

DISZULFIDHIDAT TARTALMAZÓ CIKLIKUS PEPTIDEK UV-BESUGÁRZÁSÁNAK HATÁSÁRA KELETKEZŐ SZABADGYÖKÖK ÉS SZULFHIDRIL-CSOPORTOK DETEKTÁLÁSA

Gróf Pál^aa biológia tudományok kandidátusa,
dr. habil., egyetemi docensKnapp Krisztina^b

doktorjelölt

Schlosser Gitta^c

PhD, tudományos munkatárs

Nagy Tamás Milán^d

MSc-hallgató

Timári István^d

PhD-hallgató

Borics Attila^e

PhD, tudományos munkatárs

Kövér Katalin^d

az MTA doktora, egyetemi tanár

Csík Gabriella^aa biológiai tudományok kandidátusa,
Dr. habil., egyetemi docensMajer Zsuzsa^b

PhD, egyetemi docens

^aSemmelweis Egyetem Biofizika és Sugárbiológiai Intézet • ^bELTE Kémiai Intézet Szerves Kémiai Tanszék Kiroptikai Szerkezetvizsgáló Laboratórium • ^cMTA–ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport • ^dDebreceni Egyetem Kémiai Intézet NMR Laboratórium, Debrecen • ^eMTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet, Szeged

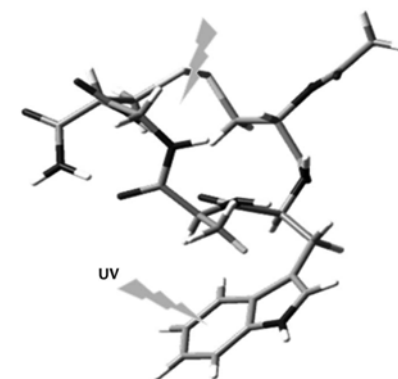
A fehérjék, peptidek diszulfidhídjaiknak fotodisszociációjával összefüggő szerkezeti és funkcionális változások tanulmányozásának, valamint a lebomlási folyamatok felderítésének biotechnológiai szempontból is óriási jelentősége van. Irodalmi adatok alapján az UVB sugárzás (280–315 nm) változást idéz elő a fehérjék (enzimek) szerkezetében, ami módosíthatja a biokatalitikus működésüket. Több fehérjénél, pl. a kecske α -laktalbumin (GLA) (Vanhooren et al., 2006) és az immunglobu-

lin fehérjék (Illyés et al., 2014) esetében végzett korábbi kutatások a triptofán szerepének tisztázására irányultak, melyek szerint a diszulfidhidakhoz kellő közelségben lévő ($d < 7 \text{ \AA}$) aromás oldallánc fotonabszorpciója révén a szerkezetstabilizáló diszulfidhidak fotolízise bekövetkezhet energia-/elektrontranszfer folyamatokban (1. ábra). A diszulfidhid fotoredukciója során keletkező szulfhidrilcsoportok *in situ* kimutatására többféle módszer, illetve reagens alkalmas; az egyik lehetséges

kimutatás a tiolspecifikus reagensek/fluoreszcens jelzővegyületek alkalmazásával történhet, amelyek szelektíven, gyors reakcióban képesek megkötni a szabaddá váló szulfhidrilcsoportokat (-SH) (Sletten et al., 2009). A képződött festék-SH adduktok fluoreszcenciával detektálhatóak és a mért fluoreszcencia intenzitásváltozásából vonhatók le minőségi és mennyiségi következtetések.

Az UV-fény hatására lejátszódó fotokémiai reakció tanulmányozása a fehérjéknél kisebb egységeken, például peptidmodelleken is lehetséges, és egyszerűbbnek tűnik a fotolízist befolyásoló szerkezeti elemek szerepének tisztázása. Főleg triptofántartalmú (W), diszulfidhiddal (S-S) ciklizált modelleket állítottunk elő, ahol a triptofán aromás oldallánca és a diszulfidhíd közötti távolság várhatóan 5–10 $\text{\AA}$: Ac-ciklo(CWKAC)-NH₂, Ac-ciklo(CAWAC)-NH₂ és Ac-ciklo(CWAGC)-NH₂ (2. ábra). (A ciklikus peptidek szekvenciájában az aminosavak egybetűs kódja szerepel, a továbbiakban a „ciklo” rövidítése: „c”.)

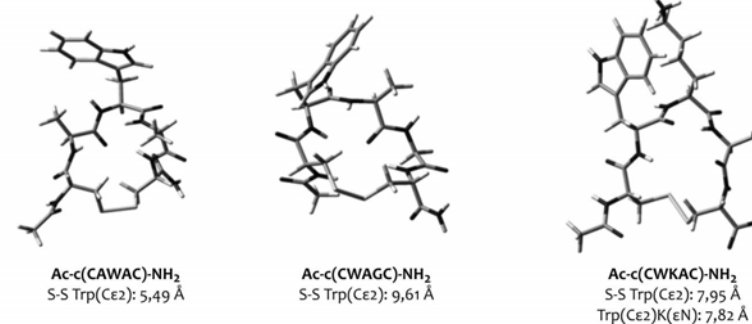
Az aminosavrész oldalláncának a diszulfidhíd fotolízisére gyakorolt hatását is tanulmányozni kívántuk, így az egyes modelleknél a szekvenciákban triptofán (W) helyett tirozin (Y) vagy fenilalanin (F), vagy valin (V)



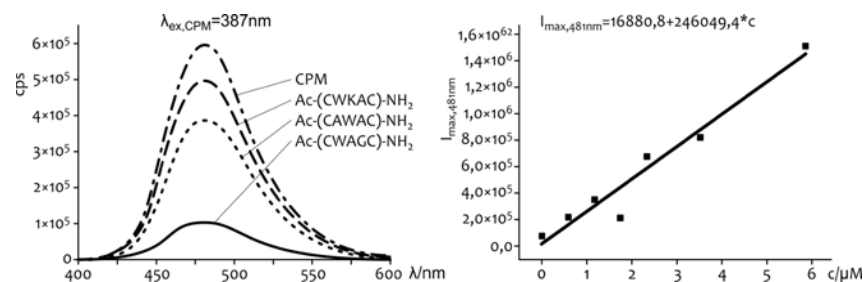
1. ábra • Az UV-fény fotodisszociációt indukálhat a fehérjeláncokon, amely során szabad szulfhidrilcsoportok keletkezhetnek.

szerepelt. A fotolízis során képződő szulfhidrilcsoportok kimutatására és kvantitatív meghatározására különböző módszereket dolgoztunk ki, de figyelembe vettük, hogy a módszer egy összetettebb fehérje esetében is sikerrel alkalmazható legyen a szulfhidrilcsoportok lokalizálására és mennyiségi meghatározására, akár igen kis mennyiségben is.

Fluoreszcencia módszer alkalmaztunk az UV-besugárzás hatására keletkező szulfhidrilcsoportok kvantitatív mérésére. A modellpep-



2. ábra • A triptofán oldallánca és a diszulfidhíd-távolságok meghatározása molekulamechanikai számolásokkal (MM) peptidmodelleken.



3. ábra • Szulfhidrilcsoportok detektálása fluoreszcencia-spektroszkópiával.
CPM-kalibráció Ac-CWAKC(Acm)-NH₂ peptiddel.

tidek oldatait oxigénmentesítettük, a besugárzást 290 nm-es hullámhosszon végeztük (16 nm rés-szélesség, 60 perc besugárzási idő, kevertetés 4 °C hőmérsékleten, argon atmoszféra) a Jobin-Yvon Fluorolog 4 spektrofluoriméter 450 W teljesítményű xenon lámpájával puffer oldatban (pH~7,5), 185–220 μM peptidkoncentrációnál. Az UV-besugárzaskor keletkező szulfhidrilcsoportok kimutatására a szulfhidrilselektív fluoreszcens reagenst, a 7-dietilamino-3-(4-maleimidofenil)-4-metil-kumarint (Ayers et al., 1986) (CPM; $\lambda_{\text{ex}}=387$ nm, $\lambda_{\text{em}}=475$ nm) használtuk, mivel a keletkező addukt erősebben fluoreszkál, mint maga a reagens (3. ábra).

A molekulamechanikai (MM) számításokkal kapott triptofán-diszulfidhíd (W-SS) távolságokat figyelembe véve, a várt sorrend a fotolitikus reakcióban keletkező szulfhidril mennyiségére az Ac-c(CWAGC)-NH₂ <

Ac-c(CWKAC)-NH₂ < Ac-c(CAWAC)-NH₂ lenne. Kísérleteink alapján megállapítottuk (1. táblázat), hogy a fluoreszcencia alapján meghatározható sorrend Ac-c(CWKAC)-NH₂ < Ac-c(CAWAC)-NH₂ < Ac-c(CWAGC)-NH₂. Így célszerűnek látszott a CPM fluoreszcens jelzőmolekulát tartalmazó lineáris és ciklikus pentapeptid modellek vizsgálata tömegspektrometriával, annak érdekében, hogy a kísérlet során keletkező termékeket (CPM-adduktok) azonosítani tudjuk.

A tandem tömegspektrometria (Bruker Esquire 3000+ ioncsapda, elektropray ionforrással) az addukt keletkezését igazolja, és a későbbiekben a kvantitatív szulfhidril-meghatározást is lehetővé teszi. Munkánk során részletesen tanulmányoztuk a CPM-jelzőmolekula pozíciójának hatását a peptid MS/MS fragmentációjára. A tandem tömegspektrometriás mérések során ütközésindukált

peptid	W(Cε2) - SS	$I_{\text{max}}(480 \text{ nm})^*$	konc. [μM]	SH[%]
Ac-c(CWKAC)-NH ₂	7,95 Å	388 560	1,51	6,31
Ac-c(CAWAC)-NH ₂	5,49 Å	497 135	1,95	8,16
Ac-c(CWAGC)-NH ₂	9,61 Å	596 180	2,35	9,24

1. táblázat • A fotolízissel keletkező szulfhidrilcsoportok fluoreszcenciás detektálása
* mért beütésszám

disszociációt (CID) alkalmaztunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a CPM fluoreszcens jelzőmolekula segítségével történő kvantitatív szulfhidril-meghatározás jól kombinálható a tandem tömegspektrometriára épülő szerkezetvizsgálati módszerekkel, mivel a jelzővegyület karakterisztikus módon befolyásolja a peptid MS/MS fragmentációját. A tandem tömegspektromokban intenzíven jelentkeznek a módosulást hordozó fragmensionok, függetlenül attól, hogy a peptiden belül melyik cisztein hordozza a jelzőmolekulát. A karakterisztikus fragmensionok alapján a módosulás helye a szekvenciában pontosan lokalizálható, és lehetőség nyílik az egyes módosulási pontok nagy érzékenységű, kvantitatív meghatározására is. Nagy felbontású LC-MS vizsgálatunk (Waters Q-TOF Premier) szerint a keletkező CPM-peptid adduktok mellett több melléktermék is azonosítható, amelyek több csúcsban jelennek meg a kromatogramokban. Azonosítottuk a ciklikus peptidok tioéter-, illetve oxidált triptofánt tartalmazó származékait (több csúcsban) (Mozziconacci et al., 2010); a ciklikus peptideket, illetve a peptid dimerjeit; a CPM-peptid adduktok szerkezeti izomerjeit (több csúcsban).

NMR-spektroszkópiával azért vizsgáltuk a ciklikus modellpeptidok térszerkezetét, hogy meghatározzuk az oldatbeli konformerekben a fotolitikus viselkedés szempontjából fontosnak vélt Trp-SS távolságot. A peptideknél

szokásos NMR jelhozzárendelési és szerkezet-meghatározási stratégiát követve, kétdimenziós (2D) kísérletek (¹H-¹H COSY, TOCSY, ROESY és ¹H-¹³C HSQC) sorozatát végeztük 500 MHz protonfrekvencián. A ROESY-spektrogramok alapján nyert, molekulán belüli proton-proton távolságok felhasználásával az energiaminimalizált szerkezetek sokaságát kaptuk, amelyekből reprezentatív konformereket választottunk ki. A további szerkezetfinomításhoz, valamint a másodlagos szerkezeti elemek statisztikai értékeléséhez molekuladinamikai számításokat végeztünk. A másodlagos szerkezetet stabilizáló hidrogénkötések jelenlétét az amidprotonok kémiai eltolódásának hőmérsékletfüggése alapján igazoltuk. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy ugyan a kapott konformerek hasonlóak, de kisebb különbségek mutatkoznak – feltehetőleg a másodlagos szerkezetek eltérő arányának tulajdoníthatóan – mind a főlánc konformációjában, mind a flexibilis oldalláncok elhelyezkedésében. A fotolízis szempontjából fontosnak gondolt triptofán-diszulfidhíd (W-SS) és triptofán-lizin (W-K) oldalláncok közötti távolságok előfordulási valószínűsége a konformerek sokaságában a 2. táblázatban van összesítve. A kapott értékek összhangban vannak az MM-számítások eredményével.

ESR-spektroszkópiai vizsgálatokat végeztünk annak érdekében, hogy az UV-besugárzás hatására felszakadó diszulfidhidakból

peptid	W(Cε2) - SS d < 7 Å	W(Cε2) - K(εN) 6 Å < d < 10 Å
Ac-c(CWKAC)-NH ₂	3,4%	46%
Ac-c(CAWAC)-NH ₂	33,4%	—
Ac-c(CWAGC)-NH ₂	0%	—

2. táblázat • Konformer-összetétel a fotolízis szempontjából meghatározó triptofán-diszulfidhíd (W-SS) és triptofán-lizin (W-K) oldalláncok távolságára vetítve.

keletkező tiil-gyököket csapdázuk. Méréseinkben a szabadgyök befogására 5-(dietoxifoszforil)-5-metil-1-pirrolin-N-oxid (DEPMPO) vegyületet használtunk, UVB- (280–320 nm) és UVA-tartományú (320–380 nm) besugárzás mellett, DTPA-t tartalmazó foszfátpufferben (pH=7,4). Eredményeink azt mutatják, hogy még az argongázzal oxigénmentesített pufferoldatokban is számolni kell olyan fotodisszociációkkal, melyek hidroxil-gyökök képződéséhez vezetnek. A diszulfidhidakat tartalmazó peptidok gyökös fotodisszociációjakor, a vizes oldatokban képződő szulfhidrilcsoportok mint redukálószer, hatékonyan redukálják a DEPMPO-val képződött nitroxid-szabadgyököket, amelyek EPR-inaktív hidroxilaminokat eredményeznek. A keletkező hidroxilaminokat $K_2Fe(CN)_6$ mint enyhe oxidálószer segítségével visszaoxidálva a csapdázott gyökök között elsősorban hidroxilgyökök, illetve széncentrumú szabadgyökök detektálhatók. Ezek kvantitatív meghatározása azonban csak további részletes mérések alapján lehetséges.

- Eredményeink azt mutatják, hogy a tandem tömegspektrometria mint módszer, a CPM-jelzőmolekula segítségével alkalmas a kvantitatív szulfhidril-tartalom meghatározására.

HIVATKOZÁSOK

- Ayers, Frank C. – Warner, G. L. – Smith, K. L. – Lawrencem D. A. (1986): Fluorometric Quantitation of Cellular and Nonprotein Thiols. *Analytical Biochemistry*. 154, 186–193. DOI:10.1016/0003-2697(86)90513-0
- Illyés Eszter – Staelens, S. – Vanhooren, A. – Deckmyn, H. – Hanssen, I. – Majer Zs. (2014): Role of the Trp-disulfide Triads in the UV Light Induced Degradation of a Monoclonal Antibody scFv. *International Journal of Biochemistry Research & Review*. 4, 5, 367–385. DOI:10.9734/IJBCCR/2014/8453 • <http://sciedomains.org/issue/483>
- Mozziconacci, Olivier – Kerwin, B. A. – Schöneich, C. J. (2010): Photolysis of an Intrachain Peptide Di-

- Az ESR-spektroszkópiai eredményeink jelzik a diszulfidhidak felszakadása következtében keletkező szabadgyök-képződést, de a tiil-gyökök kvantitatív mérése csak további vizsgálatok alapján lehetséges.
- Figyelembe véve a modell peptidok térszerkezetét és a fotolízisük eredményeit, úgy tűnik, hogy kistagszámú peptidok esetében a W–SS távolságnak nincsen meghatározó szerepe az UVB sugárzás hatására lejátszódó fotolízisben. Ennek bizonyításához más modellek (a ciklikus modellekben W helyett Y, F, V aminosav) teljes körű konformáció- és fotolízis-vizsgálata, valamint a fotolízis termékeinek további analízise szükséges.

A kutatás az OTKA (K 100720 M. Zs., K 105459 K. K.) és az MTA–MedInProt támogatásával valósult meg. Dr. Schlosser Gitta és Dr. Borics Attila munkáját a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatta.

Kulcsszavak: *ciklopeptidok, diszulfidhid, fotolízis, szulfhidrilcsoport, fluoreszcencia, tandem tömegspektrometria, LC-MS/MS, NMR-spektroszkópia, szabadgyök-csapdázás, ESR-spektroszkópia*

- sulfide Bond: Primary and Secondary Processes, Formation of H₂S, and Hydrogen Transfer Reactions. *The Journal of Physical Chemistry B*. 114, 3668–3688. DOI: 10.1021/jp910789x
- Sletten, Ellen M. – Bertozzi, Carolyn R. (2009): Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angewandte Chemie International Edition*. 48, 6974–6338. DOI: 10.1002/anie.200900942 • <http://tinyurl.com/jlks8e>
- Vanhooren, Ann – Illyés E. – Majer Zs. – Hanssens, I. (2006): Fluorescence Contributions of Individual Trp Residues in Goat a-lactalbumin. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 1764, 1586–1591. DOI:10.1016/j.bbapap.2006.07.011 • <http://tinyurl.com/hlyoctt>

5. Orvosfizika, sugárbiológia

BEVEZETŐ

Csige István

PhD, tudományos főmunkatárs,
MTA Atomki
csige.istvan@atomki.mta.hu

Sáfrány Géza

igazgató főorvos,
Országos Közegészségügyi Központ, Országos
Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Igazgatóság

Az orvosfizika, sugárbiológia és radioökológia szekcióban hat előadás hangzott el. Ezek: 1. Hideghéty Katalin: *ELI-ALPS ionizáló sugárforrások és orvosbiológiai kutatási lehetőségek*; 2. Madas Balázs Gergely: *Hiperszenzitivitás kis sugárdózisoknál és a kialakuló mutációk számának minimalizálása*; 3. Sándor Nikolett, Léner Violetta, Harsányi Izabella, Sáfrány Géza, Hegyesi Hargita: *Vér-agy gát áteresztő képessége minden dózisonál megnövekedett, késői időpontban e hatás csak a nagy dózisonál maradt meg. Megfigyelhető volt továbbá az öregedés miatt spontán kialakuló érkárosodás is. A sugárzást követő 24 óra múlva a vérben lecsökkent az endotél összegek száma, míg a csontvelőben növekedést tapasztaltak, mely egy hét múlva a vérben manifestálódott. Vizsgálataik felvetik annak a lehetőségét, hogy az érlelmeszedésben szenvedő páciensek diagnosztikai vagy terápiás ionizáló sugárzást alkalmazó kezelése hozzájárulhat az érfa károsodásának súlyosbodásához.*

Az első két előadásról önálló ismertetőt találunk ebben a lapszámban. Hegyesi Hargita és munkatársai egyszeri koponyabesugárzás hatását vizsgálták a vér-agy gát permeabilitásra,

érlelmeszedésre hajlamos, ApoE-génhiányos egerekben. Többek között tanulmányozták az érfa-regenerációban részt vevő endotél összegek mobilizációját és a gyulladásos immunválaszban szerepet játszó makrofágok aktivációját. A sugárzásra adott akut válaszként a vér-agy gát áteresztő képessége minden dózisonál megnövekedett, késői időpontban e hatás csak a nagy dózisonál maradt meg. Megfigyelhető volt továbbá az öregedés miatt spontán kialakuló érkárosodás is. A sugárzást követő 24 óra múlva a vérben lecsökkent az endotél összegek száma, míg a csontvelőben növekedést tapasztaltak, mely egy hét múlva a vérben manifestálódott. Vizsgálataik felvetik annak a lehetőségét, hogy az érlelmeszedésben szenvedő páciensek diagnosztikai vagy terápiás ionizáló sugárzást alkalmazó kezelése hozzájárulhat az érfa károsodásának súlyosbodásához.

Bogdándi Noémi és munkatársai olyan immunológiai markereket szeretnének azonosítani, amelyek prognosztikai értékkel rendelkezhetnek a sugárterápiára adott válasza. Kolorektális betegek vérmintáiban vizsgálták a Treg-sejtek arányát és fenotípusát a sugárterápiás kezelés előtt és után. Megállapították, hogy a Treg-sejtek aránya a sugárterápiás ke-