



**SZEGEDI
TUDOMÁNYEGYETEM**

Kémia Doktori Iskola



**UNIVERSITÉ GRENOBLE
ALPES**

**École Doctoral Chimie et Science
du Vivant**

**A Wilson betegség kezelésére potenciálisan alkalmazható
Cu(I)-kötő peptidek**

Doktori Értekezés Tézisei

Mesterházy Edit Éva

TÉMAVEZETŐK

Dr. Jancsó Attila

Egyetemi adjunktus

Dr. Pascale Delangle

Principal Investigator

Szeged & Grenoble

2018

I. Bevezetés

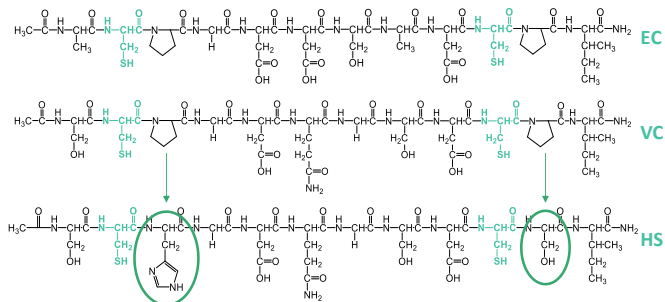
A réz, mint létfontosságú nyomelem számos biológiai folyamatban vesz részt. Ilyen a légzés, a vas-háztartás, az oxidatív stressz elleni védelem vagy a pigment képződés. Azonban, ha a réz feleslegbe kerül, ő maga is képes oxidatív károk okozására. Ezért sejten belüli koncentrációja szigorú szabályozás alatt áll. A Menkes és a Wilson betegségek genetikai elváltozások, melyek a szervezet réz-háztartásának felborulásához vezetnek és rézhiány ill., -felhalmozódás alakul ki. A Wilson betegség kelát-terápiával kezelhető, azonban a jelenleg alkalmazott gyógyszerek számos súlyos mellékhatást váltanak ki.

Pascale Delangle és kutatócsoportjának célja olyan új peptid vagy tripodális ligandumok kifejlesztése, melyek egyrészt nagy affinitást mutatnak a sejten belüli Cu(I) ionok iránt, másrészt célzottan a májsejtekbe képesek felszívódni. Mivel ezek a célzott anyagok csak a kívánt helyen válnának aktívvá, így csökkenhet a mellékhatások kockázata.

II. Célkitűzés

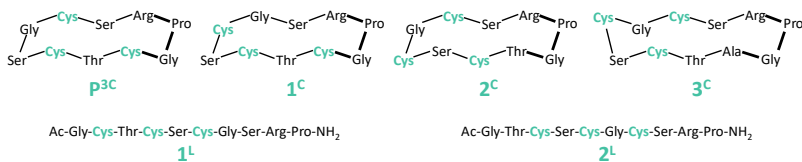
Doktori munkám céljaként új, peptid típusú, cisztein tartalmú ligandumok tervezését, valamint előállítását és Cu(I) ionokkal való kölcsönhatásának vizsgálatát tűztük ki célul annak érdekében, hogy kiderüljön, a megtervezett és vizsgált vegyületek megfelelő kelátorok lennének-e a Wilson betegség kezelésére. Egyes esetekben a peptidek Hg(II) és Zn(II) ionokkal való kölcsönhatását is tanulmányoztuk, mert a Hg(II) hasonló koordinációs kémiai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a Cu(I) és emiatt gyakorta használják az oxidációra érzékeny Cu(I) helyett próbaionként, illetve a Zn(II) ion a szervezetben nagy mennyiségben fordul elő és így a Cu(I) potenciális vetélytársa lehet.

A peptideket három különböző stratégia alapján terveztük meg. Az első csoport ligandumaiban a bakteriális rézháztartás-szabályozó CueR fehérje nagyfokú érzékenységét és szelektivitását igyekeztünk kihasználni. Ennek érdekében a fehérje két ciszteint tartalmazó fémkötő szakaszát modellező peptideket állítottunk elő (1. ábra).



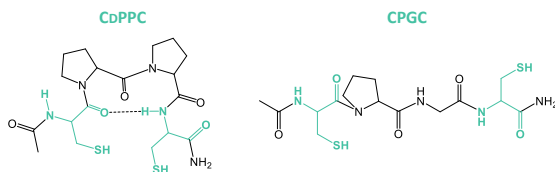
1 ábra A CueR modell peptidek sematikus szerkezete

A következő megközelítésben három ciszteint tartalmazó lineáris és ciklikus peptidek (2. ábra) segítségével próbáltuk egyesíteni a Delangle csoportban korábban tanulmányozott ligandumok kedvező tulajdonságait, azaz a tripodális ligandumok nagy Cu(I) affinitását, illetve a peptid kelátorok azon tulajdonságát, hogy glikokonjugátumaikat a májsejtek nagyobb hatékonysággal képesek felvenni.



2 ábra A három ciszteint tartalmazó peptidek sematikus ábrázolása.

Végül, a peptid szerkezetének nagyfokú preorganizációjából fakadó előnyöket terveztük kihasználni egy merev tetrapeptid segítségével, melyben két ciszteint egy turn motívum köt össze (CdPPC). Összehasonlításképp egy kevésbé merev vázú peptiddel végeztünk vizsgálatokat (CPGC) (3. ábra).



3 ábra A β turn motívumot tartalmazó peptidok sematikus szerkezete. A szaggatott vonal a CdPPC peptidben kialakuló H-kötést jelzi.

A peptidok fémionokkal való kölcsönhatását UV-látható, CD és NMR spektroszkópiával, valamint ESI-MS segítségével vizsgáltuk. A peptid-fémion komplexek stabilitását minden esetben az adott fémiont hatékonyan kötő, jól ismert ligandummal végrehajtott kiszorításos reakcióval határoztuk meg.

III. Kísérleti módszerek

A terminálisan védett lineáris peptidokat szilárd fázisú peptidszintézissel állítottuk elő az Fmoc stratégiát követve. A ciklikus peptidok előállítása során először hasonló módon lineáris prekursorokat szintetizáltunk, melyeket a gyantáról való hasítás után híg oldatban, standard kapcsolószerek jelenlétében ciklizáltunk. A nyers termékeket fordított fázisú HPLC-vel tisztítottuk, majd tisztaságukat analitikai HPLC-vel és ESI-MS segítségével ellenőriztük.

Mivel mind a cisztein tiolszoptjai, mind a Cu(I) ion oxidációra érzékeny, a minták előkészítése és további kezelése inert atmoszférában, egy gloveboxban történt. A kísérletek többségét pufferezt közegben, 7,4-es pH-n hajtottuk végre. A különböző vizsgálati módszerek alkalmazása mellett végzett titrálások során a megfelelő fémiont adagoltuk a peptid oldatához. Néhány esetben pH függő UV spektrumsorozatot is felvettünk állandó fémion:peptid arány mellett.

UV és CD spektroszkópiás méréseink során a jellegzetes ligandum-fémion töltésátviteli sávok (LMCT) kialakulását követtük. A peptidok tipikus koncentrációja $c \sim 30 \mu\text{M}$ volt.

A fémion-komplexek összetételét ESI-MS segítségével tanulmányoztuk mind negatív, mind pozitív ion módban. A minták $c \sim 100 \mu\text{M}$

koncentrációban tartalmazták a peptidet, melyhez különböző arányokban fémiont adtunk.

^1H NMR spektroszkópia alkalmazásával azonosítottuk, hogy a CueR modell peptidok mely donorcsoportjai vesznek részt a fémion megkötésében. A CdPPC and CPGC peptidekkel átfogóbb NMR vizsgálatot végeztünk. A ^1H rezonanciákat kétdimenziós technikák (COSY, TOCSY, NOESY és ROESY) alkalmazásával rendeltük hozzá az egyes aminosavak hidrogénjeihez. A $\text{Cu}_4(\text{CDPPC})_3$ klaszter összetételét DOSY NMR vizsgálatokkal bizonyítottuk. A mintákat deuterált oldószerben készítettük és a peptidok jellemző koncentrációja $c \sim 1,0$ mM volt. A β turn-re jellemző $\text{C}=\text{O}_i$ és $\text{NH}_{(i+3)}$ csoportok közötti hidrogénkötés kialakulását az amid protonok rezonanciájának hőmérsékletfüggése alapján állapítottuk meg. A spektrumokat a 278-318 K hőmérséklet-tartományban vettük fel.

A Cu(I)-komplexek stabilitásának meghatározásához BCA (bicinchoninate anion) vagy BCS (bathocuproin disulfonate) ligandumokat használtunk. A Hg(II) komplexek esetében Γ ion volt a kiszorító ligandum, míg a Zn(II) komplexek stabilitását zincon segítségével határoztuk meg. A lejátszódó folyamatokat UV-látható spektroszkópiával követtük.

IV. Új tudományos eredmények

1. A három CueR modell peptid, **EC**, **VC** és **HS**, egymagvú Cu(I) komplexeket képeznek ligandum felesleg jelenlétében, melyek többmagvú részecskékké alakulnak át, ha a fémion kerül feleslegbe. Az UV és CD spektrumokon a Cu(I)-ligandum arány növelésével párhuzamosan megjelenő tiolát-Cu(I) töltésátviteli sávok intenzitásának alakulása arra utal, hogy 7,4-es pH-n a Cu(I) a két cisztein oldallancán keresztül koordinálódik a peptidekhez. A **HS** esetében ^1H NMR vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a hisztidin oldallanca is részt vesz a fémion megkötésében.

2. A komplexek pH = 7 felett teljes mértékben kialakulnak, és a pH csökkenésével a cisztein tiolátok két lépésben dekoordinálódnak a fémiontól. Az ellentétes irányú, koordinálódási reakciókat kísérő deprotonálódási folyamatokra $\text{p}K_{s1} = 1,3-3,0$ és $\text{p}K_{s2} = 3,6-5,5$ állandókat határoztunk meg.

3. Az egymagvú komplexekre 7,4-es pH-n meglehetősen nagy látszólagos stabilitási állandókat ($\log\beta_{11}^{\text{pH}7,4} \sim 16$) mértünk, melyek azonos

nagyságrendbe esnek a CxxC vagy CxxxxC motívumot tartalmazó peptidek Cu(I)-affinitásával. Ez arra utal, hogy a ciszteinek szekvencián belüli távolsága nem befolyásolja számottevően a peptidek Cu(I)-kötő hatékonyságát és a komplexek stabilitását elsősorban a két Cu(I)-tiolát kötés erőssége határozza meg.

4. Markáns különbségeket figyeltünk meg a három ciszteint CxCxxC és CxCxC motívumokban tartalmazó peptidek Cu(I) és Hg(II) ionokkal szemben mutatott viselkedésében. Ezeknek a peptideknek a szerkezete túlságosan flexibilisnek bizonyult ahhoz, hogy egy jól definiált szerkezetbe kényszerítse a Cu(I) iont, amelynek következménye számos, elsősorban többmagvú részecske együttes jelenléte a rendszerekben. Ezzel szemben a ligandumok kiválóan alkalmasak a Hg(II) ionok tritolát koordinációs környezetben való megkötésére. Ligandum felesleg jelenlétében HgP összetételű komplexek képződnek, melyekben a peptidek mindhárom tiolát-csoportja részt vesz a fémion megkötésében. Hg(II) felesleget alkalmazva olyan többmagvú részecskék alakulnak ki, melyekben a Hg(II) a számára kedvezőbb, HgS₂ módon koordinálódik. A megfigyelt különbségek azt tükrözik, hogy a Hg(II) nem minden esetben alkalmazható modell ionként a Cu(I) tiol-tartalmú peptidekkel vagy fehérjékkel fiziológias körülmények között való kölcsönhatásának tanulmányozására.

5. A szerkezeti különbségek csak csekély mértékben befolyásolják a három ciszteint tartalmazó peptidek Cu(I)- és Hg(II)-affinitását, valamint a HgS₂ és HgS₃ koordinációs módú komplexek pH-függő egyensúlyát.

5.1. Mind a hat peptid hasonlóan nagy Cu(I)-megkötő tulajdonságot mutat. Az 1:1 összetételű, CuP általános képlettel leírható komplexek képződésére $\log\beta_{11}^{\text{pH}7,4} \sim 18$ látszólagos stabilitási állandókat határoztunk meg. Ez az érték nagyságrendileg megegyezik a dajka fehérjék Cu(I)-komplexeinek stabilitásával.

5.2. A HgP komplexek 2,0-es pH-n meghatározott látszólagos stabilitása a szűk $\log\beta_{11}^{\text{pH}2,0} = 27,0-27,5$ tartományba esik. A 7,4-es pH-ra átszámolt látszólagos stabilitási állandók 20 nagyságrenddel nagyobbak, mint a Cu(I) komplexekre azonos körülmények között meghatározott értékek, ami a

Hg(II) ion jelentősebb tiofil karakterének tulajdonítható. A HgP komplexek stabilitási állandói hasonlóak, mint a jól ismert nehézfém-kelátor 2,3-dimerkaptó-propanol (BAL) Hg(II) komplexéé.

5.3. A pH függvényében felvett UV spektrumok változása alapján HgS₂ és HgS₃ koordinációs módú komplexek pH-függő egyensúlyát figyeltük meg. A harmadik tiolcsoport deprotonálódására az egyes Hg(II)-peptid rendszerekben pK_s = 4,3-5,1 értékeket mértünk. A pK_s értékek sorrendje alapján megállapítható, hogy a P^{3C} peptid CxCxxC szekvenciája a HgS₃ geometria kialakulásának szempontjából kedvezőbb, mint a többi ligandum CxCxC motívuma, csakúgy, mint a kötőhely nagyobb távolsága a PG motívumtól a 2^C és 3^C peptidekben, mint az 1^C ligandumban, illetve a ciklikus szerkezet szintén előnyösebb a lineárishoz képest.

6. A peptid jól meghatározott, preorganizált szerkezete kulcsfontosságú a Cu(I) komplex speciációjának szabályozásában és a komplex stabilitásában.

6.1. UV, CD és NMR spektroszkópiás titrálások alapján megállapítottuk, hogy a CDPPC peptid 1,33 ekvivalensnyi fémion hozzáadásáig egy adott Cu(I) komplexet képez. ESI-MS és DOSY NMR mérések bizonyították, hogy ez a részecske egy Cu₄P₃ összetételű klaszter Cu₄S₆ maggal, melyben egy fémiont három tiolátcsoport vesz körbe. Ez az egyszerű rövid peptid figyelemre méltó módon utánozza számos Cu(I)-kötő fehérje, pl. a Ctrl vagy Cox17 réz-tiolát klaszterképző képességét.

6.2. A CPGC-Cu(I) rendszerre jóval összetettebb komplexképződési folyamatok jellemzőek. A PG turn motívum által megengedett nagyobb flexibilitás következtében a peptid nem képes jól definiált komplexbe kényszeríteni a Cu(I) iont.

6.3. A CDPPC Cu(I) komplexének stabilitása ($\log\beta_{11}^{\text{pH}7,4} = 17,5$) körülbelül egy nagyságrenddel nagyobb, mint a PG motívumot tartalmazó rokon ligandumé ($\log\beta_{11}^{\text{pH}7,4} = 16,4$).

7. A CDPPC és CPGC peptidek Zn(II) ionnal való kölcsönhatása során ZnP és ZnP₂ komplexek képződnek. Fiziológias pH-n a ZnP komplexek látszólagos stabilitási állandói a 10⁶-os nagyságrendbe esnek, ami a peptidek kimagasló Cu(I)-szelektivitását mutatja Zn(II) ionokkal szemben.

8. A CDPPC peptid jól definiált Cu(I) koordinációja és a Zn(II) ionnal szemben mutatott jelentős szelektivitása alapján ígéretes vegyület a májsejteket célzó funkcionalizálásra, és ennek révén alkalmas lehet a Wilson betegség során felhalmozódó Cu(I) célzott eltávolítására is.

V. Közlemények listája

Magyar tudományos művek tára (MTMT) azonosító: 10054976

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemények

1. **E. Mesterházy**, B. Boff, C. Lebrun, P. Delangle and A. Jancsó, Oligopeptide models of the metal binding loop of the bacterial copper efflux regulator protein CueR as potential Cu(I) chelators, *Inorg. Chim. Acta*, 2018, **472**, 192-198.
IF = 2,264
2. **E. Mesterházy**, C. Lebrun, A. Jancsó and P. Delangle, A Constrained Tetrapeptide as a Model of Cu(I) Binding Sites Involving Cu₄S₆ Clusters in Proteins, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 5723-5731.
IF = 4,700
3. **E. Mesterházy**, C. Lebrun, S. Crouzy, A. Jancsó and P. Delangle, Short oligopeptides with three cysteine residues as models of sulphur-rich Cu(I)- and Hg(II)-binding sites in proteins, *Metallomics*, 2018, DOI: 10.1039/C8MT00113H.
online megjelent
IF = 4,069
ΣIF = 11,033

További közlemény

1. A. Jancsó, B. Gyurcsik, **E. Mesterházy** and R. Berkecz, Competition of zinc(II) with cadmium(II) or mercury(II) in binding to a 12-mer peptide, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **126**, 96-103.
IF = 3,274

Előadások és poszter bemutatók

1. **Mesterházy, E.**, Jancsó, A., Lebrun, C., Tömösi, F., Delangle, P., A Wilson betegség kezelésére potenciálisan alkalmas Cu(I) kelátorok 50. Komplexkémiai Kollokvium, Balatonvilágos, 2016.
2. **Mesterházy, E.**, Jancsó, A., Lebrun, C., Tömösi, F., Delangle, P., New peptidic Cu(I) chelators as potential candidates for the treatment of Wilson's disease
13th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Budapest, 2016.
3. **Mesterházy, E.**, Jancsó, A., Lebrun, C., Delangle, P., Interaction of copper(I) with 12-mer peptides mimicking the metal binding domain of

CueR, a copper-efflux regulator

Journées de Chimie de Coordination de la SCF, Grenoble, 2017

4. **Mesterházy, E.**, Lebrun, C., Jancsó, A., Delangle, P., An Efficient Peptidic Copper(I) Chelator with Two Cysteines Linked by a Strong Turn
14th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Toulouse, 2017
5. **Mesterházy, E.**, Lebrun, C., Jancsó, A., Delangle, P., Cu(I)ionok hatékony megkötésére alkalmas β -turn motívumot és két ciszteint tartalmazó tetrapeptid
52. Komplexkémiái Kollokvium, Balatonvilágos, 2018.
6. **Mesterházy, E.**, Lebrun, C., Crouzy, S., Jancsó, A., Delangle, P., Metalloproteinek cisztein-gazdag Cu(I)- és Hg(II)-kötőhelyeit utánzó modellpeptidek
52. Komplexkémiái Kollokvium, Balatonvilágos, 2018.
7. **Mesterházy, E.**, Lebrun, C., Crouzy, S., Jancsó, A., Delangle, P., Oligopeptide models of cysteine-rich Cu(I)- and Hg(II)-binding metal sites of metalloproteins
14th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Birmingham, 2018.
8. **Mesterházy, E.**, Jancsó, A., Gyurcsik, B., Berkecz, R., Zinc(II) interaction of a 12-mer peptide and competition of group 12 ions in binding to the ligand
REGIONAL CONFERENCE “Heavy metal as contaminants of the environments”. Timisoara, Romania, 2013
9. Balogh, R.K., **Mesterházy, E.**, Gyurcsik, B., Jancsó, A., Christensen, H. E. M., Asaka, M.N., Kato, K., Nagata, K., Réz(I)ionok szelektív kimutatása a CueR fémszabályzó fehérje segítségével
XXXVIII. KÉMIAI ELŐADÓI NAPOK, Szeged, 2015.
10. Balogh, R.K., **Mesterházy, E.**, Kato, K., Nagata, K Jancsó, A., Gyurcsik, B. Detection of toxic metal ions by the CueR metalloregulator
14th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Birmingham, 2018.