

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Nikkel szuperoxid dizmutáz enzimmodellek
szerkezeti és SOD aktivitás vizsgálata**

Bonczidai-Kelemen Dóra

Témavezetők: Dr. Fábián István

Dr. Lihi Norbert



DEBRECENI EGYETEM

Kémia Doktori Iskola

Debrecen, 2026

Az értekezésben előforduló rövidítések

CD	cirkuláris dikroizmus
CE-MS	tömegspektrométerrel kapcsolt kapilláris elektroforézis
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (elektroporlasztásos ionizáció)
ESR	eletronspin rezonancia
IC_{50}	50%-os inhibícióhoz tartozó komplex koncentráció
KO ₂	kálium-szuperoxid
MS	tömegspektrometria
NiSOD	nikkel szuperoxid dizmutáz
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (mágneses magrezonancia)
O ₂ ^{•-}	szuperoxid gyökanion
ROS	reaktív oxigén részecskék
SOD	szuperoxid dizmutáz
TOF	<i>Time of Flight</i> (repülési idő)

I. Bevezetés és célkitűzés

Az oxigén metabolizmusa során reaktív oxigén részecskék (ROS) képződhetnek, melyek közül a szuperoxid gyökkanion ($O_2^{\cdot-}$) az egyik legjelentősebb. Bár kis koncentrációban szükség van rá bizonyos biológiai folyamatokban, felhalmozódása káros hatást fejt ki közvetlenül károsítva a biomolekulákat vagy közvetett módon az által, hogy további ROS-ok képződnek belőle. A ROS-ok káros koncentrációban való felhalmozódását a biológiai rendszerek antioxidáns hatású enzimekkel akadályozzák meg. Ezen enzimek közül a szuperoxid dizmutázok (SOD) kiemelkedő fontosságúak, feladatuk az $O_2^{\cdot-}$ koncentrációjának a szabályozása. A SOD-ok az aktív centrumukban olyan fémionokat tartalmaznak, melyek egyelektronos oxidációja/redukciója könnyen megvalósul. A SOD-ok ennek megfelelően három csoportra oszthatók a központi fémion minősége és a fehérje komplexek szerkezet alapján: vas/mangán, réz-cink és nikkel tartalmú SOD enzimek. A NiSOD enzim ezek közül a legkésőbb izolált SOD.

A NiSOD enzim egy homohexamer, vagyis hat monomeregységből épül fel, melyek mindegyike tartalmaz egy katalitikusan aktív nikkelcentrumot. A többi SOD enzimtől eltérően a monomerek N-terminális régiójában megtalálható az összes olyan donoratomb, amely a fémion megkötéséért és a SOD aktivitásért felelős. Ezt a kilenc aminosavból álló szekvenciát nikkelkötő huroknak nevezzük (wtNiSOD: HisCysAspLeuProCysGlyValTyr). Fiziológias pH-n az enzim redukált formájában található Ni(II)-iont az N-terminális aminocsoport, a peptidváz első amid nitrogénje, valamint a második és hatodik helyen lévő ciszteinek tiolát-csoportjai koordinálják síknégyzetes geometriát alakítva ki. A dizmutálási reakcióban képződő Ni(III) oxidációs állapot esetében ezt a koordinációs módot az első helyen lévő hisztidin imidazol nitrogénjének axiális koordinációja egészíti ki, így négyzetes piramisos

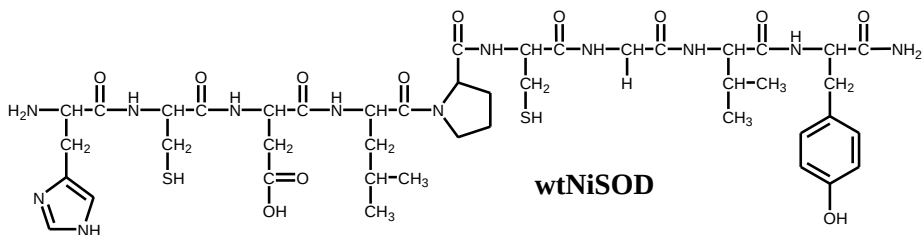
térszerkezet alakul ki. Bár a NiSOD enzimek oxidált és redukált formáinak szerkezete ismert, a nikkell-komplexek és a $O_2^{\bullet-}$ között lejátszódó reakció mechanizmusáról az eddigi szakirodalmi közlemények alapján kevés és ellentmondásos információ áll rendelkezésünkre.

Munkánk során ezért a wtNiSOD (HCDLPCGVY) különböző pontmutációit tartalmazó kis tagszámú peptidek (9 aminosav) és nikkell-komplexeinek szerkezeti és SOD aktivitás vizsgálatát tűztük ki célul, melyek segíthetnek felderíteni a különböző funkciós csoportok szerepét a dizmutálási reakcióban. Az így tervezett ligandumok és a szakirodalomban eddig közölt NiSOD enzimmodellek csak egyetlen fémion megkötésére alkalmasak. Azonban a NiSOD enzim hat fémiont koordinál, melyek mindegyike képes katalizálni a $O_2^{\bullet-}$ bontását. Ezért további célunk volt egy olyan peptid vizsgálata, amely több fémion megkötésére is alkalmas.

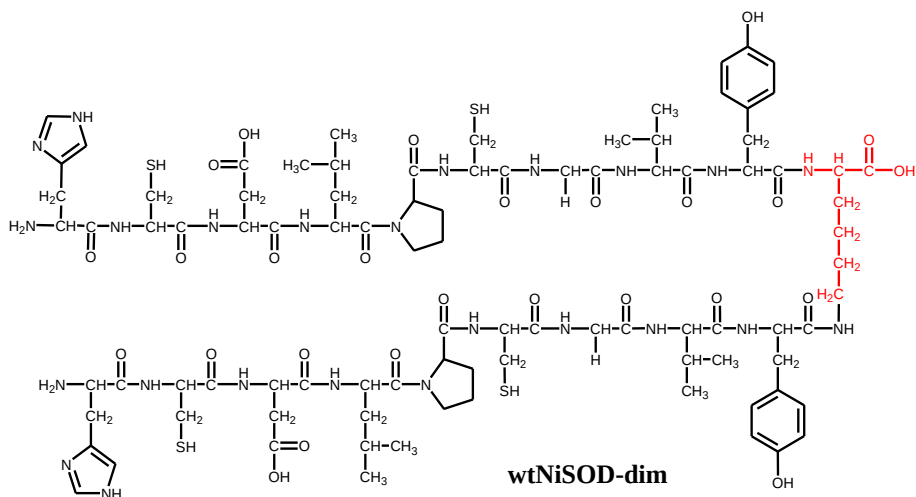
A szakirodalomban található SOD aktivitás mérési módszerek korlátai miatt továbbá célunk volt egy új, szekvenciális *stopped-flow* technikán alapuló SOD aktivitás mérési módszer fejlesztése.

II. Alkalmazott módszerek

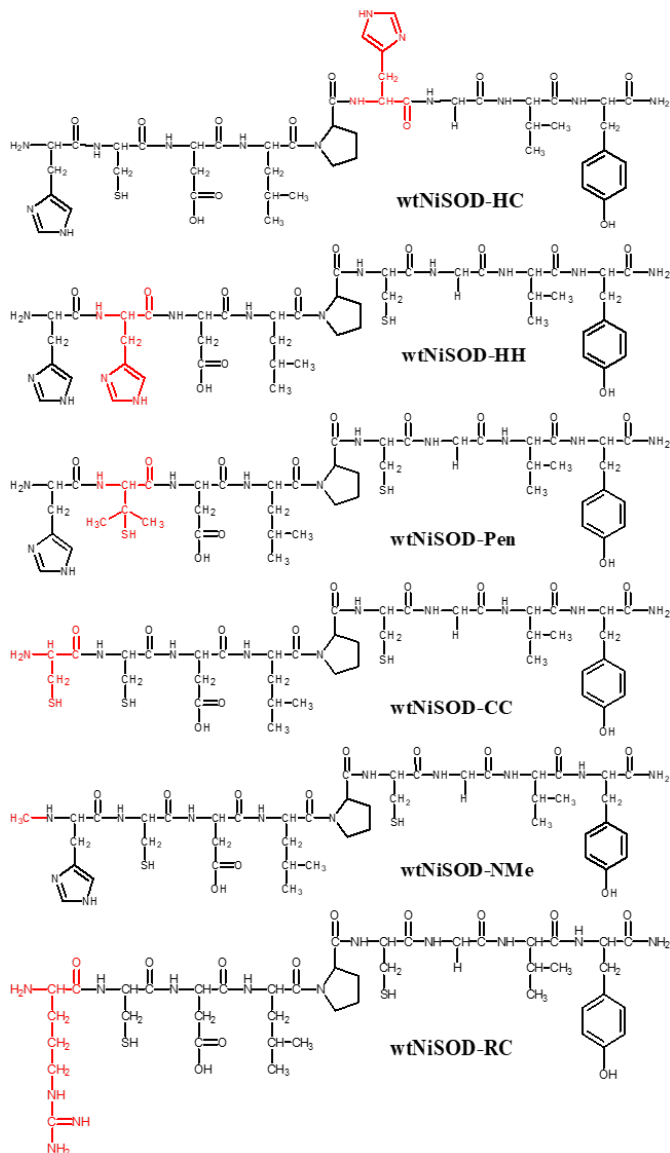
Az általunk vizsgált peptideket a Synpeptide Co. (Shanghai, Kína) cég szintetizálta, melyeket további tisztítás nélkül használtunk fel, a peptid törzsoldatok koncentrációját pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. A NiSOD enzim N-terminális végének első kilenc aminosavjából álló peptid szerkezete az 1. ábrán látható, míg a dolgozatban vizsgált peptidek szerkezete a 2. és 3. ábrán szerepel.



1. ábra: A NiSOD enzim N-terminális régiójának első kilenc aminosavjából álló nikkel-kötő hurok szerkezete.



2. ábra: A NiSOD enzim nikkel-kötő hurkának lizinnel kapcsolt dimerjének szerkezete.



3. ábra: A dolgozatban vizsgált kilenc aminosavból álló peptidek szerkezete. A szerkezetekben piros szín jelöli a wtNiSOD alapvegyület szerkezetétől különböző funkciós csoportokat és aminosavakat.

A peptidek protonálódási és a Ni(II)-komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometria segítségével határoztuk meg, aminek során a pontosan ismert koncentrációjú KOH-mérőoldatot ($\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$) Hamilton-fecskendővel felszerelt Mol-AcS mikrobüretta adagolta. A pH mérése Metrohm 6.0234.110 kombinált üvegelektóddal történt, amely MOLSPIN pH-mérőhöz csatlakozott. Az elektród egy pontos kalibrálása $0,05 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldattal történt 25°C -on, melynek pH-ja ilyen körülmények között 4,005. A titrálás során a kevertetést mágneses keverővel biztosítottuk, az inert gáztér eléréséhez a mintaoldat fölött argont áramoltattunk át, az állandó 25°C hőmérsékletet ultratermosztáttal biztosítottuk. A kapott titrálási görbék kiértékelése SUPERQUAD és PSEQUAD számítógépes programokkal történt.

A peptidek Ni(II)-komplexeiknek koordinációs módját pH-függő UV-látható és CD spektrumok felvételével vizsgáltuk. Az UV-látható spektrumokat Agilent Technologies Cary 8454 UV-VIS diódasoros spektrofotométer segítségével rögzítettük 250-800 nm hullámhossz tartományban. A CD spektroszkópiás vizsgálatokat JASCO-810 típusú készüléken végeztük 0,100 és 1,000 cm úthosszúságú küvetákban, 200-800 nm hullámhossz tartományban. A spektrumok kiértékelése a műszereket gyártó cégek saját szoftverével és MS Excel táblázatkezelő program segítségével történt.

Egyes peptidek és Ni(II)-komplexeik esetében NMR spektrumokat is rögzítettünk. Ehhez az ^1H NMR és 2D (^1H - ^{13}C HSQC) spektrumokat Bruker Advance 400 MHz készüléken rögzítettük, a kiértékelés során TopSpin 3.2 és MestreNova 8.1 szoftvereket használtunk.

Számos peptid esetében készültek tömegspektrumok, ahol a különböző összetételű Ni(II)-komplexek vagy azok kálium-szuperoxiddal (KO_2) oxidált mintáinak vizsgálata ESI-TOF-MS

módszerrel egy Bruker maXis II MicroTOF-Q típusú Qq-TOF-MS készüléken negatív ionmódban történt.

A wtNiSOD-dim ligandum komplexképződését fiziológiás pH-n CE-MS készülékkel vizsgáltuk. A kapilláris elektroforézis mérések 7100 Agilent készülékkel történtek, mely diódasoros detektorral volt felszerelve. A hozzá kapcsolt tömegspektrométer egy maXis II UHR ESI-QTOF MS készülék (Bruker).

A tömegspektrumok kiértékelése a Bruker Compass DataAnalysis 4.4 szoftverével készült, az izotópeloszlást az IsotopePattern szoftverrel (Bruker) számítottuk ki.

A Ni(II)-komplexek KO_2 -dal történő oxidálásakor keletkező Ni(III)-komplexek szerkezetét ESR spektroszkópia segítségével vizsgáltuk. Az ESR spektrumokat a *HUN-REN TTK Szerkezetkutató Központ*ban Dr. May Nóra Veronika segítségével rögzítettük. A mérések során egy BRUKER EleXsys E500 spektrométert használtunk, a spektrumokat 77 K hőmérsékleten rögzítettük.

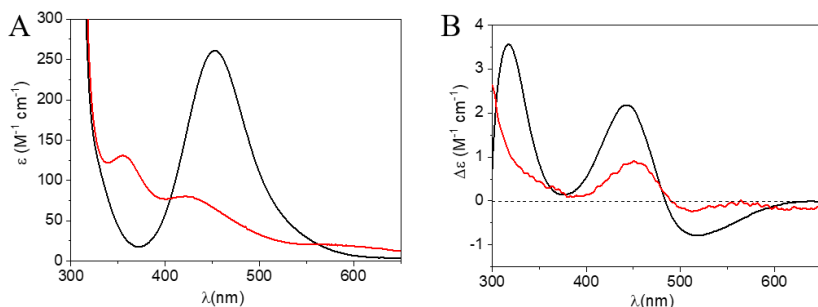
A Ni(II)-komplexek SOD aktivitás vizsgálata két féle módon történt. A szakirodalomban megtalálható McCord-Fridovich módszer alkalmazása során a spektrumokat Agilent Technologies Cary 8454 UV-VIS diódasoros spektrofotométer segítségével rögzítettük. Az általunk fejlesztett szekvenciális stopped-flow technikán alapuló SOD aktivitás mérési módszer során egy Applied Photophysics SX-20 készüléket használtunk, az adatok feldolgozása a vezérlő szoftverrel, illetve MS Excel táblázatkezelő program segítségével történt. A kinetikai görbék illesztése Scientist program segítségével valósult meg.

III. Új tudományos eredmények

1. Igazoltuk, hogy a wtNiSOD nikkelkomplexeiben a koordinációs szférát érintő funkciós csoportok módosítása jelentős mértékben befolyásolja a peptidek Ni(II) ionnal képződő komplexeinek termodinamikai tulajdonságait és a komplexek Ni(III)-á történő oxidációját.

1.1. Bizonyítottuk, hogy a wtNiSOD peptid második és hatodik helyén lévő cisztein együttes jelenléte nélkülözhetetlen a NiSOD enzim redukált és oxidált formájával megegyező szerkezetű Ni(II)- és Ni(III)-komplexek kialakulásához, illetve a megfelelő SOD aktivitáshoz.

A wtNiSOD-HC (HCDLPHGVY) és a wtNiSOD-HH (HHDLP CGVY) peptidek sav-bázis és komplexképződési tulajdonságai jelentősen eltérnek a wtNiSOD alapvegyülethez képest. Ezen peptidek azonos összetételűek, de különböző szekvenciájúak. A hisztidinek eltérő helyzete jelentősen eltérő koordinációs módot eredményezett, melyet a $[\text{NiL}]^-$ komplexekre meghatározott UV-látható és CD spektroszkópiás moláris abszorbanciák is alátámasztanak (4. ábra). Az eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a hatodik helyen lévő cisztein befolyásolhatja a Ni(II)/Ni(III) pár redoxi tulajdonságait, míg a második helyen lévő cisztein a NiSOD enzim redukált formájára jellemző síknégyzetes térszerkezet kialakításában kulcsfontosságú.



4. ábra: A Ni(II)/wtNiSOD-HC 1:1 (fekete) és a Ni(II)/wtNiSOD-HH 1:1 (piros) koncentráció arányú rendszerek esetében képződő $[\text{NiL}]^-$ komplexek számított egyedi A: UV-látható és B: CD spektrumai.

A Ni(II)-komplexek oxidálását követően az ESR spektrumokban nem jelent meg a NiSOD enzim oxidált formájára jellemző nitrogén finomszerkezet (triplett felhasadás). Az oxidált minták tömegspektrumainak elemzésekor megállapítottuk, hogy a Ni(II)-komplexek adduktumot képeznek a $\text{O}_2^{\cdot-}$ -nal. Ezenkívül a wtNiSOD-HH peptid Ni(II)-komplexe a vízben oldott oxigénnel is adduktumot képez oxidálószer távollétében, amit szintén tömegspektrumok elemzésével támasztottunk alá.

1.2. Bizonyítottuk, hogy az első helyen lévő hisztidin cseréjével jelentősen befolyásolható a peptidek komplexképződési tulajdonságai.

A wtNiSOD-CC peptid esetében a hisztidint egy cisztein helyettesíti. A $[\text{NiHL}]^{2-}$ komplexben a Ni(II)-iont az N-terminális aminocsoport és a három cisztein tiolat-csoportja koordinálja síknégyszetes geometriában. Ez a koordinációs mód kiemelt termodinamikai stabilitású komplexet eredményez, ezért a NiSOD enzim redukált formájára jellemző (NH_2 , N^- , S^- , S^-) kötésmód kialakulása a lúgos pH-tartományba tolódik el. Ezzel együtt a wtNiSOD-CC peptid rendelkezik a legnagyobb nikkal

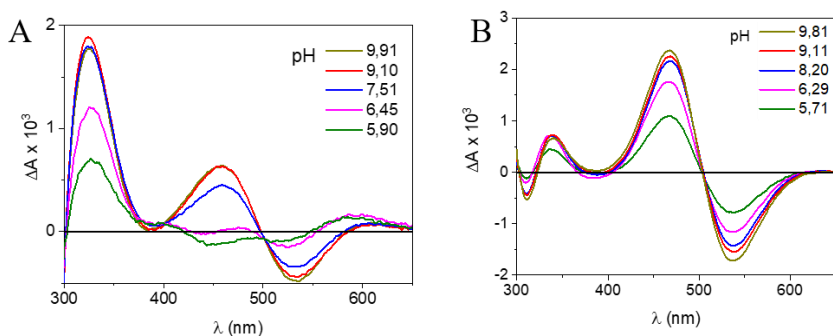
kötő affinitással a vizsgált kilenc tagszámú ligandumok közül fiziológias pH-n.

A wtNiSOD-RC ligandum esetében az első helyen lévő hisztidin helyett egy arginin található. A komplexképződés 5-ös pH-n kezdődik, azonban már ekkor megjelenik a (NH_2 , N^- , S^- , S^-) koordinációs módú $[\text{NiL}]$ komplex, amely ezután széles pH-tartományban uralkodó részecske. A ligandum Ni(II) -ion kötő képessége közel megegyezik wtNiSOD peptidével.

A Ni(II) -komplexek oxidálásakor nem jelent meg a Ni(III) -komplexekre jellemző felhasadás az ESR spektrumokban, ami nem meglepő, hiszen ez a jellegzetes felhasadás az N-terminális hisztidin imidazol nitrogénjének axiális koordinációjához rendelhető, amely ezekben a peptidekben hiányzik. Azonban a KO_2 oldatából jelentős mennyiségű $\text{O}_2^{\cdot-}$ fogyott el a Ni(II) -komplexek hozzáadása után, azaz ezek a komplexek képesek hatékonyan katalizálni a $\text{O}_2^{\cdot-}$ bomlását.

1.3. Bizonyítottuk, hogy a nikkellion koordinációjában résztvevő donorcsoportok közvetlen közelében található extra metilcsoportok képesek befolyásolni a peptidek komplexképződési tulajdonságait.

A wtNiSOD-Pen peptid esetében a második helyen lévő L-ciszteint egy D-penicillamin helyettesíti. A peptid szekvenciájában található aminosavak ezzel ellentétben, L sztereoizomerek, ami lehetővé teszi, hogy a penicillamin tiolát-csoportjának koordinációját a CD-spektrumokon szelektíven követhessük 310 nm-en, amit az 5. ábrán látható CD-spektrumok összehasonlítása is alátámaszt.

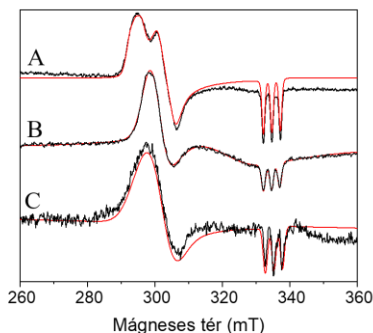


5. ábra: A Ni(II)/ligandum 1:1 koncentráció arányú rendszerek pH-függő CD spektrumai az A: wtNiSOD és a B: wtNiSOD-Pen modellek esetében.

($c_{\text{wtNiSOD}} = 1,5 \text{ mM}$; $c_{\text{wtNiSOD-Pen}} = 2,00 \text{ mM}$; $l = 1 \text{ cm}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$;
 $I = 0,2 \text{ M KCl}$)

A wtNiSOD-NMe ligandum a wtNiSOD peptid N-terminális aminocsoportjának metilezésével jött létre. A két különböző metilezett peptid sav-bázis tulajdonságai szinte azonosak. Ezen felül nagyon hasonló komplexképződési tulajdonságokat mutatnak. Lúgos pH-n azonban a wtNiSOD ligandumtól eltérően egy további lúgfogyasztó folyamat is lejátszódik. Szakirodalmi adatok alapján ez egy további amid nitrogén deprotonálódásához és koordinációjához köthető, melynek eredményeképp a második helyen levő aminosav tiolát-csoportja kiszorul a koordinációs szférából.

A Ni(II)-komplexek oxidációjakor az ESR spektrumokban megjelenik a Ni(III)-komplexekre jellemző szuperhiperfinom triplétt felhasadás (6. ábra). A meghatározott ESR paraméterek kis mértékben eltérnek a wtNiSOD peptid Ni(III)-komplexétől. Ez a metilcsoportok elektronküldő jellegéből fakad, amely befolyásolhatja az *in situ* képződő Ni(III)-ionon lokalizálódó spinsűrűséget.



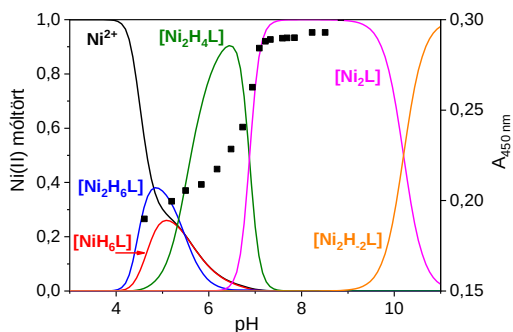
6. ábra: A Ni(III)/L 1:1 koncentráció arányú rendszerek mért (fekete) és számított (piros) CW X-sávú ESR spektrumai 77 K-en mérve, ahol L = A: wtNiSOD; B: wtNiSOD-Pen és C: wtNiSOD-NMe

2. Igazoltuk, hogy a wtNiSOD-dim ligandum képes több nikkelon megkötésére.

2.1. Bizonyítottuk, hogy a wtNiSOD-dim peptid ekvimolárishoz közeli fémion/ligandum arány esetén is képez dinukleáris komplexeket.

A peptid Ni(II)-ion kötő képességét fiziológiás pH-n CD spektroszkópia segítségével vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a peptid további amid nitrogéneken keresztül akár három fémion megkötésére is képes. Ezután vizsgáltuk a peptid és a Ni(II)-ion között kialakuló komplex képződésének kinetikáját CE-MS technika segítségével 0,9 : 1 fémion/ligandum arány mellett. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a komplexképződés viszonylag lassú és hogy a dinukleáris részecske már ekvimolárishoz közeli koncentráció aránynál is megjelenik. A fémion/ligandum 2:1 koncentráció arányú rendszer komplexképződésének tanulmányozásakor megállapítottuk, hogy fiziológiás pH-n mindkét fémion a NiSOD enzim redukált formájára

jellemző (NH_2 , N^- , S^- , S^-) kötésmódot alakít ki nagy stabilitású Ni(II) -komplexet eredményezve (7. ábra).

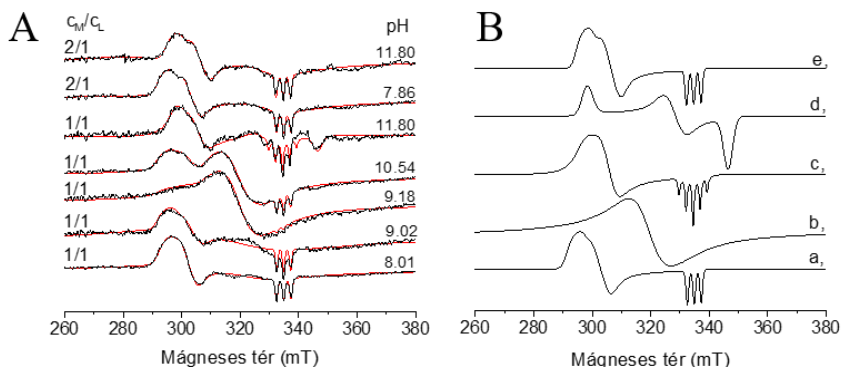


7. ábra: A Ni(II) -ion és a wtNiSOD-dim ligandum 2:1 koncentráció arányú rendszerének koncentráció eloszlási görbéje, valamint a 450 nm-en mért UV-látható abszorbancia a pH függvényében. ($C_{\text{Ni(II)}} = 2,4 \text{ mM}$;
 $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,2 \text{ M KCl}$)

2.2. Bizonyítottuk, hogy a wtNiSOD-dim Ni(II) -komplexeinek oxidálásakor a fémion/ligandum arány és pH jelentősen befolyásolja a képződő Ni(III) -komplexek szerkezetét.

A $\text{Ni(II)}/\text{wtNiSOD-dim}$ különböző koncentráció arányú és pH-jú rendszereinek oxidációjával nyert ESR spektrumok a 8. ábra A részén, a spektrumok szimulációjával nyert egyedi ESR spektrumok a 8. ábra B részén láthatók. A $\text{Ni(II)}/\text{ligandum}$ 2:1 koncentráció arányú (e), illetve a fiziológiás pH-jú 1:1 koncentráció arányú elegyeiben (a,) a NiSOD enzim oxidált formájára jellemző koordinációs mód alakul ki. A 9-es pH feletti 1:1 arányú rendszerekben a detektált ESR spektrumok további három Ni(III) -komplex képződésével írhatók le: a (b,) spektrumban a két paramágneses fémion közötti antiferromágneses csatolás eredményeként egy kiszélesedett ESR jel detektálható; a (c,) spektrumban látható szuperhiperfinom pentett felhasadás akkor jelenik meg, ha mindkét

imidazol nitrogén ($I_N = 1$) axiális pozíciókban koordinálódik a Ni(III)-centrumhoz; a (d₁) spektrumban az oxidáció eredményeképpen a párosítatlan elektron a $d_{x^2-y^2}$ pályán helyezkedik el és a donorcsoportok koordinációja erős π -viszontkoordinációt eredményez. Ez a koordinációs mód feltételezhető abban az esetben, ha a tiolát-csoportok és az amid nitrogén egy megnyúlt oktaéderes kristálytérben koordinálódik a Ni(III)-ionhoz.



8. ábra: A: A wtNiSOD-dim Ni(III)-komplexének mért (fekete) és szimulált (piros) ESR spektrumai különböző fémion : ligandum arány és pH esetén. B: A Ni(III) : wtNiSOD-dim 1:1 (a, - d,) és 2:1 (e,) koncentráció arányú rendszerének egyedi szimulált ESR spektrumai, melyek különböző állapotú Ni(III)-komplexek jelenlétére utalnak.

3. Igazoltuk, hogy a tanulmányozott modellrendszerek közül a wtNiSOD Ni(II) komplexhez hasonló SOD aktivitást mutatnak azok, amelyekben a peptid két cisztein tiolát-csoportja koordinálódik a fémionhoz. Az egyik tiolát lecserélése más donorcsoporttal jelentősen csökkenti a SOD aktivitást.

A McCord – Fridovich féle SOD módszer alapján a wtNiSOD peptid Ni(II)-komplexéhez képest a wtNiSOD-CC és -NMe peptidekkel

képződött komplexekre azonos nagyságrendű, de nagyobb, míg a wtNiSOD-RC komplexére kisebb IC_{50} értékeket határoztunk meg (1. táblázat). A wtNiSOD-RC modell kiemelkedő SOD aktivitásának oka feltehetően a pozitív töltésű arginin oldallánc jelenléte, amely elősegítheti a negatív töltésű $O_2^{\bullet-}$ kötődését a fémcentrumhoz. A koordinációs szférában csak egy tiolát-csoportot tartalmazó wtNiSOD-HC-vel és wtNiSOD-HH-val képződő Ni(II)-komplexekre meghatározott IC_{50} egy, illetve két nagyságrenddel nagyobb, mint wtNiSOD - Ni(II) rendszerre kapott érték.

1. táblázat: A peptidek Ni(II)-komplexeinek IC_{50} értékei és a katalízisre jellemző sebességi állandó értékek pH = 7,8-en.

	IC_{50} érték (μM)	k_{McCF} ($M^{-1}s^{-1}$) ^a
wtNiSOD	$3,9 \pm 0,2$	$6,9 \times 10^5$
wtNiSOD-HC	$37,4 \pm 0,3$	$7,2 \times 10^4$
wtNiSOD-HH	341 ± 5	$7,9 \times 10^3$
wtNiSOD-CC	7 ± 2	$3,8 \times 10^5$
wtNiSOD-NMe	$6,3 \pm 0,8$	$4,6 \times 10^5$
wtNiSOD-RC	$1,7 \pm 0,5$	$1,6 \times 10^6$

$$^a k_{McCF} = k_{NBT} \times [NBT] / IC_{50}, \text{ ahol } k_{NBT} = 59400 M^{-1}s^{-1}$$

4. Sikeresen kifejlesztettünk egy új, szekvenciális *stopped-flow* technikán alapuló SOD aktivitás mérési módszert.

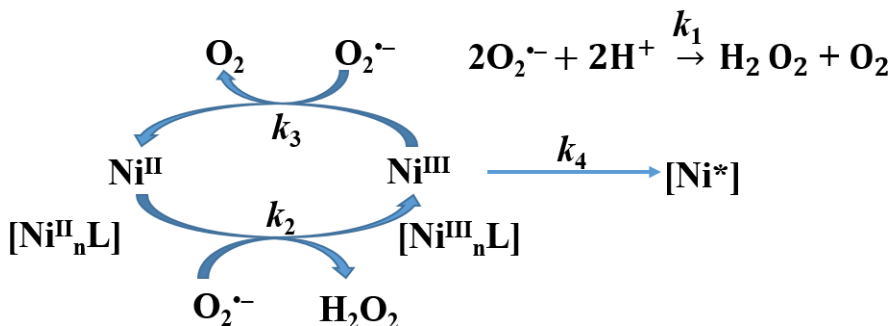
A mérésekhez KO_2 DMSO-ban készült oldatát használtuk, mert vizes közegben ez a vegyület elbomlik. A vizsgált komplexek vizes oldatban vannak, ezért a SOD aktivitás méréseket 1:1 térfogatarányú víz : DMSO oldószerkeletben végeztük oly módon, hogy a reaktánsokat csak közvetlenül a mérés előtt a *stopped-flow* készülékben elegyítettük. A módszerfejlesztés során megállapítottuk, hogy a víz és a DMSO

keveredése nem pillanatszerű, és a keverékben kialakuló inhomogenitások jelentősen torzítják az abszorbancia mérését. Ennek a problémának az elkerülésére a *stopped-flow* készüléket szekvenciális üzemmódban használtuk. Először a KO_2 -ot tartalmazó DMSO oldatot 1:1 arányban vízzel elegyítettünk, majd 40 s inkubációs idő elteltével ezt az elegyet HEPES puffert tartalmazó 1:1 térfogatarányú víz : DMSO oldószerben oldott Ni(II) -komplexszel reagáltattuk. A kinetikai görbéket 260 nm hullámhosszon regisztráltuk 2,00 mm-es optikai úthosszat alkalmazva. Ezzel a módszerrel viszonylag nagy $\text{O}_2^{\cdot-}$ koncentráció mellett és valódi katalitikus körülmények között, a $\text{O}_2^{\cdot-}$ koncentráció változását közvetlenül követve vizsgálható a dizmutálási reakció. A kinetikai görbék elemzése lehetőséget ad a folyamat részletes mechanizmusának a feltárására.

5. Bizonyítottuk, hogy a NiSOD enzimmodellek és a $\text{O}_2^{\cdot-}$ közötti dizmutálási reakció lejátszódása során akkor tapasztalható jelentős SOD aktivitás, ha a reakció lejátszódása során a redukált Ni(II) -komplex nagyobb koncentrációban van jelen, mint a Ni(III) -komplex. Igazoltuk továbbá, hogy ezekben a rendszerekben egy katalitikusan inaktív komplex képződése miatt a SOD aktivitás megszűnik.

Az előző tézispontban leírt módszer alkalmazásával kapott kinetikai görbék illesztése során megállapítottuk, hogy a dizmutálási cikluson kívül egy további folyamat is lejátszódik. A Ni(II) -komplexekeket KO_2 -dal oxidáltuk és tömegspektrometria segítségével vizsgáltuk a képződő termékeket. Ezek alapján megállapítottuk, hogy végtermékek nikkel(II) tartalmú részecskék, melyekben a tiolát-csoportok oxidálódnak szulfoxid, szulfonil, szulfonsav típusú vegyületeket, illetve kénhidak kialakulását eredményezve. A peptidek Ni(II) - és Ni(III) -komplexeinek stabilitása ismeretében feltételeztük, hogy a katalitikusan inaktív, Ni^* -

gal jelölt részecske képződése a Ni(III)-komplexek intramolekuláris redoxi degradációjához köthető. A Ni(II)-komplexek által katalizált dizmutálási reakció feltételezett mechanizmusa a 9. ábrán látható.

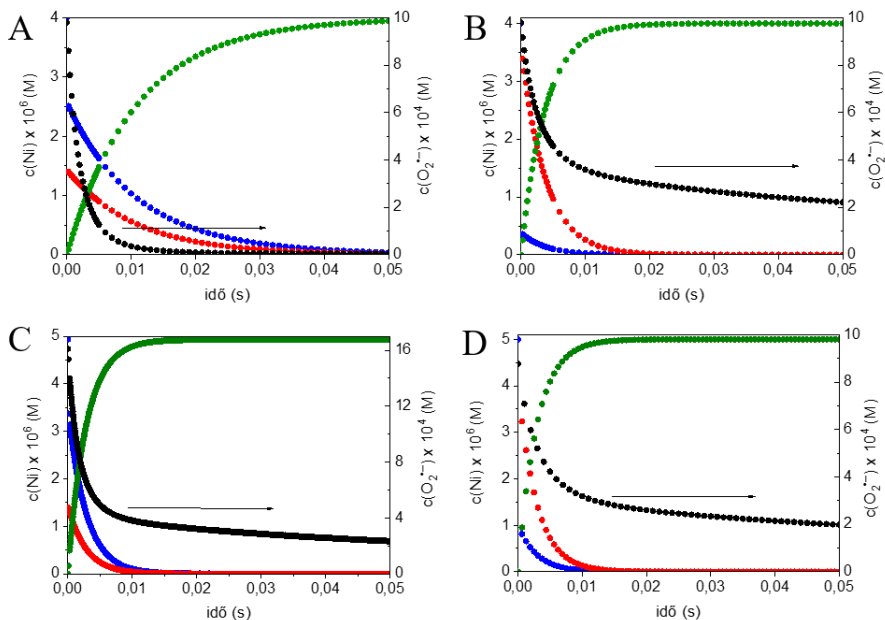


9. ábra: A dizmutálási ciklus feltételezett mechanizmusa. A wtNiSOD, wtNiSOD-Pen és wtNiSOD-CC peptidek ($n = 1$), és a wtNiSOD-dim peptid ($n = 2$) nikkelkomplexei esetén.

A kinetikai görbéket a javasolt mechanizmus alapján illesztve meghatároztuk az egyes sebességi állandók értékét, illetve a kinetikai paraméterek felhasználásával számítottuk a wtNiSOD, wtNiSOD-Pen, wtNiSOD-CC és wtNiSOD-dim ligandumok nikkelkomplexeinek időfüggő koncentráció profilját, ami a 10. ábrán látható.

A wtNiSOD és a wtNiSOD-CC modellek esetén a reakció lejátszódása során Ni(II)-komplex koncentrációja nagyobb, mint a Ni(III)-komplexszé, és ezzel együtt a dizmutálási reakció is hatékonyabb. A wtNiSOD-Pen és wtNiSOD-dim modellek esetén a reakció kezdeti szakaszában felhalmozódik a Ni(III)-komplex és ezt követően nagyobb mennyiségben van jelen, mint a Ni(II)-komplex. A wtNiSOD ligandum komplexének esetében is lejátszódik az intramolekuláris redoxi degradáció, azonban erről a jelenségről a NiSOD enzimek esetében eddig nem számoltak be. Ennek oka feltételezhetően az, hogy az enzimből a

fehérjeláncok szerkezetstabilizáló hatása megakadályozza a további oxidációs folyamatokat.



10. ábra: Az egyes részecskék számított koncentrációprofilja az idő függvényében a $O_2^{\cdot-}$ katalitikus bomlása során az A: wtNiSOD, B: wtNiSOD-Pen, C: wtNiSOD-CC és D: wtNiSOD-dim peptidek nikkel-komplexeinek jelenlétében. Kék: Ni^{II}_nL , piros: Ni^{III}_nL , zöld: Ni^* , fekete: $O_2^{\cdot-}$.

$$(c(O_2^{\cdot-})^0 = (9 - 16) \times 10^{-4} \text{ M}; c_{\text{komplex}}^0 = (4 - 10) \times 10^{-6} \text{ M}; \lambda = 260 \text{ nm}; l = 2,00 \text{ mm}; T = 25 \text{ }^\circ\text{C})$$

IV. Az eredmények hasznosítási lehetőségei

Munkánk során a NiSOD enzim különböző modellpeptidjeinek savbázis és komplexképződési tulajdonságait, valamint ezen ligandumok Ni(II)-komplexeinek SOD aktivitását tanulmányoztuk.

Az általunk vizsgált peptidek és nikkellekomplexeinek jellemzése hozzájárulhat ahhoz, hogy jobban megértsük a NiSOD enzimben a fémion koordinációjáért és a katalitikus aktivitásért felelős funkcionális csoportok szerepét a dizmutálási reakcióban.

A szekvenciális stopped-flow készülékre fejlesztett SOD aktivitás mérési módszer egyedülálló lehetőséget teremt az egyes komplexek és a szuperoxid gyökanion között lejátszódó reakció mechanizmusának tanulmányozásához. Ez a módszer nem csak az általunk vizsgált komplexek esetében alkalmazható, hasonló antioxidáns tulajdonságú vegyületek SOD aktivitás vizsgálatára is alkalmas.



Nyilvántartási szám: DEENK/537/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bonczidai-Kelemen Dóra
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10074371

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

1. **Bonczidai-Kelemen, D.**, Fábíán, I., Borsos, A., Lihi, N.: Nikkeliiont tartalmazó szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimmodellek SOD aktivitásának vizsgálata.
SCIETSEC. 7 (1), 1-9, 2026. EISSN: 2732-2688.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/112.2025.00324>

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (4)

2. **Bonczidai-Kelemen, D.**, Tóth, K., Fábíán, I., Lihi, N.: The role of the terminal cysteine moiety in a metalloprotein mimicking the active site of the NiSOD enzyme.
Dalton Trans. 53 (4), 1648-1656, 2024. ISSN: 1477-9226.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D3DT03638C>
IF: 3.3
3. **Bonczidai-Kelemen, D.**, Sciortino, G., May, N. V., Garribba, E., Fábíán, I., Lihi, N.: Introducing the penicillamine moiety into a metalloprotein mimicking the NiSOD enzyme: electronic and kinetic effects.
Inorg. Chem. Front. 9 (2), 310-322, 2022. ISSN: 2052-1553.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D1QI01025E>
IF: 7
4. **Bonczidai-Kelemen, D.**, May, N. V., András, M., Gáspár, A., Fábíán, I., Lihi, N.: High enzyme activity of a binuclear nickel complex formed with the binding loops of the NiSOD enzyme**.
Chem.-Eur. J. 26 (70), 16767-16773, 2020. ISSN: 0947-6539.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.202002706>
IF: 5.236
5. Lihi, N., **Bonczidai-Kelemen, D.**, May, N. V., Fábíán, I.: The role of the cysteine fragments of the nickel binding loop in the activity of the Ni(II)-containing SOD enzyme.
Inorg. Chem. 59 (7), 4772-4780, 2020. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c00057>
IF: 5.165





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (5)

6. Vargáné Szalóki, D., Szabó, M., **Bonczidai-Kelemen, D.**, Udvardy, A., May, N. V., Kovács, K., Virág, L., Fábán, I., Lihi, N.: Chromone-based antioxidant copper(II) complex with high superoxide dismutase activity.
Inorg. Chem. 64 (43), 21718-21729, 2025. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5c04045>
IF: 4.6
7. Diószegi, R., Guidetti, A., Ág, N., Serra, I., Vargáné Szalóki, D., **Bonczidai-Kelemen, D.**, May, N. V., Fekete, E., Karaffa, L., Fábán, I., Van Doorslaer, S., Lihi, N.: Highly active superoxide dismutase mimic: pyridine carboxamide-based copper(II) complexes.
Inorg. Chem. Front. 24, 8690-8705, 2025. ISSN: 2052-1553.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D5QI01687H>
IF: 6.2
8. Lihi, N., May, N. V., Udvardy, A., Najóczki, F., **Bonczidai-Kelemen, D.**, Diószegi, R., Vargáné Szalóki, D., Sánta, S. O., Fábán, I.: Complexes of 1,10-phenanthroline-mono-N-oxides with copper(II) and nickel(II) in aqueous solution and solid phase.
Inorg. Chim. Acta. 557, 1-11, 2023. ISSN: 0020-1693.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2023.121715>
IF: 2.7
9. Diószegi, R., **Bonczidai-Kelemen, D.**, Bényei, A., May, N. V., Fábán, I., Lihi, N.: Copper(II) Complexes of Pyridine-2,6-dicarboxamide Ligands with High SOD Activity.
Inorg. Chem. 61 (4), 2319-2332, 2022. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c03728>
IF: 4.6





10. Bunda, S., May, N. V., **Bonczidai-Kelemen, D.**, Udvardy, A., Ching, H. Y. V., Nys, K., Samanipour, M., Van Doorslaer, S., Joó, F., Lihi, N.: Copper(II) Complexes of Sulfonated Salan Ligands: Thermodynamic and Spectroscopic Features and Applications for Catalysis of the Henry Reaction.
Inorg. Chem. 60 (15), 11259-11272, 2021. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c01264>
IF: 5.436

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 44,237

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
20,701**

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

Debrecen, 2026.08.19.



Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)

**Structural and SOD activity studies of nickel
containing superoxide dismutase enzyme models**

by Dóra Bonczidai-Kelemen

Supervisors: Dr. István Fábián

Dr. Nobert Lihi



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Doctoral School of Chemistry

Debrecen, 2026

List of abbreviations

CD	circular dichroism
CE-MS	capillary electrophoresis - mass spectrometry
ESI	electrospray ionization
EPR	electron paramagnetic resonance
IC_{50}	complex concentration for 50% inhibition
KO ₂	potassium superoxide
MS	mass spectroscopy
NiSOD	nickel superoxide dismutase
NMR	nuclear magnetic resonance
O ₂ ^{•-}	superoxide anion radical
ROS	reactive oxygen species
SOD	superoxide dismutase
TOF	time of flight

I. Introduction and objectives

During the metabolism of oxygen, reactive oxygen species (ROS) is generated, among which, the superoxide radical anion ($O_2^{\bullet-}$) is one of the most significant. Although this species is required at low concentrations for certain biological processes, its accumulation causes harmful effects either directly by damaging biomolecules or indirectly through the formation of additional ROS. Biological systems prevent the accumulation of ROS to harmful levels by utilizing antioxidant enzymes. Among these enzymes, superoxide dismutases (SODs) are of particular importance, as they regulate the concentration of $O_2^{\bullet-}$. SODs contain metal ions in their active centers that can readily undergo one-electron oxidation and reduction processes. SODs can be classified into three groups on the basis of the the nature of the central metal ion and the structure of the protein complexes as follows: iron/manganese-containing, copper/zinc-containing, and nickel-containing SOD enzymes. Among these, nickel containing superoxide dismutase (NiSOD) is the most recently isolated SOD.

NiSOD is a homohexamer consisting of six identical monomeric subunits, each containing a catalytically active nickel center. Unlike other SOD enzymes, all donor atoms responsible for metal binding and catalytic activity are located within the N-terminal region of each monomer. This nine amino acid sequence (wtNiSOD: HisCysAspLeuProCysGlyValTyr) is referred to as the nickel-binding loop. In the reduced form of the enzyme, the Ni(II) ion is coordinated by the N-terminal amino group, the amide nitrogen of the first peptide bond, and the thiolate groups of the cysteine residues at positions 2 and 6 in a square-planar coordination geometry. Upon oxidation, the coordination sphere of Ni(III) is complemented by the axial coordination of the imidazole nitrogen of the N-terminal histidine, resulting in a square-

pyramidal geometry. Although the structures of both the reduced and oxidized forms of NiSOD have been elucidated, the reaction mechanism between the nickel center and the $O_2^{\bullet-}$ remains poorly understood. The available literature results provide only limited and, in some cases, contradictory information regarding this mechanism.

In this work, we aim to investigate the structural properties and superoxide dismutase (SOD) activity of nickel complexes formed with short peptides (nine amino acids in length) containing various point mutations of the wtNiSOD nickel-binding loop (HCDLPCGVY). These model complexes may provide valuable insight into the roles of individual functional groups in the dismutation reaction. Most of the ligands used in this study, as well as the NiSOD enzyme models reported in the literature to date, are capable of binding only a single nickel ion. In contrast, the native NiSOD enzyme coordinates six nickel ions, each of which is catalytically active in the dismutation of the $O_2^{\bullet-}$. Therefore, an additional objective of this work is to investigate a peptide capable of coordinating multiple nickel ions.

Furthermore, owing to the limitations of the SOD activity assays currently available in the literature, another objective of this work was to develop a novel method for measuring SOD activity using the sequential stopped-flow technique.

II. Experimental methods

The peptides investigated in this study were synthesized by Synpeptide Co. (Shanghai, China) and were used without further purification. The concentrations of the peptide stock solutions were determined by pH-potentiometric titration. The structure of the peptide corresponding to the first nine amino acid residues of the N-terminus of NiSOD is shown in Figure 1, while the structures of the peptides investigated in this work are presented in Figures 2 and 3.

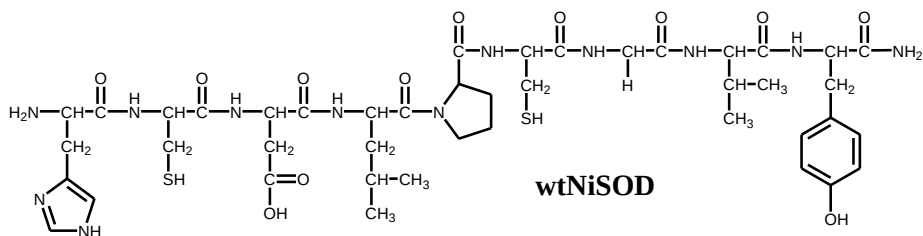


Figure 1: The structure of the nickel-binding loop comprising the first nine amino acid residues of the N-terminal region of NiSOD.

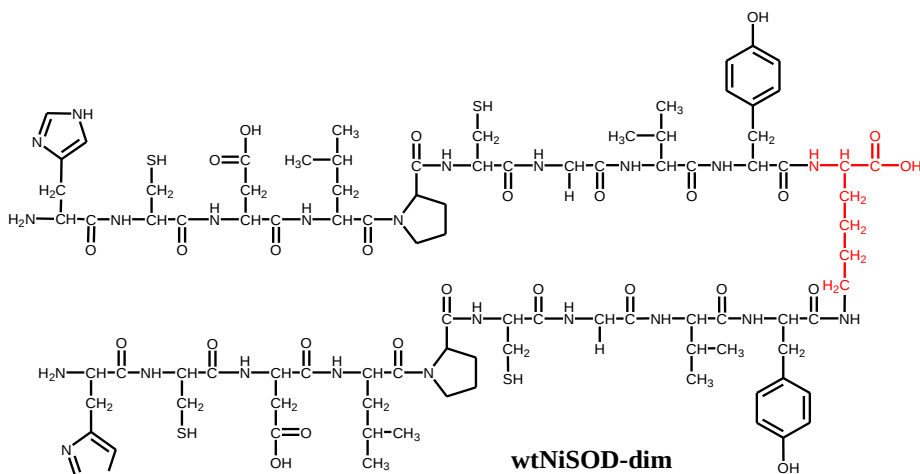


Figure 2: The structure of the lysine-linked dimer of the NiSOD nickel-binding loop.

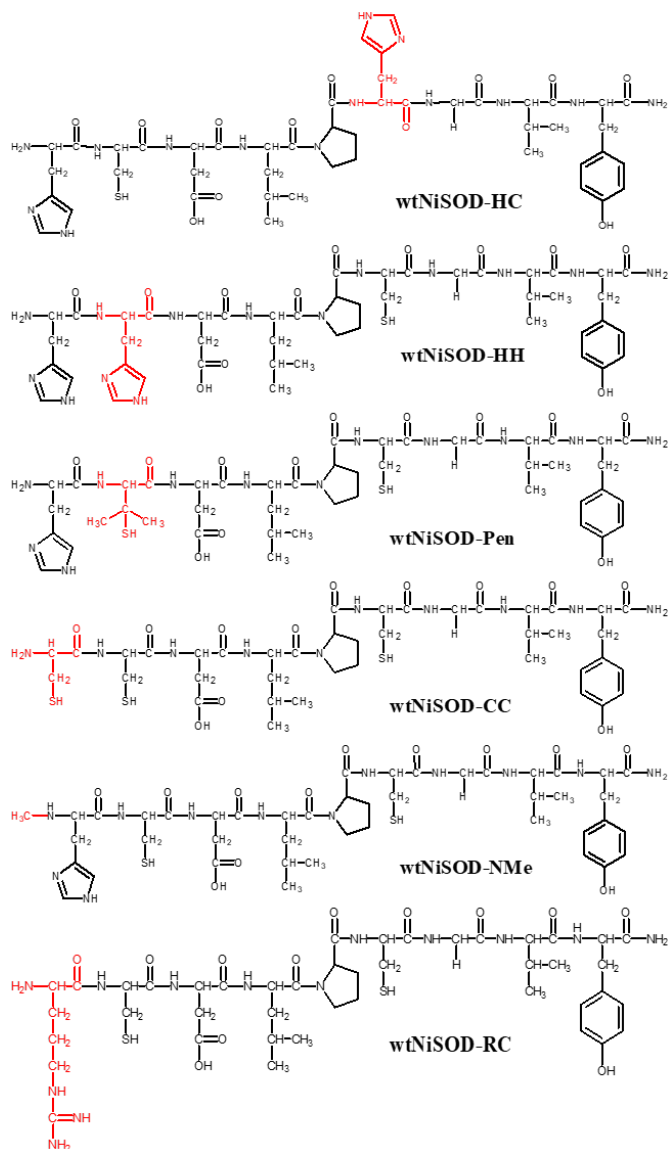


Figure 3: The structures of the nine-amino acid peptides investigated in this study. Functional groups and amino acid residues that differ from those of the wtNiSOD parent peptide are highlighted in red.

The protonation constants of the peptides and the overall stability constants of their Ni(II) complexes were determined by pH-potentiometric titrations using carbonate ion free KOH solution (~0.2 M). The headspace over the sample was purged with argon to ensure the absence of oxygen and carbon dioxide. The samples were stirred using a VELP scientific magnetic stirrer and the pH measurement were made using a MOLSPIN pH-meter equipped with a 6.0234.110 combined glass electrode and a Mol - Acs microburette. The electrode was calibrated by one-point calibration using a 0.05 M potassium hydrogen phthalate solution at 25 °C (pH = 4.005). The pH reading was converted to hydrogen ion concentration as described by Irving et al. The titration curves were evaluated using the SUPERQUAD and PSEQUAD computer programs.

The coordination modes of the Ni(II) complexes of the peptides were investigated by recording pH-dependent UV–visible and circular dichroism (CD) spectra. UV–visible spectra were recorded in the 250–800 nm wavelength range using an Agilent Technologies Cary 8454 diode-array UV–Vis spectrophotometer. CD spectroscopic measurements were carried out with a JASCO J-810 spectropolarimeter using cuvettes with optical path lengths of 0.100 and 1.000 cm over the wavelength range of 200–800 nm. The spectra were evaluated using the software provided by the manufacturer and Microsoft Excel.

For selected peptides and their Ni(II) complexes, NMR spectroscopic measurements were also performed. ^1H NMR and two-dimensional $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC spectra were recorded on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer, and the spectra were analyzed using TopSpin 3.2 and MestreNova 8.1 software.

ESI-TOF-MS measurements were performed for several peptides to investigate Ni(II) complexes of different compositions as well as samples oxidized with potassium superoxide (KO_2). The ESI-TOF-MS

measurements were carried out using a Bruker maXis II MicroTOF-Q Qq-TOF mass spectrometer. The mass spectra of the complexes were recorded in the negative ion mode.

The complex formation processes between Ni(II) and wtNiSOD-dim ligand was investigated by CE-MS at physiological pH. Capillary electrophoresis measurements were performed using an Agilent 7100 capillary electrophoresis system equipped with a diode-array detector. The system was coupled to a Bruker maXis II UHR ESI-QTOF mass spectrometer.

The mass spectra were analyzed using Bruker Compass DataAnalysis 4.4 software, and theoretical isotope patterns were calculated using the Bruker IsotopePattern software.

The structures of the Ni(III) complexes formed upon oxidation of the Ni(II) complexes with KO_2 were investigated by EPR spectroscopy. The EPR measurements were carried out at the *HUN-REN Research Centre for Natural Sciences, Centre for Structural Science*, with the assistance of Dr. Nóra Veronika May. Spectra were recorded on a Bruker ELEXSYS E500 spectrometer at 77 K.

The SOD activities of the Ni(II) complexes were evaluated using two different methods. In the case of McCord-Fridovich assay, spectra were recorded with an Agilent Technologies Cary 8454 diode-array UV-Vis spectrophotometer. The method developed in this work was performed using an Applied Photophysics SX-20 stopped-flow spectrometer. Data processing was carried out using Microsoft Excel, while kinetic traces were fitted using the Scientist software package.

III. New scientific results

1. We have demonstrated that modification of the functional groups involved in the coordination sphere of the wtNiSOD nickel complexes significantly affects the thermodynamic properties of the complexes and their oxidation to Ni(III).

1.1. We have confirmed that the simultaneous coordination of the cysteine residues at positions 2 and 6 of the wtNiSOD peptide is essential for the formation of Ni(II) and Ni(III) complexes whose coordination modes are essentially the same as those found in the reduced and oxidized forms of the NiSOD enzyme. These amino acid residues are also crucial for pronounced SOD activity.

The acid–base and metal-binding properties of the wtNiSOD-HC (HCDLPHGVY) and wtNiSOD-HH (HHDLP CGVY) peptides differ significantly from those of the wtNiSOD parent peptide. Although these peptides have identical amino acid compositions, the different positions of the histidine residues result in markedly different coordination modes, as confirmed by the individual UV–visible and CD spectra of their [NiL][−] complexes (Figure 4). Based on our results, we concluded that cysteine in the secondary position of the peptide chain is crucial to establish the square-planar geometry in the reduced form of NiSOD, while the distant cysteine may affect the redox properties of the Ni(II)/Ni(III) redox couple.

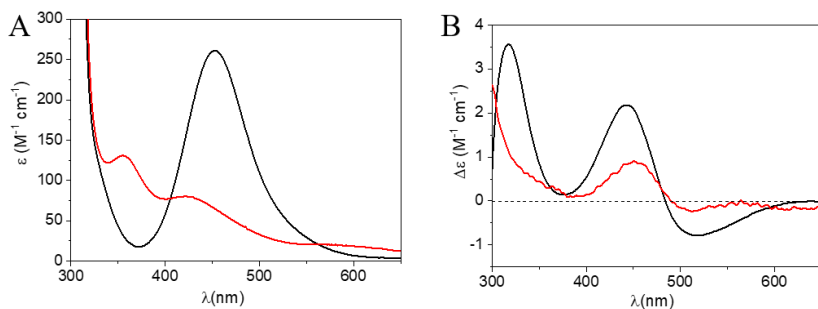


Figure 4: Individual UV-Vis (A) and CD (B) spectra of the $[\text{NiL}]^-$ complexes with wtNiSOD-HC (black) and wtNiSOD-HH (red)

The Ni(II) complexes of wtNiSOD-HH and wtNiSOD-HC remain intact using KO_2 as an oxidizing agent, and only the existence of free $\text{O}_2^{\bullet-}$ anion was observed in the EPR spectra. Analysis of the mass spectra of the oxidized samples revealed that the Ni(II) complexes form adducts with the $\text{O}_2^{\bullet-}$. Furthermore, the Ni(II) complex of the wtNiSOD-HH peptide was found to form an adduct with dissolved molecular oxygen even in the absence of an oxidizing agent, as confirmed by mass spectrometry.

1.2. We have demonstrated that the substitution of the histidine residue at position 1 significantly influences the metal binding properties of the peptides.

In the wtNiSOD-CC peptide, the N-terminal histidine residue is replaced by cysteine. In the $[\text{NiHL}]^{2-}$ complex, the Ni(II) ion is coordinated in a square-planar geometry by the N-terminal amino group and the thiolate groups of the three cysteine residues. This coordination mode yields high thermodynamic stability of the complex and shifts the formation of the $(\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{S}^-, \text{S}^-)$ coordination mode, characteristic of the reduced form of the NiSOD enzyme, to the alkaline pH range.

Consequently, among the nine-residue peptides investigated, the wtNiSOD-CC exhibits the highest nickel binding ability at physiological pH.

In the wtNiSOD-RC ligand, the N-terminal histidine residue is replaced by arginine. The complex formation processes start at approximately pH 5, however, the [NiL] complex with the (NH_2 , N^- , S^- , S^-) coordination mode is already formed under these conditions and remains the predominant species over a broad pH range. The Ni(II) binding ability of this ligand is comparable to that of the wtNiSOD peptide.

Upon oxidation of the Ni(II) complexes, the formation of Ni(III) species was not observed in the EPR spectra. Nevertheless, the addition of the Ni(II) complexes to a potassium superoxide (KO_2) solution resulted in substantial consumption of the $\text{O}_2^{\bullet-}$, indicating that these complexes efficiently catalyze the dismutation of superoxide.

1.3. We have demonstrated that additional methyl groups located in close vicinity to the donor groups involved in the coordination of Ni(II) influence the complex formation processes of the peptides.

In the wtNiSOD-Pen peptide, the *L*-cysteine residue at secondary position is replaced by *D*-penicillamine. In contrast to the penicillamine residue, all other amino acids in the peptide sequence possess the *L* configuration. This stereochemical difference enables the coordination of the penicillamine thiolate group that is selectively monitored by CD spectroscopy at 310 nm, as demonstrated by the CD spectra shown in Figure 5.

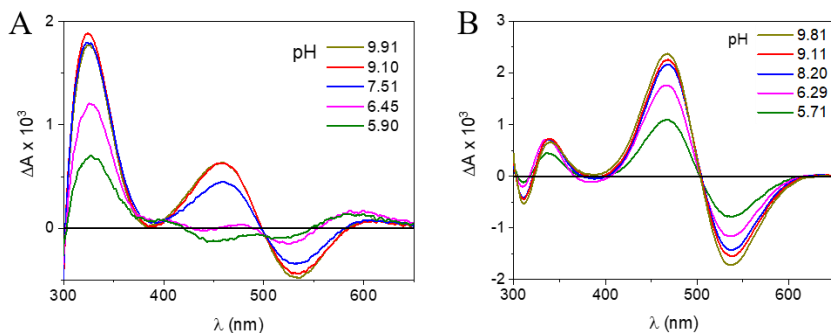


Figure 5: The CD spectra of Ni(II)/ligand 1:1 system as a function of pH for the wtNiSOD (A) and the wtNiSOD-Pen models (B). ($C_{\text{wtNiSOD}} = 1.5 \text{ mM}$; $C_{\text{wtNiSOD-Pen}} = 2.00 \text{ mM}$; $l = 1 \text{ cm}$; $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $I = 0.2 \text{ M KCl}$)

The wtNiSOD-NMe ligand was obtained by methylation of the N-terminal amino group of the wtNiSOD peptide. The resulting peptide exhibits acid–base properties that are nearly identical to those of the parent wtNiSOD peptide. Furthermore, the two ligands exhibit very similar metal-binding properties. However, in the alkaline pH range, an additional base consumption process is observed with wtNiSOD-NMe that is absent in the wtNiSOD system. According to literature data, this process is attributed to the deprotonation and coordination of an additional amide nitrogen and the thiolate group of the amino acid residue at position 2 becomes non-coordinating.

Upon oxidation of the Ni(II) complexes, the EPR spectra exhibited the superhyperfine triplet splitting characteristic of Ni(III) complexes with axial nitrogen coordination (Figure 6). The determined EPR parameters differ slightly from those of the Ni(III) complex of the wtNiSOD peptide. This difference can be attributed to the electron-donating effect of the methyl group, which influence the spin density localized on the *in situ* generated Ni(III) ion.

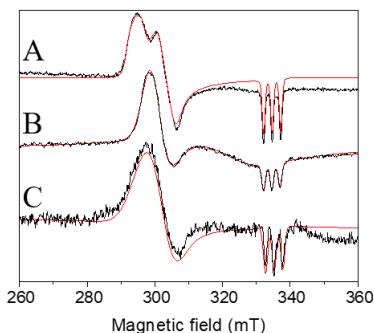


Figure 6: X-band EPR spectra recorded at 77 K in the Ni(II)/wtNiSOD (A), the Ni(II)/wtNiSOD-Pen (B) and the Ni(II)/wtNiSOD-NMe (C) systems after *in situ* oxidation (black) and the simulated EPR spectra (red).

2. We have demonstrated that the wtNiSOD-dim ligand is capable of coordinating multiple nickel ions.

2.1. We have confirmed that the wtNiSOD-dim peptide forms dinuclear nickel complexes even at nearly equimolar metal ion to ligand concentration ratios.

The Ni(II)-binding property of the peptide was investigated at physiological pH using CD spectroscopy. The results demonstrated that the peptide is capable of binding up to three Ni(II) ions through the coordination of additional amide nitrogen donor atoms. The kinetics of the complex formation process between the peptide and Ni(II) was subsequently investigated by capillary electrophoresis–mass spectrometry (CE–MS) at a metal ion to ligand concentration ratio of 0.9 : 1. The results revealed that the rate of complex formation is relatively slow and that dinuclear species are formed even at nearly equimolar solution. The complex formation process was further studied at a 2:1 metal ion to ligand concentration ratio. At physiological pH, both

nickel ions possess the (NH_2 , N^- , S^- , S^-) coordination mode characteristic of the reduced form of the NiSOD enzyme. This leads to the formation of dinuclear Ni(II) complex with high thermodynamic stability (Figure 7).

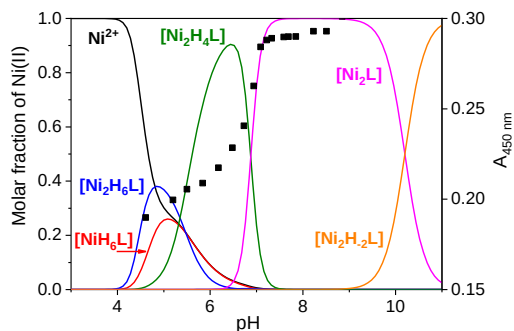


Figure 7: The distribution of the complexes formed in the Ni(II)/wtNiSOD-dim 2:1 system and the absorbance at 450 nm obtained by UV-vis spectroscopy as a function of pH ($C_{\text{Ni(II)}} = 2.4 \text{ mM}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0.2 \text{ M}$)

2.2. We have demonstrated that, upon oxidation of the Ni(II) complexes of wtNiSOD-dim, both the metal to ligand concentration ratio and the pH significantly influence the structures of the resulting Ni(III) complexes.

The EPR spectra obtained upon oxidation of Ni(II)/wtNiSOD-dim systems at different metal to ligand concentration ratios and pH values are shown in Figure 8A, while the simulated component EPR spectra are presented in Figure 8B. In the Ni(II)/ligand system with a 2:1 metal to ligand concentration ratio and in the equimolar system at physiological pH, the Ni(III) complexes (denoted as (a) and (e) in Figure 8) exhibit the coordination mode characteristic of the oxidized form of the NiSOD enzyme. In contrast, the EPR spectra of the 1:1 systems above pH 9 can

be adequately simulated by considering the formation of three Ni(III) species. In spectrum (b), a broadened EPR signal is observed as a consequence of antiferromagnetic coupling between the two paramagnetic Ni(III) centers. The superhyperfine quintet splitting observed in spectrum (c) arises when both imidazole nitrogens ($I = 1$) are bound to the axial position at the Ni(III) center. In spectrum (d), the EPR parameters confirm that the unpaired electron is located in the $d_{x^2-y^2}$ orbital and the coordination of the donor groups provides strong π backdonation. This coordination mode is envisioned when the thiolate groups as well as the amide nitrogen coordinate to Ni(III) in an elongated octahedral crystal field.

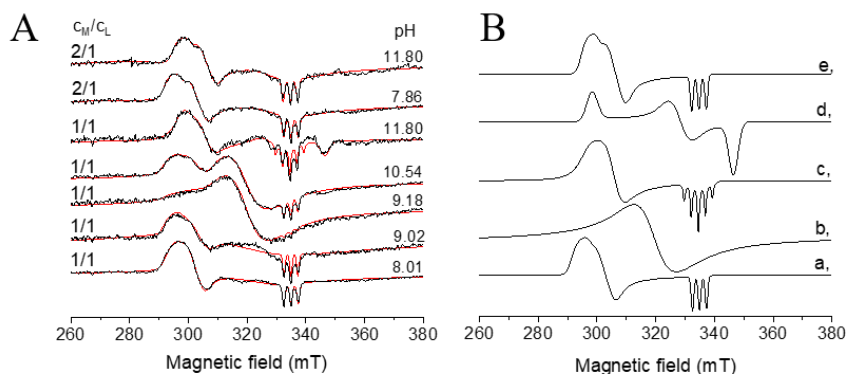


Figure 8: A: X-band EPR spectra recorded in the Ni(III)/wtNiSOD-dim system after *in situ* oxidation (black) recorded at 77 K and the simulated EPR spectra (red) after the superposition of the individual spectra. B: Component EPR spectra of the nickel(III) complexes (a,-e,) obtained by the simulation.

- We have confirmed that the SOD activities of the model systems are similar to that of the wtNiSOD Ni(II) complex when the thiolate groups of two cysteine moieties coordinate**

symultaneously to he metal ion. The replacement of one thiolate group with another donor group significantly reduces the SOD activity.

According tot the McCord – Fridovich SOD assay, the characteristic IC_{50} values of the complexes formed with the wtNiSOD-CC és -NMe peptides are on the same order of magnitude but somewhat higher than that of the Ni(II) complex of the wtNiSOD peptide. In the case of the wtNiSOD-RC complex, smaller IC_{50} was obtained (Table 1). This enhanced SOD activity is probably due to the positively charged arginine moiety that promotes the binding of the negatively charged $O_2^{\bullet-}$ to he metal center. Only one thiolate group is cordinated to Ni(II) in the complexes of wtNiSOD-HC and wtNiSOD-HH and the corresponding IC_{50} values are one and two orders of magnitude bigger than that of the wtNiSOD - Ni(II) system, respectively.

Table 1: IC_{50} values and catalytic rate constants of the Ni(II) complexes of the peptides determined at pH 7.8.

	IC_{50} values (μM)	k_{McCF} ($M^{-1}s^{-1}$) ^a
wtNiSOD	3.9 ± 0.2	6.9×10^5
wtNiSOD-HC	37.4 ± 0.3	7.2×10^4
wtNiSOD-HH	341 ± 5	7.9×10^3
wtNiSOD-CC	7 ± 2	3.8×10^5
wtNiSOD-NMe	6.3 ± 0.8	4.6×10^5
wtNiSOD-RC	1.7 ± 0.5	1.6×10^6

$$^a k_{McCF} = k_{NBT} \times [NBT] / IC_{50}, k_{NBT} = 59400 M^{-1}s^{-1}$$

4. We have successfully developed a novel SOD activity method using the sequential stopped-flow technique.

Potassium superoxide (KO_2) is used as a source of the superoxide radical anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$). KO_2 is readily soluble in dimethyl sulfoxide (DMSO) but decomposes in water, whereas the metal complexes investigated in this work are prepared in aqueous solution. To circumvent this incompatibility, the SOD activity measurements were carried out in a 1:1 (V/V) water/DMSO solvent mixture. Mixing water and DMSO is not instantaneous process, and the inhomogeneities cause spectral interferences in the absorbance measurements. The problem was resolved by mixing KO_2 solution in DMSO with water in 1:1 ratio in the first step of the sequential stopped flow experiments. After 40 s incubation periode, this mixture was reacted with the Ni(II) complex dissolved in 1:1 water : DMSO solution that also contained HEPES buffer. Kinetic traces were recorded at 260 nm using a 2.00 mm optical path-length. This method enables the use of high superoxide concentrations, thereby providing conditions that closely resemble true catalytic conditions. Furthermore, it allows direct monitoring of changes in the concentration of $\text{O}_2^{\bullet-}$, and fitting of the kinetic traces provides additional insight into the mechanism of the superoxide dismutation reaction.

5. We have demonstrated that significant SOD activity is observed in the dismutation reaction only when the concentration of the Ni(II) complex exceeds that of the corresponding Ni(III) complex in the catalytic cycle. Furthermore, we have also identified an additional reaction step leading to the desactivation of the catalyst via the formation of an inactive complex.

Analysis of the kinetic traces obtained using the method described above revealed that, in addition to the catalytic dismutation cycle, an additional reaction path is also operative. To investigate this process, the Ni(II) complexes were oxidized with potassium superoxide (KO_2), and the resulting products were analyzed by mass spectrometry. The final

products were identified as Ni(II)-containing species in which the thiolate groups had undergone oxidation, leading to the formation of sulfoxide, sulfone, and sulfonic acid groups, as well as disulfide bridges. Since the Ni(II) complexes are stable in the absence of the oxidant, we propose that the catalytically inactive species, denoted as Ni*, is formed through the intramolecular redox degradation of the Ni(III) complexes. The proposed reaction mechanism in the studied systems is shown in Figure 9.

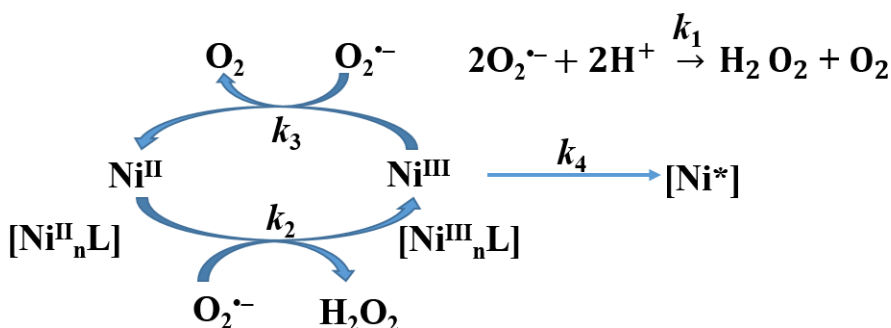


Figure 9: The dismutation reaction of superoxide ion and the degradation of the nickel complexes. L = wtNiSOD, wtNiSOD-Pen or wtNiSOD-CC ($n = 1$); L = wtNiSOD-dim ($n = 2$)

Using the kinetic parameters obtained from fitting of the kinetic traces according to the proposed kinetic model, the time-dependent concentration profiles of the Ni(II) and Ni(III) complexes as well as $O_2^{\bullet-}$ were calculated. These concentration profiles are shown in Figure 10.

The calculated concentration profiles demonstrate that, for the wtNiSOD and wtNiSOD-CC models, the concentration of the Ni(II) complex remains higher compared to the Ni(III) complex throughout the reaction, resulting in more efficient superoxide dismutation. In contrast, for the wtNiSOD-Pen and wtNiSOD-dim models, the Ni(III) complex

rapidly accumulates during the initial stage of the reaction and subsequently becomes the predominant species, exceeding the concentration of the Ni(II) complex. The results also indicate that intramolecular redox degradation must be considered even for the wtNiSOD model complex, although this phenomenon has not previously been reported for the native NiSOD enzyme. This discrepancy is likely attributable to the structural stabilization provided by the protein matrix in the enzyme, which is proposed to suppress further oxidative degradation processes.

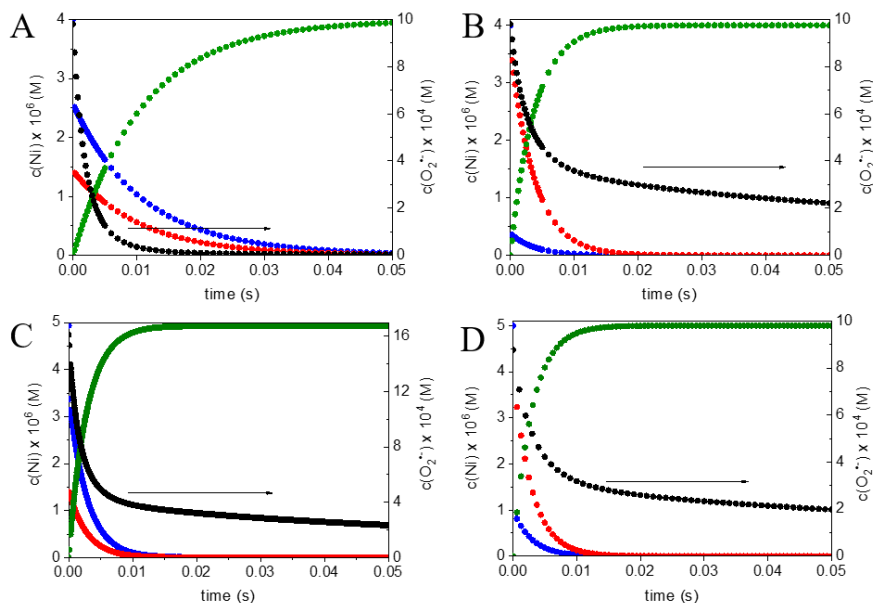


Figure 10: Calculated concentration profiles of each species as a function of time during the decomposition of superoxide anion in the presence of the catalyst (L refers to wtNiSOD (A), wtNiSOD-Pen (B), wtNiSOD-CC (C) and wtNiSOD-dim (D)). Blue: $\text{Ni}^{\text{II}}\text{L}$, red: $\text{Ni}^{\text{III}}\text{L}$, green: Ni^* (left axis); black: $\text{O}_2^{\cdot-}$ (right axis). ($c(\text{O}_2^{\cdot-})^0 = (9 - 16) \times 10^{-4} \text{ M}$; $c_{\text{complex}}^0 = (4 - 10) \times 10^{-6} \text{ M}$; $\lambda = 260 \text{ nm}$; $l = 2,00 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

IV. Possible utilization of the results

In this work, we investigated the acid–base and metal-binding properties of various NiSOD model peptides, as well as the superoxide dismutase (SOD) activities of their Ni(II) complexes.

The characterization of these peptides and their nickel complexes contributes to a better understanding of the roles of the functional groups responsible for metal coordination and catalytic activity in the dismutation reaction catalyzed by NiSOD.

The SOD activity assay developed for a sequential stopped-flow instrument provides an unique opportunity to investigate the reaction mechanism between individual metal complexes and the superoxide anion radical. Moreover, this method is not limited to the complexes investigated in the present study but is also applicable to the evaluation of the SOD activity of other compounds with antioxidant properties.



Registry number: DEENK/537/2026.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Dóra Bonczidai-Kelemen
Doctoral School: Doctoral School of Chemistry
MTMT ID: 10074371

List of publications related to the dissertation

Hungarian scientific articles in Hungarian journals (1)

1. **Bonczidai-Kelemen, D.**, Fábán, I., Borsos, A., Lihi, N.: Nikkeliont tartalmazó szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimmodellek SOD aktivitásának vizsgálata.
SCIETSEC. 7 (1), 1-9, 2026. EISSN: 2732-2688.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/112.2025.00324>

Foreign language scientific articles in international journals (4)

2. **Bonczidai-Kelemen, D.**, Tóth, K., Fábán, I., Lihi, N.: The role of the terminal cysteine moiety in a metalloprotein mimicking the active site of the NiSOD enzyme.
Dalton Trans. 53 (4), 1648-1656, 2024. ISSN: 1477-9226.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D3DT03638C>
IF: 3.3
3. **Bonczidai-Kelemen, D.**, Sciortino, G., May, N. V., Garribba, E., Fábán, I., Lihi, N.: Introducing the penicillamine moiety into a metalloprotein mimicking the NiSOD enzyme: electronic and kinetic effects.
Inorg. Chem. Front. 9 (2), 310-322, 2022. ISSN: 2052-1553.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D1QI01025E>
IF: 7
4. **Bonczidai-Kelemen, D.**, May, N. V., András, M., Gáspár, A., Fábán, I., Lihi, N.: High enzyme activity of a binuclear nickel complex formed with the binding loops of the NiSOD enzyme**.
Chem.-Eur. J. 26 (70), 16767-16773, 2020. ISSN: 0947-6539.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.202002706>
IF: 5.236
5. Lihi, N., **Bonczidai-Kelemen, D.**, May, N. V., Fábán, I.: The role of the cysteine fragments of the nickel binding loop in the activity of the Ni(II)-containing SOD enzyme.
Inorg. Chem. 59 (7), 4772-4780, 2020. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c00057>
IF: 5.165





List of other publications

Foreign language scientific articles in international journals (5)

6. Vargáné Szalóki, D., Szabó, M., **Bonczidai-Kelemen, D.**, Udvardy, A., May, N. V., Kovács, K., Virág, L., Fábán, I., Lihi, N.: Chromone-based antioxidant copper(II) complex with high superoxide dismutase activity.
Inorg. Chem. **64** (43), 21718-21729, 2025. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5c04045>
IF: 4.6
7. Diószegi, R., Guidetti, A., Ág, N., Serra, I., Vargáné Szalóki, D., **Bonczidai-Kelemen, D.**, May, N. V., Fekete, E., Karaffa, L., Fábán, I., Van Doorslaer, S., Lihi, N.: Highly active superoxide dismutase mimic: pyridine carboxamide-based copper(II) complexes.
Inorg. Chem. Front. **24**, 8690-8705, 2025. ISSN: 2052-1553.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D5QI01687H>
IF: 6.2
8. Lihi, N., May, N. V., Udvardy, A., Najóczki, F., **Bonczidai-Kelemen, D.**, Diószegi, R., Vargáné Szalóki, D., Sánta, S. O., Fábán, I.: Complexes of 1,10-phenanthroline-mono-N-oxides with copper(II) and nickel(II) in aqueous solution and solid phase.
Inorg. Chim. Acta. **557**, 1-11, 2023. ISSN: 0020-1693.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2023.121715>
IF: 2.7
9. Diószegi, R., **Bonczidai-Kelemen, D.**, Bényei, A., May, N. V., Fábán, I., Lihi, N.: Copper(II) Complexes of Pyridine-2,6-dicarboxamide Ligands with High SOD Activity.
Inorg. Chem. **61** (4), 2319-2332, 2022. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c03728>
IF: 4.6





**UNIVERSITY of
DEBRECEN**

**UNIVERSITY AND NATIONAL LIBRARY
UNIVERSITY OF DEBRECEN**

H-4002 Egyetem tér 1, Debrecen
Phone: +3652/410-443, email: publikaciok@lib.unideb.hu

10. Bunda, S., May, N. V., **Bonczidai-Kelemen, D.**, Udvardy, A., Ching, H. Y. V., Nys, K., Samanipour, M., Van Doorslaer, S., Joó, F., Lihi, N.: Copper(II) Complexes of Sulfonated Salan Ligands: Thermodynamic and Spectroscopic Features and Applications for Catalysis of the Henry Reaction.
Inorg. Chem. 60 (15), 11259-11272, 2021. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c01264>
IF: 5.436

Total IF of journals (all publications): 44,237

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 20,701

The Candidate's publication data submitted to the Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

19 August, 2026

