

OTKA Research Proposal– 2005

Principal investigator:

Prof. Tamás Kiss

This section is limited in length, as described in the Instructions. The list of references is not included in the limited length.

A Szegedi Tudományegyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Bioszervetlen Kémiai Csoportjában folyó kutatásoknak a valós rendszerekhez való közelítése folyamatában az e pályázat keretében tervezett vizsgálatainkat két fő területre összpontosítottuk, nevezetesen

- I. Biológiai hatással rendelkező fémionok és fémkomplexek kölcsönhatása biológiai makromolekulákkal: inzulinutánzó vanádium(IV,V)komplexek biospeciációja vérszérumban, a szérumfehérjék szerepe a fémion szállításában, fémkelátorok alkalmazhatósága a Alzheimer-kór gyógyításában.
- II. Molekuláris biológiai módszerek alkalmazása bioszervetlen kémiai problémák megoldására: mesterséges enzimek és fémtartalmú fehérjék előállítás és tanulmányozása.

Kutatási programunkat 2005-ben kezdtük, terveinket az SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéke Bioszervetlen kémia Csoportjának 6 oktatójára és az SZTE-MTA Bioszervetlen kémiai Kutatócsoportjának 5 kutatójára valamint az akkor már velünk dolgozó 3 PhD hallgatóra és számos diplomamunkás és diákkörös hallgató munkájára alapoztuk és ezt akartuk fejleszteni 1 post doc és 1 PhD alkalmazásával. Derült égből villámcsapásként ért bennünket a hír 2006 végén, hogy az MTA kutatócsoportunk 2007-től anyagiak hiányában támogatásban nem részesül. Így új alkalmazásokra nem gondolkoztunk, hanem a rendelkezésünkre álló személyi keretet állásukat vesztett munkában járatos, és a pályázat sikerét jelentősen magukban hordozó fiatal munkatársak legalább részleges továbbfoglalkoztatására kellett fordítanunk. Így késleltethettük a kutatócsoport az egyébként évtizedekig sikeresen dolgozó Kutatócsoport felbomlását. 2010-re volt munkatársaim ideiglenesen vagy véglegesen jó állást találtak: 2 fő Marie Curie post doc ösztöndíjon külföldön tartózkodik, 1 fő a Pannon Egyetemen Veszprémben, 1 fő a Pécsi Tudományegyetemen tudott elhelyezkedni, 1 főt pedig a Tanszéken sikerült nyugdíjazás révén adjunktusként alkalmazni. 1 fő OTKA posztdok-ként csatlakozott a csoporthoz a pályázat ideje alatt. Ugyanakkor 1 fő viszont 2 évig az USA-ban volt posztdoc, majd Magyar Zoltán ösztöndíjas volt 1 évig önálló tématerülettel, így az ő tevékeny részvételével sajnos csak kis mértékben számolhattam a projekt majdnem teljes időtartama alatt. Ezzel csak jelezni szeretném, hogy a vállalt kutatási feladatok megvalósításának feltételei korántsem voltak optimálisak. Ettől függetlenül alapvetően a pályázatban megfogalmazott terveknek megfelelően folytattuk vizsgálatainkat és úgy gondoljuk a kutatástervezés megengedte szabadság határain belül mozogtunk. Eredményeinket a következőkben a vállalt terveinknek megfelelő bontásban tárgyaljuk, a terv megfogalmazásait adva először (az eredeti angol nyelvű "Research plan"-ből átmásolva, majd az elért eredményeket magyar nyelven.

### I. Interactions of metal ions and metal complexes with macromolecular bioligands

*In the human body, the essential or toxic metal ions of biological systems or metal ions administered for therapeutical purposes, are bound to smaller or larger biomolecules. They are transported in biological fluids, cross cell membranes and exert their biological-physiological activity in complexed forms. Furthermore, the action of toxic and essential metal ions often takes place in the form of competitive reactions.*

**I. 1. Biospeciation of serum proteins.** *Over the past two decades, the interactions of small biomolecules with (i) the toxic Al(III), (ii) the potential insulin-mimetic vanadium and (iii) the both beneficial and harmful organotin(IV) ions have been studied. In these studies, we aimed at the identification of the mobile form(s) of the metal ions (Al(III), VO(IV), R<sub>2</sub>Sn(IV)). Regarding their bioavailability and transport, the complexes of these metal ions with the transport proteins (e.g., serum proteins albumin and transferrin), and membrane proteins (e.g., various glycoproteides) are also of importance. For this, investigations have been undertaken to characterize the complete biospeciation of various insulin-mimetic VO(IV) complexes in blood serum including their interactions with the serum proteins. We would like to extend such kind of studies using membrane filtration separation and EPR, CD and multinuclear NMR spectroscopic techniques. Partly in connection to this area, one of our PhD student Hollender Dominik, a Marie Curie fellow had spent one year in the Magnetic Centre of the University of Florence, working on the structure determination of a Ca(II) protein. The work has successfully been completed and a paper has been published. Most of the VO(IV) work is excluded from this project as it is covered by the OTKA project (No. T49417) of the principal investigator.*

A vanádium és a cink biospeciációja a vérszérumban elsődleges kérdés az adott fémion antidiabetikus hatásának megértésében. A kis molekulatömegű de megfelelő koordinációs képességekkel rendelkező vérszérum alkotókkal végzett korábbi megfigyeléseink alapján lényeges különbség volt felfedezhető az egyes ligandumok

fémionmegkötő képességeit illetően. A két szállítófehérjével, transzferrinnel és human szérumban albuminnal ekkor még nem álltak rendelkezésre megbízható termodinamikai adatok (stabilitási állandók).

A humán apotranszferrin oxovanádium(IV)ion fémionmegkötő képességét kizorításos módszerrel tanulmányoztuk, mivel adott körülmények között ( $\text{pH} = 7.4$ ,  $T = 25^\circ\text{C}$   $c(\text{HCO}_3^-) = 25,0\text{ mM}$ ) a szabad fémion mennyisége elhanyagolható. A kis molekulatömegű 1,2-dimetil-3-hidroxi-4(1H)-piridinon (dhp) alkalmaztuk, amely az általunk ismert legnagyobb stabilitású biszkomplexek képezi VO(IV) ionnal. (Az UV-VIS méréseknél nitrilotriecetsavat, NTA-t is használtunk) A kizorítás mértékét ESR és UV-VIS spektroszkópia módszerekkel követtük és az ebből számított látszólagos stabilitási állandó értéke ( $14,3 \pm 0,6$ ) közel egy nagyságrenddel nagyobbak bizonyult, mint a korábban elméleti alapokon (LFER) becsült érték. Sajnálatos módon a több módszer összevetéséből (LNT-EPR, RT-EPR és UV-VIS) számított értékek között jelentős - közel egy nagyságrend - eltérést mutatott, amit a dhp és az apotranszferrin VO(IV)-gyel képzett vegyeskomplexének feltételezésével magyaráztunk.

A dhp-VO(IV)-apotranszferrin vegyeskomplexek létezését együttes CD és RT-ESR mérések segítségével bizonyítottuk, és sikerült igazolnunk hasonló komplex létezését a maltol (mal) esetében is. A két spektroszkópai módszer eredményeinek együttes kvantitatív kiértékelésével sikerült az apotranszferrin-VO(IV) komplexek látszólagos stabilitási állandóinak értéket  $-\log\beta_1 = 13,4 \pm 0,2$  és  $\log\beta_2 = 25,2 \pm 0,4$  - kielégítő pontossággal meghatározni. Ezen adatok jó egyezésben voltak a korábban NTA-val végzett UV-VIS mérések alapján számított értékekkel. Meghatároztuk a vegyeskomplexek stabilitási állandóit is, melyek alapján az ultraszűrési elválasztás eredményei is jobban értelmezhetőek.

Igazoltuk továbbá, hogy a vegyeskomplexek képződésének elengedhetetlen feltétele az oldat hidrogénkarbonát-tartalma, ami azt bizonyítja, hogy a ligandum nem a szinergista hidrogénkarbonátion helyét foglalja el.

Apotranszferrin - human szérumban albumin (HSA) -  $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}$  rendszerben a CD mérések alapján nincs HSA - VO(IV) kölcsönhatás. Maltolt adva az előző rendszerhez is csak igen kismértékű - a kísérleti hiba nagyságrendjébe eső - eltolódás figyelhető meg, ami egy esetleges HSA - maltol - VO(IV) vegyes komplex létezésére utalhat.

Mindezek figyelembevételével modellszámításokat végeztünk a vérszérumban vonatkozóan, melyek igazolták, hogy a leginkább kutatott biszmalto-látó-vanádium(IV) komplex (BMOV) esetében a ligandum nem játszik szerepet a vérszérumban a vanádium(IV) megkötésében, a dhp esetében azonban erre van lehetőség.

Elválasztási technikák alkalmazásával (HPLC-ICP-MS) azt is igazoltuk, hogy bármilyen formában -  $\text{V}^{\text{IV}}\text{OSO}_4$ ,  $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{mal})_2$ ,  $\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{dhp})_2$  VO(IV) (pic)<sub>2</sub> (pic = pikolinsav) - is kerül a VO(IV) a vérszérumba, a fémion kizárólag a transzferrinhez kötődik, sem a humán szérumban albumin, sem az immunoglobulin nem játszik szerepet megkötésében.

Az oxovanádium(IV) - transzferrin kölcsönhatás tanulmányozása, valamint a modellszámítások és elválasztási technikák eredményeit két összefoglaló jellegű közleményben is megjelentettük. [3,4] Eredményeink, miszerint a transzferrin erősebben köti meg a VO(IV)iont mint a legtöbb inzulinmimetikus komplexben található komplexképző, tehát a komplex legkésőbb a véráramba jutva szétesik, alátámasztották azt a farmakokinetikai megfigyelést, amely értelmében a maltol és a VO(IV) egymástól teljesen függetlenül „mozog” a testen belül.<sup>1</sup> Mindez nagymértékben hozzájárult a „ligandum, mint taxi” mechanizmus - mely szerint a ligandumnak csak szállító feladata van, nincs szerepe a hatásmechanizmusban - szélesebb körű elfogadásához.

A különböző inzulinutánozó VO(IV) komplexekre kapott biospeciációs elemzések után néhány V(V) komplexre vonatkozólag is végeztünk hasonló vizsgálatokat információt remélve arra, hogy a fémion oxidációs számának változása befolyásolja-e a fémion speciációját a szérumban való szállítási folyamatokban. Ezzel annak megerősítését vagy cáfolatát is remélhettük, hogy ESR spektrális eredmények azt suggalták, hogy az adagolás formájától függetlenül a vérszérumban a vanádium komplexek VO(IV) komplex formában szállítódnak.

Az oxovanádium(V) ionnal, mint a felszívódás egyik formájának biospeciációjával eddig kevesen foglalkoztak. A korábbihoz hasonló, kizorításos kísérlet elvégzéséhez szükségünk volt egy ligandumra, amely megfelelő stabilitású komplexet képez vanadáttal. Öt kétfogú ligandumot hasonlítottunk össze ebből a célból, mind az öt kiválasztott ligandum VO(IV) komplexének van inzulinmimetikus hatása. Két ligandum (hpno, 2-merkaptopiridin-N-oxid mpno) vanadátkomplexeinek speciációját részletesen - pH-metria <sup>51</sup>V-NMR - tanulmányoztuk. A hpno - melynek vanadáttal alkotott biszkomplexének egykristályszerkezetét is meghatároztuk - tűnt az adott körülmények között a legmegfelelőbbnek, bár csak kismértékben volt hatásosabb a maltolnál.

A kizorításos méréseket ezért a  $\text{V}^{\text{V}}$ -tel apotranszferrin jelenlétében, maltol és 2-hidroxipiridin-N-oxid (hpno) ligandumok felhasználásával is elvégeztük, az egyensúlyt <sup>51</sup>V-NMR módszerrel követtük. A meghatározott két látszólagos állandó  $-\log K_1 = 6,03 \pm 0,4$  és  $\log K_2 = 5,46 \pm 0,18$  - igen jó egyezésben volt az ultraszűrésből számított értékekkel, és jó közelítéssel megegyezett a mások által elvégzett<sup>3</sup> kalorimetriás mérési

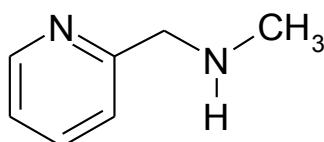
eredményekkel. Mivel a hidrogénkarbonát koncentráció nem volt hatással a kiszorítás mértékére, ezzel igazoltuk, hogy a vanadát nem a transzferrin anion megkötő helyén koordinálódik, hiszen akkor versengene a hidrogénkarbonát-ionnal.

Humán szérum albumin és a vanadátion kölcsönhatását nem sikerült kimutatni, egy az irodalomban közölt ultraszűrési mérésorozat alapján becsültünk meg a HSA-vanadát stabilitási állandóját. Mindezek ismeretében modellszámításokat végezve bizonyítottuk, hogy a biológiailag releváns koncentrációtartományban ( $c(\text{vanadát}) < 1 \mu\text{M}$ ) csak transzferrinhez kötött, illetve szabad vanadát található az szérumban. Vegyeskomplexeket jelen esetben nem találtunk.

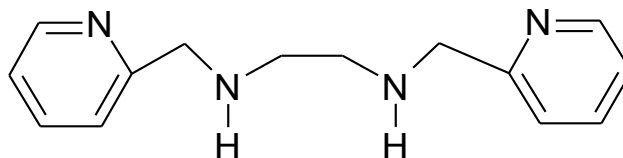
Fentiekén kívül még egy munka készült a vanádium témakörben az OTKA projekt támogatásával és együttműködő partnereink jelentős közreműködésével. Nevezetesen a háromfogú ligandum, a 2,6-bisz[hidroxi(metil)amino]-4-morfolino-1,3,5-triazin ( $\text{H}_2\text{bihyat}$ ) előállítása és vanadátkomplexének tanulmányozásából -  $^{51}\text{V}$ -NMR, röntgendiffrakciós valamint pH-metriás módszerekkel – többek között megállapítható volt, hogy a ligandum meglepően széles pH tartományban (3,5-11) képes komplexálni a vanadátiont, ami elsősorban az igen erős vanadát triazin gyűrűnitrogén kölcsönhatás eredménye. Ez a jelentős stabilitás számos – analitikai, katalitikus és esetleg biológiai alkalmazás számára biztosíthat utat.

**I. 2.  $\beta$ -amyloid aggregation.** *We plan to study the role of the metal ions (Al(III), Zn(II), Cu(II), etc.) in the aggregation processes of the neurotoxic  $\beta$ -amyloids [16]. In this field we collaborate with the Medicinal Chemistry Institute, Faculty of Medicine, Prof. Botond Penke, and Department of Colloid Chemistry, Faculty of Sciences, Prof. Imre Dékány. The aggregation of these neuropeptides are planned to be studied by amyloid specific fluorphase markers, light scattering and low angle X-ray diffraction methods. It may be interesting to study the effect of various low molecular mass oligopeptides, which has proven to be efficient inhibitors of aggregation of amyloids. A part of this research point is a part of of one of the research subtopic of the RET 008/2004 Hungarian South Plain Neurobiological Research Centre project.*

Az AD előrehaladását jelentő  $\beta$ -amiloid oligomerek képződését alkalmas kelátképzővel megakadályozandó a TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-piridilmetil) etiléndiamine), ami egyébként a biológiában a sejtek szabad Zn(II) koncentrációjának mérésére szolgáló, azzal igen nagy stabilitású komplexet képező, reagens. Emiatt igen toxikus. A molekulát megfeleztük, illetve negyedeltük és kaptuk az ENDIP ((N,N'-bisz(piridine-2-il-metil)-etiléndiamine), illetve DMAP (N-metil-1-(piridin-2-il)-metilamin) molekulákat, így csökkentettük fémionkötő képességüket.



DMAP



ENDIP

Megállapítottuk, hogy a DMAP fiziológiás pH-n 1:1, illetve 1:2 összetételű komplexeket képez a  $\beta$ -amiloid oligomerizációját elősegítő Cu(II) és Zn(II) ionokkal, de ezek stabilitása a  $K_d$  értéke mM nagyságrendű) nem elegendően nagy ahhoz, hogy hatékonyan versengjen az amiloidokban kötött fémionokért. Ugyanakkor az ENDIP mindkét fémionnal elég nagy stabilitású 1:1 összetételű komplexet képez (a  $K_d$  értéke a  $\mu\text{M}$  tartományban van) ahhoz, hogy kivonja a fémionokat az amiloid komplexéből és így gátolja a fémion indukálta  $\beta$ -amiloid oligomerizációt. Ezen eredményeket floreszcenciás és fényszórás mérésekkel is alátámasztottuk. Mindkét módszer igazolta, hogy az ENDIP képes volt a fémionok indukálta  $\beta$ -amiloid aggregációt gátolni és az amiloid aggregátumok részbeni újraoldódását előidézni.

A TPEN származékok mellett két tripeptid származékkal is folytattunk vizsgálatokat. Hisztidinben gazdag peptideket választottunk, melyek a Cu(II)-nek és a Zn(II)-nek is jó kötő ligandumai. A GlyHis és a HisHis dipeptideket Lys kötőtaggal kapcsoltuk össze és képezzünk egy multidentát ligandumot. A fémkomplexek teljes egyensúlyi és szerkezeti jellemzése mellett, vizsgáltuk a  $\beta$ -amiloid oligomerizációt gátló képességüket is, és a  $(\text{GH})_2\text{K}$  ligandummal biztató eredményeket kaptunk.

**I. 3. Interaction between Al(III) and hydrolase enzymes.** It is well-known that the actual chemical form of an element (i.e., its chemical speciation) can basically affect its biological activity, in fact, it may even influence its essential or toxic effects. Since Al(III) is proposed to inhibit hydrolyse enzymes in Alzheimer disease (AD), we intend to study the effects of the aluminium in various forms (aqua ion and Al(III) complexes) on different enzymes (trypsin, chymotrypsin, acetylcholine esterase, alkaline phosphatase, glutamine-synthetase), exploring the way of interaction, its binding site(s) and mechanism.

Három ligandum, N-(foszfonometil)iminodiacetsav (NTAP), nitrilo-trisz(metilén-foszfonsav) (NTA3P), és az 1-hidroxi-etilidén-1,1-difoszfonsav (HEDP) Al(III) komplexeit tanulmányoztuk szilárd és oldatfázisban, mivel ezek modellezhetik az Al(III)ionok kémiai kölcsönhatása foszfát és karboxilátsoportokat tartalmazó nagy molekulatömegű biomolekulákkal. Az általunk már korábban közölt Al(III)-NTAP, illetve Al(III)-NTA3P speciációk<sup>4</sup> mellé az Al(III)-HEDP komplexeinek stabilitási állandóit, és eloszlásgörbéjét is meghatároztuk.

Vizsgáltuk az Al(III) ion és néhány fenti Al(III) komplex hatását az alkalikus foszfátáz enzim hidrolitikus képességére különböző spektrális módszerekkel. Azt találtuk, hogy a komplexek nagyobb hatékonysággal inhibiálták az enzim működését, mint az  $[Al(OH)_4]^-$  ion. Figyelemreméltó, hogy a ligandumok kismértékben maguk is inhibiáló hatásúak. A szinkrotron radiációs CD spektrális vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy a ligandumok képesek a metalloenzim fémionja(i)t annak aktív centrumából elvonni, míg az Al(III) valószínűleg képes kiszorítani azt.

#### *I.4. Egyéb gyógyhatású komplexek vizsgálata*

Mint gyógyhatású molekulák, a fluoro-szalicilsavak réz(II) komplexeit is tanulmányoztuk egy új együttműködés keretében E molekulák hatásmechanizmusa nem ismert. A jövőben ezzel kapcsolatosan tanulmányozzuk majd a biológiai makromolekulák és a fluoro-szalicilsavak fémkomplexeinek kölcsönhatását, valamint a fémion hatását a fluoro-szalicilsavak biológiai rendszerekben történő viselkedésére.

## **II. Mesterséges enzimek és fémtartalmú fehérjék**

### **II. 1. Structural and functional modelling of type II copper enzymes.**

*4-10 aminosavból álló peptidek tervezése és előállítás. A tervezésben felhasználjuk egyes fehérjék (P típusú ATPáz, amiloid prekursor fehérje, baktériumok Cu,Zn-SOD-jának N-terminális fragmense) már ismert rövid fémkötő szekvenciáit. E peptidek kölcsönhatása rézzel (2006-2007). A réz(II)komplexek katecholáz aktivitásának kinetikai vizsgálata (2007-2008).*

(i) Tanulmányoztuk a *H. ducreyi* Cu,Zn-SOD N-terminális részletének (HGDHMHNHDTK, L1) réz(II)- és cink(II)-komplexeit. Az N-terminális részről feltételezhető, hogy szerepet játszik az enzim réz-felvételében. Vizsgálatainkkal alátámasztani kívántuk ezt a feltételezést, ill. kideríteni, hogy az N-terminális résznek lehet-e szerepe a cink-felvételében. Réz(II) jelenlétében rendkívül stabilis, vízoldható egy-, két és hárommagvú komplexek képeződnek. Cu/L=1/1 aránynál pH 7-8 között az igen nagy stabilitású  $\{NH_2,3N_{im}\}$  koordinációjú CuHL komplex dominál. A pH = 7,4-nél számítható látszólagos disszociációs állandó is a rendkívüli stabilitásra utal ( $K_{D,Cu} = 5 \times 10^{-12}$  M). Cinkkel a semleges pH-tartományban a szintén kiugró stabilitású ZnHL komplex képződik ( $K_{D,Zn} = 1,6 \times 10^{-9}$  M). Ismereteink szerint L1 köti legerősebben a cinket pH 7 körül az eddig vizsgált peptidek közül [gt1]. Ezekhez a vizsgálatokhoz kapcsolódva előállítottuk az *A. pleuropneumoniae* Cu,Zn-SOD-jának hasonló N-terminális peptidjét (HADHDHKK-NH<sub>2</sub>, L2), s vizsgáltuk réz(II) és cink(II) kötő képességét. Eredményeink szerint, annak ellenére, hogy ez a szekvencia egy His alegységgel kevesebbet tartalmaz, egy nagyságrenddel erősebben köti a réz(II) iont ( $K_{D,Cu} = 4,6 \times 10^{-13}$  M), mint az analóg *H. ducreyi* Cu,Zn-SOD fragmens. Ez a rendkívüli fémion-affinitás már hasonló a réztartalmú bakteriális metalloproteinekéhez, ami alátámasztja hogy az ilyen rövid, hisztidinben gazdag N-terminális szakaszok 'chaperon'-ként működve szerepet játszanak a fehérje rézfelvételében rézhiányos körülmények között. Ugyanakkor L2 a cink(II) ionokhoz több mint két nagyságrenddel kisebb affinitást mutat ( $K_{D,Zn} = 4,8 \times 10^{-7}$  M), mint a *H. ducreyi* Cu,Zn-SOD fragmense (L1). Mindkét peptid CuHL komplexe jelentős SOD utánzó hatással bír (a natív fehérje 4%-a), ami felveti az N-terminális szekvencia alternatív szerepét nem rézhiányos környezetben, mint időleges SOD centrum [gt1].

(ii) A ZIP családba tartozó Zn-transzporter fehérjék fémkötő szekvenciájának modelvegyleteiként vizsgáltuk az Ac-HKHKH-NH<sub>2</sub> (L3) és Ac-HHKHKKH-NH<sub>2</sub> (L4) peptidek réz(II) és cink(II) komplexeit. Réz(II) jelenlétében pH = 5-7 között  $\{3N_{im}\}$  (L1) és  $\{4N_{im}\}$  (L2) koordinált CuH<sub>2</sub>L komplexek dominálnak az oldatban. pH = 7-9 között a kiugró stabilitású  $\{2N_{im},2N^-\}$  koordinációjú CuL komplex van jelen mindkét peptid esetén. Fémion

felesleg mellett pH felett kétmagvú komplexek képződnek. A két peptid egy- és kétmagvú réz(II)komplexei is jelentős pirokatechin-oxidáz utánzó sajátságot mutatnak. Minthogy a kétmagvú komplexek csak pH 11 körül válnak aktívabbá, a részletes vizsgálatokat ekvimoláris oldatokban végeztük. A termék kinon oldhatósága miatt 50% etanol-víz elegyben dolgoztunk. pH = 7-11 között vizsgált rendszereink kiugró katalitikus hatást mutattak. Az eredmények értékeléséhez meghatároztuk a komplexek speciációját 50% etanol-víz elegyben is. Ezek alapján mindkét rendszerben a CuL és CuH<sub>1</sub>L komplexhez rendelhető az aktivitás. A komplexek hatása katalitikus, a kinetika a Michaelis-Menten modell alapján értelmezhető, alacsonyabb koncentrációknál a reakció sebessége első rend szerint függ a szubsztrát (dtbc), a komplex ill. a dioxigén koncentrációjától. Cink jelenlétében pH 6-8 között imidazol nitrogének által koordinált ZnH<sub>2</sub>L és ZnH<sub>4</sub>L<sub>2</sub> komplexek dominálnak, magasabb pH-n hidroxó-vegyeskomplexek képződnek.

- (iii) Az L3 és L4 peptideknél jelentkező amidkoordináció megakadályozására, s így sok metalloenzim aktív centrumára jellemző csak imidazol gyűrűk általi koordináció elősegítésére, prolint tartalmazó peptideket állítottunk elő (HPHH (L5), HPHPH (L6), KHPHPHQ (L7)). L5 esetén célunk csak részben valósult meg, pH 6-8 között az amid-koordinált [CuH<sub>1</sub>L5]<sup>+</sup>, majd egy vegyes hidroxokomplex CuH<sub>1</sub>L5(OH) képződik. A szuperoxid diszproporcióját az előbbi, a dtbc oxidációját az utóbbi komplex segítette elő. L6 peptid esetén pH 7 fölött vegyes hidroxokomplex válik ki az oldatból Cu(II) és Zn(II) jelenlétében is. Az oldhatóság növelésére a poláros aminosavakat tartalmazó L7 peptidet állítottuk elő. Ismereteink szerint ez az első olyan kisméretű peptid, mellyel sikerült a peptidnitrogének deprotonálódásának elkerülésével oldatban tartani mind a Cu(II) mind a Zn(II)ionokat pH 7-9 között.
- (iv) Előállítottuk a <sup>1</sup>HSHRDFQPVLHL-NH<sub>2</sub> peptidet (L8), amely a tumor ellenes hatású humán endostatin fehérje cinkkötő N-terminális fragmense. Tanulmányozták a peptid cink(II) és réz(II) komplexeit. A semleges pH-n egy {NH<sub>2</sub>, 3N<sub>im</sub>, COO<sup>-</sup>} koordinációjú ZnL komplex dominál az oldatban. Valószínűleg így köti a cinket az N-terminális 25-mer peptid is, amely a natív fehérjével megegyező antiangiogén (s így rákellenes) hatást mutat. A peptid rendkívül nagy affinitással köti a réz(II) iont (pH 7,4-nél K<sub>D,Cu</sub> = 2,6x10<sup>-15</sup> M). pH 5-10 között az {NH<sub>2</sub>, N<sup>-</sup>, N<sup>-</sup>, N<sub>im</sub>} koordináció egyeduralgkodik az oldatban. Ez a megfigyelés biológiai szempontból is releváns lehet, hiszen a réz(II) jelentős szerepet játszik az angiogenezisben, koncentrációjának csökkentése antiangiogén hatást eredményez (gátolja a véredények képződését), így az endostatin fiziológiás hatásának köze lehet rézkötő képességéhez.
- (v) Tanulmányoztuk a HCDGPCG-NH<sub>2</sub> (L9) peptid nikkell(II) komplexeit. E szekvencia egy napjainkban felfedezett Ni-tartalmú SOD-család N-terminális fragmense. Röntgenszerkezetük alapján a katalitikus hatásért felelős nikkelt kizárólag az N-terminális His1, Cys2 és Cys6 aminosavakhoz kötődik. Eredményeink szerint az egyensúlyi rendszer igen egyszerű, a [NiII]/[L4]=1/1 rendszerben csak az NiH<sub>2</sub>L, NiL és NiH<sub>1</sub>L komplex mutatható ki (ligandum felesleg esetén bisz-komplexek is képződnek). Az {NH<sub>2</sub>, N<sub>im</sub>} koordinált NiH<sub>2</sub>L paramágneses (Ni<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>L = NiH<sub>2</sub>L, log K = 6,66), NiL és NiH<sub>1</sub>L diamágneses. Eredményeink alapján az NiL komplex két kötési izomer formájában van jelen: {NH<sub>2</sub>, N<sub>im</sub>, 2S<sup>-</sup>} és {NH<sub>2</sub>, N<sup>-</sup>, S<sup>-</sup>}. Az enzim aktív centrumával analóg {NH<sub>2</sub>, N<sup>-</sup>, 2S<sup>-</sup>} koordinációjú NiH<sub>1</sub>L komplex csak pH 9-re alakul ki 100 %-ban (a natív enzimben ez pH 4). Az 5 egységgel magasabb képződési pH feltehetően a Cys2 és Cys6 között kialakuló makrokelát kis stabilitásával (az enzimben ezt H-hidak stabilizálják), valamint Pro5 amidkötésének cisz-transz izomériájával magyarázható. Az NiH<sub>1</sub>L komplex SOD aktivitása kb. két nagyságrenddel kisebb, mint a natív enzimé, ami a szubsztrát megkötődését elősegítő tirozin hiányával magyarázható.
- (vi) A hisztidin-gazdag glikoprotein (HRG) hisztidin-gazdag régiójának (HRR) fémkötő sajátságainak jobb megismerése céljából vizsgáltuk két, a HRR tandem módon ismétlődő (G)HHPH(G) szekvenciáját tartalmazó Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub> (L10) és Ac-HHPHGHHHPHG-NH<sub>2</sub> (L11) peptidek réz(II) és cink(II) komplexeit. Az egymáshoz kapcsolt HHPHG egységek számával együtt nő a megköthető fémionok száma is. A két egységből felépített dekapeptidben az első fémion a monomer pentapeptidhez képest eltérő módon, nagy valószínűséggel főként a (H)HHPHG szakaszon koordinálódik. Ezt alátámasztják az általunk korábban vizsgált hisztidin-prolin tartalmú peptidek cink(II)- és réz(II)komplexeinek részletes vizsgálatával nyert szerkezeti és stabilitási adatok is. Az első fémion koordinációja a dekapeptidben olyan peptid konformáció változást eredményez, mely elősegíti a második fémion felvételét, és ez extra stabilizációt eredményez. Az eredmény jelentőségét a natív HRG lépcsőzetes cink(II) megkötésében megfigyelt kooperatív hatás adja. Az Ac-HHPHG-NH<sub>2</sub> ligandum réz(II)ionok jelenlétében, lúgos pH-tartományban, a H-P közti peptidkötés hidrolitikus hasadásával fragmenseire bomlik, ami fontos lehet annak tükrében, hogy a HRG antiangiogén/antitumor hatásának kifejtéséhez a HRR-nek ki kell szakadnia a proteinből.
- (vii) Előállítottuk és vizsgáltuk az MMP13 enzim aktív centrumában lévő cinkkötő szekvenciával megegyező Ac-KAHEFGHSLGLDHSK-NH<sub>2</sub> (L12) peptid cink(II) és réz(II) komplexeit. Ennek a semleges pH-n képződő cink(II) komplexe mind szerkezeti, mind az MMP inhibitor hidroxámsavakkal való kölcsönhatás szempontjából is jól modellezi az MMP enzimek aktív centrumát. A hidroxó-vegyeskomplex ZnL funkcionális modelként is viselkedik, pH 7-9 között hatékonyan segíti elő a p-nitrofenil-acetát hidrolízisét. A három szeparált His alegységnek köszönhetően a peptid akár három réz(II)iont is oldatban képes tartani A peptid pH 8-10 között

képződő egymagvú réz(II) komplexei jelentős, az eddig vizsgált réz(II)-peptid rendszerek közül a legnagyobb pirokatechin-oxidáz aktivitással bírnak.

(viii) A hisztidint tartalmazó peptidok koordinációs kémiája meglehetősen bonyolult. Ezért olyan vizsgálmódszereket kerestünk, melynek segítségével, híg vizes oldatokban nem színes ionok jelenlétében is információt kaphatunk a komplexek szerkezetéről. A szinkrotron sugárzási CD spektroszkópia a távoli UV-ben való mérések révén lehetőséget adott a peptidkonformáció változásának követésére, míg pl. réz(II) jelenlétében a látható hullámhossz-tartományt használtuk ki. Ezen spektroszkópiában a spektrális sajátosságok és a szerkezet összefüggéseit még nem lehet egyszerű egyenletekkel megadni, ezért egyrészt szisztematikus vizsgálatokkal próbáltunk meg általános következtetéseket levonn, illetve elméleti számolásokat is végeztünk az egyszerű rendszereken. Ezen eredményeink segítettek a bonyolultabb rendszerek spektrumait értelmezni.

## II. 2. Functional model complexes immobilized on solid surface.

*SOD-utánczó imidazolát-hidas kétmagvú Cu(II)-Zn(II) komplexek rögzítése kovalens kötással szervesen (szilikagélen, montmorillonit) hordozón, hasonlóan az enzim-alapú elektródokhoz (2006-2007). Rögzített komplexeket úgy is kialakíthatunk, hogy a szilárd fázisú szintézis során előállított peptideket a hordozón hagyjuk. Vizsgálni fogjuk, hogy az így rögzített komplexek képesek-e oxidációs folyamatokat elősegíteni (2007-2008).*

A fémion-koordináció az aminosavak oldalláncaiban található donorcsoportokon valósulhat meg egy elágazó láncú peptidszerű vegyületben, melynek az „N-terminális” végeire hisztidin aminosavakat kapcsolunk. Az egyik ilyen peptidszerű ligandum az  $(\text{NH}_2\text{-His})_4\text{-(Lys)}_2\text{-Lys-CONH}_2$ , a másik ennek N-terminális aminocsoportjain acetilezett változata. E peptidek képesnek bizonyultak két ekvivalens fémion (réz(II) és cink(II)) megkötésére pH ~ 7 körül, anélkül, hogy amid-nitrogén deprotonálódást tapasztaltunk volna. E peptid, illetve N-acetilezett származékának komplexképző sajátosságait szilárd hordozóhoz (SPPS gyanta) rögzítve is vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy a fémionok megkötése ugyanabban a pH tartományban történik, mint az oldatban, ám savval történő eltávolításuk a gyantáról valószínűleg kinetikailag gátolt. Az ilyen típusú fémionokkal telített gyantákat a továbbiakban a célkitűzésnek megfelelően katalitikus tulajdonságaik szempontjából is megvizsgáltuk. A DNS molekula hidrolízisét sikerült kimutatnunk, de a mért aktivitás nem bizonyult kiemelkedőnek a ma ismert modellvegyületek körében. Azonban az ilyen típusú ligandumok számtalan lehetőséget kínálnak a donatoratomok számának és minőségének változtatására, így további ligandumok előállítását tervezzük egyéb funkciócsoportok részvételével.

Katalitikus aktivitásuk mellett további, nem elhanyagolható jelentőségű alkalmazási lehetőségeket is hordoznak az ilyen ligandumok: (i) a gyantákra rögzített ligandumok szelektív fémion-megkötő sajátága pl. nehézfémionok akkumulációját, vizes oldatokból történő kinyerését, míg (ii) oldatfázisban szelektív kelátorok létrehozását teszi lehetővé (pl. gyógyászati alkalmazás – kelátterápia; ilyen céllal állítottuk elő pl. az  $(\text{NH}_2\text{-GlyHis})_2\text{-Lys-CONH}_2$  ligandumot), valamint (iii) a gyantára kötött fémionok affinitás oszlopok kifejlesztésének alapját képezhetik.

A ligandumok szilárd hordozón való megkötése nemcsak a katalízis, hanem a káros anyagok eltávolítása miatt is hasznos. Vizsgálataink alapján Cys-tartalmú peptidekkel lehetőség nyílik az  $\text{As(OH)}_3$  eltávolítására vizes oldatokból (ez ioncserével/adszorpcióval nem lehetséges). Elsőként a ditioeritritol és ditiotreitól  $\text{As(III)}$ -kötését tanulmányoztuk. Ezek már pH 6-nál kondenzációs reakcióba lépnek az  $\text{As(OH)}_3$ -val. Ennek révén a ligandum szimmetriája csökken (NMR), ami jó egyezésben van a röntgenszerkezettel: a két láncvégi tiol- és az egyik hidroxilcsoport kapcsolódik a fémionhoz. Ezen eredmények alapján a glutation-S-transzferáz (GST) fehérjéhez molekuláris biológiai úton hozzákötöttük a P24 peptidet, ami a két közeli cisztein révén az  $\text{As(III)}$  és toxikus fémionok megkötésére is alkalmas. Ezt a GST-P24 fúziós fehérjét egy GST affinitásoszlopra kötve bizonyítottuk annak  $\text{As(III)}$ -kötő képességét. Megállapítottuk, hogy a GST-P24 fehérjét termelő kólibaktériumok ellenállóak az  $\text{As(III)}$ -mal szemben, illetve képesek azt magukban felhalmozni.

Vizsgáltuk egy a réz(II)-cink(II) szuperoxid dizmutáz (Cu.Zn-SOD) enzim aktív centrumát jól modellező kétmagvú imidazolát-hidas Cu(II)-Zn(II) kétmagvú komplexet  $[\text{Cu(II)-diethylentriamin-}\mu\text{-imidazolátó-cink(II)-trisz(2-aminoetil)amin}]$  és az azt felépítő részrendszereket. Meghatároztuk a képződő részecskék sztöchiometriáját, stabilitását és legvalószínűbb oldatbeli szerkezetét. Kimutattuk, hogy pH 7-11 között döntően az imidazolátó-hidas szerkezetű forma, illetve annak deprotonált változata fordul elő az ötkomponensű rendszerben. A részecske szerkezetét ESR és UV-Vis mérésekkel, oldatbeli létét pedig tömegspektrometriai módszerekkel (MALDI- és ESI-MS) módszerekkel igazoltuk.

A komplexet immobilizáltuk montmorilloniton, illetve szilikagélen hidrogénhíd, illetve kovalens kölcsönhatások révén. Vizsgáltuk a szabad és a különbözőképpen immobilizált katalizátor aktivitását SOD, catechol oxidáz és kataláz tesztreakciókban. Megállapítottuk, hogy a komplex SOD aktivitása kiemelkedő, jelentős catechol oxidáz aktivitást is mutat, kataláz aktivitása nulla (ez az enzim szerkezete aktív centruma

alapján értelmezhető). Megállapítottuk azt is, hogy a hidrogénhidas rögzítés közel tízszeres aktivitásnövekedést mutat a nem immobilizált komplexhez képest.[szil-5].

## **II. 3. Interaction of functional model complexes/artificial nucleases with RNA and DNA.**

### **II. 3. 1. Simple model complexes.**

*A II.1 pontban említett peptidek funkcionálizálása pozitív töltésű oldalláncokkal (lizin, arginin) a DNS-en való megkötődés elősegítésére. A kétmagvú komplexek kialakítására alkalmas ligandumok szintézise (2006-2007). E ligandumok fémkötő, valamint a komplexek hidrolitikus sajátosságainak tanulmányozása (2007-2008).*

Vizsgáltuk a 1,3,5-trideoxi-1,3,5-trisz(metilamino)-*cisz*-inositol (tnci) rézkomplexeit és azok foszfomonoészteráz aktivitását. A pH 8 körül képződő kétmagvú  $\text{Cu}_2\text{H}_3\text{L}$  komplex igen nagy hatékonysággal (közel hat nagyságrenddel) gyorsítja meg a nitrofenil-monofoszfát hidrolízisét. A komplex aktivitása hasonló, mint az eddig legaktívabbnak vélt kétmagvú Co(III) és Ln(III) komplexeké. Ugyanakkor utóbbiakkal ellentétben szelektíven képes elősegíteni foszforsavmonoészterek hidrolízisét, hiszen a foszforsavdiészter bisz-nitrofenil-foszfát hidrolízisét illetően ~ 2500-szor kisebb aktivitást mutat.

Vizsgáltuk 1,4-bisz[(1,5,9-triazaciklododekán-3-iloxi)metil]benzol (L13) és az 1,3,5-trisz[(1,5,9-triazaciklododekán-3-iloxi)metil]-benzol (L14) zinc(II) komplexeit s azok RNáz aktivitását. Fémion felesleg esetén L13 kétmagvú, míg L14 hárommagvú komplexek kialakítására is alkalmas. Eredményeink szerint L13 kétmagvú cink(II) komplexe meglepően nagy stabilitással kötődik két szomszédos guanin bázishoz. Hidrolitikus hatása viszont épp két szomszédos guanin bázist tartalmazó szubsztrátok esetén (pl. 5'-GpG-3') a legkisebb. E szubsztrát hidrolízisét viszont jelentősen elősegíti L14 hárommagvú cink komplexe. Ennek magyarázata, hogy két Zn-makrociklus alegység szelektíven megkötődik a két szomszédos guanin bázison, így a harmadik Zn-makrociklus ideális pozícióban van a hidrolízis elősegítéséhez.

A peptidkomplexek DNS-hez való kötődésének elősegítésére Lys-tartalmú peptideket (L3, L4 és L7) állítottunk elő s igazoltuk ezek Cu(II)/Zn(II) komplexeinek erős DNS kötését. Bár a vizsgált komplexek mindegyike képes a DNS hidrolitikus hasítását elősegíteni, csak a ZnL7(OH) komplex mutat kiemelkedő aktivitást. Viszont a Cu(II)-L3/L4 komplexek  $\text{H}_2\text{O}_2$  vagy aszkorbinsav jelenlétében már  $\mu\text{M}$  koncentrációban is elősegítik a DNS oxidatív hasítását.

A peptid-nitrogének koordinációjával járó katalitikus aktivitás csökkenést megelőzendő, olyan N-acetil és C-amid végű peptideket állítottunk elő, ahol a láncban ún. töréspontként szereplő prolin található: HPHPH, vagy a hisztidin aminosavak számát növeltük HHHHHH. Kétmagvú komplexek képzésére alkalmas hosszabb (>20 aminosav) peptideket is előállítottunk. Ezek fémkomplexeinek képződését, valamint DNS-kötését és hidrolitikus aktivitását vizsgáltuk. A réz(II)-HHHHHH 1:1 molarányú rendszerben képződő részecskék a pET4 plazmid DNS hasítását idézik elő, a hatékonyság azonban a pH növelésével csökken, ami alátámasztja, hogy pH 8 körül már amid-nitrogénnel koordinált fémion található az oldatban, aminek katalitikus hatása jóval kisebb, mint a CuL részecskéé.

Tapasztalatainkat ismeretterjesztő közleményben is közzétettük.

### **II. 3. 2. Design and preparation of artificial nucleases.**

*Az ebben a pontban ismertetett munka szorosan függ a hidrolitikus modellkomplexek kifejlesztésének előrehaladásától. Ezért első lépésben ezen modellkomplexek hidrolitikus hatását tanulmányozzuk DNS-t alkalmazva szubsztrátként (2006). Ezzel párhuzamosan végezzük a szekvenciaspecifikusságot biztosító molekuláriszlet keresését, tervezését, szintézisét és tanulmányozását (2006). A szekvenciaspecifikus mesterséges apo-enzimek kémiai és biológiai szintézisére - oligonukleotid vagy PNS, NBS ill. nukleinsav-kötő fehérje hordozót alkalmazva - valamint ezek fémion-kötő sajátosságának, katalitikus aktivitásának és bázisrend felismerő képességének jellemzésére ezután kerülhet sor (2007-2008).*

A mesterséges metalloenzimek előállításához első lépésként a molekulafelismerési folyamatok megismerése a célunk. Ennek érdekében egy, nukleáz hatású peptidekhez elsőként kapcsolni tervezett Adenovírus 5 pVII fehérje, valamint a nukleáris faktor I kölcsönhatását tanulmányoztuk DNS-sel. Ezután néhány peptid, pl. HPHH, HPHPH, P20 és P24 peptidek génjeit molekuláris biológiai módszerekkel a humán adenovírus 5 DNS-ét kötő fehérjékhez csatoltuk. E fehérjéket sikerült kismennyiségben kifejezni, és a tisztítást optimalizálni. Kimutattuk, hogy a fehérjék megtartották specifikus DNS kötő képességüket.

Korábbi vizsgálataink szerint a peptidek biológiai módszerekkel történő előállítására használt GST fúziós fehérje gátolja a katalitikus funkciót. Újabb kísérleteink során egy nagyobb peptidet, a Colicin E7 nukleáz HNH motívumát (kb. 5 kDa) próbáltuk előállítani. E 42 tagú peptid előállításása során felmerült nehézségek miatt azonban az ubikvitinnel (kb. 10 kDa) fuzionált változatát állítottuk elő. A rekombináns Ub-HNH fehérjét

E.coli baktériumból sikerült nagy mennyiségben kifejeznünk. A fehérje tisztítására eljárást dolgoztunk ki, amellyel további vizsgálatokra is alkalmas tisztaságú fehérjeoldatot kaptunk. CD spektroszkópiái majd tömegspektrometriás módszerrel is sikerült kölcsönhatást kimutatni a cink(II)ionokkal, a DNS-kötő és hidrolitikus kísérletekben ez a fehérje nem bizonyult aktívnek. További kísérleteink során ezért megpróbáltunk egy olyan eljárást kidolgozni, melyben a rekombináns Ub-HNH fehérjét E.coli baktériumban nagy mennyiségben fejezzük ki, párhuzamosan egy olyan proteáz enzimmel, mely *in vivo* lehasítja az ubikvitin részt a termelődött fehérjéről. E kísérletekben azonban csak az ubikvitint sikerült előállítanunk, ami megerősítette azt a feltevést, hogy a kisméretű HNH peptidet maga a baktérium bontja le. Így arra kényszerültünk, hogy az Ub-HNH fehérjét és a proteázt külön-külön kifejezve, tisztítás után a sejten kívül végezzük el a proteolitikus hasítást. Ezzel a módszerrel sikeresen előállítottuk magát a HNH fehérjét, melyet szintén SRCD és tömegspektrometriás vizsgálatoknak vetettünk alá. A cink(II)kötés igazolása után fluorimetriás, valamint gél-shift és nukleáz tesztekben vizsgáltuk hatását a DNS-re. Eredményeink azonban negatívnak bizonyultak. Hogy a HNH peptid, bár a megfelelő szerkezetet mutatja, mégsem működőképes, valószínűleg annak tudható be, hogy nem köt a DNS-hez. Ezért előállítottuk a HNH motívumot a C-terminális részén tartalmazó ColE7 nukleáz domén 6 különböző mutáns változatát, melyek részben vagy egészben tartalmazták magát a nemspecifikus DNS-kötőhelyet is. Azonban csak a teljes méretű doménnel sikerült nukleáz aktivitást kimutatni. Mivel az egyik mutáns egyetlen aminosav cseréjével készült a fehérje N-terminális részen, arra a következtetésre jutottunk, hogy ezen aminosav meglehetősen esszenciális az enzim működése szempontjából, és egyben allosztérikus kontrollt is jelent. E lehetőséget tervezzük a továbbiakban egy biztonságos, biotechnológiai vagy terápiás célokra is használható mesterséges nukleáz megtervezéséhez, mely bármilyen részleges proteolízis hatására elveszíti aktivitását, így várhatóan nem lesz képes nemspecifikus hasítások révén a sejtet elpusztítani.

Összefoglaltuk a mesterséges kimer metalloenzimek irodalmát.

E témakörhöz kapcsolódva létrehoztunk egy, az emberi metallotionein-3 fehérjét kódoló plazmidot. Ezzel a plazmiddal sikeresen transzformáltunk E.coli baktériumokat. A fehérjekifejezés körülményeinek optimalizálása hosszadalmas folyamat, mely még nem fejeződött be.

### Expected outcomes

Bár a bevezetőben említett okok miatt elképzeléseinket módosítanunk kellett, alapvetően megvalósult elképzelésünk, és sikerült elmozdulásunk a kismolekulájú modellrendszerek vizsgálatától a valós rendszereket jobban közelítő a biológiai kémia nézőpontjának jobban megfelelő és a molekuláris biológia eszköztárához is alkalmazó vizsgálatok irányába.

Ennek érdekében a Szegedi Biológiai Kutatóközpont munkatársaival és külföldi kooperációs partnerekkel erősítettük kapcsolatainkat és hazai segítséggel egy minimális munkák végzésére alkalmas molekuláris biológiai laboratóriumot alakítottunk ki. Fiatal kollegáink is jelentős mértékben részesültek ilyen irányú hazai és külföldi képzésben, szakmai látóköriük jelentősen bővült, amit mi sem bizonyít jobban, mint hogy az MTA Kutatócsoportban való állásuk elvesztése után hárman is ilyen jellegű hazai, illetve külföldi állásban helyezkedtek el vagy nyertek el ösztöndíjat.

A projekt eredményeit, amint azt a mellékelt lista is mutatja 5 PhD értekezésben, 47 közleményben foglaltuk össze, ezek összesített hatástényezője 124.141 és 27 előadást mutattunk be hazai, illetve nemzetközi konferencián. A munkákba nagy számban kapcsolódtak be fiatalok: a középiskolás tehetség-gondozás keretén belül két fiatal dolgozott csoportunkban 1 hónapon át, akik munkájukkal 2006-ban 2 díjat nyertek. Egyetemi hallhatóink 5 pályamunkát mutattak be Országos Tudományos Diákköri Konferenciákon és ezeken 3 díjat nyertek.

Szeged, 2010. január 23.

Dr. Kiss Tamás  
témavezető