

## A K-72781 sz. OTKA szerződés záró beszámolója

A projektben azt a célt tűztük ki, hogy termodinamikai paramétereket határozzunk meg - elsősorban ESR spektroszkópiai módszerekkel - olyan fém-komplexekben, ahol a ligandumok biológiai fontossággal rendelkeznek. A célt sikeresen megvalósítottuk, amit a közölt 14 tudományos publikáció is mutat (40,5 impakt pont), és ezt 4 konferencia közlemény egészíti ki, amelyekben bemutatott tudományos eredmények alapján a közeljövőben további 3-4 kéziratot tervezünk benyújtani.

Amint a projekt kutatási tervében kifejtettük a vizsgálatok legfontosabb eszköze az elektron spin rezonancia spektroszkópia (ESR). A módszer csak paramágneses rendszerekben alkalmazható, viszont ilyen típusú anyagok esetén a technika rendkívül érzékenyen tükrözi a fém környezetének szerkezetét, a koordinációt, amiért a hagyományos potenciometrikus és optikai módszereknél részletesebb információt nyújt a lehetséges koordinációs módokról beleértve izomerek jelenlétét is. Ezek az információk jelentős szerepet játszanak bizonyos fémek (réz, mangán, vanádium, vas, kobalt, króm) biológia hatásmechanizmusának tisztázásában. A gazdag információ megszerzése céljából szükséges volt egy integrált kiértékelési módszer kidolgozására, amit a korábbi OTKA támogatással (OTKA T-032929, OTKA T-046953) finanszírozott kutatás során valósítottunk meg. Ez a módszer az ESR spektrumok kétdimenziós kiértékelése, amelyben összegezni lehet nagyszámú és különböző körülmények (koncentráció, pH, hőmérséklet) között felvett spektrum információ tartalmát. Erre különösen akkor van szükség, amikor az egyedi spektrumok az összetett koordinációs viszonyok miatt nem adnak lehetőséget az egyedi specieszek szétválasztására és szerkezeti, valamint termodinamikai paramétereinek meghatározására.

Az elvégzett munka túlnyomó részben egy akadémiai kutatóintézet (korábban Kémiai Kutató Központ, Szerkezetkutatói Intézete, jelenleg a Természettudományi Kutatóközpont Molekuláris Farmakológiai Intézete) és egy egyetem (Szegedi Tudományegyetem, Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszéke, valamint Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéke) közötti együttműködésén alapult. Az akadémiai intézet biztosította az ESR spektroszkópiai infrastruktúrát és kidolgozta a mérésiértékelés számítógépes alapját, az egyetem munkatársai a kísérletek kémiai feltételeit (vegyületek előállítása, minták készítése) és kiegészítő potenciometrikus és optikai vizsgálatok elvégzésével vettek részt. Az eredmények kiértékelése és a kéziratok elkészítése közös feladat volt. A projekt munkálataiban fontos szerepet kaptak nemzetközi együttműködések is. Ennek alapját az általunk kidolgozott ESR spektrum szimulációs módszerek adták, melyek közül a kutatási tervben is felsorolt egyetemek (Rosario Egyetem, Argentina; Université de Provence, Marseille, Franciaország; Slovak Technical University, Bratislava, Szlovákia; Institute of Technology Tallaght, Dublin, Írország) vettek részt. Érdemesnek látjuk megemlíteni a mostani beszámolóban nem feltüntetett, de az elvégzett munka közvetett hatását mutató eredményeket is. Az általunk kidolgozott spektrumkiértékelési módszer növekvő mértékben került felhasználásra egyéb nemzetközi együttműködésekben: egy portugál, további három francia, két USA, egy mexikói egyetem illetve kutatási intézménnyel jött létre együttműködés, melynek keretében több közös – az OTKA projekthez csak indirekt módon kapcsolódó és ezért OTKA támogatást fel nem tüntető - publikáció született. Ez eredményezte, hogy a jelenlegi OTKA szerződés időszakában (2008-2012) összességében közel ezer független hivatkozás érkezett a korábbi és jelenlegi projektben szereplő, illetve indirekt módon ezekhez kapcsolódó publikációkra.

A projekt célkitűzési között fontos szerepe volt, hogy a farmakológiai felhasználást elősegítő feltáró jellegű kutatást végezzünk, ezért a munka különböző biológiailag fontos, a gyógyászatban szerepet játszó ligandumok fém-koordinációs tulajdonságait vizsgálta. Amint a továbbiakban bemutatjuk több esetben is olyan eredményeket kaptunk, melyek segítenek az egyes vegyületek biológiai hatásmechanizmusának tisztázásában és elősegíthetik a jövőben a gyógyászati alkalmazásokat is, de közvetlen hasznosításhoz még további kutatás szükséges.

A publikációs jegyzék [1] számú munkájában számoltunk be néhány elágazó láncú:  $(\text{NH}_2\text{-His-His})_2\text{Lys-CONH}_2$ ,  $(\text{NH}_2\text{-His-Gly})_2\text{Lys-CONH}_2$  peptid típusú fémkötő modellvegyület előállításáról és oldatbeli egyensúlyi vizsgálatáról, valamint oldatszerkezetének tanulmányozásáról. A paramágneses Cu(II)-vel való komplexképződésén kívül Zn(II)-vel való koordinációt is tanulmányoztuk, ezért sor került pH-potenciometrikus mérések mellett UV/látható és CD felvételek készítésére is. Megállapítottuk, hogy poláris oldallánc alkalmazása megakadályozhatja a vizes oldatból való komplex kiválását a semleges pH tartományban. Rövid peptid láncok esetén az általunk vizsgált esetben először lehetett olyan koordinációt kimutatni, amikor nem jön létre az amid nitrogén koordinációja Cu(II)-vel és hidroxid képződés sem jön létre Zn(II) és Cu(II) ionokkal. Modell vegyületekben, természetes DNA plazmában és szuperoxid dizmutáz reakciókban egyaránt kimutatható volt, hogy a Zn(II) komplex jelentős mértékű hidrolitikus bontást idéz elő.

A [2] számú publikáció demonstrálja a hőmérsékleti hatást. Az L- pirimidilmethanol gyulladásgátló hatása Cu(II) komplexben felerősödik. Megvizsgáltuk, hogy milyen koordinációs típusok léphetnek fel különböző hőmérsékleten, amelyek okozhatják a megfigyelt gyógyászati hatást. A termodinamikai jellemzés érdekében összevetettük a szobahőmérsékleten, illetve 77K fokon való komplexképződés eltéréseit. Az ESR spektrumok analízisét és a képződési állandók meghatározását a 2D\_EPR program segítségével végeztük el. A megfigyelt változást alapvetően a képződési entalpia eltérésére lehetett visszavezetni.

A [3] számú közlemény kitekintést enged az ESR spektroszkópia egy másfajta alkalmazási területére, ahol termodinamikai információt nyerhetünk. Ezt a vizsgálatot a BME Fizikai Intézetének munkatársaival való együttműködés keretében végeztük. A komplex képződés analógiájára a  $\text{C}_{60}$  fullerénbe N atomot lehet bevinni, illetve spin-jelölést lehet végrehajtani szénből felépülő nano-struktúrákban (peapod illetve SWCNT= egyfalú szén nanocső). Kimutattuk, hogy kristályos formához képest magasabb hőmérsékleten lép ki a nitrogén a fullerénből, ha peapod struktúra jön létre. A spin-jelölt nanocső mozgékonyságának változását a hőmérséklet függvényében termodinamikai paraméterekkel jellemeztük.

A [4] közlemény az Université de Provence kutatóival való együttműködés keretében jött létre. Ennek célja a növényi hormonok növekedést gyorsító illetve pigmentációt elősegítő mechanizmusának tanulmányozása volt. A réz(II) ACC (1-aminocyclopropane carboxil sav acid) és AIB (aminoisobutiric acid) egyéb ligandumokkal kombinálva olyan komplexeket hoz létre, amelyek hidrogénperoxid jelenlétében az ACC-ét etilénre alakítják át. Az átalakítási folyamatban jelentős szerepet tulajdonítottunk a Cu(I)-OOH speciesz képződésének.

A nyíltláncú glikoproteinek Cu(II) és Zn(II)-vel való koordinációját vizsgáltuk az [5] publikációban. A hisztidinben gazdag glikoprotein (HRG) egy egyszerű polipeptid lánc, amely megtalálható számos emlős plazmájában, közöttük az emberében is. Az emberi HRG több különböző doménből tevődik össze, közöttük két prolinban gazdag rész (PRR) között egy hisztidinben gazdag (HRR) szekvencia található. A polipeptidnek ez az összetett szerkezete lehetőséget ad különböző ligandumok (heparin, tropomiozin, plazminogén,

fibrinogén stb.) és fémek ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  stb.) megkötésére. Az ESR spektroszkópia segítségével megállapítottuk, hogy vizes oldatban, biológiai pH-n az oldalláncot alkotó imidazol csoportok koordinációja a domináns kötési mód. Lúgos oldatban a peptidok amid csoportjainak deprotonálódása is kimutatható, amely két izomer szerkezetet hoz létre.

A [6]-ik közleményben mutatjuk be az u.n. MAP (multiple antigenic peptide) típusú elágazó peptidok kötési tulajdonságait  $Cu(II)$  és  $Zn(II)$  ionokkal. A vizsgálat célja a metalloenzimek tulajdonságainak modellezése és olyan oldallánc csoport alkalmazása, amelyik lúgos tartományban is megakadályozza az amid csoport deprotonálódását és a hidrolizált termék kiválását. Kombinált szerkezetkutatási módszerek révén azonosítottuk a létrejövő mono- és dianion komplexeket, és nagyszámú speciesz képződési állandóját határoztuk meg.

A [7]-es számú közlemény veti fel a kérdést, hogyan lehet a szervezetben felhalmozódó nehézfémektől (pl.  $Zn(II)$ ,  $Cu(II)$ ,  $Fe(III)$ ) megszabadulni, amelyek Alzheimer kór kialakulását idézhetik elő. Ennek érdekében vizsgáltuk meg az oligopeptidok  $Cu(II)$  komplexeinek ESR spektrumát 77K hőmérsékletű megfagyasztott oldatokban. A pH függvényében felvett spektrumok alapján 8 különböző specieszt lehetett azonosítani, melyek közül kettő  $Cu_2LH_4$  típusú dimer volt. A dimerek közül az egyikben gyenge, a másikban erős mágneses dipólus kölcsönhatás lép fel, amit az utóbbi esetben a két fémiont összekötő OH híd okozhat. Feltehetően ez a kötési mód vezethet akkumulált réz klaszterek kialakulásához is.

A [8]-ik közleményben a gyógyászatban alkalmazott különböző ligandumok réz ESR spektrumainak spektroszkópiai problémáival foglalkozunk. Sorra vesszük azokat a nehézségeket, amelyek nehezítik egyes spektrumok kiértékelését a 2D-felbontás segítségével. Itt mindenekelőtt dinamikus effektusok játszanak szerepet, mert a specieszek gyors egymásba alakulása megakadályozhatja az egyes komplexek ESR paramétereinek és ezáltal kötési módjuknak megállapítását. Megfagyasztott oldatokban ez a nehézség elkerülhető, ekkor azonban klaszterképződés nehezítheti az analízist, ami viszont részben elkerülhető gyors fagyasztási technika alkalmazásával.

A [9]-ik közleményben - amit a dublini Institute of Technology Tallaght kutatócsoportjával együttműködve publikáltunk - a *Candida albicans* elleni nagy hatékonyságú, kumarin-származék Schiff-bázisok és rézkomplexeik oldategyensúlyait vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy egyensúlyi körülmények között csupán egy ligandummolekula kötődik a fémionhoz, és különböző protonáltságú mono-komplexek vannak jelen folyadék fázisban. A szerveskémi szintézis során előállított szilárd bisz-komplexek feloldás után vízmentes közegben stabilak, ugyanakkor víz jelenlétében lassan elbomlanak. A Schiff-bázisok redukciójával előállított szekunder aminok elvesztik gombaölő hatásukat, viszont egyes származékok hatékonyan pusztítják a ráksejt-kultúrákat.

A [10]-es számú közleményben vizsgáljuk a tioszemikarbazon vegyületeket, melyeket széles körben használnak fémionok spektrofotometriás és spektrofluorimetriás kimutatására, és ezen túlmenően jelentős biológiai hatással is bírnak, pl. antimaláriás, antibakteriális és antitumor hatásúak. A rákellenes hatásuk bizonyítottan ahhoz köthető, hogy a ribonukleotid redukáz enzim vasionjaival komplexet képeznek, így gátolják a DNS szintézishez nélkülözhetetlen enzim működését (Shao J., et al., *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5, 586-592). Egyik képviselőjük, a Triapin (3-aminopiridin-2-karboxaldehid tioszemikarbazon) jelenleg a klinikai fázis-II stádiumban van kipróbálás alatt, mint rákellenes hatóanyag. A komplexképző sajátságait azonban rossz oldhatóságuk miatt eddig csak szerves oldószerekben, vagy szilárd fázisban vizsgálták. Az általunk végzett vizsgálatok célja az volt, hogy 30% DMSO-viz

oldatában összehasonlítsunk néhány ilyen tioszemikarbazon ligandum komplexképését biológiailag fontos fémionokkal (Cu(II), Fe(II), Fe(III), Zn(II), Ga(III)). A paramágneses réz(II)-komplexek vizsgálatában a szobahőmérsékleten felvett ESR spektrumok 2D kiértékelése nyújtott igen megbízható egyensúlyi és szerkezeti információt. A cseppfolyós nitrogén hőmérsékleten felvett spektrumok segítségével további információt nyertünk a komponensek szerkezetéről az anizotrop ESR paraméterek meghatározásával. A szóban forgó publikációban három tioszemikarbazon vegyület komplexképzését hasonlítottuk össze réz(II), cink(II) és vas(II) ionokkal. Ebben kimutattuk, hogy az N-metilezett származékok esetén a tio-S-koordináció jelentős vetélytársa lehet a piridin-N koordinációjának, és mind a Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub>H, mind a Cu<sub>2</sub>L<sub>2</sub> összetétel kétféle izomer szerkezetben valósulhat meg. Ezen túlmenően az ESR spektrumokban mérhető intenzitáscsökkenés alapján kimutattuk, hogy biológiai pH-n (~7) kétszeres ligandumfeleslegben a domináns vegyület egy Cu<sub>2</sub>L<sub>3</sub> összetételű két-magvú komplex.

A [11]-es sorszámú tétel konferencia előadás, a kézirat előkészületben. Ebben a munkában izomerek mikrospeciációját vizsgáltuk multihisztidin peptidek esetén. Nagyobb tagszámú fémkötő peptideket, illetve kisebb méretű fehérjéket állítottunk elő biológiai módszerek segítségével, melyek tisztítására eredményes eljárásokat dolgoztunk ki, és részben CD és fluoreszcencia spektroszkópiás, ill. tömegspektrometriás módszerekkel tanulmányoztuk a fémion-megkötő sajátosságukat elsősorban cink(II) ionnal. Ilyen, fémkötő fehérjemotívumok elméleti modellezését is elvégeztük. A 42-tagú HNH motívum egyike a biológiai úton előállított peptideknek, melyek a colicin E7 nukleáz enzim aktív központját modellezzik.

A [12] számú közlemény kvantumkémiai félempirikus számításokat mutat be, abból a célból, hogy tisztázza a cink-finger (ZF) kötési módját DNA molekulához. Ezek a számítások a molekuláris felismerés (recognition) szempontjából fontosak. A ZF kötési módot külön vizsgáltuk specifikus és nem-specifikus DNA esetére. A kötési módok specifikusságának mértékét korrelációba lehetett hozni a kötési entalpiával. Nagy méretű DNA duplexekre számításokat végeztünk a hidrogén kötések és a pi-pi molekuláris pakolódások (stacking) szerepének tisztázása érdekében. Az eredmények elősegíthetik az aminosavak bázissorrendjének meghatározását is.

A [13] számú konferencia előadás eredményeit bemutató publikáció elkészítése folyamatban van. Ebben a munkában széles hőmérsékleti tartományban vizsgáltuk hisztidilglicinek rézzel való koordinációs egyensúlyait. A [CuL]<sup>+</sup> specieszek esetén két izomer jelenléte volt kimutatható, az egyik hisztamin, a másik peptid típusú kötést hoz létre a Cu(II) ionnal. A két izomer arányát a hőmérséklet függvényében a Van't Hoff relációalapján követtük:

$$\ln K = \frac{\Delta S}{R} - \frac{\Delta H}{RT}$$

A kiértékeléshez az új 2D\_ESR programot használtuk, melyben a

hőmérséklet függvényében felvett spektrumsorozatot egyidejűleg értékeljük ki, ahol az ESR paramétereket (g-, hiperfinom és relaxációs állandók), valamint a termodinamikai paramétereket ( $\Delta S$  és  $\Delta H$ ) egyidejűleg illesztjük. A kiértékelés alapján kapott termodinamikai adatok azt mutatták, hogy magas hőmérsékleten a peptid amid csoportjának deprotonálódása a leggyorsabb reakció, míg alacsony hőmérsékleten az oldallánc koordinálódása válik dominánssá. Az elvégzett CD vizsgálatok eredményei a fentiekkel összhangban vannak

A [14] és [15] közlemény a szlovákiai kutató csoporttal való együttműködés eredménye. A munka a szalicil sav koordinációs tulajdonságait vizsgálja, amelynek fontosságot ad az aszpirin (acetilszalicilsav) gyógyászati szerepe. A szalicilsav és származékainak Cu(II) komplexei hatékony szerek gyulladáscsökkentő betegségek, továbbá a rák, diabétesz és egy sor más betegség gyógyításában. A munka során különböző helyzetben szubsztituált fluoro-

szalicilsavak összehasonlító egyensúlyi vizsgálatát végeztük el kombinált pH-potenciometriás, spektrofotometriás, valamint 2D\_ESR módszerrel. A F-atom helyzete jelentősen befolyásolja az egyes ligandumok komplexképző képességét; ezt a ligandumokra vonatkozó kvantumkémiái számítások alapján értelmeztük. Érdekes párhuzamosságot ismertünk fel a komplexképző hajlam és a ligandumoknak a növények védekezőképességben játszott eltérő, irodalomban közölt hatékonysága között.

A réz(II) – 4-fluoro-szalicilsav – N,N-dietil-nikotinamid rendszerben, oldatban 3 vegyes ligandumú komplexet mutattunk ki, amelyek közül az egyiket sikerült kikristályosítani és röntgendiffrakcióval megvizsgálni a szerkezetét. A semleges oldatban kialakuló vegyes komplex koordinációs módjait a 2D\_ESR módszerrel derítettük föl.

A [16]-os számú publikációban a szalicilaldehid tioszemikarbazon (STSC) komplexképzését vizsgáltuk a Zn(II), Cu(II), Fe(II), Fe(III), Ga(III) ionokkal. A komplexek stabilitási állandói alapján felállíthattunk egy sorrendet amely alapján megállapítottuk, hogy a stabilitás a Ga(III) < Zn(II) < Fe(II) < Fe(III) < Cu(II) sorban nő. Az oldategyensúlyi vizsgálatok kimutatták, hogy a Fe(II), Fe(III) és Ga(III) ionok esetén mono- és bisz-komplexek is képződtek, míg csak mono-komplexeket tudtunk kimutatni a Cu(II) és Zn(II) ionok esetén. Megállapítottuk, hogy a Ga(III)-STSC nagyobb, míg a Fe(II)- STSC komplex szignifikánsan kisebb stabilitást mutatott, mint a megfelelő, korábban vizsgált Triapine ligandum.

A [17] számú publikációban számoltunk be az Alzheimer kór gyógyításához potenciálisan alkalmas réz és cink komplexekkel történt vizsgálatokról. Eben a tanulmányban hisztidinben gazdag elágazó peptidek koordinációját vizsgáltuk. Kétféle hisztidinben gazdag peptidet állítottunk elő szilárdfázisú fehérje szintézis során, ahol az elágazó lánc lizin volt. Meghatároztuk, hogy a Cu(II) illetve Zn(II) komplex milyen mértékben képes gátolni a fémionok által előidézett amiloid aggregációt. Ez a tulajdonság összefügg az alkalmazott ligandumok igen jó fémmegkötő képességével a semleges körüli pH tartományban. A vizsgálatokat pH potenciometriával, UV-látható spektroszkópiával, valamint ESR és NMR módszerrel végeztük. Széles koncentrációtartományban lehetett az egy és két fém tartalmú komplexeket kimutatni. Az alapvető kötési mód vagy tridentát (amino, amid és imidazol nitrogénnel), vagy hisztamin típusú volt, melyek makrociklusokat hoztak létre. Az alkalmazott peptidek hatékonyan akadályozták a réz aggregációt, viszont a folyamat nem volt elég gyors cink esetén. Eredményeink alapján esélyt látunk arra, hogy további elágazó peptideket találjunk, amelyek megakadályozhatják a plakk-képződést az Alzheimer kór előrehaladása során.

A [18] számú közleményben tioszemikarbazon kötődési tulajdonságait vizsgáltuk aminosavat tartalmazó vegyes komplexképző rendszerekben. Prolin aminosav beépítésével sikerült egy olyan tioszemikarbazon vegyületet előállítanunk, amely javította a vegyület vízben való oldhatóságát. Ennél a ligandumnál a citotoxicitás vizsgálatok a réz-komplexek esetén jelentősen megnövekedett aktivitást mutattak a szabad ligandumokhoz képest. A réz-komplexek sík négyzetes szerkezetét röntgen diffrakciós vizsgálatok, valamint ESR spektroszkópiái mérések is alátámasztották. Feltételezésünk szerint ennek a síknégyzetes szerkezetnek szerepe lehet biológiai aktivitásban, hasonlóan mint cisz-platin esetén. Ennek igazolására további síknégyzetes és piramis geometriájú komplexek összehasonlítását tervezzük.

A felsoroltakon túlmenően további vizsgálatokat is végeztünk, az eredményekről a közeljövőben számolunk be. Ezek közül kiemelném az L-DOPA rézkoordinációjára vonatkozó eredményeket. A réz(II)–L-3,4-dihidroxi-fenilalanin (L-DOPA) rendszer érdekes

példája az olyan komplex egyensúlyi rendszernek, amelyben a ligandum egymással versengő, közel azonos erősséggel koordinálódó kötőhelyeket tartalmaz, és mint ilyen, oldatban igen változatos szerkezetű komplexek alakulhatnak ki. A 2D\_ESR módszerrel, valamint a megfagyasztott oldatban felvett ESR-spektrumok analízisével kimutattuk, hogy különösen a fiziológiai pH-tartományban figyelhető meg sokféle koordinációs mód az aminokarboxilát-katecholát vegyes koordinációjú molekulafajták jelenléte révén; ez fontos adalék lehet a ligandum változatos, bizonyos körülmények között ellentétes biokémiai hatásainak megértéséhez. Előkészületben lévő publikáció: T. Szabó-Plánka, A. Rockenbauer, N. V. Nagy: „Versatile coordination modes in the copper(II)–L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) equilibrium system at the physiological pH. An ESR study involving the 2D-simulation of series of spectra”.