ligandumok segítségével mintázhatók a lehetséges nagyon hasonló, ám CD-spektrumuk alapján megkülönböztethető koordinációs módok.

A még megválaszolatlan kérdések megoldása érdekében a réz(II)- és cink(II)komplexek, mint az Alzheimer-kórban igazoltan szerepet játszó fémionok kölcsönhatását tanulmányoztuk, valamint a nikkel(II)komplexek, mint a réz(II)-tartalmú részecskék modelljeként alkalmazható asszociátumok vizsgálatát végeztük el. A biológiai rendszereket mintázva több fémiont tartalmazó rendszereket is tanulmányoztunk, így a kötőhelyek szelektivitásának megállapítására is sor kerülhetett.

A biokémiai vonatkozást az *amiloid dimer* származék vizsgálata jelentette – (H₂N-DAEFRHDSGYEVHHQK)₂C₈H₁₇ON₄-PEG (A β (1-16)₂PEG)–, mely a legutóbbi feltételezések alátámasztására vagy éppen megcáfolására szolgál, miszerint az amiloid plakkok megjelenésének egyik kulcsfolyamata az A β peptid dimerizációs lépése. A réz(II)- és/vagy cink(II)ionok jelenlétében lezajló komplexkémiai folyamatok számos fontos információt nyújthatnak a betegség kialakulásának kémiai alapjait illetően.

3. Kísérleti módszerek és alkalmazott technikák

3.1. Felhasznált vegyszerek

A szilárd fázisú peptidszintézishez felhasznált vegyszerek

A peptidek előállítása során alkalmazott oldószerek és vegyszerek kereskedelmi forrásból származnak és további tisztítás nélkül használtuk őket. A Rink Amide AM és az Fmoc-Gly-Wang gyantát, a 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-tetrafluoroborátot (TBTU) valamint a 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc) védőcsoporttal ellátott aminosav-származékokat (Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH és Fmoc-Ser(tBu)-OH a Novabiochem (Svájc) forgalmazza. Az analitikai tisztaságú *N,N*-dimetil-formamid (DMF), az *N,N*-diizopropil-etilamin (DIEA), az etán-1,2-dítiol és a trifluorecetsav (TFA) a Merck Kft. termékei. Az *N*-hidroxi-benzotriazol hidrátot (HOBt·H₂O), az *N*-metil-2-pirrolidont (NMP), a triizopropil-szilánt (TIS), a 2,2'-(etiléndioxi)-dietántiolt (DODT) és a 2-metil-2-butanolt a Sigma-Aldrich Co. forgalmazza. A piperidin, a diklórmétán (DCM), a dietil-éter (Et₂O) és a 96%-os ecetsav a Molar Chemicals Kft., míg a szintézis célra alkalmas tisztaságú *N,N*-dimetil-formamid és az ecetsavanhidrid a VWR International terméke.

A HPLC-s tisztaságellenőrzéshez használt vegyszerek:

Az acetonitrilt (ACN) a VWR International, míg a HPLC-tisztaságú trifluorecetsavat (TFA) a Sigma-Aldrich Co. forgalmazza.

Az oldategyensúlyi vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek:

A titrálásokat karbonátmentes, argongáz alatt tárolt, kb. 0,2 mol/dm³-es, pontosan ismert koncentrációjú KOH-oldattal végeztük. A mérőoldat karbonátmentességét a koncentráció meghatározására alkalmazott potenciometriás méréssel ellenőriztük. A CuCl₂-, NiCl₂- és ZnCl₂-törzssoldatok a Reanal Finomvegyszergyár Zrt. által gyártott, a.l.t. minőségű vegyszerekből készültek. A pontos fémion-koncentrációkat oxinát formájában gravimetriás, a savkoncentrációkat pedig pH-potenciometriás meghatározással adtuk meg. A pH-metriás mérésekhez valamint a pH-állításhoz használt kálium-hidrogén-ftalát, KCl- és KOH-oldatok szilárd vegyszerekből, a HCl-oldatok tömény sav hígításával készültek háromszor ioncserélt víz felhasználásával.

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

A ¹H NMR vizsgálatokhoz a Sigma Aldrich Co. által forgalmazott 99,9%-os izotóptisztaságú D₂O-t, DCl- és NaOD-oldatot használtunk.

3.2. Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS)

Az oldatfázisban végzett peptidszintézis nagy hátránya volt az egyes aminosav-kapcsolási lépések alacsony konverziója, amit tovább növelt a keletkező melléktermékek és a reagensek feleslegének eltávolítása érdekében alkalmazott kicsapási és szűrési eljárás. Az 1984-ben Nobel-díjjal jutalmazott módszert, mely során a peptidet szilárd hordozóra kapcsolva állítják elő, Robert Bruce Merrifield dolgozta ki. A módszer lényege, hogy a gyanta, azaz egyfajta finomszemcsés műanyag felületén és belsejében olyan funkciós csoportok találhatók, melyhez aminosav-származékok kapcsolhatók. A nemkívánatos reagensek a reakciótérből így egyszerű szűrés során eltávolíthatók, tehát nincs szükség a peptid kicsapására és újbóli feloldására, ami csökkentené a kitermelést.

Az alkalmazott gyanták olyan műanyagokból állnak, melyekkel szemben a következő szempontokat támasztották: mechanikai és kémiai ellenálló képesség, jó duzzadási tulajdonságok a megfelelő oldószerekben a hozzáférhetőség érdekében. A szintézis sikeres kimenetelét befolyásolja továbbá a szemcseméret, -alak és a homogenitás is. A manapság kapható gyanták között elterjedtek a polisztirol és a polietilén-glikol alapú hordozók. A gyanta és a peptid között stabil kötés szükséges a szintézis során alkalmazott körülmények között, azonban annak befejeztével fontos a könnyű hasíthatóság. Amennyiben a C-terminuson szabad karboxilcsoporttal rendelkező peptid előállítás a cél, használhatunk Wang, CLEAR (CROSS LINKED ETHOXYLATE ACRYLATE RESIN) és 2-klorotritil, míg amidcsoporttal végződő szekvencia esetén Rink Amide típusú gyantát.

A szintézis építőköveinek minősége alapján beszélhetünk lépésenkénti (stepwise) kapcsolásról és fragmentskondenzációról, míg a reakció kivitelezése szerint áramló oldatos és szakaszos módszerek is léteznek.

A peptidkötés kialakításához szükséges, hogy az amino és karboxil funkciókat megszabadítsuk a védőcsoportoktól, ugyanakkor a nemkívánatos oldallánc-reakciókat egyéb védőcsoportok segítségével meg kell akadályozni. Ennek kivitelezésére kétféle védőcsoportpár alkalmazása vált a legelterjedtebbé: az Fmoc/tBu és a Boc/Bzl stratégia. Az első esetben a kapcsolandó aminosavszármazék aminocsoportjának védelmét 9-fluorenil-metoxi-karbonil-, míg az utóbbi módszernél *tert*-butoxi-karbonil-csoporttal látják el. Számos aminosav tartalmaz olyan oldalláncbeli funkciós csoportot, ami a szintézis bizonyos szakaszaiban nemkívánat reakcióba lépne az alkalmazott reagensekkel. Ennek elkerülése érdekében oldallánc-védőcsoportokkal gátoljuk a melléktermékek képződését. A védőcsoportokat illetően szükség van azok stabilitására a szintézis folyamán, azonban annak befejeztével fontos a könnyű

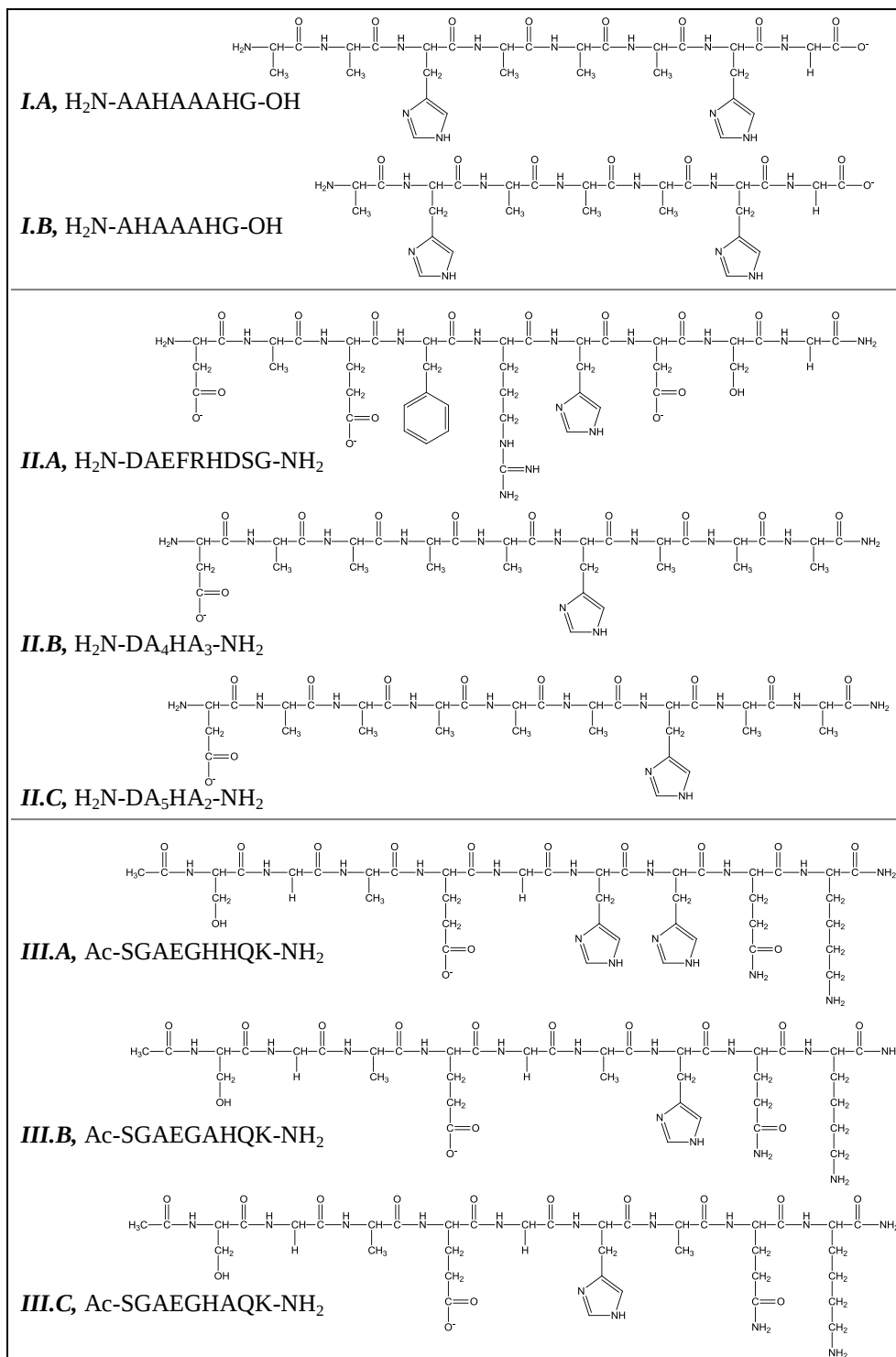
eltávolíthatóságuk is. Az általunk alkalmazott funkciócsoportvédelem az Fmoc/*t*Bu technika, amely az α -aminocsoportokon 9-fluorenil-metoxi-karbonil (Fmoc), míg az oldalláncokon *tert*-butil (*t*Bu) vagy abból származtatható csoporttal biztosítja a mellékreakciók kizárását.

Az előállított és tanulmányozott ligandumok szerkezete a 6. és 7. ábrán látható.

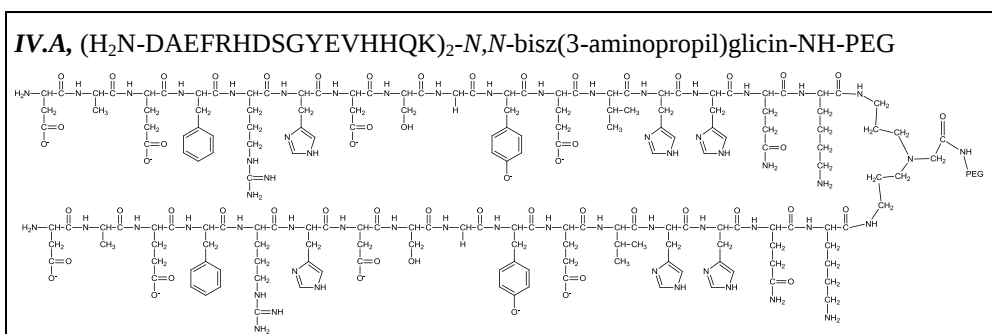
3.2.1. Oldallánc-védelem

Az oligopeptidek szintéziséhez használt aminosavak és az oldalláncaik védőcsoportjai a következők:

- alanin (**A**), fenilalanin (**F**), glicin (**G**): nincs védőcsoport
- arginin (**R**): 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurán-5-szulfonil (Pbf)
- aszparaginsav (**D**), glutaminsav (**E**): *tert*-butoxi (OtBu)
- glutamin (**Q**), hisztidin (**H**): tritil (Trt)
- lizin (**K**): *tert*-butil-oxikarbonil (Boc)
- szerin (**S**): *tert*-butil (*t*Bu)



6. ábra: A Debreceni Egyetem Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában előállított ligandumok szerkezete



7. ábra: A Cataniai Egyetemen szintetizált amiloid dimer peptidszármazék szerkezete

3.2.2. Az aminosav-szekvencia felépítése

A vizsgált peptidek előállítása szilárdfázisú módszerrel, mikrohullámú Liberty 1 peptidszintetizátor (CEM, Matthews, NC) segítségével történt automatizált módon, oldószerként *N,N*-dimetil-formamidot használtunk. A ligandumok között szerepel mind szabad, mind védett N- és C-terminusú oligopeptid is. A szénterminuson karboxilcsoportot tartalmazó molekulák előállításához Fmoc-Gly-Wang, míg a védett peptidekhez Rink Amide AM gyantát használtunk. A felsorolt gyantákat Fmoc védőcsoporttal ellátva hozzák forgalomba, így első lépésként ennek eltávolítása szükséges, hogy a szilárd fázis felületén szabad aminocsoportot kapjunk. A hasítást a készülék 0,1 mol/dm³ HOBT·H₂O és 20 V/V% piperidin-tartalmú DMF segítségével végzi el, melyhez 30 W teljesítményű mikrohullámú sugárzást alkalmaz 80 °C-on, 180 másodpercen keresztül. Ezt követően történik az aminosavoldat hozzáadása négyszeres feleslegben, 0,2 mol/dm³ koncentrációban, a funkciós csoportok aktiválása a TBTU/HOBT/DIEA stratégiának megfelelően történik. Ennek értelmében aktivátor reagenst, azaz 0,5 mol/dm³ HOBT·H₂O és 0,5 mol/dm³ TBTU DMF-es oldatát, valamint aktivátor bázist, azaz 2 mol/dm³ DIEA NMP-s elegyét alkalmazzuk a nagyobb konverzió érdekében. Az aminosav gyantához ill. a megelőző aminosavhoz kapcsolását szintén 30 W teljesítményű mikrohullám alkalmazásával, 80 °C-on végzi a készülék, 300 másodpercen át. A hasítási és kapcsolási lépést ismételve megkapjuk az előállítani kívánt szekvenciájú peptidet. A ciklikus ismétlődés révén lehetővé vált a módszer automatizálása. Az egyes reakciólépéseket követően a készülék DMF hozzáadásával és annak gyantáról történő leszűrésével távolítja el a reagens feleslegét. Amennyiben a ligandum N-terminusának acetilezésére van szükség, azt az utolsóként kapcsolt aminosav Fmoc védőcsoportjának hasítását követően 6 V/V% ecetsavanhidrid- és 5 V/V% DIEA-tartalmú DMF oldat hozzáadásával végzi a készülék.

3.2.3. Hasítás a gyantáról

A szintézis befejeztével a peptidet tartalmazó gyantát diklórmetános, 96 %-os ecetsavas, 2-metil-2-butanolos, majd dietil-éteres mosásnak vetettük alá. A hasítást szobahőmérsékleten, 94% TFA, 2,5% TIS, 2,5% H₂O és 1% DODT elegyében hajtottuk végre. A hasítóelegy nem csak a peptid gyantáról való hasítására, hanem az oldalláncok védőcsoportjainak eltávolítására is alkalmas. A nyersterméket a hasítóelegy hideg dietil-éterbe csepegtetésével csaptuk ki, a fehér vagy halványsárga csapadékot centrifuga segítségével választottuk el a folyadéktól, majd dekantáltuk és az argongázas szárítást követően vízben oldottuk fel és lefagyasztottuk a liofilizáláshoz.

3.2.4. Tisztaság-ellenőrzés és azonosítás

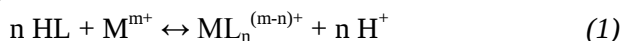
Mikrohullám és a reagensek nagy feleslegben való alkalmazásával növelhető a kapcsolási és hasítási reakciók hatásfoka a szintézis folyamán. Ezáltal minimálisra csökkenthető a hiányos szekvenciák és a vártnál kisebb tagszámú peptidek képződése. Amennyiben ez mégis bekövetkezik, a kapcsolási lépés megismétlése, a reakcióidő meghosszabbítása és a mikrohullám teljesítményének növelése (tekintettel a maximálisan megengedhető hőmérsékletre) megoldhatja a problémát.

A liofilizált nyerstermék tisztaságát folyadékkromatográfia (RP-HPLC) segítségével ellenőriztük, melyhez analitikai Vydac C18 típusú kolonnát (250 mm $\times$ 4,6 mm, pórusméret: 300 Å, szemcseméret: 5 μ m) és Jasco MD-2010 plus diódasoros detektorral rendelkező Jasco készüléket használtunk. A termék egységességét 222 nm-en való detektálással vizsgáltuk, ami a peptidkötésre jellemző maximális elnyelési hullámhossz. A tisztaság ellenőrzéséhez 0,1 V/V% TFA-t tartalmazó desztillált vizet (A) és azonos TFA-tartalmú acetonnitrilt (B) alkalmaztunk eluensként, az áramlási sebességet a 0,8-1,0 ml/min tartományban állítottuk be. Minden esetben izokratikus elúcióval történtek a vizsgálatok, az eluens-összetétel 97% A és 3% B ill. 98% A és 2% B volt. A tanszéken szintetizált oligopeptidek mindegyike egységesnek bizonyult a HPLC-kromatogramok szerint, tisztaságuk pH-potenciometriás mérés alapján nagyobbak adódott, mint 91%. A ligandumok helyes szekvenciáját ESI-MS mérések is igazolták.

3.3. pH-potenciometria

Az oldategyensúlyi vizsgálatok egyik módja a pH-potenciometria, melynek segítségével komplexképződési folyamatokat tanulmányozhatunk oldatfázisban.

A H^+ -ion és az M^{m+} fémion közötti kompetíciót az (1) reakcióegyenlettel írhatjuk le, a bruttó komplexképzési folyamatot pedig a (2) egyensúlyi reakció egyenlete adja meg (a részecskék töltését az egyszerűbb kezelhetőség érdekében nem tüntettem fel):



, ahol M^{m+} : a fémion, L: a deprotonált ligandum, H: a hidrogénion, p, q és r: sztöchiometriai együtthatók. Abban az esetben, ha a komplexképződés nem változtatja meg a ligandum deprotonálódási folyamatait, azaz nem jár pH-effektussal, a módszer nem ad információt a fémionnal való kölcsönhatásról. A kialakuló komplex részecskék összetételeinek és stabilitási állandóinak meghatározása a célja a pH-potenciometriás vizsgálatoknak, a stabilitási szorzatot a (3) egyenlet alapján kaphatjuk meg.

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

A fémkomplexek stabilitási szorzatainak kiszámítására alkalmas a PSEQUAD számítógépes program.¹⁹² A meghatározáshoz szükséges kiindulási értékek: a komponensek és asszociátumok, tehát a ligandum(ok) összes protonáltsági állapotú formáinak, a hidroxó és az $M_p H_q L_r$ fémkomplexek száma megadva azok összetételét (p, q és r paraméterek) az egyes komponenseket illetően, valamint a felsorolt részecskék ismert vagy becsült stabilitási szorzatai. A primer térfogat (ml) - pH adatpárok megadásán felül a reagensek kiindulási koncentrációi, a mérőoldat koncentrációja, a víziószorzat és az Irving-faktor ismeretére van szükség. Utóbbi korrekciós tényezőt a diffúziós potenciál figyelembevételének érdekében alkalmazzuk, melyet az Irving és munkatársai által meghatározott módon adtunk meg.¹⁹³ Az egyes komponensekre megadható anyagmérleg-egyenletek (4-6) megoldásával megkaphatjuk az ismeretlen stabilitási szorzatok értékeit:

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

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

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

A kiindulási paraméterek felhasználásával, Newton-Raphson iterációval közelíti a program a keresett stabilitási szorzatok értékét mindaddig, míg a $\Sigma(V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}})^2$ számértéke minimumot nem ér el, ahol a V térfogat értékek az ismert koncentrációjú mérőoldatra vonatkoznak. A minimum elérésével megkapjuk az egyes stabilitási szorzatokat valamint azok hibáit (a lg β értékek megadásakor zárójelben tüntettem fel az utolsó tizedesjegy hibáját). A közelítés pontosságát a $|V_{\text{mért}} - V_{\text{számított}}|$ átlagértéke, azaz az illesztési paraméter fogja megadni. A számított értékek segítségével a program kiszámítja a különböző részecskék egyensúlyi koncentrációját és a standard deviációt a titrálási görbe egyes pontjaiban. A részecskék koncentráció-eloszlási diagramját is kirajzolja a program egy kiválasztott komponensre nézve a pH függvényében. A leginformatívabb ábrázolást akkor kapjuk, ha ez a komponens a fémion, míg több fémiont tartalmazó rendszerben a ligandum. A komplexeloszlási diagram megrajzolható a MEDUSA programmal is,¹⁹⁴ melyhez a kiindulási komponens-koncentrációk és stabilitási szorzatok megadása szükséges.

A fémkomplexek stabilitási állandóinak megfelelő kombinációival különböző ligandumok komplexeinek stabilitását is összehasonlíthatjuk. Az így kapott értékeket nevezzük származtatott állandóknak. Ilyen érték a lgK(M+N_{lm}), melynek segítségével az imidazolnitrogének koordinációjával létrejövő makroelát-szerkezetű komplexeket jellemezhetjük. Az [ML] komplex lg β értéke éppen egyenlő a fent említett származtatott állandóval, amennyiben a ligandum teljesen deprotonált és minden imidazolnitrogénje fémionhoz koordinált. A komplex stabilitási állandójának értéke protonált funkciós csoport jelenlétében annak protonálódási állandója és a származtatott állandó összegeként adható meg. A (7) egyenletben feltüntetett reakcióban keletkező [MLH] részecske stabilitási állandóját például protonált lizil oldallánc jelenlétében a (8) egyenlet írja le.



$$\lg\beta([MLH]) = \lg K(M+N_{lm}) + pK(Lys) \quad (8)$$

A pH-potenciometriás méréseket vizes oldatban végeztük el, 298 K hőmérsékleten, melyet ultratermosztát biztosított. A lúgoldat adagolásához 500 μ l végtérfogatú Hamilton fecskendővel felszerelt Mol-AcS mikrobürettát és MOLSPIN pH-mérőt használtunk, amihez Metrohm 6.0234.110 kombinált üvegelektrodót csatlakoztattunk. A pH-mérő kalibrálásához 0,050 mol/dm³ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldatot használtunk, melynek pH-ja a mérések során alkalmazott hőmérsékleten 4,005. A dioxigén kizárásának

érdekében a mintaoldat gőzterébe argongázt vezettünk, a homogenizálást mágneses keverőtesttel értük el. A titrálás során $0,2 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú, argongáz alatt tárolt, karbonátmentes KOH oldatot alkalmaztunk mérőoldatként, melynek pontos koncentrációját szintén $0,050 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát-oldat felhasználásával határoztuk meg. A vizsgálni kívánt minták összeállítása során $0,2 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú HCl-oldatot is használtunk, melynek pontos koncentrációját, az aktuális paramétereknek megfelelő vízionszorozatot és Irving-faktort a már ismert, pontos koncentrációjú KOH-oldattal történő titrálás alapján adtuk meg. A minták állandó ionerősségét $1,0 \text{ mol/dm}^3$ (a mintákban $0,2 \text{ mol/dm}^3$) koncentrációjú KCl oldat segítségével biztosítottuk. Ez az ionerősség ugyanis megegyezik a titráló oldat koncentrációjával és meghaladja a titrálendő minták fémion- és ligandum-koncentrációjának összegét. A titrálási adatok kiértékelését Gran-féle linearizációval végeztük. A tanulmányozni kívánt ligandumok törzsoldatait szilárd vegyületek bemérésével készítettük el, a mintabeli koncentrációjuk az $1 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ tartományba esett. A ligandumok tisztaságának ellenőrzése mellett azok protonálódási állandóit és mintabeli koncentrációjukat a titrálási adatokból a SUPERQUAD¹⁹⁵ nevű számítógépes szoftver segítségével számoltuk ki. A program figyelembe veszi a titrálások során bekövetkező térfogat-növekedést. A fémion-ligandum arányt 1:2 és 2:1 között változtattuk, a fémkomplexek stabilitási szorzatainak kiszámítására a már említett PSEQUAD programot használtuk.

Bár a pH-potenciometria komplexkémiai kutatásokban számos előnnyel és információval rendelkezik, hiányosságai is vannak. Egy rendszer leírása több, kémiaiailag reális modellel, hasonlóan jó közelítéssel is megtehető, ennek hátterében azonban két részecske által okozott azonos pH-effektus állhat. A képződő komplexek sztöchiometriai, kötésmódbeli, geometriai megkülönböztetésére tehát ez a módszer nem alkalmas. További szerkezeti információt egyéb technikákkal, úgymint UV-látható spektrofotometriával, ^1H NMR, ESR és CD-spektroszkópiával és más módszerekkel nyerhetünk, melyek alátámaszthatják a pH-potenciometriával kapott eredményeinket.

3.4. UV-látható spektrofotometria

A fémkomplexek képződése során a központi ion d-pályái felhasadnak és eltérő energiájúak lesznek a ligandum elektromos terének hatására. Az így keletkező d-pályák közötti elektronátmenetek, azaz d-d átmenetek okozzák a részecskére jellemző abszorpciót. A képződő komplexek jellemezhetők a spektrum elemzésével, tehát megadható a koordinációban részt vevő donoratomok száma és minősége, a részecske szerkezete és geometriája.

Réz(II)komplexekben három átmenetnek megfelelő sávot várunk a spektrumban, mégpedig a d_{xz} (d_{yz}) $\rightarrow d_{x^2-y^2}$, a $d_{xy} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ és a $d_{z^2} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ átmeneteket. Az egyes sávok gyakran egy széles sávként jelennek meg, az intenzitásuk pedig a koordinációs szférában szereplő donoratomok számán és minőségén felül a kialakuló komplex geometriájától is függ. A réz(II)komplexek térbeli szerkezetéből adódóan az abszorpciós spektrumot csak az ekvatoriális síkban elhelyezkedő donoratomok befolyásolják jelentősen, amit a kísérleti adatok alá is támasztanak. A korábbi tanulmányok alapján a nitrogén- illetve oxigéndonorok a $\lambda_{\max}$ értékét csökkentik, utóbbi kisebb mértékben. Megfigyelték továbbá, hogy az egyes donoratomok hozzájárulása additív, így az axiális koordinációtól eltekintve egy empirikus egyenlet segítségével számolható a maximális elnyelési hullámhossz. (9. egyenlet)

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

x_i : hozzájárulási tényezők, melyeket számos spektrofotometriás mérés eredményeként adtak meg aminosavak és peptidek donoratomjaira¹⁰⁶

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

Az összefüggés azonban nem veszi figyelembe a kelátgyűrű méretét, az axiális koordinációt, a ligandumban lévő, de fémmegkötésben részt nem vevő szubsztituenseket.

A 6-os koordinációs számú nikkell(II) oktaéderes geometriájú és nagy spinszámú komplexei gyenge terű ligandumokkal képződnek. Ebben az esetben három, a Laporte-szabály szerinti tiltás értelmében kis intenzitású ($\epsilon < 30 \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) spinmegengedett d-d átmenet valósulhat meg. Az abszorpciós spektrumban ennek megfelelően három sáv jelenik meg: a látható és közeli infravörös tartomány határán 1430-770 nm között és két másik a látható tartományban 910-500 nm és 520-370 nm között. Egy negyedik átmenet is létezik, ez azonban csupán vállként jelenik meg valamelyik sávon. A tetraéderes, 4-es koordinációs számú nikkell(II)komplexek fényelnyelési spektrumában az

500-900 nm tartományban nagyobb intenzitású ($\epsilon_{\max} \sim 1000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sáv jelenik meg. Erős terű ligandumokkal, így peptidek amidnitrogénjének koordinációja esetén gyakran képződnek 4-es koordinációs számú, síknégyzetes geometriájú, kis spinszámú komplexek. Ekkor a maximális elnyelési hullámhossz 400 és 500 nm közötti és a sáv nagy intenzitású ($\epsilon_{\max} \sim 50\text{-}500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ezen felül egy ennél is intenzívebb, töltésátviteli sáv is megjelenhet 430 nm alatt.⁹⁷

Az abszorpciós spektrumokat a Cu(II)- és Ni(II)-ionokat tartalmazó rendszerekre rögzítettük 250-800 nm hullámhossztartományban. A minták koncentrációja ligandumra nézve 1×10^{-3} és $2 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ között volt, a fémion-ligandum arány 1:2 és 2:1 között változott. A rendszerek spektrumait különböző pH-értékeken vettük fel 1,000 cm úthosszú küvetében, Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras UV-látható spektrofotométeren. A spektrumok regisztrálását a cég által rendelkezésünkre bocsátott szoftverrel végeztük, a hullámhossz - abszorbancia adatpárokat MS Excel táblázatkezelő program segítségével ábrázoltuk. A spektrumok felbontását CCA+ illetve PSEQUAD programok segítségével végeztük el.

3.5. CD-spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia optikailag aktív anyagok esetén alkalmazható, melyek kölcsönhatásba lépnek a síkban polarizált fénnyel. Azok az anyagok rendelkeznek CD-aktivitással, melyek nem tartalmaznak másodrendű szimmetriaelemet. A síkban polarizált fénynyaláb egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált hullám összegeként írható le, melyek fázisa azonos és amplitúdója is megegyezik. Az optikailag aktív anyaggal való kölcsönhatás a két cirkulárisan polarizált fénysugárral szembeni különböző abszorpciós (extinkciós) koefficiensek és törésmutatók segítségével adható meg. Ennek eredményeként a kilépő fény elliptikusan polarizált lesz, az abszorpcióban mutatkozó különbség mindössze kb. 1%-a a teljes abszorpciónak. A Cotton-effektust, azaz a síkban polarizált fény két összetevőjének abszorpciós különbségét ($\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$) ábrázolva a hullámhossz függvényében megkapjuk a cirkuláris dikroizmus (CD) spektrumot, melyben az abszorpciós sávokhoz képest keskenyebb Gauss görbék jelentkeznek. Az így kapott spektrum maximumaihoz és minimumaihoz tartozó hullámhossz legtöbb esetben közel esik a maximális fényelnyelési hullámhosszhoz.

A fémkomplexek optikai aktivitásának eredete lehet a komplex vagy maga a ligandum aszimmetriája, amit okozhat a központi atom körüli elrendeződés avagy a ligandum donatoratomján a komplexképződés következtében létrejövő

aszimmetria. Utóbbi esetben két enantiomer racém elegye van jelen, melyek ugyan azonos intenzitású, de ellentétes előjelű, így egymást kioltó Cotton-effektussal bírnak. Az ilyen típusú komplexek vizsgálata csak kinetikailag inert komplexek esetén és az enantiomerek elválasztását követően valósítható meg.

A spektrofotometriás mérésekhez hasonlóan az egyszerű, kis tagszámú peptidek komplexeinek tanulmányozása is hasznos következtetésekhez vezetett. Sigel és Martin a hexadekán szabály figyelembe vételével megadták az XYZ tripeptid adott fémkomplexének, adott hullámhosszon számítható Cotton-effektusát megadó egyenletet:

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

A glicin (G), mint a legegyszerűbb és ebből következően optikailag inaktív aminosav nem játszik szerepet a Cotton-effektus kialakulásában. Azok az optikailag aktív csoportok, melyek a molekulában eltérő pozícióban helyezkednek el, különböző mértékű Cotton-effektust eredményeznek, mégpedig a következő sorrendben: $\Delta\epsilon_{\lambda}^{GXG} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{GGX} > \Delta\epsilon_{\lambda}^{XGG}$. Az eltérés oka az, hogy a különböző donorcsoportok nem azonos hatással továbbítják a királis információt a kromofór csoport, jelen esetben a fémion felé; a tapasztalatok alapján: $\text{NH}_2 < \text{COO}^- < \text{N}^-$. Az effektus intenzitása ezen felül annál nagyobb, minél közelebb van a kiralitáscentrum a fémionhoz.

A peptidek nikkell(II)- és réz(II)komplexeinek szerkezetvizsgálata CD-spektroszkópiával mára széles körben alkalmazott módszernek számít. A dolgozatban feltüntetett CD méréseket JASCO-810 típusú készüléken végeztük a *Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén*. A minták fémion-ligandum aránya 1:2 és 8:1 között változott, melyek spektrumát szobahőmérsékleten, különböző pH-értékeken rögzítettük a 220-800 nm-es hullámhossztartományban, 0,100 valamint 1,000 cm úthosszú küvetákban. Az adatsorok kiértékelése a gyártó által rendelkezésünkre bocsátott szoftver használatával történt, a spektrumokat MS Excel táblázatkezelő programban ábráztuk.

3.6. Tömegspektrometria (ESI-TOF-MS)

Az előállított ligandumok és a képződő fémkomplexek azonosítására és igazolására kiváló módszer a tömegspektrometria. A vizsgálat gázfázisban történt, a vizes oldatokat elektroporlasztásos ionizáció segítségével alakították gáz halmazállapotúvá. A képződő részecskék lágy ionizáción mentek keresztül, a fragmentáció így igen kismértékű, tehát a komplex molekulatömegének ismeretében hozzárendelhetők a direkt jelek. A spektrumokban fellelhető jelek asszignációja azok tömeg/töltés (m/z) értéke és a jellemző izotópeloszlás alapján történt.

A méréseket a *Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén* Bruker micrOTOF-Q 9 ESI-TOF készüléken, az adatgyűjtést BioTOF v 2.2, az adatfeldolgozást XmassBioTOF v 6.0.0 szoftverrel végezték. A ligandumok ESI-MS spektrumait pozitív, a negatív töltésű komplexekéit negatív módon rögzítették. A ligandum koncentrációja $0,001 \text{ mol/dm}^3$ volt, a fémiont tartalmazó rendszerek összetételét $1:4 < M:L < 2:1$ arányok között, tízszeres hígítású $0,10014 \text{ mol/dm}^3$ CuCl_2 -, $0,10406 \text{ mol/dm}^3$ NiCl_2 - és $0,09884 \text{ mol/dm}^3$ ZnCl_2 -oldatok hozzáadásával, a pH-értékét $0,2 \text{ mol/dm}^3$ KOH oldattal állítottuk be.

3.7. NMR- és ESR-spektroszkópia

A ^1H **magmágneses rezonancia** spektroszkópiát a szabad ligandumok és azok cink(II)- valamint a síknégyszetes, a d-pályák nagymértékű felhasadása miatt diamágneses nikkell(II)komplexeinek tanulmányozása érdekében alkalmaztuk. Az általunk előállított peptidek tisztaságának ellenőrzését és azonosítását is elvégeztük, valamint azok pH-függő spektrumait is felvettük. Összehasonlítva a nikkell(II)iont tartalmazó rendszerek ^1H NMR spektrumaival információt nyerhetünk a képződő komplexek szerkezetéről. Ezekben a részecskékben a ligandumcsere sebessége általában lassú az NMR időskálához képest, így a szabad és a fémionhoz koordinált ligandum jelei élesek és különböző kémiai eltolódás (δ) értéknél jelennek meg. A jelek eltolódása, szélesedése vagy multiplicitásának változása jelezheti az adott funkciós csoport koordinációját a fémionhoz. A cink(II)komplexek esetében a ligandumcsere gyors, így az egyes asszociátumok jelei összeolvadnak, azonban néhány esetben információval szolgálhat a ^1H NMR spektrum, mivel a spektrofotometria és a CD-spektroszkópia ebben az esetben nem alkalmazható.

Az NMR-méréseket Bruker AM 360 MHz FT-NMR ill. Bruker Avance DRX 400 MHz FT-NMR készüléken végeztük, a kiértékeléshez pedig az 1D WIN-NMR ill. a MestReNova szoftvert használtuk. A minták

összeállításához oldószerként 99,8% izotóptisztaságú D₂O-t használtunk, amit az ISOTEC Inc. forgalmaz. A ligandumkoncentráció 0,01 mol/dm³, a fémion-ligandum aránya $0 < M:L < 2$ volt, amit D₂O-ban oldott szilárd NiCl₂ és ZnCl₂ hozzáadásával biztosítottunk. A pH változtatásához NaOD és DCl oldatokat, belső standardként pedig trimetilszilil-propánsavat (TSP) használtunk. A pH mérését hordozható Metrohm pH-mérővel végeztük, melyet vizes oldatbeli, 0,05 mol/dm³ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát pufferre kalibráltunk. A deutérium-oxidos oldatokban mért pH* értékeket a Gross-Butle-Purlée egyenlet felhasználásával számítottuk át pD-skálára (11. egyenlet).¹⁹⁶⁻¹⁹⁸

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

A réz(II)komplexek általában paramágnesesek, így az NMR-spektroszkópia nem alkalmazható a kötémódok meghatározására. A párosítatlan elektront tartalmazó részecskék tanulmányozására azonban kifejezetten alkalmas az **elektronspin rezonancia (ESR)** vagy elektron paramágneses rezonancia (EPR) spektroszkópia. A tanulmányozott peptidek tetragonálisan torzult oktaéderes Cu(II)-komplexei is ilyen tulajdonságúak, így információt nyerhetünk a kialakuló szerkezetekről. A mérhető spektrális paramétereket, a $g_{\parallel}$ és az $A_{\parallel}$ értékeket egyéb módszerrel igazolt szerkezetű részecskékével összehasonlítva megállapításokat tehetünk a fémionhoz koordinált donorumok kémiai minőségét, a kialakuló kötémódot és az esetleges geometriai változásokat illetően.

A Sassari Egyetem Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjának tagjai végezték az ESR vizsgálatokat HP 53150A mikrohullámú frekvenciaszámlálóval felszerelt Bruker EMX típusú készülék alkalmazásával. Az ESR spektrumokat 120 K hőmérsékletű, etilénlikolt is tartalmazó mintákra vették fel különböző pH értékeken és fém-ligandum arányoknál ($1:2 < M:L < 2:1$), amit ⁶³CuSO₄ hozzáadásával állítottak be.

4. Eredmények

4.1. Elkülönült kelátképző modellvegyületek

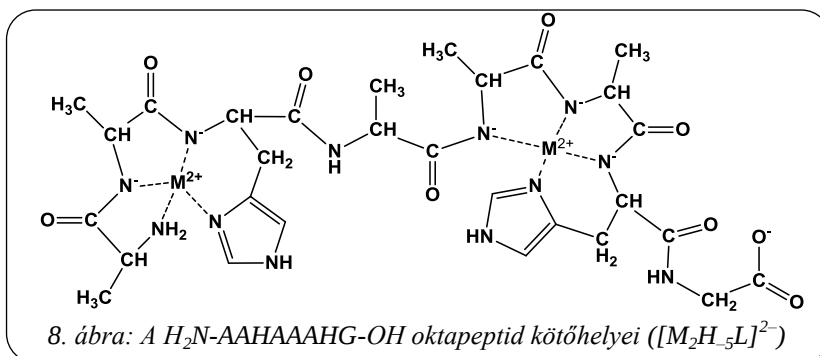
A különböző kötőhelyek egy molekulán belüli modellezésére két ligandumot szintetizáltunk és vizsgáltuk a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionok affinitását az egyes fémmegkötési lehetőségek felé. A 6. ábra I. csoportjában feltüntetett mindkét ligandum szabad terminusokkal rendelkezik, valamint két hisztidint tartalmaz. Az imidazolil oldalláncok távolsága révén a terminális aminocsoport és a C-terminálison elhelyezkedő hisztidin egymástól független kötőhelyekként szerepelhetnek. A kötőhelyek leírására illetve összehasonlításai alapként a korábban vizsgált $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$,¹⁹⁹ Ac-MKHM-NH_2 ,^{199, 200} $\text{H}_2\text{N-GH-OH}$,¹³⁷ és $\text{H}_2\text{N-AH-OH}$ ²⁰¹ szekvenciával rendelkező peptideket választottuk.

4.1.1. $\text{H}_2\text{N-AAHAAAHG-OH}$ (oktapeptid)

A fent említett oktapeptid sav-bázis és komplexképződési folyamataira jellemző állandók a 3. táblázatban találhatóak. A legalacsonyabb érték a C-terminális karboxil-, míg a legnagyobb a terminális aminocsoporthoz rendelhető, ez utóbbit a peptid ^1H NMR spektrumának pH-függése alapján is bizonyítottuk. A két hisztidin deprotonálódása egymással átfedő folyamatban megy végbe, melyet egyéb multihisztidin peptidek esetén is tapasztaltak.^{199, 202}

3. táblázat: A $\text{H}_2\text{N-AAHAAAHG-OH}$ oktapeptid protonálódási állandói és komplexeinek stabilitási állandói

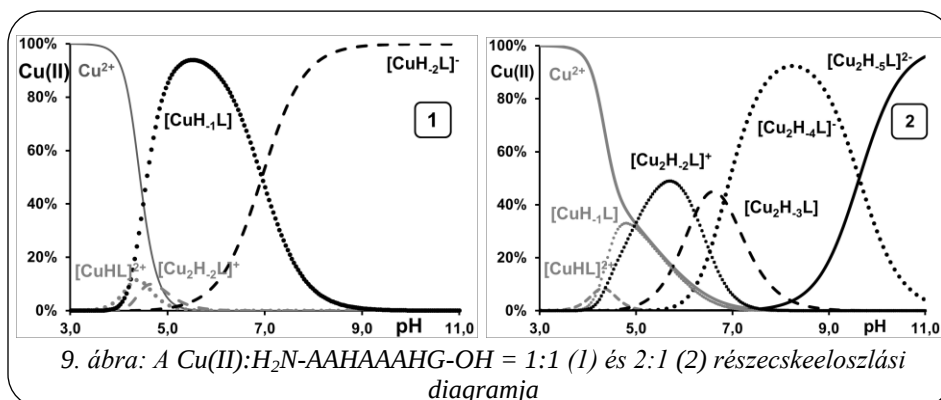
Részecske	$\lg \beta$	pK	
[HL]	7,97(1)	7,97	
$[\text{H}_2\text{L}]^+$	14,85(1)	6,88	
$[\text{H}_3\text{L}]^{2+}$	20,99(2)	6,14	
$[\text{H}_4\text{L}]^{3+}$	24,11(3)	3,12	
	Cu(II)	Ni(II)	Zn(II)
$[\text{MHL}]^{2+}$	14,48(3)	–	11,50(2)
$[\text{ML}]^+$	–	–	4,50(3)
$[\text{MH}_1\text{L}]$	6,06(1)	–0,30(9)	–2,92(1)
$[\text{MH}_2\text{L}]^-$	–0,88(4)	–7,04(6)	–
$[\text{M}_2\text{H}_2\text{L}]^+$	3,67(3)	–3,36(11)	–
$[\text{M}_2\text{H}_3\text{L}]$	–2,56(3)	–11,93(24)	–
$[\text{M}_2\text{H}_4\text{L}]^-$	–9,39(2)	–20,33(15)	–
$[\text{M}_2\text{H}_5\text{L}]^{2-}$	–19,02(2)	–29,18(5)	–
pK ₁	–	–	7,00
pK ₂	–	–	7,42
pK ₃	6,94	6,74	–



A His3 és az amino terminus részvételével albuminszerű koordinációra van lehetőség, míg a másik horgonycsoportot a His7 jelenti. (8. ábra) Ennek megfelelően kétmagvú réz(II)- és nikkel(II)komplexek is képződtek, míg cink(II)ionokkal csak mononukleáris részecskéket tudtunk leírni.

Az oktapeptid Cu(II)-komplexei

A réz(II) - H₂N-AAHAAAHG-OH ekvimoláris (1) és 2:1 (2) arányú rendszer részecskeeloszlási diagramjait a 9. ábrán tüntettem fel.



Az egymagvú komplexben létrejövő koordinációt a CD- és ESR-spektrumok alapján határoztuk meg. (4. táblázat) A réz(II)ion esetén 4N koordináció valósul meg, ami már pH = 6-7 tartományban maximálisan kialakul. A [CuH₄L] sztöchiometriájú komplex tulajdonképpen [CuH₂LH] összetételnek és az albuminszerű (NH₂, 2N⁻, N_{im}) koordinációnak felel meg, a további deprotonálódás a His7 imidazolnitrogénjéhez rendelhető. A C-terminuson elhelyezkedő hisztidinről kiinduló amidnitrogén-koordinációt egymagvú komplexekben még nagy pH-n sem észleltük. Ez a [CuH₃L]⁻ összetételű részecskét eredményezné, azonban a H₂N-MKHM-NH₂ és az Ac-MKHM-NH₂ peptidekkel elvégzett modellszámolások is megerősítik, hogy

ez a fajta kötésmód nem jelentkezik mérhető mennyiségben és az albuminszerű fémmegekötés a kedvező.

4. táblázat: A $H_2N-AAHAAAHG-OH$ réz(II)- és nikkel(II)komplexeinek spektrális adatai

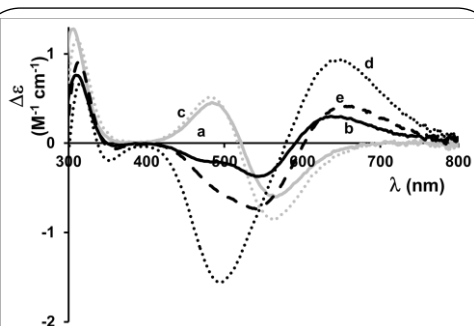
Részecske	λ/ϵ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda/\Delta\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (10 ⁻⁴ cm ⁻¹)
[CuH ₁ L]	522/94	306/+1,18 483/+0,43 565/-0,56	2,188/201
[CuH ₂ L] ⁻	525/108	305/+1,28 485/+0,48 569/-0,61	2,186/202
[Cu ₂ H ₄ L] ⁻	528/100	305/+0,63 492/+0,19 570/-0,16	
[Cu ₂ H ₅ L] ²⁻	524/107	310/+0,79 545/-0,35 637/+0,30	
[NiH ₂ L] ⁻	422/138	260/+2,15 410/+1,48 474/-2,26	
[Ni ₂ H ₅ L] ²⁻	424/124	398/+0,23 468/-0,94	

A CD-spektrumok további bizonyítékot szolgáltatnak az amino terminus elsődleges koordinációjára: az 5-11 pH-tartományban nincs további változás, ami megerősíti a [CuH₁L] és [CuH₂L]⁻ komplexek azonos kötésmódját. Összevetve a $H_2N-MKHM-NH_2$ tetrapeptid [CuH₂L] komplexének CD-spektrumával jó egyezést mutat. (10. ábra, a és c)

A $H_2N-AAHAAAHG-OH$ ligandumban réz(II)ionok számára tehát az amino terminális kötőhely jelenti az elsődleges koordinációs lehetőséget.

Kétmagvú részecskék is képződtek Cu(II)-ionfelesleg esetén már 4-es pH-tól kezdődően, az amidnitrogének deprotonálódása a His7-től kiindulva 6-os pH felett valósult meg. (9/2. ábra) A peptid mindkét

kötőhelye részt vesz a komplexképzésben (8. ábra), tehát a ligandum kiemelkedő rézkötő képességgel bír. A CD-spektrumok jól szemléltetik a két kötőhelyre jellemző Cotton-effektusok egyidejű jelenlétét a [Cu₂H₅L]²⁻ komplexben

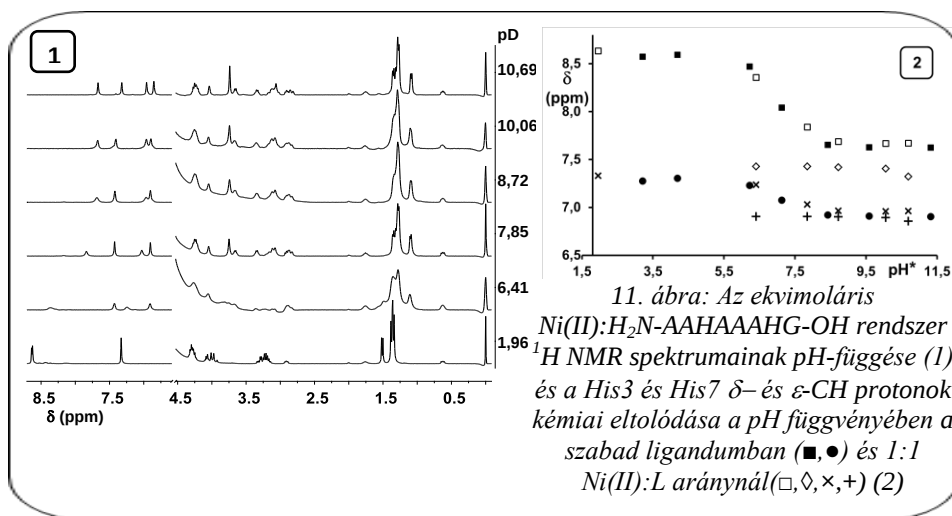


10. ábra: A $H_2N-AAHAAAHG-OH$ [CuH₂L]⁻ (a) és [Cu₂H₅L]²⁻ (b), a $H_2N-MKHM-NH_2$ [CuH₂L] (c), az Ac-MKHM-NH₂ [CuH₃L]⁻ (d) komplexének és utóbbi kettő eredő CD-spektruma (e)

(10. ábra, b), ami jó egyezést mutat a két koordinációs módot mintázó tetrapeptidek spektrumának eredőjével. (10. ábra, e) A teljes egyezés hiányát okozhatta az is – a modellként használt és az általunk vizsgált peptidek oldalláncai közötti különbségen túl –, hogy a spektrum regisztrálásának pH értékén a $[\text{Cu}_2\text{H}_4\text{L}]^-$ összetételű részecske is jelen lehetett, nem csupán a teljesen deprotonált formájú komplex. Az ESR-spektrumok ezen felül jelentős sávszélesedéssel jelzik a dinukleáris réz(II)komplexben kialakuló, egymáshoz közeli rézcentrumok közötti mágneses kölcsönhatást.

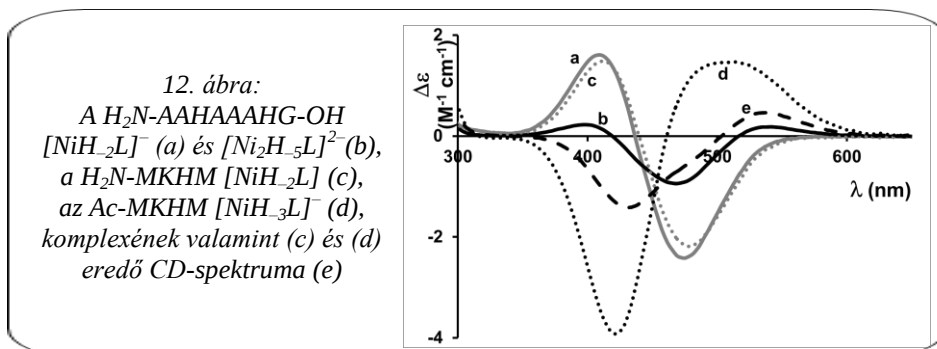
Az oktapeptid Ni(II)-komplexei

A nikkel(II)komplekek képződése hasonló a réz(II)ionokéhoz, ami a koordinációs módok hasonlóságára utal, azonban néhány pH-egységgel nagyobb értéken és az amidnitrogének egy lépésben történő koordinációjával alakulnak ki. Ez a stabilitás-csökkenés tükröződik a megfelelő stabilitási állandókban is. (3. táblázat) Az oldat 6-os pH körül megjelenő sárga színe utal a síknégyzetes, diamágneses komplex kialakulására amidnitrogén koordinációjával. Az ennek megfelelő abszorpciós spektrum látható tartományában pH = 6 körül megjelenő sáv nem mutat további eltolódást a pH függvényében. (4. táblázat) A ^1H NMR spektrumok az imidazolil oldallánc aromás $\delta\text{-CH}$ és $\varepsilon\text{-CH}$ protonok két jelcsoportját mutatják a $[\text{NiH}_2\text{L}]^-$ komplex jelenlétében, amelyek a szabad ill. a komplexben kötött hisztidinekhez tartoznak. (11. ábra)



Ennek értelmében a koordináció csak az egyik hisztidin oldalláncot érinti, tehát a réz(II)komplekekhez hasonlóan a nikkel(II)ionok is az amino terminális kötőhelyet foglalják el, amit a $\text{H}_2\text{N-MKHM-NH}_2$ $[\text{NiH}_2\text{L}]$ részecskéjének CD-spektrumával történő összehasonlítás igazol. (12. ábra a és c)

Nikkel(II)ionok számára már kevésbé kedvező a második fémion koordinációja a ligandumhoz a His7 környezetében. A pH = 6-8 tartományban uralkodó $[\text{Ni}_2\text{H}_2\text{L}]^+$ komplexben a második fémion monodentát kötődése valószínűsíthető



a His7 imidazolnitrogénjén keresztül, a Cotton-effektusok nem változnak. Egyértelműen látható azonban pH~8 felett a $(3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ kötősmód kialakulására jellemző Cotton-effektus megjelenése (12. ábra, d), azonban nem teljes az egyezés a két modellpeptid megfelelő CD-spektrumának eredőjével. (12. ábra, b és e) A feltüntetett pH~10 értéknél regisztrált spektrum az N-terminális kötőhely 100%-os, míg a C-terminális felőli hisztidintől kiinduló $(3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ koordinációs lehetőség kb. 40%-os betöltöttségének felel meg. A csapadékképződés elkerülése érdekében a ligandum mennyiségéhez képest kevesebb, mint kétszeres nikkell(II)-ion-koncentrációt alkalmaztunk, így a His7 környezetében kötött fémion maximális mennyisége csupán 80% lehet. A CD-spektrum alapján számolt arány azonban a három amidkoordinált fémion mennyiségét adja meg, míg a további 40% Ni(II) csupán $(2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}, \text{OH}^-)$ kötősmóddal rendelkezik.

Az oktapeptid Zn(II)-komplexei

A három különböző protonáltságú cink(II)komplex – $[\text{ZnLH}]^{2+}$, $[\text{ZnL}]^+$ és $[\text{ZnH}_1\text{L}]$ – pH = 5-8 között van jelen ekvimoláris rendszerben. A $[\text{ZnL}]^+$ stabilitási állandója éppen a két és három nitrogén koordinációjára jellemző értékek közötti,¹⁶¹ így ez a komplexféleség több izomer egyidejű jelenlétére utal, melyekben az aminonitrogénen és egy vagy két imidazolnitrogénen keresztül kötődik a fémion. (3. táblázat) Ez a makrokelát szerkezet semleges pH-ig képes csak megóvni a cink(II)iont a hidrolízistől. Ez a megfigyelés összhangban van a korábbi irodalmi eredményekkel is, miszerint sem az albuminszerű, sem az imidazolnitrogének részvételével megvalósuló kötősmód nem teszi lehetővé az amidnitrogének koordinációját.²⁰⁰ Bisligandumú részecskék jelenléte nem zárható ki, azonban igen csekély mennyiségük miatt nem tudtuk bizonyítani a képződésüket. A cink(II)ionokat tartalmazó rendszer nem volt képes két

ekvivalens fémiont oldatban tartani, enyhén lúgos közegben a $[\text{ZnH}_5\text{L}]$ vegyes hidroxó komplex képződését követően kivált a hidroxid csapadék.

Az oktapeptid vegyes fémkomplexei

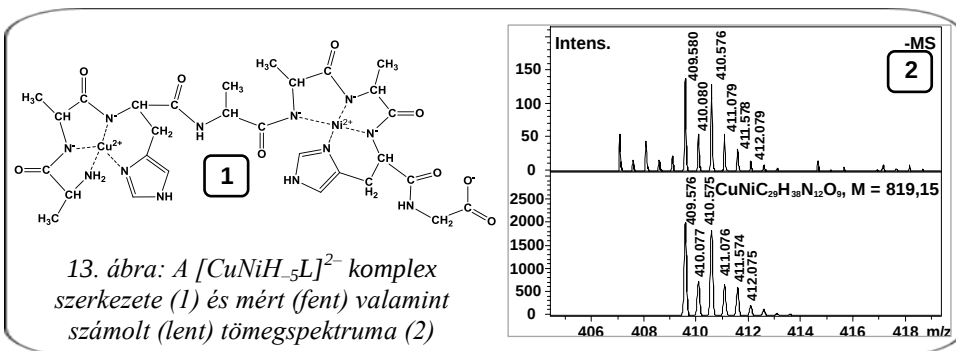
A törzsrendszerek vizsgálata során megállapítottuk, hogy a cink(II)ionok számára nem kedvezőek az oktapeptid által kínált koordinációs lehetőségek. Vegyes fémkomplexek képződését tehát csak a réz(II)-nikkel(II) rendszerekben tudtuk leírni a potenciometriás adatok alapján (5. táblázat).

5. táblázat: A $\text{H}_2\text{N-AAHAAAHG-OH}$ réz(II)-nikkel(II) vegyes fémkomplexeinek termodinamikai és spektrális adatai

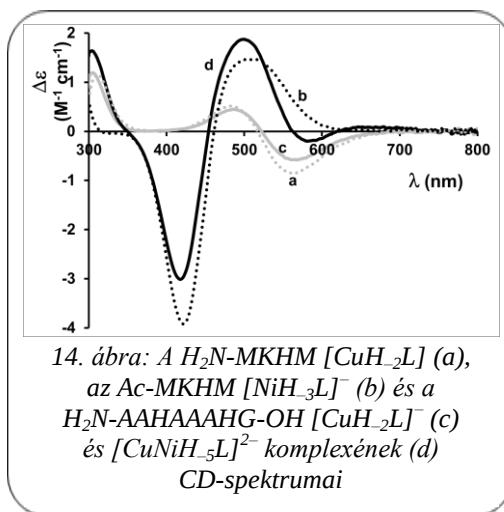
Részecske	$\lg \beta$	$\lambda/\Delta\epsilon$ ($\text{nm}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (10^{-4} cm^{-1})
$[\text{CuNiH}_2\text{L}]^+$	2,52(4)		
$[\text{CuNiH}_5\text{L}]^{2-}$	-23,40(4)	233/+10,23 275/+0,14 304/+1,64 418/-3,01 499/+1,87 582/-0,20 680/+0,10	2,187/201

Ennek megfelelően a réz(II)-cink(II) és nikkel(II)-cink(II) tartalmú rendszerekben csapadék jelent meg. A potenciometriás leírást ez megakadályozta, azonban a spektroszkópiás eredmények is a cink(II)-tartalmú vegyes fémkomplexek hiányát igazolják, ugyanis a törzsrendszerekhez hasonló ESR- és CD-spektrumok jelentkeztek. Ezek az eredmények ugyan nem zárják ki a cink(II)komplexek jelenlétét, azonban ezek mennyisége igen csekély lehet ezekben a rendszerekben.

A réz(II)- és nikkel(II)iont is tartalmazó komplexek megjelenését mutatják az abszorpciós spektrumok, melyeken mindkét fémionra jellemző sávok megtalálhatók. A $[\text{CuNiH}_5\text{L}]^{2-}$ komplex jelenlétét tömegspektruma alapján is igazoltuk. (13/2. ábra)



Enyhe csapadékképződést tapasztaltunk szűk pH-tartományban, ami a pH növelésével a komplexképződés következtében feloldódott. A $[\text{CuNiH}_2\text{L}]^+$ képződésének pH-értéke megfelel a nikkel(II) törzsrendszer azonos protonáltsági fokú komplexéével, tehát a második fémion kötőmódja azonos lehet. Az abszorpciós és a CD-spektrumok a $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ részecskééhez hasonlóak, ami a réz(II) esetén ($\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{im}}$) koordinációt és a nikkel(II)ion monodentát kötődését támasztja alá. (14. ábra a és c) A $[\text{CuNiH}_5\text{L}]^{2-}$ részecske 8-as pH körül jelenik meg a törzsrendszerbeli $[\text{NiH}_5\text{L}]^{2-}$ komplexszel azonosan, így a peptidhez kötődő második fémion koordinációs módja is megegyezik a két komplexben. A réz(II)ionok kitüntetett stabilitása az albuminszerű kötőmód iránt és az előbb említett megfigyelések alapján a vegyes réz(II)-nikkel(II) komplexben az amino terminális kötőhelyet a réz(II), míg a His7 környezetét a nikkel(II)ionok foglalják el. (13/1. ábra) Ezt a megállapítást támasztja alá a Cu(II)-Ni(II)-*oktapeptid* rendszer nagy pH-n rögzített CD-spektruma is, melyben jól látható a megfelelő sávok megjelenése (14. ábra a, b és d). A réz(II) amino terminuson elfoglalt helyét igazolják továbbá a $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ és a vegyes réz(II)-nikkel(II) fémkomplexekre adódó nagyon hasonló ESR-paraméterek. (4. és 5. táblázat)



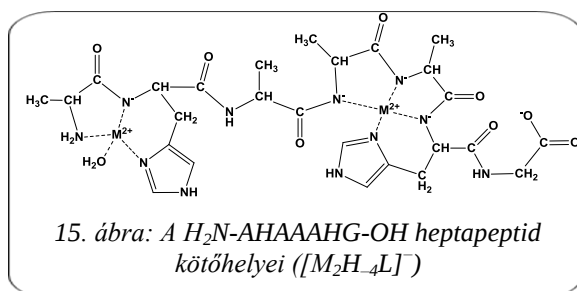
4.1.2. H_2N -AHAAAHG-OH (*heptapeptid*)

Az *oktapeptid*hez képest eggyel kevesebb alanint tartalmaz az amino terminuson a *heptapeptid*, melynek sav-bázis sajátosságaira és komplexképződési folyamataira jellemző állandókat a 6. táblázat tartalmazza. A ligandum deprotonálódási lépései az *oktapeptid*hez nagyban hasonlítanak, a fémionok affinitása azonban az egyes kötőhelyek felé különbözik, ugyanis a réz(II)- és nikkel(II)ionok mellett a cink(II) is stabil komplex kialakítására képes. Bár kétmagvú részecske ez esetben is csak előbbi két átmenetifém-ionnal képződik, azok komplexeloszlása eltérő képet mutat az *oktapeptid*hez képest. Ennek oka, hogy míg a C-terminálison a His6 környezetében a H_2N -AAHAAAHG-OH ligandumhoz hasonló koordinációra van lehetőség, az albuminszerű kötőmód

már nem jöhet létre, így a fémion körül az amino terminuson (NH₂, N⁻, N_{Im}) telítetlen koordinációs szféra alakul ki. (15. ábra)

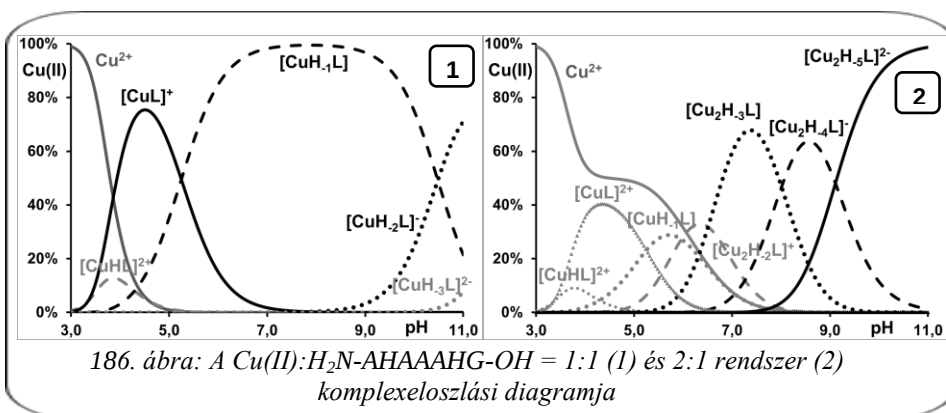
6. táblázat: A H₂N-AHAAAHG-OH heptapeptid protonálódási állandói és komplexeinek stabilitási állandói

Részecske	lg β	pK	
[HL]	7,94(1)	7,94	
[H ₂ L] ⁺	14,77(1)	6,83	
[H ₃ L] ²⁺	20,84(2)	6,07	
[H ₄ L] ³⁺	23,95(3)	3,11	
	Cu(II)	Ni(II)	Zn(II)
[MHL] ²⁺	15,74(4)	11,88(5)	11,42(2)
[ML] ⁺	12,40(1)	6,16(4)	4,65(2)
[MH ₁ L]	7,15(2)	0,77(1)	-2,08(1)
[MH ₂ L] ⁻	-3,33(2)	-9,14(3)	-11,40(3)
[MH ₃ L] ²⁻	-15,30(4)	-20,47(3)	—
[M ₂ H ₂ L] ⁺	3,77(3)	-4,47(1)	—
[M ₂ H ₃ L]	-2,74(2)	-14,40(1)	—
[M ₂ H ₄ L] ⁻	-10,75(6)	-23,13(2)	—
[M ₂ H ₅ L] ²⁻	-19,86(7)	-32,22(6)	—
pK ₁	3,34	5,72	6,77
pK ₂	5,25	5,39	6,73
pK ₃	10,48	9,91	9,32

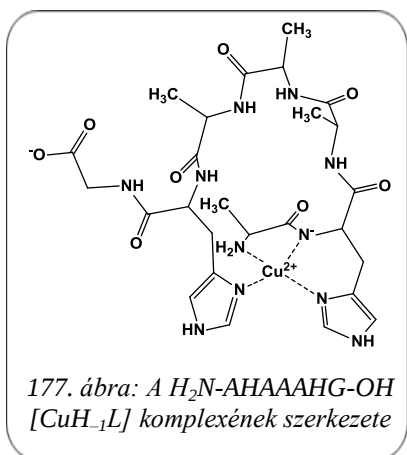


A heptapeptid Cu(II)-komplexei

Ekvivalens mennyiségű fémion jelenlétében a kiemelkedő rézkötő képesség jól tükröződik a 4,0-es pH-n még szabad réz(II)ionok mennyiségében: míg az *oktapeptid* esetén 92%, addig a *heptapeptid* jelenlétében csupán 27%. (9/1. és 16/1. ábra) A [CuL]⁺ részecske már pH = 3,0 körül megjelenik, abszorpciós maximuma alapján (NH₂, N⁻, N_{Im}) koordinációval. (7. táblázat)

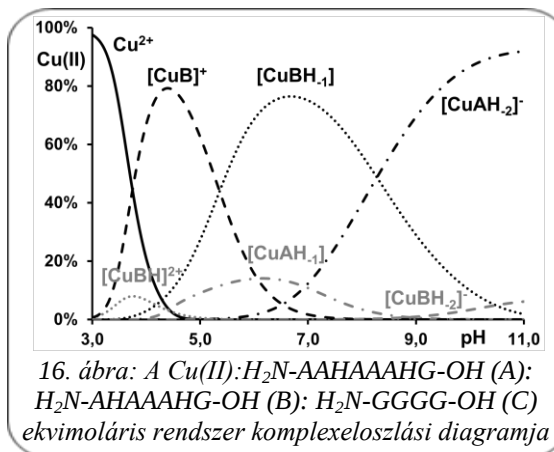


Sztöchiometriája alapján ($\text{NH}_2, \text{N}_{\text{Im}}, \text{N}_{\text{Im}}$) makrokelát szerkezettel is rendelkezhetne, azonban a CD-aktivitás is az amidnitrogén-koordinációt bizonyítja. Az ESR paraméterek is az említett 3N koordinációt támasztják alá két csatolt kelát formájában, míg a His6



A 6-os hisztidin deprotonálódását követően ekvatoriálisan kötődik a réz(II)ionhoz, így makrokelát szerkezet alakul ki. (17. ábra) A réz(II)ion koordinációs szférájának telítését igazolják az abszorpciós és ESR spektrumok is. (7. táblázat) A CD-spektrumok nem változnak lényegesen a negyedik donoratomként valóban az

részecske képződésével, tehát imidazolnitrogén kötődése valószínűsíthető torzult szerkezetű makrokelát kialakulásával. Az így létrejövő, 5,5-10,5 pH-tartományban uralkodó $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]$ összetételű részecske megnövekedett stabilitását tapasztaltuk. Ez a komplexféleség az oktapeptid esetén kialakuló, az irodalomban a réz(II)- és



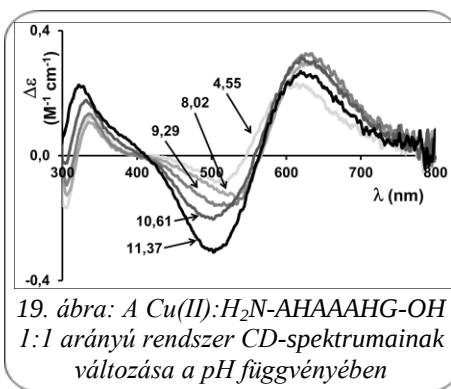
nikkel(II)ionok megkötésére kifejezetten alkalmas albuminszerű kötősmódhoz képest is nagyobb stabilitással rendelkezik. (18. ábra) A tetraglicin-komplexek meg sem jelennek a rendszerben az okta- és heptapeptid jelenlétében, tehát a hisztidin oldalláncok önmagukban is egyértelmű stabilitás-növelő hatással bírnak. A heptapeptid által kínált (NH₂,N⁻,N_{Im}) és a His6 által kiegészített kötősmód pH-függő módon ugyan, de nagyobb mértékben van jelen a réz(II)komplexekben, míg az albuminszerű koordináció csak pH ~ 7 felett jön létre jelentős mennyiségben.

7. táblázat: A H₂N-AHAAAHG-OH heptapeptid réz(II)- és nikkel(II)komplexeinek spektrális adatai

Részecske	λ/ϵ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda/\Delta\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (10 ⁻⁴ cm ⁻¹)
[CuL] ⁺	594/60	341/+0,08 514/-0,04 617/+0,13	2,230/196
[CuH ₁ L]	567/86	334/+0,11 533/-0,13 637/+0,30	2,212/202
[CuH ₂ L] ⁻	554/92	322/+0,23 503/-0,31 620/+0,27	2,212/202
[Cu ₂ H ₃ L]	573/77	310/-0,15 625/+0,15	
[Cu ₂ H ₄ L] ⁻	573/89	318/+0,05 486/-0,32 620/+0,40	
[Cu ₂ H ₅ L] ²⁻	542/91	318/+0,52 485/-0,60 615/+0,46	
[NiH ₁ L]	443/106	493/+0,36 441/-0,09	
[NiH ₂ L] ⁻	441/152	470/-1,60	
[Ni ₂ H ₅ L] ²⁻	436/173	417/-0,58 532/+0,19	

A [CuH₁L] komplex csak pH = 9 körül alakul tovább [CuH₂L]⁻ formává, az így képződő részecske kétféle szerkezettel is rendelkezhet:

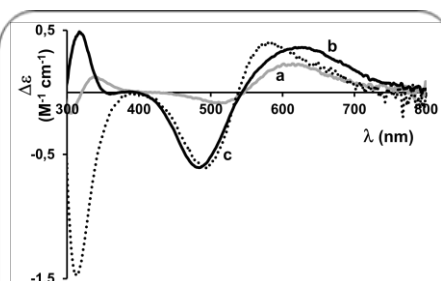
- a His2 imidazolnitrogénjének kiszorulásával (NH₂,2N⁻,N_{Im}) kötősmóddal
- a His6 környezetébe való átrendeződéssel, (N_{Im},2N⁻,N_{Im}) koordinációval



19. ábra: A Cu(II):H₂N-AHAAAHG-OH 1:1 arányú rendszer CD-spektrumainak változása a pH függvényében

Eközben az abszorpciós maximum kékeltolódása és a CD-spektrumok megváltozása tapasztalható (19. ábra), azonban az ESR spektrumok nem módosulnak. (7. táblázat) A vegyes hidroxo komplex képződése ezek fényében nem valószínű. A $\text{Cu(II):H}_2\text{N-GH-NH}_2\text{:Ac-MKHM-NH}_2\text{:1:1:1}$ modellrendszerben a réz(II)ionok átrendeződése a védett amino terminussal rendelkező ligandumhoz 9-es pH körül kezdődik, ami jó egyezést mutat a $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ komplex megjelenésének pH értékével a *heptapeptid* esetén. Mindezek a megfigyelések a His6 környezetébe való átrendeződést támasztják alá.

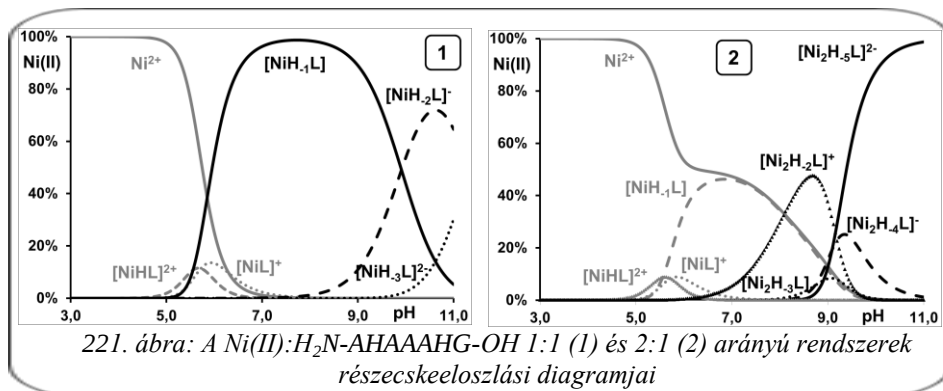
A második réz(II)ion megkötése az *oktapeptid*hez képest nagyobb pH-n következik be (16/2. ábra) ami a makrokelát szerkezetű $[\text{CuH}_1\text{L}]$ kiemelkedő stabilitásának tudható be, ebben a komplexben ugyanis a lehetséges horgonycsoportok mindegyike fémionhoz kötött. Ennek eredményeként semleges pH-n csapadékként leválik a feleslegben jelen lévő szabad fémion. A kötőhelyek elkülönülésével, a közbelső pH-n képződő kétmagvú részecskékben az amino terminuson koordinált réz(II) koordinációs szférája telítetlen, így vegyes hidroxo komplex képződik. A pH növelésével az oldat kitisztul, a második réz(II)ion megkötése is bekövetkezik, az egymáshoz közeli rézcentrumok jelenléte az ESR spektrumok sávjainak szélesedésében is megmutatkozik. A $[\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}]^{2-}$ képződése a CD-spektrumok változásán jól követhető, ami a már korábban említett Ac-MKHM-NH_2 $[\text{CuH}_3\text{L}]^{2-}$ komplexének megfelelő változást mutatja. (20. ábra)



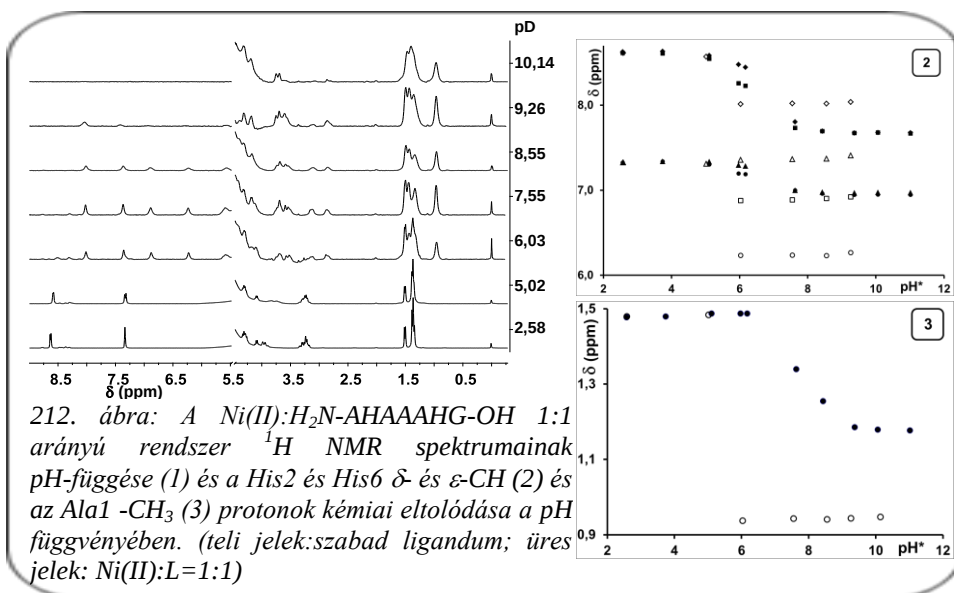
20. ábra: A $\text{H}_2\text{N-AHAAAHG-OH}$ heptapeptid $[\text{CuL}]^+$ (a), $[\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}]^{2-}$ komplexének (b), és a $\text{H}_2\text{N-AAHAAAHG-OH}$ ($3\text{N}, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinált réz(II)ionra számolt CD-spektruma (c)

A heptapeptid Ni(II)-komplexei

A nikkell(II)ionok megkötődése a réz(II)ionokhoz hasonlóan megy végbe (21. ábra), a makrokelát szerkezet nagyobb pH-n az oldat sárga színének megjelenésével síknégyzetes, N-koordinált nikkellé alakul. A $[\text{NiHL}]^{2+}$ és $[\text{NiL}]^+$ összetételű részecskék csak elhanyagolható mennyiségben vannak jelen, az oldalláncokon keresztül létrejövő koordináció oktaéderek komplexekhez vezet.



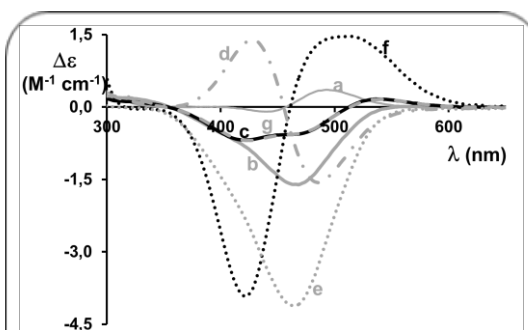
Az amidnitrogén-koordinációt alátámasztják az ekvimoláris fémiont és ligandumot tartalmazó rendszerek különböző pH értéken felvett ¹H NMR spektrumai. (22. ábra) A [NiH₁L] részecske megjelenésével az imidazol gyűrűk δ- és ε-CH és az Ala1 -CH₃ protonjainak jelei is a nagyobb térerő irányába tolódnak el a szabad ligandumhoz képest.



A koordinációban tehát a His2 és His6 is részt vesz eltérő környezetben, míg utóbbi az amidnitrogén kötődését bizonyítja. A [NiH₂L]⁻ képződését az abszorpciós spektrumon intenzitás-növekedés és a CD-spektrumok jelentős megváltozása kíséri, amit a réz(II)ionoktól eltérően az (NH₂,2N⁻,N_{Im}), majd az (NH₂,3N⁻) kötőmód kialakulása okoz a pH növelésével. (23. ábra, b és e) Nikkel(II)ionok számára tehát szintén az aminoterminus jelenti az elsődleges kötőhelyet.

A kétmagvú komplexek képződése nagyobb pH-értékre tolódik el, így az azt megelőző pH-tartományban nikkel(II)-hidroxid csapadék jelenik meg. A fémionfelesleg mellett, nagy pH-n felvett CD-spektrum számos izomer jelenlétére utal: az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ kötősmódú (~30%), a négymagvú imidazoláto-hidas (~23%), a His6 környezetében $(3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ donoratomokon keresztül kötött (~17%) és az aminoterminuson $(\text{NH}_2, 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})/(\text{NH}_2, 3\text{N}^-)$

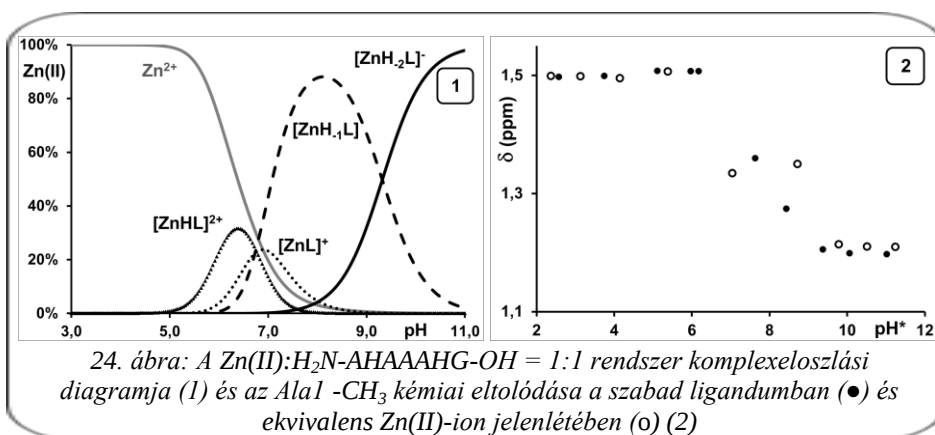
koordinációjú komplexben (~30%) kötött nikkel(II)ionra. (23. ábra, c és g)



23. ábra: A $\text{Ni(II)}:\text{H}_2\text{N-AHAAAHG-OH}$ rendszerben képződő $[\text{NiH}_{-1}\text{L}]$ (a), $[\text{NiH}_{-2}\text{L}]$ (b), $[\text{Ni}_2\text{H}_{-5}\text{L}]^{2-}$ (c), a $\text{H}_2\text{N-AH-NH}_2$ $[\text{Ni}_4\text{H}_{-8}\text{L}_4]$ (d), a $\text{H}_2\text{N-DAAAAHAAA-NH}_2$ ($\text{H}_2\text{N}, 3\text{N}^-$) kötősmódú Ni(II) - (e), az Ac-MKHM-NH_2 $[\text{NiH}_{-3}\text{L}]$ (f) komplexének és a számolt összetétel eredő CD-spektruma (g)

A heptapeptid Zn(II)-komplexei

A legnagyobb különbséget az oktapeptidhez képest a nagy stabilitású cink(II)komplexek jelentik, bár kétmagvú részecske ezzel a ligandummal sem képződik. (6. táblázat) A potenciometriás mérések szerint a pH~7,0 körül fogyó extra ekvivalens lúg az első amidcsoport deprotonálódására és koordinációjára utalhat a réz(II)- és nikkel(II)ionoknál is leírt $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}, \text{N}_{\text{Im}})$ makrokelát szerkezet kialakulásával. Az amidnitrogén koordinációt korábbi tanulmányok is igazolták a cink(II)ionok esetén is $\text{H}_2\text{N-XH-}$ szekvenciájú peptidekkel.^{138, 139, 203}



24. ábra: A $\text{Zn(II)}:\text{H}_2\text{N-AHAAAHG-OH} = 1:1$ rendszer komplexeloszlási diagramja (1) és az Ala1- CH_3 kémiai eltolódása a szabad ligandumban (●) és ekvivalens Zn(II) -ion jelenlétében (○) (2)

A ^1H NMR spektrumok alapján az Ala- CH_3 protonok a pH = 7-9 tartományban mutatnak eltérést a szabad ligandumban mérthez képest, azonban ezek

ellentétesen változnak. (24. ábra) Ennek magyarázata lehet az, hogy a pH~7 értéken felvett spektrum a $[ZnL(H)]$ részecskékhez, azaz az oldalláncokon keresztül kialakuló $(NH_2, N_{Im}, (N_{Im}))$ koordinációhoz tartozik, míg a pH~9 értéken mért eltolódás már az amidnitrogén kötődésére jellemző. Az utóbbi komplexben mért nagyobb kémiai eltolódás a szabad ligandumhoz viszonyítva ugyanis a pH növelésével kisebb mértékben ugyan, de megmarad. A pH növelése a $[ZnH_2L]^-$ vegyes hidroxo komplexet eredményezi, csapadék képződését nem tapasztaltuk. A második fémion megkötése már nem valósul meg, a gyűrű felnyílását követően létrejövő kötőhely nem kedvező a cink számára, így fémfelesleget tartalmazó rendszerben hidroxid csapadék keletkezik.

A heptapeptid vegyes fémkomplexei

A dinukleáris réz(II)- és nikkell(II)komplexek és az amino terminális kötőhelyen kialakuló stabil cink(II)komplexek révén mindhárom fémion részt vehet vegyes fémkomplexek képzésében.

8. táblázat: A $H_2N-AHAAAHG-OH$ heptapeptid vegyes fémkomplexeinek stabilitási állandói és spektrális adatai

Részecske	$\lg \beta$	$\lambda/\Delta\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$g_{ }/A_{ }$ (10 ⁻⁴ cm ⁻¹)
$[CuNiH_5L]^{2-}$	-24,95(7)	317/+0,27 420/-1,24 538/+0,34 588/+0,32	2,213/198
$[CuZnH_2L]^+$	-1,97(10)		2,214/195
$[CuZnH_4L]^-$	-13,78(3)	295/-0,24 334/+0,44 484/-0,26 576/+0,16	2,214/195
$[NiZnH_3L]$	-12,88(9)		
$[NiZnH_4L]^-$	-20,38(1)	300/+0,50 417/+0,25 460/-0,16 508/+0,10	
$[NiZnH_5L]^{2-}$	-31,28(3)	308/+0,70 411/+0,28 466/-0,64	

A CD-spektrumok ugyanis mutattak eltérést a törzsrendszerben mérthez képest a Cu(II)-Zn(II) és Ni(II)-Zn(II) rendszerben, tehát a cink(II)ionok jelenléte lúgos közegben befolyásolja a komplexképződést. A feltételezett $[NiZnH_5L]^{2-}$ összetételű komplex esetén (25. ábra, a) a változás leginkább a $H_2N-AH-NH_2$ $[NiH_2L]$ sávjainak felel meg, azonban az egyezés nem teljes. (25. ábra, e). A Zn(II)-ionok nagy affinitása az N-terminus felé eredményezheti a Ni(II)-ionok koordinációját a His6 környezetében, azonban ez mérhető mennyiségben nem

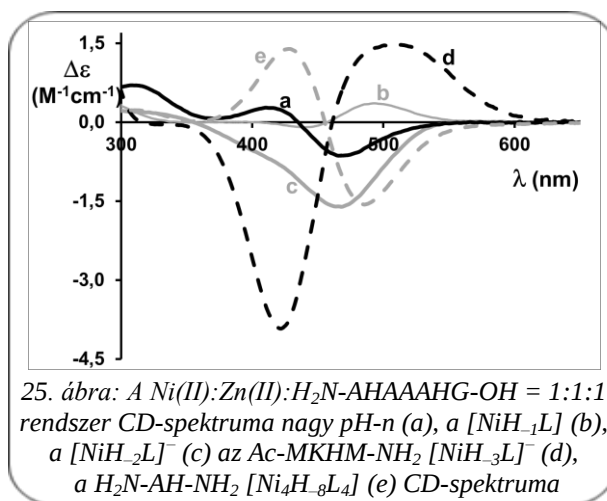
bizonyítható. Az eltérő CD-spektrumok alapján azonban nem zárható ki a Ni(II)-Zn(II) vegyes fémkomplexek jelenléte.

A réz(II)-cink(II) rendszer nagy pH-jú oldatának szintén enyhén módosult a CD-spektruma a törzsrendszeréhez képest, azonban ez még nem bizonyítja a Cu(II)-Zn(II) vegyes fémkomplexek

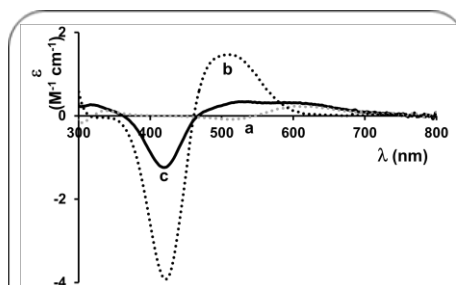
jelenlétét. Míg az oktapeptidnél már pH~8,0 értéknél megjelentek a réz(II)-nikkel(II) komplexek, a heptapeptidnél csak egy egységgel nagyobb pH-n képződtek. Ez a jelenség csakúgy, mint a törzsrendszerek esetén, az enyhén savas pH-n kialakuló makrokelát szerkezetnek és nagy stabilitásának köszönhető. Egyértelmű bizonyíték van a $[\text{CuNiH}_5\text{L}]^{2-}$ részecske jelenlétére, CD-spektrumát a 26. ábra mutatja.

A két kötőhelyet leíró spektrumok közül az amino terminuson ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációval Cu(II)iont és a His6 környezetében ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötésmóddal nikkel(II)iont tartalmazó komplexnek megfelelő Cotton-effektusok jelennek meg a vegyes komplex CD-spektrumán. A részecske ESR-paraméterei továbbá megegyeznek a biner rendszerben mért $[\text{CuL}]^+$ komplexével. (8. táblázat)

A heptapeptid kötőhelyei közül tehát az amino terminust a Cu(II)-, míg a láncközi hisztidin környezetét a Ni(II)-ionok foglalják el.



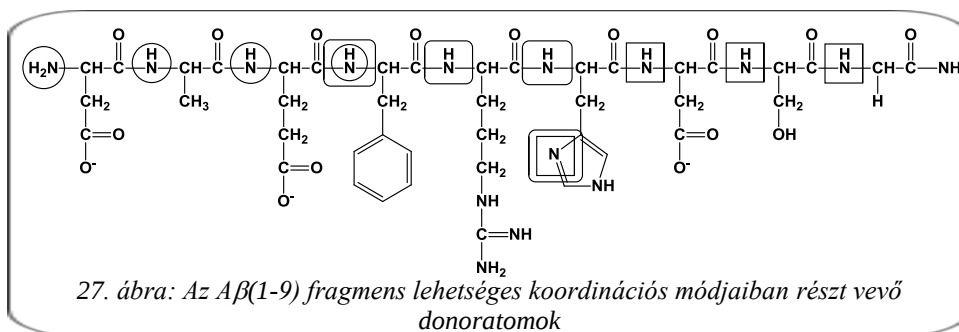
25. ábra: A Ni(II):Zn(II):H₂N-AHAAAHG-OH = 1:1:1 rendszer CD-spektruma nagy pH-n (a), a $[\text{NiH}_3\text{L}]$ (b), a $[\text{NiH}_2\text{L}]^-$ (c) az Ac-MKHM-NH₂ $[\text{NiH}_3\text{L}]^-$ (d), a H₂N-AH-NH₂ $[\text{Ni}_4\text{H}_8\text{L}_4]$ (e) CD-spektruma



26. ábra: A H₂N-AHAAAHG-OH $[\text{CuL}]^+$ (a), az Ac-MKHM-NH₂ $[\text{NiH}_3\text{L}]^-$ (b) és a heptapeptid $[\text{CuNiH}_5\text{L}]^{2-}$ (c) komplexének CD-spektruma

4.2. Az amiloid- β (1-9) fragmens és származékai

Az amiloid- β peptid amino terminális kötőhelyeinek leírására alkalmasak azok a fragmensek, melyek a terminális aminocsoportot és a 6-os pozíciójű hisztidint is tartalmazzák. Korábban az A β (1-6) fragmenst tanulmányozták, mivel ez a legrövidebb szakasz, amiben mindkét horgonycsoport megtalálható, szekvenciája: H₂N-DAEFRH-NH₂.^{120, 163, 164} Az amiloid- β peptidben kialakuló lehetséges koordinációs módok azonban kiterjedhetnek az N-terminus további aminosav egységeire is és az A β (1-6) fragmensen kívül is megvalósulhatnak az -NH₂ és a His6 részvételével. (27. ábra)



Az aminocsoporttól kiinduló – (NH₂,3N⁻) – és a His6 imidazolnitrogénjétől kezdődő amidnitrogén-koordináció – (3N⁻,N_{im}) – egyidejűleg nem valósulhat meg a fémionok koordinációs szférájának telítésével, mivel a maximálisan deprotonálódó amidnitrogének száma öt a szükséges hat helyett. A 4N koordináció azonban bekövetkezhet, ha a hisztidintől kiindulva C-terminális irányba megy végbe az amidkoordináció, bár az (N_{im},3N⁻) kötés mód a (7,5,5) tagú csatolt kelátrendszer miatt kevésbé stabilis. Az 1-16 fémmegkötő régió N-terminális szakaszán létrejövő koordinációs izomerek és azok arányának meghatározása érdekében állítottuk elő az A β (1-9) fragmenst – melynek szekvenciája H₂N-DAEFRHDSG-NH₂ –, és vizsgáltuk réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexeit. A ligandum számos töltéssel rendelkező vagy poláris oldalláncot tartalmaz, melyek hatással lehetnek a képződő komplexek stabilitására. Ahhoz, hogy igazolni tudjuk az oldalláncok szerepét, az azoktól mentes származékát, a H₂N-DAAAAHAAA-NH₂ (DA₄HA₃) ligandumot is vizsgáltuk, mely így csupán a fő kötőhelyeket tartalmazza. A természetes fragmensben képződő kötés izomerek meghatározására a hisztidin aminosavat a 6-osról a 7-es pozícióba helyeztük át. Az így kapott H₂N-DAAAAHAHA-NH₂ (DA₅HA₂) ligandumban ezáltal lehetővé tettük a 4N koordináció kialakulását mind az amino-, mind az imidazolcsoport felől kétmagvú komplexben.

Az N-terminális fragmensnek és származékainak molekulaszervezetét a 6. ábra II. csoportjában foglaltam össze.

A jobb átláthatóság érdekében az eredmények tárgyalását a származékokkal, azaz a DA_4HA_3 és DA_5HA_2 ligandumokkal kezdem, mivel ezek komplexképződési folyamatai egyszerűbbek a természetes $A\beta(1-9)$ fragmenséhez képest. A kötőhelyek közvetlen modelljeiként a kisebb $A\beta$ -fragmenseket használtuk: $A\beta(1-4)$, $Ac-A\beta(1-6)$ és $A\beta(1-6)$,^{120, 163, 164} illetve a 4.1.1. fejezetben tárgyalt $H_2N-AAHAAAHG-OH$ oktapeptidet és az $Ac-PHAAA$ ligandumot.

4.2.1. $H_2N-DAAAAHAAA-NH_2$ (DA_4HA_3) és $H_2N-DAAAAAHAA-NH_2$ (DA_5HA_2)

A két modellpeptid sav-bázis tulajdonságait illetően nem különbözik egymástól, hiszen szabad amino terminust, egy aszparaginsavat és egy hisztidint tartalmaznak közel azonos pozíciókban. (9. táblázat) A potenciometriás mérés alapján meghatározott állandók közül a legkisebb az aszparaginsav karboxil-, a legnagyobb pedig az ammóniumcsoportra jellemző, ez utóbbi deprotonálódási lépése átfed a hisztidin oldalláncáéval.

9. táblázat: $A H_2N-DAAAAHAAA-NH_2$ és $H_2N-DAAAAAHAA-NH_2$ ligandumok protonálódási állandói

Részecske	$NH_2-DAAAAHAAA-NH_2$		$NH_2-DAAAAAHAA-NH_2$	
	lg β	pK	lg β	pK
[HL]	7,69(1)	7,69	7,65(1)	7,65
$[H_2L]^+$	14,01(2)	6,32	14,01(1)	6,36
$[H_3L]^{2+}$	16,63(2)	2,62	16,83(1)	2,82

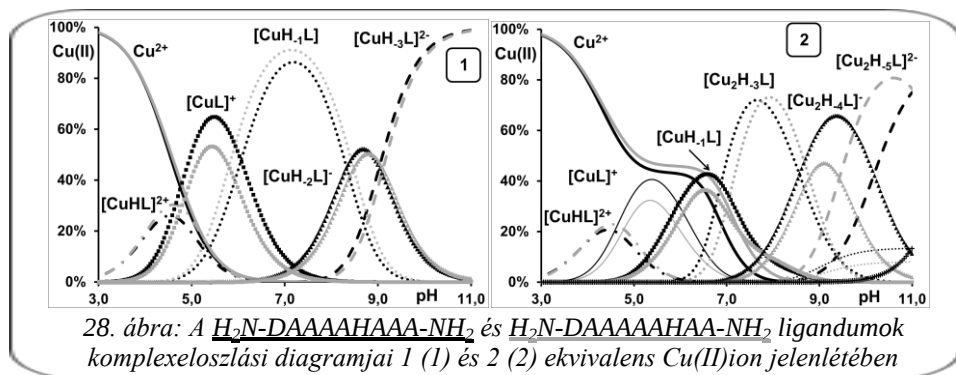
A DA_4HA_3 és DA_5HA_2 Cu(II)-komplexei

Komplexképződésüket illetően fiziológiás pH-tartományban nem mutat jelentős különbséget a két származék. (10. táblázat) A réz(II)komplexek stabilitási állandóinak meghatározása során biszligandumú részecske jelenlétét nem tudtuk igazolni mérhető koncentrációban, azonban kétmagvú részecskék mindkét ligandum esetén képződtek. (28. ábra) Az ekvimoláris rendszerek komplexképződési folyamatai szinte megegyeznek a két ligandum esetén. A $[CuL]^+$ részecske abszorpciós maximuma és a mérhető CD-aktivitás hiánya arra utal, hogy csak oldalláncokon keresztül valósult meg a koordináció. (11. táblázat)

10. táblázat: A H_2N -DAAAAHAAA- NH_2 és H_2N -DAAAAAHAA- NH_2 peptidek réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexeinek stabilitási állandói

Részecske	NH ₂ -DAAAAHAAA- NH_2		NH ₂ -DAAAAAHAA- NH_2	
	lg β	pK	lg β	pK
[CuHL] ²⁺	12,24(3)	–	12,23(3)	–
[CuL] ⁺	7,66(2)	4,58	7,45(2)	4,78
[CuH ₁ L]	1,60(3)	6,06	1,65(2)	5,80
[CuH ₂ L] [–]	–6,73(4)	8,33	–6,83(2)	8,48
[CuH ₃ L] ^{2–}	–15,76(4)	9,03	–15,94(2)	9,11
[Cu ₂ H ₃ L]	–9,29(6)	–	–9,79(4)	–
[Cu ₂ H ₄ L] [–]	–17,86(5)	8,57	–18,57(4)	8,78
[Cu ₂ H ₅ L] ^{2–}	–28,04(6)	10,18	–28,00(5)	9,43
[Cu ₂ H ₆ L] ^{3–}	–	–	–39,76(3)	11,76
[NiHL] ²⁺	11,24(11)	–	11,19(6)	–
[NiL] ⁺	5,29(5)	5,95	5,31(3)	5,88
[NiH ₁ L]	–3,05(7)	8,34	–	–
[NiH ₃ L] ^{2–}	–20,38(6)	–	–20,74(4)	–
[ZnHL] ²⁺	10,40(4)	–	10,28(4)	–
[ZnL] ⁺	4,37(1)	6,03	4,11(1)	6,17
[ZnH ₁ L]	–3,70(1)	8,07	–3,38(5)	7,49

Az (NH₂,CO) vagy (NH₂,β-COO[–]) kötismódokhoz képest megnövekedett stabilitási állandó a hisztidin makrokelátszerű hozzájárulását igazolja. A spektroszkópiás adatok szerint a pH növelésével az amidnitrogének lépcsőzetes deprotonálódása valósul meg az egyszerű oligopeptidekhez hasonlóan. Az abszorpció jelentős kékeltolódása mellett a CD-aktivitás megjelenése, valamint a sávok módosulása és intenzitásuk növekedése is ezt támasztja alá.

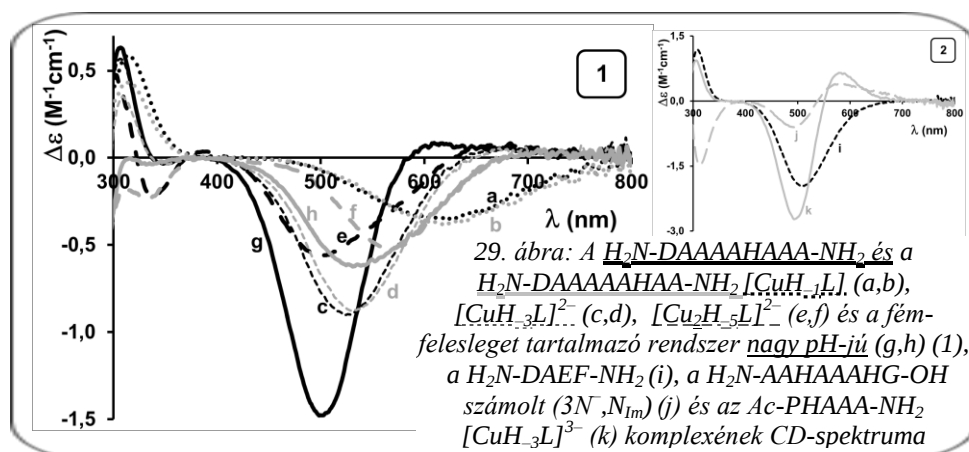


Az Aβ(1-6) fragmens esetén is hasonló megfigyelésekhez jutottak, amelyben az amino terminusról indult az N[–]-koordináció.¹²⁰ Ezek a peptidrészletek ugyanis két horgonycsoportot tartalmaznak, így az aminocsoporttól ill. az imidazolil oldalláncról kezdődően is megvalósulhat amidnitrogén-deprotonálódás.

11. táblázat: A H_2N -DAAAAHAAA- NH_2 és H_2N -DAAAAAHAA- NH_2 peptidek réz(II)- és nikkel(II)komplexeinek spektrális adatai

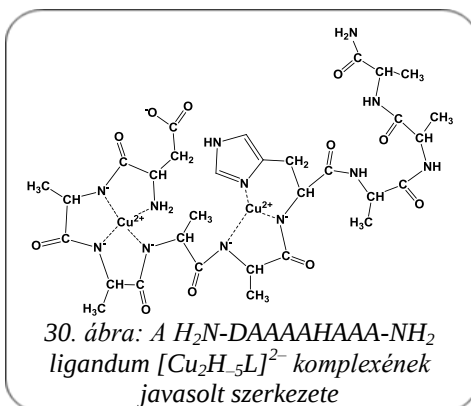
Részecske	NH_2 -DAAAAHAAA- NH_2		NH_2 -DAAAAAHAA- NH_2	
	λ_{max}/ϵ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda/\Delta\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{max}/ϵ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda/\Delta\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)
[CuL] ⁺	685/44	–	682/40	–
[CuH ₁ L]	618/104	625/–0,35	623/97	621/–0,38
[CuH ₂ L] [–]	566/109	560/–0,35	557/107	554/–0,29
[CuH ₃ L] ^{2–}	517/168	307/+0,57	515/167	309/+0,35
		523/–0,90		529/–0,88
		699/+0,07		673/+0,06
[NiH ₃ L] ^{2–}	414/247	463/–4,11	414/173	466/–2,54

Lúgos közegben, pH~9 felett egy új, kis intenzitású sáv jelenik meg 660 nm körül, ami a [CuH₃L]^{2–} részecskéhez tartozik. (29/1. ábra, c és d) Összehasonlítva a két kötőhelyet leíró Aβ(1-4) és H₂N-AAHAAAHG-OH ligandumok Cu(II)-komplexeire jellemző CD-spektrumaival ez az új Cotton-effektus a (3N[–],N_{Im}) kötőmódra utal, azaz koordinációs izomerek vannak jelen.



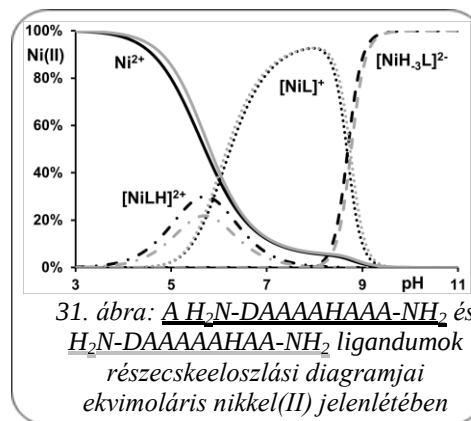
Mindkét komplex 4N koordinált fémiont tartalmaz, azonban a horgonycsoport lehet az -NH₂ vagy az N_{Im}. A számolt eredő CD-spektrum az (NH₂,3N[–]):(3N[–],N_{Im}) = 90:10 arány esetén adta a legjobb egyezést. A fémfelesleget tartalmazó rendszerben csapadék jelent meg, ami nem vagy nem teljes egészében fémhidroxid csapadék, ugyanis a közbelső pH-n nagy mennyiségben jelenlévő komplexek, a [CuH₁L] és a [Cu₂H₃L] is semleges töltésűek. A pH növelésével a csapadék feloldódott, az amidnitrogének deprotonálódásával párhuzamosan kétmagvú komplexek jelennek meg. Mindkét ligandum esetén a [Cu₂H₅L]^{2–} a nagy pH-n uralkodó részecske. A teljesen deprotonált kétmagvú részecske a DA₄HA₃ esetén a [Cu₂H₅L]^{2–}, a DA₅HA₂-vel pedig a [Cu₂H₆L]^{3–}, azonban ez utóbbi csak 11-es pH felett van jelen nagyobb

mennyiségben. Az utolsó deprotonálódási lépés erősen lúgos közegben következik be, amit sztérikus okokra vezethetünk vissza, azonban a negatív töltés növekedése is kedvezőtlené teszi. A $[\text{Cu}_2\text{H}_5\text{L}]^{2-}$ komplexekben a $(3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ koordinációra jellemző sáv kis intenzitású, a meghatározó koordinációs izomer tehát az $(\text{NH}_2, 3\text{N}^-; 2\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ kötésmóddal rendelkezik. (30. ábra) A C-terminus irányába lejátszódó amidkoordinációra az $(\text{N}_{\text{Im}}, 3\text{N}^-)$ kötésmóddal csak a DA_4HA_3 ligandum esetén és erősen lúgos közegben utalt a 600 nm-nél megjelenő sáv. (29/2. ábra, k)

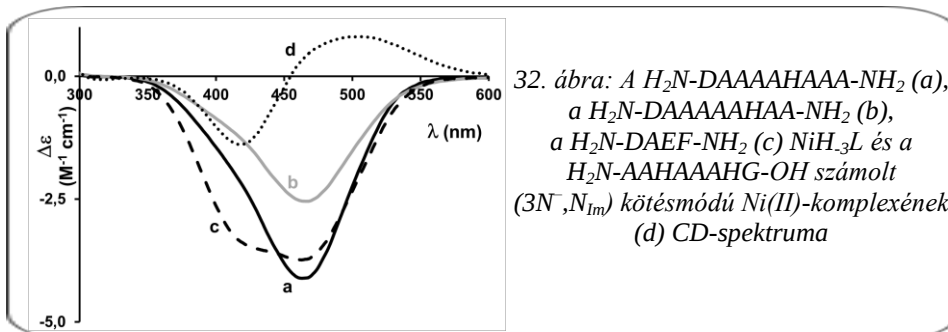


A DA_4HA_3 és DA_5HA_2 Ni(II)-komplexei

A réz(II)komplexekhez képest egyszerűbb képet mutat a ligandumok nikkeltartalmú rendszerben lejátszódó komplexképződése: a titrálási adatok alapján csak egymagvú komplexeket tudunk leírni mérhető mennyiségben. (10. táblázat) Fémfelesleg jelenlétében pH~8 értéknél csapadékképződés jelzi a dinukleáris részecskék hiányát, ami erősen lúgos közegben sem oldódott fel teljesen. A mononukleáris komplexek a réz(II)komplexekhez hasonló módon jelentkeznek, azonban nagyobb mennyiségben csak az $[\text{NiL}]^+$ és $[\text{NiH}_3\text{L}]^{2-}$ van jelen. (31. ábra)



Az abszorpciós maximum és a gyenge CD-aktivitás a $[\text{CuL}]^+$ komplexnél ismertetett, oldallánc-koordinációval létrejövő szerkezetre utal a $[\text{NiL}]^+$ esetén is a $6 < \text{pH} < 8$ tartományban. A síknégyszetes nikkell(II)kompleyre jellemző sárga szín további pH növelés hatására tapasztalható, ami az abszorpció és a CD-sávok intenzitásának növekedésével jár, azaz az amidnitrogének kooperatív deprotonálódása és koordinációja következik be. (11. táblázat) Az A β (1-4) $(\text{NH}_2, 3\text{N}^-)$ és $\text{H}_2\text{N-AAHAAAHG-OH}$ $(3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}})$ kötésmódú komplexének CD-spektrumával összevetve az aminoterminus egyértelmű preferenciája bizonyítható a DA_4HA_3 és DA_5HA_2 ligandumok esetén. (32. ábra)



A DA_4HA_3 és DA_5HA_2 $Zn(II)$ -komplexei

A kis cink(II)ion-affinitás mindhárom nonapeptidre, tehát az $A\beta(1-9)$ fragmensre és mutánsaira is igaz, a komplexeloszlási diagramok nem különböznek jelentős mértékben. A potenciometriás adatok alapján meghatároztuk a $Zn(II)$ -ionokkal képződő komplexek stabilitási állandóit is, melyek az egyszerű peptidekéhez képest ugyan nagyobbak, de a cink hidrolízise pH~8 felett bekövetkezik. (10. táblázat) Az uralkodó részecske a $[ZnL]^+$ összetételű, ami az $(NH_2, \beta-COO^-)$ β -alaninszerű koordinációval jön létre és a hisztidin imidazolnitrogénje egészíti ki makrokelát kialakításával. A további deprotonálódás eredményeként pedig $[ZnH_{-1}L]$ vegyes hidroxokomplex képződik.

4.2.2. H_2N -DAEFRHDSG- NH_2 ($A\beta(1-9)$)

Az amiloid- β peptid 1-9 fragmense számos különböző oldalláncot tartalmaz, melyek közül két aszparaginsav, egy glutaminsav és egy hisztidin oldallánc képes proton leadására a vizsgált pH-tartományban. A terminális aminosocsoporttal együtt így öt pK értékkel írható le a sav-bázis tulajdonságait tekintve, tehát az összehasonlításképp feltüntetett $A\beta(1-6)$ fragmenshez képest egy aszparaginsav oldallánccal bővül. A három legkisebb pK érték a karboxilcsoportokhoz, míg a két nagyobb a hisztidinhez illetve a terminális aminosocsoorthoz rendelhető. (12. táblázat) (Az összehasonlításban szereplő részecskék töltése különböző. A könnyebb értelmezhetőség érdekében ezeket ebben az alfejezetben nem tüntettem fel.)

12. táblázat: A H₂N-DAEFRH-NH₂ és H₂N-DAEFRHDSG-NH₂ ligandumok protonálódási állandói

Részecske	NH ₂ -DAEFRH-NH ₂ ¹²⁰		NH ₂ -DAEFRHDSG-NH ₂	
	A β (1-6)		A β (1-9)	
	lg β	pK	lg β	pK
[HL]	7,59	7,59	7,73(1)	7,73
[H ₂ L]	13,86	6,27	14,06(1)	6,33
[H ₃ L]	18,04	4,18	18,36(2)	4,30
[H ₄ L]	20,85	2,81	21,83(3)	3,47
[H ₅ L]	–	–	24,45(8)	2,62

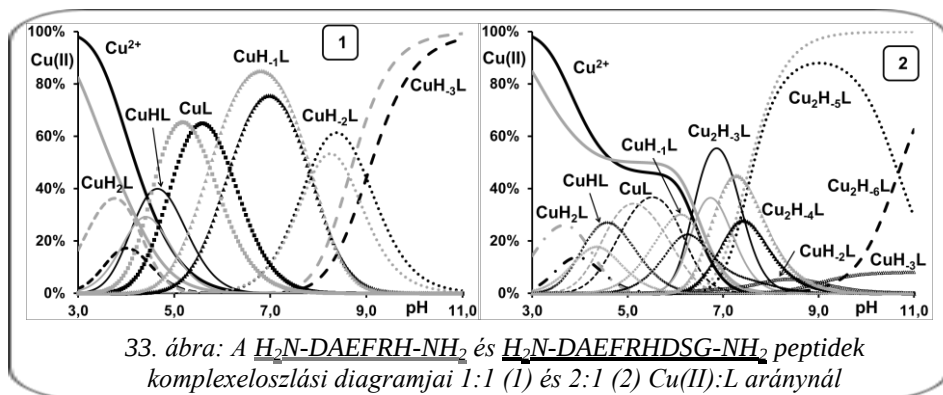
Az A β (1-9) Cu(II)-komplexei

Az ekvimoláris és fémfesleget tartalmazó rendszer potenciometriás titrálási eredményei alapján mono- és dinukleáris részecskék is leírhatók az A β (1-9) természetes fragmensre a korábban vizsgált A β (1-6) fragmenshez hasonlóan. (13. táblázat)

13. táblázat: A H₂N-DAEFRH-NH₂ és H₂N-DAEFRHDSG-NH₂ ligandumok réz(II)komplexeinek stabilitási állandói

Részecske	NH ₂ -DAEFRH-NH ₂ ¹²⁰		NH ₂ -DAEFRHDSG-NH ₂	
	A β (1-6)		A β (1-9)	
	lg β	pK	lg β	pK
[CuH ₂ L]	17,36	–	16,94(3)	–
[CuHL]	13,16	4,20	12,99(2)	3,95
[CuL]	8,76	4,40	8,12(2)	4,87
[CuH ₋₁ L]	3,02	5,74	1,97(2)	6,15
[CuH ₋₂ L]	–4,86	7,88	–5,85(2)	7,82
[CuH ₋₃ L]	–13,50	8,64	–14,85(2)	9,00
[Cu ₂ H ₋₃ L]	–7,18	–	–7,94(2)	–
[Cu ₂ H ₋₄ L]	–14,08	6,90	–15,38(2)	7,44
[Cu ₂ H ₋₅ L]	–21,55	7,47	–22,75(4)	7,37
[Cu ₂ H ₋₆ L]	–	–	–33,41(3)	10,66

A két természetes fragmens komplexképződési folyamatai réz(II)ionokkal nagyon hasonlóak, valamint a DA₄HA₃ és DA₅HA₂ mutánsétól sem különböznek alapvetően. A részecskeeloszlási diagram jól tükrözi az egyezést, mely alapján a rövidebb peptidéhez hasonló koordinációs módok kialakulása feltételezhető. (28. és 33. ábra) A pH növelésével lépcsőzetes deprotonálódási lépések valósulnak meg ekvimoláris rendszerben, amely az aminotermínusról induló koordinációra jellemző.

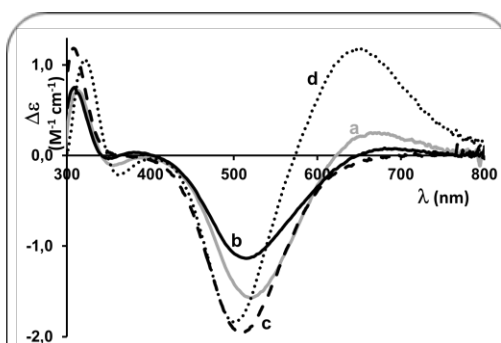


5,5-ös pH alatt nincs jelentős CD-aktivitás, ami az abszorpciós maximum hullámhosszával összhangban csupán az oldalláncok koordinációját igazolja a $[CuL]^-$ komplexben. (14. táblázat)

14. táblázat: A H_2N -DAEFRHDSG-NH₂ (A β (1-9)) ligandum réz(II)- és nikkel(II)komplexeinek spektrális adatai

Részecske	NH ₂ -DAEFRHDSG-NH ₂ (A β (1-9))	
	(λ_{max}/ϵ , nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	($\lambda/\Delta\epsilon$, nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)
$[CuL]^-$	696/41	–
$[CuH_1L]^{2-}$	619/94	591/–0,36
$[CuH_2L]^{3-}$	560/101	496/–0,41
		583/–0,38
$[CuH_3L]^{4-}$	514/162	313/+0,72
		521/–1,57
		664/+0,25
$[NiH_3L]^{4-}$	418/211	413(váll)/–2,11
		469/–3,28

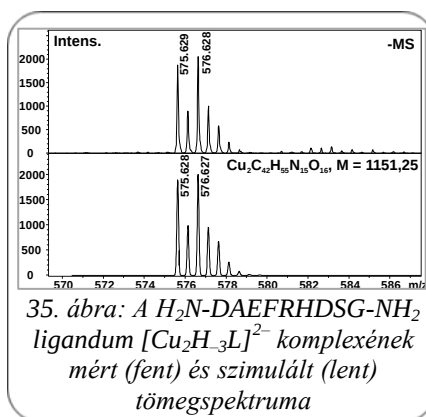
A komplex stabilitása is nagyobb, mint az (NH₂,CO) ill. (NH₂, β -COO⁻) koordinációjú komplexé, ami a terminális amino- és az aszpartát karboxilát-csoportjának részvételével kialakuló 6-tagú kelát mellett a hisztidin oldalláncának kötődésére is utal. Összevetve az Asp1 kivételével egyéb oldalláncbéli funkciós csoportot nem tartalmazó származék $[CuL]^+$ komplexének stabilitásával a növekedés alapján további Glu3 és Asp7 karboxilát-



34. ábra: A H_2N -DAEFRHDSG-NH₂ peptid $[CuH_3L]^{4-}$ (a), és $[Cu_2H_6L]^{5-}$ (b) valamint a H_2N -DAEF-NH₂ (c) és az Ac-DAEFRH-NH₂ $[CuH_3L]^{3-}$ (d) komplexének CD-spektruma

koordinációra is következtethetünk. A protonált formák abszorpciós maximumai csupán becsülhetők, azonban a 700 nm körüli elnyelés az amino terminus (NH₂, β -COO⁻) koordinációjára utal, míg a His6 és Glu3 aminosavak protonált formában vannak jelen. A [CuH_nL]⁽¹⁺ⁿ⁾⁻ komplexek megjelenésével az abszorpciós sáv jelentős kékeltolódása és egyre növekvő CD-aktivitás is tapasztalható, ami növekvő számú amidnitrogén-koordinációt jelent. A rövidebb A β (1-6) fragmenshez hasonlóan az amino terminusról kiinduló koordinációt feltételezhetjük, azonban pH~9 felett egy új CD-sáv jelenik meg 650 nm körül. (34. ábra) A két kötőhelyet modellező fragmensek CD-spektrumaival összehasonlítva a (3N⁻,N_{Im}) kötésmód megjelenésére következtethetünk. A [CuH₃L]⁴⁻ részecske így két izomer szerkezettel írható le, melyek aránya: (NH₂,3N⁻):(3N⁻,N_{Im}) ~ 3:1, míg az oldalláncoktól mentes származékban ez az arány 9:1 volt.

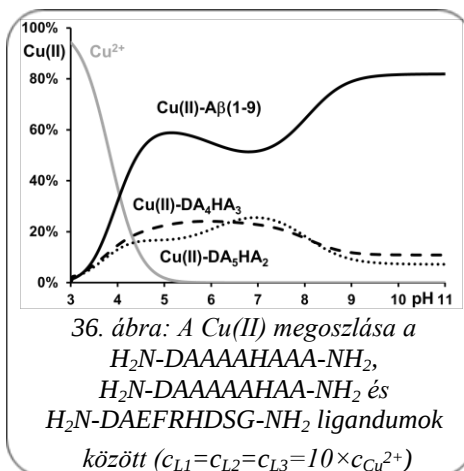
A kétmagvú [Cu₂H_nL]⁽ⁿ⁻¹⁾⁻ (n=3-5 vagy 6) komplexek az amidnitrogén-koordinációval párhuzamosan jelennek meg 6 < pH értéken, amit ESI-MS spektrummal is igazoltunk. (35. ábra) Fiziológias pH-n a [CuH₁L]²⁻ és [Cu₂H₃L]²⁻ részecskék vannak jelen uralkodó mennyiségben a rendszerben, ami az eloszlási képpel is összhangban van. Míg a H₂N-DAEFRH-NH₂ peptidben maximum öt amidnitrogén



deprotonálódására volt lehetőség, az 1-9 fragmens esetén már [Cu₂H₆L]⁵⁻ komplexet is le tudtunk írni a potenciometriás adatok felhasználásával. A képződéséhez tartozó pK érték meglehetősen nagy, ami nem zárja ki vegyes hidroxó komplex jelenlétét, azonban a CD-spektrumon megjelenő kis intenzitású pozitív Cotton-effektus a C-terminális irányába lejátszódó amidkoordinációra utalhat. (34. ábra, b) Az így létrejövő (N_{Im},3N⁻) kötésmód (7,5,5) tagú csatolt kelátrendszert eredményez, ami kisebb stabilitású ugyan, mint az N-terminális irányú, azonban a fémion koordinációs szférájának telítése is megvalósulhat.

Az oldalláncok komplexképződésre gyakorolt hatásának szemléltetésére alkalmas a Cu(II)-iont, a DA₄HA₃, DA₅HA₂ és A β (1-9) ligandumokat 1:10:10:10 arányban tartalmazó rendszer szimulált részecskeeloszlási képe. (36. ábra) Az egyes ligandumok összes réz(II)komplexét ábrázolva látható a természetes fragmens kiemelkedő réz(II)kötő képessége az oldalláncoktól mentes származékokhoz képest. A különbséget okozhatja a töltéssel rendelkező

oldalláncok jelenléte, ami megváltoztatja a komplex töltését, ezzel stabilizálva a részecskét, azonban egyéb, elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások is szerepet játszhatnak. Az oldalláncok jelenléte tehát növeli a komplexek stabilitását, azonban a fő koordinációs módokat lényegében nem változtatja meg, amit a spektrális adatok alá is támasztanak. A stabilitásbeli különbség leginkább a kétmagvú komplexek képződésében mutatkozik meg: a $[\text{Cu}_2\text{H}_6\text{L}]^{5-}$ részecske a DA_4HA_3 ligandummal meg sem jelenik. A deprotonálódási folyamat pK értéke a természetes fragmens esetén is elég nagy, azonban a DA_5HA_2 esetén, amelyben hat amidnitrogén áll rendelkezésre a horgonycsoportok között, tovább nő. A dinukleáris komplexek szerkezetét tekintve a CD-spektrumok összehasonlításával az alaninnal helyettesített származékok kisebb affinitását írhatjuk le a hisztidin környezetében való fémionmegkötésre.



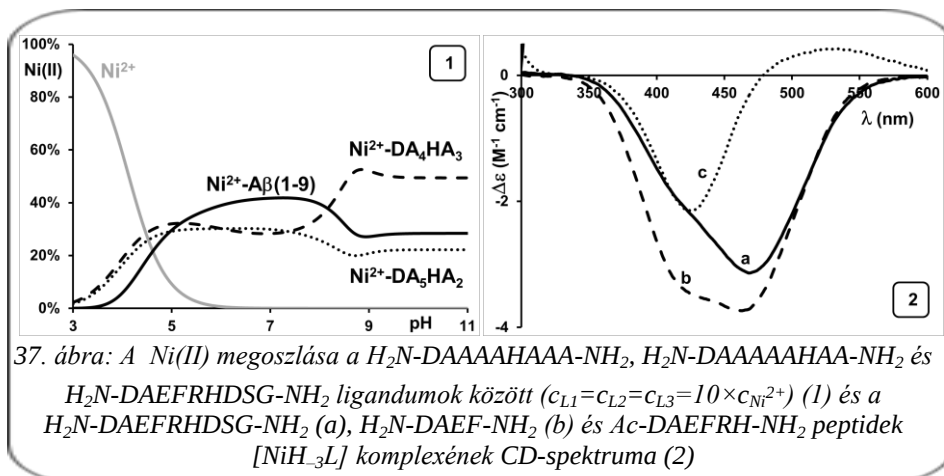
Az $\text{A}\beta(1-9)$ Ni(II) -komplexei

Az oldalláncmentes származékokhoz hasonlóan a természetes fragmens sem képez dinukleáris komplexeket nikkell(II)ionokkal, főleg esetben hidroxid csapadék jelent meg $\text{pH} \sim 6$ körül. (15. táblázat)

15. táblázat: A $\text{H}_2\text{N-DAEFRH-NH}_2$ és $\text{H}_2\text{N-DAEFRHDSG-NH}_2$ peptidek nikkell(II)komplexeinek stabilitási állandói

Részecske	$\text{NH}_2\text{-DAEFRH-NH}_2^{164}$ $\text{A}\beta(1-6)$		$\text{NH}_2\text{-DAEFRHDSG-NH}_2$ $\text{A}\beta(1-9)$	
	$\lg \beta$	pK	$\lg \beta$	pK
$[\text{NiHL}]$	10,60	—	11,31(8)	—
$[\text{NiL}]$	5,63	4,97	5,53(4)	5,78
$[\text{NiH}_1\text{L}]$	−3,05	9,13	—	—
$[\text{NiH}_3\text{L}]$	−20,00	—	−20,63(4)	—

Stabilitási állandóit tekintve a nikkell(II)komplexek nem különböznek lényegesen a DA_4HA_3 és DA_5HA_2 származékokétól, tehát az oldalláncok jelentősége kisebb a réz(II)komplexekhez képest. (10. táblázat) Az egyes ligandumok által kötött nikkell(II)ion mennyisége – ellentétben a réz(II)ionokkal – széles pH -tartományban közel azonos. (37/1. ábra)



37. ábra: A Ni(II) megoszlása a H₂N-DAAAAHAAA-NH₂, H₂N-DAAAAAHAA-NH₂ és H₂N-DAEFRHDSG-NH₂ ligandumok között ($c_{L1}=c_{L2}=c_{L3}=10\times c_{Ni^{2+}}$) (1) és a H₂N-DAEFRHDSG-NH₂ (a), H₂N-DAEF-NH₂ (b) és Ac-DAEFRH-NH₂ peptidek [NiH₃L] komplexének CD-spektruma (2)

A [NiL]⁻ összetételű részecske szintén oldalláncokon keresztül megvalósuló koordinációval jön létre, míg a másik uralkodó részecske, a [NiH₃L]⁴⁻ síknégyszetes és sárga színű, az amidnitrogén-koordinációt az abszorpciós és a CD-spektrumok is alátámasztják. (14. táblázat) Utóbbi nagy hasonlóságot mutat az amino terminust mintázó peptid megfelelő komplexének CD-spektrumával, így a természetes fragmensben is az amino terminus egyértelmű preferenciáját írhattuk le. (37/2. ábra) A nikkell(II)ionok esetén az oldalláncok stabilizáló hatása nem jelentkezik, ami a kialakuló merev, síknégyszetes szerkezetnek köszönhető. A réz(II)ionoknál kétmagvú részecskéknél nyilvánult meg legnagyobb mértékben az oldalláncok stabilitásnövelő hatása, ilyen komplexek azonban nikkellel nem alakultak ki.

Az A β (1-9) Zn(II)-komplexei

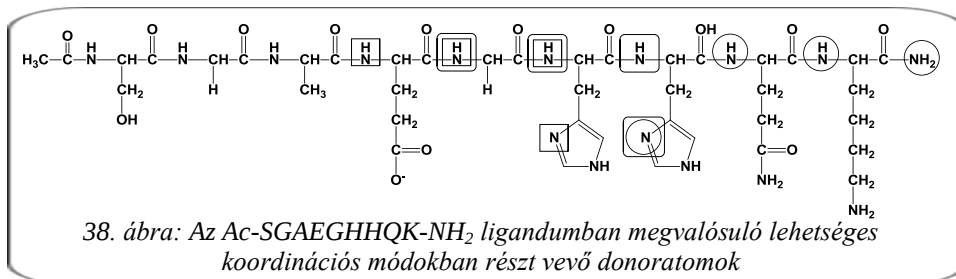
A Zn(II)-tartalmú részecskék esetén [ZnHL], [ZnL]⁻ és [ZnH₁L]²⁻ összetételű komplexeket tudtunk leírni a potenciometriás titrálás eredményeként, hasonlóan a DA₄HA₃ és DA₅HA₂ származékokhoz. Az amiloid- β peptid amino terminális régiója azonban a réz(II)- és nikkell(II)ionok számára szolgál kedvező kötőhelyekkel, a cink(II)ionok esetén a His13 és His14 környezetét adták meg, mint kifejezetten jó koordinációs lehetőséget. Ennek megfelelően és a származékaihoz hasonlóan a H₂N-DAEFRHDSG-NH₂ peptid jelenlétében is [ZnH₁L]²⁻ vegyes hidroxó komplex és hidroxid csapadék képződik 8-as pH-n. Az enyhén savas pH-n jelenlévő komplex (NH₂, β -COO⁻) koordinált cink(II)iont tartalmaz, melyet semleges közegben a hisztidin egészít ki makrokelát képzésével. Az oldalláncok hatása ebben az esetben a hidroxó komplex stabilitási szorzatában nyilvánul meg, mely a három nonapeptid közül a legkisebb érték, tehát nagyobb pH értékre képes eltolni a fémion hidrolízisét. (16. táblázat)

16. táblázat: A H_2N -DAEFRH- NH_2 és a H_2N -DAEFRHDSG- NH_2 peptidek cink(II)komplexeinek stabilitási állandói

Részcseke	$\text{H}_2\text{N-DAEFRH-NH}_2^{163}$ $A\beta(1-6)$		$\text{NH}_2\text{-DAEFRHDSG-NH}_2$ $A\beta(1-9)$	
	lg β	pK	lg β	pK
[ZnHL]	—	—	10,09(5)	—
[ZnL]	4,32	—	4,25(1)	5,84
[ZnH ₋₁ L]	-4,05	8,37	-4,50(3)	8,75
[ZnH ₋₂ L]	-12,96	8,91	—	—

4.3. Az amiloid- β (8-16) fragmens mutánsai

Az amiloid- β peptid fémionmegkötésért felelős szekvenciájának második szakasza két szomszédos hisztidint tartalmaz 13-as és 14-es helyzetben, mely további kötőhelyként szolgál a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionok számára. A korábban vizsgált A β (1-16)Y10A származékkal bizonyították, hogy a tirozin nem vesz részt a fémionok koordinációjában, mivel a természetes A β (1-16) fragmens pegilált formájához képest nem mutatott különbséget a képződő komplexekben.¹²⁰ (Önmagában a természetes fragmens a komplexei rossz oldhatósága miatt nem volt tanulmányozható oldategyensúlyi technikákkal, a pegilálás pedig nem változtatta meg a peptid harmadlagos szerkezetét.) A peptid oldhatóságát azonban javítani tudták ezzel a pontmutációval, így munkánkban az Ac-A β (8-16)Y10A származékot, az Ac-SGAEVHHQK-NH₂ peptidet vettük alapul a további kérdések megválaszolására.^{120, 163, 164} A szomszédos hisztidinek jelenléte miatt ugyanis számos komplexféleség és izomer szerkezet alakulhat ki: az amidnitrogének koordinációja mind a 13-as, mind a 14-es aminosavtól kiindulva is lejátszódhat, mind az N-, mind a C-terminális irányba. (38. ábra)



Az így képződő részecskék szerkezetének leírását és az izomerek arányát CD-spektroszkópiás vizsgálatok révén terveztük megadni. Ennek érdekében a CD-inaktív glicin aminosavat építettük be a koordinációban szerepet szintén nem játszó, 12-es pozíciójú valin aminosav helyére, így kaptuk az Ac-SGAEGHHQK-NH₂ szekvenciát (*Aβ*(8-16)*HH*). Az egyes hisztidin

oldalláncokról kiinduló koordináció ezáltal megkülönböztethetővé válik, azonban a két kötésmód leírásához szükség volt a His13Ala ill. His14Ala pontmutációkra is további két származék formájában. (6. ábra, III. csoport) Az utóbbi két, egy hisztidint tartalmazó peptid komplexképződési folyamatai jelentik tehát az alapot a tényleges kötőhely viselkedésének leírásához, ezért az eredmények részletezését az $A\beta(8-16)AH$ és $A\beta(8-16)HA$ származékokkal kezdem.

4.3.1. Ac-SGAEGAHQK-NH₂ ($A\beta(8-16)AH$) és Ac-SGAEGHAQK-NH₂ ($A\beta(8-16)HA$)

A két ligandum csaknem azonos szekvenciájú: egy glutaminsavat, egy hisztidint és egy lizint tartalmaznak, melyek pK értékeit potenciometriás vizsgálatok alapján határoztuk meg. A három disszociációs lépcső egymástól elkülönülten játszódik le a fenti sorrendben növekvő pK értékkel. (17. táblázat)

17. táblázat: Az Ac-SGAEGAHQK-NH₂ és Ac-SGAEGHAQK-NH₂ ligandumok pK értékei

Részecske	Ac-SGAEGAHQK-NH ₂ $A\beta(8-16)AH$		Ac-SGAEGHAQK-NH ₂ $A\beta(8-16)HA$	
	lg β	pK	lg β	pK
[HL]	10,26(1)	10,26	10,27(1)	10,27
[H ₂ L] ⁺	16,69(1)	6,43	16,73(1)	6,46
[H ₃ L] ²⁺	20,84(2)	4,15	20,82(2)	4,09

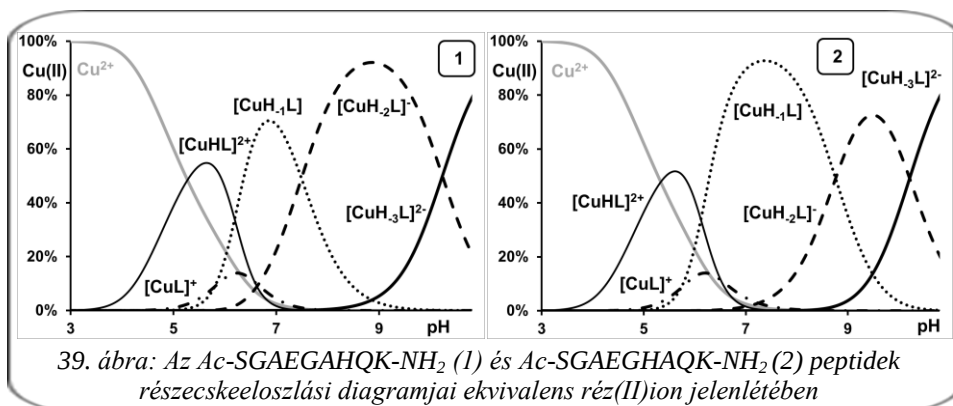
Az $A\beta(8-16)AH$ és $A\beta(8-16)HA$ $Cu(II)$ -komplexei

A két modell peptid egy-egy hisztidint tartalmaz horgonycsoportként, így egy ekvivalens fémion megkötésére képes. Ligandumfelesleg jelenlétében is vizsgáltuk a kialakuló részecskéket, azonban biszligandumú részecskét nem tudtunk jelentős mennyiségben leírni a potenciometriás mérések alapján. A képződő komplexek sztöchiometriája azonos, bár a stabilitási állandók néhány esetben különböznek. (18. táblázat)

18. táblázat: Az Ac-SGAEGAHQK-NH₂ és Ac-SGAEGHAQK-NH₂ peptidekkel képződő réz(II)komplexek stabilitási állandói

Részecske	Ac-SGAEGAHQK-NH ₂ $A\beta(8-16)AH$		Ac-SGAEGHAQK-NH ₂ $A\beta(8-16)HA$	
	lg β	pK	lg β	pK
[CuHL] ²⁺	14,49(1)	–	14,47(2)	–
[CuL] ⁺	7,91(2)	6,58	7,96(4)	6,51
[CuH ₁ L]	2,11(1)	5,80	2,23(1)	5,73
[CuH ₂ L] [–]	–5,38(1)	7,49	–6,53(2)	8,76
[CuH ₃ L] ^{2–}	–15,61(2)	10,23	–16,74(2)	10,21
lg K(Cu+N _{lm})	4,23		4,20	

Ekvivalens réz(II)ion jelenlétében az enyhén savas pH-n megjelenő $[\text{CuHL}]^{2+}$ komplex nagy mennyiségben képződik. (39. ábra) Ezen a pH értéken a lizin oldallánc még protonált formában van jelen, így az imidazolnitrogén koordinációját feltételezhetjük. Az első egyensúlyi állandó értéke a Cu(II) monodentát kötődésére azonban nagyobb, mint az egy hisztidint tartalmazó peptidek esetén ($\text{pK} \sim 3,6-3,9$). A stabilizáló hatás a Glu11 karboxilátcsoportjának



lehet köszönhető, ami ezen a pH értéken már deprotonált állapotú. A legnagyobb különbség a két peptid komplexképződése között a $[\text{CuH}_1\text{L}]$ és $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ részecskék stabilitásában látható: míg az $A\beta(8-16)\text{HA}$ ligandum $[\text{CuH}_1\text{L}]$ komplexe széles pH-tartományban uralkodó, az $A\beta(8-16)\text{AH}$ esetén a $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ részecskével átfedő folyamatban képződik. Az eltérő viselkedés a harmadik amidnitrogén deprotonálódásának pK értékében is tükröződik (18. táblázat).

A lizin oldallánc a spektroszkópiai adatok szerint nem vesz részt a koordinációban és $\text{pH} \sim 10$ alatt protonált formában van. (19. táblázat) Ebből következően a $[\text{CuH}_2\text{L}]^-$ komplex pontos összetétele $[\text{CuH}_3\text{LH}]^-$ és a koordinációs módja megegyezik a $[\text{CuH}_3\text{L}]^{2-}$ részecskéével, csupán a lizin oldallánca deprotonálódik. A nagy pH-n képződő komplexek 4N koordinációját alátámasztják a spektrális adatok is, $\text{pH} > 9$ esetén már nincs további változás, ami bizonyítja a kötémódok azonosságát. Hasonlóan a $[\text{CuH}_1\text{L}]$ komplex valójában $[\text{CuH}_2\text{LH}]$ képlettel írható le, azaz az imidazolnitrogén mellett két amidnitrogén van a koordinációs szférában, a negyedik helyet pedig elfoglalhatja a Glu11 karboxilátcsoportja. Ez a fajta kötémód az $A\beta(8-16)\text{HA}$ ligandum esetén kedvezményezettebb, hiszen kisebb távolság a hisztidin és a glutaminsav oldallánca között, ami kelátképző helyzetben van, ezzel magyarázható a kitüntetett stabilitás is.

19. táblázat: Az Ac-SGAEGAHQK-NH₂ és Ac-SGAEGHAQK-NH₂ ligandumok réz(II)- és nikkel(II)komplexeinek spektrális adatai

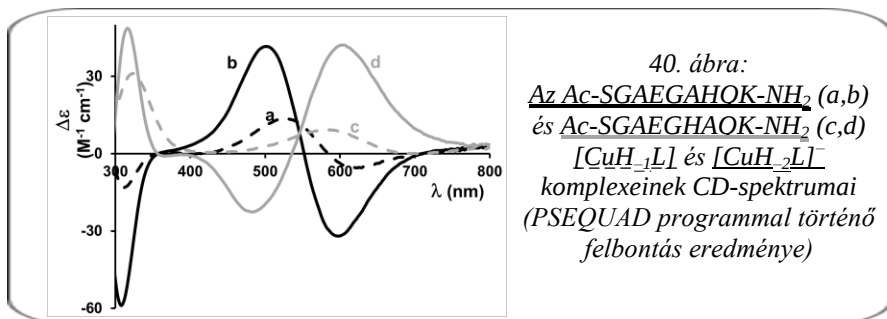
Részecske	Ac-SGAEGAHQK-NH ₂ A β (8-16)AH		Ac-SGAEGHAQK-NH ₂ A β (8-16)HA	
	$\lambda_{\max}/\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda/\Delta\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}/\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda/\Delta\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)
[CuHL] ²⁺	771/19	–	773/20	–
[CuH ₁ L]	608/64	311/–0,53 528/+0,45 622/–0,28	626/62	324/+0,18 582/+0,11
[CuH ₂ L] [–]	550/119	308/–2,30 502/+1,60 598/–1,33	519/118 576(váll)/105	316/+1,77 367/–0,06 483/–0,88
[CuH ₃ L] ^{2–}	550/119	308/–2,30 502/+1,60 598/–1,33	519/118 576(váll)/105	316/+1,77 367/–0,06 483/–0,88
[NiH ₃ L] ^{2–}	430/169	415/+6,48	433/198	419/–3,49
(=[NiH ₂ L])	474(váll)/154	495/–4,58	500(váll)/130	503/+4,24

Az UV-látható és CD-spektrumok alátámasztják a feltételezett kötémódokat, azonban az ESR-paraméterek a közbenső protonáltságú komplexekben ezektől eltérő szerkezetekre utalnak. (20. táblázat) Ezeket a különbségeket okozhatta a glutamin oldalláncnak a közelmúltban kimutatott közvetett kölcsönhatása, mely hidrogénkötéseken keresztül stabilizálhatja a kialakult komplexszerkezetet.²⁰⁴ A [CuH₁L] és [CuH₂L][–] komplexek széles abszorpciós sávját és a várttól eltérő ESR paramétereit tehát ez esetben a lizil és glutaminil oldalláncok szokatlan hatása és az így kialakuló torzult szerkezet magyarázhatja. A 3N és 4N koordinált részecskékben megfigyelhető módosulás a lizin ammóniumcsoportjának deprotonálódásával és a hidrogénkötés megszűnésével eltűnik, így a [CuH₃L]^{2–} részecske esetén mért paraméterek már nem mutatnak különbséget az egyéb (3N[–],N_{im}) kötémódú komplexekhez képest.

20. táblázat: Az Ac-SGAEGAHQK-NH₂ és Ac-SGAEGHAQK-NH₂ peptidok néhány réz(II)komplexének ESR paraméterei

Részecske	Ac-SGAEGAHQK-NH ₂ A β (8-16)AH	Ac-SGAEGHAQK-NH ₂ A β (8-16)HA
	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (10 ⁻⁴ cm ⁻¹)
[CuH ₁ L]	2,272/179	2,299/169
[CuH ₂ L] [–]	2,235/170	2,246/184
[CuH ₃ L] ^{2–}	2,193/200	2,195/198

Ez azonban nem akadályozza meg, hogy a (3N[–],N_{im}) koordinációjú komplexek eltérő CD-spektrumai alapján modellként használjuk a két hisztidint tartalmazó származék komplexképződési folyamatainak leírásához. (40. ábra)



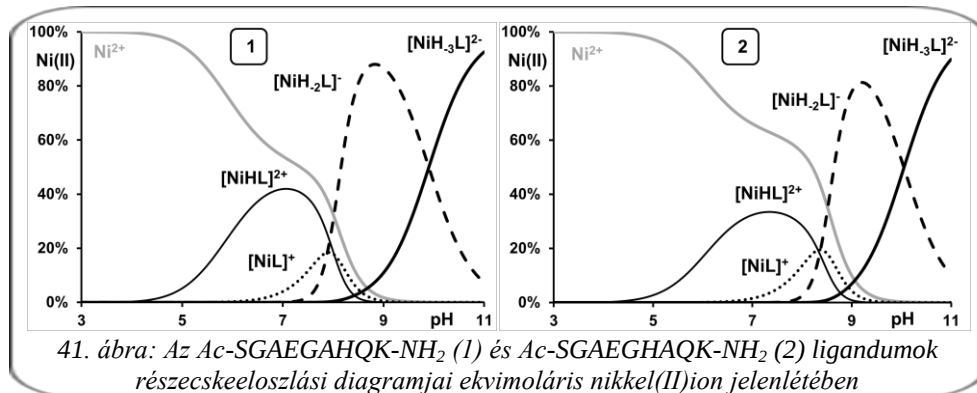
Az Aβ(8-16)AH és Aβ(8-16)HA Ni(II)-komplexei

A két ligandum hasonlóan a réz(II)-ionokhoz egy ekvivalens nikkel(II)iont képes megkötni a 21. táblázatban feltüntetett stabilitású komplexek képződése közben.

21. táblázat: Az Ac-SGAEGAHQK-NH₂ és Ac-SGAEGHAQK-NH₂ ligandumokkal képződő nikkel(II)komplexek stabilitási állandói

Részecske	Ac-SGAEGAHQK-NH ₂ Aβ(8-16)AH		Ac-SGAEGHAQK-NH ₂ Aβ(8-16)HA	
	lgβ	pK	lgβ	pK
[NiHL] ²⁺	13,22(4)	–	12,95(4)	–
[NiL] ⁺	5,20(5)	8,02	4,63(4)	8,32
[NiH ₂ L] ⁻	-10,57(2)	–	-12,11(2)	–
[NiH ₃ L] ²⁻	-20,47(3)	9,90	-22,16(2)	10,05
lg K(Ni + N _{lm})	2,96		2,68	

Az utolsó deprotonálódási lépés a pK értéke alapján is a lizin oldalláncához rendelhető. A fémionhoz képest kétszeres mennyiségű ligandumot tartalmazó rendszer titrálási adatainak kiértékelése során biszkomplexek képződését nem tudtuk leírni. A nikkel számára kevésbé kedvező kötőhelyet kínálnak ezek a szekvenciák, amit 8-as pH-n csapadék megjelenése is tükrözött, azonban a pH további emelésével feloldódott. Az oldat sárga színe ezzel párhuzamosan azonban igazolta a síknégyszetes, három amid által koordinált [NiH₂L]⁻ képződését, amit a spektrális adatok számszerűen is alátámasztanak. (19. táblázat) A megelőző pH-értékeken jelenlévő [NiHL]²⁺ ill. [NiL]⁺ részecskékben a ligandum az oldalláncokon keresztül ill. egy amidnitrogénnel kiegészülve köti a fémiont. (41. ábra) A nagy pH-n jelenlévő komplexekben a két ligandum esetén egyaránt (3N⁻,N_{lm}) kötismód valósul meg, CD-spektrumaik azonban jelentős különbséget mutatnak a glicin részletek helyzete miatt. (48. ábra) A koordinációs izomerek szerkezete és aránya ezen éppen ellentétes lefutású modellspektrumok segítségével meghatározható a két hisztidin tartalmazó fragmensre.



Az A β (8-16)AH és A β (8-16)HA Zn(II)-komplexei

Egyszerű, egy hisztidinnel és védett amino terminussal rendelkező peptidek korábban vizsgált Zn(II)-tartalmú rendszereiben csapadékképződést figyeltek meg, tehát ezek a ligandumok nem képesek stabil cink(II)komplexeik kialakítására. Ennek megfelelően az általunk vizsgált peptidek sem tudták megakadályozni a cink(II)ionok hidrolízisét 8-as pH felett. Egyetlen komplexféleségként a $[\text{ZnHL}]^{2+}$ összetételű részecskét tudtuk azonosítani és leírni, ami enyhén savas közegben volt jelen, így a lizin oldallánc protonált volt, a koordináció a Glu(COO⁻) és His(N_{im}) donorcsoportok részvételével valósult meg.

22. táblázat: Az Ac-SGAEGAHQK-NH₂ és Ac-SGAEGHAQK-NH₂ cink(II)komplexének stabilitási állandói

Részecske	Ac-SGAEGAHQK-NH ₂ A β (8-16)AH		Ac-SGAEGHAQK-NH ₂ A β (8-16)HA	
	lg β	lg K(Zn + N _{im})	lg β	lg K(Zn + N _{im})
$[\text{ZnHL}]^{2+}$	13,04(4)	2,78	12,89(5)	2,62

4.3.2. Ac-SGAEGHHQK-NH₂ (A β (8-16)HH)

Az A β (8-16)Y10A V12G pontmutációkkal kapott peptid pK értékei közül a glutaminsavhoz tartozik a legalacsonyabb, míg a lizinhez a legnagyobb érték. A két hisztidin oldallánca egymással átfedő folyamatokban deprotonálódik. (23. táblázat) Az Ac-A β (8-16)Y10A származékhoz képest a 12-es valin aminosavban különbözik, amit glicinre cseréltünk, ez a sav-bázis tulajdonságait nem befolyásolja jelentősen.

23. táblázat: Az Ac-SGAEGHHQK-NH₂ és Ac-SGAEVHHQK-NH₂ ligandumok protonálódási állandói

Részecske	Ac-SGAEGHHQK-NH ₂ Aβ(8-16)HH		Ac-SGAEVHHQK-NH ₂ ¹²⁰ Ac-Aβ(8-16)Y10A	
	lg β	pK	lg β	pK
[HL]	10,23(1)	10,23	10,31	10,31
[H ₂ L] ⁺	16,96(1)	6,73	17,04	6,73
[H ₃ L] ²⁺	22,94(2)	5,98	23,01	5,97
[H ₄ L] ³⁺	27,02(2)	4,08	26,99	3,98

Az Aβ(8-16)HH Cu(II)-komplexei

A vizsgált peptidek közül a két hisztidint tartalmazó amiloid-β származék mutatja a leggazdagabb képet a komplexképződést illetően. (24. táblázat)

24. táblázat: Az Ac-SGAEGHHQK-NH₂ és Ac-SGAEVHHQK-NH₂ peptidek réz(II)komplexeinek stabilitási állandói

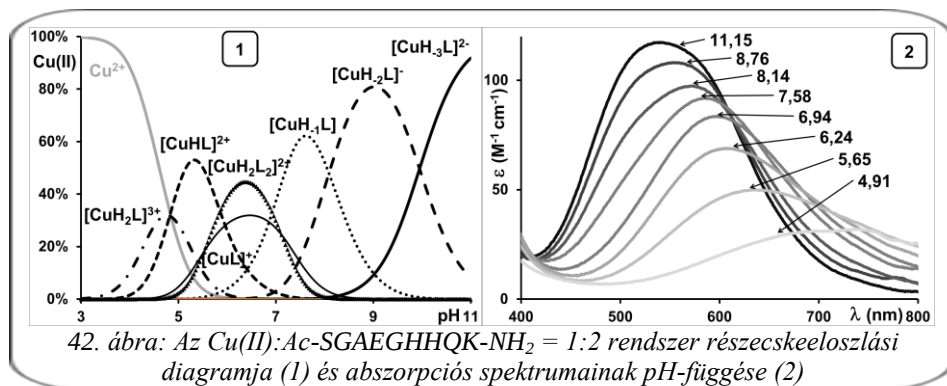
Részecske	Ac-SGAEGHHQK-NH ₂ Aβ(8-16)HH		Ac-SGAEVHHQK-NH ₂ ¹²⁰ Ac-Aβ(8-16)Y10A	
	lg β	pK	lg β	pK
[CuH ₂ L] ³⁺	21,07(2)	–	20,90	–
[CuHL] ²⁺	16,25(1)	4,82	16,08	4,82
[CuL] ⁺	10,29(4)	5,96	9,90	6,18
[CuH ₁ L]	3,43(3)	6,86	2,35	7,55
[CuH ₂ L] [–]	–4,66(3)	8,09	–6,91	9,26
[CuH ₃ L] ^{2–}	–14,61(4)	9,95	–17,35	10,44
[CuH ₂ L ₂] ²⁺	30,92(7)	–	–	–
[Cu ₂ H ₁ L] ²⁺	7,31(5)	–	7,03	–
[Cu ₂ H ₂ L] ⁺	0,79(3)	6,52	0,35	6,68
[Cu ₂ H ₃ L]	–6,55(3)	7,34	–7,67	8,02
[Cu ₂ H ₄ L] [–]	–14,31(3)	7,76	–16,41	8,74
[Cu ₂ H ₅ L] ^{2–}	–	–	–26,14	9,73
[Cu ₂ H ₆ L] ^{3–}	–34,82(3)	–	–36,64	10,50
lg K(Cu+N _{Im})	6,02		5,77	

A két horgonycsoporttól kiindulva mononukleáris részecskéken túl kétmagvú komplexek kialakítására is képes, valamint ligandumfelesleget alkalmazva biszkomplexek jelenlétét is ki tudtuk mutatni a potenciometriás adatok alapján. Az ESR-adatok is egyértelműen mutatják, hogy jelen van a ligandumfelesleget tartalmazó rendszerben a 4N_{Im} koordinált réz(II)ion, azaz a hisztidin imidazolláncokon keresztül kialakuló biszligandumú részecske. (25. táblázat) Nagy hasonlóságot mutatnak például az Ac-HVVH-NH₂ ligandum azonos koordinációjú komplexének paraméterei ($g_{\parallel} = 2,255$; $A_{\parallel} = 193 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$).¹⁸¹

25. táblázat: Az Ac-SGAEGHHQK-NH₂ peptid réz(II)komplexeinek spektrális adatai

Részecske	$\lambda_{\max}/\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda/\Delta\epsilon$ (nm/M ⁻¹ cm ⁻¹)	$g_{\parallel}/A_{\parallel}$ (10 ⁻⁴ cm ⁻¹)
[CuLH] ²⁺	—	—	2,317/171
[CuL] ⁺	611/71	—	2,272/179
[CuH ₁ L]	596/84	308/-0,37 343/+0,18 539/+0,32	—
[CuH ₂ L] ⁻	543/113	308/-1,59 498/+0,70 582/-0,49 672/+0,21	—
[CuH ₃ L] ²⁻	543/113	308/-1,59 498/+0,70 582/-0,49 672/+0,21	2,195/199
[CuH ₂ L ₂] ²⁺	—	—	2,252/192
[Cu ₂ H ₆ L] ³⁻	545/133	501/-0,29 637/+0,14	—

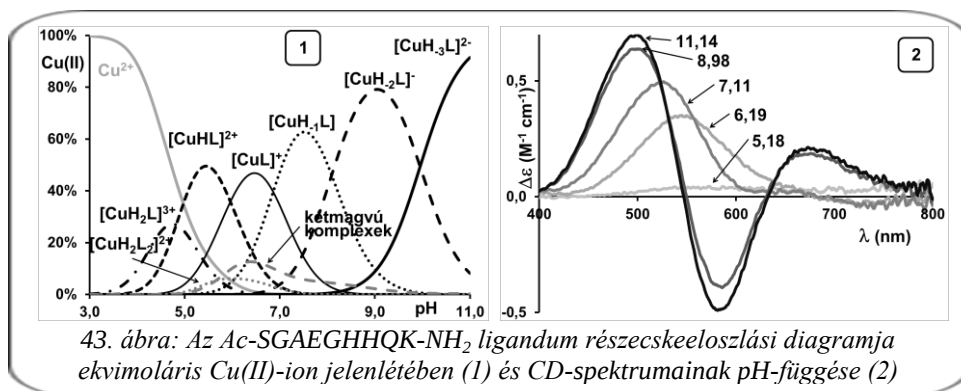
A részecske a [CuL]⁺ komplexszel párhuzamosan képződik, ami intenzívebb abszorpciós sávokat és Cotton-effektusokat eredményez az amidnitrogén-koordináció révén. (42. ábra) Az abszorpciós spektrumok felbontásával így nem


 42. ábra: Az Cu(II):Ac-SGAEGHHQK-NH₂ = 1:2 rendszer részecskeeloszlási diagramja (1) és abszorpciós spektrumainak pH-függése (2)

tudtuk meghatározni az abszorpciós maximum értékét, azonban 700 nm körül mutatkozik a spektrumon. A pH emelésével mononukleáris részecskék jönnek létre, amit az ekvimoláris fémion jelenlétében rögzített abszorpciós és CD-spektrumok hasonlósága is alátámaszt. A savas pH-n képződő [CuLH₂]³⁺ részecske a glutaminsav és hisztidin oldalláncainak részvételével képződik, a következő protonvesztés pedig a His14 imidazolnitrogénjéhez és koordinációjához rendelhető.

A [CuH_nL]¹⁻ⁿ (n = 0-2) részecskék növekvő számú amidkoordinációját a látható tartománybeli maximális elnyelési hullámhossz és a CD-spektrumok változása is igazolja. (25. táblázat) Az utolsó deprotonálódási lépés a lizin oldalláncbeli

ammóniumcsoportjához rendelhető, a CD-spektrumok nem mutatnak változást pH = 9,0 felett. (43/2. ábra)



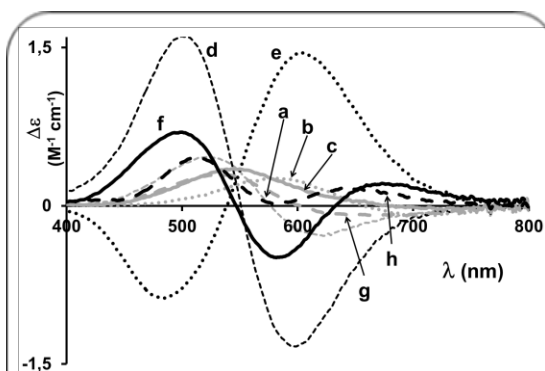
A ligandum két horgonycsoporttal is rendelkezik, melyektől kiindulva az N- és a C-terminális irányban is létrejöhet a koordináció, azonban utóbbi esetben kevésbé stabil komplex képződik. Ebből következően az amino terminus irányába megvalósuló amidkoordinációt várjuk, ami így kialakulhat az -EGH- ill. a -GHH- aminosavak részvételével. Az amidnitrogén-deprotonálódás a két

izomer esetén eltérő CD-spektrumokhoz vezet, mivel a glicin részletek különböző távolságra helyezkednek el a horgonycsoporttól. Ezeket a komplexszerkezeteket a már említett két, egy hisztidint tartalmazó modell peptid segítségével írtuk le, amelyeket összehasonlítási alapként használhatunk az

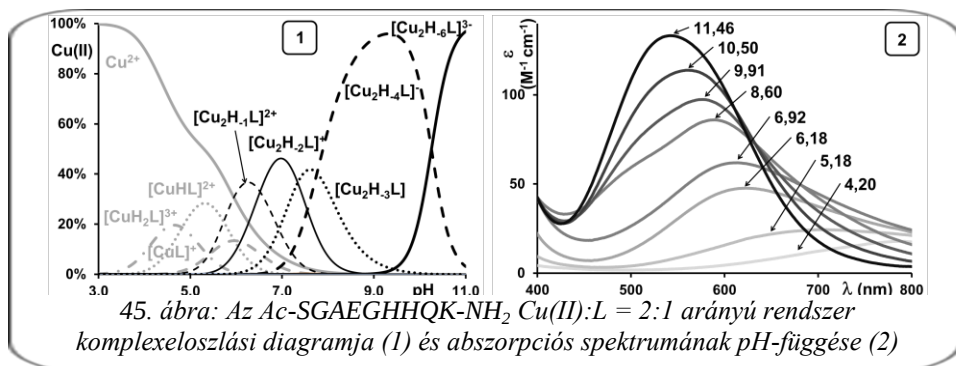
Ac-SGAEGHHQK-NH₂ ligandum leírására. (44. ábra)

A számolt eredő spektrumok alapján a 13-as és 14-es

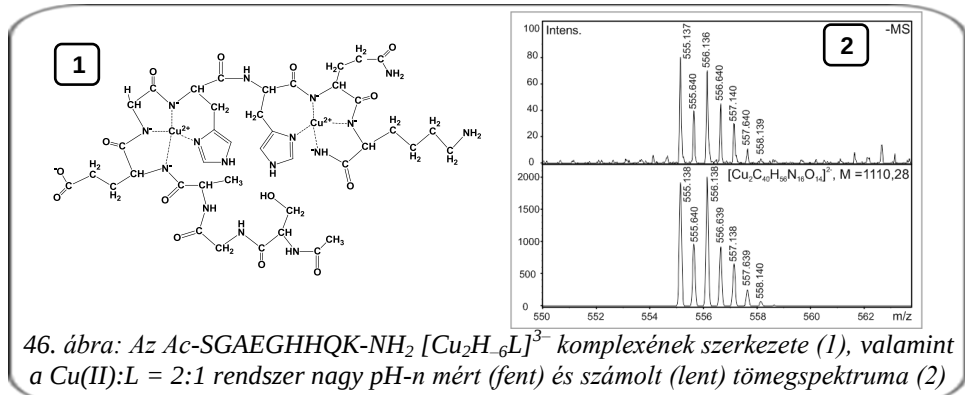
hisztidintről induló amidkoordináció azonos mértékben következik be, amit a [CuH₁L] komplex modell peptidek alapján számolt eredő CD-spektrummal való jó egyezés mutat. A [CuH₃L]²⁻ komplex esetén azonban nem teljes az egyezés a mért CD-spektrummal: a 650-750 nm tartományban pozitív CD-sáv jelenik meg, ami a (3N⁻,N_{im}) koordinációt axiálisan kiegészítő hisztidin kötődésére utalhat.



A két horgonycsoport elkülönült kötőhellyé válik réz(II) felesleget alkalmazva, kétmagvú komplexek képződnek pH = 5 felett. (45/1. ábra) A mononukleáris komplexekhez hasonlóan az amidnitrogének koordinációja játszódik le a pH növelésével, amit az abszorpciós spektrumok is alátámasztanak. (45/2. ábra)

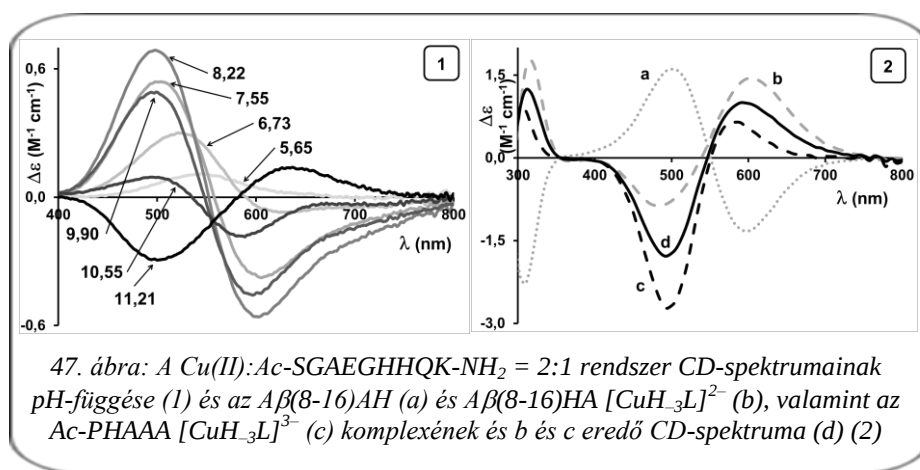


A kétmagvú komplexek kialakulása a 13-as hisztidintől az N-terminus felé és a 14-es hisztidintől a C-terminus felé mehet végbe (3N⁺,N_{Im}) és (N_{Im},3N⁺) kötésmódokkal. (46/1. ábra) A [Cu₂H₅L]²⁺ részecskék jelenlétét a potenciometriás adatok alapján nem tudtuk bizonyítani, ami az Ac-A β (8-16)Y10A fragmenshez képest különbséget jelent. A [Cu₂H₆L]³⁺ részecske képződése az abszorpciós maximum hullámhosszának csökkenésével járt együtt, ami további amidnitrogén-koordinációra utal. A lizin oldalláncának deprotonálódása ezzel a folyamattal átfedő lépésben mehet végbe.



A képződő komplexek szerkezetét a CD-spektrumoknak a modellrendszerekével történő összevetése révén adhatjuk meg. A CD-spektrumok változása a pH függvényében 8,2-es értékig megegyezik az Ac-SGAEGHHQK-NH₂ réz(II)komplexeinek spektrumaival. (47/1. ábra) Ezt követően a CD-sávok intenzitásának csökkenése következik be, ami a réz(II)ionok His14-ről a His13 környezetébe való átrendeződésére utal. Az amidkoordináció két fémion esetén

ugyanis akkor mehet végbe a koordinációs szférák telítésével, ha az N-terminális láncvég felé a His 13-ról, a His14-ről pedig a C-terminális irányba megy végbe. A legnagyobb pH-n rögzített spektrum azonban nem csupán a maximálisan deprotonált részecskére jellemző, az Ac-PHAAA-NH₂ modell peptiddel leírható (N_{im},3N⁻) koordináció CD-sávjai nem jelentkeznek a megfelelő mértékben (47./2. ábra, c). A CD-spektrumok alapján tehát még nem teljes az amidnitrogének deprotonálódása a His14-től a C-terminus irányába minden Cu(II)ion esetén. A dinukleáris réz(II)komplex jelenlétét tömegspektruma is alátámasztja. (46/2. ábra) A két réz(II)ion közötti kis távolságot a pH növelésével az ESR-spektrumok sávjainak szélesedése is jelzi.



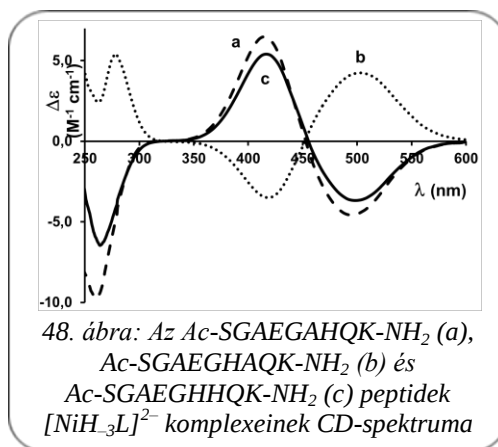
Az Aβ(8-16)HH Ni(II)-komplexei

A nikkel(II)ionokat feleslegben tartalmazó rendszerben csapadék képződött, kétmagvú részecskékre nem tudtunk stabilitási állandót meghatározni. A titrálási adatok alapján ligandumfelesleg mellett biszkomplex csak kis mennyiségben képződik. (26. táblázat) A protonált komplexekben kizárólag az oldalláncok koordinálnak, hiszen a [NiHL]²⁺ összetételű részecske nem mutat mérhető CD-aktivitást. A mononukleáris részecskék stabilitási állandóit összevetve a Val12-t tartalmazó származékéival, jelentős különbséget látunk, bár a képződő részecskék sztöchiometriája egyezik.

26. táblázat: Az Ac-SGAEGHHQK-NH₂ és Ac-SGAEVHHQK-NH₂ ligandumok nikkel(II)komplexeinek stabilitási állandói

Részecske	Ac-SGAEGHHQK-NH ₂		Ac-SGAEVHHQK-NH ₂ ¹⁶⁴	
	A β (8-16)HH		Ac-A β (8-16)Y10A	
	lg β	pK	lg β	pK
[NiHL] ²⁺	14,17(2)	–	14,05(3)	–
[NiH ₁ L]	–2,02(2)	–	–2,63(3)	–
[NiH ₂ L] [–]	–10,49(2)	8,47	–12,38(4)	9,75
[NiH ₃ L] ^{2–}	–20,37(2)	9,88	–23,47(5)	11,09
[NiH ₂ L ₂] ²⁺	26,71(18)	–	–	–
lg K(Ni + N _{lm})	3,94		3,74	

A részecskeeloszlási diagramok szerint a deprotonálódási folyamatok kisebb pH-n mennek végbe a glicint tartalmazó peptid esetén, így feltételezhető a valin izopropil oldalláncának szterikus gátló hatása.²⁰⁵ Az abszorpciós és CD-spektrumok pH=9 felett nem változnak, így az utolsó deprotonálódási lépés ismét a lizin oldalláncnak tudható be. A 430 nm-nél látható maximális elnyelési hullámhossz és a vállként megjelenő abszorpciós sáv 476 nm-nél (3N[–],N_{lm}) koordinációra utal a [NiH₂L][–] és [NiH₃L]^{2–} részecskékre. A horgonycsoport meghatározása az egy hisztidint tartalmazó ligandumok CD-spektrumaival történő összevetés útján lehetséges. (48. ábra) A (3N[–],N_{lm}) koordinált Ni(II) CD-spektruma jó egyezést mutat a 14-es hisztidintről induló kötémódra jellemző spektrummal, tehát a nikkel(II)ion számára ez a horgonycsoport jelenti az elsődleges kötőhelyet.



48. ábra: Az Ac-SGAEGAHQK-NH₂ (a), Ac-SGAEGHQAQK-NH₂ (b) és Ac-SGAEGHHQK-NH₂ (c) peptidek [NiH₃L]^{2–} komplexeinek CD-spektruma

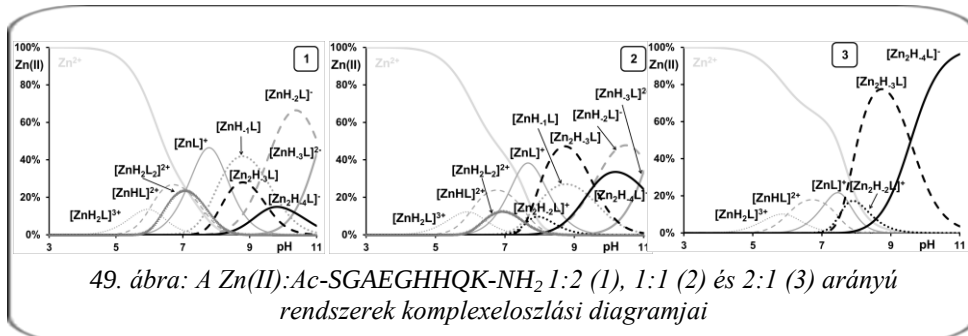
Az A β (8-16)HH Zn(II)-komplexei

Az amiloid- β peptid elsődleges cinkkötő helyeként a His13 és His14 környezetét jelölték meg, melyek nagy affinitását dinukleáris komplexek jelenléte is igazolja az Ac-A β (8-16)Y10A fragmenssel.¹⁶³ Az Ac-SGAEGHHQK-NH₂ peptiddel szintén leírtuk kétmagvú részecskék képződését, valamint a mononukleáris komplexeken felül ligandum feleslege mellett biszligandumúak is kialakultak a potenciometriás adatok alapján. (27. táblázat)

27. táblázat: Az Ac-SGAEGHHQK-NH₂ és Ac-SGAEVHHQK-NH₂ ligandumok cink(II)komplexeinek stabilitási állandói

Részecske	Ac-SGAEGHHQK-NH ₂ Aβ(8-16)HH		Ac-SGAEVHHQK-NH ₂ ¹⁶⁴ Ac-Aβ(8-16)Y10A	
	lg β	pK	lg β	pK
[ZnLH ₂] ³⁺	19,37(5)	–	19,92	–
[ZnLH] ²⁺	13,38(3)	5,99	13,94	5,98
[ZnL] ⁺	6,29(2)	7,09	6,67	7,27
[ZnH ₁ L]	–1,96(3)	8,25	–1,55	8,22
[ZnH ₂ L] [–]	–11,34(3)	9,38	–11,20	9,65
[ZnH ₃ L] ^{2–}	–22,41(5)	11,07	–22,65	11,45
[Zn ₂ H ₂ L] ⁺	–6,64(4)	–	–5,85	–
[Zn ₂ H ₃ L]	–14,20(1)	7,56	–14,49	8,64
[Zn ₂ H ₄ L] [–]	–23,77(2)	9,57	–25,65	11,16
[ZnH ₂ L ₂] ²⁺	26,77(8)	–	–	–
lg K(Zn + N _{Im})	3,15		3,63	

A stabilitási állandók felhasználásával ligandumfelesleg esetén ábrázolt komplexeloszlási diagramon azonban enyhén lúgos közegben a dinukleáris részecskék is megjelennek. (49. ábra) A négyszeres ligandumfelesleg mellett



felvett tömegspektrum a biszkomplekek jelenlétére nem utalt, ami a Zn-N_{Im} kötés megszűnésével is magyarázható a vizsgálat körülményei között. Kétmagvú részecskékre jellemző m/z értékeknél jelentkező csúcsokat azonban megfigyelhettünk ilyen fém-ligandum arány mellett is a spektrumon, összhangban a részecskeeloszlási képpel, azonban ellentétben a korábbi tapasztalatokkal. Ezek ismeretében nem meglepő, hogy ekvimoláris fémiont és ligandumot tartalmazó rendszerben is megjelennek a dinukleáris komplexek, hasonlóan a korábban vizsgált Ac-Aβ(8-16)Y10A származékhoz. A pH = 7 körül megjelenő kétmagvú komplexekben lejátszódó deprotonálódás azonban kedvezményezettebb a glicinnel helyettesített származékban, ami ismét utalhat a valin oldalláncának szterikus gátló hatására. Ezek a részecskék és a [ZnH₃L]^{2–} ugyanis kisebb pH-n jelennek meg és nagyobb mennyiségben képződnek

ekvimoláris rendszerben. A deprotonálódási folyamatok nem csupán hidrolízis folyamatra, de amidnitrogén-koordinációra is utalhatnak. Cink(II)ionok által indukált amiddeprotonálódásra kevés példa van az irodalomban, a legjellemzőbb a 4.1.2. fejezetben a *heptapeptid* esetén is ismertetett H₂N-XH- szekvenciával kialakuló (NH₂,N⁻,N_{im}) koordináció. Megfigyelték továbbá az Ac-HHVGDNH₂ ligandumban is a Zn(II)-N⁻ kötés kialakulását, azonban az Ac-HVGDH-NH₂ peptiddel már nem jött létre ez a kötés, ami alapján az amidkoordinációhoz szükséges a hisztidinek szomszédos elhelyezkedése. Az Ac-HHGH-OH ligandummal annak ellenére, hogy tartalmazza ezt a kötőhelyet, nem játszódik le amidnitrogén-deprotonálódás, ami a megfelelő távolságra elhelyezkedő, főként aszpartát ill. glutamát oldalláncbeli karboxilát csoportjainak szükségességére is utal.²⁰² Ezek fényében nem meglepő az Ac-SGAEVHHQK-NH₂ származék esetén már bizonyított amidkoordináció, amit a valin-glicin csere sem befolyásol, ugyanis ekvimoláris cink(II)ion jelenlétében nem jelent meg fémhidroxid csapadék a pH növelésével, valamint a megfelelő pK értékek is nagy hasonlóságot mutatnak. A ¹H NMR spektrumok alapján kaphatunk pontosabb képet a koordinálódó donoratomokról, azonban a kémiai eltolódások cink(II)ionok jelenlétében nem különböznek jelentősen a szabad liganduméhoz képest, valamint a jelek szélesedése is megnehezíti azok kiértékelését. A hisztidin α -CH és β -CH₂ protonjai mellett a lizin ε -CH₂ és a glutamát δ -CH₂ hidrogénjeinek kissé eltérő kémiai eltolódását tapasztaltuk a szabad ligandumhoz képest, főként a pH = 6-8 tartományban, ami az oldalláncok koordinációjára utalhat. A nagy pH-n felvett spektrumokon a szabad ligandumra jellemző jelek is láthatók, melyek alapján dinukleáris részecskék és így a fémionhoz nem koordinált ligandum jelenlétére következtethetünk.

A kétmagvú komplexek jelenlétét tömegspektrumuk alapján is igazoltuk, amit az Ac-A β (8-16)Y10A ligandummal is bizonyítottak. A ¹H NMR spektrumok 1,8:1 fém-ligandum arány esetén azonban széles jeleket mutatnak, melyek nem alkalmasak a komplexszerkezetre vonatkozó információk kinyerésére, a potenciometriás méréshez képest megnövelt koncentráció csapadék képződését eredményezte.

A biológiai szempontból jelentős réz(II)- és cink(II)ionok egyidejű jelenlétében is vizsgáltuk a komplexképződési folyamatokat. A réz(II)iont tartalmazó törzsrendszerrel összevetve sem az abszorpciós sem a CD-spektrumok nem mutattak érdemi különbséget cink(II) jelenlétében. Az A β (8-16)HH ligandum réz(II)ionokkal való kölcsönhatását tehát a cink(II)ionok nem befolyásolják jelentős mértékben. A teljes A β (1-16) fémmegkötő szakaszban

tapasztalt Cu(II)-átrendeződés Zn(II) jelenlétében¹⁸⁶ tehát csak abban az esetben megy végbe, amennyiben a réz(II)ionok számára rendelkezésre áll más koordinációs lehetőség a His13 és His14 környezetén kívül, amit nagy pH-n a cink(II)ionok foglalnak el.

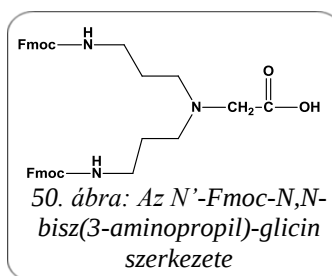
4.4. Az amiloid-β (1-16) dimer származéka

Az utóbbi évek biokémiai kutatásainak eredményei alapján az amiloid lerakódások kialakulásában a kulcslépést az amiloid-β peptid dimerizációja jelenti, majd az így képződő dimer szálak további akkumulációja révén jönnek létre az oligomer formák, továbbá az amiloid plakkok. A réz(II)- és/vagy cink(II)ionok szerepe ebben a folyamatban a két szál közötti intermolekuláris kötés kialakítása lehet a horgonycsoportok részvételével, így az Aβ(1-16) fragmens különböző dimer formáinak fémkoordinációját is vizsgálták.²⁰⁶ Néhány irodalmi eredmény azokban az esetekben is alátámasztotta a kölcsönhatást, amelyekben a peptid apoláris (17-43) szakasza is jelen volt a molekulában.¹⁸ Ez a szakasz hidrofób kölcsönhatások kialakulása révén elősegítheti a dimerképződést, valamint a fémionok híd szerepe is fontos lehet a ligandumok között. Mindezek fényében a réz(II)- és cink(II)ionok intermolekuláris kölcsönhatásának tanulmányozására állítottuk elő az *amiloid dimer* származékot.

Az amiloid dimer szintézise

Az (Aβ(1-16))₂C₈H₁₇O₄N-PEG ligandum szintézisét a 3.2. fejezetben leírtakhoz hasonlóan végeztük el, az előállítani kívánt származékot a fejezet 7. ábrájának IV.A molekulaszervezete mutatja. Első lépésként az Fmoc-PEG₁₁-COOH kapcsolását végezte a készülék, miután a gyantáról eltávolította az Fmoc védőcsoportot. Az újabb védőcsoport-hasítást követően csatoltuk

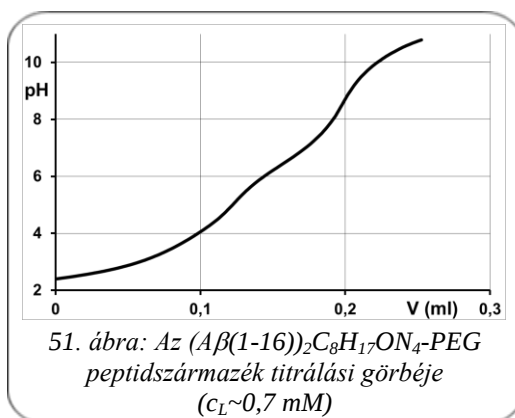
az aminosorozatjain védett *N,N*-bisz(3-aminopropil)-glicint (50. ábra), amivel olyan szerkezethez jutottunk, melyben két, aminosav kapcsolására alkalmas aminosav csoport található. A szintézis léptékének kétszerezése révén ezáltal lehetővé vált az Fmoc-védőcsoportok eltávolítását követően a kettős DAEFRHDSGYEVHHQK peptidlánc párhuzamos felépítése azonos szekvenciával.



Az amiloid dimer sav-bázis tulajdonságai

A tisztítást követően nyert peptidszármazék kis mennyisége és ismeretlen peptidtartalma nehézséget jelentett az oldategyensúlyi vizsgálatok során. Az A β (1-16) fémmegekötő szakasz két aszpartát-, két glutamát-, három imidazolil-, egy tirozinát-, egy lizil- és egy terminális aminocsoportot tartalmaz.

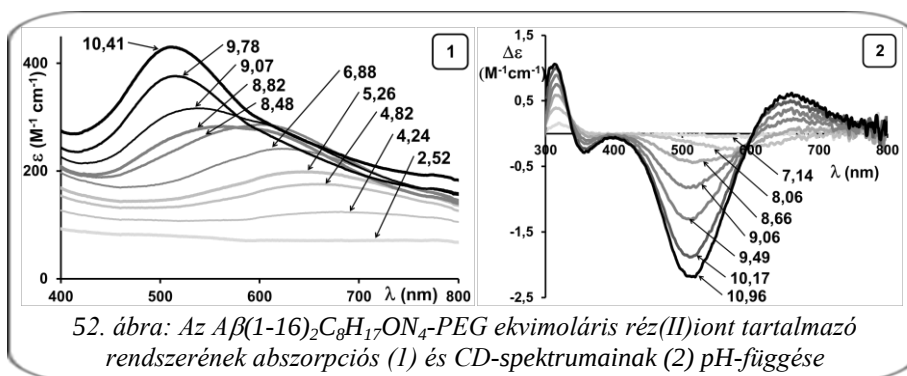
A két peptidszálat összekötő glicinszármazék tercier aminonitrogénjével együtt a származék 21 pK értékkel rendelkezik. A deprotonálódó csoportok a vizsgálat pH-tartományán belül disszociálnának, azonban a számos azonos funkciós csoport egyidejű jelenléte miatt ezek a lépések nem különülnek el egymástól. A pH~2,5 vagy kisebb, ill. a pH~11,0 vagy nagyobb pH-értéken



lejátszódó folyamatokat azonban ilyen koncentrációban nem tudtuk megfelelő pontossággal leírni. A becsült mintabeli koncentráció azonban közel állt a tényleges, potenciometriás titrálás eredménye alapján kapott 0,7 mM körüli értékhez. (51. ábra) A meghatározás közel 10%-os pontatlansága miatt az oldategyensúlyi vizsgálatoktól eltekintettünk és spektroszkópiai módszerek segítségével terveztünk információt szerezni a komplexképződési folyamatokról.

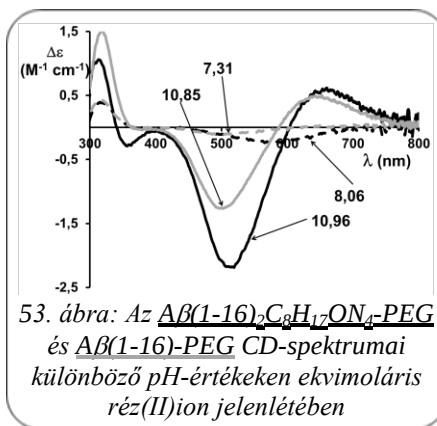
Az amiloid dimer Cu(II)-, és vegyes Cu(II)-Zn(II)-komplexei

A kis mennyiségű ligandum csupán az ekvimoláris réz(II)iont tartalmazó rendszer potenciometriás vizsgálatát tette lehetővé, ami alapján az amidnitrogén-deprotonálódásra extra légfogyás utalt. Ez a folyamat a monomer A β (1-16)-PEG származékkal összevetve nagyobb pH-értéken következett be, melynek igazolásához spektroszkópiai módszereket alkalmaztunk. Az aminocsoport és a hisztidin oldalláncok koordinációjára jellemző abszorpciós sáv $\lambda_{\max} = 650$ nm-nél pH = 4,8 körül már egyértelműen jelentkezik. (52./1 ábra) Az amidkoordináció hiányát ezen a pH értéken a mérhető CD-aktivitás hiánya is alátámasztja. 8-as pH értékig a maximális elnyelés hullámhossza kékeltolódást mutat 615 nm-ig növekvő számú N_{im} koordinációja miatt, majd a pH további emelése egy újabb abszorpciós sáv megjelenését eredményezi. Lúgos közegben 510 nm körül maximális az elnyelés, ami a növekvő számú amidnitrogén-koordinációra jellemző.



52. ábra: Az $A\beta(1-16)_2C_8H_{17}ON_4$ -PEG ekvimoláris réz(II)iont tartalmazó rendszerének abszorpció (1) és CD-spektrumainak (2) pH-függése

A CD-spektrumok 7,1-es pH-n még nem, csak pH = 7,6 felett mutatnak CD-aktivitást, ami az $A\beta(1-9)$ fragmens $[CuH_1L]^{2-}$ komplexének spektrumával jó egyezést mutat. A kötémód tehát az $(NH_2, \beta-COO^-, N^-)$ donoratommokkal írható le az Asp1 és Ala2 részvételével, hurokszerű imidazolnitrogén-koordinációval kiegészülve, ami összhangban van az irodalomban a vér fiziológiás pH-ján leírt szerkezettel.¹¹⁹ 8,4-es pH felett a CD-spektrumokon megjelennek a $(3N^-, N_{Im})$ koordinációra jellemző sávok is. (52/2. ábra) A két összekapcsolt peptidlánc dimerként való viselkedését a monomer $A\beta(1-16)$ -PEG formával történő összehasonlítással támaszthatjuk alá. CD-aktivitás ezzel a ligandummal már 7,3-as pH-n jelentkezik, mégpedig a $(3N^-, N_{Im})$ koordinációra jellemző hullámhossznál. A dimer forma esetén ettől eltérően nagyobb pH értékig megmarad az amino terminuson koordinált réz(II)ionra jellemző CD-spektrum, tehát stabilitása növekszik. Ennek magyarázatául szolgálhat, hogy a dimer formával az $(NH_2, \beta-COO^-, N^-, N_{Im}, N_{Im}(ax))$ kötémód alakul ki, amelyben az axiális imidazolnitrogén származhat a másik peptidlánc egyik hisztidinjéből, így kialakítva az intermolekuláris stabilizáló kölcsönhatást.



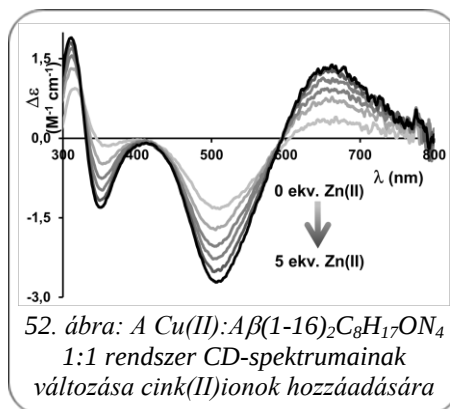
53. ábra: Az $A\beta(1-16)_2C_8H_{17}ON_4$ -PEG és $A\beta(1-16)$ -PEG CD-spektrumai különböző pH-értékeken ekvimoláris réz(II)ion jelenlétében

Ezt a CD sávot azonban a monomer formánál nem tapasztalták. (53. ábra) A Cu(II)-ionok hozzáadását az ekvimoláris rendszerhez 9,4-es pH értéken végeztük, mivel ezen az értéken már jól mérhető CD-aktivitást tapasztaltunk. A Cu(II)-ionok feleslegében mért CD-spektrumok nem változnak, csupán intenzitásuk nő, tehát az imidazolnitrogénről induló amidkoordináció egyre

nagyobb mértékben valósul meg. A mintában nyolc ekvivalens réz(II)ion hozzáadását követően jelent meg látható mennyiségű csapadék, ami megfelel a dimer peptidszármazékban megtalálható nyolc kötőhelynek. (Egy peptidláncban egy aminos csoport és három hisztidin oldallánc található horgonydonorként.)

Az Cu(II) : *amiloid dimer* ekvimoláris rendszerhez cink(II)ionokat adagolva vizsgáltuk a koordinációs módok változását szintén 9,4-es pH-n. Cink(II)ionok hozzáadásával a (3N⁻,N_{Im}) koordinációra jellemző CD-sávok intenzitásának párhuzamos növekedését tapasztaltuk. (54. ábra) A réz(II)ionok tehát egyre növekvő mennyiségben vannak jelen ilyen kötőmóddal, ami arra utalhat, hogy ezen a pH értéken koordinációs izomerek vannak jelen a törzsrendszerben. Az említett koordinációs szféra mellett jelen lehet a már az A β (8-16)HH ligandummal kimutatott, a két lánc szomszédos hisztidinjeinek 4N_{Im}-je által kötött fémion is. Cink(II)ionok a már ismertetett módon a His13 és His14 környezetét preferálják, így az *amiloid dimer* származék is ezen kötőhelyeken keresztül koordinálhatja a fémiont. A Cu(II)ionok tehát a (3N⁻,N_{Im}) kötőmóddal komplexbe rendeződnek át, míg a Zn(II)ionok elfoglalhatják a 4N_{Im}-koordinációs lehetőséget.

Az *amiloid dimer* származék komplexképződési folyamatai réz(II)ionokkal tehát nem különböznek lényegesen a monomer formáétól. Savas és lúgos pH-n hasonló koordinációs módok alakulnak ki. Közbenső pH értéken azonban megjelenik a Cu(II)-ion híd szerepe a CD-spektrumok alapján, ami igazolja a dimer szerkezetet, azaz élettani szempontból valóban jelentős lehet ez a kölcsönhatás.



5. Összefoglalás

Doktori értekezésemben az amiloid- β peptid fragmenseinek és származékainak fémmegkötő sajátságait tanulmányoztam réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionokkal. A számos horgonycsoporttal rendelkező peptid szerepét az Alzheimer-kórban egyértelműen bizonyították, melynek kifejlődése során a réz(II)- cink(II)- és vas(II/III)ionok koncentrációjának megnövekedését is leírták egyes agyi régiókban. A munkát ezek fényében két fő részre osztottuk: az amiloid- β peptidben is megtalálható hisztidin aminosavat tartalmazó modell ligandumok tanulmányozására és a peptid fémmegkötő (1-16) szakasza természetes fragmenseinek vizsgálatára.

A hisztidintartalmú kötőhelyek fémionaffinitásának összehasonlítását egy molekulán belül a $\text{H}_2\text{N-AAHAAAHG-OH}$ és $\text{H}_2\text{N-AHAAAHG-OH}$ peptidek segítségével végeztünk. Az *oktapeptidben* az N-terminuson az albuminszerű koordinációra van lehetőség, mely mind a réz(II)-, mind a nikkel(II)ionok számára elsődleges a C-terminális hisztidin részvételével létrejövő ($3\text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötésmóddal szemben. Az említett két fémionnal dinukleáris komplexek is kialakulnak, melyben mindkét hisztidin részt vesz, jelezve ezzel az *oktapeptid* kiemelkedő affinitását réz(II)- és nikkel(II)ionokhoz. Cink(II)ionokkal ezzel ellentétben csak az oldalláncok és a láncvégi funkciós csoportok szerepét tudtuk leírni, már ekvivalens mennyiségű fémion jelenlétében is hidroxidcsapadék vált le. Ezzel ellentétben az utóbbi, *heptapeptiddel* amidkoordinált Zn(II)-komplexek jelentek meg az N-terminális kötőhely részvételével. Ehhez az ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) kötésmódhoz hozzájárul a C-terminális hisztidin is imidazolnitrogénjével telítve a koordinációs szféra ekvatoriális síkját. A makrokelátszerű kötéssel létrejövő részecskét réz(II)- és nikkel(II)ionokkal is kimutattuk, valamint azok megnövekedett stabilitását tapasztaltuk. Összehasonlítva az ATCUN motívum jól ismert nagy Cu(II)- és Ni(II)-ionkötő képességével, attól nagyobb fémionaffinitást írtunk le az ($\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}, \text{N}_{\text{Im}}$) kötésmód esetén. A kétmagvú komplexek megjelenése ennek következtében nagyobb pH-értékre tolódott el, hiszen a mononukleáris részecskében mindhárom horgonycsoport fémionhoz kötött.

A vizsgálatok második fázisát az amiloid- β fragmensek és származékaik képezték, amit további három területre oszthatunk: az N-terminális szakasz, a szomszédos hisztidinek környezete és a dimer származék tanulmányozására.

Az A β (1-9) természetes fragmens vizsgálata során feltérképeztük a képződő komplexekben szereplő donoratomokat, a keletkező izomer részecskék szerkezetét, azok arányát. A terminális aminocsoport mellett a His6 is horgonycsoportként szerepelhet, így az amidkoordináció többféleképpen is végbemehet: (NH₂,3N⁻), (3N⁻,N_{Im}) és (N_{Im},3N⁻) kötésmódok jöhetnek létre. Az utolsóként említett, C-terminális irányú koordinációs módnak csak réz(II)ionok esetén és csak nagy pH értéken van jelentősége, így biológiai szempontból nem releváns. A 4N koordinált fémkomplexek jellemzésére a H₂N-DAAAAAHAA-NH₂ (DA₅HA₂) ligandumot használtuk. Dinukleáris részecskék csak réz(II)ionokkal képződnek, melyben a koordinációs szférák telítése az amidnitrogének szükségesnél kisebb száma miatt nem következik be. A kialakuló izomer részecskék aránya nagy pH-n (NH₂,3N⁻;2N⁻,N_{Im}): (NH₂,2N⁻;3N⁻,N_{Im}) = 3:1, míg az oldalláncokat nem tartalmazó H₂N-DAAAAHAAA-NH₂ (DA₄HA₃) származék esetén 9:1. Nikkel(II)ionokkal az aminoterminus koordinációjának egyértelmű preferenciáját írhattuk le, míg cink(II)ionok számára ez a fragmens és származékai sem kínáltak kedvező lehetőségeket. Az oldalláncok jelenléte azonban ez utóbbi esetben is növelte a képződő komplexek stabilitását, ami abban nyilvánult meg, hogy a cink(II)hidroxid-csapadék nagyobb pH értéken jelent meg. Cu(II)- és Ni(II)-ionok esetén már jelentősebb stabilitásnövekedést eredményezett az oldalláncok jelenléte, nagyobb mértékben a réz(II)ionok komplexeinél, melyet a nikkel(II)ionokhoz képest torzultabb szerkezet lehetőségének, így a kiegészítő axiális koordináció megvalósulásának tudhatunk be.

A His13 és His14 aminosavakat tartalmazó (8-16) származékban (A β (8-16)HH) az Y10A pontmutáción túl a V12G cserét is megvalósítottuk, ezáltal CD-spektrumaik alapján megkülönböztethettük az egyes hisztidinektől kiinduló amidkoordinációval létrejövő komplexeket. Az ehhez szükséges további H13A és H14A mutánsokat (A β (8-16)AH és A β (8-16)HA) használtuk modell ligandumként az izomer részecskék jelenlétének bizonyítására és arányuk meghatározására. A mindkét hisztidint tartalmazó származék réz(II)komplexei közel 1:1 arányban képződnek a 13-as és a 14-es hisztidinről induló amidkoordinációval, míg nikkel(II)ionok esetén közel 100%-ban a His14 volt az elsődleges horgonycsoport nagy pH értéken. Kétmagvú réz(II)komplexek is képződtek (3N⁻,N_{Im}) és (N_{Im},3N⁻) kötésmóddal, melyben a második Cu(II)-ion amidkoordinációjához az első ekvivalens fémionnak a His13 környezetébe való átrendeződésre van szükség. Nikkel(II)ionokkal csak egymagvú komplexeket tudtunk leírni, mind az egy, mind a két hisztidint tartalmazó származékra. Míg egyetlen hisztidin a szekvenciában nem óvta meg a cink(II)ionokat a

hidrolízistől, a mindkét hisztidint tartalmazó peptiddel – a korábbi megfigyelésekhez hasonlóan – dinukleáris részecskék is képződtek. Az utóbbi években megfigyelt, az amiloid- β peptid dimerizációs folyamatainak jelentőségét támasztja alá, hogy cink(II)- és réz(II)ionokkal is leírtunk biszligandumú komplexeket a szomszédos hisztidinek részvételével, $4N_{Im}$ koordinációval.

Az *amiloid dimer* származék előállítására és tanulmányozására éppen ezen eredmények okán került sor. A két $A\beta(1-16)$ szál C-terminusán összekapcsolt és pegilált származékának spektroszkópai vizsgálata során pH szempontjából késleltetett amidnitrogén-deprotonálódást figyeltünk meg a monomer származékhoz képest ekvivalens mennyiségű réz(II)ion jelenlétében. A képződő komplexféleségben tehát mindkét peptidlánc szerepet játszhat, ami ismételten utalhat a kór kifejlődése során bekövetkező dimerképződésre. A csapadék megjelenése alapján a származék nyolc ekvivalens réz(II)ion megkötésére képes, ami megfelel a ligandumban megtalálható nyolc horgonycsoportnak. Ekvivalens mennyiségű $A\beta(1-16)$ -dimert és réz(II)iont tartalmazó rendszerhez cink(II)ionokat adagolva a Cu(II)-ionok átrendeződésére utaló változásokat tapasztaltunk a $4N_{Im}$ -kötött komplexből az amidnitrogén-koordinált kötési módokba. A Zn(II) így a szomszédos hisztidinek által koordinált módon lesz jelen a rendszerben, azonban csak abban az esetben foglalhatja el ezt a kötőhelyet, amennyiben a Cu(II) számára rendelkezésre áll más koordinációs lehetőség is. Az $A\beta(8-16)$ származék esetén ugyanis ez az átrendeződés nem következik be.

Vizsgálataink eredményei alapján *a fémionok* Alzheimer-kórban betöltött szerepe azok *koncentrációjának növekedéséből adódó* aggregáció és amiloid plakk-képződés lehet. A fémion szerepe ebben az esetben az amiloid szálak összekapcsolása, melyek ezáltal kellő közelségbe kerülnek a hidrofób C-terminális szakaszok közötti másodlagos kölcsönhatások kialakításához és a képződő szerkezet rögzítéséhez. A réz(II)-, cink(II)- és vas(II/III)ionok szerkezetalkító hatása szintén okozhat megnövekedett hajlamot az aggregációra. Nem zárható ki azonban *a betegség kifejlődése során* bekövetkező réz(II)-, cink(II)-, illetve vas(II/III)koncentráció-növekedés, melynek során az oligomer apo-formák képződése nagyobb affinitást eredményez a fémionok felé, így magával vonja azok megnövekedett koncentrációját. Ennek alátámasztására azonban további, főként biokémiai tanulmányok szükségesek, melyek a ligandum oligomerizációjának vizsgálatát tűzik ki célul fémionok távollétében.

6. Summary

The aim of my work during the years of PhD was the study of the copper(II), nickel(II) and zinc(II) binding ability of the amyloid- β peptide. The role of this peptide containing several anchoring sites such as histidine and terminal amino group in Alzheimer's disease is unambiguously proved by many research groups and publications. The aggregation and plaque formation is attached with the increased concentration of copper(II), zinc(II) and iron(II/III) in certain brain regions. These findings led to two main chapters of work: study of histidine containing model ligands and the fragments and derivatives of the native A β (1-16) peptide sequence.

As a comparison of binding modes including histidine in the same ligand the peptides H₂N-AAHAAAHG-OH and H₂N-AHAAAHG-OH were used. The N-terminus of the *octapeptide* represents the albumin-like binding site preferred by copper(II) and nickel(II) ions instead of the (3N⁻,N_{Im}) coordination mode including the C-terminal histidine. These two metal ions form dinuclear complexes, too, in which both histidine residues are involved showing high affinity towards copper(II) and nickel(II) ions. On the contrary only the side chains and the terminal functional groups play a role in zinc(II) binding resulting in the hydroxide precipitation in the presence of equimolar amount of the metal ion. On the other hand in the case of the *heptapeptide* amide-coordinated species are present with the involvement of the N-terminus of the ligand. The imidazole nitrogen of the C-terminal histidine contributes to the (NH₂,N⁻,N_{Im}) binding mode in the equatorial plane of the coordination sphere resulting in a 4N complex. This macrochelate containing species can be detected with copper(II) and nickel(II) ions, too, having an increased stability even compared with the well known ATCUN motif which has one of the highest Cu(II) and Ni(II) ion binding ability. The (NH₂,N⁻,N_{Im},N_{Im}) coordination mode results in the shift of the appearance of dinuclear complexes to higher pH values, because all the three anchoring groups are bond to the same metal ion in the mononuclear complex formed at lower pH.

The second part of the work involves the fragments and derivatives of amyloid- β and can be detailed into three more sections: the study of the N-terminal fragment, the environment of the adjacent histidines and the dimer peptide derivative.

As a result of the study on the native N-terminal fragment A β (1-9) the donor atoms playing role in the complex formation processes, the isomer species and their ratio was determined. Beside the terminal amino group the imidazole nitrogen of His6 is an anchoring group, too, giving the possibility for the amide

coordination in two directions with the donor sets ($3N^-, N_{Im}$) and ($N_{Im}, 3N^-$). The presence of the latter, C-terminal coordination mode is significant only at high pH and exclusively for copper(II) ions therefore lacks of biological relevance. The 4N coordinated isomer metal complexes can be characterized by using the $H_2N-DAAAAAHAA-NH_2$ (DA_5HA_2) ligand. Formation of dinuclear complexes can be detected only with Cu(II) ions in an unsaturated coordination sphere because only five amide nitrogens can be involved in metal binding. The ratio of the isomer complexes at high pH is ($NH_2, 3N^-$; $2N^-, N_{Im}$): ($NH_2, 2N^-$; $3N^-, N_{Im}$) = 3:1, while it is 9:1 for the $H_2N-DAAAAHAAA-NH_2$ (DA_4HA_3) derivative without polar side chains. Nickel(II) ions prefers the amino terminus of the peptide, the hydrolysis of zinc(II) ions, however, can be observed in equimolar samples. Although the presence of polar side chains enhances the stability of the formed complexes it results in the appearance of hydroxide precipitate at slightly higher pH values for the native fragment. In the case of Cu(II) and Ni(II) ions remarkable increase of stability can be observed with the involvement of side chain functions especially for copper(II). This difference can be explained with the more distorted coordination geometry of this metal ion leading to the additional axial binding of aspartyl and/or glutamyl side chains.

The A β (8-16) derivative containing the His13 and His14 amino acid residues and the Y10A and V12G point mutations (A β (8-16)HH) can be used to determine the structure of complexes formed with each imidazole nitrogens on the base of their CD-spectra. The H13A and H14A mutated model peptides (A β (8-16)AH and A β (8-16)HA) were synthesized to identify and determine the ratio of the formed isomer species. Copper(II) complexes of the peptide containing both histidines have the binding modes started from the His13 and His14 in approximately equal amount, while in the case of nickel(II) ions the latter imidazole group is preferred at high pH. Dinuclear copper(II) complexes were also formed with ($3N^-, N_{Im}$) and ($N_{Im}, 3N^-$) coordination modes attached with the rearrangement of the metal ions to the His13 from His14 in the dinuclear species. All A β (8-16) derivatives are able to bind only one nickel(II) ion and the presence of the one-histidine peptides can not avoid the hydrolysis of zinc(II) ions. The A β (8-16)HH peptide forms, however, dinuclear species with this metal ion, too, in agreement with the earlier results on A β (8-16)Y10A. Confirming former publications on the importance of dimerization of the amyloid- β peptide the four imidazole coordinated bisligand zinc(II) and copper(II) complex can be described involving the adjacent histidines.

These findings gave reason to synthesize and study the *amyloid dimer* derivative. According to the spectroscopic study of the ligand containing two A β (1-16) fragments connected at the C-terminus and pegylated the deprotonation of amide nitrogens is shifted to higher pH compared to the monomer derivative in the presence of equivalent amount of copper(II) ion. This observation indicates that both peptide chains can play a role in the formation of these complexes confirming again the dimerization during the development of Alzheimer's disease. Precipitation appeared after adding eight equivalent of copper(II) ion equally to the anchoring groups in the ligand. Adding zinc(II) ions to the Cu(II) - amyloid dimer equimolar system the change of CD-spectra refers to the rearrangement of copper(II) ions from the four imidazole binding mode to the amide coordinated species. Zinc(II) ions are able to occupy the former coordination mode with the involvement of the adjacent histidines in this case although the realignment of copper(II) takes place only in the presence of other possible binding sites eg. the N-terminal binding site of the ligand. Accordingly, redistribution of copper(II) ions in the presence of zinc(II) can not be observed in the case of the A β (8-16)HH derivative.

According to our results the high level of metal ions in AD patients' brains can **induce** the aggregation and plaque formation of amyloid. However, the increase of the concentration of copper(II), zinc(II) and iron(II/III) ions **during the development** of amyloidosis can not be ruled out. The exact role of metal ions can be confirmed by other, mainly biochemical and biological studies focusing on the oligomerization processes of the ligand in the absence of the mentioned transition-metal ions.

7. Irodalomjegyzék

1. L. Davies; B. Wolska; C. Hilbich; G. Multhaup; R. Martins; G. Simms; K. Beyreuther; C.L. Masters "A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques." *Neurology*, 38, 1688-1693 (1988)
2. R.R. Crichton; R.J. Ward "Metal-based Neurodegeneration" *John Wiley & Sons Ltd.*, Chichester, England, (2006)
3. J.-Y. Lee; T.B. Cole; R.D. Palmiter; S.W. Suh; J.Y. Koh "Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 7705-7710 (2002)
4. G. Perry; A. Nunomura; K. Hirai; X. Zhu; M. Perez; J. Avila; R.J. Castellani; C.S. Atwood; G. Aliev; L.M. Sayre; A. Takeda; M.A. Smith "Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases?" *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 1475-1479 (2002)
5. X. Zhu; A.K. Raina; H.-G. Lee; G. Casadesus; M.A. Smith; G. Perry "Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease" *Brain Research*, 1000, 32-39 (2004)
6. C.D. Syme; J.H. Viles "Solution ^1H NMR investigation of Zn^{2+} and Cd^{2+} binding to amyloid-beta peptide ($\text{A}\beta$) of Alzheimer's disease." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, 246-256 (2006)
7. M. Sinha; P. Bhowmick; A. Banerjee; S. Chakrabarti "Antioxidant role of amyloid β protein in cell-free and biological systems: implication for the pathogenesis of Alzheimer disease" *Free Radical Biology and Medicine*, 56, 184-192 (2013)
8. A.D. Watt; V.L. Villemagne; K.J. Barnham "Metals, membranes, and amyloid- β oligomers: key pieces in the Alzheimer's disease puzzle?" *Journal of Alzheimer's Disease*, 33, S283-S293 (2013)
9. R.T. Bartus; R.L. Dean 3rd; B. Beer; A.S. Lippa "The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction." *Science*, 217, 408-414 (1982)
10. I. Grundke-Iqbal; K. Iqbal; Y.C. Tung; M. Quinlan; H.M. Wisniewski; L.I. Binder "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (τ) in Alzheimer cytoskeletal pathology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 4913-4917 (1986)
11. A. Travaglia; A. Pietropaolo; D. La Mendola; V.G. Nicoletti; E. Rizzarelli "The inorganic perspectives of neurotrophins and Alzheimer's disease" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111, 130-137 (2012)
12. M.E. Lame; E.E. Chambers; M. Blatnik "Quantitation of amyloid beta peptides $\text{A}\beta(1-38)$, $\text{A}\beta(1-40)$, and $\text{A}\beta(1-42)$ in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Analytical Biochemistry*, 419, 133-139 (2011)
13. J.A. Hardy; G.A. Higgins "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." *Science*, 256, 184-185 (1992)
14. C.A. McLean; R.A. Cherny; F.W. Fraser; S.J. Fuller; M.J. Smith; K. Beyreuther; A.I. Bush; C.L. Masters "Soluble pool of $\text{A}\beta$ amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease" *Annals of Neurology*, 46, 860-866 (1999)

15. C. Hureau "Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2164-2174 (2012)
16. J.T. Rogers; J.D. Randall; C.M. Cahill; P.S. Eder; X. Huang; H. Gunshin; L. Leiter; J. McPhee; S.S. Sarang; T. Utsuki; N.H. Greig; D.K. Lahiri; R.E. Tanzi; A.I. Bush; T. Giordano; S.R. Gullans "An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript" *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 45518-45528 (2002)
17. V. Wilquet; B. De Strooper "Amyloid- β precursor protein processing in neurodegeneration" *Current Opinion in Neurobiology*, 14, 582-588 (2004)
18. F. Hane; G. Tran; S.J. Attwood; Z. Leonenko "Cu²⁺ affects amyloid- β (1-42) aggregation by increasing peptide-peptide binding forces" *PloS ONE*, 8(3), e59005 (2013)
19. L.R. Pan; J.C. Patterson "Molecular dynamics study of ZnA β and ZnA β ₂" *PloS ONE*, 8(9), e70681 (2013)
20. Y. Noda; M. Asada; M. Kubota; M. Maesako; K. Watanabe; M. Uemura; T. Kihara; S. Shimohama; R. Takahashi; A. Kinoshita; K. Uemura "Copper enhances APP dimerization and promotes A β production." *Neuroscience Letters*, 547, 10-15 (2013)
21. 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)
22. O.S. Makin; L.C. Serpell "Structures for amyloid fibrils" *The FEBS Journal*, 272, 5950-5961 (2005)
23. J.D. Harper "Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins." *Annual Review of Biochemistry*, 66, 385-407 (1997)
24. B.A. Yankner; T. Lu "Amyloid β -protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer's disease" *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 4755-4759 (2009)
25. S. Chassaing; F. Collin; P. Dorlet; J. Gout; C. Hureau; P. Faller "Copper and heme-mediated A β toxicity: redox chemistry, A β oxidations and anti-ROS compounds" *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12, 2573-2595 (2012)
26. C. Behl; J.B. Davis; R. Lesley; D. Schubert "Hydrogen peroxide mediates amyloid-beta protein toxicity." *Cell*, 77, 817-827 (1994)
27. H. Atamna; W.H. Frey II "A role for heme in Alzheimer's disease: Heme binds amyloid- β and has altered metabolism" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 11153-11158 (2004)
28. Y.L. Zhou; J. Wang; L.T. Liu; R.R. Wang; X.H. Lai; M.T. Xu "Interaction between amyloid- β peptide and heme probed by electrochemistry and atomic force microscopy" *American Chemical Society, Chemical Neuroscience*, 4, 535-539 (2013)
29. D. Pramanik; C. Ghosh; S. Mukherjee; S.G. Dey "Interaction of amyloid β peptides with redox active heme cofactor: relevance to Alzheimer's disease" *Coordination Chemistry Reviews*, 257, 81-92 (2013)
30. S.B. Prusiner "Shattuck lecture – neurodegenerative diseases and prions" *The New England Journal of Medicine*, 344, 1516-1526 (2001)
31. D.R. Brown; H. Kozlowski "Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases" *Dalton Transactions*, 13, 1907-1917 (2004)

32. C.J. Sarell; S.R. Wilkinson; J.H. Viles "Substoichiometric levels of Cu²⁺ ions accelerate the kinetics of fiber formation and promote cell toxicity of amyloid- β from Alzheimer-disease." *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 41533-41540 (2010)
33. B. Liu; A. Moloney; S. Meehan; K. Morris; S.E. Thomas; L.C. Serpell; R. Hider; S.J. Marciniak; D.A. Lomas; D.C. Crowther "Iron promotes the toxicity of the amyloid- β peptide by impeding its ordered aggregation." *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 4248-4256 (2011)
34. N.D. Younan; M. Klewpatinond; P. Davies; A.V. Ruban; D.R. Brown; J.H. Viles "Copper(II)-Induced Secondary Structure Changes and Reduced Folding Stability of the Prion Protein" *Journal of Molecular Biology*, 410, 369-382 (2011)
35. S. Leal; H.M. Botelho; C.M. Gomes "Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2253-2270 (2012)
36. R.D. Terry; C. Pena "Experimental production of neurofibrillary degeneration. 2. Electron microscopy, phosphatase histochemistry and electron probe analysis." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 24, 200-210 (1965)
37. D.P. Perl; A.R. Brody "Alzheimer's disease: X-ray spectrometric evidence of aluminum accumulation in neurofibrillary tangle-bearing neurons." *Science*, 208, 297-299 (1980)
38. G.A. Trapp; G.D. Miner; R.L. Zimmerman; A.R. Mastri; L.L. Heston "Aluminium levels in brain in Alzheimer's disease." *Biological Psychiatry*, 13, 709-718 (1978)
39. D.R. Crapper; S.S. Krishnan; A.J. Dalton "Brain aluminium distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration." *Science*, 180, 511-513 (1973)
40. C.N. Martyn; D.J. Barker; C. Osmond; E.C. Harris; J.A. Edwardson; R.F. Lacey "Geographical relation between Alzheimer's disease and aluminium in drinking water." *Lancet*, 1, 59-62 (1989)
41. S. Brenner "Aluminium may mediate Alzheimer's disease through liver toxicity, with aberrant hepatic synthesis of ceruloplasmin and ATPase7B, the resultant excess free copper causing brain oxidation, β -amyloid aggregation and Alzheimer's disease" *Medical Hypotheses*, 80, 326-327 (2013)
42. S. Bolognin; P. Zatta; E. Lorenzetto; M.T. Valenti; M. Buffelli " β -amyloid-aluminium complex alters cytoskeletal stability and increases ROS production in cortical neurons" *Neurochemistry International*, 62, 566-574 (2013)
43. T. Jiang; X.L. Zhi; Y.-H. Zhang; L.-F. Pan; P. Zhou "Inhibitory effect of curcumin on the Al(III)-induced A β (42) aggregation and neurotoxicity in vitro" *Biochimica et biophysica acta – molecular basis of disease*, 1822, 1207-1215 (2012)
44. 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)
45. A.I. Bush "The metal theory of Alzheimer's disease" *Alzheimer's disease: advances for a new century*, 3, 277-281 (2013)
46. 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)

47. S. Ayton; P. Lei; A.I. Bush "Metallostasis in Alzheimer's disease" *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 76-89 (2013)
48. M.A. Deibel; W.D. Ehmann; W.R. Markesbery "Copper, iron and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress." *Journal of Neuroscience Methods*, 143, 137-142 (1996)
49. M.A. Lovell; J.D. Robertson; W.J. Teesdale; J.L. Campbell; W.R. Markesbery "Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques." *Journal of the Neurological Sciences*, 158, 47-52 (1998)
50. F. Attanasio; P. De Bona; S. Cataldo; M.F.M. Sciacca; D. Milardi; B. Pignataro; G. Pappalardo "Copper(II) and zinc(II) dependent effects on A β ₄₂ aggregation: a CD, Th-T and SFM study" *New Journal of Chemistry*, 37, (2013)
51. D.K. Kim; J.W. Song; J.D. Park; B.S. Choi "Copper induces the accumulation of amyloid- β in the brain" *Molecular & Cellular Toxicology*, 9, 57-66 (2013)
52. I. Singh; A.P. Sagare; M. Coma; D. Perlmutter; R. Gelein; R.D. Bell; R.J. Deane; E. Zhong; M. Parisi; J. Ciszewski; R.T. Kasper; R. Deane "Low levels of copper disrupt brain amyloid- β homeostasis by altering its production and clearance" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 14771-14776 (2013)
53. C.S. Atwood; X.D. Huang; A. Khatir; R.C. Scarpa; Y.S. Kim; R.D. Moir; R.E. Tanzi; A.E. Roher; A.I. Bush "Copper catalyzed oxidation of Alzheimer A β " *Cellular and Molecular Biology*, 46, 777-783 (2000)
54. C.S. Atwood; G. Perry; H. Zeng; Y. Kato; W.D. Jones; K.-Q. Ling; X. Huang; R.D. Moir; D. Wang; L.M. Sayre; M.A. Smith; S.G. Chen; A.I. Bush "Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid- β " *Biochemistry*, 43, 560-568 (2004)
55. D.P. Smith; D.G. Smith; C.C. Curtain; J.F. Boas; J.R. Pilbrow; G.D. Cicciotosto; T.-L. Lau; D.J. Tew; K.A. Perez; J.D. Wade; A.I. Bush; S.C. Drew; F. Separovic; C.L. Masters; R. Cappai; K.J. Barnham "Copper-mediated amyloid- β toxicity is associated with an intermolecular histidine bridge." *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 15145-15154 (2006)
56. L. Jin; W.H. Wu; Q.Y. Li; Y.F. Zhao; Y.M. Li "Copper inducing A β ₄₂ rather than A β ₄₀ nanoscale oligomer formation is the key process for A β neurotoxicity." *Nanoscale*, 3, 4746-4751 (2011)
57. X. Huang; C.S. Atwood; M.A. Hartshorn; G. Multhaup; L.E. Goldstein; R.C. Scarpa; M.P. Cuajungco; D.N. Gray; J. Lim; R.D. Moir; R.E. Tanzi; A.I. Bush "The A β peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction." *Biochemistry*, 38, 7609-7616 (1999)
58. L. Spoorri; K.J. Barnham; G. Multhaup; R. Cappai "Role of the amyloid precursor protein and copper in Alzheimer's disease" *Brain Diseases and Metalloproteins*, 169-220 (2013)
59. K. Vogt; J. Mellor; G. Tong; R. Nicoll "The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses." *Neuron*, 26, 187-196 (2000)
60. M. Schrag; A. Dickson; A. Jiffry; D. Kirsch; H.V. Vinters; W. Kirsch "The effect of formalin fixation on the levels of brain transition metals in archived samples." *Biometals*, 23, 1123-1127 (2010)
61. G. Danscher; K.B. Jensen; C.J. Frederickson; K. Kemp; A. Andreasen; S. Juhl; M. Stoltenberg; R. Ravid "Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer's diseased brains: a proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of

- cryostat sections from autopsy material." *Journal of Neuroscience Methods*, 76, 53-59 (1997)
62. A.E. Panayi; N.M. Spyrou; B.S. Iversen; M.A. White; P. Part "Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry." *Journal of Neuroscience Methods*, 195, 1-10 (2002)
63. A.I. Bush; W.H. Pettingell; G. Multhaup; M. de Paradis; J.P. Vonsattel; J.F. Gusella; K. Beyreuther; C.L. Masters; R.E. Tanzi "Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc." *Science*, 265, 1464-1467 (1994)
64. M.P. Cuajungco; L.E. Goldstein; A. Nunomura; M.A. Smith; J.T. Lim; C.S. Atwood; X. Huang; Y.W. Farrag; G. Perry; A.I. Bush "Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of A β by zinc" *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 19439-19442 (2000)
65. L. Goodman "Alzheimer's disease; a clinicopathologic analysis of 23 cases with a theory on pathogenesis." *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 118, 97-130 (1953)
66. S.M. LeVine "Iron deposits in multiple sclerosis and Alzheimer's disease brains." *Brain Research*, 760, 298-303 (1998)
67. J.R. Connor; S.L. Menzies St; S.M. Martin; E.J. Mufson "A histochemical study of iron, transferrin and ferritin in Alzheimer's diseased brains." *Journal of Neuroscience Research*, 31, 75-83 (1992)
68. D.A. Loeffler; J.R. Connor; P.L. Juneau; B.S. Snyder; L. Kanaley; A.J. DeMaggio; H. Nguyen; C.M. Brickman; P.A. LeWitt "Transferrin and iron in normal, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease brain regions." *Journal of Neurochemistry*, 65, 710-724 (1995)
69. W. Zheng; N. Xin; Z.-H. Chi; B.-L. Zhao; J. Zhang; J.-Y. Li; Z.-Y. Wang "Divalent metal transporter 1 is involved in amyloid precursor protein processing and A β generation." *The FASEB Journal*, 23, 4207-4217 (2009)
70. J.R. Connor; P. Tucker; M. Johnson; B. Snyder "Ceruloplasmin levels in the human superior temporal gyrus in aging and Alzheimer's disease." *Neuroscience Letters*, 159, 88-90 (1993)
71. G. Torsdottir; J. Kristinsson; J. Snaedal; S. Sveinbjornsdottir; G. Gudmundsson; S. Hreidarsson; T. Johannesson "Case-control studies on ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD1) in neurodegenerative diseases: a short review." *Journal of the Neurological Sciences*, 299, 51-54 (2010)
72. J.A. Duce; A. Tsatsanis; M.A. Carter; S.A. James; E. Robb; K. Wikke; S.L. Leong; K.A. Perez; T.J. Johanssen; M.A. Greenough; H.-H. Cho; D. Galatis; R.D. Moir; C.L. Masters; C. McLean; R.E. Tanzi; R. Cappai; K.J. Barnham; G.D. Ciccotosto; J.T. Rogers; A.I. Bush "Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease." *Cell*, 142, 857-867 (2010)
73. D. Schubert; M. Chevion "The role of iron in beta amyloid toxicity." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216, 702-707 (1995)
74. A.I. Bush "The metallobiology of Alzheimer's disease" *Trends in Neurosciences*, 26, 207-214 (2003)
75. Y. Yoshiike; K. Tanemura; O. Murayama; T. Akagi; M. Murayama; S. Sato; X. Sun; N. Tanaka; A. Takashima "New insights on how metals disrupt amyloid beta-aggregation and their effects on amyloid-beta cytotoxicity." *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 32293-32299 (2001)

76. C. Ha; J. Ryu; C.B. Park "Metal ions differentially influence the aggregation and deposition of Alzheimer's beta-amyloid on a solid template." *Biochemistry*, 46, 6118-6125 (2007)
77. V. Tougu; A. Karafin; K. Zovo; R.S. Chung; C. Howells; A.K. West; P. Palumaa "Zn(II)- and Cu(II)-induced non-fibrillar aggregates of amyloid-beta (1-42) peptide are transformed to amyloid fibrils, both spontaneously and under the influence of metal chelators." *Journal of Neurochemistry*, 110, 1784-1795 (2009)
78. M. Innocenti; E. Salviati; M. Guidotti; A. Casini; S. Bellandi; M.L. Foresti; C. Gabbiani; A. Pozzi; P. Zatta; L. Messori "Trace copper(II) or zinc(II) ions drastically modify the aggregation behavior of amyloid-beta1-42: an AFM study." *Journal of Alzheimer's Disease*, 19, 1323-1329 (2010)
79. Y. Bin; X. Li; Y. He; S. Chen; J. Xiang "Amyloid-peptide (1-42) aggregation induced by copper ions under acidic conditions" *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 45, 570-577 (2013)
80. M. Mold; L. Ouro-Gnao; B.M. Wieczkowski; C. Exley "Copper prevents amyloid- β (1-42) from forming amyloid fibrils under near-physiological conditions in vitro" *Scientific Reports*, 3, 1256 (2013)
81. J.T. Pedersen; J. Ostergaard; N. Rozlosnik; B. Gammelgaard; N.H. Heegard "Cu(II) mediates kinetically distinct, non-amyloidogenic aggregation of amyloid- β peptides" *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 26952-26963 (2011)
82. P. Faller; C. Hureau; O. Berthoumieu "Role of metal ions in the self-assembly of the Alzheimer's amyloid- β peptide" *Inorganic Chemistry*, 52, 12193-12206 (2013)
83. G. Grasso; M.L. Giuffrida; E. Rizzarelli "Metallostatics and amyloid β -degrading enzymes" *Metallomics*, 4, 937-949 (2012)
84. X.P. Lv; X.S. Tan "Metals homeostasis and related proteins in Alzheimer's disease" *Progress in Chemistry*, 25, 511-519 (2013)
85. C. Rodríguez-Rodríguez; M. Telpoukhovskaia; C. Orvig "The art of building multifunctional metal-binding agents from basic molecular scaffolds for the potential application in neurodegenerative diseases" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2308-2332 (2012)
86. T. Marino; M. Pavelka; M. Toscano; N. Russo "Structural and binding properties of metal ion chelators relevant to Alzheimer's disease. A theoretical investigation" *International Journal of Quantum Chemistry*, 112, 2109-2114 (2012)
87. S. Noel; F. Perez; J.T. Pedersen; B. Alies; S. Ladeira; S. Sayen; E. Guillon; E. Gras; C. Hureau "A new water-soluble Cu(II) chelator that retrieves Cu from Cu(amyloid- β) species, stops associated ROS production and prevents Cu(II)-induced A β aggregation" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 322-325 (2012)
88. A.L. Picciano; T.D. Vaden "Complexation between Cu(II) and curcumin in the presence of two different segments of amyloid β " *Biophysical Chemistry*, 184, 62-67 (2013)
89. W.M. Tay; G.F.Z. da Silva; L.J. Ming "Metal binding of flavonoids and their distinct inhibition mechanisms toward the oxidation activity of Cu²⁺- β -amyloid: not just serving as suicide antioxidants!" *Inorganic Chemistry*, 52, 679-690 (2013)
90. J. Geng; M. Li; L. Wu; J.S. Ren; X.G. Qu "Liberation of copper from amyloid plaques: making a risk factor useful for Alzheimer's disease treatment" *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 9146-9155 (2012)
91. J.L. Hickey; S. Lim; D.J. Hayne; B.M. Paterson; J.M. White; V.L. Villemagne; P. Roselt; D. Binns; C. Cullinane; C.M. Jeffery; R.I. Price; K.J. Barnham; P.S. Donnelly

- "Diagnostic imaging agents for Alzheimer's disease: copper radiopharmaceuticals that target Ab plaques" *Journal of the American Chemical Society*, 135, 16120-16132 (2013)
92. A. Lakatos; B. Gyurcsik; N.V. Nagy; Z. Csendes; E. Weber; L. Fülöp; T. Kiss "Histidine-rich branched peptides as Cu(II) and Zn(II) chelators with potential therapeutic application in Alzheimer's disease" *Dalton Transactions*, 41, 1713-1726 (2012)
93. D. Valensin; C. Gabbiani; L. Messori "Metal compounds as inhibitors of β -amyloid aggregation. Perspectives for an innovative metallotherapeutics on Alzheimer's disease" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2357-2366 (2012)
94. V.A. Streltsov; V.C. Epa; S.A. James; Q.I. Churches; J.M. Caine; V.B. Kenche; K.J. Barnham "Structural insights into the interaction of platinum-based inhibitors with the Alzheimer's disease amyloid- β peptide" *Chemical Communications*, 49, 11364-11366 (2013)
95. F. Collin; I. Sasaki; H. Eury; P. Faller; C. Hureau "Pt(II) compounds interplay with Cu(II) and Zn(II) coordination to the amyloid- β peptide has metal specific consequences on deleterious processes associated to Alzheimer's disease" *Chemical Communications*, 49, 2130-2132 (2013)
96. G.L. Ma; E.Q. Wang; H. Wei; K.J. Wei; P.P. Zhu; Y.Z. Liu "PtCl₂(phen) disrupts the metal ions binding to amyloid- β peptide" *Metallomics*, 5, 879-887 (2013)
97. N.N. Greenwood; A. Earnshaw "Az elemek kémiája" *Nemzeti Tankönyvkiadó*, Budapest, (1999)
98. W. Kaim; B. Schwederski "Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life" Wiley, Chichester, (1994)
99. K.D. Karlin; Z. Tyeklar "Bioinorganic Chemistry of Copper" *Chapman and Hall*, New York, (1993)
100. A.F. Kolodziej "Progress in Inorganic Chemistry" Wiley, 41, 493-597 (1994)
101. F.D. Ernst; A.H.M. van Vliet; M. Kist; J.G. Kusters; S. Bereswill "The role of nickel in environmental adaptation of the gastric pathogen helicobacter pylori" *Metal Ions in Life Sciences*, 2, 545-580 (2007)
102. A.S. Prasad "Biochemistry of Zinc" *Plenum Press*, New York, 303 (1993)
103. D. Bryce-Smith *Chemistry in Britain*, 25, 783-786 (1989)
104. N.P. Pavletich; C.O. Pabo "Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers" *Science*, 261, 1701-1707 (1993)
105. J.-Y. Lee; J.-H. Kim; S.H. Hong; J.Y. Lee; R.A. Cherny; A.I. Bush; R.D. Palmiter; J.-Y. Koh "Estrogen decreases zinc transporter 3 expression and synaptic vesicle zinc levels in mouse brain" *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 8602-8607 (2004)
106. 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)
107. I. Sóvágó "Coordination equilibria in biologically active systems" *Biocoordination chemistry*, K. Burger (Ed) Ellis Horwood, Chichester, Ch. 4, 135-184 (1990)
108. L.D. Pettit; J.E. Gregor; H. Kozłowski "Complex formation between metal ions and peptides" *Perspectives in bioinorganic chemistry*, R.W. Hay; J.R. Dilworth; K.B. Nolan (Eds) Jai Press Ltd., London, 1 (1991)
109. L.D. Pettit; R.L.A. "Metal-peptide complex formation" *Handbook of metal-ligand interaction in biological fluids*, G. Berthon (Ed) Marcel Dekker Inc., New York, Ch. 2, 1, 636-647 (1995)

110. H. Kozłowski; W. Bal; M. Dyba; T. Kowalik-Jankowska "Specific structure-stability relations in metallopeptides" *Coordination Chemistry Reviews*, 184, 319-346 (1999)
111. I. Sóvágó; K. Ősz "Metal ion selectivity of oligopeptides" *Dalton Transactions*, 3841-3854 (2006)
112. 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)
113. T. Kiss "Coordination equilibria in biologically active systems" *Biocoordination chemistry*, K. Burger (Ed) Ellis Horwood, Chichester, Ch. 3, 56-134 (1990)
114. S.H. Laurie "Bioinorganic chemistry" *Handbook of metal-ligand interactions in biological fluids*, G. Berthon (Ed) Marcel Dekker Inc., New York, Ch. 2, 1, 603-619 (1995)
115. 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)
116. 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)
117. G. Malandrinos; M. Louloudi; Y. Deligiannakis; N. Hadjiliadis "Complexation of Cu²⁺ by HETPP and the pentapeptide Asp-Asp-Asn-Lys-Ile: a structural model of the active site of thiamin-dependent enzymes in solution" *Inorganic Chemistry*, 40, 4588-4596 (2001)
118. B. Decock-Le Reverend; L. Andrianarijaona; C. Livera; L.D. Pettit; I. Steel; H. Kozłowski "A potentiometric and spectroscopic study of the interaction of the N terminal tetrapeptide fragment of fibrinopeptide A with Cu^{II} and Ni^{III}" *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, 10, 2221-2226 (1986)
119. B. Alies; C. Bijani; S. Sayen; E. Guillon; P. Faller; C. Hureau "Copper coordination to native N-terminally modified versus full-length amyloid- β : second-sphere effects determine the species present at physiological pH" *Inorganic Chemistry*, 51, 12988-13000 (2012)
120. C. Damante; K. Ősz; Z. Nagy; G. Pappalardo; G. Grasso; G. Impellizzeri; E. Rizzarelli; I. Sóvágó "The metal loading ability of β -amyloid N-terminus: a combined potentiometric and spectroscopic study of copper(II) complexes with β -amyloid(1-16), its short or mutated peptides fragments, and its polyethylene glycol (PEG)-ylated analogue" *Inorganic Chemistry*, 47, 9669-9683 (2008)
121. I. Sóvágó; E. Farkas; Cs. Bertalan; A. Lebkiri; T. Kowalik-Jankowska; H. Kozłowski "Copper(II) complexes of dipeptides containing aspartyl, glutamyl, and histidyl residues in the side chain" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 51, 715-726 (1993)
122. B. Decock-Le Reverend; F. Liman; C. Livera; L.D. Pettit; S. Pyburn; H. Kozłowski "A potentiometric and spectroscopic study of the interaction of angiotensin II and some of its peptide fragments with copper(II)" *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, 4, 887-894 (1988)
123. I. Sóvágó; T. Kiss; A. Gergely "Proton and copper(II) complexes of the pentapeptide thymopoietin(32-36)" *Inorganica Chimica Acta*, 93, L53-L55 (1984)

124. I. Sóvágó; B. Radomska; I. Schön; O. Nyéki "Copper(II) and nickel(II) complexes of diastereomeric segments of thymopoietin" *Polyhedron*, 9, 825-830 (1990)
125. I. Sóvágó; Cs. Bertalan; L. Göbl; O. Nyéki "Copper(II) complexes of low molecular weight derivatives of thymopoietin" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 55, 67-75 (1994)
126. J.-F. Galey; H. Kozłowski; L.D. Pettit "A potentiometric and spectroscopic study of the proton and copper(II) and zinc(II) complexes formed by fibrinopeptide A" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 44, 149-153 (1991)
127. L.D. Pettit; S. Pyburn; H. Kozłowski; B. Decock-Le Reverend; F. Liman "Coordination of nickel(II) ions by angiotensin II and its peptide fragments. A potentiometric, proton nuclear magnetic resonance and circular dichroism spectroscopic study" *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, 8, 1471-1475 (1989)
128. T. Kowalik-Jankowska; M. Jasionowski; L. Lankiewicz "Copper(II) complexation by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide fragments." *Journal of Inorganic Biochemistry*, 76, 63-70 (1999)
129. A. Gergely; E. Farkas "Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 6. Influence of side-chain donor group on the equilibrium and thermodynamics of binary and ternary copper(II)-dipeptide complexes" *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, 2, 381-386 (1982)
130. J.-F. Galey; B. Decock-Le Reverend; A. Lebkiri; L.D. Pettit; S. Pyburn; H. Kozłowski "Specific interactions of the β -carboxylate group of the aspartic acid residue in oligopeptides containing one, two or three such residues with copper(II) ions. A potentiometric and spectroscopic study" *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, 9, 2281-2287 (1991)
131. H. Kozłowski; A. Lebkiri; Ch.O. Onindo; L.D. Pettit; J.-F. Galey "The influence of aspartic or glutamic acid residues in tetrapeptides on the formation of complexes with nickel(II) and zinc(II)" *Polyhedron*, 14, 211-218 (1995)
132. T. Kowalik-Jankowska; H. Kozłowski; E. Farkas; I. Sóvágó "Nickel ion complexes of amino acids and peptides" *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)
133. P. Tsvieriotis; 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)
134. 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)
135. 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)
136. 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)
137. 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)

138. 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)
139. 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 American Chemical Society*, 107, 6435-6439 (1985)
140. N. Camerman; A. Camerman; B. Sarkar "Molecular design to mimic copper(II) transport site of human-albumin - crystal and molecular-structure of copper(II) - glycylglycyl-L-histidine-N-methyl amide monoaqua complex" *Canadian Journal of Chemistry - Revue Canadienne De Chimie*, 54, 1309-1316 (1976)
141. 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)
142. 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)
143. 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)
144. C. Conato; H. Kozlowski; 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)
145. 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)
146. 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)
147. 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)
148. 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)
149. E.K. Quagrainie; 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)
150. 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)
151. P. Mlynarz; D. Valensin; K. Kociolek; J. Zabrocki; J. Olejnik; H. Kozlowski "Impact of the peptide sequence on the coordination abilities of albumin-like tripeptides towards Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ ions. Potential albumin-like peptide chelators" *New Journal of Chemistry*, 26, 264-268 (2002)

152. P. Gizzi; B. Henry; P. Rubini; S. Giroux; E. Wenger "A multi-approach study of the interaction of the Cu(II) and Ni(II) ions with alanyl-glycylhistamine, a mimicking pseudopeptide of the serum albumine N-terminal residue" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 1182-1192 (2005)
153. R. Sankararamakrishnan; S. Verma; S. Kumar "ATCUN-like metal-binding motifs in proteins: Identification and characterization by crystal structure and sequence analysis" *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 58, (2005)
154. W. Bal; M.I. Djurnan; D.W. Margerum; E.T. Gray; M.A. Mazid; R.T. Tom; E. Nieboer; P.J. Sadler "Dioxygen-induced decarboxylation and hydroxylation of $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{glycyl-glycyl-L-histidine})]$ occurs via Ni^{III} - X-ray crystal-structure of $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{glycyl-glycyl-}\alpha\text{-hydroxy-D,L-histamine})]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ " *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications*, 1889-1890 (1994)
155. S.L. Best; T.K. Chattopadhyay; M.I. Djurnan; R.A. Palmer; P.J. Sadler; I. Sóvágó; K. Várnagy "Gold(III) and palladium(II) complexes of glycylglycyl-L-histidine: Crystal structures of $[\text{Au}^{\text{III}}(\text{Gly-Gly-L-His-H}_2)]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Pd}^{\text{II}}(\text{Gly-Gly-L-His-H}_2)]\cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ and His ϵNH deprotonation" *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, 2587-2596 (1997)
156. 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)
157. 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)
158. 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)
159. 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)
160. 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)
161. 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)
162. 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)
163. C. 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)
164. É. Józsa; K. Ósz; C. Kállay; P. De Bona; C. Damante; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; I. Sóvágó "Nickel(II) and mixed metal complexes of amyloid- β N-terminus" *Dalton Transactions*, 39, 7046-7053 (2010)

165. D. Valensin; F.M. Mancini; M. Luczkowski; A. Janicka; K. Wisniewska; E. Gaggelli; G. Valensin; L. Lankiewicz; H. Kozlowski "Identification of a novel high affinity copper binding site in the APP(145-155) fragment of amyloid precursor protein." *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, 16-22 (2004)
166. M. Luczkowski; K. Wisniewska; L. Lankiewicz; H. Kozlowski "Specific binding of Cu²⁺ ions by a pentapeptide fragment present in the cysteine-rich region of amyloid precursor protein" *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 11, 2266-2268 (2002)
167. D. Valensin; M. Luczkowski; F.M. Mancini; A. Legowska; E. Gaggelli; G. Valensin; K. Rolka; H. Kozlowski "The dimeric and tetrameric octarepeat fragments of prion protein behave differently to its monomeric unit" *Dalton Transactions*, 1284-1293 (2004)
168. P. Stanczak; M. Luczkowski; P. Juszczuk; Z. Grzonka; H. Kozlowski "Interactions of Cu²⁺ ions with chicken prion tandem repeats" *Dalton Transactions*, 2102-2107 (2004)
169. P. Stanczak; D. Valensin; P. Juszczuk; Z. Grzonka; C. Migliorini; E. Molteni; G. Valensin; E. Gaggelli; H. Kozlowski "Structure and stability of the Cu^{II} complexes with tandem repeats of the chicken prion" *Biochemistry*, 44, 12940-12954 (2005)
170. C.E. Livera; L.D. Pettit; M. Bataille; B. Perly; H. Kozlowski; 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)
171. 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)
172. 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)
173. 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)
174. 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)
175. 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)
176. 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)
177. G. Pappalardo; G. Impellizzeri; R.P. Bonomo; T. Campagna; G. Grasso; M.G. Saita "Copper(II) and nickel(II) binding modes in a histidine-containing model dodecapeptide" *New Journal of Chemistry*, 26, 593-600 (2002)
178. 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)
179. 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)
180. 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)
181. 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)
182. 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)
183. S. Timári; C. Kállay; K. Ősz; I. Sóvágó; K. Várnagy "Transition metal complexes of short multihistidine peptides" *Dalton Transactions*, 1962-1971 (2009)
184. G. Arena; D. La Mendola; G. Pappalardo; I. Sóvágó; E. Rizzarelli "Interactions of copper(II) with prion family peptide fragments. Considerations on affinity, speciation and coordination" *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 2202-2218 (2012)
185. O. Crescenzi; S. Tomaselli; R. Guerrini; S. Salvadori; A.M. D'Ursi; P.A. Temussi; D. Picone "Solution structure of the Alzheimer amyloid β -peptide (1-42) in an apolar microenvironment" *European Journal of Biochemistry*, 269, 5642-5648 (2002)
186. C. Damante; K. Ősz; Z. Nagy; G. Grasso; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; I. Sóvágó "Zn²⁺'s ability to alter the distribution of Cu²⁺ among the available binding sites of A β (1-16)-polyethylenglycol-ylated peptide: implications in Alzheimer's disease" *Inorganic Chemistry*, 50, 5342-5350 (2011)
187. B. Alies; I. Sasaki; O. Proux; S. Sayen; E. Guillon; P. Faller; C. Hureau "Zn impacts Cu coordination to amyloid- β , the Alzheimer's peptide, but not the ROS production and the associated cell toxicity" *Chemical Communications*, 49, 1214-1216 (2013)
188. K.J. Silva; S. Saxena "Zn(II) ions substantially perturb Cu(II) ion coordination in amyloid- β at physiological pH" *Journal of Physical Chemistry B*, 117, 9386-9394 (2013)
189. S. Noel; S. Bustos Rodriguez; S. Sayen; E. Guillon; P. Faller; C. Hureau "Use of a new water-soluble Zn sensor to determine Zn affinity for the amyloid- β peptide and relevant mutants" *Metallomics*, 6, 1220-1222 (2014)
190. C.D. Syme; R.C. Nadal; S.E.J. Rigby; J.H. Viles "Copper binding to the amyloid- β (A β) peptide associated with Alzheimer's disease: folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of A β (1-28): insights from a range of complementary spectroscopic techniques" *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 18169-18177 (2004)
191. C. Sacco; Skowronsky R.A.; S. Gade; J.M. Kenney; A.M. Spuches "Calorimetric investigation of copper(II) binding to A β peptides: thermodynamics of coordination plasticity" *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17, 531-541 (2012)

192. L. Zékány; I. Nagypál "PSEQUAD: A comprehensive program for the evaluation of potentiometric and/or spectrophotometric equilibrium data using analytical derivatives" *Computational methods for the determination of formation constants*, D. Legett (Ed) Plenum Press, New York, 291-353 (1985)
193. 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)
194. G. Eriksson "Algorithm for the computation of aqueous multicomponent, multiphase equilibria" *Analytica Chimica Acta - Computer Techniques and Optimization*, 3, 375-383 (1979)
195. 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)
196. E.L.J. Purlée "On the solvent isotope effect of deuterium in aqueous acid solutions" *Journal of American Chemical Society*, 81, 263-272 (1959)
197. K. Mikkelsen; S.O.J. Nielsen "Acidity measurements with the glass electrode in H₂O-D₂O mixtures" *Journal of Physical Chemistry*, 64, 632-637 (1960)
198. P.K. Glasoe; F.A. Long "Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide" *Journal of Physical Chemistry*, 64, 188-190 (1960)
199. I. Turi; C. Kállay; D. Szikszai; G. Pappalardo; G. Di Natale; P. De Bona; E. Rizzarelli; I. Sóvágó "Nickel(II) complexes of the multihistidine peptide fragments of human prion protein" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104, 885-891 (2010)
200. V. Józai; Z. Nagy; K. Ősz; D. Sanna; G. Di Natale; D. La Mendola; G. Pappalardo; E. Rizzarelli; I. Sóvágó "Transition metal complexes of terminally protected peptides containing histidyl residues" *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 1399-1409 (2006)
201. Kaluha Anikó „Peptidek vegyes fémkomplexeinek képződését befolyásoló tényezők vizsgálata” *Diplomamunka* (2011)
202. C. Kállay; K. Ősz; Dávid A.; Z. Valastyán; G. Malandrinos; N. Hadjiliadis; I. Sóvágó "Zinc(II) binding ability of tri-, tetra- and penta-peptides containing two or three histidyl residues" *Dalton Transactions*, 4040-4047 (2007)
203. M.J.A. Rainer; B.M. Rode "The complex formation of zinc(II) with GHL* and related peptides" *Inorganica Chimica Acta*, 93, 109-115 (1984)
204. N.M. Chiera; M. Rowinska-Zyrek; R. Wieczorek; R. Guerrini; D. Witkowska; M. Remelli; H. Kozłowski "Unexpected impact of the number of glutamine residues on metal complex stability" *Metallomics*, 5, 214-221 (2013)
205. G. Brookes; L.D. Pettit "Thermodynamics of complex formation between hydrogen, copper(II), and nickel(II) ions and dipeptides containing non-co-ordinating substituent groups" *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, 5, 2106-2112 (1975)
206. S.C. Drew; W.M. Kok; C.A. Hutton; K.J. Barnham "Cu²⁺ coordination of covalently cross-linked β -amyloid dimers" *Applied Magnetic Resonance*, 44, 927-939 (2013)

8. Függelék

Az értekezés alapját képező közlemények:

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

1. Ágnes Grenács, Anikó Kaluha, Csilla Kállay, Viktória Jósza, Daniele Sanna, Imre 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)*
IP: 3,274
2. Ágnes Grenács, Imre Sóvágó: *Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of the N-terminal nonapeptide fragment of amyloid- β and its derivatives. Journal of Inorganic Biochemistry, 139, 49-56 (2014)*
IP: 3,274

Tudományos folyóiratban még meg nem jelent közlemények:

1. Ágnes Grenács, Daniele Sanna, Imre Sóvágó: *Copper(II) and nickel(II) binding sites of peptides containing adjacent histidyl residues.* (közlésre benyújtva)
2. Ágnes Grenács, Imre Sóvágó, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, Enrico Rizzarelli: *Dimeric behaviour of an A β (1-16)₂ derivative in the presence of Cu(II) and Zn(II) ions.* (közlésre előkészítve)

Konferencia kötetben megjelent tanulmány:

1. I. Sóvágó, I. Turi, Á. Grenács: *Factors influencing the formation of mixed metal complexes of peptide fragments of prion protein and related ligands. 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 12-16 September 2012, Granada, Spain, MEDIMOND International Proceedings, p. 31-36.*

Az értekezés anyagából készült előadások:

1. Grenács Ágnes, Kaluha Anikó, Jószai Viktória, Kállay Csilla, Sóvágó Imre: *Hisztidin kötőhelyeket tartalmazó peptidek fémion-szelektivitásának vizsgálata*
46. Komplexkémiiai Kollokvium, Mátrafüred, 2012. május 21-23.
2. Grenács Ágnes, Sóvágó Imre, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo: *Az amyloid- β peptid N-terminális fragmensének – A β (1-9) – és dimer konjugátumának komplexképződési folyamatai*
47. Komplexkémiiai Kollokvium, Mátraháza, 2013. május 29-31.
3. Grenács Ágnes, Sóvágó Imre: *Az amyloid- β peptid N-terminális fragmensének és mutánsainak kölcsönhatása Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionokkal*
48. Komplexkémiiai Kollokvium, Siófok, 2014. május 28-30.
4. Imre Sóvágó, Ágnes Grenács: *Copper(II), nickel(II) and zinc(II) binding ability of the N-terminal fragment of amyloid- β peptide*
12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Zürich, Svájc; 2014. augusztus 24-28.

Az értekezés anyagából készült posztterek:

1. Grenács Ágnes, Kaluha Anikó, Jószai Viktória, Kállay Csilla, Sóvágó Imre: *Peptidek többmagvú és vegyes fémkomplexei képződését befolyásoló tényezők vizsgálata modellrendszerekben*
MKE 1. Nemzeti Konferencia, Sopron, 2011. május 22-25.
2. Ágnes Grenács, Csilla Kállay, Imre Sóvágó: *Mixed metal complexes of multihistidine peptides*
11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Granada, Spanyolország; 2012. szeptember 12-16.
3. Ágnes Grenács, Imre Sóvágó: *Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of A β (1-9) and its model peptides*
XII. International Symposium on Inorganic Biochemistry, Wrocław, Lengyelország; 2013. augusztus 28. - szeptember 1.
4. Ágnes Grenács, Imre Sóvágó: *Copper(II), nickel(II) and zinc(II) binding ability of the N-terminal fragments of amyloid- β peptide*
International Symposium on Metal Complexes 2014, Pavia, Olaszország; 2014. június 8-12.

Köszönetnyilvánítás

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

Őszinte hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek, *Dr. Sóvágó Imre* professor emeritusnak lelkiismeretes témavezetéséért, kivétel nélkül rendelkezésemre álló segítségéért, biztatásáért.

Köszönet illeti *Dr. Farkas Etelka* professzor emeritust, *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi docenst és *Dr. Buglyó Péter* egyetemi docenst, akikhez bátran fordulhattam kérdéseimmel.

Köszönettel tartozom a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* minden régi és jelenlegi tagjának, külön kiemelve *Dr. Kállay Csilla* tudományos főmunkatársat munkám kezdetén és annak során tanúsított figyelméért és sokrétű segítségéért, *Fáriné Dr. Turi Ildikót*, *Dr. Timári Saroltát*, *Lekkáné Dr. Szabó Orsolyát*, *Dr. Földi-Bíró Linda* egyetemi tanársegédet, *Lihi Norbert*, *Dávid Ágnes*, *Csire Gizella* és *Bihari Zsolt* PhD hallgatókat, valamint *Godó Attila* műszaki ügyintézőt, mert kérdéseimre választ adtak, és őszinte baráti légkört biztosítottak a munkám elvégzéséhez.

Köszönöm *Hüse Ilona* vegyészmérnöknek gyakorlati tanácsait, melyet a mérések kivitelezése során hasznosíthattam.

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

Köszönettel tartozom *Dr. Kurtán Tibornak* a cirkuláris dikroizmus mérésekben nyújtott segítségéért, *Dr. Giuseppe Pappalardónak* (Department of Chemical Sciences, University of Catania, Olaszország), 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. Köszönettel tartozom *Dr. Nagy Lajos* egyetemi adjunktusnak, *Nagy Tibor* és *Antal Borbála* PhD hallgatóknak a tömegspektrumok felvételéért.

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

A kutatások anyagi támogatásáért az OTKA-NKTH 77586, TAMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007, OTKA 72956, TAMOP-4.2.2.B-10/1-2010-0024 kutatási pályázatoknak és a TAMOP 4.2.4.B/2-11/1-2012-0001 Campus Hungary ösztöndíj pályázatnak tartozunk köszönettel. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg. A kutatáshoz a TAMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0043 (ENVIKUT) projekt is hozzájárult.