

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**AMILINHORMON FRAGMENTEK ÉS
MUTÁNSOK FÉMIONKOMPLEXEINEK
OLDATEGYENSÚLYI VIZSGÁLATA**

Dávid Ágnes

**Témavezető:
Dr. Várnagy Katalin**



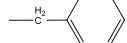
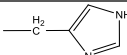
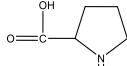
Debreceni Egyetem
Kémiai Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2017

Az értekezésben előforduló rövidítések magyarázata

<i>A, Ala</i>	alanin
<i>D, Asp</i>	aszparaginsav
<i>E, Glu</i>	glutaminsav
<i>F, Phe</i>	fenilalanin
<i>G, Gly</i>	glicin
<i>H, His</i>	hisztidin
<i>K, Lys</i>	lizin
<i>M, Met</i>	metionin
<i>N, Asn</i>	aszparagin
<i>P, Pro</i>	prolin
<i>Q, Gln</i>	glutamin
<i>R, Arg</i>	arginin
<i>S, Ser</i>	szerin
<i>T, Thr</i>	treonin
<i>V, Val</i>	valin
<i>W, Trp</i>	triptofán
<i>Y, Tyr</i>	tirozin
<i>Ac</i>	acetil (védőcsoport)
<i>ACN</i>	acetonitril, CH_3CN
<i>AcOH</i>	ecetsav
<i>Ac₂O</i>	ecetsavanhidrid
<i>ATCUN</i>	Amino Terminal Cu and Ni binding site (aminoterminális réz- és nikkelkötőhely)
<i>CD</i>	cirkuláris dikroizmus
<i>CT sáv</i>	töltésátviteli sáv (Charge Transfer)
<i>Boc</i>	<i>t</i> -butoxi-karbonil (védőcsoport)
<i>Bzl</i>	benzil (védőcsoport)
<i>DCM</i>	diklórmétán
<i>DIEA</i>	<i>N,N</i> -diizopropil-etilamin
<i>DMF</i>	<i>N</i> ,imetil-formamid

<i>EDT</i>	etán-1,2-ditiol
<i>DODT</i>	2,2'-(etiléndioxi)-dietántiol
<i>EPR (ESR)</i>	elektron paramágneses rezonancia (elektronspin-rezonancia spektroszkópia)
<i>Et₂O</i>	dietil-éter
<i>Fmoc</i>	9-fluorenil-metoxi-karbonil (védőcsoport)
<i>Met109Ser</i>	a 109. pozícióban metionin helyett szerin található
<i>Asn22</i>	az aminosav-szekvenciában az adott számú pozícióban lévő pl. aszparagin
<i>HOBt</i>	<i>N</i> -hidroxi-benzotriazol
<i>HPLC</i>	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
<i>hIAPP</i>	emberi (humán) amilin
<i>Me</i>	metilcsoport
<i>N⁻</i>	deprotonált amidnitrogén
<i>N_{im}</i>	imidazolnitrogén
<i>NMP</i>	<i>N</i> -metil-2-pirrolidon
<i>NMR</i>	mágneses rezonancia
<i>O_{karbonil}</i>	karboniloxigén
<i>O_{karboxilát}</i>	karboxilát oxigén
<i>rIAPP</i>	patkány amylin
<i>RP-HPLC</i>	fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
<i>SOD</i>	szuperoxid-dizmutáz (enzim)
<i>TBTU</i>	2-(1- <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-tetrafluoroborát
<i>tBu</i>	<i>tert</i> -butil (védőcsoport)
<i>TFA</i>	trifluorecetsav
<i>TIS</i>	triizopropil-szilán
<i>Trt</i>	tritol (védőcsoport)
<i>UV-vis</i>	ultraibolya – látható
<i>Z</i>	benziloxi-karbonil (védőcsoport)

1. táblázat: A humán és a patkány amilinben előforduló aminosavak rövidítései és oldalláncaik szerkezete

Név és jelölés	Szerkezet
Alanin (Ala, A)	---CH_3
Cisztein (Cys, C)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---SH}$
Fenilalanin (Phe, F)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}$ 
Glicin (Gly, G)	$\text{---}\overset{\text{H}}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}$
Hisztidin (His, H)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}$ 
Izoleucin (Ile, I)	$\text{---}\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}$
Lizin (Lys, K)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---NH}_2$
Leucin (Leu, L)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}\text{---CH}_3$
Aszparagin (Asn, N)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}\text{---}$
Prolin (Pro, P)	
Glutamin (Gln, Q)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}\text{---}$
Arginin (Arg, R)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---NH---}\overset{\text{NH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}\text{---}$
Szerin (Ser, S)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---OH}$
Treonin (Thr, T)	$\text{---}\overset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}}\text{---}\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}$
Valin (Val, V)	$\text{---}\overset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}}\text{---CH}_3$
Tirozin (Tyr, Y)	$\text{---}\overset{\text{H}_2}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---}$ 

1. BEVEZETÉS

A Debreceni Egyetem Bioszervetlen és Koordinációs Kémiai Kutatócsoportjában évtizedek óta folynak olyan kutatások, melyek a különböző hormonrendszeri és idegrendszeri elváltozásokban, megbetegedésekben szerepet játszó peptidfehérjék és az élettani szempontból fontos fémionok között kialakuló komplex kölcsönhatások megértését célozzák. Az Alzheimer-kór és a prionbetegség mellett ilyen a cukorbetegség is.

A WHO 2014-re vonatkozó adatai szerint a korábbi becsléshez képest nagyobb mértékben növekedett a cukorbetegek száma, abban az évben ugyanis már 422 millió cukorbeteg tartottak számon, 2012-ben pedig 1,5 millió haláleset oka volt a diabétesz.

Igaz, hogy a cukorbetegséget régóta tanulmányozzák, kialakulásának okait azonban még nem sikerült minden kétséget kizáróan feltérképezni és megmagyarázni.

Gyakran hozzák kapcsolatba a neurodegeneratív megbetegedésekkel, hiszen közös szövettani „nyomuk” bizonyos viasszerű, áttetsző lerakódások megjelenése, az ún. *amiloidózis* jelensége.

Az egyik ok gyakorta valamilyen külső behatás (oxidatív stressz, fémionok helyi feldúsulása, a fémionok koordinációja miatt bekövetkező konformációváltozás), de lehet mutáció következménye is az alfa-hélix átrendeződése.

A 2-es típusú cukorbetegségben szenvedők hasnyálmirigyének bonctani vizsgálatát követően 90-95 százalékuknál neurodegeneratív megbetegedésekre jellemző, amiloid típusú lerakódásokat mutattak ki. Idővel az is érdekelte a téma kutatóit, hogy mely fehérje megváltozása vezet a hasnyálmirigy amiloid lerakódásainak képződéséhez. Cooper és csoportja azt közölték, hogy az aggregátumok legfőbb fehérjealkotója a 37 aminosavból álló humán amilin peptidhormon (amylin, amilin, human islet amyloid polypeptide, *hIAPP*).

A *hIAPP* az inzulinhoz hasonlóan a hasnyálmirigy bétasejtjeiben keletkezik, csökkenti a gyomorürülés sebességét és ezáltal mérsékli az étkezés utáni vércukor-emelkedést. Az amilin peptidlánc aggregációjának oka és mechanizmusa ugyanakkor mindmáig kérdés maradt.

A patkány amilinjét vizsgálva viszont megállapíthatták, nem mutat hajlamot ilyen plakkok képzésére. A patkányból és az emberből izolált amilin a 18., 23., 25., 26., 28. és 29. aminosavban tér el egymástól (**2. táblázat**).

Azt már korábban is tudták, hogy az ideg- illetve hormonrendszeri betegségek kialakulása alapvetően a fehérjemolekulák konformációváltozásával, és az azt követő aggregációjával van összefüggésben. Azonban ezen fehérjék

nagy fémionaffinitása és így a fémionok ezen folyamatokban betöltött szerepe csak az újabb kutatások alapján vált egyértelművé.

Hogy a fémionok szerepe valóban releváns, arra egyértelmű eredmények mutatnak, hiszen a Cu(II), Fe(III) és Zn(II) kiugróan nagy koncentrációban vannak jelen az amiloid lerakódásokban.

Kutatócsoportunkban már folytak előzetes mérések a patkány amilin (rIAPP) (17-29) fragmens és a Cu(II)-ion kölcsönhatásának feltérképezésére.

Annak ellenére azonban, hogy a patkány amilin (17-29) szekvenciájában található aminosavak oldalláncaikban nem tartalmaznak olyan donortomot, amelyekhez a fémion koordinálódni tudna, mégis azt tapasztalták, hogy képes a Cu(II)-ionok oldatban tartására.

Kérdés maradt tehát, hogy a molekula mely része köti meg a Cu(II)-iont, illetve mely csoport(ok) és milyen arányú közreműködése játszik ebben az egyedi koordinációs folyamatban szerepet.

2. táblázat: A humán és a patkány amilin szekvenciája

(Az eltérő tagokat kiemeltem.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Hu	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	H
Rat	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	R

1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3
9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7
S	S	N	N	F	G	A	I	L	S	S	T	N	V	G	S	N	T	Y
S	S	N	N	L	G	P	V	L	P	P	T	N	V	G	S	N	T	Y

2. CÉLKITŰZÉSEK

A szakirodalomban fellelhető adatok szerint a patkány és a humán amilin eltérő viselkedésében a szekvenciális eltéréseknek, poláris oldalláncoknak, különösképpen a poláris szerin- és/vagy az aszparagin-oldalláncoknak együttesen lehet jelentős szerepe. A Cu(II)-ion megkötésének pontos módja ugyanakkor mind ez idáig megválaszolatlan maradt, így ez további vizsgálatokat irányoz elő ebben a témakörben.

Munkám első szegmense a *patkány* amilin humán amilintól eltérő szakaszának (rIAPP 17-29) vizsgálata során nyert, korábbi irodalmi adatok kiegészítése volt. Az egyes oldalláncok szerepének és a *fémion megkötésének módját* vizsgálándó rövidebb, terminálisan védett fragmensek és mutánsok pH-potenciometriás és spektroszkópiai vizsgálatát végeztük el.

További munkánk során arra voltunk kíváncsiak, hogy az *egyes oldalláncoknak számszerűsíthetően milyen és mekkora szerepe* lehet a szokatlan komplexképzésben, emiatt elvégeztük néhány N-terminálisan nem védett patkány amilin fragmens szintézisét, valamint fémionkomplexeiknek pH-potenciometriás és spektroszkópiai vizsgálatát.

Munkánk harmadik szakaszában arra kerestük a választ, hogy *más, erősen koordináló fémkötőhely mellett milyen szerepe lehet a poláris oldalláncok* alkotta szekvenciaszakasznak a fémion, avagy egy második ekvivalens fémion megkötésében.

Ugyanezen fragmensek egy jelentős részét az egyes oldalláncok sajátos komplexkémiái szerepének felderítésére, illetőleg megerősítő és összehasonlító információk nyerésének céljából az élettani szempontból jelentős *Ni(II)-ion és Zn(II)-ion jelenlétében is* terveztük tanulmányozni

A negyedik vizsgálati csoportot a terminálisan védett *humán* amilin fragmensek (Ac-AAAHSSNN-NH₂, Ac-AAAHAAAA-NH₂) képezték, melyek Cu(II)-komplexeinek tanulmányozásával szerettünk volna választ kapni a patkány és a humán amilin eltérő koordinációs és plakkképzési hajlamának okaira.

Munkánk során az emberi szervezetet jellemző vizes rendszerek tanulmányozására törekedtünk minden vizsgálatunk esetében. Különösen érdekelt minket az, hogy a hasnyálmirigy pH-viszonyai között hogyan viselkednek és milyen szerkezetűek komplexeink.

3. ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A vizsgált peptidek egyik felét *szilárdfázisú peptidszintézissel* kutatócsoportunkban, a másik felét pedig egy olaszországi együttműködés keretében a Catania Egyetemen állítottuk elő. Munkánk során az összes ligandum szintézisét automatizált módon, egy mikrohullámú Liberty peptidszintetizáló készülékkel (CEM, Matthews, NC) végeztük.

A peptid gyantáról való lehasítását szobahőmérsékleten végeztük 94,0 % TFA, 1,0 % DODT, 2,5 % TIS, 2,5 % H₂O elegyével 1-1,5 óra alatt. Ez alatt nem csak a gyantáról való hasítás, hanem az oldalláncbeli védőcsoportok eltávolítása is megtörtént. A hideg, dietiléterben történő kicsapás után kaptuk meg a nyers termékeket. A csapadékot centrifugálással választottuk el és ülepítettük, majd újbóli hideg dietil-éterrel való mosást követő szárítás következett. Az így kapott anyagot 4 ml vízben feloldottuk, majd liofilizáltuk.

Az előállított és liofilizált oligopeptidek tisztaságát minden esetben *nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC)* és *ESI-MS analízissel* ellenőriztünk.

Munkánk során valamennyi ligandum esetében az első alkalmazott technika a *pH-potenciometriás módszer* volt, mely az oldatfázisban lejátszódó komplexképződési folyamatok egyensúlyi vizsgálatának legáltalánosabb kísérleti módszere. A pH-potenciometriás mérések segítségével határoztuk meg a ligandumok protonálódási állandóit és a fémionkomplexek stabilitási állandóit. A kísérleti adatokból a fémkomplexekre meghatározott stabilitási szorzatokat a PSEQUAD és a SUPERQUAD nevű számítógépes programokkal számítottuk ki.

UV-Vis spektrofotometriás méréseinket 200-900 nm-es hullámhossz tartományban végeztük. A spektrumokat Hewlett-Packard HP 8453 típusú egysugaras, diódasoros, illetve Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras fotométereken, 1,000 cm-es küvettában vettük fel különböző pH-értékeken, különböző fémion-ligandum arányoknál. Utóbbiakat minden esetben a pH-potenciometriás méréseink alapján választottuk meg.

Miután a Cu(II)- és Ni(II)-peptid rendszerek komplexeinek képződése jól vizsgálható *CD spektroszkópiával*, ezért CD méréseket is végeztünk a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén egy JASCO J-810 spektrométeren. A spektrumokat szobahőmérsékletű vizes oldatokban vettük fel különböző pH-értékeknél és különböző fémion-ligandum arányokat alkalmazva. Méréseinkhez 0,1 és 1,0 cm úthosszúságú küvettákat használtunk, a spektrumokat 220-800 nm

hullámhossz tartományban rögzítettük. A spektrumok elemzésével a képződött komplexek szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donoratomok számára és minőségére lehetett következtetni.

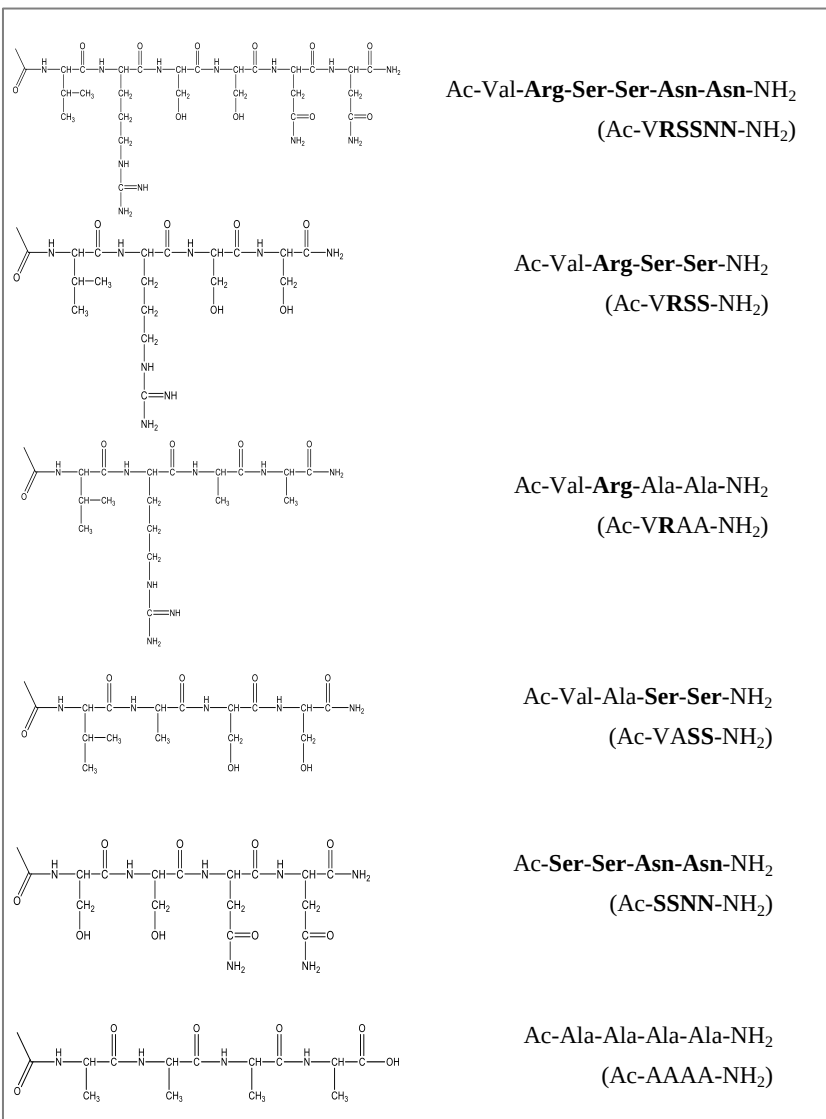
A spektrumok kiértékeléséhez a CCA+ és a PSEQUAD programot használtuk. A „**Convex Constraint Analysis**” (CCA+) program alapja, hogy a már meglévő spektrumsorozatot matematikai elven összetevőire bontja, így megkülönböztethetővé válnak a sorozatot meghatározó néhány komponens jellemző spektrumai. A spektrumok mellett bemeneti adatnak csak a fényelnyeléssel rendelkező részecskék számát szükséges megadni. A módszerrel egyedi spektrumok, eloszlási diagramok nyerhetők.

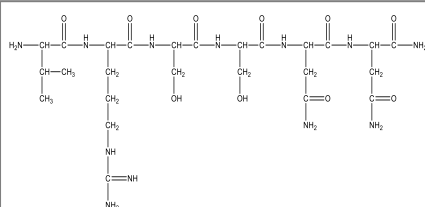
Az elektrospin-rezonancia spektroszkópia (ESR, EPR) módszere olyan részecskék tanulmányozására alkalmas, amelyek párosítatlan elektront tartalmaznak, azaz paramágneses sajátságúak. A Cu(II)-ion paramágneses volta miatt ez a módszer kiválóan alkalmas komplexei vizsgálatára.

A számított paraméterekből a már ismert szerkezetű komplexek paramétereivel való összehasonlítás alapján a fémion körül kialakuló koordinációs módra és a koordinálódó atomok kémiai minőségére lehet következtetni.

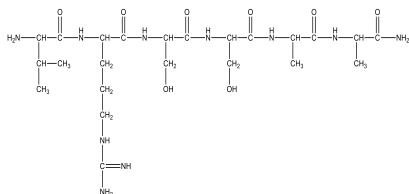
A méréseket Olaszországban (Department of Chemistry, University of Sassari) a kutatócsoportunkkal szakmai együttműködésben álló kutatócsoport tagjai végezték. A spektrumokat Bruker EMX spektrométeren, etilén-glikol hozzáadása után 120 K hőmérsékletűre lehűtött oldatokban vették fel különböző pH-értékeknél, illetve különböző fémion/ligandum aránynál. A mérésekhez használt fémtrözsoldat ^{63}Cu izotópot tartalmazott, koncentrációja a mintában 5 mM volt. Külső standardként difenil-pikril-hidrazint használtak, melyre a $g_{\parallel}^0$ értéke 2,0028.

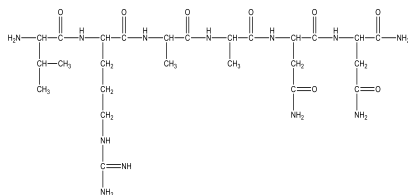
4. A VIZSGÁLT LIGANDUMOK SZERKEZETI KÉPLETEI



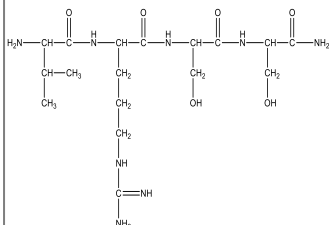


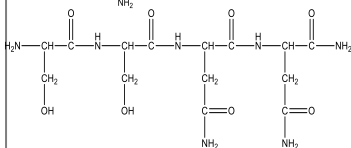
NH₂-Val-**Arg-Ser-Ser-Asn-Asn**-NH₂
(NH₂-VRSSNN-NH₂)


$$\text{NH}_2\text{-Val-Arg-Ser-Ser-Ala-Ala-NH}_2$$

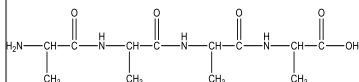
$$(\text{NH}_2\text{-VRSSAA-NH}_2)$$


NH₂-Val-**Arg**-Ala-Ala-**Asn**-Asn-NH₂
(NH₂-V**R**AANN-NH₂)

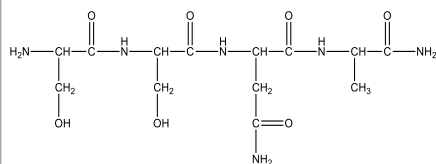

$$\text{NH}_2\text{-Val-Arg-Ser-Ser-NH}_2$$

$$(\text{NH}_2\text{-VRSS-NH}_2)$$


NH₂-Ser-Ser-Asn-Asn-NH₂
(NH₂-SSNN-NH₂)

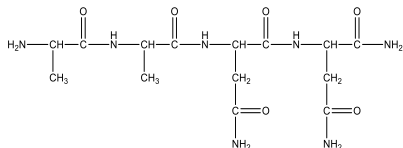


NH₂-Ala-Ala-Ala-Ala-OH
(NH₂-AAAA-NH₂)



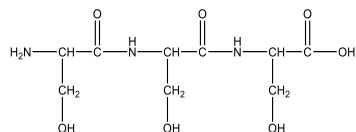
$\text{NH}_2\text{-Ser-Ser-Asn-Ala-NH}_2$

$\text{NH}_2\text{-SSNA-NH}_2$



$\text{NH}_2\text{-Ala-Ala-Asn-Asn-NH}_2$

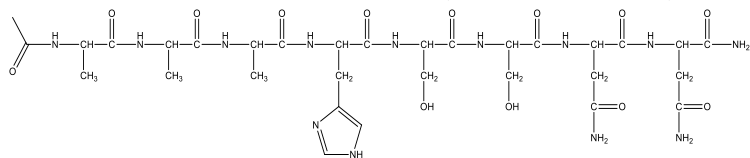
$\text{NH}_2\text{-AANN-NH}_2$



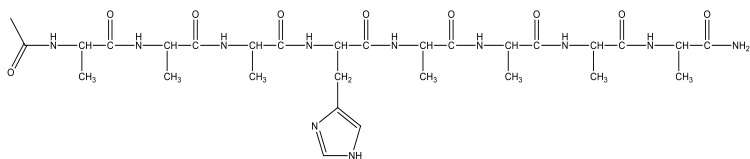
$\text{NH}_2\text{-Ser-Ser-Ser-NH}_2$

$\text{NH}_2\text{-SSS-OH}$

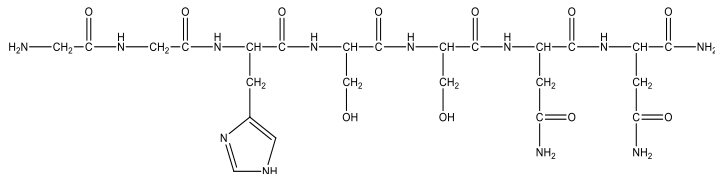
$\text{Ac-Ala-Ala-Ala-His-Ser-Ser-Asn-Asn-NH}_2$ (Ac-AAAHSSNN-NH₂)



$\text{Ac-Ala-Ala-Ala-His-Ala-Ala-Ala-NH}_2$ (Ac-AAAHAAAA-NH₂)



$\text{NH}_2\text{-Gly-Gly-His-Ser-Ser-Asn-Asn-NH}_2$ (NH₂-GGHSSNN-NH₂)



5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

I. A PATKÁNY AMILIN (17-29) FÉMIONKÖTŐHELYÉNEK MODELEZÉSE

Terminálisan védett természetes fragmensek vizsgálata Cu(II)-ion jelenlétében

1. A ligandumkoncentrációk ismeretében, melyeket egy már irodalomban leírt módszer optimalizálásával határoztuk meg, le tudtuk írni a patkány amilin (17-29) Cu(II)-komplexeinek eddig még nem jellemzett stabilitási állandóit és azok pH szerinti eloszlását, valamint azonosítottuk a képződő komplexek egyedi UV-Vis spektrumait is.

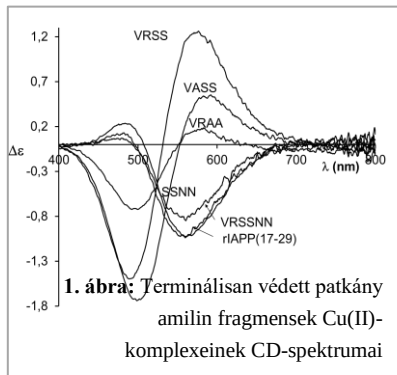
- További öt, új amilinfragmens (Ac-VRSSNN-NH₂, Ac-VRSS-NH₂, Ac-SSNN-NH₂, Ac-VRAA-NH₂, Ac-VASS-NH₂) koordinációs kémiai viselkedését is ugyanilyen módszerrel írtuk le, azonosítottuk egyedi spektrumaikat, és meghatároztuk a Cu(II)-komplexek stabilitási állandóit.

/A továbbiakban nem jelölöm külön a védett C-terminust, a következő rövidítést alkalmazom:

például Ac-VRSSNN./

2. Bizonyítottuk, hogy a korábbi feltevésekkel ellentétben nem az arginin tagnak, hanem a szerin és az aszparagin tagoknak van szerepe a fémion koordinálásában.

A pH-potenciometriás, illetve a spektroszkópai mérések eredményeként információt nyertünk arról, hogy egy rövidebb, csupán kétféle poláris oldalláncot tartalmazó fragmens (Ac-VRSS) és annak egyféle poláris oldalláncot tartalmazó mutánsai (Ac-VRAA, Ac-VASS) a 6 és 9 közötti pH-tartományban nem voltak képesek oldatban tartani a Cu(II)-iont, így Cu(OH)₂ csapadék vált ki az oldatokból. Kimutattuk azt, hogy a szerin jelenléte lúgos pH-tartományban elősegíti a csapadék visszaoldódását, a fémion részbeni kötődését a peptidlánchoz.



1. ábra: Terminálisan védett patkány amilin fragmensek Cu(II)-komplexeinek CD-spektrumai

3. Azonosítottuk a Cu(II)-ion megkötéséért felelős legrövidebb motívumot, a Ser-Ser-Asn-Asn szekvenciát.

Összehasonlítva a hat peptid (Ac-VRSSNN, Ac-VRSS, Ac-SSNN-, amilin 17–29, Ac-VRAA, Ac-VASS) megfelelő spektrumait megállapíthattuk, hogy kétféle spektrumtípust különböztethetünk meg (**1. ábra**). Az egyik típusba az Ac-VRSS, a Ac-VRAA és a Ac-VASS tetrapeptidek tartoznak. A másik típushoz az Ac-SSNN és a Ac-VRSSNN fragmentumok rendelhetők. Abból kiindulva, hogy az rIAPP (17-29) spektrális viselkedése az SSNN-típusúakhoz mutat hasonlóságot, bizonyítottuk, hogy a Cu(II)-iont kötő legrövidebb szenvenciaszakasz az SSNN-szakasz, így ezzel modellezhető a fémion kötőhelye a legjobban.

4. Kimutattuk, hogy a 22-es pozícióban lévő aszparagin-oldallánc már fiziológiás pH-n is képes deprotonálódni és koordinálódni a Cu(II)-ionhoz.

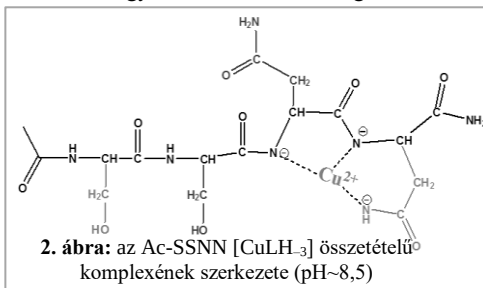
DFT-számítások és az ESR paraméterek alapján kimutattuk, hogy a poláris oldalláncok (szerin, aszparagin) között kialakuló kölcsönhatások egy olyan molekuláris környezetet hoznak létre, melyben a C-terminális aszparagin-oldallánc horgonycsoporként indukálja a fémion megkötését, valamint a peptidvázbeli amidnitrogének egymást követő deprotonálódását és koordinációját (**2. ábra**).

- Azt is demonstráltuk, hogy az aszparagin-oldallánc koordinációja jól jellemezhető egy karakteres, 480 nm-nél megjelenő CD-sávval (**1. ábra**).

Eredményeinkkel alátámasztottuk, hogy a hormon különleges fémion-koordináló képességéért elsősorban az aszparagin-oldallánc a felelős, illetve maga az SSNN szekvencia által kialakított különleges környezet. Az aszparagin oldallánca a ciszteinhez vagy hisztidinhez hasonlóan elsődleges fémkötőhely lehet.

Eredményeink

jelentősége abban áll, hogy az eddigi irodalmak alapján eleddig csak az erősen lúgos közegben tudták csak kimutatni az aszparagin-oldallánc deprotonálódását és koordinációját.



II. A POLÁRIS OLDALLÁNCOK EGYMÁSHOZ VISZONYÍTOTT RÉSZVÉTELE (Cu(II)-KOMPLEXEK ESETÉBEN)

Terminálisan nem védett, szabad aminocsoporttal rendelkező mutánsok oldategyensúlyi vizsgálata Cu(II)-ion jelenlétében

1. Szilárdfázisú peptidszintézissel előállítottam 8 új, szabad aminocsoporttal rendelkező aminofragmens mutáns (NH₂-VRSSNN, NH₂-VRSSAA, NH₂-VRAANN, NH₂-VRSS, NH₂-SSNN, NH₂-AANN, NH₂-SSNA, NH₂-GGHSSNN), melyek pH-potenciometriás és spektroszkópiás vizsgálatával tisztáztuk a poláris oldalláncok és a terminális aminocsoport egymáshoz képesti szerepét immár számszerűsítve is. Összehasonlításként két további, kereskedelmi forgalomban elérhető egyszerűbb oligopeptid–Cu(II) rendszert is tanulmányoztunk.

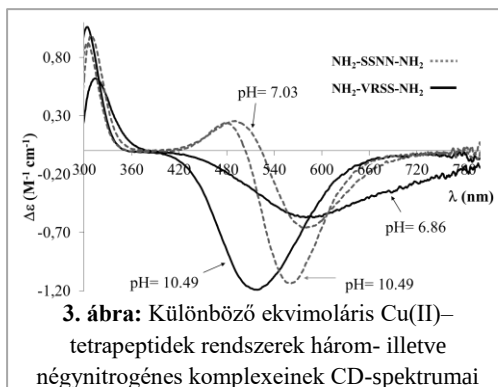
2. Igazoltuk, hogy a terminális aminocsoport szerepe messze fölülmúlja az aszparagin oldallánc szerepét a fémion megkötésében. Ugyanakkor a tetra- és hexapeptidek koordinációs kémiai viselkedése kissé eltért egymástól.

- A tetrapeptidek esetében, amikor az aszparagin-oldalláncok közel helyezkedtek el a koordinálódó peptidváz-szakaszhoz, akkor jelentékeny stabilitásnövekedés volt tapasztalható – habár a kötémód alapvetően megegyezett az egyszerűbb oligopeptidekével. A hexapeptidek esetében a horgonycsoporttól már igen távol esik az aszparagin-oldallánc, így szerepét ezen ligandumok komplexeinél nem tudtuk kimutatni.
- Másrésztől azonban megállapítottuk, hogy ha az aszparagin-oldallánc a harmadik pozícióban (röviden: NH₂-xxNy) helyezkedik el, akkor a háromnitrogénes, közbenső komplexek stabilitása kiugróan megnövekedik.
- Vizsgált peptidjeinkben azonban nem az aszparagin oldallánca az elsődleges horgonycsoport, hanem a N-terminális aminocsoport, ugyanakkor az aszparagin-oldalláncnak jelentősebb szerkezetalkító szerepét bizonyítják a nyert pH-potenciometriás adatok, stabilitási állandók.

3. A CD-, UV- és ESR-spektroszkópiai adatok elemzésével bizonyítottuk, hogy az aszparagin-oldallánc még szabad N-terminus mellett is részt vesz a Cu(II)-ion koordinálásában.

Összehasonlítva az $\text{NH}_2\text{-xxNy}$ ligandumaink komplexeinek és az Ac-SSNN ligandum komplexeinek paramétereit (UV-Vis, CD, ESR) nem zárható ki, hogy az aminoterminuson történő fémion megkötődést követően a 3. helyen lévő aszparagin-oldallánc

deprotonálódása és koordinációja következik be ennek a ligandumcsoportnak az esetében is. A védett terminusokkal rendelkező patkány amilin fragmensek CD-spektrumaiban jelentkező karakteres sáv (pozitív Cotton-effektus 480 nm körül) ezen ligandumok komplexeinek is jellemzője volt (3. ábra).

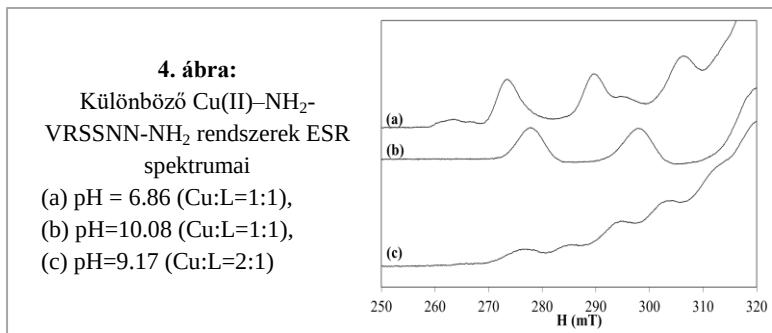


3. ábra: Különböző ekvimoláris Cu(II)–tetrapeptidek rendszerek három- illetve négynitrogén komplexek CD-spektruma

4. Kísérleteinkkel demonstráltuk, hogy a szabad aminoterminussal rendelkező ligandumok esetében még szerin-oldalláncok hiányában ($\text{NH}_2\text{-AANN}$) is volt stabilitásnövekedés és az aszparagin-oldallánc részvételére utaló Cotton-effektus is jelentkezett. Ugyanakkor szerin-oldalláncok jelenlétében ($\text{NH}_2\text{-SSNN}$, $\text{NH}_2\text{-SSNA}$) kifejezettebb volt a hatás, nagyobb volt a stabilitásnövekedés és intenzívebb a pozitív Cotton-effektus is.

5. Bizonyítottuk, hogy az –SSNN– domén még a terminális aminocsoport mellett is másodlagos kötőhelyként funkcionálhat:

A fémiont főlegben tartalmazó mintáink mérése során azt találtuk, hogy csupán az $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$ ligandum képes két ekvivalens fémiont oldatban tartani, a mutánsok esetében ($\text{NH}_2\text{-VRSSAA}$, $\text{NH}_2\text{-VRAANN}$) ez csak 11-es pH fölött valósulhat meg. Az $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$ ligandum kétmagvú Cu(II)-komplexeinek jelenlétét tömegspektrometris és ESR módszerrel is igazoltuk, míg a mutánsok esetében nem tudtunk kimutatni kétmagvú részecskéket. CD-spektroszkópiás vizsgálatokkal igazoltuk az ESR paraméterek alapján feltételezett két egyenértékű, háromnitrogén centrum meglétét pH~8-9 körüli pH értéken (4. ábra).



6. A mutánsok vizsgálatával megállapítottuk azt is, hogy sem a szerin oldalláncok, sem az aszparagin oldalláncok külön-külön, önmagukban nem képesek a fémion számára másodlagos kötőhelyet kialakítani, szükséges mind a négy aminosav (SSNN) jelenléte a koordinációhoz.

7. Az SSNN-kötőhely további bizonyításához előállítottuk az albumin- és SSNN-szekvenciát is magába foglaló NH₂-GGHSSNN ligandumot annak tanulmányozására, hogy vajon az albumin-kötőhely mellett is funkcionálhat-e kötőhelyként az SSNN-domén.

- Igazoltuk, hogy az ekvimoláris rendszerben várakozásainkkal megegyezően mindösszesen az albumin-szakasz (NH₂-GGH) vesz részt a fémion koordinálásában.
- A fémiont kétszeres mennyiségben tartalmazó rendszer Cu(II)-komplexének CD-spektrumait elemezve azonban azt is bizonyítottuk, hogy az SSNN rész az irodalomból jól ismert, nagy hatékonyságú albumin-kötőhely mellett is képes a másodlagos kötőhely szerepét betölteni.
- Ezen eredmények alátámasztják a korábbi ligandumok aszparagin-oldalláncainak részvételét is a fémion megkötésében (NH₂-SSNN, NH₂-SSNA, NH₂-AANN).

III. A POLÁRIS OLDALLÁNCOK EGYMÁSHOZ VISZONYÍTOTT RÉSZVÉTELE (Ni(II)- VAGY Zn(II)-IONT TARTALMAZÓ RENDSZEREKBEN)

Ni(II)-komplexek

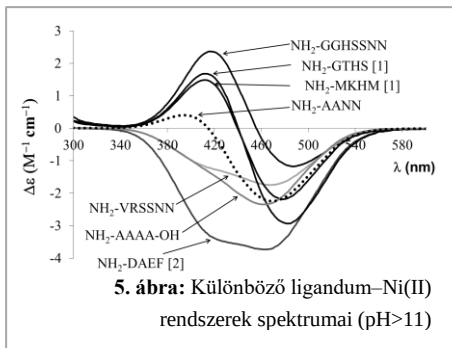
1. Kimutattuk, hogy az SSNN-szekvencia és az aszparagin-oldallánc szokatlan hatása a Ni(II)-ion komplexeiben is érvényesül:

- Megállapíthattuk, hogy az aszparagin-oldallánc jelenlétében a komplexképződési folyamatok kisebb pH-n mentek végbe. Már pH 8-8,5 körül négynitrogén komplexek domináltak a rendszerekben, míg a poláris oldalláncokkal nem rendelkező tetraalanin négynitrogén Ni(II)-komplexei csak ~10-es pH-n képződtek az előbbivel összemérhető mennyiségben.

2. Igazoltuk az aszparagin-oldallánc jelentős részvételét a Ni(II)-ion koordinációs szférájának kialakításában egy jellemző CD-sáv hozzárendelésével:

A $\text{NH}_2\text{-xxNy-NH}_2\text{-Ni(II)}$ komplexek egyedi spektrumait más Ni(II)-peptid rendszerek ($\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$, $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$, $\text{NH}_2\text{-AAAA-OH}$, $\text{NH}_2\text{-GTHS}^1$, $\text{NH}_2\text{-MKHM}^1$, $\text{NH}_2\text{-DAEF}^2$) megfelelő pH-n felvett spektrumaival összevetve jól látszik, hogy ha az oldallánc (hisztidin, aszparagin) részt vesz a fémion megkötésében, akkor megjelenik a pozitív sáv 400-420 nm körül (**5. ábra**).

Oldallánccal nem koordinálódó ligandumok esetében pedig egyöntetűen csak negatív Cotton-effektusokkal jellemezhetők a folyamatok.



5. ábra: Különböző ligandum–Ni(II) rendszerek spektrumai (pH>11)

¹ I. Turi; D. Sanna; E. Garribba; G. Pappalardo, I. Sóvágó; Polyhedron, 62, 7–17. (2013)

² Józsa Éva, Tudományos Diákköri dolgozat, Az Alzheimer-kórért felelős amiloid-β(1-16)

² Józsa Éva, Tudományos Diákköri dolgozat, Az Alzheimer-kórért felelős amiloid-β(1-16) fragmenseinek Ni(II)-, Cd(II)- és Co(II)-komplexei. (2008)

3. Bizonyítottuk, hogy az aszparagin-oldallánc okozza a fragmensek/mutások szokatlan viselkedését, de a szerin-oldalláncok befolyásoló/módosító hatással bírnak.

- Négy mutáns ($\text{NH}_2\text{-AANN}$, $\text{NH}_2\text{-SSNA}$, $\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$, $\text{NH}_2\text{-SSS-OH}$) vizsgálatával demonstráltuk, hogy (hasonlóan a Cu(II) -rendszerekhez) az aszparagin-oldalláncok kiemeltebb és a szerin oldalláncok másodlagos szerepét.
- Azt is bemutattuk, hogy ha az SSNN-szakasz a horgonyként szolgáló terminális aminosoporttól távolabb helyezkedik el, akkor hatása a Ni(II) -tartalmú rendszerekben sem mutatható ki hasonlóan a Cu(II) -rendszerekhez.

4. Demonstráltuk, hogy a Cu(II) -ionnal ellentétben a Ni(II) -ion számára nem szolgálhat másodlagos kötőhelyként az SSNN-szakasz terminálisan nem védett aminosoport és/vagy albumin-típusú kötőhely jelenlétében.

- A Ni(II) -iont főlegben tartalmazó mintáink mérése során mindkét ligandum ($\text{NH}_2\text{-VRSSNN}$ és $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN}$) esetén azt találtuk, hogy Ni(OH)_2 -csapadék vált ki oldatból, tehát a második ekvivalens fémion számára nem adódott újabb, másodlagos kötőhely.
- Megállapítottuk, hogy – szemben a Cu(II) -ionnal – a Ni(II) -ion nem képes előidézni a C-terminális aszparagin-oldallánc deprotonálódását és koordinációját.
- Egyéb, erősen koordinálódó csoport (pl. terminális aminosoport) jelenlétében az SSNN-domén növeli a komplexek stabilitását.

Az $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN-Zn(II)}$ és az $\text{NH}_2\text{-SSNA-Zn(II)}$ rendszer vizsgálata

Irodalmi előzményekből kiindulva arra kerestük a választ, hogy képes-e az aszparagin oldalláncbeli amidcsoportja a hisztidin imidazols csoportjához hasonlóan részt venni a Zn(II) -ion megkötésében, valamint hogy ez megtörténhet-e az enyhén lúgos pH-tartományban is.

5. Kimutattuk, hogy a Zn(II) (hasonlóan a Ni(II) -ionhoz) nem képes erős kölcsönhatást kialakítani az SSNN-szakasszal. A poláris oldalláncok stabilitásnövelő hatását nem tudtuk kimutatni.

- A $\text{Zn(II)-NH}_2\text{-SSNA}$ rendszerekben várakozásainknak megfelelően az enyhén savas pH-tartományban, pH 5 fölött [ML] összetételű komplexek képződtek az aminocsoport és a szomszédos karboniloxigén részvételével. Ennél nagyobb pH-n azonban a fémion hidroxidcsapadékként kivált az oldatból.

6. Igazoltuk, hogy a Zn(II) sem képes elősegíteni a aszparagin-oldalláncok deprotonálódását és koordinációját.

7. Sem az aszparagin-oldalláncok, sem az SSNN-szekvencia, sem pedig az albumin-SSNN motívumok együttesen nem elégségesek a Zn(II) -ion fiziológias és enyhén lúgos (pH 8-9) tartományban történő koordinálására.

- Az $\text{NH}_2\text{-GGHSSNN-Zn(II)}$ rendszerben sem mutattuk ki az SSNx-szakasz extra hatását, csupán az irodalomban már leírt (NH_2 , N_{im}) típusú komplexek képződését igazoltuk. A 7-es pH fölött ebben a rendszerben is Zn(OH)_2 csapadék vált ki az oldatból.

IV. A HUMÁN AMILIN Cu(II)-ION KÖTŐHELYÉNEK/KÖTŐHELYEINEK MODELEZÉSE

A humán amilin (15-22) szakaszát modellező mutáns Cu(II)-kötőhelyének vizsgálata

Minthogy a természetes szekvenciának a 15-22 szakaszában nincs szabad aminos csoport, ezért az Ac-AAAHSSNN ligandum vizsgálatával a humán hormon és patkány hormon, valamint a két kötőhely valódi összehasonlítását végezhetjük el.

1. *A natív szekvencia (hIAPP (15-22); Ac-ANFLVHSSNN) kis vízóldékonysága miatt szintetizáltam egy mutánsát, az Ac-AAAHSSNN ligandumot. A ligandum két kötőhellyel rendelkezik; az egy hisztidint tartalmazóval és az SSNN-doménnel. Összehasonlítási célból a csak egy hisztidint tartalmazó (N_{im} , $3N^-$) modellező mutánst (az Ac-AAAHAAAA ligandumot) is előállítottuk.*

2. *Demonstráltuk, hogy ekvimoláris rendszerekben a Cu(II)-ion nem csak a hisztidin-kötőhelyhez, hanem az SSNN-szakaszhoz is koordinálódik.*

- Kimutattuk, hogy pH 7 körül az egyhisztidines kötőhelyhez (AAAH domén) koordinálódik a fémion, de enyhén lúgos közegben (pH 8-9) és affölött már az SSNN-kötőhely válik kedvezményezetté. A Cu(II)-komplexek pH szerinti eloszlása és azok sztöchiometriája alapján koordinációs izomerek jelenlétére következtettünk a lúgos pH-tartományban.
- Mindezek mellett a CD-spektrumok összegzésével, illetőleg különböző arányú kombinálásával igazoltuk, hogy az SSNN-kötőhely (az eddigi tapasztalatokkal egyezően) a pH 8-11,5 közötti tartományban egyre nagyobb szerepet kap, illetve nő az SSNN-részhez kötődő izomerek mennyisége.

3. *Cirkuláris dikroizmus, UV-Vis és ESR módszerrel is bizonyítottuk, hogy a Cu(II)-iont tartalmazó rendszerekben kétmagvú komplexek képződnek, azaz az SSNN-szakasz a hisztidint tartalmazó kötőhely mellett egy új fémion-koordináló helyként szolgál a humán amilin esetében.*

6. AZ EREDMÉNYEK HASZNOSÍTHATÓSÁGÁNAK LEHETŐSÉGEI

A Bioszervetlen és Koordinációs Kémiai Kutatócsoportban évtizedek óta tanulmányozzuk *in vitro* körülmények között a különböző, biológiai szempontból fontos fémionok és peptidek komplexeinek koordinációs kémiai viselkedését, ezáltal tudományosan tisztázott alapokat nyújthatunk akár a biológiai/orvosi kutatások *in vivo* vizsgálataihoz is.

Munkám során az amiloidplakkok képzésére nem hajlamos patkány és az amiloidképző humán amilin hormonok fémionkötő képességét vizsgáltam és hasonlítottam össze különböző modellvegyületeken keresztül. Az amiloidplakkok képződése, a peptidlánc konformációváltozása, valamint a fémionok megkötése közötti szoros összefüggés jól ismert a szakirodalomban, így fontos lehet a komplexek koordinációs módjának feltérképezése.

Eredményeink jelentősége abban áll, hogy méréseinkkel kimutattuk, az SSNN-szekvencia is fémion-koordináló helyként szolgálhat a lúgos közegben (pH 9 körül) a Cu(II)-ion számára.

A patkány amilin esetében ugyanis csak egy kötőhely kínálkozik a Cu(II)-ion számára; az SSNN-domén. A humán amilin *hIAPP* 15-22 szekvenciáját modellező Ac-AAAHSSNN peptidnél egy ennél bonyolultabb rendszer jön/jöhet létre, hiszen izomerek vagy kétmagvú komplexek egyaránt jelen lehetnek a rendszerben. Mivel a hasnyálmirigy szövetei nem tekinthetők homogén oldatrendszereknek és a fémionok akár lokálisan feldúsulhatnak, ezért mind az izomerek, mind a kétmagvú komplexek képződésére valódi esély van. Az utóbbi rendszerben így egészen más típusú konformációváltozás várható, mint a patkány amilin esetében. Munkánk során egyértelmű különbséget találtunk a humán és a patkány amilin Cu(II)-kötőhelye(i)ben és a Cu(II)-ion megkötés módjában.

Noha vizsgálataink alap kutatás jellegűek, a kapott eredmények lehetővé teszik nagyobb biomolekulák, hormonok és fémionok közötti kölcsönhatások számszerű jellemzését és modellek felállítását.

7. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK (Publications)

Az értekezés alapját képező közlemények (Publications related to the thesis)

1. Ágnes Dávid, Csilla Kállay, Daniele Sanna, Norbert Lihi, Imre Sóvágó, Katalin Várnagy: *Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes of rat amylin fragments. The anchoring ability of specific non-coordinating side chains*,

Dalton Trans., **2015**, 44, 17091–17099.

IF: **4,197**

DOI: 10.1039/c1dt10835b

2. Csilla Kállay, Ágnes Dávid, Sarolta Timári, Eszter Márta Nagy, Daniele Sanna, Eugenio Garribba, Giovanni Micera, Paolo De Bona, Giuseppe Pappalardo, Enrico Rizzarelli and Imre Sóvágó: *Copper(II) complexes of rat amylin fragments*,

Dalton Trans. **2011**, 40 (38), 9711 – 9721.

IF: **3,838**

DOI: 10.1039/c5dt02445e

Az értekezés alapját képező előadások (Lectures related to the thesis)

1. Katalin Várnagy Ágnes Dávid, Daniele Sanna, Csilla Kállay, Imre Sóvágó: *The anchoring ability of specific non-coordinating side chains in the rat amylin fragments*, 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference (Eurobic 13), Budapest, Hungary, **2016**. 08. 28- 09. 01.
2. Dávid Ágnes, Kállay Csilla, Várnagy Katalin, Daniele Sanna, Hartman Éva, Sóvágó Imre: *Amylinfragmentek fémkötőhelyének vizsgálata*, 49. Komplexkémiái Kollokvium, Siófok, **2015**. 05. 26-28.
3. Katalin Várnagy, Gizella Csire, Sarolta Timári, Ágnes Dávid, Csilla Kállay: *The role of side chains in the fine tuning of metal binding ability of peptides*, 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (Eurobic 12), Zürich, Switzerland, **2014**. 08. 24-28.
4. Katalin Várnagy, Ágnes Dávid, Csilla Kállay, Daniele Sanna and Imre Sóvágó: *The role of the polar side chains in the metal binding ability of rat amylin fragments*, 12th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC12), Guangzhou, Kína, **2013**. 12. 03–06.

5. Dávid Ágnes, Várnagy Katalin, Kállay Csilla, Daniele Sanna, Sóvágó Imre: *Amilin fragmentek fémkötőhelyének vizsgálata*, 47. Komplexkémiái Kollokvium, Mátraháza, **2013.** 05. 30.
6. Dávid Ágnes: *Amilin fragmentek szintézise és oldategyensúlyi vizsgálata*, Kémiai Előadói Napok, Szeged, **2012.** 10. 29-31.
7. Dávid Ágnes: *Amilin fragmentek szintézise és oldategyensúlyi vizsgálata*, Hatvani István Szakkollégium hallgatói konferenciája, Debrecen, **2012.** 05. 03.
8. Dávid Ágnes: *Amilin fragmentek oldategyensúlyi vizsgálata*, XXX. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs, **2011.** 04. 27–29.
9. Dávid Ágnes: *Amilin fragmentek oldategyensúlyi vizsgálata*, Hatvani István Szakkollégium hallgatói konferenciája, Debrecen, **2011.** 04. 21.
10. Dávid Ágnes: *Amilin fragmentek oldategyensúlyi vizsgálata*, Tudományos Diákköri Konferencia, Debrecen, **2010.** 11. 25.
11. Kállay Cs., Dávid Á., Sóvágó I.: *Amilin fragmentek réz(II)ionokkal való kölcsönhatásának vizsgálata*, XLV. Komplexkémiái Kollokvium, Mátraháza, **2010.** 05. 26–28.

Az értekezés alapját képező poszterek (Posters related to the thesis)

1. Ágnes Dávid, Katalin Várnagy, Csilla Kállay, Daniele Sanna, Imre Sóvágó: *The anchoring ability of specific non-coordinating side chains in fragments of the rat and the human amylin*, 13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC13), Galway, Írország, **2015.** 06. 12-15.
2. Ágnes Dávid, Katalin Várnagy, Csilla Kállay, Daniele Sanna, Imre Sóvágó: *The anchoring ability of specific non-coordinating side chains in fragments of the rat and the human amylin*, XIII. International Symposium on Inorganic Biochemistry, Karpacz, Lengyelország, **2015.** 09. 1-6.

3. Agnes David, Katalin Varnagy, Csilla Kállay, Daniele Sanna and Imre Sovago: *Binding sites of rat amylin fragments*, International Symposium on Metal Complexes 2014 (ISMEC2014), Pavia, Olaszország, **2014.** június 8-12.
4. Ágnes Dávid, Katalin Várnagy, Csilla Kállay, Daniele Sanna and Imre Sóvágó: *Binding sites of rat amylin fragments*, 12th International Symposium on Inorganic Biochemistry, Wrocław, Lengyelország, **2013.** 08. 28 – 09. 01.
5. Ágnes Dávid, Csilla Kállay, Imre Sóvágó, Daniele Sanna: *Effect of side chains on the copper(II) complexes of rat amylin fragments*, 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Granada, Spanyolország, **2012.** 09. 12–17.
6. Csilla Kállay, Ágnes Dávid, Imre Sóvágó, Paolo De Bona, Giuseppe Pappalardo, Daniele Sanna and Enrico Rizzarelli: *Copper(II) complexes of rat amylin fragments*, 3rd International Symposium on Metallomics, Münster, Németország, **2011.** 06. 15–18.



Nyilvántartási szám: DEENK/160/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Dávid Ágnes
Neptun kód: F6R06R
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10038050

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idégen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **Dávid, Á.**, Kállay, C., Sanna, D., Lih, N., Sóvágó, I., Várnagy, K.: Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) complexes of rat amylin fragments. The anchoring ability of specific non-coordinating side chains.
Dalton Trans. 44 (39), 17091-17099, 2015. ISSN: 1477-9226.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C5DT02445E>
IF: 4.177
2. Kállay, C., **Dávid, Á.**, Timári, S., Nagy, E. M., Sanna, D., Garribba, E., Micera, G., De Bona, P., Pappalardo, G., Rizzarelli, E., Sóvágó, I.: Copper(II) complexes of rat amylin fragments.
Dalton Trans. 40 (38), 9711-9721, 2011. ISSN: 1477-9226.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c1dt10835b>
IF: 3.838

A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 8,015

A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,015

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, 2017.05.30.

