

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A réz-efflux szabályzó CueR fehérje fémkötő  
sajátságainak tanulmányozása modellpeptideken  
keresztül**

SZUNYOGH DÁNIEL MIHÁLY

**Témavezetők:**

Dr. JANCsó ATTILA

Egyetemi adjunktus

Dr. GYURCSIK BÉLA

Egyetemi docens



**Kémia Doktori Iskola  
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Szegedi Tudományegyetem**

**2016**

# 1. BEVEZETÉS

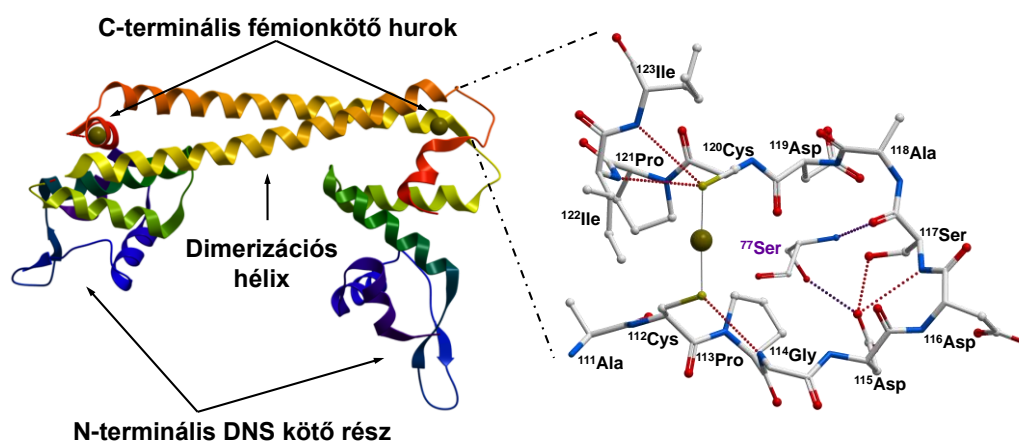
Az átmenetifémek, mint például a mangán, vas, kobalt, nikkel, réz, cink, molibdén ionjai a biológiai rendszerek nélkülözhetetlen alkotóelemei. Ezek a fémionok megtalálhatók a metalloenzimek aktív centrumaiban, katalitikus kofaktorként részt vesznek hidrolitikus, illetve reverzibilis oxidációs és redukációs reakciókban, valamint az elektron transzfer folyamatokban is. Koncentrációjuk szűk tartományon belül változhat, túlzott növekedése/csökkenése a sejtek károsodásához vezethet. Az optimális koncentráció fenntartása a fémion-felvétel, -raktározás és -efflux egyensúlyával érhető el.

A bioszervetlen kémia eszközeit alkalmazva megtervezhetjük és előállíthatjuk a fémion-háztartás működéséhez szükséges fehérjék és enzimek modellvegyületeit. Ezen vegyületek fémkomplexeinek oldatszerkezet-vizsgálata segítségünkre lehet abban, hogy megismerjük a fémionok és biomolekulák közötti kölcsönhatásokat, a fémionok fehérjék szerkezetére gyakorolt hatását, a fehérjék fémion-szelektivitását. Ezt a disszertációmban a  $\text{Cu}^+$ -ionok érzékelésében, valamint koncentrációjának szabályozásában szerepet játszó CueR fehérjék fémkötő részének peptidmodelljein keresztül mutatom be.

# 2. CÉLKITŰZÉS

A bakteriális sejtek fémion-háztartását olyan fehérjék (mint például az általunk választott MerR család tagjai) tartják fenn, amelyek mind a létfontosságú, mind a toxikus fémionok mennyiségét hivatottak szabályozni. Működésük a fémionok szelektív megkötésén alapul. Az ilyen regulátor fehérjék feladata például egyes fémionok redoxi átalakulásait katalizáló enzimek vagy a fémionok szállításában, tárolásában, kiürítésében részt vevő transzportfehérjék szintézise, amit akár transzkripció szinten is képesek befolyásolni.

A PhD munkám célja egy egyértékű  $d^{10}$  fémionokra ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ) szelektív transzkripció regulátor fehérje, a bakteriális CueR (*V. cholerae* és *E. coli* baktériumokból) fémion-kötő tulajdonságainak felderítése volt (1. ábra).



1. ábra A CueR regulátorfehérje, valamint a fémion-kötő régió szerkezete

Terveink között szerepelt, hogy a fémion-kötő doméneket a fehérjékből kiemelve megvizsgáljuk, hogy a peptidek szintjén is tapasztalunk-e fémion-szelektivitást. Ennek érdekében célul tűztük ki a fenti két CueR fehérje fémkötő szakaszát képező oligopeptidek előállítását.

O'Halloran és munkatársai kimutatták, hogy a CueR fehérje csak egyértékű, szoft karakterű fémionok megkötését követően mutat pozitív biológiai választ. Ezért célszerűnek találtuk az általunk előállított peptidek kétértékű fémionokkal ( $Zn^{2+}$ -,  $Cd^{2+}$ -, és  $Hg^{2+}$ -ionok) alkotott komplexeinek vizsgálatát, hogy kiderítsük, ezek a fémionok milyen erős kötést alakítanak ki, és hogyan befolyásolják a peptidek szerkezetét.

A MerR család tagjai között kétértékű fémionokat érzékelő fehérjék is megtalálhatók. Ilyenek például a  $Hg^{2+}$ -szelektív MerR, a  $Zn^{2+}$ -érzékeny ZntR, valamint a  $Cd^{2+}$ -szabályozó CadR fehérjék, melyeket a koordinációs szférában jelenlévő ciszteinek és hisztidinek oldalláncai tesznek lehetővé a fémionok szelektív megkötésére. Ezek alapján az is célunk volt, hogy feltárjuk, milyen hatása lehet a peptid fémkötő képességére, illetve a komplexek szerkezetére, ha szekvenciájába egy további potenciális donorcsoportot juttatunk. Ehhez a *V. cholerae* CueR fémkötő szakaszát képező peptid olyan variánsait terveztük meg, melyek az eredeti szekvenciához képest kevesebb prolin egységet, illetve egy hisztidint tartalmaznak. A prolinok számának csökkentésével a ligandum megváltozó flexibilitásának hatásáról terveztünk információt nyerni. A módosított peptidek vizsgálatának szükségességét egy friss tanulmány is igazolja, amely szerint az egyértékű fémionokra szelektív CueR fehérje is érzékennyé tehető kétértékű fémionokra, ha a fémkötő részt úgy módosítják, hogy a koordinációs szféra közelében további potenciális donorcsoportok jelennek meg.

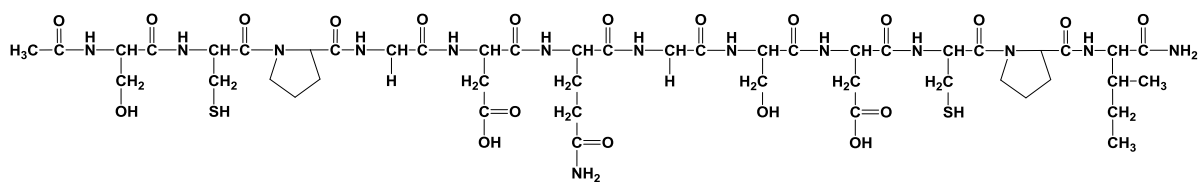
Hogy közelebb kerüljünk a fehérjében tapasztalt fémion-szelektivitás megértéséhez, vizsgálatokat terveztünk egy egyértékű  $d^{10}$  fémionnal ( $Ag^+$ ) is. A peptid-fémion rendszerek részletes vizsgálatától az reméltük, hogy elősegíthetik annak a kérdésnek az eldöntését is, hogy a fehérjék szelektivitása kizárólag a fémion megkötésének erősségén múlik, vagy más tényezők is hozzájárulnak a szelektív működéshez.

### **3. ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

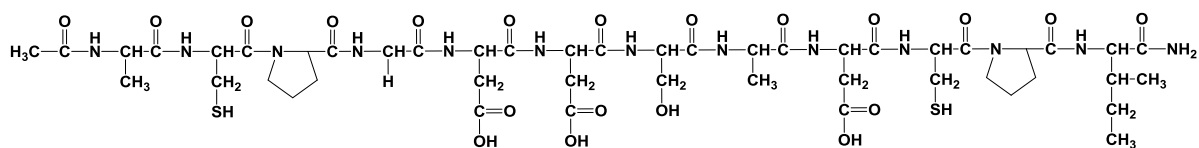
#### **A ligandumok előállítása**

Az N- és C-terminálisan is védett ligandumok előállítása szilárd fázisú peptidszintézissel történt. A dodekapeptideket HPLC-vel (High Performance Liquid Chromatography) tisztítottuk, majd ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry) alkalmazásával azonosítottuk.

Ac-SCPGDQGSDCPI-NH<sub>2</sub> (Ac-Ser-Cys-Pro-Gly-Asp-Gln-Gly-Ser-Asp-Cys-Pro-Ile-NH<sub>2</sub>)  
**(PP, *V. cholerae* baktérium CueR fehérjéjének fémkötő doménje):**



Ac-ACPGDDSDCPI-NH<sub>2</sub> (Ac-Ala-Cys-Pro-Gly-Asp-Asp-Ser-Ala-Asp-Cys-Pro-Ile-NH<sub>2</sub>)  
**(EC, *E. coli* baktérium CueR fehérjéjének fémkötő doménje):**



A módosítások során szintetizált ligandumok a **PS**: Ac-SCPGDQGSDCSI-NH<sub>2</sub>, amelyben a **PP** peptid C-terminális prolinját szerinre cseréltük, illetve a **HS** (Ac-SCHGDQGSDCSI-NH<sub>2</sub>), melyben további módosításként az eddigi két cisztein és két aszparaginsav mellé potenciális donorcsoportként egy hisztidint is beépítettünk a molekulába.

### Kísérleti módszerek

A ligandumok spektrumain megfigyelt <sup>1</sup>H rezonanciák hozzárendelését az egyes aminosavak hidrogénjeihez kétdimenziós módszerek, így <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (Correlation Spectroscopy), <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), valamint <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY (Rotating-frame Overhauser Spectroscopy) alkalmazásával végeztük.

A különböző peptid – fémion rendszerekben lejátszódó komplexképződési folyamatokat pH potenciometriás titrálásokkal követtük, továbbá a Zn<sup>2+</sup>- és Cd<sup>2+</sup>-ionok esetén a fémionok pH-függő speciációját, valamint a részecskék képződési állandóit is meghatároztuk a PSEQUAD program alkalmazásával.

A tiolátcsoportok fémion-koordinációját pH-függő UV spektrumsorozatok felvételével, és az elektrongerjesztési spektrumokon megjelenő S<sup>-</sup>-M<sup>n+</sup> töltésátviteli sávok (Ligand to Metal Charge Transfer, LMCT) tanulmányozásával követtük. (SR)CD (Synchrotron Radiation Circular Dichroism) spektrumok felvételével vizsgálni tudtuk, hogy az egyes fémionok kölcsönhatása a peptidekkel milyen pH-tartományban és milyen mértékben okoz változásokat a ligandumok konformációjában.

<sup>1</sup>H NMR és UV spektroszkópai vizsgálatokon túl a Hg<sup>2+</sup>-ionok koordinációs környezetéről megerősítő információt PAC (Perturbed Angular Correlation) spektroszkópia révén szereztünk.

## 4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Oldatszerkezet-vizsgálatok során bizonyítottuk, hogy ekvivalens mennyiségű  $Zn^{2+}$ - és  $Cd^{2+}$ -ionok jelenlétében a hisztidint nem tartalmazó peptidek stabilis komplexet képeznek a fémionokkal. Az egymástól hét aminosav egységre lévő ciszteinek a jelentős távolság ellenére is képesek kötődni ugyanazon fémionhoz, amely a tiolcsoportok meghatározó szerepét mutatja a potenciális donorcsoportok között.

1.1.  $Zn^{2+}$ - és  $Cd^{2+}$ -ionok 1:1 fémion:ligandum arány esetén hasonló szerkezetű ML törzskomplexeket képeznek a **PP**, **PS** és **EC** peptidekkel. A pH-potenciometriás, UV-, és NMR spektroszkópiai vizsgálatok alapján a tiolcsoportok fémion indukálta deprotonálódása minden esetben több pH egységgel alacsonyabban történt, mint amit a szabad ligandumoknál tapasztaltunk.

1.2. Az  $^1H$  NMR mérések során a peptidek Asp alegységeihez tartozó  $C_{\beta}H_2$  jelek változása alapján kijelenthető, hogy a  $Zn^{2+}$ - és  $Cd^{2+}$ -ionok kötésében semleges pH felett az Asp karboxilátcsoportok is részt vesznek. A fémion koordinációs szféráját mindkét fémion esetén  $H_2O/COO^-$  egészíti ki. pH-potenciometriás és UV spektroszkópiai eredmények alapján lúgos körülmények között mindkét fémion törzskomplexében egy koordinálódó vízmolekula deprotonálódik, amelyet követően az uralkodó részecske az  $M(OH)L$  összetételű komplex. A  $ZnL$  részecske hidrolízise már pH  $\sim 8$ -tól megkezdődik, ellentétben a  $CdL$  komplex deprotonálódásával, amely  $\sim 1,5$  pH egységgel magasabban indul. A különbség oka feltehetőleg a  $Zn^{2+}$ -ion erősebb Lewis-sav karaktere, összevetve a  $Cd^{2+}$ -ionéval, s így jelentősebb affinitása a hidroxidionokhoz.

1.3. Az (SR)CD spektroszkópiai mérések során a  $Zn^{2+}$ - és  $Cd^{2+}$ -ionok monokomplexeiben nagyon hasonló konformáció-eloszlást tapasztaltunk. Mindkét fémion esetén a ligandum konformációja összességében véletlenszerűnek tekinthető.  $^1H$  NMR mérések során a ligandumok  $^1H$  rezonanciáin általánosan megfigyelhető vonalkiszélesedés alapján a ligandum konformációi közötti csere sebessége a közepesen gyors/lassú tartományba esik az NMR időskálájához viszonyítva. Ezek alapján elmondható, hogy a stabilis komplexek kialakulása mellett is megmarad a ligandum flexibilitása.

**2. A hisztidint nem tartalmazó peptidek ekvimoláris mennyiségű  $\text{Hg}^{2+}$ -iont tartalmazó rendszerében egyetlen domináns részecske képződését tapasztaltuk a vizsgált pH tartományban (pH = 3-11). Ezekben a komplexekben a peptidek egy hurkot formálva kötődnek a fémionhoz a Cys aminosavak tiolátcsoportjain keresztül. [1]**

**2.1.** Ligandum kiszorítási módszert alkalmazva meghatároztuk pH = 2,0-nál a **PS** ligandum  $\text{Hg}^{2+}$ -kötésére vonatkozó látszólagos stabilitási állandóját. Ez  $\lg K' = 25,7$ -nek adódott, amely a  $\text{Hg}^{2+}$ -ion rendkívüli affinitását mutatja az általunk vizsgált Cys-tartalmú peptidekhez. Ez az érték több nagyságrenddel nagyobb a  $\text{Zn}^{2+}$ - és  $\text{Cd}^{2+}$ -ionok koordinációs affinitásához képest. A HgL komplexben a ligandumnak több olyan konformációs állapota is lehet, amelyek közötti átmenet az NMR időskálájához képest közepesen gyors/lassú időtartományba esik. Ez az oka annak, hogy a ligandum számos jelén kémiai eltolódás-változást ugyan nem, azonban kismértékű szélesedést tapasztaltunk a fémion jelenlétében az NMR spektrumokon.

**2.2.** UV-, és  $^1\text{H}$  NMR spektroszkópiai mérésekkel bizonyítottuk, hogy a vizsgált pH tartományban (pH = 3-11) kizárólag  $\{2 \times \text{S}^-\}$  típusú kötés alakul ki a  $\text{Hg}^{2+}$ -ionok körül. A  $\text{Zn}^{2+}$  és  $\text{Cd}^{2+}$ -ionoknál tapasztaltakkal ellentétben az Asp egységek deprotonálódásával párhuzamosan bekövetkező kémiai eltolódás változás nagyon hasonló a szabad ligandumoknál tapasztaltakhoz, s ennek alapján a karboxilátcsoport koordinációban való részvétele kizárható. A két donorcsoport koordinációját perturbált szögkorrelációs spektroszkópiával (PAC) is bizonyítottuk.

**3. A peptideket (PP, PS, EC) feleslegben alkalmazva a  $\text{Cd}^{2+}$ - és  $\text{Zn}^{2+}$ -ionok jelenlétében jelentős mennyiségű  $\text{ML}_2$  bisz-törzskomplexek keletkeznek, melyekben a két ligandum  $\{4 \times \text{S}^-\}$  típusú koordinációval kötődik a fémionokhoz.  $\text{Hg}^{2+}$ -ionnal biszkomplexek képződését nem tapasztaltuk.**

**3.1.** A fémionokhoz képest két ekvivalens ligandumot alkalmazva pH  $\sim$  6-ig az 1:1 fémion:ligandum arányhoz hasonlóan a monokomplexek uralkodnak. pH > 6 tartományban azonban,  $\text{Zn}^{2+}$ - és  $\text{Cd}^{2+}$ -ionok jelenlétében egyaránt, biszkomplexek is képződnek. Az  $\text{ML}_2$  komplexek stabilitási állandóiból ( $\text{ZnL}_2$ :  $\lg \beta = 14,5-15,0$ , illetve  $\text{CdL}_2$ :  $\lg \beta = 17,6-18,2$  tartományok) a második ligandum koordinálódását jellemző állandók ( $\text{Zn}^{2+}$ :  $\lg K_2 = 3,70-4,70$  illetve  $\text{Cd}^{2+}$ :  $\lg K_2 = 5,30-6,21$  tartomány) értékei jelentősen elmaradnak a monokomplexekben tapasztalt stabilitástól ( $\text{ZnL}$ :  $\lg \beta = 9,80-10,60$ , illetve  $\text{CdL}_2$ :  $\lg \beta = 11,60-12,24$  tartományok).

Ennek egyrészt az az oka, hogy a peptidek mérete miatt nem kedvezményezett egy újabb ligandum kötődése a fémionokhoz. Továbbá lúgos körülmények között a teljesen deprotonált peptidek 4-5 negatív töltésűek, ami szintén gátolhatja a stabilis biszkomplexek kialakulását.

**3.2.**  $^1\text{H}$  NMR spektroszkópiai és pH-potenciometriás vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy míg a  $\text{CdL}_2$  részecske nagy mennyiségben van jelen pH = 9 felett is, addig a  $\text{ZnL}_2$  komplex bázikus körülmények között az 1:1 fémion:ligandum aránynál tapasztalt  $\text{ZnH}_{-1}\text{L}$  részecskévé és szabad ligandummá disszociál. A  $\text{Cd}^{2+}$ -ion szoftabb karaktere, illetve a  $\text{Zn}^{2+}$ -ion erősebb Lewis savassága okozhatja azt, hogy lúgos körülmények között (pH = 8 felett) a biszkomplexekre jellemző  $\{4 \times \text{S}^-\}$  típusú koordinációból a hidroxidionok fokozatosan kiszorítják ki a második ligandum tiolátcsoportjait a  $\text{Zn}^{2+}$ -ion koordinációs környezetéből.

**3.3.**  $\text{Zn}^{2+}$ -, és  $\text{Cd}^{2+}$ -ionokkal ellentétben  $\text{Hg}^{2+}$ -ionok jelenlétében még pH > 9 felett sem képződik  $\text{HgL}_2$  biszkomplex. UV-spektroszkópiai mérések alapján a vizsgált pH tartományban (pH = 3-11) a ligandumok 50%-a kötődik a fémionhoz  $\{2 \times \text{S}^-\}$  típusú koordinációval, majd a szabad peptidekhez hasonlóan a ligandum feleslege lúgos körülmények között fémion-koordináció nélkül deprotonálódik. Ennek oka a ligandum méretén és a negatív töltései közötti taszításon túl abban keresendő, hogy a  $\text{Hg}^{2+}$ -ionok kiemelkedő preferenciát mutatnak a kettes koordinációs számú környezet iránt, ellentétben a  $\text{Zn}^{2+}$ -, és  $\text{Cd}^{2+}$ -ionok számára kedvezményezett négyes koordinációs számmal. [1]

**3.4.**  $^{199\text{m}}\text{Hg}$  PAC mérésekkel szintén bizonyítottuk, hogy ligandumfelesleg jelenlétében az alkalmazott pH-tól függetlenül az 1:1  $\text{Hg}^{2+}$ :ligandum összetételű rendszerrel megegyező komplex képződik. A Cys egységek tiolátcsoportjain kívül egyéb donorcsoport nem vesz részt a koordinációban.  $^1\text{H}$  NMR mérések alapján a  $\text{HgL}$  monokomplex és a szabad ligandum közötti ligandumcsere a savas pH tartományban (pH = 2-6) lassú/közepes cseresebbségről a szabad peptid tiolcsoportjainak deprotonálódásával párhuzamosan (pH = 7-11) a közepes/gyors cseresebbség felé változik az NMR időskálájához viszonyítva. [1]

**4. Oldatszerkezet-vizsgálatokkal bizonyítottuk, hogy a HS peptid imidazol-oldallánca részt vesz a  $\text{Zn}^{2+}$ -, és  $\text{Cd}^{2+}$ -ionok megkötésében, azonban ez csak a  $\text{Zn}^{2+}$ -HS komplexekben jár kismértékű stabilitás-növekedéssel. A  $\text{Hg}^{2+}$ -ionok jelenlétében nem tapasztaltuk a hisztidin részvételét a koordinációban. [2,3]**

**4.1.**  $^1\text{H}$  NMR és pH-potenciometriás eredményeink igazolják, hogy  $\text{Zn}^{2+}$ - és  $\text{Cd}^{2+}$ -**HS** komplexekben a hisztidin koordinál a fémionokhoz. Míg a  $\text{ZnHL}$  részecskéből (pH ~ 5,5) többféle izomer lehet jelen, melyekben vagy a két Cys tiolátcsoportja, vagy egy Cys tiolát-, és egy His imidazolcsoport kötődik a fémionhoz, addig a  $\text{CdHL}$  komplexben a hisztidin nem kötődik a fémionhoz. Az ML törzskomplexekben a koordinációs környezet azonban már mindkét fémion esetében  $\{2 \times \text{S}^-, \text{N}_{\text{im}}, \text{X}\}$  típusú, amelyben X vagy egy Asp karboxilátcsoportot vagy egy koordinálódó víz molekulát jelöl.

**4.2.** A hisztidin oldallánc koordinációjának érdekes módon csak a  $\text{Zn}^{2+}$ -komplexek stabilitására van számottevő hatása, ami a két fémion eltérő donorcsoport preferenciájával magyarázható. A  $\text{Zn}^{2+}$ - és  $\text{Cd}^{2+}$ -ionok **HS** peptiddel alkotott monokomplexeinek hidrolízise a His egységet nem tartalmazó peptidek törzskomplexeihez képest alacsonyabb pH-n kezdődik. A His imidazolcsoportjának koordinációja tehát növeli a fémcentrumok Lewis-sav karakterét.

**4.3.** A **HS** ligandum  $\text{Hg}^{2+}$ -ionok jelenlétében mért  $^1\text{H}$  NMR spektrumain a His aminosavhoz tartozó  $\text{C}_\beta\text{H}_2$ , valamint  $\text{C}_{\epsilon 1}\text{H}$  és  $\text{C}_{\delta 2}\text{H}$  rezonanciák a szabad **HS** ligandum azonos rezonanciáihoz nagyon hasonló kémiai eltolódás értékeknél jelentkeznek, melynek alapján a hisztidinek nem vesznek részt a  $\text{Hg}^{2+}$  ionok koordinációjában. A fémion koordinációs környezete a hisztidint nem tartalmazó peptidekhez hasonlóan  $\{2 \times \text{S}^-\}$  típusú.

**5. A  $\text{Zn}^{2+}$ - és  $\text{Cd}^{2+}$ -ionok a **HS** peptiddel olyan biszkomplexeket is képeznek, melyekben a hisztidinek imidazolcsoportjai is részt vesznek a fémionok koordinációjában.  $\text{Hg}^{2+}$ -ionokkal – a hisztidint nem tartalmazó peptidekhez hasonlóan – biszkomplexeik nem képződnek. [2,3]**

**5.1.**  $\text{Zn}^{2+}$ -ionok jelenlétében  $^1\text{H}$  NMR spektroszkópiai mérésekkel sikeresen bizonyítottuk, hogy a pH = 7-10 tartományban biszkomplexeik is képződnek. pH = 8-nál 0,5:1 fémion:ligandum arány mellett három széles, de egymástól elkülönülő His  $\text{C}_{\epsilon 1}\text{H}$  és  $\text{C}_{\delta 2}\text{H}$  rezonancia látható. Ezek a jelek három egymástól eltérő kémiai környezetben lévő hisztidinhez rendelhetők, melyek között lassú ligandumcsere van. A pH = 8-nál képződő  $\text{ZnHL}_2$  és  $\text{ZnL}_2$  biszkomplexeikben tehát a két ligandum His egységei közül valamelyik biztosan részt vesz a fémion kötésében.



**5.2.**  $^1\text{H}$  NMR-, és UV spektroszkópiával bizonyítottuk, hogy lúgos pH-n ( $\text{pH} > 9,5$ ) a  $\text{Zn}^{2+}$ -HS rendszerben jelen levő biszkomplexek a hisztidint nem tartalmazó biszkomplexekhez hasonlóan  $\text{ZnH}_1\text{L}$  részecskére és szabad ligandumra disszociálnak.

**5.3.** UV-spektroszkópiai eredmények alapján a  $\text{Cd}^{2+}$ :HS 0,5:1 rendszerben a tiolcsoportok deprotonálódása két lépesben történik meg.  $\text{pH} = 4,5$ - $6,5$  tartományban a tiolcsoportok  $\sim 50\%$ -a deprotonálódik, azaz a  $\text{pH} = 7$ -nál uralkodó  $\text{CdH}_2\text{L}_2$  komplexben a tiolcsoportok jelentős hányada még protonált formában van. A  $\text{CdL}_2$  komplex képződésével párhuzamosan tapasztalható abszorbancia-növekedés alapján a  $\text{pH} \sim 8$  felett képződő törzskomplexre jellemző koordinációs mód  $\{4 \times \text{S}^-\}$  típusú.

**5.4.** A  $\text{CdH}_2\text{L}_2$  részecske képződési tartományában felvett  $^1\text{H}$  NMR spektrumokon a His aminosav  $\text{C}_{\varepsilon_1}\text{H}$  és  $\text{C}_{\delta_2}\text{H}$  jelei a szabad HS jeleihez képest a nagyobb ppm értékek felé tolódtak el, ugyanakkor a kémiai eltolódások nagyon hasonlóak az 1:1 fémion:ligandum arány mellett mért értékekhez. Ennek alapján a  $\text{CdH}_2\text{L}_2$  komplexben  $\{2 \times \text{S}^-, 2 \times \text{N}_{\text{im}}\}$  típusú koordinációs mód javasolható. A  $\text{CdL}_2$  részecske képződésével párhuzamosan a  $\text{pH} \sim 7,5$ - $9,5$  tartományban az  $^1\text{H}$  NMR spektrumokon a hisztidinhez tartozó jelek a szabad ligandum His  $\text{C}_{\varepsilon_1}\text{H}$  és  $\text{C}_{\delta_2}\text{H}$  jeleire jellemző kémiai eltolódások felé közelednek. Ezek alapján ligandum két újabb Cys oldallánci tiolátcsoportjának koordinálódásával a His imidazolcsoportok kiszorulnak a fémion környezetéből, kialakítva  $\{4 \times \text{S}^-\}$  típusú koordinációt.

## **6. Szerkezetvizsgáló módszerekkel igazoltuk, hogy a ligandum(ok)hoz képest két ekvivalens $\text{Hg}^{2+}$ -ion jelenlétében többmagvú komplexek is képződnek.**

**6.1.** A fémionfelesleg mellett mért NMR spektrumok jelentősen eltérnek az 1:1 aránynál mértektől, ami a  $\text{HgL}$  komplextől eltérő összetételű részecskék jelenlétét jelzi. Ezt az (SR)CD spektroszkópiai vizsgálatok eredményei is tükrözik, ugyanis a  $\text{Hg}^{2+}$ :ligandum 2:1 arányú rendszerekben mért spektrumok alapján megváltozik a ligandumok konformációja az 1:1 fémion:ligandum arányhoz képest.

**6.2.** PAC spektroszkópiai eredmények alapján savas pH-n ( $\text{pH} < 7$ ) egy olyan szerkezetű komplex javasolható, amelyben a peptidok két tiolátcsoportja hidligandumként köti össze a két  $\text{Hg}^{2+}$ -centrumot. Lúgos körülmények között ( $\text{pH} > 9$ ) pedig a szeparált  $\text{Hg}^{2+}$ -centrumokhoz 1-1 tiolátcsoport és 1-1 hidroxidion koordinálódik.

A lúgos oldatokban ( $\text{pH} > 11$ ) 2:1  $\text{Hg}^{2+}$ :ligandum arány mellett felvett SR(CD) spektrumok időbeli változása alapján a 2:1 összetételű komplexből az egyik fémion lassan hidrolízis termék képződése közben távozik, s így kialakul az 1:1 aránynál is tapasztalt  $\{2 \times \text{S}^-\}$  koordinációjú monokomplex.

**7. PP és EC peptidek  $\text{Ag}^+$ -komplexeit is tanulmányoztuk. Oldatszerkezet-vizsgálatok alapján a ligandumok Cys tiolcsoportjainak egy része már savas körülmények között ( $\text{pH} < 2$ ) kötődik a fémionhoz. Semleges pH-tartományban újabb deprotonálódás történik.  $\text{pH} = 6$  alatt azonban a tiolcsoport protonált formában történő koordinálódása is lehetséges. [1]**

**7.1.** UV-spektroszkópiai mérések alapján a vizsgált dodekapeptidek már  $\text{pH} = 2,0$  alatt kötődnek az  $\text{Ag}^+$ -ionhoz, a  $\text{Hg}^{2+}$ -peptid rendszerekhez hasonlóan. Semleges pH tartományban ( $\text{pH} = 6-8$  között) abszorbancia-növekedés figyelhető meg az 1:1 fémion:ligandum arányú rendszerben. Ezzel párhuzamosan a pH-függő CD spektrumokon az ellipticitás értékek növekednek, ami jelentős konformáció-változásra utal.  $\lambda = 218$  nm-nél egy izodikroikus pont is megfigyelhető, amely két egymással egyensúlyban lévő részecske jelenlétét jelzi.

**7.2.** Az  $\text{Ag}^+$ -PP 1:1 rendszer pH-potenciometriás titrálási görbéjén a  $\text{pH} = 5,5$ -ig történő 3 ekvivalens lúgfogyás arra utal, hogy ezen pH-ig a két karboxilcsoport mellett az egyik Cys tiolcsoport deprotonálódása is lejátszódik.  $\text{pH} \sim 5,5-7$  tartományban a titrálási görbén egy újabb lépcső látható, amely minden valószínűség szerint a második tiolcsoport deprotonálódásának és  $\text{Ag}^+$ -koordinációjának következménye. A folyamat az UV-, és CD titrálásoknál megfigyelt változáshoz hasonlóan  $\text{p}K_s \sim 6,5$  értékkel jellemezhető. Ez az érték az általunk vizsgált fémionok között egyedi az egyértékű fémionra.

**7.3.** Az  $\text{Ag}^+$ -PP 1:1 rendszerben  $\text{pH} = 6$ -nál mért  $^1\text{H}$  NMR spektrumon a Cys  $\text{C}_\beta\text{H}_2$  hidrogénekhez rendelhető rezonanciák a szabad ligandumra jellemző kémiai eltolódás értékeknél, valamint ehhez képest az alacsonyabb terek irányába eltolódva is jelentkeznek. Ezek alapján savas pH tartományban ( $\text{pH} = 2-6$ ) a ligandum tiolcsoportjainak csak egy része kötődik a fémionhoz, a többi még protonált formában van. A pH növelésével ( $\text{pH} = 6-11$  tartományban) a második tiolcsoport deprotonálódásával párhuzamosan a szabad és kötött Cys  $\text{C}_\beta\text{H}_2$ -hoz rendelhető jelek koaleszcenciáját tapasztaltuk.

**7.4.** Az oldatszerkezet-vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a vizsgált peptidek két tiolcsoportjának affinitása az  $\text{Ag}^+$ -ionhoz szignifikánsan különbözik, szemben a kétértékű fémionoknál tapasztaltakkal. Míg a  $\text{Hg}^{2+}$ -ionokra jellemző  $\{2 \times \text{S}^-\}$  típusú koordináció csak a fiziológias pH-tartomány felett válik uralkodóvá, addig semleges pH alatt az egyik deprotonálódott tiolcsoport mellett a másik cisztein oldallánc protonált formában való koordinációja is lehetséges. Kvantumkémiai számítások alapján egy protonált cisztein oldallánc kötődése az egyértékű fémionokhoz a CueR fehérjében is javasolható. Megjelenésével a másik monomer egység  $^{77}\text{Ser}$  alegységét közelebb húzza a fémion-kötő doménhez, amely olyan szerkezeti változásokat indukálhat a fehérjében, amely kulcsfontosságú lehet a fémion-szelektivitás kialakulásában, s így az egyértékű fémionok érzékelésében.

## 5. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: 10034748

### *Az értekezéshez kapcsolódó tudományos közlemények*

- [1] **D. Szunyogh**, H. Szokolai, P. W. Thulstrup, F.H. Larsen, B. Gyurcsik, N. J. Christensen, M. Stachura, L. Hemmingsen, A. Jancsó: Specificity of the Metalloregulator CueR for Monovalent Metal Ions: Possible functional Role of a Coordinated Thiol?  
*Angewandte Chemie International Edition*, **54**, 15756-15761, 2015.  
**DOI:** 10.1002/anie.201508555  
IF = 11,261
- [2] **D. Szunyogh**, B. Gyurcsik, F.H. Larsen, M. Stachura, P.W. Thulstrup, L. Hemmingsen, A. Jancsó: Zn(II) and Hg(II) binding to a designed peptide that accommodates different coordination geometries.  
*Dalton Transactions*, **44**, 12576-12588, 2015.  
**DOI:** 10.1039/C5DT00945F  
IF = 4,197
- [3] A. Jancsó, **D. Szunyogh**, F.H. Larsen, P.W. Thulstrup, N.J.Christensen, B. Gyurcsik and L. Hemmingsen: Towards the role of metal ions in the structural variability of proteins: Cd(II) speciation of a metalion binding loop motif.  
*Metallomics*, **3**, 1331-1339, 2011.  
**DOI:** 10.1039/C1MT00138H  
IF = 3,585

$\Sigma$ IF = 19,043

### *Az értekezés témaköréhez szorosan nem kapcsolódó közlemények*

- [4] Gottberg, M. Stachura, M. Kowalska, M. L. Bissell, V. Arcisauskaite, K. Blaum, A. Helmke, K. Johnston, K. Kreim, F. H. Larsen, R. Neugart, G. Neyens, **D. Szunyogh**, P. W. Thulstrup, D. T. Yordanov, L. Hemmingsen: Billion Time Enhanced Sensitivity of NMR Spectroscopy for Magnesium Ions in Solution  
*ChemphysChem*, **15**, 3929-3932, 2014.  
IF = 3,419
- [5] D. Árus, A. Jancsó, **D. Szunyogh**, F. Matyuska, N. V. Nagy, E. Hoffmann, T. Körtvélyesi, T. Gajda: On the possible roles of N-terminal His-rich domains of Cu,Zn SODs of some Gram-negative bacteria.  
*Journal of Inorganic Biochemistry*, **106**, 10-18, 2012.  
IF = 3,444

$\Sigma\Sigma$ IF = 25,906

### *Nemzetközi konferencia részvétel (szerző/társszerző)*

1. A. Jancsó, B. Gyurcsik, **D. Szunyogh**, A. Angyal, L. Hemmingsen: Mercury(II)- interaction of dodecapeptides designed for the sequestering of toxic metal ions.  
*10<sup>th</sup> European Biological Inorganic Chemistry Conference*, Thessaloniki, Greece, 22-26<sup>th</sup> June, 2010.
2. L. Hemmingsen, A. Jancsó, **D. Szunyogh**, F.H. Larsen, P.W. Thulstrup, N.J. Christensen, B. Gyurcsik: Metal Ion Controlled Polymorphism of a Peptide.  
*3<sup>rd</sup> International Symposium on Metallomics*, Münster, Germany, 15-18<sup>th</sup> June, 2011.
3. A. Jancsó, B. Gyurcsik, **D. Szunyogh**, A. Angyal, L. Szekeres, L. Hemmingsen, F.H. Larsen, P.W. Thulstrup, N.J. Christensen: Cadmium(II) and mercury(II) binding of cysteine containing oligopeptides designed for the sequestering of toxic metal ions.  
*4<sup>th</sup> European Conference on Chemistry for Life Sciences (4<sup>th</sup> ECCLS)*, Budapest, Hungary, August 31- September 3, 2011.
4. A. Jancsó, **D. Szunyogh**, A. Cserkó, Cserkó, B. Gyurcsik, L. Hemmingsen, P.W. Thulstrup, F.H. Larsen: Capture and bioaccumulation of toxic metal ions by oligopeptides inspired by the metal binding loop of CueR metalloregulatory proteins.  
*5<sup>th</sup> International IMBG Meeting on Metal Homeostasis*, Autrans, France September 17-21<sup>th</sup>, 2012.
5. H. Szokolai, **D. Szunyogh**, L. Rózsahégyi, A. Jancsó, B. Gyurcsik, L. Hemmingsen, P. W. Thulstrup, F. H. Larsen: Metal ion binding study of a dodecamer peptide representing the effector binding loop of a metalloregulatory protein.  
*REGIONAL CONFERENCE "Heavy metal as contaminants of the environments"* Timisoara, Romania, 17<sup>th</sup> May, 2013.
6. **D. Szunyogh**, A. Jancsó, H. Szokolai, L. Rózsahégyi, B. Gyurcsik, L. Hemmingsen, P.W. Thulstrup, F.H. Larsen: Interaction of d<sup>10</sup> metal ions with a 12-mer peptide comprising the metal binding domain of a CueR metalloregulatory protein  
*5<sup>th</sup> European Conference on Chemistry for Life Sciences (5<sup>th</sup> ECCLS)*, Barcelona, Spain, 10-12<sup>th</sup>, June, 2013.
7. A. Jancsó, H. Szokolai, L. Rózsahégyi, **D. Szunyogh**, L. Hemmingsen, P.W. Thulstrup, F. H. Larsen: Metal ion interaction of an oligopeptide fragment representing the regulatory metal binding site of a CueR protein  
*International Conference on BioInorganic Chemistry (16<sup>th</sup> ICBIC)*, Grenoble, Spain, 22-26<sup>th</sup>, July, 2013.
8. **D. Szunyogh**, A. Jancsó, B. Gyurcsik, L. Hemmingsen, P. W. Thulstrup, F. H. Larsen: Metal ion induced structural diversity of the metal binding domain from E. Coli CueR regulatory protein  
*12<sup>th</sup> European Biological Inorganic Chemistry Conference (12<sup>th</sup> EUROBIC)*, Zürich, Switzerland, 24-28<sup>th</sup>, August, 2014.

9. **D. Szunyogh**, A. Jancsó, B. Gyurcsik: SRCD studies on metal ion binding of oligopeptides  
*Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy at the Physikzentrum Bad Honnef*,  
Bad Honnef, Germany, 17-20<sup>th</sup>, May, 2015.

#### **Hazai konferencia részvétel (szerző/társszerző)**

1. Jancsó A., Gyurcsik B., **Szunyogh D.**, Angyal A., Hemmingsen L.: Toxikus fémionok eltávolítására tervezett dodekapeptidek higany(II)ionokkal való kölcsönhatása  
*XLV. Komplexkémiai Kollokvium*, május 26-28, Mátraháza, 2010.
2. Jancsó A., Gyurcsik B., **Szunyogh D.**, Angyal A., Szekeres L., Hemmingsen L., Larsen F.:  
Kadmium(II)- és higany(II)ionok kölcsönhatása toxikus fémionok megkötésére tervezett oligopeptidekkel  
*MKE 1. Nemzeti Konferencia*, május 22-25, Sopron, 2011.
3. Jancsó A., Gyurcsik B., **Szunyogh D.**, Angyal A.:Toxikus fémionok hatékony megkötése oligopeptidekkel  
*Az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíjas szegedi kutatók és az Információs Társadalom jogi alprogram kutatóinak tudományos konferenciája*, december 9, Szeged, 2011.
4. **Szunyogh D.**, Cserkó A., Gyurcsik B., Jancsó A.:Toxikus fémionok eltávolítására felkészített baktériumok előállítása, valamint fémion toleranciájuk vizsgálata  
*XLVI. Komplexkémiai Kollokvium*, május 21-23, Mátrafüred, 2012.
5. Jancsó A., Gyurcsik B., **Szunyogh D.**, Hemmingsen L., Thulstrup P. W., Larsen F. H., Christensen N. J.: Oligopeptide sequences of the metal binding domain of CueR metalloregulatory proteins as candidates for toxic metal-ion capture.  
*The International Symposium on Analytical and Environmental Problems, with Special Emphasis on Heavy Metal Ions as Contaminants*, Szeged, Hungary, 24<sup>th</sup> September, 2012.
6. **Szunyogh D.**, Jancsó A., Gyurcsik B., Thulstrup P.W., Hemmingsen L.: A CueR fehérje fémkötő helyét modellező peptidek kölcsönhatása egy-, és kétértékű átmeneti fémionokkal  
*XLIX. Komplex Kémiai Kollokvium*, május 26-28. Siófok, 2015.