

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**FEHÉRJÉK FÉMIONKÖTŐHELYEIT
MODELLEZŐ PEPTIDEK
KOORDINÁCIÓS ÉS REDOXI
SAJÁTSÁGAI**

Csire Gizella

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin egyetemi tanár



Debreceni Egyetem
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2017

A tézisekben előforduló rövidítések magyarázata:

a, b, c	a peptid fragmentálódása során keletkező termék, amely az N-terminális felőli molekularészletet foglalja magába
Ac	acetilcsoport (védőcsoport)
ACN	acetonitril, CH ₃ CN
Ala, A	alanin
Asn, N	aszparagin
CD	cirkuláris dikroizmus
CV	ciklikus voltammetria
DIPEA	N,N-diizopropil-etilamin
DMF	N,N-dimetilformamid
DOTD	2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol
ESI	elektroporlasztásos ionizáció (ElectroSpray Ionization)
Fmoc	9-fluorenil-metoxi-karbonil (védőcsoport)
Gln, Q	glutamin
Gly, G	glicin
His, H	hisztidin
His-BIMA	hisztidil-bisz(2-imidazolil)-metil-amin
HOBt	N-hidroxi-benzotriazol
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High-Performance Liquid Chromatography)
Hu-PrP ^C	egészséges humán prion fehérje
HuPrP(84-114)H96A	Ac-PHGGGWGQGGGTASQWNKP-SKPKTNMKHMAG-NH ₂
Lys, K	lizin
MCO	fémionkatalizált oxidáció

Fehérjék fémionkötőhelyeit modellező peptidek koordinációs és redoxi sajátosságai

Met, M	metionin
MS	tömegspektrometria
N ⁻	deprotonált amidnitrogén
NBT	nitroblue-tetrazólium-klorid
NH ₂	aminocsoport
N(Im)	imidazolnitrogén
Pro, P	prolin
Sar	szarkozin
Ser, S	szerin
SOD	szuperoxid diszmutáz
TBTU	2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium tetrafluoroborát
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butil (védőcsoport)
TFA	trifluorecetsav
Thr, T	treonin
TIS	triizopropil-szilán
TOF	repülési idő (time of flight)
Trp, W	triptofán
UV-Vis	UV-látható spektrofotometria (UV-Visible)
Val, V	valin
x, y, z	a peptid fragmentálódása során keletkező termék, amely a C-terminális felőli molekularészletet foglalja magába

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITÚZÉSEK

Egyes fémionok létfontosságú szerepet játszanak az élő szervezet működésében. Funkciójukat tekintve több szerepet is betölthetnek: lehetnek szerkezetalkítók, aktiválhatnak enzimeket, katalizálhatnak reakciókat azáltal, hogy oxidációs állapotuk megváltozik a folyamat során. Továbbá az is ismert, hogy különböző idegrendszeri betegségekben (mint például az Alzheimer kór vagy a prion betegségek) fontos szerepet játszanak, különösképpen azok, amelyek redoxaktívak. Az élő szervezetben ezen fémionok megkötésére a legideálisabb ligandumok a fehérjék. A fehérjékben található aminosavak közül a hisztidin imidazolnitrogénje az, amely nagyon gyakran fémionok kötődési helye.

A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim és a humán prion protein (Hu-PrP^C) két eltérő funkcióban szerepet játszó (metallo)protein, de közös pont, hogy mindkettőben az imidazolnitrogén a horgonydonor, illetve, hogy mindkettő esetén a fémion kötődése Cu(II) formában kedvezményezettebb, ugyanakkor a Cu(II)/Cu(I) átalakulás is igen fontos szerepet játszik/játszhat a működésükben.

A Cu,Zn-szuperoxid-diszmutáz (Cu,Zn-SOD) enzim egy metalloenzim és az eukarióták sejtjeiben működik. Ezen enzim aktív centrumában egy Cu(II)- és egy Zn(II)-ion található. A Cu(II)-ion négy imidazolnitrogénhez, míg a Zn(II)-ion három imidazolnitrogénhez és egy aszparaginsav karboxilátcsoportjához kapcsolódik és a két fémiont egy imidazolátóhíd köti össze. Ez az enzim az élő szervezetben található szuperoxid-gyökionok bontásáért felelős. Az aktív centrumban található réz(II)ion vesz részt a káros gyökök bontásában, míg a cink(II)-ionnak szerkezetalkító szerepe van.

A másik fehérje a humán prion protein (Hu-PrP^C), amely tartalmaz egy PHGGGWGQ tartományt, ahol ez a szekvencia négyszer ismétlődik egymás után és ezt tartják a fő Cu(II)-ion kötőhelynek a fehérjében, bár ez a rész nem rendelkezik rendezett szerkezettel. A Hu-PrP^C réz anyagcserében betöltött funkciója még nem teljesen tisztázott. Korábban azt állapították meg, hogy részt vesz a réz szállításában, anyagcseréjében és védi a sejtet a

káros oxidatív hatásokkal szemben az intracelluláris SOD aktivitás szabályozásán keresztül. Mára inkább az a kép alakult ki, hogy redoxi szenzor és a feleslegben lévő Cu(II)-ionkat köti meg és védi a neuronokat az oxidatív károsodás ellen.

Ezenkívül ismert az is, hogy a fehérjék oxidációjáért mind a fémionok, mind a szabad gyökök együttesen felelősek, úgynevezett fémionkatalizált oxidációban (MCO) vesznek részt, ezzel károsítva a fehérjét. Emiatt elveszíthetik funkciójukat, nem tudják betölteni az élő szervezetben ellátott szerepüket. Továbbá proteázrezisztenssé is válhatnak, lerakódhatnak különböző szövetekben és tönkre tehetik azokat a szerkezetet, amelyekben felhalmozódtak, ez pedig nagy valószínűséggel betegségek kialakulásához vezet.

A fent említett fehérjéket mind szerkezetük megismerésében, mind funkciójukat tekintve kiterjedten vizsgálták már korábban különböző kutatócsoportok. A Debreceni Egyetem *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában* mindkét fehérje fémionkötőhelyeinek vizsgálata is a kutatási irányvonalak tárgyát képezik és ezen a két területen folyó kutatásokhoz kapcsolódott a doktori munkám.

Munkánk során célul tűztük ki:

- a humán prion fehérje 103-112 fragmensének és négy mutánsának szintézisét, Cu(II)- és Ni(II)-komplexeinek jellemzését,
- a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának modellezésére potenciálisan alkalmas terminálisan védett multihisztidin peptidek tervezését és szintézisét,
- a multihisztidin ligandumok Cu(II)- és Ni(II)-komplexei összetételének, stabilitásának és szerkezetének meghatározását,
- ugyanezen modellpeptidek Cu(II)-komplexeinek elektrokémiai vizsgálatát annak eldöntésére, hogy a komplexek alkalmas modelljei lehetnek-e a Cu,Zn-SOD enzimnek,
- a megfelelő elektrokémiai paraméterekkel jellemezhető Cu(II)-komplexek SOD aktivitásának megadását,
- a humán prion fehérje 103-112 fragmensének és mutánsainak oxidációs vizsgálatát, annak megállapítására, hogy a Cu(II)/H₂O₂ rendszer oxidálja-e a szekvenciában található oxidációra érzékeny hisztidin és metionin aminosavakat,

➤ ezen eredmények ismeretében annak feltárását, hogy milyen szerepet játszhatnak ezek a reakciók a prion betegség alakulásában.

II. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A vizsgált ligandumokat (*I. ábra*) mikrohullámú Liberty1 szilárdfázisú peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) állítottuk elő. Az N-terminális végen védett peptideket Fmoc/tBu technikával szintetizáltuk, amelyhez Rink Amide AM típusú gyantát használtunk, TBTU/HOBt/DIPEA aminosav aktiválást alkalmazva N,N-dimetilformamidos közegben. A peptidek gyantáról történő és az aminosavak oldalláncbéli védőcsoportjainak egyidejű hasítását TFA/H₂O/DODT/TIS elegyben 1-1,5 óra alatt végeztük el. A peptidek hideg éterben való kicsapását és centrifugálását követően azokat argon gáz alatt szárítottuk majd vízben oldás után liofilizáltuk.

pH-potenciometriás módszerrel határoztuk meg a ligandumok deprotonálódási állandóit, tisztaságát és koncentrációját, illetve a Cu(II)-, Ni(II)-komplexek stabilitási állandóit. A rendszereket vizes oldatban tanulmányoztuk 25 °C-on 0,2 mol/dm³ KCl ionerősség mellett 1:2, 1:1 és 2:1 fémion:ligandum arányoknál. A ligandumok tervezett kezdeti koncentrációja ~ 3 · 10⁻³ mol/dm³ volt. A ligandumok protonálódási állandóit és a komponensek (L és H) pontos kiindulási koncentrációját a SUPERQUAD programmal, a képződő komplexek stabilitási szorzat értékeit a PSEQUAD program segítségével számítottuk ki. A kapott stabilitási állandó értékekből a MEDUSA programmal szerkesztettük meg az egyes rendszerek koncentráció-eloszlási görbéit.

Az **UV-látható** spektrumokat Perkin Elmer Lamda 25 típusú kétsugaras és Hewlett Packard HP 8453 típusú egysugaras, diódasoros fotométereken 1,000 cm úthosszú küvettában vettük fel, különböző fémion:ligandum arányoknál (1:2, 1:1, 2:1) a pH változtatásával, 200-900 nm hullámhossztartományban.

A Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén végeztük a **cirkuláris dikroizmus (CD)** méréseket egy Jasco J-810 típusú készüléken. A spektrumokat eltérő fémion:ligandum arányoknál

(1:2, 1:1, 2:1), különböző pH-kon vettük fel. A méréshez használt küveták 0,100 cm és 1,000 cm úthosszúságúak voltak. 200-800 nm hullámhossztartományban rögzítettük a spektrumokat.

A 746-747 VA Trace Analyzer típusú **ciklikus voltammétert** használtuk a Cu(II)-komplexek redoxi folyamatainak tanulmányozásához. Háromelektrod (platina ellen-, szén mérő- és Ag/AgCl (3 mol/dm³ NaCl) referenciaelektrod) kialakítású rendszerben különböző pásztázási sebességek, 800-(–600) mV feszültségtartományban és 140 µA határáram mellett dolgoztunk. Az értékeléshez szükséges paramétereket a CACYVO program segítségével kaptuk meg.

A **szuperoxid-diszmutáz (SOD) aktivitás** vizsgálatának egyik legelterjedtebb módszere a közvetett technikák közül a xantin/xantin-oxidáz rendszerrel in situ előállított szuperoxid gyökanyon és a nitroblue-tetrazólium-klorid (NBT) közötti reakció spektrofotometriás nyomon követése. A SOD aktivitás mérésére közegként foszfát puffert (pH 6,8 és 7,4) használtunk. A xantin-oxidáz mennyiségét úgy állítottuk be, hogy az abszorbanciaváltozás 560 nm-nél 0,025-0,028 min⁻¹ érték között változzon. A reakciót Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras fotométerrel követtük nyomon, a telítési görbék kiértékelésére pedig a Scientist programot alkalmaztuk.

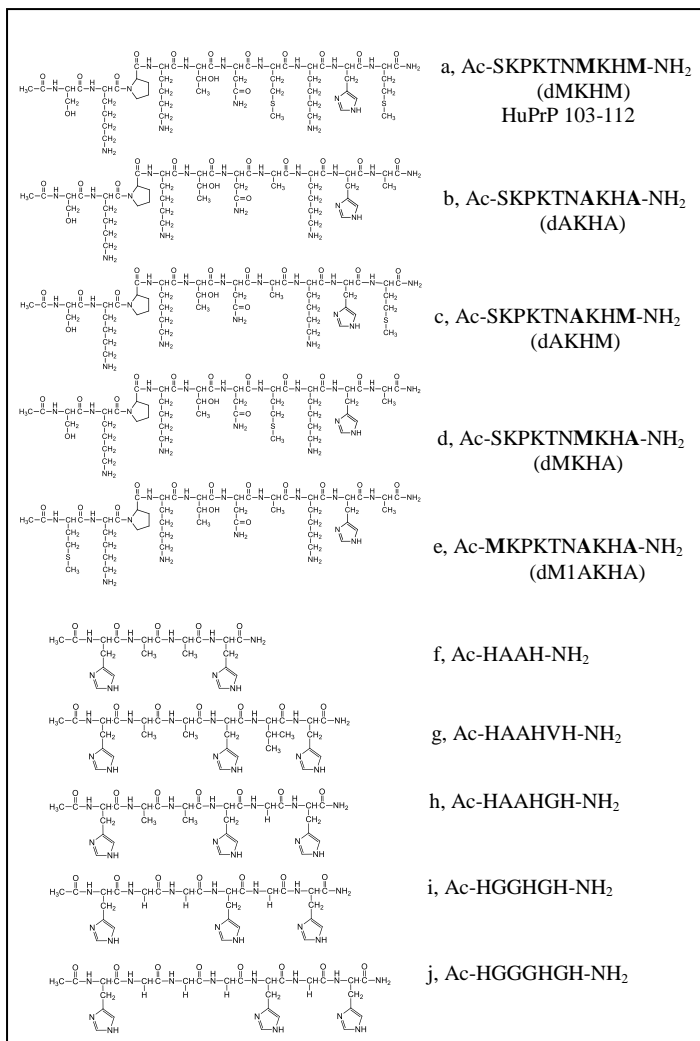
Az **oxidáció** vizsgálatánál 1 cm³ mintát állítottuk össze úgy, hogy a fémion koncentrációja 1 mmol/dm³ és a fémion:ligandum aránya 1:1,1 legyen. A vizsgálatokat 7,4-s pH-n és 25 °C-on hajtottuk végre. A felhasznált H₂O₂ 1%-os volt, ezt négyszeres feleslegben adtuk a Cu(II)-ligandum oldathoz. A reakció leállításához Na₂EDTA oldatot használtunk ötszörös feleslegben.

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) segítségével nemcsak az előállított ligandumok tisztaságát ellenőriztük, hanem a tisztításukra is felhasználtuk, illetve az oxidáció során keletkező termékeket is ezzel a technikával választottuk el egymástól. A több hisztidint tartalmazó ligandumok vizsgálatára Grace Vydac C18 (250 mm × 4,6 mm, 300 Å, 5 µm), az egy hisztidint tartalmazó peptidekre Europa Protein C18 (250 mm × 4,6 mm, 300 Å, 5 µm), elválasztásukhoz pedig Grace Vydac C18 (250 mm × 10 mm, 300 Å, 5 µm) típusú kolonnát használtunk. Az analitikai HPLC Jasco MD-2010 plus diódasoros detektorral, míg a félpreparatív HPLC Jasco UV-2077

plus UV-látható detektorral van felszerelve. Elválasztáshoz eluensként vizet (A) és acetonitrilt (B) használtunk, amelyek 0,1 % (v/v) TFA-t tartalmaztak. Áramlási sebességnek 1 és 2 ml/percet választottunk.

A peptidek azonosítására **tömegspektrometriát (MS)** is használtunk. Ezekre a mérésekre a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémiai Tanszékén található MicroTOF-Q típusú Qq-TOF MS készülékkel (Bruker Daltonik, Bréma, Németország) ESI ionforrás mellett pozitív módban került sor. Az oxidációs során keletkezett termékek azonosítására LC-ESI-MS és MS/MS technikát alkalmaztunk. A spektrumok kiértékeléséhez a DataAnalysis (3.4 verzió) programot használtuk.

III. A VIZSGÁLT LIGANDUMOK



1. ábra: A ligandumok szerkezeti képletei

IV. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak komplexképző sajátságai

Meghatároztuk a HuPrP 103-112 fragmens és négy mutánsa Cu(II)- és Ni(II)-ionnal alkotott komplexeinek stabilitási állandóit, szerkezeteit és a kapott eredményeket összehasonlítottuk a korábban vizsgált hasonló ligandumok ezen fémionokkal alkotott komplexeinek adataival.

- Megállapítottuk hogy, a vizsgált peptidek koordinációs sajátságaiban a His111 horgonycsoportként kulcsfontosságú szerepet tölt be mindkét fémion esetében. A Met109 és Met112 a képződő komplexek összetételét és stabilitását lényegében nem befolyásolja.
- Spektális vizsgálatokkal kimutattuk a Met109 gyenge kölcsönhatását a Cu(II)-ionnal alkotott $[N^-, N^-, N(Im)]$ koordinációs módú részecskében. Megállapítottuk, hogy ez a kölcsönhatás kisebb mértékű, mint a korábban vizsgált HuPrP 109-112 (Ac-MetLysHisMet-NH₂) tetrapeptidben, de kimutatható, ellentétben a jóval nagyobb tagszámú HuPrP(84-114)H96A fragmenssel.
- Megállapítottuk, hogy Ni(II)-ionnal kisebb stabilitású komplexek keletkeznek a réz(II)ionhoz képest, ami az Irving-Williams sornak megfelel.
- A koordinációs szférát modellező Ac-MetLysHisMet-NH₂ tetrapeptiddel ellentétben ezek a nagyobb tagszámú ligandumok oldatban tartják a nikkell(II)iont.

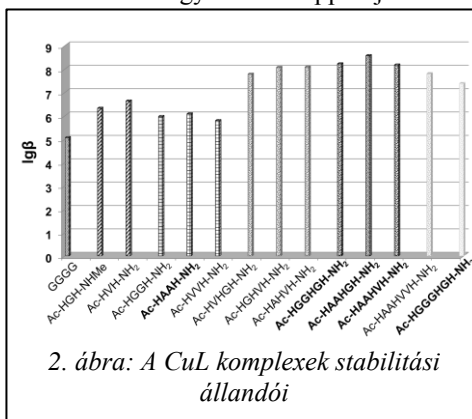
2. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidek komplexképző sajátságai

A Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának modellezése céljából multihisztidin peptideket szintetizáltunk és meghatároztuk a ligandumok sav-bázis sajátságait és Cu(II)-, illetve Ni(II)-ionnal alkotott komplexeinek összetételét és stabilitását. Továbbá megadtuk a fémkomplexek szerkezeteit is és azoknál a komplexeknél az izomerek arányát is, ahol a kialakulásukra lehetőség adódik.

Fehérjék fémionkötőhelyeit modellező peptidek koordinációs és redoxi sajátosságai

- Megállapítottuk, hogy a multihisztidin peptidekben lévő oldalláncbeli imidazolnitrogének az elsődleges fémmegekötő-csoportok a Cu(II)- és Ni(II)-ionok számára.
- A ligandumokban lévő hisztidinek számának növelése a komplexek stabilitásának növekedését eredményezi és ezzel alátámasztottuk a korábbi következtetéseket. Ugyanakkor azt is kimutattuk, hogy a hisztidinek közötti aminosavak számával és minőségével a keletkező komplexek stabilitása befolyásolható.
- Nagy stabilitású CuL komplexek keletkeznek, ezek szerkezetükben hasonlítanak a SOD enzim aktív centrumához, így elsődlegesen ezek kerültek a figyelem középpontjába.

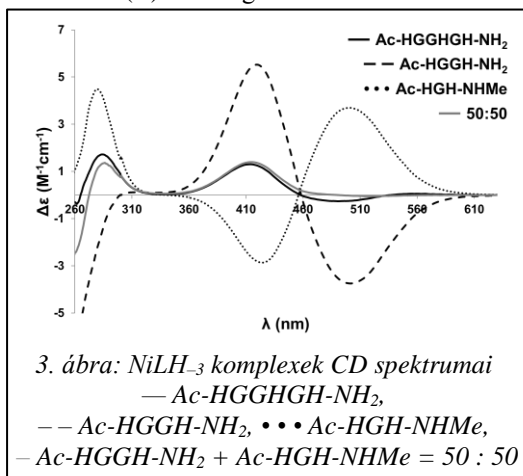
- Megállapítottuk a stabilitási sorrendet az imidazol-koordinációjú komplexekre:
 Ac-HXXXH-NH₂ < Ac-HXH-NH₂ < Ac-HXXHZZH-NH₂ ~ Ac-HGGGHGH-NH₂ < Ac-



2. ábra: A CuL komplexek stabilitási állandói

- amelyet az 2. ábra szemléltet.
- Kimutattuk, hogy enyhén lúgos pH-tartományban a Cu(II)-ion indukálja az amidnitrogének deprotonálódását, ami a három hisztidint tartalmazó peptidek esetében koordinációs izomerek képződését eredményezi. Az izomerek arányát a CD spektrumokból becsültük meg és megállapítottuk, hogy a fémion kötődése a C-terminális végen kedvezményezettebb.
- Megállapítottuk, hogy a CuLH₂ és CuLH₃ komplexekben a fémion kötődésének aránya a C-terminális végen a következő sorrendben csökken: Ac-HGGGHGH-NH₂ > Ac-HGGHGHNH₂ > Ac-HAAHGH-NH₂ > Ac-HAAHVH-NH₂.

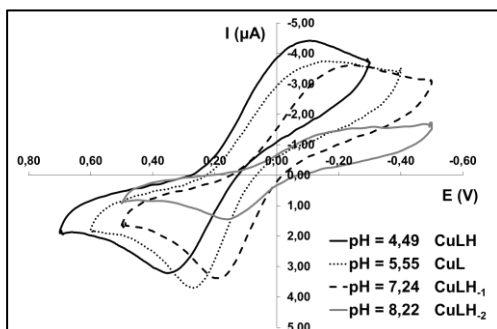
- A három hisztidint tartalmazó peptidek esetében fémionfelesleget tartalmazó rendszerben kétmagvú komplexek keletkezését is kimutattuk.
- A nikkell(II)ionok jelenlétében az amidnitrogének deprotonálódása kooperatív módon megy végbe. A $NiLH_3$ összetételű $[N^-, N^-, N^-, N(Im)]$ koordinációs módú komplexeknél izomer szerkezetek alakulnak ki, amelyek arányát a CD spektrumokból állapítottuk meg. Az eredmények alapján arra következtettünk, hogy a Ni(II)-ionnak a közbelső hisztidinekhez és az azt megelőző amidnitrogénekhez való affinitása sokkal jelentősebb, mint a Cu(II)-ionnál.
- Az izomerek aránya a csak glicintartalmú peptideknél összemérhető, amelyet a 3. ábra jól szemléltet. Az Ac-HAAHVH-NH₂-nél a közbelső hisztidinhez, míg az Ac-HAAHGH-NH₂-nél pedig a C-terminális véghez kötődik a fémion.
- Trendet állapítottunk meg az oldalláncok méretének izomerek arányában betöltött hatására, amely a C terminális vég kedvezményezettségét mutatja: Ac-HAAHVH-NH₂ < Ac-HGGHGH-NH₂ ~ Ac-HGGGHGH-NH₂ < Ac-HAAHGH-NH₂.
- A Cu(II)-ionokkal ellentétben ezek a ligandumok nem képesek két ekvivalens Ni(II)-ion megkötésére.



3. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidek Cu(II)-komplexeinek redoxi sajátosságai

Az oldategyensúlyi vizsgálatokat követően meghatároztuk az egymagvú Cu(II)-komplexek redoxi paramétereit is. A meghatározott redoxipotenciál értékek információt adhatnak a Cu(II)-komplexek SOD aktivitásáról. Ahhoz, hogy egy Cu(II)-komplex el tudja bontani a szuperoxid gyökianiont a formálpotenciál értékének $0,89(-0,16)$ V tartományban kell lennie.

- A hisztidin-tartalmú peptidek imidazolkoordinációjú komplexeire meghatározott redoxipotenciál értékek alapján igazoltuk, hogy ezekre a komplexekre is teljesül az az állítás, miszerint a hisztidinek számának növekedése a koordinációs szférában a Cu(II)-komplexekre jellemző formálpotenciál értéket csökkenti. A komplexek növekvő stabilitása következtében a fémcentrum redukálhatósága csökken.
- Ugyanakkor azt is kimutattuk, hogy az $[N(\text{Im}), N^-, N(\text{Im})]$, illetve $[N(\text{Im}), N^-, N^-, N(\text{Im})]$ koordinációjú komplexek redoxipotenciál értékei is pozitívak vagy kis negatív értékek a kialakuló torzult geometriának köszönhetően. A 4. ábrán láthatóak az imidazolkoordinációjú komplexek mellett a CuLH_1 és CuLH_2 részecskék ciklikus voltammogramjai is.



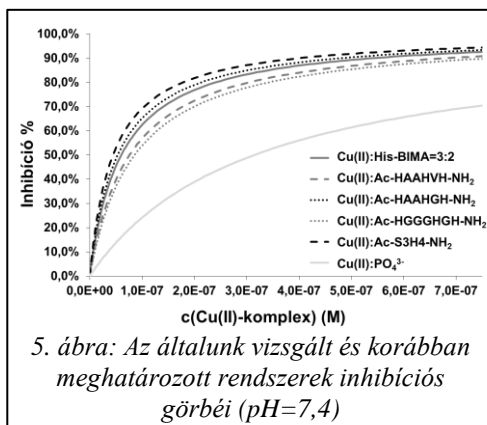
4. ábra: $\text{Cu(II)} : \text{Ac-HAAHGH-NH}_2 = 1 : 8$ arányú rendszer voltammogramjai különböző pH-értékeken

- Megállapítottuk, hogy Cu(II)-komplexekre számított feszültségértékek a SOD aktivitáshoz szükséges potenciáltartományba esnek, így azok alkalmas SOD modellek lehetnek.
- Továbbá a meghatározott elektrokémiai paraméterek alapján megerősítettük azt a feltételezést, hogy a Cu(II)-ion a CuLH₋₁ és CuLH₋₂ komplexekben nagyrészt a HXH szekvenciához kötődik.

4. A Cu,Zn-SOD enzimet modellező peptidok Cu(II)-komplexeinek SOD aktivitása

Elektrokémiai vizsgálatokat követően a hexa- és heptapeptidok Cu(II)-ionnal alkotott komplexeinek SOD aktivitását határoztuk meg pH 6,8 és pH 7,4 esetén.

- Megállapítottuk, hogy a Cu(II)-komplexek relatív aktivitása 2-4 % között van 6,8-s pH-n.
- Kimutattuk, hogy a pH növelésével a SOD aktivitás nő.
- Megállapítottuk, hogy 7,4-es pH-n az általunk vizsgált hat- és héttagú peptidok Cu(II)-komplexei hasonló aktivitást mutatnak a korábban meghatározott Cu(II):Ac-HisSarHisSarHisSarHis-NH₂ rendszerben képződő CuL és Cu(II):His-BIMA 3:2 arányú rendszerben keletkező imidazolátohidas komplex IC₅₀ értékével, amelyet az 5. ábrán látható telítési görbe mutat,



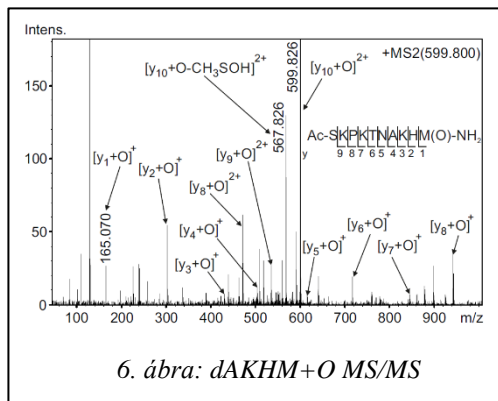
amelyen a jobb láthatóság kedvéért nem tüntettem fel a mérési pontokat.

- Ugyanakkor azt is megállapítottuk, hogy a SOD aktivitáshoz nemcsak az imidazol-koordinációjú komplexek, de az [N(Im), N⁻, N(Im)] , illetve [N(Im), N⁻, N⁻, N(Im)] koordinációjú komplexek is hozzájárulnak. Ezen komplexek torzult geometriája elősegíti a Cu(II) + e⁻ → Cu(I) átalakulást , illetve a O₂⁻ kötődését a fémcentrumhoz.

5. A humán prion fehérje fragmensének és mutánsainak oxidációs vizsgálata

Az egy hisztidint tartalmazó prion fragmens és mutánsai Cu(II)-ionnal alkotott komplexeinek összetételét és szerkezetét meghatározva további célunk volt ezeknek a ligandumoknak az oxidációja is. A választott peptidekben oxidációra hajlamos aminosavak vannak, ilyen a hisztidin és a metionin. Az oxidált minták azonosítását LC-MS-sel és LC-MS/MS-sel végeztük el.

- Módszert fejlesztettünk a humán prion fehérje fragmens és mutánsai oxidációjának vizsgálata során keletkező termékek HPLC technikával történő elválasztására.
- Kimutattuk a metionint nem tartalmazó mutáns (dAKHA) vizsgálata során a lánc hasadását, de az irodalomban leírtakkal ellentétben nem tapasztaltuk 2-oxohisztidin származék keletkezését. Megállapítottuk, hogy a lánc hasadása az α -amidálási útvonalon megy végbe.
- A metionin-tartalmú ligandumok (dMKHA, dAKHM, dMKHM, dM1AKHA) oxidációja során minden esetben a metioninból metionin-szulfoxid keletkezik, amelyet a 6. ábrán látható dAKHM MS/MS spektruma mutat be.
- Kimutattuk, hogy a peptidláncbéli pozíciójától függetlenül, a réz(II)kötőhely közvetlen közelében vagy attól távol lévő metionin is megvédi a peptidláncot annak hasadásától , illetve hogy ezekben az esetekben sem következik be a hisztidin oxidációja.
- Az eredmények azt támasztják alá, hogy a Cu(II)-ionnak katalizáló szerepe van a fent említett folyamatban.



- Másrészt pedig a metionin igen érzékeny oxidációja megvédi a prion proteint és a környezetében lévő egyéb peptideket a fragmentálódástól és csak a metionin oldalláncok szulfoxiddá történő oxidációja következik be.

V. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

A *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* évtizedek óta foglalkozik különböző enzimek modellezésére alkalmas peptidek vizsgálatával. Ezek az eredmények molekuláris szintű elemzést adnak arra vonatkozólag, hogy a tényleges fémion-kötőhelyek egy adott fehérjében/metalloproteinben hol vannak jelen. Választ adnak a vizsgálatok arra is, hogy milyen kölcsönhatás alakul ki a vizsgált fémionnal a koordinációs szférában vagy attól távolabb lévő oldalláncokkal és azok hogyan befolyásolják a kialakuló komplexek stabilitását.

Munkánk során hisztidin-tartalmú ligandumok szintézisét végeztük el és Cu(II)-, Ni(II)-ionokkal való kölcsönhatását és redoxi sajátosságait tanulmányoztuk. Az eredmények azt tükrözik, hogy a multihisztidin ligandumok nagyobb aktivitást mutató Cu(II)-komplexei a Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumának nagyon jó szerkezeti és funkcionális modelljeinek kiinduló pontjai lehetnek. A humán prion fragmens (Hu PrP^C 103-112) és mutánsai oxidációjának vizsgálata során kapott eredmények hozzájárulhatnak ahhoz, hogy jobban megértsük az oxidációs folyamatok szerepét a betegség alakulása során. Az általunk kapott adatok fontos információként szolgálhatnak olyan biológiai kutatásokhoz, amelyekben idegrendszeri betegségek kiváltó okát keresik.

TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK (PUBLICATIONS)

Az értekezés alapját képező közlemények (Articles connected to the thesis) (3):

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények (Published articles) (2):

1. Gizella Csire, József Demjén, Sarolta Timári, Katalin Várnagy
Electrochemical and SOD activity studies of copper(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives, Polyhedron, **61**, 202-212 (2013)
IF:2,047
2. Gizella Csire, Lajos Nagy, Katalin Várnagy, Csilla Kállay
Copper(II) Interaction with the Humán Prion 103-112 Fragment – Coordination and Oxidation, Journal of Inorganic Biochemistry, **170**, 195-201 (2017)
IF: 3,205

Tudományos folyóiratban még meg nem jelent közlemények (Not published articles) (1):

1. Gizella Csire, Sarolta Timári, József Asztalos, Judit Király, Mariann Kiss, Katalin Várnagy
Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides
(közlésre beküldve)

Az értekezés alapját képező előadások (Lectures connected to the thesis) (10):

1. Gizella Csire, Sarolta Timári, Katalin Várnagy
Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides
International Symposium on Metal Complexes 2016, Poster Presentation, Barcelona, Spanyolország, 2016. 06. 07-10., 65. oldal
2. Csire Gizella, Kállay Csilla, Nagy Lajos, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre
A humán prion fehérje 103-112 fragmense és a Cu(II)-ion közötti kölcsönhatás vizsgálata – koordináció és oxidáció
50. Komplexkémiái Kollokvium, Balatonvilágos, Magyarország, 2016.05.30-06.01., E41

3. Katalin Várnagy, Gizella Csire, Sarolta Timári, Ágnes Dávid, Csilla Kállay
The role of side chains in the fine tuning of metal binding ability of peptides
12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Zürich, Svájc, 2014. 08. 24-28., S751. oldal, OP 6
4. Katalin Várnagy, Gizella Csire, Sarolta Timári
The role of side chains in the fine tuning of metal binding ability of peptides
International Symposium on Metal Complexes 2014, Pávia, Olaszország, 2014. 06. 08-12., 38. oldal, OC-6
5. Kállay Csilla, Csire Gizella, Nagy Lajos, Várnagy Katalin, Sóvágó Imre
Hisztidint és metionint tartalmazó peptidek kölcsönhatása réz(II)-ionokkal
48. Komplexkémiái Kollokvium, Siófok, Magyarország, 2014. 05. 28-30., E36
6. Csire Gizella
Cu(II)–peptidkomplexek koordinációs és redoxi sajátossága, , illetve SOD aktivitása
XXXVI. Kémiai Előadói Napok, Szeged, Magyarország, 2013. 10. 28-31., 231. oldal
7. Katalin Várnagy, Gizella Csire, Sarolta Timári
Copper(II) complexes of peptide derivatives containing imidazole side chains, as models of Cu,Zn-SOD enzyme
International Symposium on Metal Complexes 2013, Burgos, Spanyolország, 2013. 06. 16-20., 50. oldal OC-5
8. Csire Gizella
Cu(II)–peptidkomplexek koordinációs és redoxi sajátossága, , illetve SOD aktivitása
47. Komplexkémiái Kollokvium, Mátraháza, Magyarország, 2013. 05. 29-31., E21
9. Csire Gizella
Cu(II)-bisz(imidazolil) származékok redoxi sajátosságainak és SOD aktivitásának vizsgálata
XXXI. OTDK, Kémiai és Vegyipari Szekció, Koordinációs kémiai tagozat, Eger, Magyarország, 2013. április 4–6., 173. oldal

10. Csire Gizella

Cu(II)-bisz(imidazolil) származékok redoxi sajátságainak és SOD aktivitásának vizsgálata

DE TTK TDK konferencia, Debrecen, Magyarország, 2012. 11. 20-23.

Az értekezés alapját képező poszterek (Posters connected to the thesis) (5):

1. Gizella Csire, Sarolta Timári, Mariann Kiss, Katalin Várnagy
Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides
13th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Budapest, Magyarország, 2016. 08. 28.- 09. 01., 257. oldal, P104
2. Gizella Csire, Sarolta Timári, Katalin Várnagy
Coordination, redox properties and SOD activity of Cu(II) complexes of multihistidine peptides
International Symposium on Metal Complexes 2016, Barcelona, Spanyolország, 2016. 06. 07-10., 65. oldal
3. Gizella Csire, Csilla Kállay, Lajos Nagy, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó
Copper(II) Interaction with the Humán Prion 103-112 Fragment – Coordination and Oxidation
13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2015. június 12–15., Galway, Írország, 111. oldal, P13
4. Gizella Csire, Csilla Kállay, Lajos Nagy, Katalin Várnagy, Imre Sóvágó
Metal ion catalyzed oxidation of a humán prion fragment
12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Zürich, Svájc, 2014. 08. 24-28., S813. oldal, P103
5. Csire Gizella, Várnagy Katalin
Cu(II)–peptidkomplexek koordinációs és redoxi sajátsága, illetve SOD aktivitása
XIX. Bolyai Konferencia, Budapest, Magyarország, 2014. 03. 22-23. 26. oldal, IX.

Az értekezésben nem tárgyalt előadások (Lectures not connected to the thesis) (2):

Fehérjék fémionkötőhelyeit modellező peptidek koordinációs és redoxi sajátságai

1. Csire Gizella
Imidazolgyűrűt tartalmazó ligandumok Cu(II)-komplexeinek elektrokémiai és SOD aktivitás vizsgálata
DETEP konferencia, Debrecen, Magyarország 2012. 05. 10.
2. Csire Gizella
Imidazolgyűrűt tartalmazó aminosav- és peptidszármazékok átmenetifém komplexeinek elektrokémiai vizsgálata
DETEP konferencia, Debrecen, Magyarország, 2011. 05. 05.

Az értekezésben nem tárgyalt poszterek (Posters not connected to the thesis) (1):

1. Katalin Várnagy, Sarolta Timári, Gizella Csire, Norbert Lihi
Coordination and redox properties of copper(II) and iron(II/III) complexes of bis(imidazol-2-yl) ligands
11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Barcelona, Spanyolország, 2011. 12. 02-05, P147



Nyilvántartási szám: DEENK/126/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csire Gizella
Neptun kód: IOA0I9
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10047253

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Csire, G.**, Nagy, L., Várnagy, K., Kállay, C.: Copper(II) interaction with the Human Prion 103-112 fragment - Coordination and oxidation.
J. Inorg. Biochem. 170, 195-201, 2017. ISSN: 0162-0134.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.02.018>
IF: 3.205 (2015)
2. **Csire, G.**, Demjén, J., Timári, S., Várnagy, K.: Electrochemical and SOD activity studies of copper(II) complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives.
Polyhedron. 61, 202-212, 2013. ISSN: 0277-5387.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2013.05.053>
IF: 2.047

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 5,252

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 5,252

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

Debrecen, 2017.05.11.

