

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Grenács Ágnes Judit

Témavezető: Dr. Sóvágó Imre professzor emeritus



Debreceni Egyetem

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2015.

I. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Évtizedek óta ismert, hogy bizonyos fémionok koncentrációja megnő és amiloid plakkok jelennek meg az Alzheimer-kórban szenvedők bizonyos agyi régióiban. A kutatások központi kérdése, hogy a fémionok homeosztázisának zavara a betegség **kiváltó oka** avagy annak **kifejlődése során** következik be a felhalmozódásuk.

Ennek fényében az Alzheimer-kór kialakulásában szerepet játszó β -amiloid peptid réz(II)-, cink(II)- és vas(II/III)ionokkal való kölcsönhatásának vizsgálata elengedhetetlennek bizonyul. Ezen peptid kóros formájának megjelenése és aggregációja ugyanis a felsorolt fémionok koncentrációjának megemelkedésével jár együtt. A 40-43 tagú amiloid- β peptid szekvenciáját tekintve számos, fémion-megkötésre alkalmas, valamint azt segítő poláris aminosav-oldalláncot tartalmaz, mely alátámasztja a fémionok szerepét az amiloidózis kifejlődésében. Több kutatócsoport, köztük a *Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportja* is vizsgálta a peptid fémionkötő képességét. Ennek során fény derült arra, hogy az N-terminális láncvég felelős a fémion-koordinációért, míg a molekula további része apoláris csoportokat tartalmaz hidrofób jelleget kölcsönözve, mely sajáttság az aggregáció révén kerül előtérbe. Az oldategyensúlyi vizsgálatokat megnehezítette a rossz oldhatóság, melyet a peptid pegilálásával küszöböltek ki. A polietilén-glikolláncsal való összekapcsolás révén lehetővé vált az amiloid- β peptid fémkomplexeinek vizsgálata és annak meghatározása, milyen az egyes fémionok affinitása a rendelkezésre álló kötőhelyekhez. A vizsgálatok a Cu(II)- és Zn(II)-ionok mellett a Ni(II)-ionokra is kiterjedtek, mely szintén nagy stabilitású komplex kialakítására képes a peptiddel és a réz(II)ionok koordinációs viselkedésének modellezésére is alkalmas. Ennek eredményeként megállapították, hogy a peptid 1-16 szekvenciája vesz részt a fémionmegkötésben, mely szakaszban a terminális aminocsoport mellett a 6-os, 13-as és 14-es pozícióban lévő hisztidin szerepel horgonycsoportként. Az A β (1-16) esetén az *1. táblázatban* összegzett módon megy végbe az említett átmenetifém-ionok koordinációja.

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

	$-\text{NH}_2$ (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 kötőhelyek közötti megoszlását tehát korábban megadták, azonban a kialakuló részecskék kötésmódjának teljes leírására és a koordinációban részt vevő valamennyi donortom megadására még nem került sor.

A vizsgált peptidrészlet számos, lényegesen különböző vagy épp nagy hasonlóságot mutató kötőhellyel rendelkezik, melyek affinitása az egyes fémionok felé azonban nagyban különbözhet. Kutatásaink első szakaszát tehát az jelentette, hogy elkülönült kelátképző ligandumok segítségével modellezzünk hisztidin(ek)e)t és/vagy terminális aminocsoportot horgonydonorként tartalmazó koordinációs helyeket egy molekulán belül, így téve lehetővé azok összehasonlítását.

A vizsgálatok további részét az említett A β (1-16) szakasz fragmenseinek és/vagy azok modell-ligandumainak tanulmányozása jelentette. Ezen peptidek egyik csoportját az A β (1-9), a másikat az A β (8-16) peptidrészlet ill. származékaik képezték. A pontos koordinációs módok meghatározásának érdekében a natív peptid egyes kötőhelyeit elkülönülten vagy külön ligandumokban tartalmazó modellpeptideket állítottunk elő a kutatócsoportban.

Az utóbbi években látott napvilágot az a felfedezés, miszerint a kór lefolyásában fontos szerepe van az amiloid- β peptid dimerizációjának, ugyanis ez a lépés kritikus a további aggregáció és plakk-képződés szempontjából. A dimer viselkedést tanulmányozandó szintetizáltuk azt az ún. amiloid dimer származékot, mely két A β (1-16) fémmegkötő fragmenst tartalmaz a C-terminusán összekapcsolva, valamint pegilált az oldhatóság növelése érdekében.

Az említett ligandumok komplexképződési folyamatait réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionokkal vizsgáltuk pH-metriás, UV-látható, CD, ^1H NMR, ESR spektroszkópiás és ESI-MS technikákkal. Azon rendszerek esetében, amelyekben lehetőség volt erre, vegyes fémmolekulák kialakulását is tanulmányoztuk, hiszen biológiai körülmények között egyidejűleg több fémion is jelen lehet.

II. ALKALMAZOTT TECHNIKÁK

1. Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS):

A vizsgált peptideket a kutatócsoportban Liberty1, illetve a peptidszármazékot az olaszországi *Cataniai Egyetemen* Liberty mikrohullámú peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) automatizált módon állítottuk elő. A szilárd fázist Rink Amide AM, ill. Fmoc-Gly-Wang típusú gyanták jelentették, melyek aminocsoportot, ill. glicin aminosavat tartalmaznak a felületükön, így C-terminuson védett, ill. szabad peptid keletkezik a hasítást követően. Ezen peptidek szintézisét Fmoc/tBu technika alkalmazásával végeztük, az aminosavak karboxil- és aminocsoportjának aktiválását a TBTU/HOBt/DIEA stratégia szerint végeztük *N,N*-dimetilformamid (DMF) közegben. Az előállított ligandumok szerkezete az *1.a* és *1.b* ábrákon látható.

2. Nagynyomású folyadékkromatográfia (HPLC)

Az előállított peptidek tisztaságáról HPLC-kromatogramok felvételével bizonyosodtunk meg. A vizsgálatokhoz trifluorecetsav 0,1 %-os vizes (A), illetve acetonitriles (B) elegyét használtuk eluensként, a tisztaságellenőrzéshez 3% A és 97% B, ill. 2% A és 98% B eluens-összetételt és 0,8-1,0 ml/min áramlási sebességet alkalmaztunk. A mérések Vydac C18 fordított fázisú kolonnán (250 mm × 4,6 mm, pórusméret: 300 Å, szemcseméret: 5 µm) történtek, a detektálást Jasco MD-2010 plus detektorral, 222 nm-en végeztük.

3. pH-potenciometriás titrálás segítségével is ellenőriztük a peptidek tisztaságát és megállapítottuk a ligandumok protonálódási állandóit, valamint a réz(II)-, nikkel(II)-, cink(II)- és vegyes fémkomplexek stabilitási állandóit. A méréseket vizes oldatban végeztük különböző arányban ($0 \leq M:L < 2$) fémiont és ligandumot tartalmazó rendszerekben ($T = 25\text{ °C}$; $I = 0,20\text{ mol/dm}^3$ KCl). A ligandum-koncentráció 1×10^{-3} - $2 \times 10^{-3}\text{ mol/dm}^3$ koncentráció-tartományba esett. A ligandumok protonálódására és a fémkomplexek képződésére vonatkozó stabilitási szorzatokat a PSEQUAD és SUPERQUAD számítógépes programokkal számítottuk ki a kísérleti adatok segítségével. A meghatározott állandókat felhasználva a MEDUSA számítógépes programmal ábrázoltuk az egyes rendszerek részecske-eloszlási diagramjait.

4. Az UV-látható (UV-vis) spektrofotometriás méréseket a 250-800 nm hullámhossztartományban, szobahőmérsékleten kiviteleztek a réz(II)- és nikkell(II)ionokat tartalmazó rendszerekben. Az abszorpciós spektrumokat 3-12 pH-tartományban, a pH-potenciometriás titrálásokhoz alkalmazott fém-ligandum arányok mellett regisztráltuk Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras UV-látható spektrofotométer segítségével, melyhez 1,000 cm úthosszú kvarc küvettát használtunk.

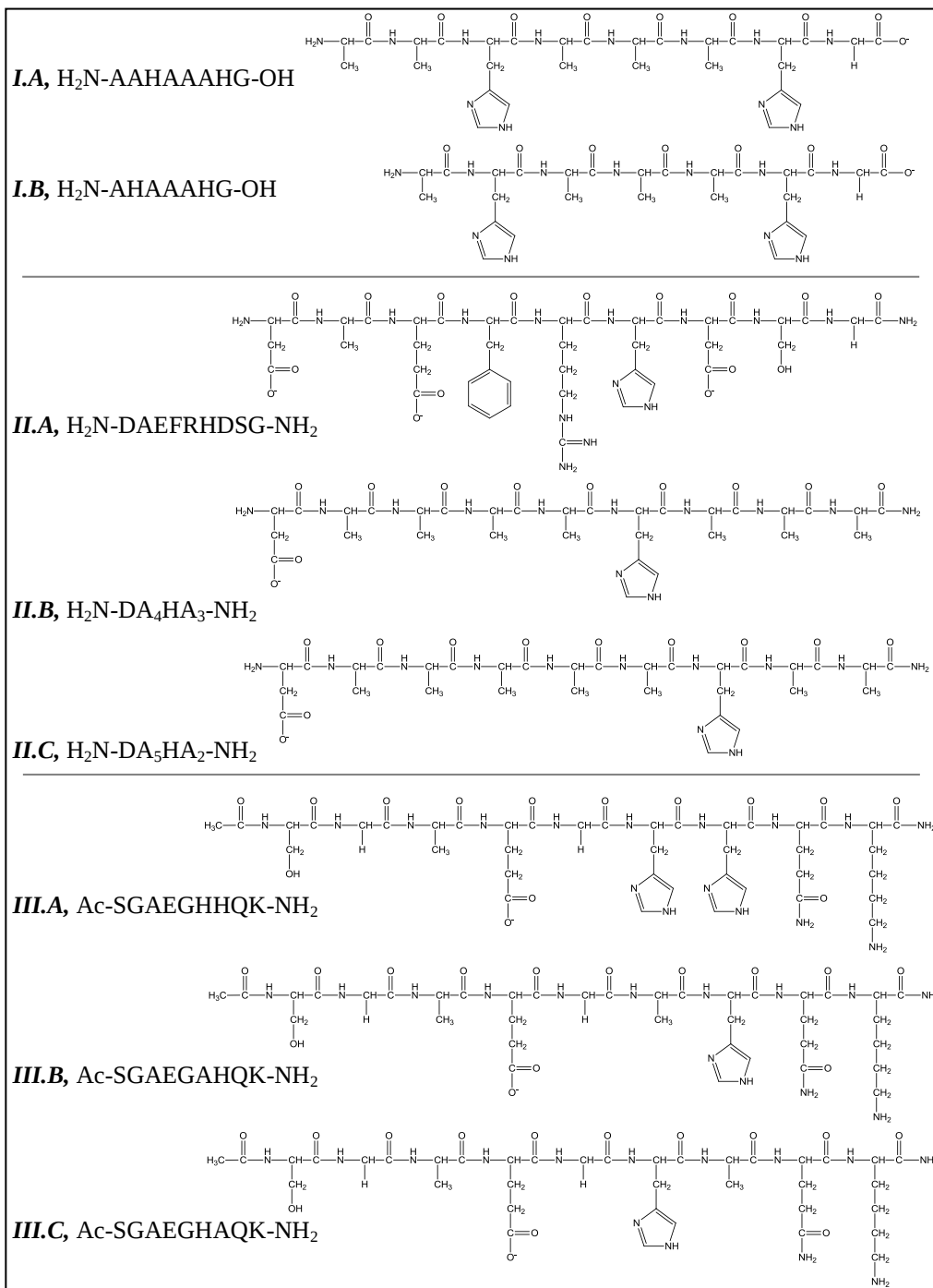
5. A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiás méréseket a *Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén* végeztük, JASCO-810 típusú spektropolariméteren. Ezen technika alkalmas olyan fémkomplexek szerkezetének felderítésére, melyek optikai aktivitást mutatnak. Munkánk során a Cu(II) és/vagy Ni(II) tartalmú fémkomplexek esetén volt lehetőség a részecskék szerkezetének CD-spektrum alapján történő leírására. A tanulmányozott rendszerek fém-ligandum aránya, hőmérséklete, pH-tartománya és a mérések hullámhossztartománya megegyezik a fotometriás vizsgálatoknál alkalmazottakkal, a küvetták úthossza 0,100 és 1,000 cm volt.

6. A ^1H NMR spektroszkópiás méréseket BRUKER AM 360 MHz FT-NMR ill. Bruker Avance DRX 400 MHz FT-NMR készüléken végeztük, a spektrumok kiértékeléshez az 1D WIN-NMR Bruker ill. a MestReNova szoftvert használtuk. A módszer információval szolgál a ligandumok tisztaságáról és néhány Zn(II)-, ill. síknégyzetes geometriájú Ni(II)-komplex koordinációs viszonyairól a szabad ligandum ^1H NMR spektrumával történő összevetés révén.

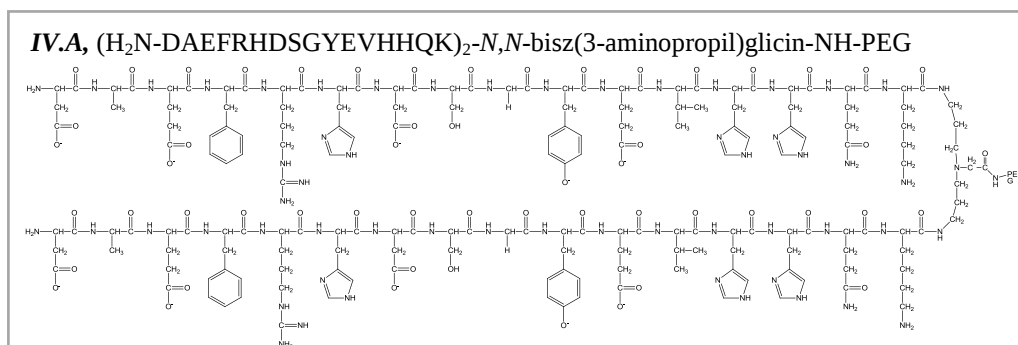
7. Tömegspektrometria (MS) segítségével azonosítottuk az előállított ligandumokat és néhány vegyes fémkomplexet. A vizsgálatokra a *Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén* ESI-TOF-MS technikával, micrOTOF-Q 9 ESI-TOF készüléken, $c_L = 1 \times 10^{-4}$ mol/dm³ koncentráció mellett került sor.

8. Az elektronspin-rezonancia spektroszkópiás (ESR) méréseket lefagyasztott mintákban ($T = 120$ K) az olaszországi *Sassari Egyetemen* végezték Bruker EMX spektrométerrel, ^{63}Cu izotóppal dúsított $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ és 10 % etilénlikol alkalmazásával.

III. A VIZSGÁLT LIGANDUMOK SZERKEZETE



1.a ábra: A Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban szintetizált oligopeptidek szerkezete



1.b ábra: Az előállított amiloid dimer peptidszármazék szerkezete

IV. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Doktori értekezésemben az amiloid- β peptid fragmenseinek, azok mutánsainak, illetve modellként alkalmazható származékainak kölcsönhatását vizsgáltuk réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionokkal. Az oligopeptidek deprotonálódási, valamint Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-komplexeinek képződési folyamatait pH-potenciometriás vizsgálatok segítségével írtuk le. A stabilitási szorzatok ismeretében ábrázoltuk a folyamatokat leíró részecske-eloszlási diagramokat. UV-látható fotometriás és CD-spektroszkópiás meghatározások alapján megadtuk az egyes komplexekre jellemző spektroszkópiai paramétereket. A kötőhelyeket modellező kis tagszámú ligandumok CD-spektrumait felhasználva lehetővé vált a kialakuló réz(II)- és nikkel(II)komplexek szerkezetének ill. azok izomerarányának meghatározása. A kétmagvú, ill. biszligandumú komplexek jelenlétét ESR, és/vagy MS mérések alapján is igazoltuk.

Különböző, terminális aminocsoportot és/vagy hisztidint tartalmazó kötőhelyek egy peptidben való vizsgálatát végeztük el egy *hepta*- és egy *oktapeptid* esetében, melyekkel vegyes fémkomplexek tanulmányozására is sor került. A dolgozat további részeit az amiloid- β peptid 1-9 természetes fragmense és két modell-liganduma, a 8-16 fragmensének három származéka és a teljes 1-16 természetes fragmens 32 aminosavszéletről álló ún. *amiloid dimer* formája jelentik. Ez utóbbi molekula vizsgálata csak a réz(II)- és cink(II)komplexeinek tanulmányozására terjedt ki.

1. Elkülönült kelátképző csoportokat tartalmazó ligandumok

Hasonló donoratomok részvételével megvalósuló, de különböző koordinációs lehetőségek fémion-affinitásának összehasonlítására alkalmasak azok a ligandumok, melyek egymástól elkülönülten elhelyezkedő horgonycsoportokat tartalmaznak molekulájukban. Erre hivatott az 1.a ábrán feltüntetett ligandumok I. csoportja, a $\text{H}_2\text{N-AAHAAAHG-OH}$ (*oktapeptid*) és $\text{H}_2\text{N-AHAAAHG-OH}$ (*heptapeptid*), melyeket modellpeptidekként alkalmaztunk.

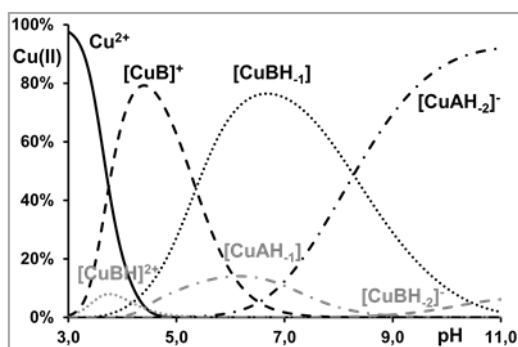
A vizsgált *oktapeptidben* az aminoterminuson létrejövő ($\text{H}_2\text{N}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinációs mód az ATCUN motívumnak megfelelő, jól ismert stabil réz(II)- és nikkel(II)komplexek kialakítására képes kötőhely. Mindkét modell-ligandumban megtalálható egy láncközi hisztidin, melynek imidazolnitrogénjéről kiindulva az N-terminális irányba valósulhat meg a fémion-koordináció ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) donoratomok részvételével. A *heptapeptidben* az amino terminuson ($\text{H}_2\text{N}, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) koordinált fémion szerepelhet telítetlen koordinációs szférával, ami kiegészülhet a His6 makrokelátszerű kötődésével.

a, $\text{H}_2\text{N-AAHAAAHG-OH}$ (*oktapeptid*)

- Cu(II)- és Ni(II)-ionok esetén is az N-terminális láncvég koordinációja bizonyult elsődlegesnek az MH_1L (MH_2LH) részecskében, de dinukleáris komplexek is kialakultak mindkét fémionnal.
- Zn(II)-ionokkal enyhén savas körülmények között a terminális aminocsoport és a hisztidinek részvételével makrokelát szerkezet alakul ki. Ezáltal az oligoglicinekhez képest nagyobb stabilitású komplexek jönnek létre, azonban 7-es pH körül hidrolízis következik be. Az amidnitrogének deprotonálódása nem megy végbe, a réz(II)- és nikkel(II)ionokéihoz képest kisebb stabilitás jellemző a komplexeire.
- Cu(II)/Ni(II) vegyes fémkomplex kialakulását MS-spektruma alapján is bizonyítottuk, CD-spektruma pedig arra utal, hogy az N-terminuson réz(II)-, a His7 környezetében nikkel(II)ion koordinációjával létrejövő izomer van jelen meghatározó mennyiségben.

b, $\text{H}_2\text{N-AHAAAHG-OH}$ (heptapeptid)

- Az *oktapeptid*től eltérően az aminotermínus preferenciája nem csak a réz(II)- és nikkel(II)-, hanem a cink(II)ionok esetében is megfigyelhető.
- Enyhén savas pH-n bekövetkezik a fémion-koordináció az N-terminális részen, melynek stabilitását a His6 imidazol-nitrogénjének ekvatoriális kötődése növeli az MH_1L komplexben.
- Nagy pH-n szerkezeti átalakulás következik be réz(II)- és nikkel(II) tartalmú rendszerekben: a His2 kiszorulhat a koordinációs szférából és további N^- koordinálódhat vagy a fémion átrendeződhet a His6-re.
- Kétmagvú részecske is kialakul a cink kivételével, azonban egyértelműen nagyobb pH-értéken, mint az *oktapeptid* esetén melyet az előbb említett makrokelát szerkezet kiemelkedő stabilitása magyaráz.
- Vegyes fémkomplex alakul ki a Cu(II)/Ni(II) rendszerben, a Ni(II)/Zn(II) tartalmú rendszerben a nikkel(II)ionok cink(II) jelenlétében eltérően viselkedtek a törzsrendszerhez képest.
- Az egyes fémionok két modellpeptid által reprezentált háromféle kötéshely közötti megoszlása érdekes képet mutatott. Az *oktapeptid* amino terminusának albuminszerű szekvenciájával létrejövő réz(II)- és nikkel(II)komplexek kiemelkedő stabilitása kisebbnek bizonyult, mint a *heptapeptid*ben kialakuló, makrokelát révén stabilizált fémkomplexé, melyben $(\text{H}_2\text{N}, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}, \text{N}_{\text{Im}})$ koordináció jön létre. A stabilitásbeli különbséget jól mutatja a CuH_1L (CuH_2LH) ill. a CuL (CuH_1LH) összetételű, az amino terminuson kialakuló komplex megjelenésének pH értéke közötti eltérés az *okta*-, ill.



2. ábra: Komplexeloszlási diagram $\text{Cu(II):AAHAAAHG(A):AHAAAHG(B)}$ ekvimoláris rendszerben

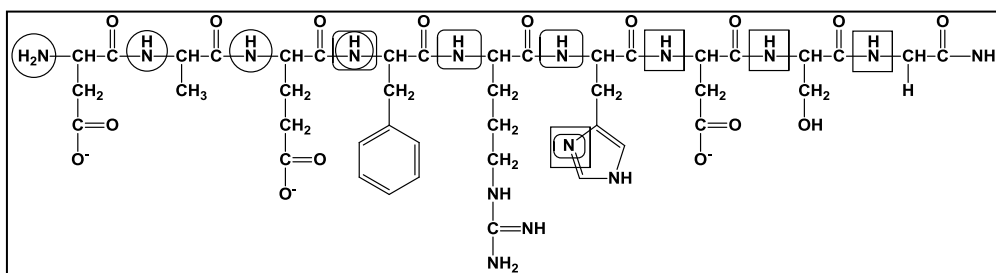
a *heptapeptid*re. A két ligandumot és a réz(II)iont tartalmazó terner rendszerben ezen túlmenően megfigyelhető a *heptapeptid*

által koordinált fémionok megnövekedett aránya az irodalomban leírt, kimondottan Cu(II)- és Ni(II)-ionok számára kedvező albuminszerű koordinációhoz képest (2. ábra).

- Zn(II)-ionok esetén a preferencia még kifejezettebb az ($\text{H}_2\text{N}, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}, \text{N}_{\text{Im}}$) koordináció iránt, melyet a vegyes fémkomplexek kialakulása is alátámaszt. Cink(II)ionok jelenlétében a réz(II)- vagy nikkel(II)ionokat tartalmazó rendszerekben megváltozik a fémionok megoszlása az egyes kötőhelyek között, a réz(II)- és nikkel(II)ionok nagyobb mértékben foglalják el a His6 környezetét a *heptapeptidben*, mint biner rendszerben.

2. Amiloid- β (1-9) fragmens és modellvegyületei

A természetes amiloid- β peptidben a terminális aminocsoport ($\text{H}_2\text{N}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-$) és a His6 ($\text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}_{\text{Im}}$) környezete jelent két koordinációs lehetőséget, melyet korábban az A β (1-6) fragmens vizsgálatával írtak le. Az A β_{40-42} peptidben a fémion-koordináció azonban kiterjedhet az N-terminális láncvég első kilenc aminosavára ($\text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{N}^-$), valamint koordinációs izomerek jöhetnek létre, melyek arányát az A β (1-9) fragmens tanulmányozása révén terveztük megadni. (3. ábra) A fémion-megkötésben részt vevő donoratomok pontos leírásához azonban szükség volt a két modellvegyület, a $\text{H}_2\text{N-DAAAAHAAA-NH}_2$ (DA_4HA_3) és a $\text{H}_2\text{N-DAAAAAHAA-NH}_2$ (DA_5HA_2) peptidek vizsgálatára is.



3. ábra: Az egyes lehetséges koordinációs módokban részt vevő donoratomok az A β (1-9) természetes fragmensben

a, $\text{H}_2\text{N-DAAAAHAAA-NH}_2$ (DA_4HA_3)

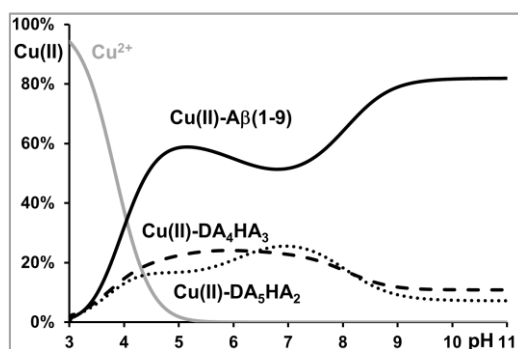
- Az első modellpeptidben az oldalláncok hatását küszöböltük ki az aminosav egységek alaninra történő cseréjével az Asp1 (az Ala2) és a His6 kivételével. A komplexeloszlási kép a mért

pH-tartományban lényegében nem változott az A β (1-9) természetes fragmenséhez képest, azonban kisebb stabilitással képződtek a hasonló szerkezetű részecskék.

- Az elsődleges kötőhely szintén az aminotermínus volt, immáron a réz(II)ionok számára is nagyobb mértékben (~90%). Az oldalláncok hiánya tehát kedvezőtlen a His6 környezetében történő fémionmegkötés szempontjából.
- A Zn(II)-ionokkal csak gyenge kölcsönhatás alakult ki az oldalláncok részvételével, pH > 8 esetén a fémion hidrolízise és csapadék leválása következett be.
- Kétmagvú komplexek csak nagy pH-n, a fémhidroxid csapadékból való visszaoldódását követően alakultak ki réz(II)ionokkal. A C-terminus irányába történő amidnitrogén-koordináció (N_{Im}, N⁻, N⁻, N⁻) csak erősen lúgos közegben következik be.

b, H₂N-DAAAAAHAA-NH₂ (DA₅HA₂)

- A feltüntetett szekvenciában a hisztidin a 6-osról a 7-es pozícióba került, melynek oka a kellő számú amid-nitrogén biztosítása a fémionok koordinációs szféráinak telítésére. A különbséget tehát az jelenti, hogy a dinukleáris réz(II)-komplexben mind az (H₂N, N⁻, N⁻, N⁻) mind az (N⁻, N⁻, N⁻, N_{Im}) koordináció egyidejű kialakulására is van lehetőség. A második modell-ligandum fémmegkötő sajátságait tekintve nagy hasonlóságot mutat az előbb említett peptidével: a hisztidin áthelyezése a C-terminális felé lényegében nem változtatott a komplexképzési sajátságokon, tehát az amiloid- β (1-9) fragmenshez hasonló koordináció valósul meg a két származékban is.



4. ábra: Cu(II)ionok megoszlása az A β (1-9) fragmens és származékai között
Cu(II):A β (1-9):DA₄HA₃:DA₅HA₂=
1:10:10:10

- A természetes fragmens szekvenciája kifejezetten alkalmas réz(II)ionok megkötésére, amit a DA_4HA_3 és DA_5HA_2 származékokkal való összehasonlítás is mutat. (4. ábra)

c, H_2N -DAEFRHDSG- NH_2 ($A\beta(1-9)$)

- Mindhárom fémion képes mononukleáris komplex kialakítására (NH_2, COO^-, N_{Im}) makrokelát képződésével, melyet a további aszpartil és glutamil oldalláncok stabilizálhatnak.
- Amidnitrogén-deprotonálódás és -koordináció csak a Cu(II)- és Ni(II)-ionok esetén megy végbe.
- Az amino terminus preferenciája mindkét fémion komplexeiben megfigyelhető, a Cu(II)-ionokhoz képest (~75%) a Ni(II)-ionok esetén nagyobb mértékben (~100%).
- Kétmagvú részecske kizárólag réz(II)ionokkal képződött, melyben a 4N koordináció nagyobb arányban alakult ki az N-terminuson megkötött fémion környezetében.

3. Amiloid- β (8-16) fragmens származékai

A természetes szekvencia 13-as és 14-es hisztidinjének fémmegkötő sajátosságait tanulmányoztuk a már korábban vizsgált $A\beta(8-16)Tyr10Ala$ származék további, $Val12Gly$ pontmutációjával nyert peptiden keresztül. A glicin részlet a komplexszerkezet-meghatározáshoz járul hozzá oly módon, hogy a CD-spektrumon eltérő változást okoz optikai aktivitásának hiánya révén. Így megkülönböztethetővé válik a His13-ról ill. a His14-ről kiinduló koordináció. A kétféle kötésmód jellemzőinek megismeréséhez azonban további két mutánsra, az említett két változtatáson túl a His13Ala, valamint a His14Ala cserékre volt szükség.

a, Ac -SGAEGAHQK- NH_2 ($A\beta(8-16)AH$)

- Az egy hisztidint tartalmazó, His13Ala származék egy-egy réz(II)- vagy nikkel(II)iont képes megkötni (N^-, N^-, N^-, N_{Im}) donoratomok részvételével.
- Cink(II)ionokkal nem képes stabilis komplex kialakítására, a fémion $pH > 6$ értéken hidrolizál.

b, Ac-SGAEGHAQK-NH₂ (A β (8-16)HA)

- Szintén egymagvú részecskék alakulnak ki a His14Ala mutációval kapott peptiddel, az A β (8-16)AH származékhoz hasonló koordinációs móddal.
- A szekvencia nem akadályozza meg a Zn(II)-ionok hidrolízisét, csapadék jelenik meg pH > 6 értéken. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a cink(II)ionok stabilis koordinációjához elengedhetetlen két hisztidin jelenléte.
- A két egyhisztidines származék komplexképzési tulajdonságai között eltérést jelent a CuH₁L (CuH₂LH) összetételű részecske kitüntetett stabilitása az A β (8-16)HA mutánsal. Ennek magyarázata lehet a Glu(COO⁻) ekvatoriális kötődésének stabilitásnövelő hatása, mely a harmadik amidnitrogén koordinációját nagyobb pH-értékre tolja el.

c, Ac-SGAEGHHQK-NH₂ (A β (8-16)HH)

- A nonapeptidben háromféle kötésmódra van lehetőség: a His13-től vagy a His14-től az aminotermius felé (N⁻,N⁻,N⁻,N_{Im}) vagy a His14-től C-terminus irányába (N_{Im},N⁻,N⁻,N⁻) koordinációval.
- Mononukleáris réz(II)komplexben az izomerek aránya körülbelül azonos, az egyes hisztidinekről az N-terminus felé kiindulva (N⁻,N⁻,N⁻,N_{Im}) koordinációval, melyet feltehetően a másik hisztidin imidazolnitrogénjével axiálisan kiegészít.
- Kétmagvú részecskében szerkezeti átalakulás megy végbe a második réz(II)ion megkötődésekor: az első ekvivalens réz(II)ion átrendeződésével a His 13 környezetébe, a második fémion pedig a C-terminus felé létrejövő koordinációval kötődik.
- Ligandumfelesleg mellett biszligandumú CuL₂H₂ komplex jelenléte is bizonyított ESR spektruma alapján.
- Nikkel(II)komplexek csak 1:1 fémion-ligandum arányban alakultak ki, meghatározó mennyiségben (~100%) a His14-től induló koordinációval.
- A korábbi A β (8-16)Tyr10Ala mutánshoz hasonlóan kiemelkedő Zn(II)-ionaffinitást mutattunk ki. Ligandumfelesleg mellett biszligandumú, fémfelesleg esetén dinukleáris részecskék jelenlétére utal a pH-potenciometriás meghatározás, utóbbi tömegspektruma alapján is bizonyított.

4. Az amiloid dimer származék

A β -amiloid peptid dimerként való viselkedésének alátámasztására szolgál az $A\beta(1-16)_2\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{ON}_4\text{-PEG}$ oligopeptid-származék, melyben összesen nyolc kötőhely található. (1.b ábra)

- Az összesen 21 deprotonálódó csoport protonálódási állandói az $1,5 < \text{pK} < 11,5$ tartományba esnek. A híg oldat ($7 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$) azonban a pH-potenciometriás mérés alapján csupán a kölcsönhatás kvalitatív jellemzését tette lehetővé. Ugyanakkor az UV-látható és a CD-spektroszkópiás mérések számos fontos információval szolgáltak a $\text{Cu(II):L} = 1:1$ arányú rendszert illetően.
- Nyolc ekvivalens réz(II)ion megkötésére képes az előállított származék, csapadék megjelenését csak további fémion hozzáadására tapasztaltunk.
- Ekvivalens mennyiségű réz(II)ion jelenlétében a peptidszármazékban az amidnitrogén-koordináció fiziológias pH-tartományban késleltetett a pH függvényében a monomer származékhoz képest. Ez a viselkedés alátámasztja az amiloid plakkok képződése során kulcsfontosságúnak vélt dimer forma kialakulását.
- Érdekes változást tapasztaltunk a $\text{Cu(II):L} = 1:1$ rendszerhez cink(II)ionokat adagolva: a CD-spektrumon a sávok intenzitásának növekedését okozta, mely a réz(II)ionok koordinációs viszonyainak megváltozását jelentheti. Ennek értelmében a cink(II)ionok nem szorítják ki, de átrendezik a réz(II)ionokat a részecskékben.

IV. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

A fehérjék számára fontos fémkötőhelyet jelentenek a hisztidin oldalláncok. Bebizonyosodott, hogy ugyanazon kötőhelyek is rendelkezhetnek különböző affinitással az egyes átmenetifém-ionok felé. Két modellpeptidünkben hisztidin tartalmú kötőhelyeket hasonlítottunk össze a kialakuló réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)ionok stabilitása révén, melyek alapként szolgálhatnak hisztidint tartalmazó peptidek fémion-megkötésének megállapításánál. Ennek eredményeként a kiemelkedő Cu(II)- és Ni(II)-ionkötőként számon tartott ATCUN-motívumnál stabilisabb kötőhelyet jelentett az (NH₂,N⁻,N_{Im},N_{Im}) koordináció savas, semleges és enyhén lúgos közegben is. Ezen felül bebizonyosodott, hogy Zn(II)-ionok számára a H₂N-AHAAAHG-OH *heptapeptid* kiváló fémmegkötőként szolgál. Ilyen horgonycsoportokat tartalmazó ligandum az Alzheimer-kórban alapvető fontosságú amiloid- β peptid, melynek fragmenseit vizsgáltuk az említett három fémionnal. A képződő komplexek szerkezeti tanulmányozása révén meghatároztuk a koordinációban részt vevő donoratomokat, a fémionok preferenciáját az egyes kötőhelyek felé, valamint a komplexek izomerarányát. A vizsgálatok eredményeként az amiloid- β peptid kiugró affinitása mutatható ki Cu(II)- és Zn(II)-ionok felé. A két fémion preferenciája azonban eltérő az egyes kötőhelyek iránt: míg a réz(II)ionok az aminotermínust, a cink(II)ionok a 13-as és 14-es pozícióban lévő hisztidinek környezetét részesítik előnyben. Ennek eredményeként az *amiloid dimer* peptidszármazékban Zn(II)-ionok hozzáadására a Cu(II)-ionok átrendeződése következik be az imidazolnitrogén-koordinált kötőhelyről az amino terminus felé, amidnitrogének részvételével kialakuló komplexbe. Az A β (8-16) származék réz(II)ionokkal biszligandumú részecskét is képes volt kialakítani, mely alátámasztani látszik az amiloid- β peptid **fémionindukált oligomerizációját** az élő szervezetben. Az A β (1-16)₂ származék amidnitrogénjeinek koordinációja nagyobb pH értékre, az enyhén lúgos tartományba tolódik el az A β (1-16) monomerhez képest, mely szintén a dimerizációs folyamatot erősítheti meg. Az általunk nyert eredmények tehát közvetve hozzájárulhatnak újabb gyógyszerhatóanyagok kifejlesztéséhez, melyek az Alzheimer-kór kialakulását gátolják, illetve annak kezelésében játszhatnak szerepet.

TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK (PUBLICATIONS)

Az értekezés alapját képező közlemények (Articles connected to the thesis)

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények

1. Ágnes Grenács, Anikó Kaluha, Csilla Kállay, Viktória Józai, 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 (2013) 17-25
Impakt faktor: 3,274 (2014)
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 (2014) 49-56
Impakt faktor: 3,274 (2014)

Tudományos folyóiratban még meg nem jelent közlemények

1. Ágnes Grenács, Imre Sóvágó, Daniele Sanna, **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)

Konferenciakötetben megjelent tanulmány

Imre Sóvágó, Ildikó Turi, Ágnes 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 alapját képező előadások (Lectures connected to the thesis)

1. Grenács Ágnes, Kaluha Anikó, Józai Viktória, Kállay Csilla, Sóvágó Imre, **Hisztidin kötőhelyeket tartalmazó peptidek fémion-szelektivitásának vizsgálata, 46. Komplexkémiái Kollokvium, Mátrafüred, 2012. május 21-23.**
2. Grenács Ágnes, Sóvágó Imre, Giuseppe Di Natale, Giuseppe Pappalardo, **Az amyloid- β peptid N-terminális fragszénének – A β (1-9) – és dimer konjugátumának komplexképződési folyamatai, 47. Komplexkémiái Kollokvium, Mátraháza; 2013. május 29-31.**

3. Grenács Ágnes, Sóvágó Imre, **Az amiloid- β peptid N-terminális fragmenseinek és mutánsainak kölcsönhatása Cu(II)-, Ni(II)- és Zn(II)-ionokkal**, 48. *Komplekkémiai 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 alapiját képező posztterek (Posters connected to the thesis)

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.

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.



Jelölt: Grenács Ágnes

Neptun kód: EV1RCI

Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Nyilvántartási szám: DEENK/112/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegennyelvű tudományos közlemény(ek) külföldi folyóiratban (2)

1. Grenács, Á., Sóvágó, I.: Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of the N-terminal nonapeptide fragment of amyloid-[beta] and its derivatives.
J. Inorg. Biochem. 139, 49-56, 2014. ISSN: 0162-0134.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.06.001>
IF:3.274 (2013)
2. Grenács, Á., Kaluha, A., Kállay, C., Józsa, V., Sanna, D., Sóvágó, I.: Binary and ternary mixed metal complexes of terminally free peptides containing two different histidyl binding sites.
J. Inorg. Biochem. 128, 17-25, 2013. ISSN: 0162-0134.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.07.008>
IF:3.274

Idegennyelvű konferencia közlemény(ek) (1)

3. Sóvágó, I., Turi, I., Grenács, Á.: Factors influencing the formation of mixed metal complexes of peptide fragments of prion protein and related ligands.
In: 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference. Ed.: Josefa María González-Pérez, Antonio Matilla-Hernández, Juan Nicolás Gutiérrez, MEDIMOND, Granada, 31-36, 2013. ISBN: 9788875876586

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,548

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,548

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2015.05.21.