

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**TOXIKUS FÉMIONOK SZELEKTÍV
MEGKÖTÉSÉRE ALKALMAS PEPTIDEK
TERVEZÉSE, SZINTÉZISE ÉS FÉMKOMPLEXEIK
VIZSGÁLATA**

Szunyog Györgyi

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin egyetemi tanár



DEBRECENI EGYETEM

Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019.

I. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A nehézfém-mérgezés okozta megbetegedések, rendellenességek a mai napig gyakoriak. Az ólom(II)ion fejlődési zavarok kiváltója, beépül a csontokba, károsítja a központi idegrendszert. A kadmium(II)ion felelős az itai-itai kór kialakulásáért, a csontok törékenységet okozza, illetve veseelégtelenséget is előidézhet.

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Bioszervetlen Kutatócsoportjában már régóta foglalkoznak az ólom(II)- és kadmium(II)ionok koordinációs kémiájának kutatásával. A vizsgálatok kiterjedtek az aminosavakra és peptidekre is, mely tanulmányok alátámasztották, hogy ezen fémionok számára az elsődleges kötőhely a tiolátcsoport kén donoratomja, de nagy stabilitású komplexeket képeznek az oxigén donoratomú karboxilátcsoporttal is. Továbbá a korábbi vizsgálatokból egyértelművé vált, hogy a donorcsoportok számának, minőségének és pozíciójának nagy szerepe van a ligandumok fémionkötő képességében, ám ezen ligandumok nem mutatnak jelentős szelektivitást például a létfontosságú cink(II)ionnal szemben. Hasonló következtetés vonható le a nikkell(II)iont tartalmazó rendszerek eredményeiből is, ám lényeges különbség a másik három említett fémionnal szemben, hogy a nikkell(II)ion képes indukálni az amidnitrogén deprotonálódását, ezáltal változatosabb koordinációs módokat eredményezve.

A peptideket felépítő aminosavak változtatásával lehetőségünk nyílik arra, hogy vizsgáljuk a ligandumok fémionért való versengését.

Ezért a szekvenciák tervezésénél fontos szempont az, hogy az adott peptid szelektíven kösse meg az emberi szervezetben a toxikus fémionokat.

Így célunk az volt, hogy olyan peptideket találjunk, melyek képesek lehetnek szelektíven megkötni toxikus ólom(II)- és kadmium(II)iont. A peptidek három csoportjának szilárd fázisú szintézisét és ólom(II) és kadmium(II)komplexeinek karakterizálását tűztük ki célul, néhány esetben kiegészítve ezeket a cink(II)- és nikkel(II)komplexek jellemzésével. Arra kerestük a választ, hogy

- 1) a különböző számban aszparaginsavat tartalmazó peptidek ólom(II)komplexeinek stabilitását hogyan befolyásolja az oldalláncbeli karboxilátcsoportok számának növelése?
- 2) a kistagszámú, egy, illetve két ciszteint tartalmazó terminálisan védett peptidek mutatnak-e szelektivitást az ólom(II), illetve kadmium(II) megkötésében?
- 3) a két cisztein egymástól való távolsága, illetve a cisztein mellett levő egyéb oldalláncbeli donorcsoportok hogyan befolyásolják az ólom(II)ionnal alkotott komplexek képződését?
- 4) az N-terminálisan szabad, két ciszteint tartalmazó oligopeptidek ólom(II)- és nikkel(II)komplexei esetén hogyan befolyásolja a koordinációs kémiai viselkedést és a peptid fémionmegkötő képességét az N-terminális aminocsoport és az N-terminálishoz közeli cisztein távolsága?

II. ALKALMAZOTT TECHNIKÁK

A vizsgált peptidok egy részét (**1. ábra**) **szilárdfázisú peptidszintézissel** egy Liberty 1TM (CEM, Matthews, NC) automatikus mikrohullámú peptidszintetizáló készülékkel állítottuk elő a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban. Az N-terminuson acilezett, illetve szabad aminocsoporttal rendelkező peptidokat is Fmoc/*t*Bu technikával állítottuk elő. A C-terminuson amidált végződést a Rink Amide AM típusú gyanta biztosította. A karboxil- és aminocsoportok aktiválásához a TBTU/HOBt/DIEA stratégiát használtuk. A szintézist *N,N*-dimetilformamidos (DMF) közegben végeztük.

A vizsgált peptidok másik részét (**2. ábra**) kereskedelmi forgalomból szereztük be.

A liofilizált termék tisztaságát **nagynyomású folyadékkromatográfiás** (RP-HPLC) módszerrel ellenőriztük. Ehhez egy analitikai Teknokroma Europa Peptide C18 (250 mm x 4,6 mm, pólusméret: 120 Å, szemcseméret: 5 µm) típusú kolonnát és Jasco MD-2010 plus diódasoros detektort használtunk. A detektálás 222 nm-en történt, ami a peptidkötésre jellemző elnyelési hullámhossz maximuma. A vizsgálatok során gradiens elúciót alkalmaztunk. Eluensként 0,1 V/V% TFA-t tartalmazó vizet és acetonitrilt használtunk, ahol az acetonitril aránya a 0-15-ig percig 20 V/V%-ra nőtt, majd a tizenötödik perctől a huszadik percig 0 V/V%-ra csökkent, az áramlási sebesség 0,8-1,0 ml/perc peptidtől függően.

A vizsgált ligandumok peptidtartalmát **pH-potenciometriás** vizsgálattal is ellenőriztük. Ezt a módszert alkalmaztuk a peptidok protonálódási állandóinak és fémionkomplexei stabilitási állandóinak meghatározására. A kísérleti adatokat felhasználva a PSEQUAD és a SUPERQUAD számítógépes programmal végeztük a számításokat. A mérések egy részét a Mettler Toledo T50 készülékkel ($I=0,20 \text{ mol/dm}^3$

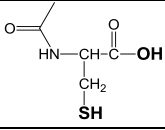
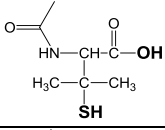
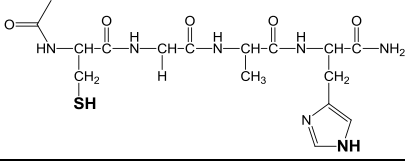
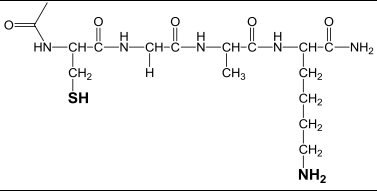
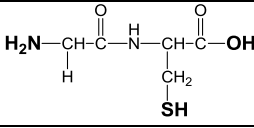
KNO_3 ionerősség, $T=298,0$ K), másik részét Molspin titrálóberendezéssel ($I=0,20$ mol/dm³ KNO_3 , illetve KCl , $T=298,0$ K). A vizsgálatok vizes közegben történtek, különböző fémion-ligandum arányok mellett. Az adott rendszerre jellemző paramétereket felhasználva a részecskeeloszlási görbéket a MEDUSA nevű számítógépes programmal készítettük el.

A szerkezetmeghatározáshoz szükséges **UV-Vis spektrofotometriás** méréseinket a nikkell(II)-komplexekre 200-900 nm, az ólom(II)- és kadmium(II)-komplexekre 200-400 nm hullámhossz tartományban 1,000 cm-es kvarc küvettában végeztük egy Perkin Elmer Lambda 25 kétsugaras fotométerrel. A spektrumokat különböző fémion-ligandum aránynál, különböző pH-kon vettük fel.

Nikkell(II)iont tartalmazó rendszerek estében szerkezetmeghatározásra **CD-spektroszkópiát** is alkalmaztunk. A CD méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén egy Jasco J-810 típusú spektrométeren végeztük 220-800 nm hullámhossztartományban 1,000 cm-es és 0,100 cm-es úthosszúságú küvettákat használva. A rendszerek különböző fémion-ligandum aránynál, különböző pH-kon lettek felvéve.

A komplexképződés folyamatának nyomon követésére, valamint a peptidok tisztaságának ellenőrzésére **NMR spektroszkópiás** méréseket végeztük a Bruker Avance DRX 400 MHz FT-NMR és Bruker AM 360 MHz FT-NMR készülékeken. A kiértékeléshez a TopSpin 3.5 és a MestReNova 9.0 szoftvereket használtuk.

Tömegspektrometria (ESI-MS) segítségével azonosítottuk az előállított ligandumokat, és egyes esetekben a keletkezett fémkomplexeket. A vizsgálatokat a maXis II MicroTOF-Q típusú Qq-TOF MS készüléket használva ESI ionforrás mellett pozitív és negatív módban végeztük.

 <chem>CC(=O)NCC(S)C(=O)O</chem>	Ac-Cys
 <chem>CC(=O)N[C@@H](C)C(=O)O</chem>	Ac-Pen
 <chem>CC(=O)N[C@@H](CS)C(=O)N[C@@H](H)C(=O)N[C@@H](C)C(=O)N[C@@H](Cc1c[nH]c1)C(=O)N</chem>	Ac-CGAH-NH ₂
 <chem>CC(=O)N[C@@H](CS)C(=O)N[C@@H](H)C(=O)N[C@@H](C)C(=O)N[C@@H](CCCCN)C(=O)N</chem>	Ac-CGAK-NH ₂
 <chem>NCC(=O)N[C@@H](CS)C(=O)O</chem>	GlyCys
<p>2. ábra: A kereskedelmi forgalomból megvásárolt, vizsgált peptidok szerkezete.</p>	

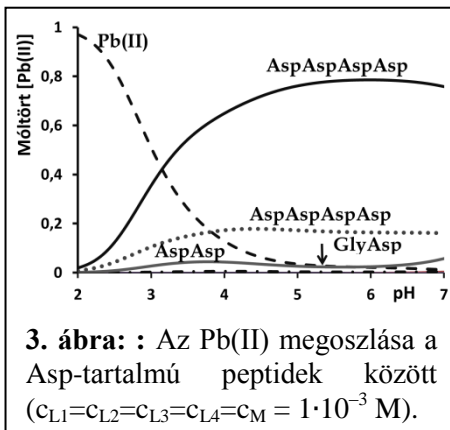
III. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

3.1 Módszerfejlesztést végeztünk az Pb(II)-ionot tartalmazó rendszerek fotometriás vizsgálataihoz.

- Előállítottuk az ólom(II)-trifluoracetát oldatot, melynek a vizsgált hullámhossz tartományban nincs UV-elnyelése.
- Meghatároztuk az ólom(II)ionhoz koordinálódott tiolátsoportok számát jellemző abszorpciós maximumot. Az egy tiolátsoport koordinációját jellemző abszorpciós maximum 276-277 nm hullámhossz tartományban, a két tiolátsoporté pedig 309-311 nm hullámhossz tartományban jelenik meg.

3.2. Jellemeztük a növekvő számban aszparaginsavat tartalmazó peptidok Pb(II)-komplexeit.

- Megállapítottuk, hogy az aszparaginsav β -karboxilát csoportjainak hatása egyértelmű, azok közvetlenül kötődnek a fémionhoz, mely a komplexek megnövekedett stabilitását eredményezi.



3. ábra: Az Pb(II) megoszlása a Asp-tartalmú peptidok között ($C_{L1}=C_{L2}=C_{L3}=C_{L4}=C_M = 1 \cdot 10^{-3}$ M).

- Mind a négy peptid esetében (GlyAsp, AspAsp, AspAspAsp és AspAspAspAsp) csak 1:1 összetételű mononukleáris komplexek jelennek meg, biszkomplexeiket még nagy ligandumfelesleg tartalmú oldatban sem tudtunk kimutatni. A komplexek stabilitása nő a β -karboxilát csoportok számának növelésével (3).

ábra), és nem befolyásolja a ligandum mérete, illetve annak megnövekedett negatív töltése.

- A komplexekben, mint horgonydonor-atom, egy vagy több karboxilát oxigén koordinálódik az Pb(II)-ionhoz, és a terminális aminos csoport protonált marad a protonált részecskékben.
- Ezen peptidek komplexeinek stabilitását összehasonlítva a kutatócsoportunkban korábban már vizsgált fémionokkal, az alábbi sorrendet írhatjuk fel:



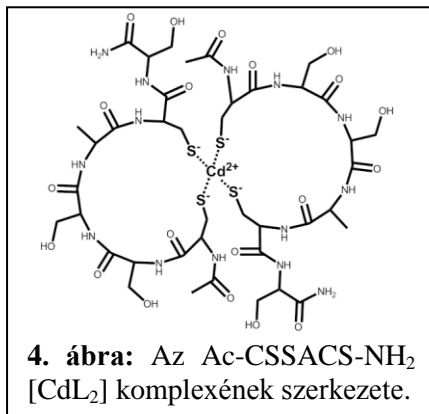
3.3. Jellemeztük az N-terminálisan védett, egy, illetve két ciszteint tartalmazó peptidek Pb(II)-komplexeit.

- Megállapítottuk, hogy az egy ciszteint tartalmazó peptidek ólom(II)komplexeiben csak a tiolátcsoport vesz részt a komplexképződésben, még akkor is, ha a ligandumban más donoratomot tartalmazó aminosav (lizin vagy hisztidin) is található.
- Néhány esetben kialakulnak a biszkomplexek is, a fotometriás adatok alapján pedig a triszkomplexek képződése sem zárható ki.
- Megállapítottuk, hogy ekvimoláris oldatban jellemző a polimer szerkezetű komplexek képződése, amelyet a spektrofotometriás mérések támasztottak alá.
- Amennyiben a peptidben két cisztein is található, úgy mindkét aminosav tiolátcsoportja részt vesz a komplexképződésben.
- Biszkomplex képződését csak az Ac-SCCS-NH₂ ligandum esetében feltételeztünk, de egyik esetben sem zárhatjuk ki a polimer szerkezetű komplexek jelenlétét sem.
- Igazoltuk, hogy a ciszteinek száma, és a peptidben lévő pozíciója befolyásolja a keletkező fémkomplexek stabilitását. A két ciszteint tartalmazó peptidek sokkal erősebben kötik meg az

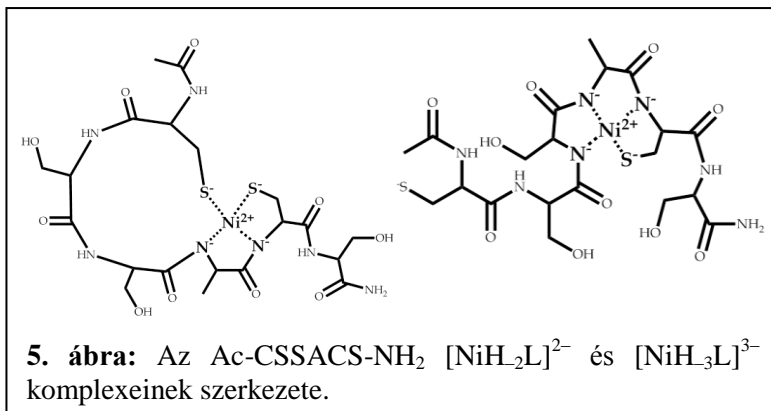
ólom(II)iont, mint az egy ciszteint, illetve az egy ciszteint és egy másik donorcsoportot is tartalmazó N-terminálisan védett peptidek.

3.4. Jellemeztük néhány N-terminálisan védett, egy, illetve két ciszteint tartalmazó peptid Cd(II)-, Zn(II)- és Ni(II)-komplexeit.

- Megállapítottuk, hogy az Ac-SAAC-NH₂, az Ac-AAAC-NH₂, és az Ac-CSSACS-NH₂ peptidek Cd(II)- és Zn(II)-ionnal minden esetben bisz- vagy triszkomplexeket képeznek (**4. ábra**), ám Ni(II)-ion jelenlétében csak monokomplexek alakulnak ki.



- A nikkel(II)ion számára szintén a cisztein tiolátcsoportja a horgonycsoport, de ebben az esetben a Ni(II) képes az amidnitrogének deprotonálódását elősegíteni, így ~11,0-es pH felett már a (S⁻,N⁻,N⁻,N⁻) koordinációs mód a jellemző.
- Az Ac-CSSACS-NH₂ [NiH₂L]²⁻ komplexében a koordináció az (S⁻,N⁻,N⁻,S⁻) donorcsoportokon keresztül valósul meg, és csak nagyobb pH-n, a [NiH₃L]³⁻ kialakulásával lép ki az egyik kén donoratom a koordinációs szférából (**5. ábra**).

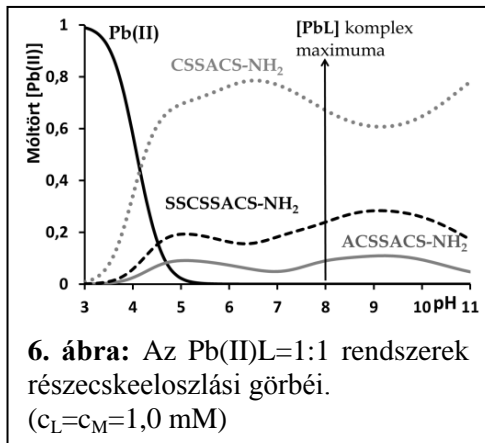


- A vizsgált rendszerek adataiból számolt pM értékek alapján ($c_L = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $c_M = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) igazoltuk, hogy a két ciszteint tartalmazó védett Ac-CSSACS-NH₂ peptid fémionkötő képessége mind a négy vizsgált fémion esetén jóval nagyobb, mint az egy ciszteint tartalmazó peptideké.

3.5. Jellemeztük az N-terminálisan szabad, két ciszteint tartalmazó peptidok Pb(II)-, Cd(II)- és Zn(II)-komplexeit, feltártuk a különböző peptidok és különböző fémionok esetén kialakuló komplexek eltérő koordinációs módjait.

- Megállapítottuk, hogy az ólom(II)ion nagy stabilitású komplexeket képez mindhárom N-terminálisan szabad, két ciszteint tartalmazó oligopeptiddel (CSSACS-NH₂, ACSSACS-NH₂ és SSCSSACS-NH₂).
- Megállapítottuk, hogy a komplexek összetétele hasonló, ám a koordinációs módokban vannak eltérések.

- A CSSACS-NH₂ peptid [PbL] komplexének stabilitása nagyobb a másik két peptid [PbL] komplexének stabilitásához képest, ami a ligandum stabil háromfajú koordinációjának köszönhető (**6. ábra**).

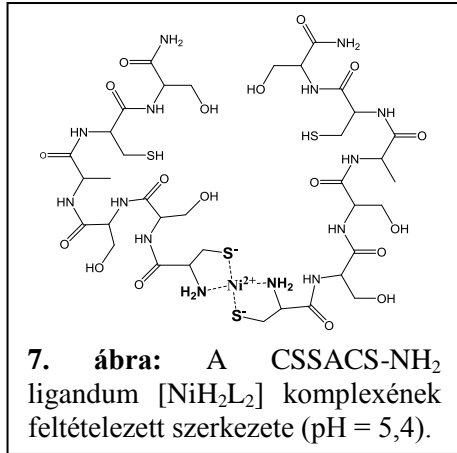


- Megállapítottuk, hogy ha a –CXXXC– szekvencia távolabb van a molekula N-terminális részétől, az (S⁻,S⁻) donoratom a fő kötőhely az ólom(II)ion számára, és az N-terminális aminoszoport koordinációban való részvétele jelentősen lecsökken, vagy akár elhanyagolható.
- Kimutattuk a biszkomplexek kialakulását az ACSSACS-NH₂ és az SSCSSACS-NH₂ peptidok esetében.

- Igazoltuk, hogy a legfőbb különbség ezen biszkomplexek között az, hogy az Pb(II)-ionhoz $3S^-$ donoratomokon keresztül koordinálódik a két ligandum, míg a Cd(II) és Zn(II) esetében a CdH_xL_2 és a ZnH_xL_2 komplexekre a $2x(S^-,S^-)$ ($x = 0-2$) koordinációs mód a jellemző, melyre magyarázat a kialakuló komplexek eltérő geometriája.

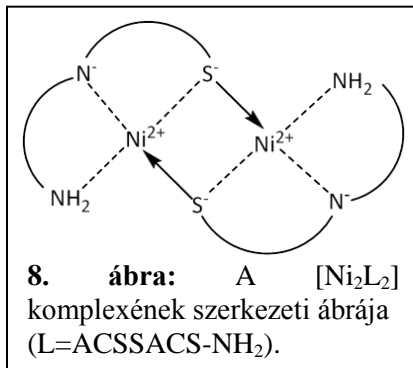
3.6. Jellemeztük az N-terminálisan szabad, két ciszteint tartalmazó peptidok Ni(II)-komplexeit.

- Ni(II)-iont tartalmazó rendszerben a CSSACS-NH₂ peptid esetén a 6,5-ös pH feletti csapadékképződés miatt pH-potenciometriás módszerrel csak a [NiH₂L₂] komplex (7. ábra) stabilitási állandóját tudtuk meghatározni, melyben a koordinációs mód: 2X(NH₂,S⁻).



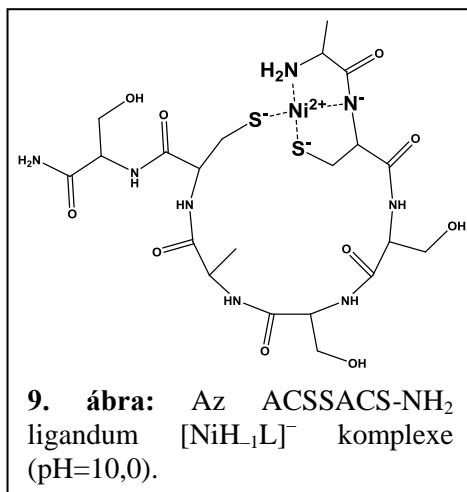
- Megállapítottuk, hogy a második cisztein tiolszortjának deprotonálódásával párhuzamosan polimer szerkezetű komplexek is képződnek. Igazoltuk, hogy erősen lúgos közegben a C-terminális cisztein lesz a fő kötőhely a Ni(II)-ion számára és (S⁻,N⁻,N⁻,S⁻) vagy (N⁻,N⁻,N⁻,S⁻) koordinációs módú komplexek képződnek.
- Megállapítottuk, hogy az ACSSACS-NH₂ ligandumban az N-terminális rész a fő kötőhely a Ni(II)-ion számára, a fémiont az (NH₂,N⁻,S⁻) donorcsoportok koordinálják.

- Kimutattuk, hogy ligandumfelesleg esetén biszkomplex képződik, ahol a második ligandum a tiolátcsoport kén donoratomján keresztül telíti a fémion koordinációs szféráját, míg ekvimoláris oldatban két $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-)$ koordinálta egység



kapcsolódik tioláthídon keresztül dimer szerkezetű komplexek kialakulásával (**8. ábra**).

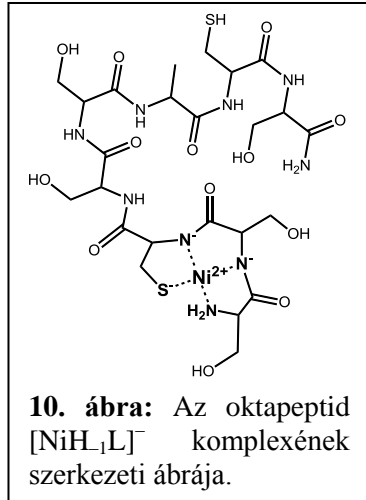
- Megállapítottuk, hogy lúgos pH-tartományban a C-terminális rész tiolcsoportjának deprotonálódását követően ez a csoport telíti a Ni(II)-ion koordinációs szféráját, megbontva a ligandumfelesleg jelenlétében kialakuló biszkomplexet, illetve az ekvimoláris oldatban



- képződött dimer szerkezetű komplexeket (**9. ábra**).
- Igazoltuk, hogy amennyiben a tiolátcsoport az N-terminálístól számított harmadik helyen van, szintén az N-terminális rész az elsődleges kötőhely a Ni(II)-ion számára, és az $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}^-, \text{S}^-)$ donorcsoportok telítik a Ni(II) koordinációs szféráját, így széles

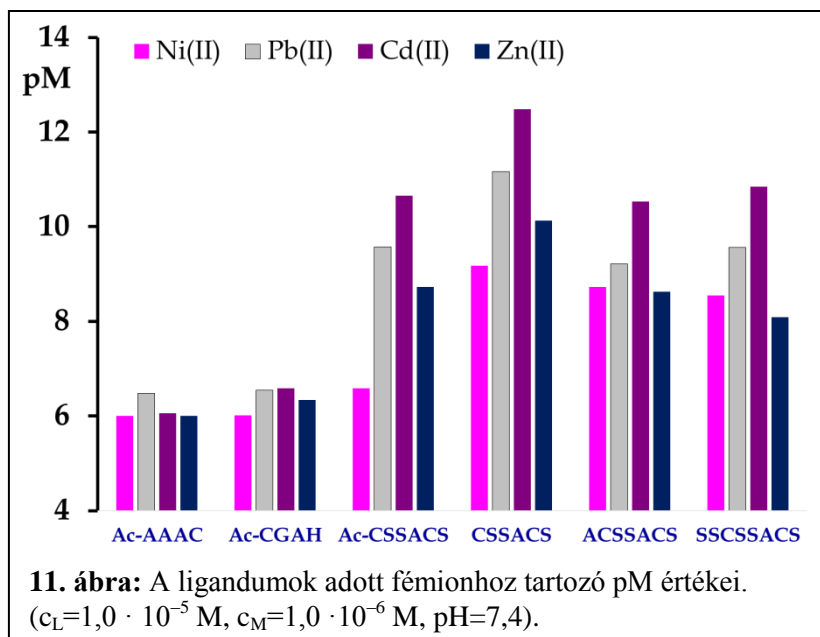
pH-tartományban az egymagvú $[\text{NiH}_1\text{L}]^-$ komplex az uralkodó részecske (**10. ábra**).

- Fémion felesleg jelenlétében az ACSSACS-NH₂ és az SSCSSACS-NH₂ peptideknél is mind az N-terminális rész, mind a C-terminális tiolátcsoport kötőhelyet jelentenek a fémionok számára, így kétmagvú komplexek képződését is kimutattuk.
- Az oktapeptid esetén 9-es pH felett ekvimoláris oldatban is jelentős mennyiségben jelenik meg a kétmagvú részecske.



Összességében megállapítottuk, hogy a fémionok számára fontos kötőhelyet jelent a cisztein tiolátcsoportja. A tiolátkén donoratom koordinációban való részvétele nagyobb stabilitású ólom(II)komplexekeket eredményez, mint az aszparaginsav β -kaboxilát csoportja. Ha több cisztein van a peptidláncban, akkor nagyobb stabilitású komplexek keletkeznek. A kistagszámú védett peptidek a rosszul oldódó komplexek képződése miatt önmagukban nem alkalmasak a vizsgált toxikus fémionok szelektív megkötésére.

Bár nagy szelektivitást az N-terminálisan szabad, két ciszteint tartalmazó peptideknél sem tapasztaltunk, megállapítottuk, hogy a toxikus Pb(II)- és Cd(II)-ionokat nagyobb stabilitással kötik, mint a létfontosságú Zn(II)-iont (**11. ábra**).



IV. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTÁSI LEHETŐSÉGEI

A korábbi eredmények alapján láhattuk, hogy a fémionok megkötésére alkalmas ligandumok palettája igen széles. Ezek közül biológiai szempontból az egyik legjelentősebb ligandumcsaládot a különböző aminosav-összetételű peptidek alkotják. Ezek a peptidek képesek nagy stabilitású komplexet képezni, mind a létfontosságú, mint a toxikus fémionokkal, így egyértelműen fémionszelektívnek nem nevezhetjük őket.

Az doktori képzésem alatt végzett kutatás a bioszervetlen- és koordinációs kémiában alapkutatásnak számít, ám ezek az eredmények jól tükrözték, hogy az aminosavszekvencia és a donorcsoportok variálásával a peptid fémionmegkötő képességét befolyásolni lehet.

Ezek ismeretében olyan peptidek tervezése és szintézise irányába érdemes a vizsgálatokat folytatni, amelyekben a két cisztein mellett további oldalláncbeli donorcsoportot tartalmazó aminosavakat építünk, ami lehetővé teszi a peptid fémionkötő képességének finomszabályozását is.

Az így kapott peptidek által lehetőség nyílik akár a gyógyászati kezelések elvégzésére is, például az ólom(II)- vagy kadmium(II)-ion emberi szervezetből való szelektív eltávolítására.

V. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

1. Györgyi Szunyog, Katalin Várnagy

Lead(II) complexes of oligopeptides containing two cysteine residues

Inorganica Chimica Acta, 472 (2018) 157-164.

IF: 2,433

2. Norbert Lih, Márton Lukács, Mária Raics, Györgyi Szunyog, Katalin Várnagy, Csilla Kállay

The effect of carboxylate groups on the complexation of metal ion with oligopeptides – Potentiometric investigation

Inorganica Chimica Acta, 472 (2018) 165-173.

IF: 2,433

3. Györgyi Szunyog, Alíz Laskai, Dóra Szűcs, Imre Sóvágó, Katalin Várnagy

A comparative study on the nickel binding ability of peptides containing separate cysteinyl residues

Dalton Transactions (közlésre benyújtva, revízió alatt)



Nyilvántartási szám: DEENK/317/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Szunyog Györgyi
Neptun kód: G7JOL0
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056733

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Szunyog, G.**, Várnagy, K.: Lead(II) complexes of oligopeptides containing two cysteine residues.
Inorg. Chim. Acta. 472, 157-164, 2018. ISSN: 0020-1693.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.067>
IF: 2.433
2. Lih, N., Lukács, M., Hadháziné Raics, M., **Szunyog, G.**, Várnagy, K., Kállay, C.: The effect of carboxylate groups on the complexation of metal ion with oligopeptides - Potentiometric investigation.
Inorg. Chim. Acta. 472, 165-173, 2018. ISSN: 0020-1693.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.032>
IF: 2.433





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

További közlemények

Idégen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

3. **Szunyog, G.**, Várnagy, K.: Lead Complexes of Cysteine Containing Peptides.

In: 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference : Program & Book of Abstracts,
Hungarian Chemical Society, Budapest, 160, 2016. ISBN: 9789639970670

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 4,866

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
4,866**

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

Debrecen, 2019.09.06.

