

## Szakmai zárójelentés

### **A fémionok lehetséges szerepe az idegrendszeri betegségek kifejlődésében és lefolyásában.**

#### **A hisztidintartalmú peptidek átmenetifém-ionokkal való komplexképződési folyamatai**

Régóta ismert, hogy bizonyos fémek létfontosságúak az élő szervezet számára. Szerepet játszanak a szerves molekulák szintézisében, szállításában, illetve biológiai rendszerek sav-bázis- és redoxifolyamatainak katalizálásában. Más elemek már rendkívül kis koncentrációban is komoly veszélyt jelentenek valamennyi szervezet számára. Napjainkra az is egyértelművé vált, hogy a szerves anyagok közül a fehérjék azok, amelyek a fémionok megkötésében meghatározó szerepet játszanak. A létfontosságú elemek közül a réz és a cink szinte kizárólag fehérjékhez kötve található metalloenzimek vagy egyéb funkciókat betöltő metalloproteinek formájában. Ugyanakkor a palládium és más platinafémek vagy a kadmium és a higany toxicitása is ezen fémionok és a fehérjék között megvalósuló kölcsönhatásokkal értelmezhető. Ma már az is általánosan elfogadott, hogy egyes fémionok fontos szerepet játszanak a neurodegeneratív elváltozások kifejlődésében és ezen betegségek lefolyásában is. Ezek közül talán a Parkinson-kór és az Alzheimer-kór a legelterjedtebb és legismertebb, de a közélet szempontjából a legnagyobb figyelmet a prion proteinek konformációváltozásához kapcsolható megbetegedések (pl. a Creutzfeldt-Jakob-kór vagy kerge marhakór) kapták.

Azt már korábban is tudták, hogy az idegrendszeri betegségek kialakulása alapvetően a fehérjemolekulák konformációváltozásával, és az azt követő aggregációjával van összefüggésben, de ezen fehérjék nagy fémionaffinitása és így a fémionok ezen folyamatokban betöltött szerepe csak az újabb kutatások alapján vált egyértelművé.

Az OTKA Posztdoktori Pályázat keretében különböző betegségekkel (neurodegeneratív betegségek, prionbetegség, II. típusú cukorbetegség) kapcsolatba hozható fehérjék fragmenseinek komplexképződési folyamatait tanulmányoztuk. A kapott eredményeket a vizsgált ligandumcsaládok szerinti bontásban tárgyaljuk.

### **1. Kistagszámú hisztidintartalmú-peptidek átmenetifémionokkal alkotott törzs- és vegyes fémkomplexei**

A hisztidintartalmú peptidek kiugró fémmegkötőképessége már régóta ismert, de a korábbi eredmények főleg olyan peptidekre vonatkoztak, amelyek a szekvencián belül csak egyetlen hisztidint, de terminális amino- és karboxilát-csoportokat is tartalmaztak. Ezek a peptidek ugyan kiváló fémkötő ligandumok, de a terminális csoportok jelenléte miatt nem igazán alkalmasak a fehérje molekulán belül található kötőhelyek modellezésére.

A terminálisan védett, két vagy három hisztidint tartalmazó kistagszámú peptidek különböző átmenetifémionokkal való kölcsönhatásának tanulmányozását már korábban, a 48352-es OTKA keretében elkezdtük, ezeket a méréseket kiegészítettük és lezártuk.

A posztdoktori pályázatom keretein belül tovább vizsgált peptidek aminosav-szekvenciáját az alábbi összeállítás mutatja:

Ac-HisGlyHis-OH

Ac-HisGlyHis-NHMe

Ac-HisHisGlyHis-OH

Ac-HisValGlyAspHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisHisValGlyAsp-NH<sub>2</sub>

Ac-HisValHisAlaHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisAlaHisValHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisGlyHisValHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisValHisGlyHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisProHisAlaHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisAlaHisProHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisSarHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisSarHisSarHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisSarHisSarHisSarHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisValValHis-NH<sub>2</sub>

Ac-HisAlaAlaHisValValHis-NH<sub>2</sub>

A peptidek aminosav szekvenciája alapján a komplexek összetételét, stabilitását és szerkezetét befolyásoló alábbi tényezők megválaszolására adódott lehetőség:

- a hisztidinek számának hatása
- a hisztidinek egymáshoz viszonyított távolságának hatása
- a terminális karboxilátcsoport hatása
- az aszparaginsav oldalláncbeli karboxilátcsoportjának hatása
- a láncközi prolin és szarkozin (szekunder amidok) hatása

A fémionokat tekintve a vizsgálatok mindenekelőtt a réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)komplexekre terjedtek ki, bár néhány esetben a kobalt(II)- és kadmium(II)ionokat is bevontuk a vizsgálati körbe.

Ezen peptidek hisztidil-oldalláncai önálló fémmegkötőhelyek lehetnek, ezért réz(II)ionnal kétmagvú komplexeket képeznek, illetve vegyes fémmkomplexek kialakulására is lehetőség van.

Többféle vegyes rendszert; réz(II)-nikkel(II), réz(II)-cink(II), réz(II)-palládium(II) és nikkel(II)-cink(II) rendszert is tanulmányoztunk.

A legfontosabb megállapítások a következők:

– A Zn(II)-ion kevésbé hajlamos vegyes fémkomplex képzésére, a Cu(II)/Zn(II) rendszerekben azonban, savas pH tartományban, a Cu(II)-ionnal való stabilis kötődés mellett számolhatunk a szabad imidazol-nitrogénatomok és a Zn(II)-ion közötti kölcsönhatással.

– A Cu(II)/Ni(II) rendszerekben a savas és semleges pH tartományban csak a Cu(II)-ion koordinálódik, a pH növelésével azonban olyan vegyesmagvú komplexek képződnek, amelyekben mindkét fémion hisztidinnitrogénhez és amidnitrogénekhez is koordinálódik.

– A Cu(II)-Pd(II) vegyes rendszerben savas pH tartományban a Pd(II)-ion koordinációja a meghatározó, a Cu(II)-ion semleges pH-n hidrolizál, a lúgos pH tartományban azonban megtöri a Pd(II)-ionnal képződött többmagvú komplexek szerkezetét, és vegyes fémkomplexek képződnek. [1], [9], [10]

## **2. A prion fehérje peptidfragmenseinek Cu(II)-, Ni(II)-törzskomplexei és Cu(II)/Ni(II) vegyes fémkomplexei**

A prion protein egy közel 250 aminosavból álló, monomer,  $\alpha$ -hélixben gazdag szerkezetű vízoldható sejtfelületi glikoprotein ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), amely megtalálható minden emlős szervezetében. Ma még ismeretlen okok miatt ez a fehérje olyan konformációváltozáson mehet át, amely során vízben oldhatatlan, fibrilláris szerkezetű,  $\beta$ -redőben gazdag aggregátum képződik belőle. A normális ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) és a toxikus ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) formák aminosav-összetétele azonos, de a fehérjék másodlagos szerkezete, oldékonysága és enzimekkel szembeni reaktivitása eltérő. A  $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$  átalakulás iránt mutatkozó kitüntetett figyelmet a betegség terjedésének különös módja indokolja. A toxikus forma a normális prion proteinek számára mindegy templátként működik, és indukálja a kóros forma elszaporodását. Ha egy normális, a proteázokra érzékeny prion protein toxikus prionná alakul a sejtben kívülről (pl. a táplálékkal) bekerülő toxikus prion hatására, akkor megindul a kór terjedése. A toxikus priont a proteázok nem tudják lebontani, így felhalmozódnak a sejtben, kicsapódnak, s nyomásuk által elpusztítják azt. Továbbá a toxikus prionok képesek kilépni a sejtből és belépni a szomszédos sejtbe, ahol átalakítják a folyamatosan termelődő normális prionokat.

A prion protein biológiai szerepe mind a mai napig nem ismert pontosan, de újabban egyre többen valószínűsítik, hogy a réznek a sejtmembránon történő átjutásában, illetve a rézionok koncentrációjának tanulmányozásában és ezáltal a reaktív oxigéngyökök elleni védelemben van szerepe.

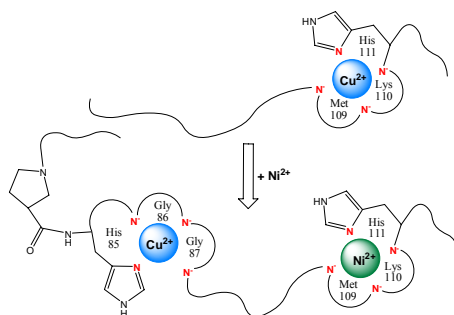
A fehérje igen nagy számban tartalmazza a hisztidin aminosavat, amely a rézproteinek leggyakoribb fémion-kötőhelyeként ismert. Ennek megfelelően az utóbbi néhány évben szinte exponenciálisan nőtt a fémion-prion protein, illetve annak peptidfragmenseivel való kölcsönhatására vonatkozó közlemények száma. Korábban úgy gondolták, hogy az „oktarepeat” tartomány az elsődleges fémion-megkötőhely. Ebben a tartományban (HuPrP(60-91)) egy 8 aminosavat tartalmazó szekvencia (PHGGGWGQ) ismétlődik négyszer, amelyek közül elsősorban a hisztidin nitrogénekhez koordinálnak a fémionok. Azonban a fehérje további 6 hisztidint tartalmaz, amelyek potenciális fémmegkötők lehetnek. Kutatócsoportunkban az elsődleges cél az „oktarepeat” tartományon kívüli hisztidinek fémmegkötő képességének vizsgálata volt. A korábbi vizsgálatok a réz(II)ionra fókuszáltak, azonban a kölcsönhatás nem teljesen szelektív és más fémionok biológiai szerepe is számításba jöhet. Ezért további célkitűzésünk a különböző prionfragmensek más fémionokkal való kölcsönhatásának tanulmányozása volt. Emellett tanulmányoztuk az „oktarepeat” tartomány réz(II)ion megkötő képességét és a 109-es, 112-es metionin más aminosavakkal való helyettesítésének komplexképződésre gyakorolt hatását.

A „biszoktarepeat” tartomány vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a ligandum két ekvivalens réz(II)ion megkötésére képes, és a kétmagvú komplexek képződése ekvimoláris oldatban is kedvezményezett. Oldékonysági problémák miatt a „tetraoktarepeat” tartomány vizsgálatához a ligandum PEG-ilált formáját kellett előállítani. Ez a fragmens is annyi réz(II)ion megkötésére képes, ahány hisztidint tartalmaz. Ekvimoláris oldatban pH 5 és 7 között 4N makrokelát van jelen, aminek eredményeként az amidnitrogének deprotonálódása csak pH 7,5 fölött következik be. Nagyobb fém/ligandum arányoknál kétmagvú, részleges makrokelát is képződik. Ezeknek a komplexekben nem telített a réz(II)ion koordinációs szférája, így az amidnitrogének deprotonálódása könnyebben, már pH 6-6,5 körül elkezdődik. Fémionfelesleg esetén pH 7,5 felett többmagvú komplexek vannak jelen az oldatban, a ligandum 3-4 réz(II)iont köt meg, a kétmagvú komplexek képződése nem kedvezményezett.

A prion proteinben a hisztidin imidazolgyűrűi jelentik az elsődleges fémkötőhelyet. A korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a metionin tioétercsoportja hozzájárul a prion protein fragmensek fémmegkötéséhez. A 109-es metionin és a 111-es hisztidin oldallánca specifikus kötőhelyet teremtenek a fémionok számára. Úgy gondoltuk, hogy ha a 109-es metionint más, gyengén koordinálódó oldalláncot tartalmazó aminosavval helyettesítjük szintén stabilitásnövekedés lesz megfigyelhető a csak egyetlen hisztidint tartalmazó peptidekhez képest. A 109-es pozícióban metionin helyett szerint, treonint és metoxi-szerint tartalmazó mutánsok (Ac-SKHM-NH<sub>2</sub>, Ac-TKHM-NH<sub>2</sub>, Ac-S(OMe)KHM-NH<sub>2</sub> és Ac-KTNSKHMAG-

NH<sub>2</sub>) esetén az említett odalláncok oxigén donoratomjainak stabilizáló hatása figyelhető meg. Ilyen jellegű kölcsönhatás azonban a 112-es pozícióban nem jelentkezik. [20]

Több fragmens (HuPrP(76–114), HuPrP(91–115), HuPrP(76–114)H85A és HuPrP(84–114)H96A) nikkell(II)-ionnal való kölcsönhatását is tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy a fragmensek általában annyi nikkell(II)-ion megkötésére képesek, ahány hisztidint tartalmaznak. Ez a megállapítás megegyezik a réz(II)-ionok esetén tapasztaltakkal, eltérés mutatkozott azonban az egyes hisztidinek fémion-megkötőképességében. Amíg a réz(II)ionok a His111-hez kötődnek preferáltan, a nikkell(II)ionok számára a His96 a preferált kötőhely. [15] A réz(II)- és nikkell(II)-ionokat is tartalmazó rendszerekben jól megfigyelhető ez a preferáltság, az is megállapítható hogy a nikkell(II)ionok jelenlétében a réz(II)ionok nagyobb arányban koordinálódnak a His111-hez, mint a csak réz(II)iont tartalmazó rendszerekben. Ugyanakkor a His96-ot nem tartalmazó HuPrP(84–114)H96A mutáns vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy hiába a réz(II)ion nagy affinitása a His111-hez, a nikkell(II)ion képes megváltoztatni a réz(II)ion különböző kötőhelyeken való megoszlását; a nikkell(II)ionok túlnyomórészt a His111-hez, a réz(II)ionok az „oktarepeat” tartományon belüli His85-höz koordinálódnak. (1. ábra) [22]



1. ábra

### 3. A $\beta$ -amiloid Ni(II) törzs-, illetve Ni(II)/Cu(II) és Ni(II)/Cu(II)/Zn(II) vegyes fémkomplexei

Az amiloid- $\beta$  peptideknek az Alzheimer-kór kifejlődésében van szerepe. Az Alzheimer-kór a 65 év feletti lakosság tíz százalékát érinti, míg a 80 évesnél idősebb korosztályban ez az arány négyszeresére növekszik. A betegség memória-kieséssel kezdődik, és a szellemi képességek leépüléséhez (az emlékezetet és a gondolkodás hanyatlásához, az érzelmek kontrolljának elvesztéséhez), majd halálhoz vezet. A betegségre jelenleg nincs gyógymód, bár néhány gyógyszer lassíthatja a kóros folyamatokat. A kórra jellemző, hogy az agyban kóros fehérje-lerakódások, úgynevezett amiloidplakkok keletkeznek, amelyekben a réz(II)- és cink(II)ionok nagy mennyiségben vannak jelen. Egyelőre nem tudjuk, hogy ez a betegség tünete

vagy oka. Ezeket a plakkokat elsősorban az amiloid-prekursor protein (APP) (21. kromoszómán elhelyezkedő gén) 40-42 aminosavból álló fragmense, a  $\beta$ -amiloid peptid alkotja. Normális körülmények között az APP-t az  $\alpha$ -szekretáz hasítja a  $\beta$ -amiloid szekvenciáján belül, így nem képződhet  $\beta$ -amiloid. Az Alzheimer-kór esetén az APP hasítását a  $\beta$ - és  $\gamma$ -szekretázok végzik, ennek eredményeként képződik a  $\beta$ -amiloid, mely  $\alpha$ -helikális szerkezet helyett  $\beta$ -redőt formál, így aggregálódik, proteázok számára oldhatatlan extracelluláris zárványokat képez. Az aggregált  $\beta$ -amiloid károsítja az idegsejteket, s ez okozhatja az Alzheimer-kór kialakulását.

Az amiloid- $\beta$ -peptid a prion fehérjéhez hasonlóan nagyszámban tartalmaz hisztidint, ezek elrendeződése azonban eltérő. A három hisztidin közül 2 egymás mellett (His13 és His14), míg a harmadik ezektől távol helyezkedik el (His6). További fontos jellemzője ennek a peptidnek, hogy a molekulában terminális aminocsoport is található, ami jelentősen megváltoztatja a koordinációs lehetőségeket. A fémionokkal való kölcsönhatásban az első 16 aminosav játszik szerepet, amelyek között a hisztidinek mellett két aszparaginsav, két glutaminsav, egy tirozin, egy arginin és egy lizin is szerepel. Ez rendkívül bonyolulttá teszi a komplexképződési folyamatokat, ezért kutatócsoportunkban elsőként a kisebb fragmensek komplexkémiaili tulajdonságait tanulmányozták. A vizsgálatok azt mutatták, hogy réz(II)- és cink(II)ionokkal egyaránt igen nagy stabilitású komplexek képződnek, az  $A\beta(1-16)$  fragmens 4 réz(II)- vagy 3 cink(II)ion megkötésére képes és vegyes fémkomplexek is képződnek.

Munkánk során a vegyes fémkomplexek tanulmányozását a modellként használható Ni(II)-ionokra is kiterjesztettük.

A vegyes rendszerek vizsgálatához először az  $A\beta(1-16)Y10A$  peptid és kisebb fragmenseinek ( $A\beta(1-4)$ ,  $A\beta(1-6)$ ,  $Ac-A\beta(1-6)$  és  $Ac-A\beta(8-16)Y10A$ ) nikkel(II)-ionokkal való komplexképzését tanulmányoztuk. Ezek a ligandumok nikkel(II)ionnal nagy stabilitású komplexeket képeznek. Az  $A\beta(1-16)Y10A$  peptid két, egymástól független kötőhelyet tartalmaz; az N-terminális rész és a közbenső hisztidinek körüli rész is képes 1-1 ekvivalens nikkel(II)ion megkötésére. A spektroszkópiás vizsgálatok az N-terminális részen történő kötődés preferáltságát mutatták. Réz(II)ionok esetén is ez volt a preferált kötőhely, azonban sokkal kisebb mértékű ez a különbség, míg a cink(II)ionok esetén a közbenső hisztidineken való koordináció a kedvezőbb.

A nikkel(II)ionok nem képesek kiszorítani a réz(II)ionokat az N-terminális részről, ezért a Ni(II)/Cu(II) vegyes rendszerben a réz(II)ionok a peptid N-terminális, a nikkel(II)-ionok pedig a közbenső részen koordinálódnak.

Abban az esetben, ha a közbenső hisztidinekkel koordinálódó cink(II)ion is jelen van a rendszerben, akkor a nikkell(II)ionok csak a szabadon maradt koordinációs helyeket foglalhatják el. Az A $\beta$ (1-16)Y10A peptid mindhárom fémion egyidejű megkötésére is képes. A Ni(II)/Cu(II)/Zn(II)–A $\beta$ (1-16)Y10A rendszerben a réz(II)ionok elsősorban az N-terminális részen, a cink(II)ionok a közbenső tartományban kötődnek, míg a nikkell(II)ionok a peptid mindkét részén koordinálódnak. A három ekvivalens fémion megkötését az teszi lehetővé, hogy a peptid mindkét részén 2-2 fémion is koordinálódhat. Az N-terminális részen két réz(II)ion, a közbenső részen két réz(II)- vagy cink(II)ion, illetve egy réz(II)- és egy cink(II)ion lehet.

Ezen vizsgálatokból megállapítottuk, hogy sem a cink(II)-, sem a nikkell(II)-ionok nem képesek kiszorítani a réz(II)-iont a  $\beta$ -amiloid peptid fémion-megkötőhelyeiről, azonban mindkét fémion képes megváltoztatni a réz(II)-ionok eloszlását a különböző fémion-megkötőhelyek között. [16]

#### **4. Amilin fragmensek Cu(II)-ionokkal való kölcsönhatása**

Az amilin egy 37 aminosavból felépülő, az inzulinhoz hasonlóan a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjeiben keletkező hormon. Megfigyelték, hogy II. típusú cukorbetegségben ez az amilin nevű fehérje a betegek több mint 90 százalékában csapadék formájában lerakódik a  $\beta$ -sejtben. A képződött amiloidplakkok a szigeteken belül apoptózist okozhatnak, így ez 2-es típusú diabetesben fokozza a  $\beta$ -sejt pusztulását, tönkreteszi a  $\beta$ -sejt-replikációt.

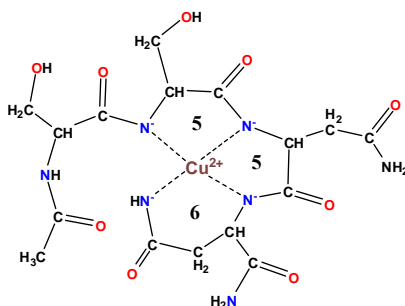
A patkány amilinje ilyen plakkok képzésére nem mutat hajlamot. A patkányból és az emberből izolált amilin a 18., 23., 25., 26., 28. és 29. aminosavban tér el egymástól: míg az emberi amilinben ezeken a helyeken hisztidin, fenilalanin, alanin, szerin és szerin található, addig a patkányban arginin, leucin, prolin, valin, prolin és prolin. Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatai a patkány amilin ezen aminosavakat is magába foglaló 17-29 tartományára (Ac-ValArgSerSerAsnAsnLeuGlyProValLeuProPro-NH<sub>2</sub>) irányultak. A vegyület érdekessége, hogy a benne található aminosavak külön-külön az oldalláncaikban a fémionhoz koordinálódni képes donoratomot nem tartalmaznak.

A korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a patkány amilin 17-29 fragmense képes egy ekvivalens réz(II)ion megkötésére, oldatban tartására. Az amidnitrogének deprotonálódásához horgonycsoportra van szükség. A szekvencia ismeretében úgy gondoltuk, hogy az arginin guanidino csoportja tölti be ezt a szerepet. Ezen kívül még az arginint követő szerin- és aszparagin-oldalláncoknak lehet ilyen szerepe.

Ezért az ezen aminosavakat magába foglaló, kisebb patkány amilin fragmenseket, a 17-22 fragmenst (Ac-ValArgSerSerAsnAsn-NH<sub>2</sub>), a 17-20 fragmenst (Ac-ValArgSerSer-NH<sub>2</sub>) és a

19-22 fragmenst (Ac-SerSerAsnAsn-NH<sub>2</sub>) tanulmányoztuk. Az arginin és a szerin szerepének megismeréséhez a 17-20 fragmens két mutánsát is vizsgáltuk (Ac-ValArgAlaAla-NH<sub>2</sub> és Ac-ValAlaSerSer-NH<sub>2</sub>).

Vizsgálataink azt mutatják, hogy nem az arginin felelős a patkány amilin fémmegekötő-képességéért. Az Ac-SerSerAsnAsn-NH<sub>2</sub> peptid mutat az amilin 17-29 fragmenséhez hasonló komplexkémiai viselkedést. Ennek alapján a szerin- és az aszparagin-oldalláncnak, esetleg ezek együttes elrendeződésének lehet szerepe a fémmegekötésben. Az olasz együttműködő fél molekulaelméleti számításai alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a 22-es pozícióban lévő aszparagin oldalláncbéli amidcsoportja deprotonálódik, és részt vesz a koordinációban. (2. ábra) A mérési eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy az SSNN szekvencia poláris oldalláncainak együttes jelenléte szükséges ahhoz, hogy a fémion oldatban maradjon, és megakadályozza a fémion hidrolízisét. Bebizonyosodott, hogy a jól ismert horgonycsoportok, a hisztidin és a cisztein oldalláncok mellett az aszparagin amidcsoportja is elsődleges fémionkötőhely lehet, koordinálódásával indukálhatja a peptidvázbeli amidnitrogének deprotonálódását. Ugyanakkor önmagában egy aszparagin nem elegendő a fémion megkötésére. [21]



2. ábra

A kutatások eredményeit 10 közleményben foglaltuk össze (össz impakt faktor: 33,62 - ebből megjelent: 26,29), valamint 5 előadásban és 8 poszteren mutattuk be magyar és nemzetközi konferenciákon. Emellett két projektmunka, egy szakdolgozat és egy tudományos diákköri dolgozat készült a pályázat témavezetőjének irányításával (III. helyezés az Országos Tudományos Diákköri Konferencián).

A 72321-es számú pályázat a posztdoktori alkalmazásomat finanszírozta. Pályázatommal a Dr. Sóvágó Imre vezetésével futó 48352-es pályázathoz csatlakoztam, majd 2008-tól a 77586-os OTKA pályázat fedezte a kutatások költségeit. Emellett a kutatás eredményessége szempontjából fontos szerepe volt az MTA és a CNR közötti kétoldalú együttműködési pályázatnak, amely a peptidek szintézise és egyes szerkezetvizsgáló módszerek során valósult meg.