

Szakmai zárójelentés

Az átmenetifémionok peptidekkel alkotott komplexei. A fémion-fehérje kölcsönhatás modellezése

Az élő szervezetben előforduló létfontosságú átmenetifémek, mint a vas, réz és cink, döntő mennyiségben fehérjékhez kötve találhatók. A fémionok élettani szerepe így elsősorban a fehérjékkel való kölcsönhatáson keresztül érvényesül. A fémion-fehérje kölcsönhatás molekuláris szintű megismerése ezért alapvető jelentőségű a nyomelemek élettani szerepének tisztázása céljából. A pályázat által támogatott kutatások során ezen témakörhöz kapcsolódóan kívántunk vizsgálatokat végezni, a koordinációs kémia és bioszervetlen kémia nyújtotta lehetőségek között.

A korábbi irodalmi vizsgálatok alapján már általánosan elfogadott tény, hogy a hisztidin és cisztein aminosavak képviselik a fehérjék legfontosabb fémkötőhelyeit. A célkitűzéseink között ezért új, hisztidintartalmú peptidek előállítása és komplexképződési folyamataik megismerése állt. Ezek a peptidek három szempontból is érdeklődésre tarthatnak számot: (i) a szisztematikusan tervezett és több hisztidint tartalmazó peptidek (vagy multihisztidin peptidek) ideális ligandumok lehetnek a metalloenzimek szerkezetének és katalitikus aktivitásának modellezése szempontjából, (ii) a neurodegeneratív betegségek egy speciális csoportját jelentő prion betegségekért felelős fehérje ugyancsak gazdag hisztidinben, így a természetes eredetű fehérje különböző fragmenseinek tanulmányozása indokolt, (iii) az Alzheimer-kór a leggyakoribb neurodegeneratív elváltozás és a betegséggel összefüggésbe hozható amyloid- β peptid szintén hisztidingazdag molekula, kiugróan magas fémionmegkötő képességgel. A pályázat keretei között az említett 3 területhez kapcsolódva végeztünk vizsgálatokat és az eredményeket is ennek megfelelő bontásban tárgyaljuk.

1. Több hisztidint tartalmazó kistagszámú peptidek réz(II) és cink(II) komplexei.

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 karboxil-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 pályázat keretein belül ezért terminálisan védett és általában 2 vagy

3 hisztidint tartalmazó, de viszonylag kis tagszámú peptidek előállítására/vizsgálatára törekedtünk. Ezek aminosav szekvenciáját az alábbi összeállítás mutatja:

Ac-HisGlyHis-OH

Ac-HisGlyHis-NHMe

Ac-HisHisGlyHis-OH

Ac-HisHisGlyHis-NHMe

Ac-HisValGlyAspHis-NH₂

Ac-HisHisValGlyAsp-NH₂

Ac-HisValHisAlaHis-NH₂

Ac-HisAlaHisValHis-NH₂

Ac-HisGlyHisValHis-NH₂

Ac-HisValHisGlyHis-NH₂

Ac-HisProHisAlaHis-NH₂

Ac-HisAlaHisProHis-NH₂

Ac-HisGlySerProHisAla-NH₂

Ac-HisProSerGlyHisAla-NH₂

Ac-HisSarHis-NH₂

Ac-HisSarHisSarHis-NH₂

Ac-HisSarHisSarHisSarHis-NH₂

Ac-HisValValHis-NH₂

Ac-HisAlaAlaHisValValHis-NH₂

A fenti felsorolásból egyértelműen látható, hogy a vizsgált – N-terminálisan minden esetben védett – tri-, tetra-, penta-, hexa és hepta-peptidek szisztematikus elrendezésben tartalmazták a hisztidint és néhány más aminosavat. 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 karboxilcsoport hatása
- az aszparaginsav oldalláncbeli karboxilcsoportjának hatása
- a láncközi prolin és szarkozin (szekunder amidok) hatása

A fémionokat tekintve a vizsgálatok mindenekelőtt a réz(II)- és cink(II)komplexekre terjedtek ki, bár néhány esetben a peptidek irányába ugyancsak nagy affinitást mutató nikkel(II)ionokat is bevontuk a vizsgálati körbe. A réz(II)- és cink(II)ionok választását egyrészt ezen fémionoknak, mint enzimmotórnak a szerepe indokolja, másrészt a neurodegeneratív folyamatok kialakulása kapcsán is feltételezik szerepüket.

A vizsgálatok során a pH-potencometriát alkalmaztuk a képződő komplexek sztöchiometriai összetételének és stabilitási állandójának, illetve ezzel összefüggésben a pH-függő fémioneloszlás (speciáció) meghatározására. Tekintettel ezen rendszerek

meglehetősen bonyolult jellegére már a munka ezen fázisában is alkalmazni kellett azokat az oldatszerkezetvizsgáló módszereket, amelyek a helyes számítási modell megalkotását lehetővé tették. Ezek között a színes és paramágneses réz(II)komplexek esetén meghatározó szerepe volt az UV-látható, cirkuláris dikroizmus valamint ESR spektroszkópiának, míg a szintelen és diamágneses cink(II)komplexek vizsgálatára az NMR és tömegspektroszkópiás módszereket alkalmaztuk.

A munka ezen fázisa során kapott nagyszámú eredményre és publikációra való tekintettel e helyen csak a legfontosabb megállapítások összegzésére szorítkozunk, míg a további részletek a megfelelő közleményekben találhatóak (lásd zárójelentés közlemény lista: [3], [5], [9] – [11], [15], [16] és [19] – [21] közlemények).

Fontosabb eredmények felsorolása:

- Valamennyi vizsgált hisztidintartalmú peptid közös jellemzője, hogy az oldalláncban található imidazol-N donoratombok az elsődleges fémkötőhelyek. A multihisztidin peptidok esetén ez makrokelátok kialakulását eredményezheti [5,21]. A makrokelátok létezése különösen fontos lehet a prolint és/vagy szarkozint tartalmazó peptidok esetén, ahol az amidcsoport koordinációja gátolt.

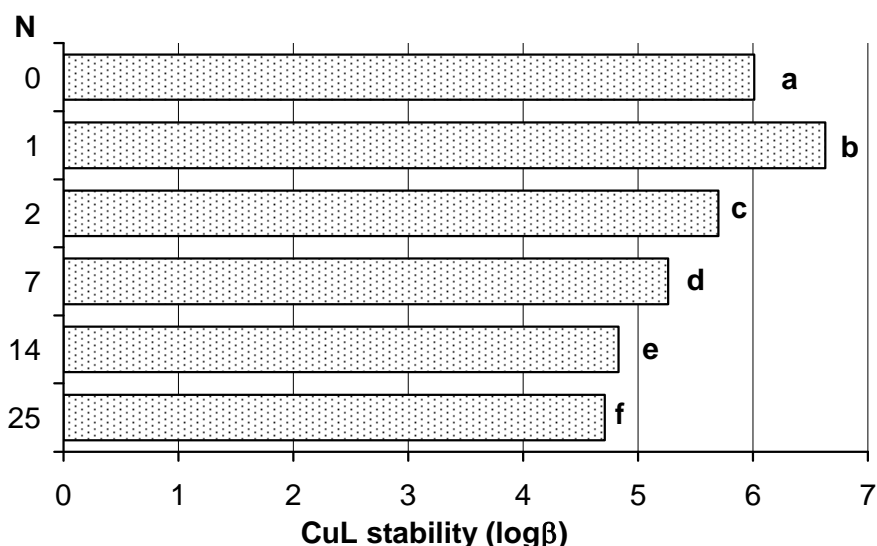
- A prolint tartalmazó peptidok esetén azt is kimutattuk, hogy a makrokelátokon belül a prolin alapvető hatással van a peptid konformációjára, azaz ezen peptidok konformációja gyenge fémion-ligandum kölcsönhatásokkal is jelentősen befolyásolható [15]

- Kimutattuk, hogy a makrokelátok termodinamikai stabilitása a hisztidinek számával párhuzamosan növekszik. A legnagyobb stabilitást a hisztidin szempontjából alternáló szekvencia (pl. HXHXH....) esetén kaptuk [3, 9, 21]. Ezt a jelenséget szemlélteti az 1. ábra néhány különböző kéthisztidines peptid esetén.

- A réz(II) komplexek esetén a nagy stabilitású makrokelátok képződése kissé visszaszorítja, de nem gátolja meg az amidcsoportok fémion indukált deprotonálódását és koordinációját [3,6,20,21]. Ennek megfelelően pH 7 körül valamennyi rendszerben az $[N_{im}, 2 \times N_{amid}]$ koordinációjú vagy másnéven 3N komplexek dominálnak. A pH további növelésével a harmadik amidnitrogén telíti a réz(II)ionok koordinációs szféráját $[N_{im}, 3 \times N_{amid}]$.

- A cink(II)ionok általában nem képesek az amidcsoport deprotonálódását és fémionkoordinációját kiváltani. Eredményeink szerint erre csak akkor van lehetőség, ha a hisztidin aminosavak egymás szomszédságában találhatóak és a karboxilcsoportok ugyancsak vannak a molekulákban [9,11].

- A karboxilcsoportok jelenléte csak kevésbé növeli a réz(II)komplexek termodinamikai stabilitását, míg a cink(II) esetén számottevően növeli a peptidok fémionkötő képességét és visszaszorítja a hidrolitikus folyamatokat [9.11].



1. ábra: A Cu–2N_{im} kötést tartalmazó makrokelátok stabilitási állandójának változása a hisztidineket elválasztó aminosavak számának függvényében. (a) ciklo-(HH), (b) HVH, (c) GHKLHL (d) (PHGGWGQ)₂, (e) HuPrP(91-115), (f) HuPrP(84-114)H96A.

- A réz(II)komplexek vizsgálata során kapott legfontosabb eredményeink szerint a multihisztidin peptidekkel többmagvú komplexek is képződhetnek, azaz ha hisztidinek elég távol vannak egymástól, akkor valamennyi hisztidin független fémkötőhelynek tekinthető. Ez lehetőséget teremtett arra is, hogy az irodalomban először többmagvú vegyesfém komplexek képződési körülményeit jellemezzük [3,6, 20].

2. A prion fehérje peptidfragmenseinek komplexképződési folyamatai

A prion betegség a neurodegeneratív megbetegedéseknek egy viszonylag ritka formáját jelenti, de fertőző jellege miatt fokozottan az érdeklődés középpontjába került. Egyre több adat támasztja alá, hogy a prion fehérje normális formájának (PrP^C) szerepe van a réz transzportjában (internalizáció), bár a kóros átalakulás kiváltó okaként nem valószínűsíthető. A PrP^C és a réz biológiai szerepe azonban összekapcsolható, ami indokolja ezen valóban nagy rézmegkötő képességű fehérje részletes vizsgálatát. A korábbi irodalmi adatok szerint a fehérje úgynevezett oktarepeat tartománya az elsődleges rézkötőhely, ami 4 ismétlődő és 1-1 hisztidint tartalmazó oktapeptidből áll. Az oktarepeat 4 hisztidinje mellett azonban a molekulában további 6 hisztidin található amelyek közül legalább 3 (His96, His111 és His187) a fémionokkal is kölcsönhatásba kerülhet. Fontos továbbá kiemelni, hogy a

hisztidintartalmú peptidek más átmenetifémionokat is stabilan koordinálhatnak, de ezeket az irodalomban még alig tanulmányozták.

Vizsgálati célunk ezért kettős volt: (i) tanulmányozni kívántuk az oktarepeaten kívüli hisztidineket modellező fragmensek komplexképződési folyamatait, valamint (ii) tisztázni kívántuk a hisztidintartalmú kistagszámú prionfragmensek és az átmenetifémek széles köre között lehetséges kölcsönhatásokat.

2.a. A réz(II) ion kölcsönhatása az oktarepeaten kívüli fragmensekkel

A vizsgálatok céljára az alábbi peptideket állítottuk elő: (Valamennyi vizsgált peptid N- és C-terminálisan egyaránt védett, ezért ezt az egyszerűség kedvéért külön nem jelöljük)

HuPrP(109-112) = MKHM

HuPrP(106-114) = KTNMKHMAG

ChPrP(122-125) = FKHV

ChPrP(119-127) = KTNFKHVAG

HuPrP(94-97) = GTHS

HuPrP(184-188) = IKQHT

HuPrP(91-115) = QGGGTHSQWNKPSKKPKTNMKHMAGA

HuPrP(84-114) = PHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKKPKTNMKHMAG

HuPrP(84-114)H85A = PAGGGWGQGGGTHSQWNKPSKKPKTNMKHMAG

HuPrP(84-114)H96A = PHGGGWGQGGGTASQWNKPSKKPKTNMKHMAG

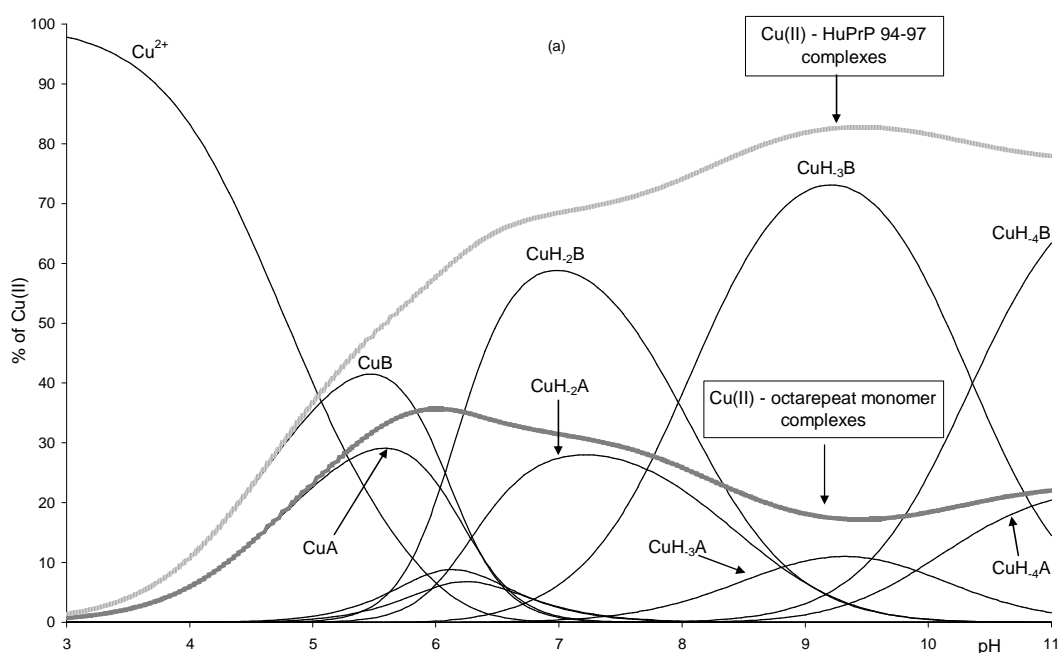
HuPrP(84-114)H111A = PHGGGWGQGGGTHSQWNKPSKKPKTNMKAMAG

(rövidítések: HuPrP – human prion protein, ChPrP – chicken prion protein)

A felsorolásból egyértelmű, hogy a fenti peptidek az oktarepeaten kívüli hisztidinek és a réz(II)ionok kölcsönhatásának tanulmányozását kis (tetra- penta-), közepes (nona-) és nagy tagszámú (31-tagú) peptidekben egyaránt lehetővé tették. A nagy tagszámú peptidek egyben azt is biztosították, hogy az oktarepeat egy egysége és az azon kívül található hisztidinek fémkötő képességének összehasonlítását egyetlen molekulában is elvégezhesük. A vizsgálatokat általában ugyanazon kísérleti technikák alkalmazásával végeztük, mint azt az előző pontban tárgyaltuk, de a rendelkezésre álló kis anyagmennyiségek miatt speciális eljárásokat kellett kidolgoznunk. A cirkuláris dikroizmus spektrumok összetett jellege azt is szükségessé tette, hogy azok felbontására egy új matematikai eljárást dolgozzunk ki [18]. Az eredmények nagyobb részét már közöltük ([1, 2, 4, 6-8, 12, 17, 18]) így e helyen ismét csak a legfontosabb megállapításokat emeljük ki:

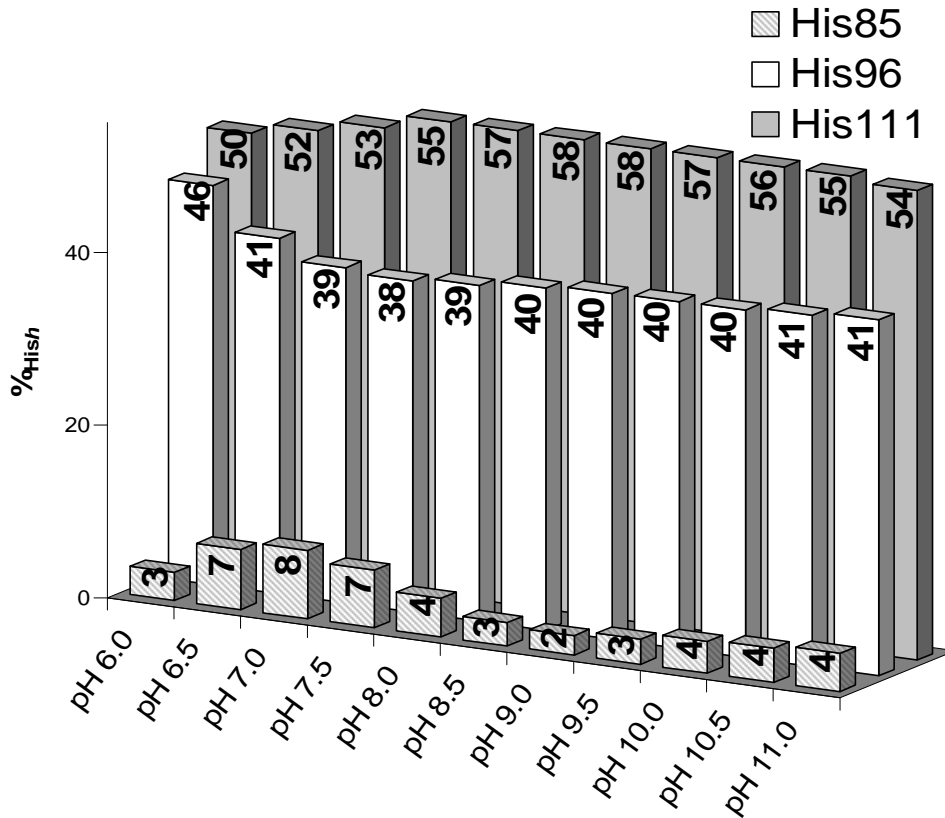
- A munka talán legfontosabb eredményének tekinthető, hogy az oktarepeaten kívüli hisztidinek szintén stabilisan köthetik a réz(II) ionot, sőt a kis peptid fragmensekkel

képződő komplexek stabilitása nagyobb, mint az oktarepeat monomereké [2, 8]. Ezt a jelenséget szemlélteti a 2. ábra, amelyen a H96 és az oktarepeat moner (pl. H85) rézmegekötőképességét hasonlítjuk össze. Az ábra alapján egyértelmű, hogy az összes réz mintegy 70-80 %-a a H96 hisztidinhez kötődik. Fontos azonban figyelembe venni, hogy ez az eloszlás akkor érvényes, ha a két hisztidin két független molekulában található. A fehérjében természetesen nem ez a helyzet, azaz az egyes hisztidinek közötti esetleges kooperativitás jelentősen megváltoztathatja a fémioneloszlást. A vizsgálatokat tehát olyan peptidekkel folytattuk, amelyekben az oktarepeat és azon kívüli hisztidinek egyaránt megtalálhatók, pl. HuPrP(84-114), stb.



2. ábra: A réz(II) – octarepeat monomer (A) – HuPrP(94-97) (B) rendszer pH-függő koncentrációeloszlása

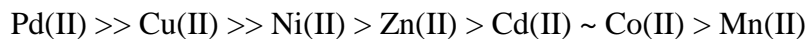
- A nagy tagszámú peptidekre (31-tagú) kapott eredmények szerint a peptidek annyi réz(II)iont képesek megkötni, ahány hisztidin található bennük, azaz valamennyi hisztidin független kötési helynek tekinthető. A koordinációs viszonyok megfelelnek az 1. pontban a kis molekulákra leírt tapasztalatoknak [12].
- Bár valamennyi hisztidin fémkötőhely, azok relatív betöltöttsége a koncentrációviszonyok és a pH függvénye. A 3. ábra A HuPrP(84-114) peptid fémioneloszlását mutatja a H85, H96 és H111 hisztidinek között. Egyértelmű, hogy a H111 koordináció preferált és az oktarepeat H85 a legkevésbé stabilis kötőhely.



3. ábra: A réz ion megoszlása a HuPrP(84-114) peptid 3 kötőhelye között.

2.b. A prion fehérje peptidfragmenseinek kölcsönhatása egyéb fémionokkal

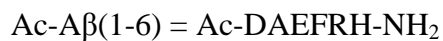
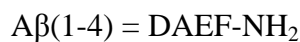
Ezt a kérdést korábban még alig tanulmányozták, ezért a vizsgálati körbe igyekeztünk minél több fémiont befoglalni. Ennek megfelelően vizsgáltuk a létfontosságú réz(II)-, cink(II)-, kobalt(II)-, mangán(II)- és nikkel(II)ionokat, valamint az erősen mérgező kadmium(II)- és palládium(II)komplexeiket is. A vizsgálatok eredményei alapján az alábbi stabilitási sor volt felállítható [8]:



Eredményeink szerint a prion fehérje peptidfragmensei elsősorban a Pd(II), Cu(II) és Ni(II)ionokkal létesítenek stabilis kölcsönhatást, míg az egyéb elemekkel való kölcsönhatásuk – beleértve a létfontosságú cink(II)ionokat is – nem számottevő. Ezen megfigyelés is alátámasztja, hogy a réz-prion kölcsönhatás biológiai szerepe kitüntetett és a cinkionok ezen a téren valószínűleg kevésbé fontos szerepet játszanak. A palládiummal való kiugróan stabilis kölcsönhatás viszont egyéb hisztidintartalmú peptidekkel is hasonlóan megvalósulhat, alátámasztván ezen fémion (és más soft fémionok) negatív élettani hatásait.

3. Az amyloid- β peptid fragmenseinek komplexképződési folyamatai

Az amyloid- β peptid egy 40-43 aminosavból álló polipeptid, amelynek aggregációját tartják felelősnek az Alzheimer-kór kialakulásáért. A peptid aminosav szekvenciája és a korábbi irodalmi vizsgálatok szerint is nyilvánvaló, hogy a molekula N-terminális része lehet alkalmas a fémionok megkötésére. Ennek megfelelően a fémkötő domaint modellező 16 aminosavból felépülő peptidet és annak különböző fragmenseit illetve mutánsait tanulmányoztuk. Az előállított peptidek az alábbiak voltak:

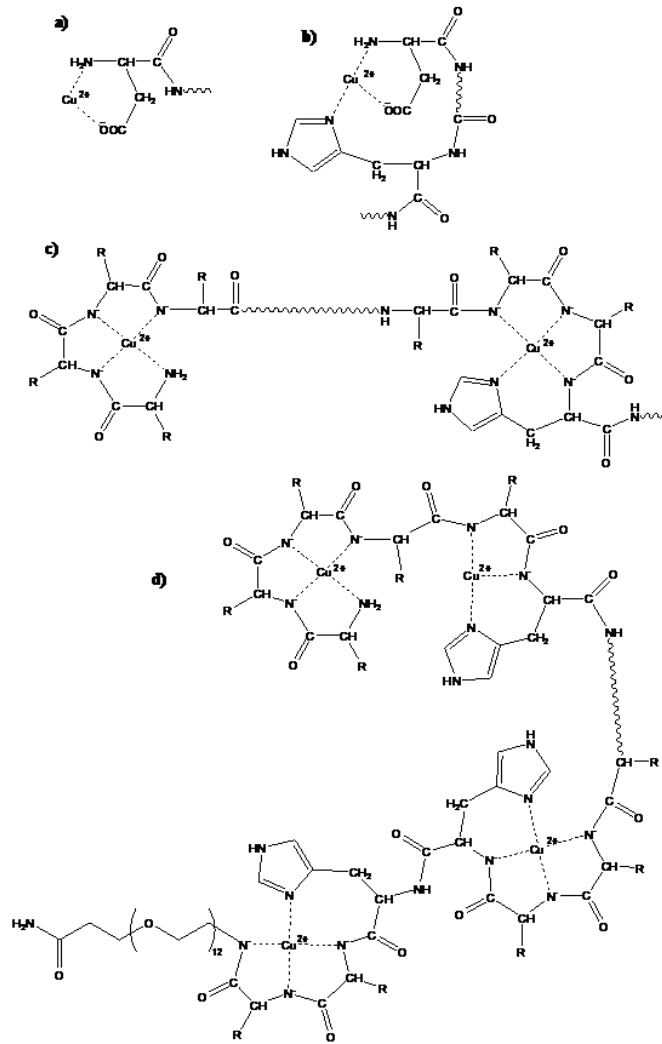


A nagyszámú és különböző típusú származék előállítását az tette szükségessé, hogy az alapvegyület, $A\beta(1-16)$, és főleg annak fémkomplexei igen rosszul oldódnak vízben, ami lehetetlenné teszi a koordinációs viszonyok pontos meghatározását. A PEG (polietilén-glikol) konjugátum szintézise mind a ligandum, mind annak réz(II) komplexei esetén növelte az oldhatóságot megfelelő alapot teremtve az oldatszerkezeti vizsgáló módszerek alkalmazásához. Az $A\beta(1-16)$ peptid egyik legfontosabb jellemzője, hogy szabad aminoterminussal rendelkezik, ami jelentősen növeli a fémkötőképességét és egyben fokozza a kölcsönhatás bonyolultságát. A kis tagszámú fragmensek előállítása és vizsgálata így újabb egyszerűsített modellek alkalmazását jelentette. Egy további fontos jellemző, hogy a terminális amino és 3 oldalláncbeli hisztidin mellett ez a peptid további lehetséges funkciós csoportokat tartalmaz, mint az aszparaginsav, glutaminsav és tirozin. A tirozin/alanin mutáns vizsgálatával ($A\beta(1-16)Y10A$) a tirozin fenolos-OH csoportjának lehetséges koordinációjáról kívántunk információt szerezni.

A réz(II)- $A\beta(1-16)$ rendszer vizsgálata során elért főbb eredményeket már közöltük ([13, 14, 17, 18]) és a fontosabb megállapításokat az alábbiakban rögzítjük:

- A hexadekapeptid $A\beta(1-16)$ rendkívül nagy affinitást mutat a réz(II)ionok irányába és a lehetséges különböző összetételű komplexek száma igen nagy. A fontosabb részecskék kötésviszonyait a 4. ábrán tüntettük fel.
- Valamennyi kísérleti adat egyértelműen alátámasztja, hogy az N-terminális aszparaginsav amino- és karboxilátcsoportja az elsődleges fémkötőhely (lásd 4.a. szerkezet). A pH növelésével, de még savas közegben a hisztidin imidazol-N

donoratomjai is részt vesznek a komplexképzésben makrokelátok formájában (4.b. szerkezet)



4. ábra: A Cu(II) – Aβ(1-16) rendszerben képződő főbb részecskék koordinációs viszonyai

- A pH további növelésével elkezdődik az amidcsoportok deprotonálódása és fémion koordinációja. Ehhez a reakcióhoz a terminális aminos csoport valamint a His6, His13 és His14 aminosavak egyaránt horgonyként szolgálhatnak, ami többmagvú komplexek kialakulását is lehetővé teszi (4.c. szerkezet).
- Az előző pontban említett funkciós csoportok független kötési helyet képviselnek, ezért egyetlen hexadekapeptid 4 ekvivalens réz(II)ion megkötésére is képes lehet (4.d szerkezet).
- Az 1:1 összetételű komplexnek számos koordinációs izomerje lehetséges, de a cirkuláris dikroizmus spektrumok analízise alapján a terminális aminos csoport kitüntetett szerepét a teljes pH tartományban valószínűsíthetjük.

- Az A β (1-16) és A β (1-16)Y10A peptidek vizsgálati eredményeinek összevetése alapján egyértelműen kijelenthetjük, hogy a tirozin aminosav fenolos-OH csoportja nem fémkötőhely.
- Az A β (1-16) és kisebb fragmensei cink(II)komplexeinek vizsgálatát ugyancsak elkezdtük. Az előzetes eredmények alapján nyilvánvaló, hogy ennek a peptidnek a cinkion affinitása sokkal nagyobb, mint a szokásos hisztidintartalmú peptideké, beleértve a prion fehérje peptidfragmenseit is. A kölcsönhatások bonyolultsága miatt azonban ezen rendszerben lezajló komplexképződési folyamatok teljes feltárása már csak egy következő kutatási fázisban lehetséges.

Végezetül szükségesnek tartjuk megemlíteni, hogy pályázat sikere szempontjából alapvető jelentősége volt azoknak a nemzetközi együttműködéseknek, amelyek a peptidek szintézise illetve egyes szerkezetvizsgáló módszerek alkalmazása során valósultak meg. A szintetikus munkában elsősorban a görögországi Ioannina és az olaszországi Catania egyetemeinek munkacsoportjaival alakítottunk ki szoros munkakapcsolatot, míg a CD illetve ESR spektroszkópiás mérések tekintetében az olaszországi Catania illetve Sassari Egyetemekkel működünk együtt. Fontos továbbá kiemelni, hogy a munka során és annak eredményeinek felhasználásával 3 PhD értekezés és 5 vegyész diplomamunka készült.