

OTKA 100720 (Deckerné Dr. Majer Zsuzsa): 2012. április 01.- 2015. szeptember 30.

Személyi változások és a téma kibővítésének hatása a projekt eredményeire (OTKA-zsűri által engedélyezett változások):

- 1) *Dr. Nemes Anikó* (alkalmazva: 2012. november 01.-2014. október 31.

Az új munkatársat félévnyi csúszással tudtuk alkalmazni és nem volt gyakorlata sem a peptidkémiai eljárásokban (szintézisek, elválasztások), sem az ECD, illetve fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekben - betanítása kb. félévet vett igénybe. Ugyanakkor szintetikus múltja révén, ígéretesnek tűnt újabb fluorofór molekulák szintézisét tervezni, amelyeket a szulfhidril-csoport kimutatására, mint újabb jelölő molekulákat vezettünk volna be. Sajnos ez utóbbi nem járt eredménnyel. *Bódi Péter* és *Kerényi Péter* hallgatók (ELTE, Kémia alapszak) irányítása mellett végezték szakmai gyakorlatukat.

2) *Knapp Krisztina* doktorandusz - eredetileg is nevesített a projektben -, egyrészt mint doktori ösztöndíjas, másrészt mint alkalmazott kutató (2014. szeptember 01.-2015. július 31.) vett részt a projektben. Az ő munkáját főleg a modellezés/peptidszintézis mellett a fluoreszcencia mérések tették ki, melyet *Dr. Csik Gabriella* irányítása mellett végzett. Aktívan részt vett a tömegspektrometriás és konformációs vizsgálatokban is, amelyek a kutatási témakör kibővítésével jelentek meg a projektben. Irányítása alatt szakmai gyakorlatát *Sajti Ákos* (ELTE, Kémia alapszak) végezte, illetve mint társ-témavezető *Czirók Márton* (ELTE, Kémia alapszak) hallgató szakdolgozati munkáját irányította.

3) A modellek fotolitikus reakcióinak, a gyökstabilitási vizsgálatainak témafelelőse *Dr. Gróf Pál* (Simmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet), akinek irányítása mellett *Bozó Tamás* (Pharm. dr.) dolgozott a témában.

4) A kutatási téma kibővítését (egyben a projekt hosszabbítását is) a 3. év eredményei tették szükségessé. A peptid modellek fotolízisének kiértékelése fluoreszcencia spektroszkópiával és HPLC-módszerrel történt, de az eredmények nem voltak egyértelműek. Így szükségesnek ítéltük egyrészt a modellek oldatbeli konformációjának vizsgálatát (ROA, ECD, NMR spektroszkópia) és a fotolitikus termékek azonosítását tömegspektrometriával (LC-MS; MS/MS).

- NMR vizsgálatok (*Dr. Kövér Katalin* Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Tanszék; *Dr. Borics Attila* SzBK, Biokémiai Intézet) képet adtak az oldatbeli konformációs vizsgálatokról, amelyet ECD spektroszkópiával is vizsgáltunk. *Nagy Tamás Milán* (DE, Kémiai Alapszak) három modellünk NMR-modellezéséből írta szakdolgozatát (Témavezető: *Dr. Kövér Katalin* professzor)

- Az ECD spektroszkópiai vizsgálatokhoz kiegészítésként elméleti spektrumszámításokat is végeztünk: *Fehér Domonkos* (ELTE, Kémia mesterszak; szakdolgozati téma) *Dr. Farkas Ödön* (ELTE, Kémiai Intézet) irányításával.

- Tömegspektrometriai vizsgálatokat szükségesnek ítéltük a fotolízisben kapott termékek azonosítására, illetve az MS/MS fragmentációjuk tisztázására. A munkát *Dr. Schlosser Gitta* (ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport) és *Dr. Illyés Eszter* (nevesített kutató, Vichem Chemie Kft.) végezte.

Az együttműködések rendkívül hasznosnak ítélem, mivel ezek a mérések/számolások nagyban hozzájárultak a vizsgált peptidmodellek fotolitikus reakciójának a leírásához, tisztázásához és újabb publikációkat is lehetővé tettek / tesznek.

TÉMA ELŐZMÉNYEI, INDÍTTATÁSA

Több fehérje esetében igazolt, hogy a fényérzékeny triptofán fotoindukálta elektrontranszfer reakciókra képes¹. A redukálható diszulfid-hidak esetében az egy-elektron redukciós folyamatban így szulfhidril, és tiil-gyök keletkezhet². Bizonyították, hogy a Trp térbeli közelsége a diszulfid-hídhoz ($d = 4-7 \text{ \AA}$) felelős a fehérjék fényérzékenységeért és a különböző lebomlási termékek keletkezéséért³, ami a biológiai hatás megváltozásával (pl. enzimkatalizis) jár⁴. A fehérjék vizsgálatainál, ahol több aromás aminosav is egymás közelében lehet (pl. aromás loop), vagy több triptofán (Trp, W) és/vagy tirozin (Tyr, Y) oldallánca a diszulfidhíd (SS-híd) közelében⁵ helyezkedik el, a fotolitikus vizsgálatok elemzése bonyolult feladat. Mivel a fehérje, mint egy komplex egység, a behatásokra mindig ad valami választ, célszerűnek tűnik bizonyos folyamatok, reakciók tisztázására egyszerűbb modell vegyületeket használni, pl. peptideket. A peptidek kisebbek, a szekvenciájukba célirányosan be lehet építeni az adott hatásért felelős molekularészletet. Szerkezeti egységeikben viszont megegyeznek a fehérjékkel, tehát egy adott jelenség vizsgálatakor a peptidekkel kapott részeredményeket akár a fehérjékre is ki tudjuk terjeszteni. Így az UV-fény hatására lejátszódó fotokémiai reakciót a fehérjéknél kisebb egységeken, peptidmodelleken vizsgáltuk és feltételeztük, hogy ezek a modellek (kisebb ciklikus peptidek) vizsgálata nagyban hozzájárulhat a fotolízis folyamatának szélesebb körű megértéséhez. A választott peptidmodellek flexibilitását diszulfidhídon keresztüli ciklizálással csökkentettük; olyan ciklikus kispeptideket konstruáltunk, melyek szekvenciájában aromás oldalláncú aminosav és diszulfidhíd van, de a laktalbumin fehérje (kecske, GLA) adott Trp mikrokörnyezetének „kivágásával” is készült modell. A kistszámú peptidek általában 5-6-7 aminosavat tartalmazó ciklikusok, melyeknek összetételét szisztematikusan változtattuk, így a diszulfid-kötés különböző kémiai környezetbe került. A kis tagszámú ciklikus peptidmodellek jó modelleknek tűntek, mert: i) a lineáris peptidnél kevesebb konformációs lehetőséggel bírnak (SS-híd szerkezetmerezítő hatása), ii) a megfelelő közelségbe kerülhet a Trp és az SS-híd és így jól tanulmányozható az UV-VIS fény hatására a feltételezett Trp közvetítette elektrontranszfer folyamat révén bekövetkező diszulfidhíd hasadás.

Az eddigi kutatások eredményei alapján (fehérjék^{5,7}, ill. oligopeptidek^{9,10}) az alábbi paraméterek játszhatnak szerepet a Trp és SS-híd közötti fotokémiai folyamatban, melyeket figyelembe vettünk a modellek tervezésénél:

- 1) A Trp oldallánc és SS-híd közötti térbeli távolsága^{5,11} (optimális $4-7 \text{ \AA}$)
- 2) A fehérjékben a Trp körüli lokális környezet – mikrokörnyezet –, azaz a térben közeli aminosavak hatása (oldallánc minősége: aromás, illetve nagy térigényű alifás)¹².
- 3) A mikrokörnyezetben található lizin (Lys, K), illetve arginin (Arg, R) oldallánca ($\epsilon\text{-NH}_2$, illetve guanidil-csoport) befolyásolhatja a folyamat lejátszódását, pl. a kation- π kölcsönhatás révén ($5-8 \text{ \AA}$)¹³.
- 4) Védett N- (acetyl-csoport) és C-terminálist (amid-csoport) tartalmazó peptidmodellek alkalmazása (láncvégi ionos töltésű csoportok jelenlétének elkerülése, peptidgerinc kiterjesztése).

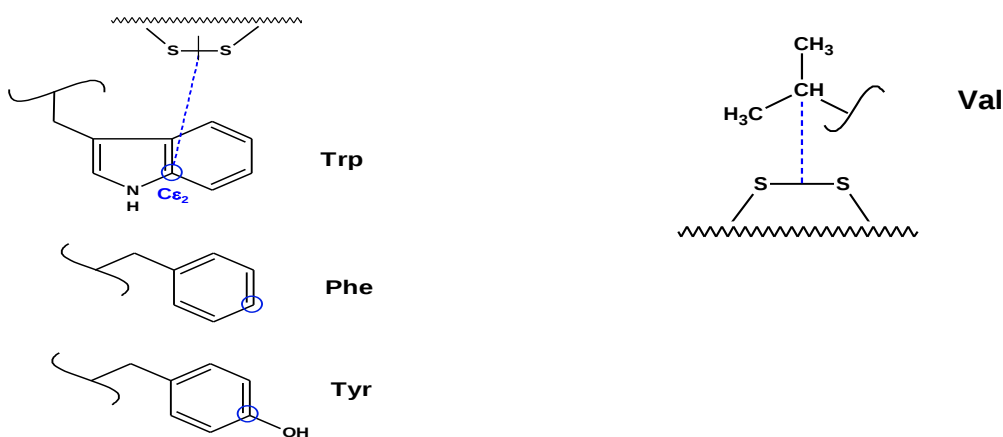
Munkánk a következő fejezetekre tagolódott:

- 1) ciklikus kispeptidek és fehérje környezeti modellek tervezése és molekulamechanikai módszerrel (MM vákuumban) a legkisebb energiájú konformer(ek) keresése. A két távolsági kritériumot teljesítő modellek kiválasztása, szekvencia-variánsok tervezése és ezek MM számolása;
- 2) kiválasztott modellek szintézise, azonosítása;
- 3) ciklikus peptidmodellek fluoreszcencia vizsgálata („kvencselés”)
- 4) Fotoredukciós kísérletek: UV-VIS besugárzások optimalizálása (lámpák teljesítménye és az alkalmazott fény hullámhossza, körülmények optimalizálása) és a folyamatban keletkezett szulfhidril-csoport kvalitatív kimutatása többféle reagenssel (új reagensek fejlesztése) és módszerrel (fluoreszcencia, LC/MS, MS/MS, HPLC);
- 5) Szulfhidril csoport kvantitatív meghatározása
- 6) Szerkezet-hatás összefüggés, azaz oldatbeli (valós) konformációs viszonyok tisztázása NMR, ECD spektroszkópiával
- 7) Fotolitikus folyamatok vizsgálata ESR spektroszkópia segítségével
- 8) Fehérjék és fehérjefragmensek vizsgálatai

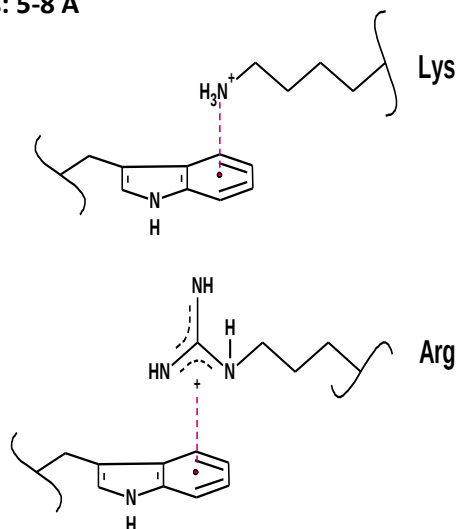
EREDMÉNYEINK

1. Molekulamechanikai (MM) számításokat végeztünk vákuumban a tervezett peptid-sorozatokra, azaz az öt-, hat-, illetve hét aminosavból álló ciklikus peptidekre, ahol a szekvenciák különböző aromás aminosavat - Trp (W), Tyr (Y), fenilalanin (Phe,F) -, illetve valint (Val,V) tartalmaznak a szekvencia különböző helyein. A Val-tartalmú (alifás oldallánc) modellek fotolízise esetén nem, vagy a legkisebb SS-híd felszakadását vártuk az aromás oldalláncot ideális távolságban tartalmazó szekvenciákhoz képest. Az optimalizálás és konformer keresési eljárás a lent megadott feltételekkel és paraméterekkel történt. Az „optimális” modellvegyületek kiválasztásának az alapja a legkisebb energiájú konformereknél leolvasott aromás mag-diszulfidhíd, illetve a kation- π távolság. A kedvező aromás-diszulfidhíd távolság esetén ($d \sim 4-7 \text{ \AA}$)¹¹ nagyobb az esély a nagyobb mennyiségű -SH képződésére, mert nagyobb fokú SS-híd hasadása. A bázikus oldallánc-aromás mag kedvező távolsága ($d \sim 5-8 \text{ \AA}$)¹³ esetén a kation- π kölcsönhatás elősegítheti a diszulfid-kötések hasadását.

Aromás mag-diszulfid távolság: 4-7 Å



kation- π kölcsönhatás: 5-8 Å



MM Számolási paraméterek: HyperChem 6.0, vákuum, Amber erőter; Newton-Raphson és Polak-Ribiere algoritmus (2000 ciklus); rögzített transz-amidkötések és $d(\text{S-S})=2,04$ Å; torziós szögek: φ_1 , ψ_1 , ξ_1 , χ_1

Jelmagyarázat: peptid modelleknél az atomok közötti távolságok méréséhez

d_1 / Å Az aromás gyűrű megfelelő C és a SS híd fele közti távolság („fantomatom”)

- Trp indol-gyűrűjében a C ϵ 2-atomtól; a Tyr, Phe aromás gyűrű legtovábbi C-atomjától (aromás-SS)
- Val: oldalláncban harmadrendű C atom

d_2 /Å és d_3 /Å kation- π hatás esetében

- kationok: Lys oldalláncának -NH $_3^+$ -csoportja; Arg oldallánc guanidil-csoportjának mértani közepe
 - aromások: Trp indol-gyűrűjében a C ϵ 2-atomtól; a Tyr és a Phe az aromás gyűrű mértani közepe
- További aminosav rövidítések: cisztein (Cys, C); alanin (Ala, A), glicin (Gly, G)

1.1 Ciklikus pentapeptid modellek

Pentapeptidek	d_1 / Å (SS/2)	d_2 / Å (Lys-NH)	d_3 / Å (Arg-NE)
Ac-c(CAXAC)-NH $_2$			
X=V	8.26154	-	-
X=Y	9.07417	-	-
X=F	10.64513	-	-
X=W	5.49121	-	-
Ac-c(CXAGC)-NH $_2$			
X=V	6.60316	-	-
X=Y	10.5157	-	-
X=F	10.3899	-	-
X=W	9.61117	-	-
Ac-c(CXAKC)-NH $_2$			
X=V	6.57262	-	-
X=Y	9.64502	10.07436	-
X=F	10.3983	9.98268	-
X=W	7.91659	7.87089	-
Ac-(CXARC)-NH $_2$			
X=V	7.8165	-	-
X=Y	10.2755	-	8.04758
X=F	11.4658	-	6.40667
X=W	9.88286	-	10.4482
Ac-(CXGAC)-NH $_2$			
X=V	6.80832	-	-
X=Y	8.74973	-	-

$X=F$	6.48993	-	-
$X=W$	9.67964	-	-

Pentapeptidek	$d_1 / \text{\AA} (SS/2)$	$d_2 / \text{\AA} (Lys-NH)$	$d_3 / \text{\AA} (Arg-NE)$
Ac-(CXXAC)-NH ₂			
$X=V$	7.76335	-	-
$X=Y$	10.3313	6.89629	-
$X=F$	9.16893	9.9857	-
$X=W$	7.95261	7.82582	-
Ac-(CXRAC)-NH ₂			
$X=V$	7.51346	-	-
$X=Y$	8.21491	-	9.81522
$X=F$	10.1649	-	10.32462
$X=W$	9.75967	-	10.799
Ac-(CAXKC)-NH ₂			
$X=V$	8.18645	-	-
$X=Y$	9.15727	8.51474	-
$X=F$	9.67174	3.78181	-
$X=W$	8.62061	7.44406	-
Ac-(CKXAC)-NH ₂			
$X=V$	8.48349	-	-
$X=Y$	10.59146	10.50955	-
$X=F$	10.31466	10.21498	-
$X=W$	10.09892	10.51892	-

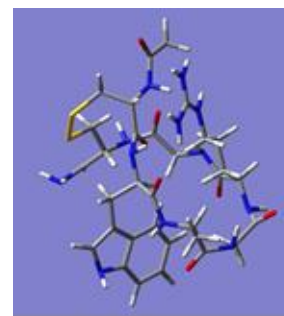
A fenti modellek közül ígéretes az Ac-ciklo(CAXAC)-NH₂ sorozat a W-SS távolság szempontjából, míg a kation- π kölcsönhatás szempontjából az Ac-ciklo(CWKAC)-NH₂, illetve az Ac-ciklo(CWAKC)-NH₂ modell.

1.2 Ciklikus hexapeptid modellek esetében növekedett a gyűrű flexibilitása. A vizsgált 10 modell közül az Ac-ciklo(CWAGAC)-NH₂ ($d_1 / \text{\AA} = 6,92915$), illetve az Ac-W-ciklo(CAGAC)-NH₂ ($d_1 / \text{\AA} = 7,00559$) modellek esetében volt a legjobb a W-SS távolság, de ez rosszabb volt a ciklikus pentapeptidok esetében talált modellénél.

1.3 Ciklikus heptapeptid modellek vizsgálatánál (Czirók M. szakdolgozat, 2013)¹⁴ módunkban állt, hogy a kation- π kölcsönhatás létrejöttének egyik tényezőjét, azaz az aromás és kationos oldalláncú aminosavak egymástól való távolságát ($m=0,1,2,3$, ahol az m közöttük található aminosav-részek száma), valamint az aromás aminosavak szekvenciában elfoglalt helyét változtatva ($k=0,1,2$, ahol a k az N-terminálison elhelyezkedő Cys és az aromás oldalláncot tartalmazó aminosav között elhelyezkedő aminosavrészek száma), vizsgáljuk a kialakuló konformációs viszonyokat. Itt jelentősége volt az N-terminálison lévő acetyl-csoportnak és a C-terminálisú amidcsoportnak, mert így a láncvégi potenciális kation és anion nem alakíthat ki újabb kölcsönhatást az aromás oldalláncsal.

Az Ac-ciklo(CGA-X-A-Z-C)-NH₂, az Ac-ciklo(C-X-AGA-Z-C)-NH₂, az Ac-ciklo(C-X-Z-GAGC)-NH₂ és az Ac-ciklo(C-X-AG-Z-GC)NH₂ ($X=W, Y, F, V$ és $Z=G, R, K$) modellek esetében mind az aromás-SS, mind a kation- π hatás távolsága nagyobb volt, mint $7.5\text{\AA}$. Az Ac-ciklo(CG-X-AA-Z-C)-NH₂, és az Ac-ciklo(C-X-A-Z-AGC)NH₂ sorozatnál pedig a távolságok $10\text{\AA}$ körüliek, illetve nagyobbak. Nem találtunk igazán optimális modellsorozatot a vizsgált szekvenciák között.

Peptid (legkisebb energiájú konformer)	d ₁ / Å	d ₂ / Å	d ₃ / Å
Ac-(CWAG A GC)-NH ₂ (Ref)	9,74206	-	-
Ac-(CWAG K GC)-NH ₂	9,73633	7,99941	-
Ac-(CWAG R GC)-NH ₂	6,99576	8,4896	8,03685
Ac-(CYAG K GC)-NH ₂	8,50655	12,60038	-
Ac-(CYAG R GC)-NH ₂	10,55056	13,01344	11,04784



Az ábrán a kiválasztott Trp-t és Arg-t tartalmazó szekvencia legkisebb energiájú konformere látható.

1.4 Fehérje (GLA) környezeti modell

Modelleztük a kecske laktalbumin (GLA) fehérjének a **Trp-60** aminosav térbeli közelségében lévő aminosavakból felépített szekvenciát, azaz az adott mikrokörnyezeti modellt: Ac-ciklo(**C**KIYI-**X**-IC)-NH₂ ahol X=W, F, Y. A lizil-részt egyes szekvenciákban arginil-részre cseréltük, vizsgálva ez utóbbi konformációra gyakorolt hatását.

Peptid (HyperChem-kód)	d ₁ / Å	d ₄ / Å Aromás centroid-Lys/Arg(N)
Ac-(C KIYI W IC)-NH ₂	8,7829	W-K : 5.39901
Ac-(C KIYI F IC)-NH ₂	12,80339	F-K : 8.25585
Ac-(C KIYI Y IC)-NH ₂	11,03598	Y-K : 8.75154
Ac-(C RIYI W IC)-NH ₂	3,59557	W-R : 11.11202
Ac-(C RIYI Y IC)-NH ₂	5,01645	Y-R : 8.72841
Ac-(C RIYI F IC)-NH ₂	13,72122	F-R : 10.56333
Ac-(CI W YI K IC)-NH ₂ (7A-retro)	9,19442	W-K: 9.4099
Ac-(C K A YI W IC)-NH ₂	9,90022	W-K: 4.00102

A modellezés eredménye szerint a diszulfid-aromás távolság az Ac-ciklo(**C**KIYI**W**IC)-NH₂ modellben kb. 8.7 Å – ami esetleg teljesíti a W-hatásának érvényesülését a diszulfid-hidak fotolízisében, de ezt erősítheti a kedvező kation- π kölcsönhatás (kb. 5.3 Å). Az Ac-ciklo(**C**RIYI**W**IC)-NH₂ és az Ac-ciklo(**C**RIYI**Y**IC)-NH₂ modellek esetén az aromás mag és diszulfidhíd távolsága optimális (kb. 3.5, illetve kb. 5 Å), tehát az UV-fénnyel történő besugárzás hatására feltételeztük a diszulfidhíd fotoredukcióját a tirozin esetében is (Tyr-közvetített elektrontranszfer folyamat)¹⁵. Ez utóbbinál a kation – π kölcsönhatásnak valószínűleg nem lesz szerepe, mivel a távolság 11.1 Å, illetve 8.7 Å.

2. Peptidmodellek szintézise

A peptidmodellek manuális szilárdfázisú peptidszintézissel (Fmoc/tBu módszer) készültek, Rink amid MBHA gyantán¹⁶. A gyantáról történt lehasítás után kapott nyers lineáris peptidek vizsgálata és azonosítása analitikai HPLC-vel és ESI-MS vizsgálattal történt. Amennyiben a lineáris peptid tisztasága nagyobb volt, mint 80%, ciklizálási reakciót végeztünk a levegő oxigénjének segítségével a peptid híg vizes oldatában ($c_{\text{peptid}}=0,05-0,1$ mg/ml), ahol a pH =7,8-8 (NH₄HCO₃) volt. A reakciót RP-HPLC-vel követtük, majd a kapott ciklikus peptidet preparatív RP-HPLC-vel tisztítottuk, azonosítása pedig analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével történt. A liofilizált termékek peptidtartalma: 70-80%, tisztasága ~95%

2.1 Ciklikus pentapeptid-modellek esetében figyelembe véve a két távolság-kritériumot, kiválasztottunk az optimálisnak tűnő modelleket, és a kevésbé optimális modelleket is, amelyek

fotolízisének összehasonlításával várhatóan olyan információkhoz jutunk, melyekből következtetni tudunk részben a ciklopeptid szerkezete és így az aromás aminosav, illetve a kation- π kölcsönhatás szerepére a fotolízisben. Nagyszámú peptidtárat állítottunk elő.

2.2 A ciklikus hexapeptideknél nem találtunk kiemelkedően jól megfelelő modellt, ahol a Trp-SS távolságot optimális lenne; nem történt szintézis.

2.3 Ciklikus heptapeptid-modellek közül egy triptofán-tartalmú modellsorozat, az Ac-ciklo(CWAGZGC)-NH₂ (Z= R, K, A) sorozat szintézise megtörtént¹⁴. Az alanin tartalmú szekvencia a referencia peptid, mivel itt nem jöhet létre kation- π kölcsönhatás.

2.4 A Trp-60 környezeti modellsorozat mikrohullámú peptidszintetizátorral készült. Ezen peptidok analízise szintén RP-HPLC, MALDI-MS vizsgálatokkal történt, de tisztításuk (HPLC) vízben való oldhatatlanságuk miatt meghiúsult.

2.5 Lineáris prekurzorok és ezek származékainak elkészítése:

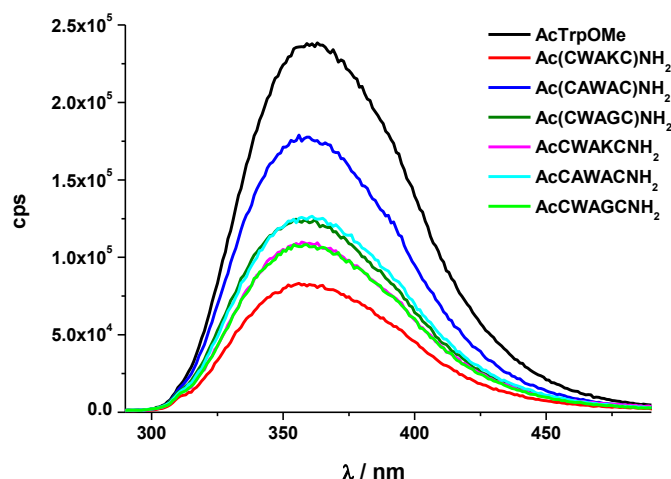
- Ac-C(Acm)WAKC-NH₂, Ac-CWAKC(Acm)-NH₂ (Acm= acet-amidometil csoport)
- Ac-C(Acm)WAKC(CPM)-NH₂, Ac-C(CPM)WAKC(Acm)-NH₂, Ac-C(CPM)WAKC(CPM)-NH₂

CPM= fluorofór csoport, lásd később

3. Modell peptidok fluoreszcenciája

A peptidok és fehérjék esetében fluoreszcens vizsgálatok⁶ lehetségesek, ha aromás oldalláncú aminosavak (természetes fluorofór) vannak a szekvenciában. Az UV-VIS tartományban gerjeszthetők és a kibocsátott fény (kisebb energiájú – nagyobb hullámhossz; intenzitás arányos a koncentrációval) spektruma függ az aromás rendszer környezetétől, így ez minden esetben molekulára jellemző spektrumot ad. Ha a fluorofórok által kibocsátott fény intenzitása nem egyezik meg a mért intenzitással, akkor kioltás („kvencselés”) történik, amelyért a fluorofór-csoport közelében lévő más molekula, molekularészlet vagy ion jelenléte a felelős. Ezeknek, a kioltásért felelős részeknek az elektronszerkezete alkalmas arra, hogy a gerjesztett állapotban lévő fluorofórokkal „kölcsönhatást” létesítve annak gerjesztési energiáját átvegyék és így azt disszipálják. Ebből következtetni lehet arra, hogy kioltásért felelős részekből mennyi és milyen távol helyezkedik el a fluorofór aromás rendszertől. A Trp fluoreszcencia intenzitásának csökkenése peptidekben és fehérjékben a Trp környezetében előforduló diszulfidhidak, aromás rendszerek, amino-csoportok és amid-csoportok (peptidkötés) jelenlétének tulajdoníthatók.

A szintetizált Trp-tartalmú modelleknek felvettük a fluoreszcencia spektrumát. Azt vártuk, hogy amint a fehérjék esetében is¹⁷, az SS-híd közelében lévő Trp oldallánca csökkenteni fogja (kvencseli) a Trp-fluoreszcencia intenzitását a ciklikus modellekben. Összehasonlításra az Ac-Trp-OMe és a lineáris Trp-szekvenciákat (nagyobb flexibilitás/ konformációs szabadság) használtuk. A spektrumok c=35 μ M koncentrációjú oldatokból készültek



A vizsgált pentapeptideknél - különösen az Ac-ciklo(CAWAC)-NH₂ modellnél - a talált intenzitáscsökkenés a Trp-fluoreszcencia intenzitásához képest, arra utalt, hogy a diszulfidhíd a Trp-molekularészlet közelében lehet.

A heptapeptidek modelleken végzett MM számolások alapján nem vártunk jelentős különbséget a szintetikus ciklikus modellek fluoreszcens intenzitása között, de méréseink szerint ezek nem különböznek a lineáris modellek intenzitás értékeitől sem¹⁴. A mért adatok tükrében, erre a lehetséges magyarázatok a következők lehetnek:

- az MM számolás kvalitatív módszer, a számolások során az optimalizálás és konformer-keresés vákuumban, míg a fluoreszcencia mérések oldatfázisban (szolvatáció) történtek;
- a lineáris peptidek felvehetnek olyan szerkezetet (hosszabb peptidlánc, sok konformer), ahol kioltó hatással rendelkező molekularészek (pl. lizin/arginin oldallánc, amid-váz) közel kerülnek a Trp-hoz így okozva a fluoreszcencia intenzitás csökkenését.

4. Fotoredukciós kísérletek

Figyelembe véve a modelleknél az MM számítások eredményét és a szintézis, ill. a szintetizált modellek oldhatósági során fellépett nehézségeket, szűkítettük a fotolitikus reakcióban vizsgálni kívánt modellek számát:

- a ciklikus heptapeptid modelleknél (Ac-ciklo(CWAGXGC)-NH₂, X= Arg, Lys, Ala) a konformerek sokaságának egymásmellettsége nem adhat egyértelmű eredményt¹⁴. A fotolízist nem végeztük el.
- a ciklikus pentapeptidek fotolízisét vizsgáltuk. A Trp-SS távolság, illetve várhatóan a fotolitikus viselkedés szempontjából is, kiválasztottunk egy-egy szekvenciát: Ac-ciklo(CAWAC)NH₂ (d₁=5,49121Å, **JÓ modell**); Ac-ciklo(CWAGC)-NH₂ (d₁=9,61117Å **ROSSZ modell**) és Ac-ciklo(CWAKC)-NH₂ (d₁=7,91659Å **KÖZEPES modell**). A KÖZEPES modell esetében a várt fotolitikus hasadási értéket a kation – π kölcsönhatás (d₂=7,87089Å) erősítheti. A három reprezentáns szekvencia analógjainak (W helyett Y, F, V) is vizsgáltuk a fotolízisét.

4.1 Besugárzások

A gerjesztésre különböző fényforrásokat használtunk.

Az alkalmazott fényforrások: Fluorolog-lámpa, FS-20 UVB-lámpa, valamint Germicid-lámpa. Az első két lámpával történő besugárzásnál a Trp, ill Tyr közvetítette fotolízis mehet végbe, míg a Germicid-lámpa közvetlenül a diszulfid-hidak hasadását is eredményezheti. Azt vártuk, hogy a vizsgált peptidminta diszulfidhidjainak hasadása a Germicid-lámpa használata esetén a legnagyobb mértékű, de ezen a hullámhosszon már más fotokémiai bomlás is lehetséges.

Fényforrások		Foton fluxus	
		foton/sec*	mW/cm ² **
L1	Jobin-Yvon Fluorolog 4 spektrofluoriméter, 450W Xe, monokromátor	$\lambda=290$ nm: $3,03 \cdot 10^{18}$ $\lambda=280$ nm: $1,92 \cdot 10^{18}$	–
L2	FS-20 sávszélességű UVB-lámpa WG-305 nm-es szűrővel	$\lambda \geq 305$ nm: $9,00 \cdot 10^{18}$	$\lambda \geq 305$ nm: 0,9-1,4
L3	Philips TMS022 Germicid-lámpa $\lambda \sim 254$ nm	–	–

* Aktinometria¹⁸

** Doziméter: Vilber-Lourmat VLX-3W; Szenzor: CX-312.

4.2 Modellek besugárzása: a peptid minta (C_{peptid} =185-220 mM) besugárzása NH₄HCO₃-puffer oldatban (5mM, pH=7.5) történt a fenti hullámhosszakon, 16nm résszélességgel, T=4°C hőmérsékleten kevertetéssel 1h időtartamig. Az NH₄HCO₃-puffer buborékmentesítése

vákuumpumpával, szonikálással történt. A $\lambda = 254$ és 305 nm esetén a hőmérséklet magasabb volt ($T = 25^\circ\text{C}$).

Egy-egy besugárzott minta oldatából párhuzamosan végeztük el a vizsgálatokat a különböző reagensekkel és módszerekkel.

4.3 Szulfhidril-csoport detektálása (kvalitatív kimutatás)

A fotokémiai reakcióban keletkező szulfhidril-csoport kimutatására több reagens és módszer alkalmas; ezeket a reagenseket /módszereket a kimutatási határtól függően kell megválasztani: Ellman- reagens¹⁹, jódacetamid- és maleimidszármazékok²⁰.

A fotolízis során a viszonylag kis mennyiségben keletkező szulfhidril-csoport kimutatása addukt-képzési reakcióval történik „*in situ*” és a képződött vegyület detektálására több módszer lehetséges: fluoreszcencia mérés, HPLC és tömegspektrometria.

➤ HPLC UV-Vis detektálás: viszonylag nagy koncentráció szükséges a vizsgálatához, ami oldhatósági és detektálási problémákhoz vezethet, mivel a fotolízis várt hatékonysága a mintáknál 3-20% közé esik;

➤ MS detektálás: általában fragmentációval történik a vegyületek azonosítása, ezért elővizsgálatok (*work-up step*) szükségesek;

➤ Fluoreszcencia: érzékeny és szelektív módszer. Kis koncentrációban történik a meghatározás, így nincsenek oldhatósági problémák és már 1-2% HS-tartalom is meghatározható. A detektálás alapja, hogy a fotolízis során képződött HS-csoport reakcióba lép a szulfhidril-specifikus (ún. „tiolspecifikus”) fluoreszcens jelzővegyülettel (festék). Az így képződött addukt a festéknél erősebben fluoreszkál, így a peptidminta besugárzását követően a fluoreszcencia intenzitásának növekedése a keletkezett HS-csoportok mennyiségével arányos, fluorimetriával meghatározható.

A fotolízisekor keletkező szulfhidril-csoport kimutatására és azonosítására használt reagensek, módszerek:

4.3.1 Új fluorofor reagensek szintézise: sikertelen.

A keletkező -SH csoport egyértelmű kimutatásására olyan reagens szükséges, amellyel gyorsan képződik a szulfhidril-csoportot tartalmazó peptidből reagens adduktja; az addukt stabil és szelektív a kimutathatósága, ill. megkülönböztethetősége (pl. intenzív jel és addukthoz rendelhető egyértelmű fluoreszcencia spektrum).

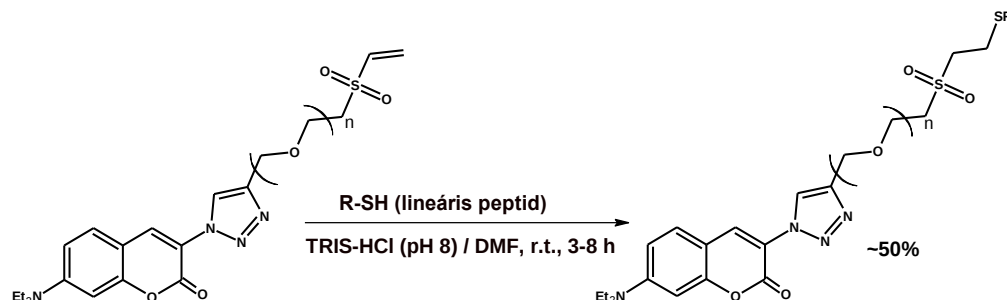
A) A 3-(4'-maleimidofenil)-7-(dietilamino)-kumarin – ez egy CPM²¹-analóg – előállítását 3-brom-7-(dietilamino)kumarinból próbáltuk Ullmann reakcióval. A brom-származék előállítása (Knoevenagel reakció és bromozás) sikeres volt, de az Ullmann reakció lejátszódását már nem sikerült kimutatni (NMR spektrum).

B) Előállítottuk a 7-hidroxi-4-metilkumarin és a fluoreszcein 2,4-dinitrobenzolszulfonil-észterét, egyik vegyület sem mutatott fluoreszcenciát. Tiolokkal reagálva azonban 2,4-dinitrotioészterek mellett SO_2 és 7-hidroxi-4-metilkumarin, illetve fluoreszcein keletkezik, melyek már fluoreszcens vegyületek. Az előkísérletek során azonban vegyületeink már az oldószerként alkalmazott vízzel, illetve metanollal is reagáltak, így nem szulfhidril-szelektívek.

4.3.2 7-(dietilamino)-3-(4-((2-(2-(vinilszulfonil)etoxi)etoxi)-metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-kumarin (VSC) reagens²² peptid adduktjai.

A peptid-VSH adduktképzési reakció követésére HPLC módszert dolgoztunk ki, amely alkalmas a jövőben a szintetizált peptid-VSC addukt segítségével a kvantitatív szulfhidril-meghatározásra. Az eredményeket konferencia előadáson²³ és poszteren²⁴ mutattuk be.

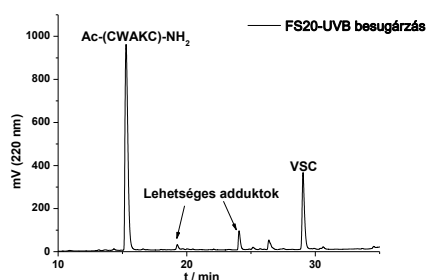
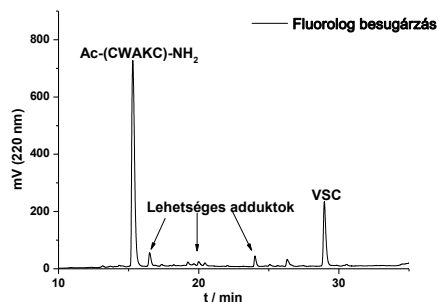
Optimalizáltuk az HS-csoport (lineáris peptid szabad S-csoportja) reakcióját a VSC reagenssel, illetve ennek linkerével (3-{2-[2-(vinilszulfonil)etoxi]etoxi}-prop-1-in, VS); a reakció követése HPLC-vel történt. Vizsgált körülmények: pH=6 - 8,5, T=20 - 37°C, peptid:VSC=1:4 arány



A lineáris modellpeptidekből Ac-C(Acm)WAKC-NH₂, Ac-CWAKC(Acm)-NH₂ és Ac-CWAKC-NH₂ állítottuk elő a megfelelő VSC származékokat, ahol az optimális körülmények a következők voltak: dimetilformamid-víz elegyben pH=7.9 értéknél szobahőmérsékleten, 20-30 perc alatt lejátszódott az adduktképzés. Az adduktokat izoláltuk és azonosítottuk (ESI-MS). Az addukt több órán keresztül stabil.

Jelenleg csak kvalitatív kimutatásra alkalmas a módszer, mert:

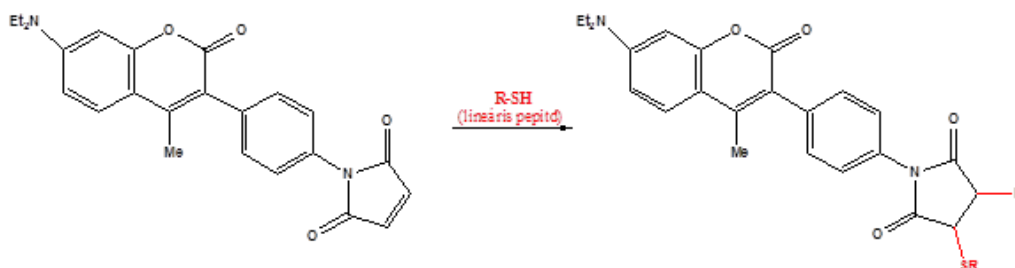
- a fotolízis során modelljeinkből csak kis százalékban keletkező peptid-VSC addukt gyenge jelintenzitást mutatott a HPLC kromatogramban, a jel-zaj arány nem optimális, így nem használható a csúcsok alatti terület összehasonlítására;
- az érzékenyebb fluoreszcencia mérés nem alkalmazható, mivel a VSC-reagens és a képződött peptid-addukt fluoreszcens spektruma átfed.



4.3.3 7-dietilamino-3-(4'-maleimidilfenil)-4-metilkumarin (CPM)²¹

A peptid-CPM addukt detektálását fluoreszcens-, LC-MS módszerekkel végeztük a peptidek fotolizált oldatából. Egy lineáris modellből előállítottunk peptid-CPM adduktokat (kalibrációs standard), amelyek teljes körű MS/MS analízise megtörtént. A peptidek fotolizált oldatában a keletkezett CPM-adduktok követése /meghatározása HPLC-vel nem egyértelmű. Ebből a témakörből született eredményeinket több poszteren mutattuk be és egy beküldött cikkben^{25a,b, 26,27}.

Ezzel a reagenssel végeztük a legtöbb eredményes kísérletet, jó egyezéssel kaptuk a parallel mérések értékeit.

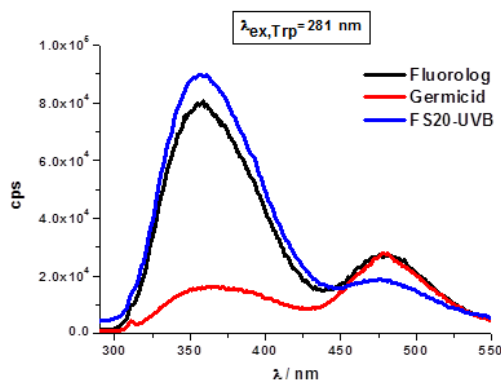


(CPM: $\lambda_{\text{ex}}=387$ nm, $\lambda_{\text{em}}=475$ nm)

CPM esetén a maleimidil-gyűrű kettős kötése és az SH között megy végbe a reakció, a képződött addukt erősebben fluoreszkál, mint a CPM-reagens

4.3.3.1 A peptid-CPM addukt detektálása (kvalitatív) fluoreszcenciával.

A fehérjéknél alkalmazott módszert követtük: a CPM reagenst DMSO-ban oldottuk, majd a törzsoldatot metanollal hígítottuk. A besugárzott peptidoldathoz ($c_{\text{peptid}}=35$ μM ; NH_4HCO_3 -puffer pH 7,5) adtuk a CPM-reagens DMSO/MeOH oldatát ($c_{\text{CPM}}=3.5$ μM). A reakcióelegy fluoreszcencia spektrumát 30 perc kevertetés után (az addukt képződése 25 °C-on) vettük fel $\lambda=395\text{-}680$ nm tartományban.



A különböző hullámhosszokon történt besugárzás hatékonyságát az Ac-ciklo(CWAKC)-NH₂ modellen vizsgáltuk a CPM reagens alkalmazásával, a keletkezett peptid-CPM addukt fluoreszcencia detektálása mellett.

Összehasonlítva a három hullámhosszon történt besugárzást:

A spektrumokban két emissziós maximum (357 és 478 nm) jelenik meg, a görbe lefutások hasonlóak. Mindhárom besugárzásnál közel azonos mennyiségű -SH képződött (l. a peptid-CPM addukt intenzitás értékei). A Germicid –lámpa esetében nagyon kicsi a Trp emissziós sávja $\lambda=357$ nm-nél, valószínűleg a besugárzás hatására erősen károsodott a Trp-oldallánca (oxidációs termékek). Ugyanakkor a várttal ellentétben nem keletkezett több szulfhidril viszonyítva a másik két hullámhosszhoz.

A legtöbb peptidmodell besugárzása főleg 280 nm (Tyr UV_{max}) és 290 nm (Trp UV_{max}) történt.

4.3.3.2 Újabb detektálási módszerek a peptid-CPM adduktok kimutatására a fotolizált oldatban.

Peptid-CPM adduktok HPLC – detektálása (poszter bemutatás)²⁴.

Az itt alkalmazott töményebb oldatok készítése szükségessé tette, hogy vizsgáljuk a CPM-reagens oldékonyságát (vízben $c\sim 50\text{mM}$, metanolban $c\sim 100\text{mM}$), a stabilitását (legalább 40-60 perc peptid-CPM addukt kialakulásához), a hidrolízist és a kimutathatósági határát. 30 perc után a CPM abszorbancia, ill. fluoreszcencia értéke megváltozik (CPM kiválása és /vagy hidrolízise). A méréseinknél minden esetben a peptid-CPM addukt képződését 30 perc reakcióidő után detektáltuk itt.

A CPM-peptid adduktok HPLC-azonosításához újabb szintetikus modellekre volt szükségünk. Elkészítettük Ac-C(Acm)**X**AKC(CPM)-NH₂, Ac-C(CPM)**X**AKC(Acm)-NH₂, Ac-C(CPM)**X**AKC (CPM)-NH₂ sorozatot (X=W, F) az általunk optimalizált reakciókörülmények között (DMSO, T = 37 °C, 4-24 óra, egy, illetve 2 ekv. CPM). A lineáris peptid-CPM származékok jól megkülönböztethetők voltak egymástól a HPLC kromatogramban. A fotolizált peptid oldat kromatogramjának kiértékelésénél problémát jelentett, hogy mind a CPM, mind a maradék ciklikus modell peptid intenzív jele mellett, a fotolízis-adduktoknak nagyon kis intenzitású csúcsai voltak jelen. Jelenleg a módszer a modellek besugárzásakor keletkezett HS-kimutatására csak *kvalitatív módszerként* alkalmazható.

A peptid-CPM adduktok LC-MS és MS/MS vizsgálata (poszter bemutatása és publikáció beküldve)^{25a,b}.

A modellek fotolízis termékeinek vizsgálatára LC-MS módszert is alkalmaztunk, fejlesztettünk. Mind a várt peptid-CPM, mind a melléktermékek azonosításához szükség volt a szintetizált Ac-C(Acm)**X**AKC-NH₂, Ac-C**X**AKC(Acm)-NH₂, AcC(Acm)**X**AKC(CPM)-NH₂, Ac-C(CPM)**X**AKC(Acm)-NH₂, Ac-C(CPM)**X**AKC(CPM)-NH₂ (X=W,F) sorozat tömegspektrometriás analizisére. Tanulmányoztuk a CPM jelzőmolekula pozíciójának hatását a peptidek MS/MS fragmentációjára. A tandem tömegspektrometriás mérések során ütközésindukált disszociációt (CID) alkalmaztunk. Eredményeink azt mutatják, hogy a CPM fluoreszcens jelzőmolekula segítségével történő szulfhidril-meghatározás kombinálható a tandem tömegspektrometriára épülő szerkezetvizsgálati módszerekkel, mivel a jelzővegyület karakterisztikus módon befolyásolja a peptidek MS/MS fragmentációját. A tandem tömegspektrumokban intenzíven jelentkeznek a módosulást hordozó fragmensionok, függetlenül attól, hogy a peptiden belül melyik cisztein hordozza a jelzőmolekulát. A karakterisztikus fragmensionok alapján a módosulás helye a szekvenciában pontosan lokalizálható és így lehetőség nyílik az egyes módosulási pontok nagy érzékenységgű, kvantitatív meghatározására is tandem tömegspektrometriával..

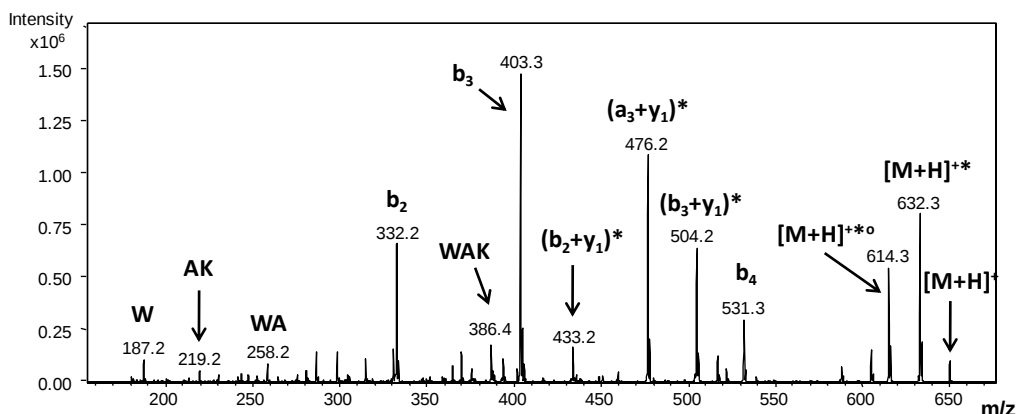
Peptid-CPM adduktok LC-MS vizsgálata a modell peptidek fotolizált oldatában.

A besugárzás, valamint adduktképzés során keletkező vegyületek azonosítására LC-MS vizsgálatokat végeztünk. A keletkező komponensek kromatográfiás profilját, molekulatömegét egy Bruker Esquire 3000+ ioncsapda típusú tömegspektrométerrel határoztuk meg. Ezután a legfontosabb összetevők szerkezetigazolásához on-line LC-MS/MS méréseket valamint nagyfelbontású tömegspektrométerrel (Waters Q-TOF Premier) pontos molekulatömeg-meghatározást végeztünk. A méréseink azt igazolták, hogy a keletkező peptid-CPM adduktok mellett több melléktermék is azonosítható^{9,28}, ezek a kromatogramban számos azonos molekulatömegű (izomer) csúcsként jelentkeztek. Azonosítottuk például a ciklikus peptidtioéter-, illetve oxidált triptofánt tartalmazó származékokat (több HPLC csúcs formájában); ciklikus peptideket, illetve az oligopeptidek dimerjeit; valamint a peptid-CPM adduktok szerkezeti izomerjeit (szintén több HPLC csúcsban).

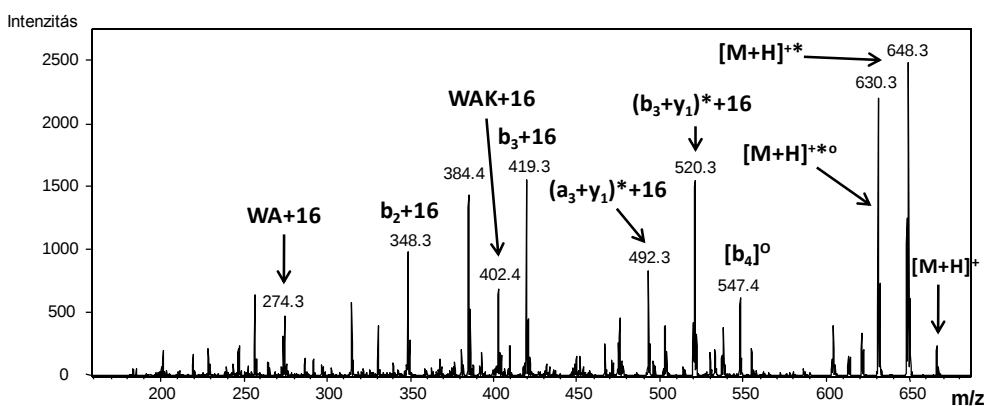
Az Ac-ciklo(CWAKC)-NH₂ modell peptid tandem tömegspektruma (A.) ábrán, valamint ezen peptid oxidált formájának LC-ESI-MS/MS spektruma (B.) ábrán látható.

Ábramagyarázat: A ciklopeptidből származó belső fragmenseket az aminosavak egybetűs kódjaival jelöltük. A diszulfidhíddal összekapcsolt fragmensionok zárójellel vannak jelölve. *jelet használunk a 17 tömegegység-vesztés (NH₃), míg ° jelet a 18 tömegegység-vesztés (H₂O) jelölésére.

A.)



B.)



A bemutatott MS/MS spektrumok alapján igazolható, hogy az oxidáció a triptofánon következett be.

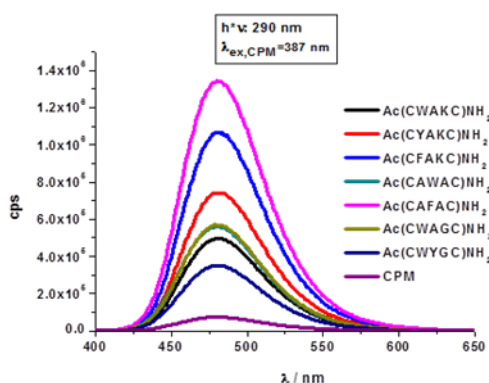
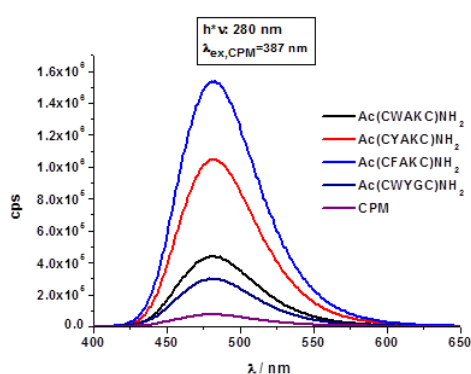
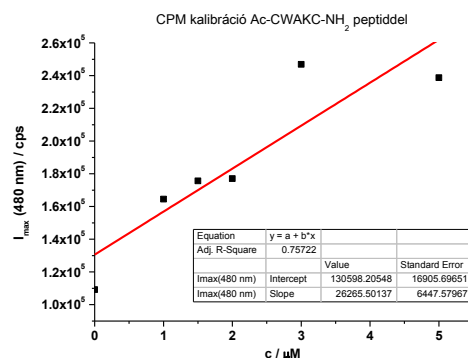
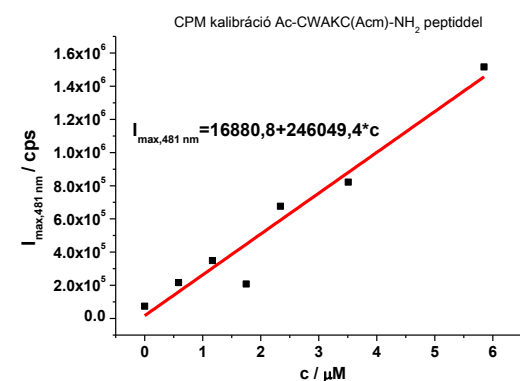
5. Szulfhidril-csoport kvantitatív meghatározása

Az eredményekből több poszter került bemutatásra és két konferencia összefoglaló született^{26,27,30}.

5.1 Peptid-CPM addukt mennyiségi meghatározása a besugárzott oldatokból fluorimetriával.

A modellek fotolízisekor keletkező szulfhidril kvantitatív kiértékeléshez **kalibrációs görbére** volt szükségünk. A lineáris peptid Ac-CWAKC-NH₂ (két szulfhidril-csoport) és az Ac-CWAKC (Acm)-NH₂ (egy szulfhidril-csoport) oldatát titráltuk CPM oldattal.

Mind a kalibráció értékeit, mind a modellek besugárzásakor keletkezett peptid-CPM mérési adatait 2-3 azonos minta új besugárzási adatainak átlagolásából nyertük.



Ciklikus pentapeptidek fotolízisének eredménye

Peptidek	Germicid 254 nm	UVB-lámpa 310nm	Fluorolog 280nm		Fluorolog 290nm		d(SS-X) / Å	d (Lys-X) / Å
	SH%*	SH%*	SH %*	SH %*				
Ac(CWAKC)NH ₂	4.10	4.31	6.44	7.24	7.91659	7.87089		
Ac(CYAKC)NH ₂	2.63		13.58	8.83	9.64502	10.07436		
Ac(CFAKC)NH ₂	3.95	2.47	9,62	8.09	10.3983	9.98268		
Ac(CVAKC)NH ₂	-	3.16	10.64	-	6.57262			
Ac(CAWAC)NH ₂	7.21		9.05	9.21	5.49121	-		
Ac(CAFAC)NH ₂			12.67	11.56	10.64513	-		
Ac(CAYAC)NH ₂			5.93	-	9.07417			
Ac(CWAGC)NH ₂	-		8.48	9.03	9.61117	-		
Ac(CYAGC)NH ₂	-		10.91	-	10.5157			
Ac(CWKAC)NH ₂	-		8.64	6.31	7,91659	7,87089		
Ac(CWYGC)NH ₂	-		3.26	3.89	-	-		

*SH%: a C_{mért}-ekre számolva; a CVAKC-, a CFAKC-, a CAFAC- és a CWYGC-szekvenciáknál a peptidtartalomra (75%) van számolva.

A fotolízis eredményeiből három poszter került bemutatásra^{26, 27, 30}.

Bár szisztematikusan elvégeztük a λ= 280, 290 nm-en a választott modellek besugárzását, a detektált –SH értékek közötti különbség, továbbra sem a triptofán (C_{ε2}), illetve aromás mag és a diszulfidhid közötti távolságnak (MM számolások vákuumban) megfelelő elvárást mutatta. Egyugyanazon sorozaton belül a Phe-t, Ty-t illetve Val-t tartalmazó modellek fentivel azonos

hullámhosszon történő besugárzásának eredményeként a detektált –SH% értékek magasabbak voltak, mint amit a Trp-t tartalmazó modellekben mértünk.

5.2 A besugárzott peptid minták vizsgálata LC-MS módszerrel

Az LCMS vizsgálatokat ugyanazokból a besugárzott ciklikus modellek oldataiból végeztük, amiből a kvantitatív fluoreszcens vizsgálatok (peptid-CPM addukt mérése) történtek.

A fotodegradáció mértékét itt a ciklikus modell peptidok elbomlott mennyiségére számoltuk.

	Besugárzott peptidok (c/μmol)	LCMS MH+/AUC alapján c/μmol	Besugárzás utáni bomlástermékek mennyisége %	SS⇌Trp(Cε2) d < 7 Å NMR-modell
Ac(CWAKC)-NH ₂	100	69.7	30	3.4% + kation-π
Ac(CFAKC)-NH ₂	100	12.4	87.6	
Ac(CWAGC)-NH ₂	96,7	81	16.3	0%
Ac(CYAGC)-NH ₂	100	80.2	20	
Ac(CAWAC)-NH ₂	100	65.9	44	33.4%
Ac(CAFAC)-NH ₂	99	74.68	24	

A λ=280-290nm-en besugárzott ciklikus modell peptidok 100μM-os oldatából 3 paralel injektálás történt az LC-MS készülékbe. A besugárzott ciklikus peptidokban a bomlási százalékot a *nem-besugárzott* ciklikus peptidok oldatából készült kalibrációs egyenes alapján számoltuk ki (a ciklikus peptid mennyiségének a fogyását a besugárzást követően). A kalibrációs egyenes 6 pontos volt: 10 és 200μM közötti koncentrációkban történtek a mérések, 50μl peptidoldat injektálásával minden esetben; és mérésekből 3 párhuzamos mérés készült. A mérések kiértékelése a tömegspektrum AUC (tömegcsúcs alatti intenzitás érték) alapján történt. A kísérleteknek nagy a szórása (5-10%). A detektált ciklikus peptid mennyiségének változása százalékosan van megadva a táblázatban. Ezek az értékek azt mutatják, hogy milyen mértékű magának a ciklikus peptidnak a fotodegradációja. Eszerint a fluoreszcenciával detektált szulfhidril-csoportok (diszulfid hasadásának egyik terméke) mellett nagy százalékban vannak más termékek is jelen a vizsgált fotolizált oldatban. A tömegcsúcsok további analizisével a bomlástermékek és a keletkezett szulfhidril-csoportok arányát reméljük kimutatni az azonosításuk segítségével. A módszer ezek után alkalmas lesz a szulfhidril-csoportok kvantitatív meghatározására

A két kvantitatív módszerrel kapott HS-mennyiségek reális megítéléséhez és így a triptofán (illetve más aromás oldallánc) szerepének megállapításához a fotolízisben, még szükség van az LC-MS kromatogramokban lévő termékek pontos tömeganalízisére, amelyek folyamatban vannak.

6. Szerkezet-hatás összefüggés, azaz oldatbeli konformációs viszonyok (ROA, NMR, ECD)

A fotolízisben vizsgált modelleket az MM-számolások vákuumban kapott eredményei alapján választottuk ki. Elképzelhető volt, hogy az itt kapott legkisebb energiájú konformerek különböznek a modellek oldatfázisban felvett konformációtól és a diszulfidhíd fotolízise oldatfázisban történt. Tanulmányoztuk a modellek oldatbeli konformációját, főleg az aromás

mag és diszulfidhíd közötti távolságot. A távolság megállapításának szempontjából két módszer tűnt elérhetőnek: a ROA és az NMR spektroszkópia.

6.1 ROA mérésekkel (ELTE, Kémiai Intézet, KSzL) tanulmányozható vizes közegben a Trp és diszulfidhíd távolsága, amelyre számos irodalmi példa van³¹. A Raman spektroszkópia alkalmazható az HS-csoportok kvantitatív meghatározására is. A módszernél az alkalmazott koncentráció ~20-100 mg/ml, amit a ciklopeptidek modellekénél nem sikerült megvalósítani rossz oldékonyságuk, ill. gélesedésük miatt sem vízben, sem metanolban. Így ez nem járható út.

6.2 NMR spektroszkópiai mérésekre három Trp-tartalmú ciklopeptid modellt választottunk ki, ahol a Trp-SS távolság különböző az MM számolások szerint: Ac-ciklo(CWKAC)-NH₂ (**KK1**, $d_{SS-Trp}=7.952\text{\AA}$), Ac-ciklo(CAWAC)-NH₂ (**KK2**, $d_{SS-Trp}=5.491\text{\AA}$) és Ac-ciklo (CWAGC)-NH₂ (**KK3**, $d_{SS-Trp}=9.611\text{\AA}$)

Az NMR-alapon történő molekulamodellezést Kövér Katalin prof. témavezetésével, Nagy Tamás Milán kémia BSc. hallgató végezte a Debreceni Egyetemen³².

A három ciklikus peptid NMR-alapú molekulamodellezése a következő vázlattal mutatható be:

a) NMR spektrumok felvétele oldatfázisban

A ¹H-¹H COSY, TOCSY, ROESY ¹H-¹³C HSQC NMR felvételek a Bruker Avance II 500MHz készüléken történtek DMSO oldószerben

b) jelhozzárendelés

c) konformációs kényszerfeltételek megállapítása

d) háromdimenziós szerkezet

e) a szerkezet finomítása (a peptidek főláncának jellemzése és konformer-családokba való csoportosítása)

2D Szerkezetszámolást ROESY intenzitás adatokból *AtnosCandid* algoritmussal végeztek. A molekuladinamikai vizsgálatok GROMACS 4.5.5 programcsomaggal történtek. Az intra-molekuláris hidrogén-hidak feltérképezésére hőmérsékletfüggő mérések is történtek (298, 303 és 308 K egy dimenziós proton-spektrumok felvétele). A vizsgálatok alapján kiderült, hogy Ac-ciklo(CWKAC)NH₂ (KK1) és Ac-ciklo(CAWAC)NH₂ (KK2) peptid hasonló flexibilitással rendelkezik, míg az Ac-ciklo(CWAGC)NH₂ (KK3) hozzájuk képest merevnek mondható.

A másodlagos szerkezeti elemek előfordulását, illetve a szerkezetfinomítást követően kapott szerkezeti sokaságokban a távolság-kritériumot teljesítő konformerek %-os megoszlását a következő táblázat mutatja:

	β-kanyar (I)	β-kanyar (II)	β-kanyar (IV)	β-kanyar (VIII)	γ-kanyar (inverz)	3 ₁₀ hélix	SS-Trp $d < 7\text{\AA}$	Trp(Cε2)-K(εN) $6\text{\AA} < d < 10\text{\AA}$
Ac-c(CWKAC)NH ₂	29,3 %	0,3 %	23,6 %	0,5 %	0,3 %	1,2 %	3,4%	46%
Ac-c(CAWAC)NH ₂	0,6 %	-	30,6 %	1,0 %	7,8 %	-	33,4%	-
Ac-c(CWAGC)NH ₂	43,7 %	-	10,7 %	-	0,2 %	-	0%	-

Ezek alapján a „kritikus távolságok” vizsgálata a ciklikus modellekben a következő jóslásokat engedi meg:

Ac-ciklo(CWKAC)NH₂ (KK1) A Trp- és az SS-híd távolsága 8-10 Å között fluktuál, azaz a fotolízist nem segíti elő a Trp. A dinamika során viszont olyan szerkezetek is előfordultak, ahol 7 Å alá kerül ez az érték (3,4 %). A kation-pi kölcsönhatás a Lys protonált oldalláncának

nitrogénatomja és a Trp(Cε2) között távolságtartomány 6-10 Å a trajektóriák jelentős részében (46%). Ez geometriailag megengedi a kölcsönhatás létrejöttét, elősegítheti a diszulfid-híd nagyobb mértékű fotolízisét

Az Ac-ciklo(CAWAC)NH₂ (KK2)modellben a dinamika során a diszulfidhíd-indolgyűrű távolság jelentősen változik, egyaránt megjelennek a kölcsönhatást megengedő (33,4%) és a kölcsönhatáson kívüli távolságtartományok is.

Az Ac-ciklo(CWAGC)NH₂ (KK3) dinamikájában a triptofán-diszulfidhíd távolság az egész dinamika mentén nem változott nagyon és kívül esett azon a távolságon, amely elősegíthetné a fotolízist. Az -SH mért értéke viszont a vizsgált modellek között a λ=290nm besugárzásnál a legnagyobb!

Peptid modellek	SS⇌Trp(Cε2) (MM-számolás)	SH% λ=280nm	SH % λ=290nm	SS⇌Trp(Cε2) d < 7 Å NMR-modellezés
Ac-c(CWKAC)-NH ₂ (KK1)	7.95261 Å	8.64	6.31	3,4 % és a kation-π hatás
Ac-c(CAWAC)-NH ₂ (KK2)	5.491 Å	9.05	8.71	33.4 %
Ac-c(CWAGC)-NH ₂ (KK3)	9.61117 Å	8.48	9.03	0 %

Az eredmények szerint³⁰:

- SS⇌Trp(Cε2) távolság és a Trp(Cε2)-K(εN) jó egyezést mutatott a vákuumban történt számolás és az NMR-vizsgálatok alapján az MD szerkezetfinomítást követően kapott szerkezeti sokaságok adataival;
- A kapott konformerek hasonlóak, kisebb különbségek mutatkoznak a flexibilis oldalláncok elhelyezkedésében és a főlánc konformációjában (különböző másodlagos szerkezeti elemek jelenléte).
- A fotolízis eredményei, a fluoreszcenciásan detektált HS-értékek nagysága, nem magyarázhatók a Trp-SS híd távolságával, azaz további vizsgálatokat indokoltak. Ugyanakkor a ciklopeptidek fotodegradációjának mértékénél – jelenlegi LCMS/Ms adataink és feltételezésünk szerint – lehet szerepe a Trp-SS távolságnak.

6.2 További konformációs vizsgálatok: ECD mérések

6.2.1 Az NMR-rel vizsgált három ciklikus modell ECD oldószeres méréseit és a spektrumok oldószermodelles számolásait is elvégeztük. A Trp-tartalmú mintákat, Ac-ciklo(CWKAC)-NH₂, Ac-ciklo(CAWAC)-NH₂, Ac-ciklo(CWAGC)-NH₂ vízben, acetonitrilben és trifluoetanolban vizsgáltuk, majd ezek szekvencia-analógjait is mértük. A Trp-modellek vízben készült spektrumaiból kapott adatok az NMR-mérésekhez kiegészítő információkat adhatnak a konformációs viszonyokra nézve, de a különböző oldószerekben felvett spektrumok segítségével a peptidgerinc oldószer-érzékenysége is kapunk adatokat. Az egyazon szekvenciában változtatott aromás aminosavak segítségével pedig adatokat kaphatunk a másodlagos szerkezetvizsgálatban a Trp-aminosavrész ECD-spektrális hozzájárulásáról. A Trp-tartalmú modellekből elméleti számolások is készültek, illetve folyamatban vannak. (Fehér Domonkos, Kémia MSc. szakdolgozati témája.)

ECD spektroszkópiában jól megkülönböztethető egymástól a β-I(III), β-II és γ-kanyar, de nem szignifikáns a többi kanyar-típus ECD spektruma. Ha egymás mellett azonos mennyiségben több típusú kanyarszerkezet, valamint más, nem tipikus H-kötéses szerkezet is jelen van, a spektrumok átfednek, így széles lesz az ECD-sáv – jelenleg csak kvalitatív értékelés van.

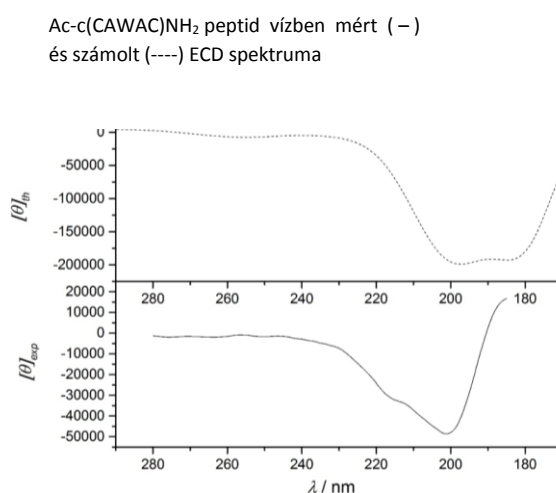
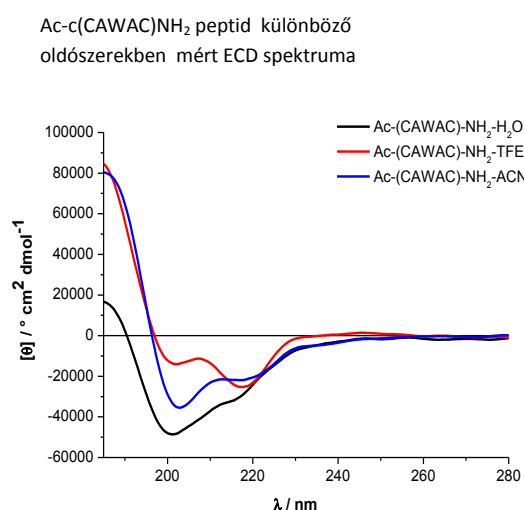
A vízben mért ECD spektrumok az adott szekvenciájú modellnél, többféle kanyarszerkezet egyidejű jelenlétére engednek következtetni, de nem tipikus H-kötéses szerkezetek is jelen

vannak. Így az ECD nem adott kiegészítő információt az NMR vizsgálatokból kapott másodlagos szerkezetekhez. A trifluoretanol oldószerben a konformer arány eltolódott a rendezettebb és stabilabb kanyarszerkezetek javára, megjelennek a jellegzetes kanyarszerkezetre jellemző spektrumok (jelenleg értékelésük folyik).

Az ECD görbék elméleti számításai Gaussian® programcsomaggal történtek. A spektrumok számításához az idő-függő sűrűség funkcionál elmélet (*Time-dependent Density Functional Theory*, TD-DFT) módszert használtuk³³. A számítások a 6-31G* bázison történtek. Oldószermodellnek a polarizálható kontinuum modell integrál egyenlet formalizmusú (PCMIEF)³⁴ verzióját használtuk vízre paraméterezve.

A TD-DFT módszerrel az első 100 gerjesztett állapotot kerestük meg. Ez legtöbbször elegendő volt a mérési tartomány lefedésére. A kiindulási szerkezetek NMR spektrum alapján lettek megállapítva. A spektrum számítása előtt elvégeztünk egy geometriai optimálást is az adott szinten. A módszer – és a bázisfüggés vizsgálatakor, ugyanazt a szerkezetet (B3LYP/6-311G* szinten optimáltat) használtuk az összes számítás esetében.

Az Ac-ciklo(CAWAC-NH₂) modell esetén, az elméleti úton számolt spektrum jó egyezést mutat a mért spektrummal. A számolt spektrumban a csúcsok eltolódnak a kisebb hullámhosszak felé (~20 nm), de a spektrum lefutása megegyezik. Az elméleti spektrumban két azonos intenzitású csúcsot látunk, a mért spektrumban a nagyobb hullámhossznál lévő csúcs jóval kisebb, mint a másik.

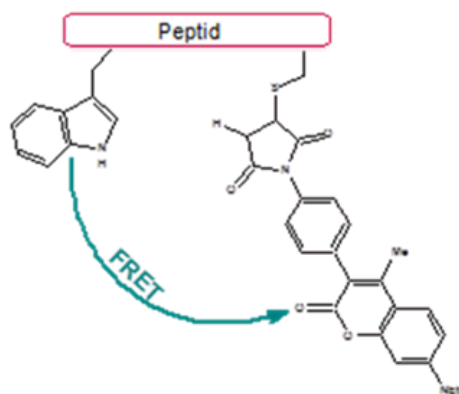
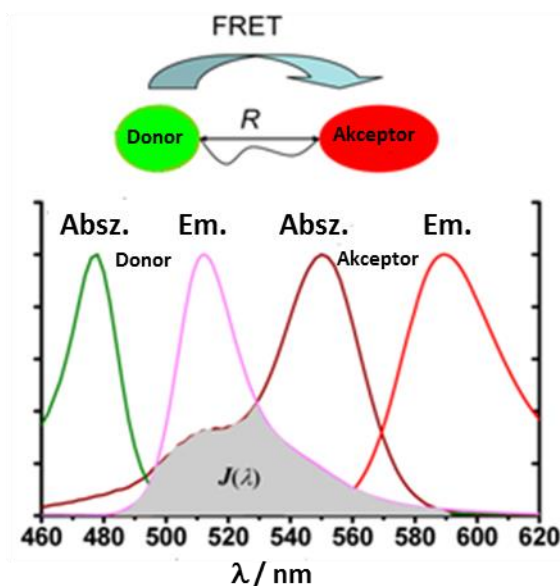


A másik két Trp-tartalmú ciklikus modellnél nincs jó egyezés a mért és a számolt spektrum között. Így szükségesnek látszik, hogy további konformáció-vizsgálatot végezzünk el.

6.2.2 Ciklikus peptid-sorozatban vizsgáltuk a diszulfidhíd, illetve a tioéter-híd konformációra gyakorolt hatását is NMR-ECD komplex spektroszkópai módszerrel. Eredményeinket a *J.Med.Chem.* folyóiratban (2015) publikáltuk³⁵.

7. FRET jelenség kiszűrése/kihasználása

A képződött peptid-CPM adduktban a Trp- és CPM-rész között elképzelhető a FRET-jelenség (Förster rezonancia energia transzfer). Ez két szempontból is fontos: egyrészt, hogy a fluoreszcens méréseknél megjelenhet-e (esetlegesen rontva a kiértékelést), másrészt hogy a Trp és SS-híd közötti távolság megállapításánál használhatjuk-e.

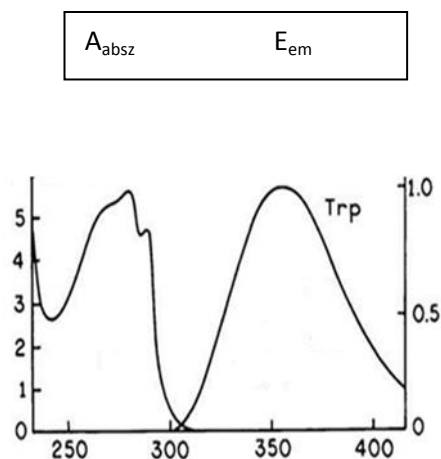
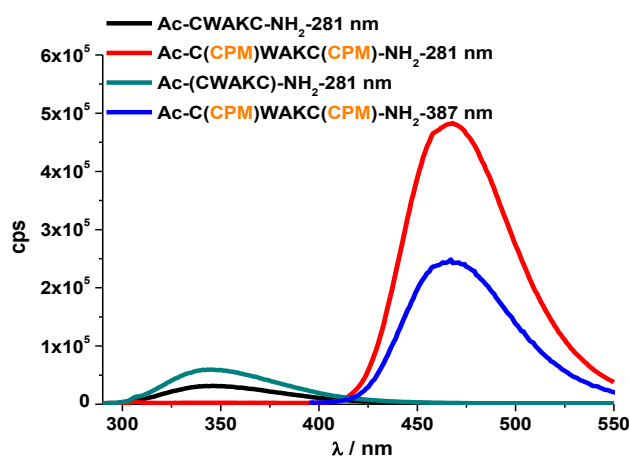


A FRET olyan folyamat, amely akkor következik be, ha egy fluorofor emissziós spektruma átfed az akceptor molekula (például a kvencser) abszorpciós spektrumával⁶. A besugárzásakor kapott peptid-CPM adduktok fluoreszcenciás mérésénél minden esetben detektáltuk a FRET-hatást.

7.1 Peptid-CPM adduktok vizsgálata a FRET-hatás szempontjából (poszter)²⁴

A szintetizált és azonosított lineáris peptid-CPM adduktok sorozata, Ac-CWAKC-NH₂ lineáris peptid, ill. származékai Ac-C(Acm)WAKC-NH₂, Ac-CWAKC(Acm)-NH₂, Ac-C(Acm)-WAKC(CPM)-NH₂, Ac-C(CPM)WAKC(Acm)-NH₂, Ac-C(CPM)WAKC (CPM)-NH₂ alkalmas volt arra is, hogy a FRET-hatást vizsgáljuk.

Spektrum felvétel: Jobin-Yvon Fluorolog 4 spektrofluoriméter, $l=1$ cm, $\lambda_{\text{ex,W}}=281$ nm, $\lambda_{\text{ex,CPM}}=387$ nm $\lambda_{\text{det}}: 290\text{-}550$ nm és $395\text{-}680$ nm; $c=5$ mM, CH₃OH



Jobb oldali ábrán a Trp abszorpciós (A) és emissziós (E) spektruma⁶

Mint a fenti ábrán is látható, a lineáris Ac-CWAKC-NH₂ és a ciklo Ac-ciklo(CWAKC)-NH₂ egy emissziós maximummal rendelkezik 346 nm-nél (Trp-sáv). A CPM-peptid addukt koncentráció fluoreszcencia spektrumok alapján történő kvantitatív meghatározásakor a gerjesztés 387 nm-en történik, a spektrumokat 395-680 nm-es tartományban rögzítjük. A Trp elnyelési sávja nem tartalmazza az adott gerjesztési hullámhosszat, így az ebből eredő torzító hatásra nem kell számítanunk. Ez a szabad HS-meghatározásnál fontos tényező. **A besugárzási**

kísérleteknél nem zavaró tényező a fellépő FRET-jelenség, nem kell korrigálni vele a mért spektrumokat.

Ugyanakkor a Trp emissziós spektruma megfelelő átfedést mutat a CPM 300-400 nm között elnyelési sávjával, ami felvetette a FRET felhasználási lehetőségét a szerkezet meghatározásában. Sajnos azonban a CPM egy további elnyelési sávval rendelkezik az 220-300 nm közötti sávban (emissziós maximum: 281nm), ami nem különíthető el a Trp elnyelési (gerjesztési) sávjától. ***Így, habár megjelenik az energia transzfer a kromofórok között, az távolság meghatározására nem alkalmazható.***

7.2 Modell peptid szekvenciájába épített fluorofór – sikertelen (poszter)³⁶

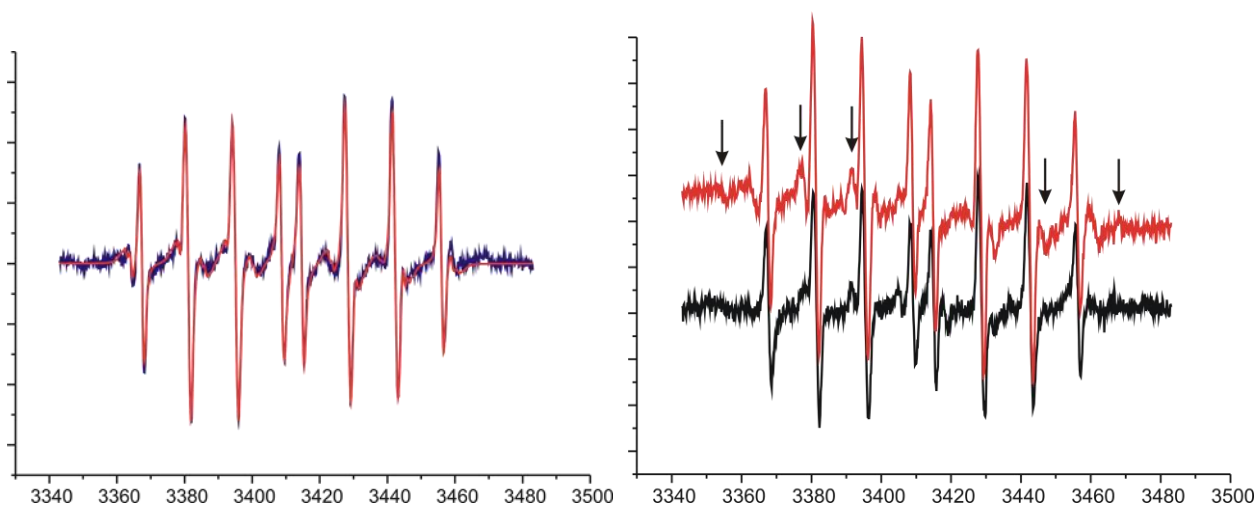
Irodalmi adatokat kerestünk olyan reakcióra, amely során szekvencia módosítással (pl. glutaminsav beépítése) és "klikk" reakcióval a peptidmodellbe be tudunk építeni fluorofór-részt, és így a kérdéses távolságokat a (Trp-diszulfidhíd, valamint kation-pi kölcsönhatás) FRET-mérésekkel tisztázni tudnánk. Előkísérletként réz katalizátor helyett ródium-katalizátorral vizsgáltuk a szulfid-csoport stabilitását, metionint/metionin-származékokat alkalmazva modell vegyületnek. Sajnos az alkalmazott diródium-teraacetát a vizsgált körülmények között komplexet képzett a modell vegyülettel és nem katalizátorként működött.

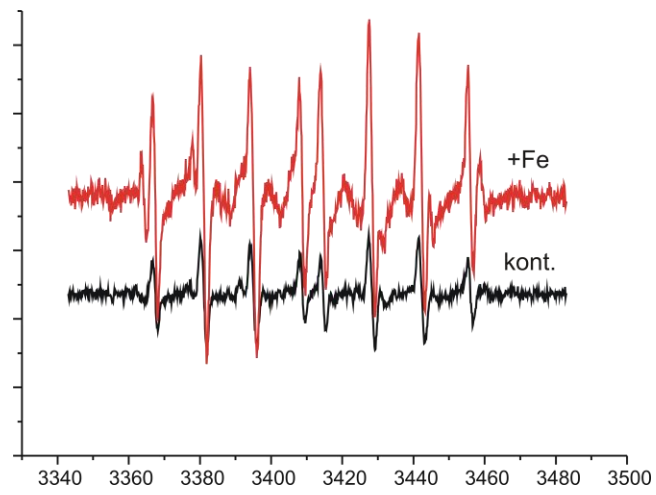
8. Peptid modellek ESR-vizsgálata (poszterek bemutatása)^{29, 37}

A különböző hullámhosszon ($\lambda = 280, 290, \sim 305$ nm) besugárzott peptid oldatok ESR-vizsgálata is megtörtént. A CPM-reagenssel történő fluoreszcenciás mérésekkel párhuzamosan a kontroll és a besugárzott mintákhoz a besugárzás végén, NH_4HCO_3 -puffer oldatban (5mM, pH=7.5) DEPMPO-gyökfogót — 5-(Diethoxy-phosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxid — adtunk, amivel a besugárzás során felszabaduló paramágneses gyököket kívántuk detektálni. Az oldatokat minden esetben, az irodalmi hivatkozások alapján Ar-gázzal oxigénmentesítettük. A kontroll és a besugárzott mintákat a méréseket követően közvetlenül, vagy – 80 °C-on történt tárolás után mértük. A kontroll minták esetén kettős kontrollt alkalmaztunk. Egyrészt a besugárzás nélküli peptid minták oldatait, másrészt a peptideket nem tartalmazó oldatokat besugároztuk (azonos körülmények a peptid oldatokéval) és mindkettőnél mértük a gyökfogó jelenlétében képződő paramágneses gyököket. Megfigyeléseink az összes minta esetén azt mutatták, hogy a szélessávú UVB/UVA besugárzás hatására mind a peptid jelenlétében, mind peptidmentes esetben oxigén- és széncentrumú szabadgyökök is képződtek, amik a gyökfogóval kimutathatók voltak. Ezek a gyökös termékek azonban, csak újbóli, az EPR-mérések alatti besugárzás hatására voltak detektálhatók, míg a minták ismételt UV-besugárzás nélkül csak a spektrométer érzékenységi küszöbébe eső mennyiségű szabadgyökmennyiséget tudtunk detektálni. Ezek a megfigyelések arra mutattak, hogy az irodalomban ismert reakciók alapján az NH_4HCO_3 -ból UV-besugárzás hatására, esetleg a vízmolekulák fotolízisekor keletkező köztes termékek, OH^* , OOH^* és O_2^- , hatására is CO_2^- -adduktum keletkezik. A kapott ESR-spektrumok azonban azt is mutatták, hogy leszámítva az -OH és esetleg O-centrumú gyököket, a keletkező nitroxid-vegyületek nagyon hamar elbomlanak. Ezt elősegítik a ciklikus diszulfidhidak felszakadásakor keletkező SH-csoportok, amik a már keletkezett gyökös adduktumokat redukálni képesek. Az UV-besugárzás hatására a diszulfidhidakból diszulfid-anion gyökök is képződhetnek, amiknek igen erős a redukáló képességük^{38,39}. Kísérleti stratégiánk ennek megfelelően kiegészült azzal, hogy az eddig használt pufferek helyett foszfátpuffert alkalmaztunk, és az UV-besugárzás után enyhe redukálószerrel, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, kívántuk a képződött, a DEPMPO által befogott, de redukálódott gyököket ismét EPR-aktív nitroxid

vegyületekké oxidálni. (Kísérleti körülmények: NH_4HCO_3 , foszfát (pH >7,2-7,8); a pufferek végkoncentrációja 20 mM (+2mM DTPA); 20 mM DEPMPO. $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ hozzáadásakor az oxidálószer koncentrációja 0,5 mM. UV-forrás: FS20 (4x 15W; WG-305 szűrővel) irradiancia UVB(312 nm): 1,5 mW/cm²; UVA(365 nm): 0,50 mW/cm². Maximális dózis: 8,1 kJ/cm² (UVB); 2,7 kJ/cm². Vizsgált ciklo-peptidek: Ac-c(CWAKC)-NH₂ (0,4 mM) és Ac-c(CYAKC)-NH₂ (1 és 0,4 mM). **EPR spektroszkópia:** X-sávú (9,5 GHz Bruker EMX6) mérés; spektrumtartomány 140 gauss; modulációs frekvencia/amplitúdó 100 kHz/1gauss, 1024 pont (~0,137 gauss felbontás); 83,8 s mérési idő; 20,48 ms időállandó; 64 scan; 20 mW mikrohullámú teljesítmény. **Spektrumszimulációk:** izotróp gyorsforgású spektrumok P, N valamint β - és γ -H-nek hiperfinom csatolási állandóinak figyelembe vételével; az illesztett γ -H-nek maximális száma három. Nem-lineáris spektrum-illesztés a kísérleti spektrumokhoz a Levenberg-Marquardt algoritmus alapján. Maximálisan három spektrális komponens illesztése lehetséges. A spektrumszimulációkhoz szükséges kiindulási adatok becslése a kísérleti spektrumokon mérhető felhasadások, valamint a vonalak száma alapján lehetséges.

A következő ábrán összefoglaljuk a kapott főbb eredményeket. UVB/UVA szélessávú besugárzás hatására a peptidmentes foszfát pufferben is képződnek oxigén-alapú szabadgyökök, amik a DEPMPO-val csapdázhatóak. A peptideket (az ábrán pl. Ac(CYAKC)NH₂ modell) tartalmazó minták UV-besugárzásakor további szén-centrumú gyökök is képződnek, amik a besugárzást követően/közben gyorsan elbomlanak. Enyhe oxidálószer hatására az EPR inaktív hidroxilaminok detektálható mennyiségű nitroxid-származékká alakulnak vissza.





9) Fehérjék és fehérje-fragmensek vizsgálatai

Az immunoglobulin fehérjecsaládba tartozó 28 kDa-os fehérje-fragmens, a 82D6A3 monoklonális antitrombotikus antitest és mutánsainak fotolízisével kapcsolatos eredményeinket összefoglaló publikáció 2014-ben jelent meg az *International Journal Biochemistry Research & Review* (JBcRR)⁷ folyóiratban. A fehérje-fragmens két diszulfid hidat és öt Trp-t tartalmaz, melyből három Trp a diszulfid hidak közvetlen közelében található. Korábbi együttműködés révén a fotolitikus hasadást tanulmányoztuk a vad, illetve a Trp – SS-triádhhoz tartozó Trp-Phe mutánsokon. Eredményeink igazolták, hogy a Trp közelsége révén szulfhidril-csoport(ok) keletkeztek, ami szerkezetváltozást és a biológiai aktivitás csökkenéséhez vezetett.

A fehérjék fluoreszcens vizsgálatainál mindig felmerül a *kvenccselés* jelensége, akár mint probléma, akár mint a triptofán aminosavrész mikro környezetének változását mérő módszerek standardizálásánál. Ez utóbbi mérés pl. információkkal szolgál a fehérje dinamikai és konformációs változásainak tisztázására. Ezzel kapcsolatosan vizsgáltunk több fehérjét különböző fiziko-kémiai eljárásokkal⁸, eredményeinket a *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* folyóiratban publikáltuk 2013-ban.

ÖSSZEFOGLALÁS

A pályázat fő eredményeinek a következőket tartjuk:

- 1) Sikert az MM modellezések alapján három pentapeptid sorozatot (különböző aromás oldalláncok, kationos oldallánc) találni, amelyek megfelelnek a fehérjék aromás oldallánc befolyásolta UV-VIS hatására lejátszódó fotolízisét tanulmányozni.
- 2) Szintetikus peptidtárat hoztunk létre, melyek több hullámhosszon történő besugárzásával sikerült a diszulfidhidak fotoredukcióját tanulmányozni.
- 3) A fotolízis során keletkező **szulfhidril-csoportok** reakcióelegyben történő **kimutatására** és **kvantitatív meghatározására** különböző módszereket dolgoztunk ki (fluoreszcens, HPLC, LCMS).
- 4) A CPM-jelzőmolekulával képződött peptid adduktok esetében nem tudtuk kihasználni a FRET-jelenséget az aromás mag és a diszulfidhíd közötti távolság meghatározására. De a jelenség a fluoreszcens méréseket sem zavarta
- 5) A 7-dietilamino-3-(4-maleimidofenil)-4-metilkumarin – CPM, fluoreszcens jelzőmolekula segítségével történő kvantitatív szulfhidril-meghatározás jól kombinálható a tandem tömegspektrometriára épülő szerkezetvizsgálati módszerekkel, mivel a jelzővegyület karakterisztikus módon befolyásolja a peptidek MS/MS fragmentációját. A karakterisztikus fragmensek alapján a módosulás helye a szekvenciában pontosan lokalizálható.
- 6) A ciklikus pentapeptid modellek oldatbeli konformációs viszonyainak tisztázására NMR és ECD vizsgálatokat végeztünk. Az így meghatározott kritikus távolságok (aromás mag-diszulfidhíd; kation- π hatás) a modellben közel azonosak voltak az MM vákuumban végzett számolások jóslataival. Megállapítottuk, hogy a kis tagszámú peptid modelljeinkben sok konformer van egyidejűleg jelen, a kritikus távolságok viszonylag tág határok között mozognak.
- 7) Adataink szerint, a ciklikus pentapeptid modellek fotolitikus reakcióiban keletkezett szulfhidril-mennyisége nem függ össze a modellekben található aromás aminosavak minőségével, sem a korábbi adatok szerinti optimális távolságokkal.

- 8) A fotolitikus termékeket vizsgálva számos oxidációs reakcióterméket találtunk. Ugyanakkor a ciklikus peptidek fotodegradáció-mértékénél - a jelenlegi LCMS és MS/MS adataink és feltételezésünk szerint – lehet szerepe az aromás mag és a diszulfidhíd távolságnak.
- 9) ESR spektroszkópiai vizsgálataink szerint az UVB/UVA szélessávú besugárzás hatására a peptidmentes használt pufferekben is képződnek oxigén-alapú szabadgyökök, amik a DEPMPO-val csapdázhatóak. A modell peptideket tartalmazó minták UV-besugárzásakor további szén-centrumú gyökök is képződnek, amik a besugárzást követően/közben gyorsan elbomlanak.
- 10) Sikerült egy újabb fehérjefragmens esetében igazolni a Trp-közvetítette fotodegradációt, valamint adatokkal közelebb kerülni a fehérjék vizsgálatánál fontos kvencselések elemzéséhez.

IRODALOMJEGYZÉK

- 1) Bent, D. V. , Hayon, E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 2612
- 2) Vanhooren, A., Devreese, B., Vanhee, K., Van Beeumen, J., Hanssens, I.: *Biochemistry* **2002**, 41, 11035
- 3) Neves-Petersen, M.T., Gryczynski, Z., Lakowicz, J., Frojan, P., Pedersen, S., Petersen, E., Petersen, B.S.: *Protein Sci.* **2002**, 11, 588
- 4) Bhattacharya D., Basu, S., Mandal, P.C.: *J. Photochem. Photobiol. B, Biology* **2000**, 59, 54
- 5) Illyés, E., Majer, Zs., Hanssens, I. *Biochim. Biophys. Acta (Proteins and Proteomics)*, **2006**, 1764, 1586
- 6) Lakowicz, J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York **1999**.
- 7) Illyés, E., Staelens, S., Vanhooren, A., Deckmyn, H., Hanssen, I., Majer, Zs.: *Int. J. Biochem. Research & Review*, **2014**, 4(5), 364
- 8) Bódis, E., Raics, K., Nyitrai, M., Majer, Zs., Lukács, A.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **2013**, 129, 108
- 9) Mozziconacci, O., Schöneich, C.: *Mol. Pharmaceutics*, **2014**, 11, 3537
- 10) Mozziconacci, O., Sharov, V., Williams, T.D., Kerwin, B.A., Schöneich, C.: *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112, 9250
- 11) Ioeberger, T.M., Du, Ch., Linthicum, D.S.: *Molec. Immunology*, **1999**, 36, 373
- 12) Samanta, U., Pal, D., Chakrabarti, P.: *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **2000**, 38, 288
- 13) Burley, S. K., Petsko, G. A.: *FEBS Letters*, **1986**, 203, 139
- 14) Czírók Márton: *Kation- π kölcsönhatás szerepe a diszulfid-hidak fotolízisében* (ELTE, Kémiai alapszak, szakdolgozat) **2013**.
- 15) Bent, D. V., Hayon, E.: *J. Phys.chem.*, **1975**, 97, 2599
- 16) Albericio, F. *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide (1st edition)*. CRC Press: Boca Raton, **2000**
- 17) Eftink, M.R., Ghiron, C.A.: *Anal Biochem*, **1981**, 114 199
- 18) Calvert, J.G. , Pitts Jr., T.N.: *Photochemistry*, **1967**, John Wiley & Sons., New York
- 19) Eilman, G.L.: *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82, 70
- 20) Sletten, E.M., Bertozzi, C.R.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6974
- 21) Ayers, F.C., Warner, G.L., Smith, K.L., Lawrence, D.A.: *Anal. Biochem.*, **1986**, 154, 186
- 22) Cserép, G.B., Baranyai, Zs., Komáromy, D., Horváti, K., Bösze, Sz., Kele, P.: *Tetrahedron*, **2014**, 70, 5961
- 23) Knapp K., Nemes A., Cserép G.B., Kele P., Csík G., Majer Zs.: *Peptidek fotolízisének vizsgálata tiolspecifikus fluoreszcens jelzővegyületekkel XX. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Kolozsvár (Románia)*, **2014**, előadás, 66. old.
- 24) Knapp, K., Nemes, A., Cserép, G.B., Kele, P., Csík, G., Majer, Zs.: *Thiol-specific fluorescent labels for monitoring UV mediated disulfide scission*, 20th International Conference on Organic Synthesis, ICOS-20, Budapest, **2014**, poszter
- 25) Knapp, K., Majer, Zs., Schlosser, G.: *Journal of Mass Spectrometry*, **2015** beküldve; Knapp K., Majer Zs., Illyés E., Schlosser G.: *Szulfhidril-csoportok azonosítása peptidekben fluoreszcens jelzés és tandem tömegspektrometria kombinálásával*, MKE 2. Nemzeti Konferencia, Hajdúszoboszló, **2015**, poszter

- 26) Illyés, E., Knapp, K., Csík, G., Majer, Zs.: *Role of cation- π interaction in the photolysis of disulphide bridge containing cyclic model peptides*. 32-EPS poszter, in PEPTIDES **2012** Proceedings of the 32nd European Peptide Symposium (Eds. G. Kokotos, V. Constantinou-Kokotou, J. Matsuoka), 678-9 old.
- 27) Csík G., Gróf P., Knapp K., Nemes A., Majer Zs.: *Trp-mediated photo reduction of disulfide bonds modelling by peptides*, poszter és konferencia összefoglaló in *Peptide Science 2013* (Proceedings of 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/50th Japanese peptide Symposium, November 6-8, 2013 Osaka, Japan, Eds. Yuji Nishiuchi, Tadashi Teshima), p. 185-8
- 28) Pattison, D.I., Rahmanto, A.S., Davies, M.J.: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2012, 11, 38
- 29) Majer, Zs., Nemes, A., Knapp, K., Cserép, G.B., Kele, P., Csík, G., Gróf, P., Illyés, E.: *The study of thiol-responsive traceable method on photolysis of peptides, proteins* 5th EuChemS Chemistry Congress (Istanbul) **2014**, poszter
- 30) Knapp K., Nagy T.M., Timári I., Borics A., Kövér K., Csík G., Illyés E., Majer Zs.: *Fehérjék fotolízisének tanulmányozása peptidmodellekkel* MKE 2. Nemzeti Konferencia, Hajdúszoboszló, **2015**, poszter
- 31) Barron L.D., et al.: *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **2000**, 73, 1-49
- 32) Nagy Tamás Milán: *Ciklopeptidek szerkezetvizsgálata NMR módszerekkel és molekuladinamikai számításokkal* (DE, Kémia alapszakos szakdolgozat) **2015**
- 33) Bak, K., Jorgensen, P., Ruud, K., Helgaker, T., Hanse, A. E., Olsen, J.: *Theor. Chem. Adv.*, **1995**, 90, 441-58.
- 34) Tomasi, J., Mennucci, B., Cancès, E. *J. Mol. Struct.*, **1999**, 464211-26.
- 35) Enyedi K.N., Czajlik A., Knapp K., Láng A., Majer Zs., Lajkó E., Kőhidai L., Perczel A., Mező G.: *J. Med. Chem.*, **2015**, 58, 1806
- 36) Báti G., Szilvágyi G., Majer Zs.: *A metionin-oldallánc szerepe a diródiium-komplexek kialakulásában: szintézis és szerkezetmeghatározás* XVIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, Félixfürdő (Románia), **2012**, poszter, 110. old
- 37) Gróf P., Knapp K., Csík G., Majer Zs.: *Diszulfidhidat tartalmazó ciklikus peptidek UV-besugárzásának hatására keletkező szabadgyökök detektálása* Magyar Biofizikai Társaság XXV. Kongresszusa, Budapest, **2015**, poszter, Összefoglaló kötet 87.
- 38) Mezyk, S.P.: *J. Physical Chemistry*, **1996**, 100, 8861
- 39) Surdhar, P.S., Armstrong, D.A.: *J. Physical Chemistry*, **1987**, 91, 6532
-