

Zárójelentés az OTKA K-63606 sz. pályázat eredményeiről

I. Elméleti számítások alapján úgy terveztünk meg két, a borsav foszfatáz enzimek aktív centrumát modellező peptidet (YKDPPTDHLQDVLDPHHN = L1 és DPPQVPHLYGLFQINDTVH-GCCHN = L2), hogy azok már a fémionok távollétében is az azok megkötéséhez szükséges konformációt alakítsák ki. A két peptidet mind kémiai, mind biológiai úton előállítottuk. Az utóbbi esetben a termék egy módosított glutation-S-transzferáz fehérje mely a C terminális részen tartalmazza a célpeptidet. E módosított fehérjék fémkötő tulajdonságait távoli UV-CD, valamint fémion-affinitás kromatográfia segítségével tanulmányoztuk. Kimutattuk fenti szekvenciák szerepét a cink(II) ionoknak e módosított fehérjékhez való kötődése során. Vizsgálatainkat a fúziós fehérjét nem tartalmazó peptidek előállításával és tanulmányozásával folytattuk. pH-metriás és CD vizsgálatokkal igazoltuk a célvegyület, a kétmagvú Zn(II)-Fe(III) komplex képződését [2].

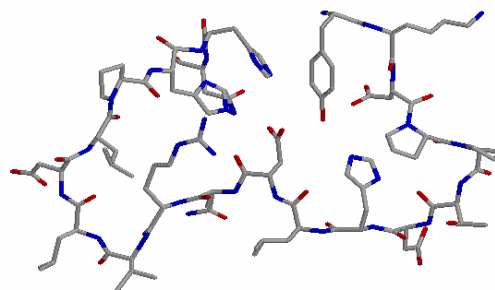


Fig. 1. The proposed structure of L1 peptide able to perform two adjacent metal ion binding sites with an aspartic acid side-chain between them.

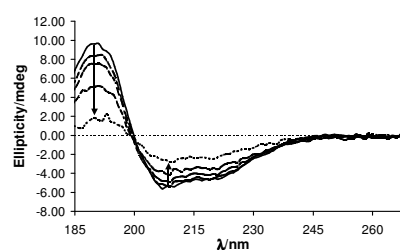
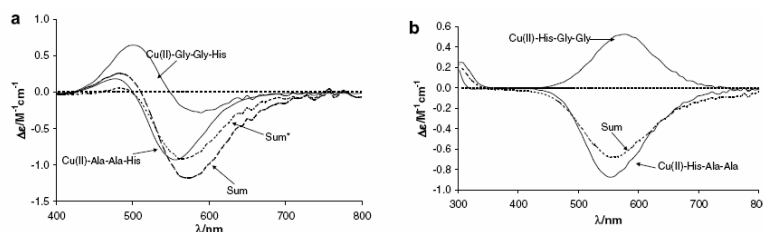


Fig. 6. SRCD spectra of the GST-L1 protein in the presence of increasing Zn(II) concentration. The metal ion to protein molar ratios were: 0:1 (solid line) 2:1, 10:1, 21:1 and 500:1.

II. A bonyolultabb peptidmolekulák oldatainak vizsgálata számos új kihívást jelentett, főként a rendelkezésre álló kis anyagmennyiségek miatt. Az oldatbeli szerkezetvizsgáló módszerek közül különös jelentőséggel bír a CD spektroszkópia, mely mind a ligandum, mind pedig a fémionok viselkedésére információt nyújthat. Vizsgáltuk az egyszerű hisztidintartalmú (acetilezett) peptideken keresztül az aminosav oldalláncok hatását a CD spektrumok látható tartományába eső d-d átmenetekre. A hisztidinben lévő oldallánc koordinációja a peptidkomplexekben jelentős királis hozzájárulást eredményez, ami minden esetben pozitív (illetve kevésbé negatív) Cotton-effektusban nyilvánult meg, és a spektrumok alakja a hisztidinnek a szekvenciában elfoglalt helyével jelentősen változott.

Fig. 7. The additivity of the molar CD spectra for CuH₂L complexes in (a) copper(II)-Xaa-Xaa-His systems (where SUM stands for the spectral sum of CuH₂L complexes of Ala-Gly-Gly, Gly-Ala-Gly and Gly-Gly-His, while in creating the SUM* the CD spectra of the appropriate Ala-Gly-Gly, Gly-Ala-Gly complexes were corrected for the wavelength and intensity according to the visible wavelengths and molar absorbance differences compared to the Gly-Gly-His complex) and (b) copper(II)-His-Xaa-Xaa systems (where SUM stands for the spectral sum of CuH₂L complexes of Gly-Gly-Ala, Gly-Ala-Gly and His-Gly-Gly).



Érdekes megfigyelés volt, hogy a koordinációs szférában lévő ligandumok kölcsönhatása további királis hozzájárulásokat eredményez. A hisztidint az N-terminális végükön tartalmazó peptidek esetében általános jelenség, hogy a hisztamin-típusú koordinációjú biszkomplexek CD jelének intenzitása mintegy egy nagyságrenddel nagyobb, mint a monokomplexeké. Mivel mindkét ligandum csak az imidazol-nitrogénjével és a terminális aminosoportjával

koordinálódik, a jelenség azzal magyarázható, hogy a biszkomplex stabilis cisz-izomerében az egymáshoz közel kerülő imidazolgyűrűk szterikus okokból az ekvatoriális síkból propellerszerűen kifordulnak. E magyarázat helytállóságát szemiempirikus számítások, illetve egykristályszerkezet is alátámasztotta. A fenti eredményeket kellő körültekintéssel alkalmazva, pontos oldategyensúlyi vizsgálatok és számított egyedi CD spektrumok alapján néhány bonyolultabb réz(II)-komplex oldatbeli szerkezetére is jó becslést adhatunk [3].

III. A korábban általunk (is) vizsgált N-Ac-HHGH peptid kedvező sajátságainak továbbfejlesztése érdekében előállítottuk a prolin tartalmazó N-Ac-HPHH-NH₂ (L3) peptidet, vizsgáltuk kölcsönhatását Ni(II), Cu(II) és Zn(II) ionokkal, és a komplexek enzimutánzó sajátságait. Zn(II) jelenlétében pH 7 körül, a ZnL komplex képződése után, csapadékképződést tapasztaltunk. A {3N_{im}} koordinációjú NiL részecske meglepően széles pH-tartományban domináns részecske s csak pH 9 felett alakul át a síknégyzetes NiH₂L

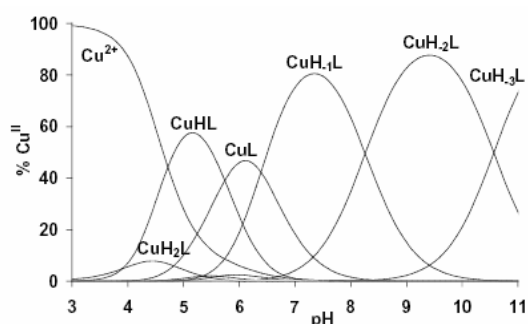
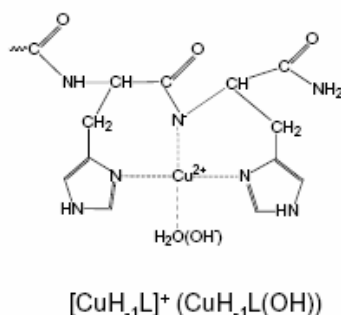


Fig. 1. Species distribution diagram for the copper(II):HPHH systems. $c_{\text{Cu}^{2+}} = c_{\text{L}} = 8.0 \times 10^{-4} \text{ M}$; ($I = 0.1 \text{ M NaCl}$, and $T = 298.0 \pm 0.1 \text{ K}$).



Scheme 1. The schematic drawing of the solution structures of major copper(II) complexes of HPHH ligand.

komplexszé. Cu(II) jelenlétében pH 6-8 között előbb az amid-koordinált CuH₁L majd a CuH₁L(OH) vegyes hidroxokomplex válik dominánssá. E két részecske multifunkcionális katalitikus sajátságot mutat, hiszen hatékonyan elősegítik a szuperoxidgyök diszproporció-ját, a di-tercbutil-pirokatechin O₂ általi oxidációját, valamint a 2-hidroxi-propil-4-nitrofenil-foszfát átészterezési reakcióját is [4].

IV. A HXH szekvenciát tartalmazó peptidok nagy stabilitású {N_{im},N⁻,N⁻,N_{im}} koordinációjú réz(II) komplexeket képeznek pH 7 körül, ami megakadályozza a metalloproteinekre oly jellemző {3N_{im}} kötés mód dominanciáját. Ennek kiküszöbölése volt célunk az N-Ac-HPHPH-NH₂ (L4) peptid előállításával, azonban pH 7 felett mind réz(II), mind cink(II) jelenlétében vegyes hidroxokomplexek váltak ki az oldatból. A komplexek oldhatóságának növelése érdekében előállítottuk a poláros láncvégi aminosavakat tartalmazó N-Ac-KHPHPHQ-NH₂ (L5) peptidet. Ez már a teljes pH-tartományban vízoldható komplexeket eredményezett mindkét fémionnal, és a semleges pH-tartományban

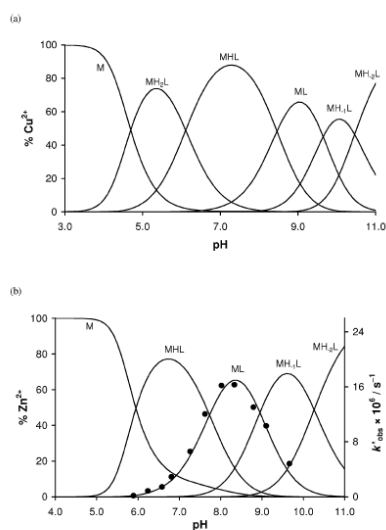
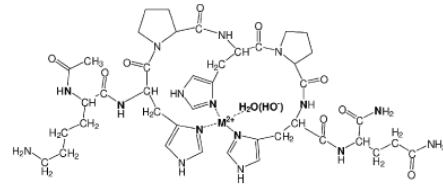


Fig. 2. The speciation diagrams of the (a) copper(II)- and (b) zinc(II)-L2 systems. $1.1 \times c_{\text{Cu}^{2+}} = c_{\text{L}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; $I = 0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$; $T = 298 \text{ K}$, the charges of the species—similarly to the text—are neglected for the reason of simplicity. The circles in (b) represent the profile of the obtained pseudo-first order rate constants (k'_{obs} is a corrected value by pH-dependent rate constants referring to the autohydrolysis of the substrate) in the hppp hydrolysis assay.

valóban nem tapasztaltunk amid-deprotonálódást. Ismereteink szerint ez volt az első kisméretű peptid amely, a semleges pH tartományban $\{3N_{im}\}$ koordinációjú MHL komplexek kialakulása révén képes oldatban tartani mind a réz(II), mind a cink(II) ionokat. Ez a számos metalloenzim aktív centrumára emlékeztető kötőhely azok funkcionális modelljeként is

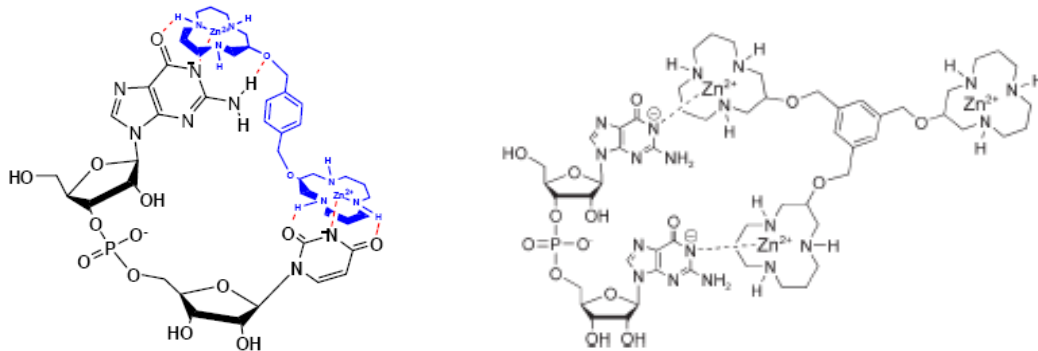
szolgál, hiszen a pH 7-9 között képződő $\{3N_{im}\}$ ill. $\{3N_{im},OH^-\}$ koordinációjú CuHL és CuHL(OH) komplexek jelentős SOD aktivitással rendelkeznek. Ugyanakkor a $\{3N_{im},OH^-\}$ donorcsoportokkal bíró ZnHL(OH)

részecske mind egy aktivált foszforsavdiészter, mind egy cirkuláris DNS jelenlétében (a protonált lizin elősegítheti a DNS-hez való kötődést) jelentős nukleáz aktivitást mutatott [5].



Scheme 1 The schematic structure of the $\{3 \times N_{im}\}$ coordinated metal complexes with L2 ligand. The central part of the Scheme can also be applied for L1 complexes and shows either a coordinated water or hydroxide ion in the fourth equatorial position. The amide nitrogens at the N- and C-terminus of L2 peptide that are in favourable positions for deprotonation in basic solutions are also highlighted in bold.

V. Vizsgáltuk 1,4-bisz[(1,5,9-triazaciklo-dodekán-3-iloxi)metil]benzol (L6) és az 1,3,5-trisz[(1,5,9-triazaciklododekán-3-iloxi)metil]-benzol (L7) zinc(II) komplexeit s azok RNáz aktivitását. Fémion felesleg esetén L6 kétmagvú, míg L7 hárommagvú komplexek kialakítására is alkalmas. Eredményeink szerint L6 kétmagvú cink(II) komplexe meglepően nagy stabilitással képes megkötödni két szomszédos guanin bázishoz koordinatív és H-hidas kölcsönhatások révén. Hidrolitikus hatása viszont épp két szomszédos guanin bázist tartalmazó szubsztrátok esetén (pl. 5'-GpG-3') a legkisebb. E szubsztrát hidrolízisét viszont jelentősen elősegíti L7 hárommagvú cink komplexe. Ennek magyarázata, hogy két Zn-makrociklus alegység szelektíven megkötődik a két szomszédos guanin bázison, így a harmadik Zn-makrociklus már ideális pozícióban lesz a bázis-szelektív hidrolízis elősegítéséhez [6].



VI. Néhány Gram-negatív patogén baktérium Cu,Zn-SOD enzimje egy hisztidinben gazdag N-terminális toldalékot tartalmaz, amelyről feltételezhető, hogy szerepet játszik az enzim Cu(II)-felvételében. Termodinamikai adatokkal próbáltuk alátámasztani ezt a feltételezést, ezért vizsgáltuk a H. ducreyi Cu,Zn-SOD N-terminális részletének (HGDHMHNDTK, L8) Cu(II)- és Zn(II)-komplexeit.

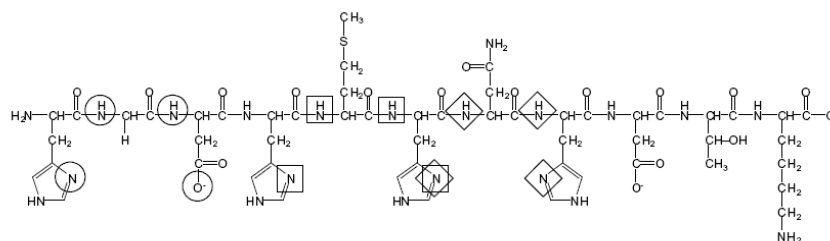


Fig. 9. Schematic structure of L8, and the three major metal binding sites (denoted by ◻, ◊ and ◉) of the CuHL₁L isomers.

Cu(II) jelenlétében rendkívül stabilis, vízzoldható egy-, két és hárommagvú komplexek képződnek. Cu/L=1/1 aránynál pH 7-8 között a {NH₂,3N_{im}} koordinációjú CuHL komplex dominál (Cu²⁺ + HL = CuHL, logK = 11.73). Ismereteink szerint az összes eddig vizsgált peptid közül L8 köti, oldallánci csoportjai által legerősebben a rezet a fiziológias pH-n. Kétszeres fémeleslegnél pH = 7 körül a {NH₂,N_{im},COO⁻}+{N_{im},2N⁻,N_{im}} koordinációjú Cu₂H₁L komplex az uralkodó. Cink jelenlétében szintén nagy stabilitású komplexek képződnek (pl. Zn²⁺ + HL = ZnHL, log K = 8,84), így a rézhez hasonlóan pH 7 körül a cinket is ez a szekvencia köti a legerősebben, oldallánci csoportjai által, az irodalomban eddig vizsgált peptidek közül. NMR vizsgálataink alapján a ZnHL komplex {NH₂,3N_{im},S_{Met},COO⁻} koordinációjú, míg a ZnL esetén nyolc donorcsoport is kötődik (NH₂,4N_{im},S_{Met},COO⁻,OH⁻), így valószínűleg izomerek képződnek.

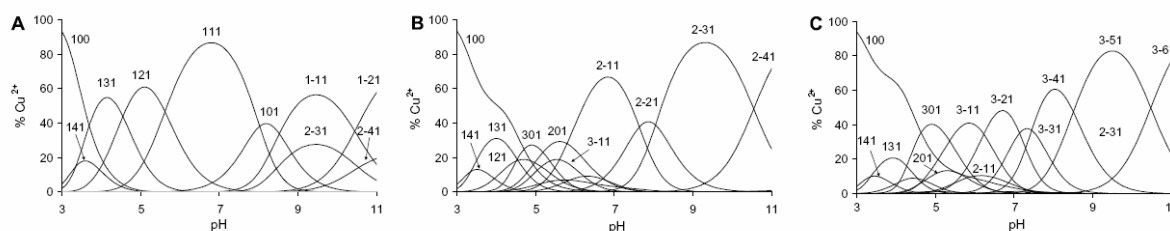
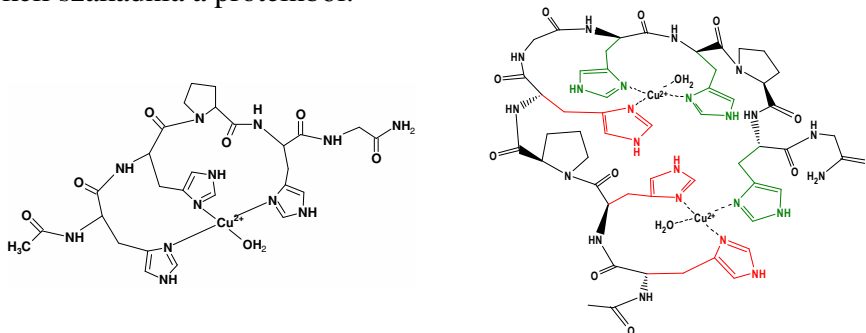


Fig. 6. Speciation diagrams of the copper(II)-L system. [Cu²⁺]_{tot}/[L]_{tot} = 1/1 (A), 2/1 (B) and 3/1 (C). [L] = 0.001 M, T = 298 K, I = 0.1 M NaCl, the species are denoted by their pqr numbers.

A peptid rendkívül nagy fémion affinitása megközelíti a bakteriális réz-, és cinktartalmú fehérjékét, ami megerősíti az N-terminális hisztidinben gazdag domén feltételezett réz(II) chaperon funkcióját, és hasonló szerepet sejtet a cink esetén is (lásd még XIII). Ez a baktérium túlélési esélyeit javítja fémion hiányos környezetben (általában jellemző a gazdaszervezetekre). Érdekes módon a CuHL komplex jelentős SOD-aktivitást mutat pH 7,4-nél, ami a natív enzim ~ 5%-a. Ez a tapasztalat felvetheti az N-terminális domén alternatív funkciójának lehetőségét is, mint átmeneti, kis aktivitású katalitikus centrum [7].

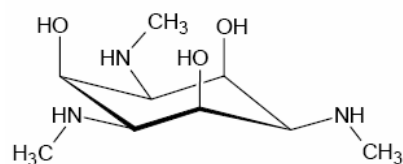
VII. A HRG egy a vérplazmában viszonylag nagy mennyiségben megtalálható fehérje. Az emberi HRG több doménből épül fel. A központi hisztidin-gazdag régió két prolinban gazdag régió között helyezkedik el, s benne 12-szer ismétlődik a HHPHG szekvencia. Sajátos, több alegységből felépülő szerkezetének köszönhetően a HRG biológiai funkciói is változatosak. Szabályozó szerepet játszik a véralvadás, vérrögképződés és vérrögoldódás, leukocitavándorlás, érképződés (angiogenesis), daganatok áttételeződése és fejlődése során, sőt antibakteriális és gombaölő hatással is rendelkezik. HRG erős kölcsönhatásba kerül több kétértékű fémionnal, főként cinkkel, ami számos esetben szükséges az adott feladat ellátásához. Az antiangiogén, antibakteriális és gombaölő aktivitás is a HRR-hez rendelhető. Az antiangiogén hatás kifejtéséhez elengedhetetlen a HRR szakasz kiszakadása a fehérjéből. Munkánk során vizsgáltuk az ismétlődő pentapeptid (N-Ac-HHPHG-NH₂, L9) és annak dimerjének (N-Ac-HHPHGHPHG-NH₂, L10) (kölcsönhatását cink(II)- és réz(II)ionokkal. Eredményeink szerint a semleges pH-tartományban a monomernél az ML, míg a dimernél az M₂L komplexek dominálnak, melyekben a fémionok kizárólag a His oldalláncokhoz kötődnek. A két egységből felépített decapeptidben az első fémion a monomer pentapeptidhez képest eltérő módon, nagy valószínűséggel a (H)HPHG szakaszon koordinálódik. Ezt alátámasztják a módosított szekvenciájú hisztidin-prolin tartalmú peptidek cink(II)- és réz(II)komplexeinek részletes vizsgálatával nyert szerkezeti és stabilitási adatok is. Az első fémion koordinációja a decapeptidben olyan peptid konformáció változást eredményez, mely elősegíti a második fémion felvételét, és ez extra stabilizációt eredményez. Ez hasonló a natív HRG lépcsőzetes cink(II) megkötésében megfigyelt kooperatív hatáshoz, s annak

magyarázatául szolgálhat. Az Ac-HHPHG-NH₂ ligandum réz(II)ionok jelenlétében, lúgos pH-tartományban, a H-P közti peptidkötés hidrolitikus hasadásával fragmenseire bomlik, ami fontos lehet annak tükrében, hogy a HRG antiangiogén/antitumor hatásának kifejtéséhez a HRR-nek ki kell szakadnia a proteinből.



L9 egymagvú és L10 kétmagvú komplexének feltételezett szerkezete

VIII. Korábban vizsgáltuk az 1,3,5-trideoxi-1,3,5-trisz(dimetilamino)-cisz-inozitol (tdci) kétmagvú Cu(II) komplexeit, melyek rendkívül hatékonyan, közel 9 nagyságrenddel képesek foszforsavdiészterek hidrolízisét felgyorsítani. Jelen projektben a ligandum kevésbé rigid monometil származékát 1,3,5-trideoxi-1,3,5-trisz(metilamino)-cisz-inozitol (tmci, L11) vizsgáltuk. A két ligandum hasonló koordinációs sajátosságokkal, viszont alapvetően eltérő katalitikus tulajdonságokkal bír. Míg a tdcí komplexek hatása szelektív a foszforsavdiészterekre, addig a tmci komplexei szelektíven hidrolizálják a foszforsavmonoésztereket. A kétmagvú Cu₂H₃L komplex közel 6 nagyságrenddel és gyorsítja meg a 4-nitrofenil-foszfát hidrolízisét, egyedülállóan nagy érték kétértékű fémionok komplexeinek körében [9]. Kinetikai vizsgálataink egy érdekes jelenségre, az ún. szubsztrát inhibícióra utalnak, ami ugyan gyakori enzimeknél, de nagyon ritkán jelentkezik biomimetikus modelleknél. Ennek oka a foszforsavmonoészterek viszonylag erős koordinációs sajátosságaira vezethető vissza. Ez utóbbi jelenségről egy későbbi közleményben fogunk beszámolni.



Scheme 1. The structure of tmci.

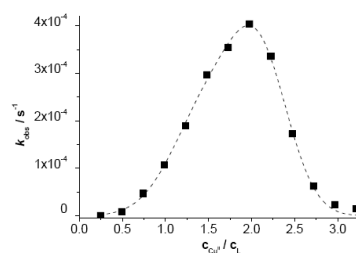


Figure 1. k_{obs} values for the hydrolysis of NPP as a function of copper(II)-to-tmci ratio (pH = 7.8, $c_{\text{tmci}} = 4.5 \times 10^{-4}$ M, $c_{\text{NPP}} = 1.25 \times 10^{-4}$ M, $T = 298$ K, the dashed line simply connects the points to show the tendency).

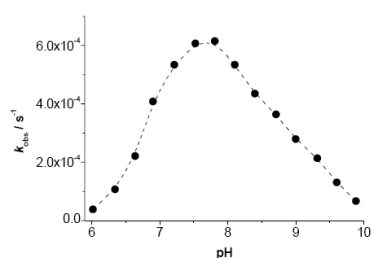
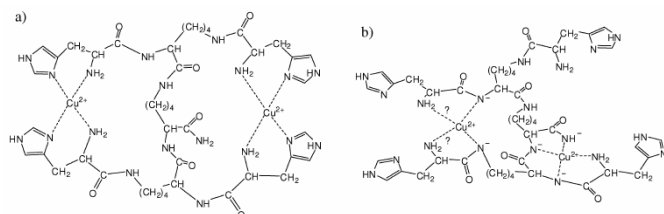


Figure 2. pH-dependence of the k_{obs} values for the hydrolysis of NPP in the copper(II) – tmci 2:1 system ($c_{\text{NPP}} = 1.25 \times 10^{-4}$ M, $c_{\text{tmci}} = 5.0 \times 10^{-4}$ M, $T = 298$ K, the dashed line simply connects the points to show the tendency).

IX. A multihisztidin tartalmú aktív centrumok modellezése céljából előállítottunk két elágazó láncú peptidet ((NH₂-His)₄-(Lys)₂-Lys-CONH₂, L12 és (N-Ac-His)₄-(Lys)₂-Lys-CONH₂, L13). E peptidek képesnek bizonyultak két ekvivalens fémion (réz(II) és cink(II))

megkötésére is pH ~ 7 körül, anélkül, hogy amid-nitrogén deprotonálódást tapasztaltunk volna. Bár e komplexek rendelkeznek DNáz aktivitással, az szerénynek mondható. Azonban az ilyen típusú ligandumok számtalan lehetőséget kínálnak a donoratomok számának és minőségének változtatására, így további ligandumok előállítását tervezzük egyéb funkciócsoportok beépítésével. Tanulmányoztuk a szilárd hordozóra rögzített L12 és L13 fémkötő hatását és DNáz aktivitását is. A 2008-as évben előállított két multihisztidin elágazó láncú peptidet ((NH₂-His)₄-(Lys)₂-Lys-CONH₂ és (N-Ac-His)₄-(Lys)₂-Lys-CONH₂) tovább tanulmányoztuk, egyrészt szilárd hordozóra rögzítve, másrészt réz(II) és cink(II) ionok együttes jelenlétében. Mind a rögzített komplexekről, mind pedig a fémionokat vegyesen tartalmazó komplexekről megállapítottuk, hogy DNáz aktivitásukat tekintve hatékonyabb modelleknek bizonyultak, mint az eddigiekben tanulmányozott homonukleáris rendszereink. A továbbiakban ezen biztató eredmények nyomán egyrészt az elágazó láncú peptid lánc hosszának, valamint a donorcsoportok célzott változtatásával próbálunk meg hatékonyabb, illetve szelektív komplexeket előállítani [10].



Scheme 1 The schematic structures of the complexes of the (His)₄-(Lys)₂-Lys-CONH₂ ligand formed under different conditions. (a) [Cu₂L]²⁺, (b) [CuLH₂]⁺. In the latter, one of the metal ions is coordinated by the amino and three deprotonated amide nitrogens as in the [CuLH₂]⁺ species, while the second metal ion is surrounded by two deprotonated amide and two amino nitrogens. The question marks symbolize the ambiguity of the latter groups since imidazole nitrogens are also available for coordination.

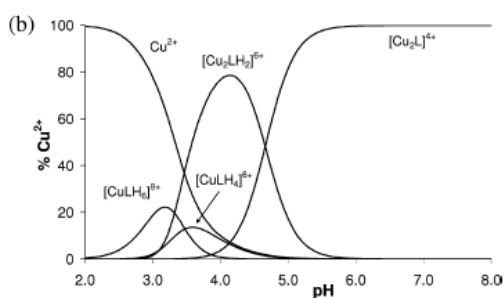
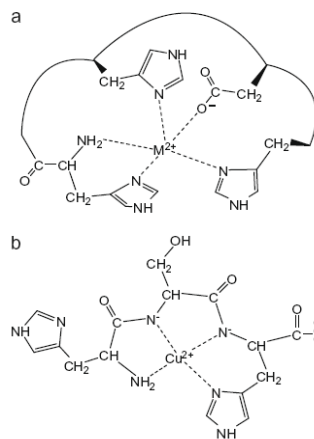


Fig. 3 The speciation diagrams of the copper(II) containing systems: $c_{Cu^{2+}} : c_L = 1 : 1$ (a) and $2 : 1$ (b). $c_L = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$; $I = 0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$; $T = 298 \text{ K}$.

X. Előállítottuk a humán endosztatin N-terminális cinkkötő szekvenciáját (HSHRDFQ-PVLHLVA-NH₂, L14). Ez a 183 aminosavból álló fehérje antiangiogén hatása miatt fontos eleme az emberi szervezet rákos betegségek elleni természetes védekező rendszerének. Az antiangiogén hatáshoz elengedhetetlen a fehérje N-terminális, az emlősök körében szigorúan megőrzött szekvenciájú végéhez kötődő cinkion. Meglepő módon az N-terminális 25-mer peptid Zn(II) jelenlétében azonos antiangiogén hatással bír, mint maga a fehérje. Minthogy a 12-25 szekvenciában csak alifás aminosavak találhatóak, vizsgálatunkat a fenti undekapeptidre korlátoztuk. Potenciometriás, 1D és 2D NMR vizsgálataink szerint a semleges pH-tartományban a ZnL komplex domináns az oldatban, amelyben a lehetséges öt donorcsoport mindegyike koordinálódik a fémionhoz. A komplex stabilitási állandója nagynak mondható ($\log K = 6.1$), de L14 fémkötő képessége messze elmarad a sejten kívüli térben megtalálható egyéb cinkkötő ligandumok cink-affinitásától. Minthogy cink jelenléte szükséges volt a peptid antiangiogén hatásának kiváltásához, és a hatást az endothél sejt felszínén való megkötődéssel értelmezték, elképzelhető, hogy a cinknek szerkezetépítő szerepén túl más funkciója is van, pl.



Scheme 1. Schematic structure of [ZnL]⁺ (a (M = Zn)), and the two binding isomers of [CuL]⁺ (a (M = Cu) and b, see the text).

részt vesz a sejt felszínén való megkötődésben, s az így kialakuló terner komplex már nagyobb stabilitással kötheti a cinket.

Munkánk során a L14 rézkötő képességét is vizsgáltuk, ui. L14-ben megtalálható az a N-terminális XYH szekvencia, amely pl. a humán szérum albuminban is nagy affinitású rézkötő-helyként szolgál. E tekintetben fontos megemlíteni, hogy a réz serkenti az angiogenezist (érképződést), az endothél sejtek migrációját, szükséges a tumorsejtek számos angiogén faktorának kiválasztásához. A réz(II) megkötése, koncentrációjának csökkenése megakadályozza egy sor ilyen faktor termelődését, ami közvetve az érképződés gátlását, azaz rákellenes hatást eredményez. Vizsgálataink szerint a peptid rendkívül nagy affinitással köti a réz(II) iont is (közel 300-szor erősebben, mint maga a szérum albumin), pH 5-10 között a $\{NH_2, N^-, N^-, N_{im}\}$ koordináció egyeduralgódó az oldatban. Ez a megfigyelés biológiai szempontból is releváns lehet, és arra utal, hogy az endosztatin két módon is elérheti antiangiogén hatását, egyrészt az endothél sejt felszínén való megkötődéssel, másrészt a réz(II) megkötésével [11].

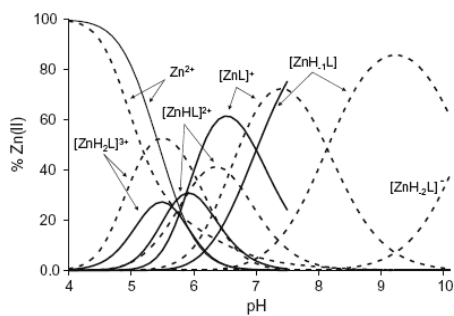


Fig. 1. Speciation diagram of the zinc(II)-L system in water (continuous line) and in DMSO (dashed line) ($[L]_{tot} = 2 \times [Zn^{2+}]_{tot} = 1.0 \times 10^{-3}$ M, $T = 298$ K, $I = 0.1$ M NaCl).

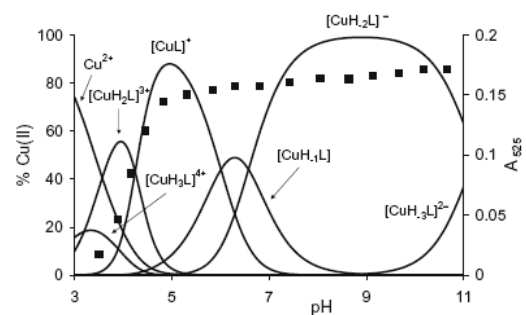


Fig. 3. Species distribution profile in the equimolar copper(II)-L system, and the intensity of the vis spectra at 525 nm as a function of pH ($[Cu^{2+}]_{tot} = [L]_{tot} = 1.0 \times 10^{-3}$ M, $T = 298$ K, $I = 0.1$ M NaCl).

XI. Eredményeinkről (egyéb irodalmi adatok mellett) egy tudományos ismeretterjesztő folyóiratban [1] és egy könyvfejezetben számoltunk be [12].

XII. A 4. aminosav pozícióban His-t tartalmazó fehérjék fémkötő sajátosságainak leírásával már több modell vizsgálat foglalkozott, de azok ellentmondó következtetésre jutottak az imidazolgyűrűnek a koordinációban való részvételéről, ezért előállítottuk a Gly-Gly-Gly-hisztamin (L15) és Boc-Gly-Gly-Gly-hisztamin (L16) pseudopeptideket, és vizsgáltuk kölcsönhatásukat Ni(II)-vel és Cu(II)-vel. L15 peptid ML komplexeinek nagyobb stabilitása egyértelműen mutatja (a korábbiakhoz hasonlóan) a $\{NH_2, N_{im}\}$ makrokelát kialakulását. A CuL komplex egy eddig még le nem írt dimer komplexen ($Cu_2H_2L_2$) keresztül alakul át a CuH_2L részecskébe. Az irodalmi ellentmondások leginkább ennek a komplexnek a szerkezetét érintik.

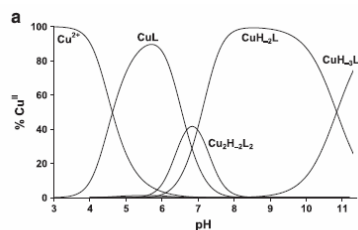


Fig. 2. Species distribution diagram for the copper(II)-GGGHa 1:1 (a) and 1:4 (b) systems. $Cu^{2+} = 3.0 \times 10^{-3}$ M ($I = 0.1$ M NaClO₄, $T = 298$ K).

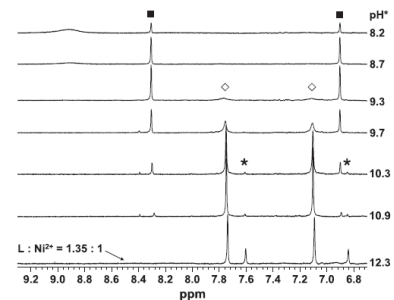
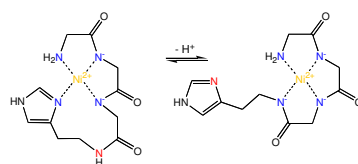


Fig. 8. Aromatic range of the pH-dependent 1H NMR spectra recorded in the nickel(II)-GGGHa 1:1.03 system in D_2O at $T = 298$ K ($C_{Ni^{2+}} = 5.29 \times 10^{-3}$ M). The three sets of the C^H and C^H imidazole signals belong to NH_2L (■), NH_2L (◇) and the small fraction of the free ligand (★). The last spectrum at $pH = 12.3$ was recorded in the presence of ligand excess ($C_{GGGHa} = 1.37 \times C_{Ni^{2+}} = 3.83 \times 10^{-3}$ M).

Az analóg Ni(II) komplex NMR vizsgálata egyértelműen egy $\{NH_2, N^-, N^-, N_{im}\}$ makrokelátot tartalmazó koordinációra utal e komplexben, s az imidazol gyűrű csak a következő lépésben, az $\{NH_2, N^-, N^-, N^-\}$ típusú MH_3L részecske képződése során szorul ki a koordinációs szférából. Magasabb pH-n a pirrolos nitrogén fémkoordináció nélküli deprotonálódását tapasztaltuk [13].

XIII. A ribozimok az RNS hasítására képes általános sav/bázis katalízist biztosító RNS molekulák. Ezen fémionok részvétele nélküli folyamat kémiai modellezésére már sok kísérlet történt, azonban ezekből, az igen csekély katalitikus hatás miatt, érdemleges következtetés nem vonható le a natív ribozimokra nézve. Munkánk során egy bisz(ciklén) származékot állítottunk elő (L17). Elgondolásunk szerint ennek kétmagvú cink komplexe bázis-szelektív módon képes megkötödni két szomszédos uridinhez, ezzel a molekula triazin centruma közel kerül a foszforsavdiészter kötéshez, s remélhetőleg általános sav/bázis katalízist biztosítva a ribozimokhoz hasonló módon, elősegíti az RNS hidrolízisét. A várakozásunknak megfelelően L17 nagy stabilitású kétmagvú Zn_2L komplexet képez a semleges pH tartományban. E kétmagvú részecske koordinatív és H-hidas kötések révén rendkívül stabilis, pH 7-10 között egyeduralgó terner komplexet képez az UpU-val (egyensúlyi méréseinket az UpU nem hidrolízis érzékeny 2'-O-metil származékával végeztük el), ugyanakkor az ApA-val nem alakít ki terner komplexet. További kinetikai vizsgálataink szerint Zn_2L jelentősen meggyorsítja az UpU, de semmilyen hatást nem gyakorol az ApA hidrolízisére. Ennek magyarázata, hogy a Zn_2L -UpU terner komplexben a triazin centrum ténylegesen képes a folyamat katalízisét, feltételezhetően a $2'-OH \rightarrow$ foszforán intermedier \rightarrow távozó csoport irányú proton-transzfer elősegítésével [14].

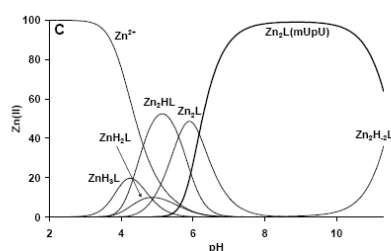
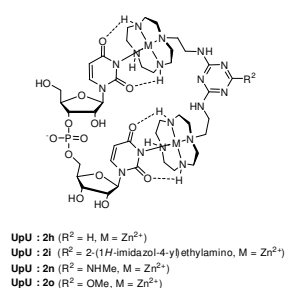


Figure 2. Species distribution curves for the $Zn^{2+}/L/mUpU = 1/1/0$ (A), $2/1/0$ (B) and $2/1/1$ (C) systems ($T = 25^\circ C$, $I(NaCl) = 0.1 \text{ mol L}^{-1}$, $[L] = 1 \text{ mmol L}^{-1}$).

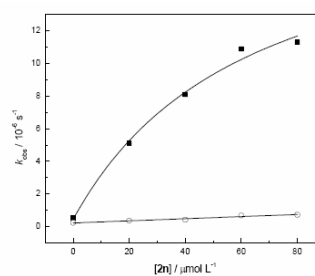
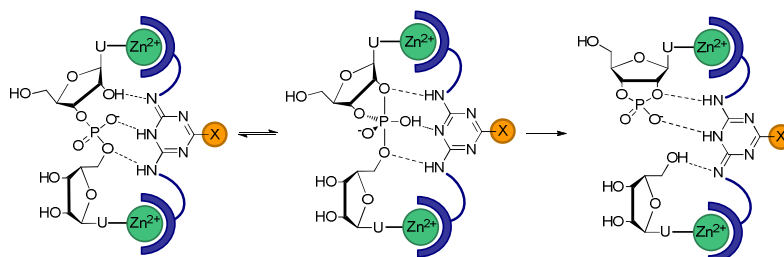
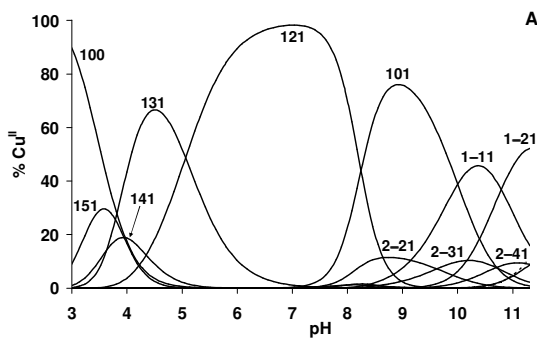


Figure 5. Pseudo first-order rate constants for the cleavage of UpU (■) and ApA (○) as a function of the concentration of the cleaving agent Zn at $90^\circ C$, $pH^* = 6.57$, $I(NaClO_4) = 0.10 \text{ mol L}^{-1}$, $[UpU] = [ApA] = 5.0 \text{ μmol L}^{-1}$.

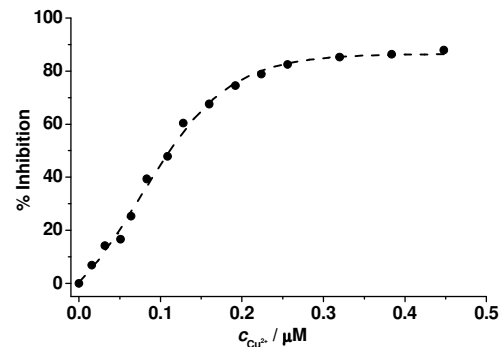


XIV. A VI. pontban említett H. ducreyi Cu,Zn-SOD enzim N-terminális fragmensével kapcsolatos vizsgálataink folytatásaként előállítottuk az A. pleuropneumoniae Cu,Zn-SOD-jának hasonló N-terminális peptidjét (HADHDKK-NH₂), s vizsgáltuk réz(II) és cink(II) kötő képességét. Azért választottuk ezt a szekvenciát, mert egy hisztidinnel kevesebbet tartalmaz L8 peptidnél, aminek – ha a chaperon funkcióra vonatkozó feltételezésünk igaz – nem szabadna tükröződnie fémkötő képességében. Eredményeink szerint, annak ellenére, hogy ez a szekvencia egy His alegységgel kevesebbet tartalmaz, egy nagyságrenddel

erősebben köti a réz(II) iont ($\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{L} = \text{CuH}_2\text{L}$, $\log K = 12.68$), mint az analóg H. ducreyi Cu,Zn-SOD fragmens. Ez a rendkívüli fémion-affinitás hasonló a réztartalmú bakteriális metalloproteinekéhez. Ez további igazolását adja, hogy ez a rövid, hisztidinben gazdag N-terminális szakasz 'chaperon'-ként működve szerepet játszik a fehérje rézfelvételében, ill. fémion-csapdaként működve annak megtartásában. Ugyanakkor a cink(II) ionokhoz több mint két nagyságrenddel kisebb affinitást mutat ($\text{Zn}^{2+} + \text{H}_2\text{L} = \text{ZnH}_2\text{L}$, $\log K = 6.58$), mint a H. ducreyi Cu,Zn-SOD fragmense. Eszerint az N-terminális fragmensnek a cink-felvételben betöltött szerepe biztosan nem általánosítható a hisztidinben gazdag N-terminális toldalékot tartalmaz Gram-negatív bakteriális Cu,Zn-SOD enzimek családjára. Ugyanakkor a semleges pH-n egyeduralkodó $\{\text{NH}_2, 3\text{N}_{im}\}$ koordinációjú réz(II) complex még a VI. pontban említettéknél is nagyon SOD-aktivitást mutat, ami tovább erősítheti az N-terminális domén alternatív funkciójának lehetőségét, mint átmeneti, kis aktivitású katalitikus centrum [15].



Speciation diagrams of the copper(II)-L system. $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tot}}/[\text{L}]_{\text{tot}} = 1/1$ (A), $[\text{L}] = 0.001 \text{ M}$, $T = 298 \text{ K}$, $I = 0.1 \text{ M NaCl}$.



Inhibition of the Nitroblue Tetrazolium (NBT) reduction by superoxide as a function of the concentration of copper(II) complexes ($[\text{Cu}^{2+}] = [\text{L}]$, 0.05 M phosphate buffer, $\text{pH} = 7.0$).

XV. A nagyobb méretű oligopeptidek biológiai módszerekkel történő előállítására használt GST fúziós fehérje gátolja a katalitikus funkció vizsgálatát. Ezért kísérleteinkben olyan vektort választottunk, melynek segítségével fúziós rész nélkül fejezhető ki a peptidek. Ekkor azonban a képződő peptid detektálása jelentett gondot, ill. a baktérium proteáz enzimjei elemésztették a célpeptideket. Ilyen jellegű kísérleteink során egy nagyobb peptidet, a Colicin E7 nukleáz HNH motívumát, aktív doménjét (kb. 5 kDa) állítottuk elő egy kisméretű fehérjéhez az ubikvitinhez (kb. 10 kDa) fuzionálva. A rekombináns Ub-HNH fehérjét E.coli baktériumból sikerült nagy mennyiségben kifejeznünk. A fehérje tisztítására három lépéses eljárást dolgoztunk ki, amellyel további vizsgálatokra is alkalmas tisztaságú fehérjeoldatot kaptunk. A cink(II)-Ub-HNH fehérje kölcsönhatást CD vizsgálataink igazolták. Bár az Ub-HNH fúziós fehérjéről igazoltuk cinkkötő képességét, a DNS-kötő és hidrolitikus kísérletekben ez a fehérje nem bizonyult aktívnak. Ezért megpróbáltunk egy olyan eljárást kidolgozni, melyben a rekombináns Ub-HNH fehérjét E.coli baktériumban nagy mennyiségben fejezzük ki, párhuzamosan egy olyan proteáz enzimmel, mely in vivo lehasítja az ubikvitin részt a termelődött fehérjéről. De csak az ubikvitint sikerült nagyobb mennyiségben kinyernünk. Így arra kényszerültünk, hogy az Ub-HNH fehérjét és a proteázát külön-külön kifejezve, tisztítás után a sejten kívül végezzük el a proteolitikus hasítást. Ezzel a módszerrel sikeresen előállítottuk magát a HNH fehérjét, melyet szintén SRCD és tömegspektrometriás vizsgálatoknak vetettünk alá. A cink(II)kötés igazolása után fluorimetriás, valamint gél-shift és nukleáz tesztekben vizsgáltuk hatását a DNS-re. Eredményeink azonban negatívnak bizonyultak. Hogy a HNH peptid, bár a megfelelő szerkezetet mutatja, mégsem működőképes, annak tulajdonítottuk, hogy nem köt a DNS-hez. Ezért előállítottuk a HNH motívumot a C-terminális részén tartalmazó Cole7 nukleáz domén

6 különböző mutáns változatát, melyek részben vagy egészben tartalmazták magát a nemspecifikus DNS-kötő helyet is. Azonban csak a teljes méretű doménnel sikerült nukleáz aktivitást kimutatni. Ez arra utalt, hogy a fehérje N-terminális része szükséges a HNH motívum aktivitásához, ami előrevetíti a továbbiakban egy biztonságos, biotechnológiai vagy terápiás célokra is használható mesterséges nukleáz előállításának lehetőségét [16].

Publikációs lista (az OTKA K-63606 megjelölésével)

1. Gajda T., Gyurcsik B: *Mesterséges enzimek*, 138, 41-44, 2007.
2. I.N. Jakab, Zs. Jenei, B. Gyurcsik, T. Gajda, T. Körtvélyesi, A. Mikulová, L. Rulíšek, T. Raskó, A. Kiss: *Design, synthesis and metal ion binding properties of a peptide mimicking the active centre of purple acid phosphatases*, Achievements In Coordination, Bioinorganic And Applied Inorganic Chemistry, 2007, 8, 80-90, 2007
3. N.I. Jakab, B. Gyurcsik, T. Körtvélyesi, I. Vosekalna, J. Jensen, E. Larsen: *Design of histidine containing peptides for better understanding of their coordination mode toward copper(II) by CD spectroscopy*, J. Inorg. Biochem. 101, 1376-1381, 2007
4. I.N. Jakab, O. Lőrincz, A. Jancsó, Tamás Gajda, B. Gyurcsik: *Approaching the minimal metal ion binding peptide for structural and*, Dalton. Trans. 6987-6995, 2008
5. N.I. Jakab, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer: *Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of N-acetyl-His-Pro-His-His-NH₂: equilibria, solution structure and enzyme mimicking*, J. Inorg. Biochem. 102, 1438-1448, 2008.
6. Q. Wang, E. Leino, A. Jancsó, I. Szilágyi, T. Gajda, E. Hietamaki, H. Lönnberg: *Zn²⁺ complexes of di- and tri-nucleating azacrown ligands as base moiety selective cleaving agents of RNA 3',5'-phosphodiester bonds: binding to guanine base*, ChemBioChem 9, 1739-1748 (2008).
7. Z. Paksi, A. Jancsó, F. Pacello, N. Nagy, A. Battistoni, T. Gajda: *Copper and zinc binding properties of the N-terminal histidine-rich sequence of Haemophilus ducreyi Cu,Zn superoxide dismutase*, J. Inorg. Biochem. 102, 1700-1710, 2008
8. A. Jancsó, A. Kolozsi, B. Gyurcsik, N.V. Nagy, T. Gajda: *Probing Cu²⁺ and Zn²⁺ binding affinity of histidine-rich glycoprotein*, J. Inorg. Biochem., 103, 1634–1643, 2009
9. A. Jancsó, I. Török, K. Hegetschweiler, T. Gajda: *Efficient and selective hydrolysis of 4-nitrophenyl phosphate by a dinuclear copper(II) complex*, ARKIVOC Part 3, 217-224, 2009
10. A. Kolozsi, I. Vosekalna, T. Martinek, E. Larsen, B. Gyurcsik: *Copper(II) and zinc(II) ion binding properties of a MAP type branched ligand with histidines as surface functionalities*, Dalton Trans., 5647–5654, 2009.
11. A. Kolozsi, A. Jancsó, N.V. Nagy, T. Gajda: *N-terminal fragment of the anti-angiogenic human endostatin binds copper(II) with very high affinity*, J. Inorg. Biochem. 103, 940-947, 2009.
12. B. Gyurcsik: *Chimeric Metallonucleases-Design, Realization and Applications*, In: Inorganic Biochemistry: Research Progress, Eds. J.G. Hughes and A.J. Robinson, Ch. 1, pp. 11-26, Nova Science Publishers, NY, ISBN: 978-1-60456-708-3, 2009, könyvfejezet
13. A. Jancsó, K. Selmecezi, P. Gizzi, N.V. Nagy, T. Gajda, B. Henry: *The role of terminal amino group and histidine at the fourth position in the metal ion binding of oligopeptides revisited Copper(II) and nickel(II) complexes of glycyl-glycyl-glycyl-histamine and its N-Boc protected derivative*, J. Inorg. Biochem. 105 (2011) 92–101.
14. T. A. Lönnberg, M. Helkearo, A. Jancsó, T. Gajda: *Mimics of Small Ribozymes Utilizing a Supramolecular Scaffold*, Dalton Trans., közlésre elfogadva, 2011

- 15.** D. Árus, A. Jancsó, D. Szunyogh, N.V. Nagy, T. Gajda: *On the possible multifunctional roles of copper(II)-bound N-terminal His-rich domains of Cu,ZnSODs of some Gram-negative bacteria*, J. Inorg. Biochem. (közlésre benyújtva), 2011
- 16.** H. Barát-Jankovics, N.I. Jakab, K. Sklarska-Kiss, A. Kiss, Z. Kele, B. Gyurcsik: *Synthesis, purification and metal binding studies of the HNH protein motif from Colicin E7*, J. Inorg. Biochem. (közlésre benyújtva), 2011