

Kiss Tamás – Gajda Tamás – Enyedy Éva Anna – Gyurcsik Béla
– Jakusch Tamás – Jancsó Attila

■ SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport

Bioszervetlen kémiai kutatások a Szegedi Tudományegyetem Kémiai Intézetében

A bioszervetlen kémiai kutatócsoport rövid története

A bioszervetlen kémiai kutatások a Szegedi Tudományegyetemen 1983-ban, tehát valamivel több mint 30 évvel ezelőtt [1] indultak meg, amikor a néhai Burger Kálmán akadémikus Szegedre kerülve átvette a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék vezetését, valamint megalakította az MTA Biokoordinációs Kémiai Kutatócsoportját. A csoport fő profilja kezdetben különböző bioligandumok, döntően peptidek, szénhidrátok és származékaik létfontosságú fémionokkal való kölcsönhatásának tanulmányozása, a komplexképződési folyamatok termodinamikájának és a fémkomplexek szerkezetének leírása volt. E kutatásokba a kezdetektől bekapcsolódott Labádi Imre, Nagy László, Nemesné Vetéssy Zsuzsa és Véber Margit, valamint hosszabb-rövidebb időre számos fiatal kutató (a jelenleg is a csoportban dolgozókon kívül Buzás Norbert, Jakab Ida Noémi, Jankovics Hajnalka, Lakatos Andrea, Schrantz Krisztina, Sija Éva, Sipos Pál). A 80-as évek leglátványosabb eredménye: a Richter Gedeon Rt.-vel közös kutatásokban kifejlesztettük a sebgyógyító hatású Zn(II)-hialuronát komplexet, ami hazánkban Curiosin/Curiosa néven a mai napig is forgalomban van, sőt több országban is gyártják. A gyógyhatású fémkomplexek vizsgálata azóta is fontos részét képezi a csoport kutatásainak. A 90-es évek elejére tehető a rákellenes ón(IV)organikus vegyületek vizsgálatának beindulása. A csoportban felnövekvő fiatalabb generáció is újabb kutatási irányokat indított el, például a hisztidintartalmú peptidek fémionokkal való kölcsönhatásának tanulmányozását. 1996-ban

a Debrecenből érkező Kiss Tamás vette át a tanszék, majd 1999-től az MTA-kutatócsoport irányítását. Kiss Tamás Szegeden folytatta a vanádium- és alumíniumionok koordinációs kémiájának tanulmányozását. A csoport kutatási palettája a 90-es évek második felétől kezdődően számos új területtel bővült, és egyre inkább eltolódott a természetes makromolekulákkal való kölcsönhatások vizsgálatának irányába. Megindultak a fehérjék fémkötő saját-ságaival, valamint a metalloenzimek funkcionális modellezésével kapcsolatos kutatások. Mindezek már túlmutattak a szorosan vett biokoordinációs kémián, így a kutatócsoport neve is Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportra változott.

A bioszervetlen kémiai kutatások a tanszéken és az akadémiai kutatócsoportban szoros együttműködésben folytak. Ez a közös munka az évek során 2 MTA doktori, 6 kandidátusi és 25 egyetemi doktori/PhD-disszertációt eredményezett. Az elmúlt bő 30 évben a szegedi bioszervetlen kémiai kutatások hazai és nemzetközi ismertséget és elismertséget vívtak ki. Olyan fiatal generáció nőtt fel Szegeden, amely személyesen is elvitte hírünket a világ sok országába, és öregbíti azt ma is, hisz sokan most is dolgoznak. Reméljük, egyszer hazatérnek.

Nemzetközi ismertségünket és elismertségünket jelzi az is, hogy „történetünk” alatt több nemzetközi konferenciát rendeztünk, melyek közül kiemelnénk a 2011-es 4th European Conference on Chemistry for Life Sciencest (szervezők: Perczel András, ELTE és Kiss Tamás, SZTE) és a 2016-os 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference-t (szervezők: Sívágó Imre, DE és Kiss Tamás, SZTE). Mindkét konferen-

cia 5 földrész 40–50 országának kb. 400 résztvevőjével nagy sikerrel mutatta be a tudományterület aktuális, friss eredményeit, a résztvevők teljes melegegedésére. Mindkét konferencia szervezőmunkájában az MKE volt segítségünkre.

Egy ilyen áttekintés során szomorú kötelességünk megemlékezni Burger Kálmának 2000-ben, valamint Nagy Lászlónak 2010-ben bekövetkezett haláláról.

Mutatkozzanak be a csoport ma dolgozó aktív tagjai, a szenior kollegák mellett a posztdoktor munkatársak és a PhD-hallgatók is, hiszen az ő munkájuk legalább annyira meghatározó eredményeinkben, mint a tapasztaltabb munkatársaké: a képen balról jobbra, felső (két) sor: Szunyogh Dániel, Jakusch Tamás, Gyurcsik Béla, Szekeres Levente, Kiss Tamás, Gajda Tamás, Matyuska Ferenc, Szorcsik Attila, Jancsó Attila; alsó sor: Balogh Ria Katalin, Czene Anikó, Dömötör Orsolya, Dancs Ágnes, Meszterházy Edit, Enyedy Éva Anna.

A Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport tagjai 2017-ben





A jelenleg is folyó bioszervetlen kémiai kutatások rövid bemutatásakor részben támaszkodunk közelmúltbeli, 30 éves munkánkról szóló beszámolóinkra [1].

Gyógyhatású vegyületek

Egy készítmény hatásosságának értékelésénél figyelembe kell venni, hogy az annak preparálása során alkalmazott kísérleti körülmények rendszerint különböznek attól, ami az élő szervezetben uralkodik, ahol a vegyület a biológiai hatását kifejti. Az oldószer minősége, illetve a biológiai nedvek, a sejtek, a szövetek folyadéka, azok pH-ja jelentősen különbözhet. Továbbá egyéb biomolekulák lehetnek jelen a biológiai rendszerekben, melyeknek nagy lehet az affinitása az adott fémionhoz, és így ezekben a molekulákban az eredeti fémionhordozó ligandumok részben vagy teljesen helyettesíthetők i) a szájon át adott gyógyszerek esetén a gyomor-bél szakaszban való felszívódásuk során; ii) a véráramban való szállításuk során a szérumkomponensekkel való kölcsönhatás eredményeként, illetve iii) a sejtekben az endogén biomolekulákkal való kölcsönhatás révén. Ennek megfelelően az eredeti hordozó ligandumok részben vagy teljesen „elveszhetnek”, és teljesen más formában lehet a biológiailag aktív részecske, mint amilyen formában a fémion beadásra került. A készítmény szervezetben való lehetséges átalakulásainak nyomon követése alapvető fontosságú lehet a készítmény hatásmechanizmusának felderítésében. Ezek a kutatások a rákellenes fémkomplexekre, az antidiabetikus fémvegyületekre és a neurodegeneratív betegségekben felhasználható fémionokra alapozott terápiás szerekre összpontosítanak.

Rákellenes fémkomplexek biospeciációja

A tumoros megbetegedések esetén használt farmakonok alkalmazhatóságát gyakran korlátozza a toxicitásuk és a fellépő rezisztencia, így az újabb alacsonyabb kockázatú és szelektív terápiás szerek fejlesztésére még mindig erős az igény. Az anti-tumor fémkomplexek közül a ciszplatina klinikai alkalmazásának sikere erősen ösztönözi az újabb típusú fémkomplexek előállítását és tesztelését. A nem platinaalapú fémkomplexek közül a legígéretesebbek a klinikai kipróbálás alatt álló Ru(III)- és Ga(III)komplexek; de számos Ru(II)-, V(IV/V)-, Fe(II/III)- és Cu(II)komplex is hatékonyan bizonyult [2]. Munkánk során új fejlesztésű fémkomplexek biotranszferrin-folyamatait és biospeciációját vizsgáljuk szoros együttműködésben Bernhard K. Keppler professzor (Bécsi Egyetem) kutatócsoportjával. Ezeknek a folyamatoknak a megismerése alapvetően fontos, hogy megjósoljuk a gyógyszerjelölt fémkomplex farmakokinetikai viselkedését, és nagyban hozzájárul a hatásmechanizmus megértéséhez, a sikeres gyógyszerfejlesztéshez. Az *in vitro* vizsgálati adatok birtokában pedig (matematikailag és kémiailag) modellezni tudjuk a biológiailag releváns koncentrációviszonyok és bioligandumok jelenlétében a fémkomplexek viselkedését.

Jelentős eredményeket értünk el a klinikai fázis II vizsgálatokba került rákellenes tioszemikarbazon gyógyszer-molekula, a Triapine és származékainak Cu(II)-, Zn(II)-, Fe(II/III)-, Ga(III)- és V(IV/V)ionokkal képzett komplexei esetén. A fémkomplexek összetételének, stabilitásának jellemzése mellett összefüggéseket találtunk oldategyensúlyi eredmények és a biológiai aktivitás között. Például egyértelmű korreláció áll fenn a Fe(II)-tioszemikarbazon biszkomplexek fiziológias pH-ra számolt látszólagos állandói és a mért citotoxicitási adatok között [3–5].

Emellett a klinikai fázis I vizsgálatokon sikeresen túljutott Ga(III)-oxinátó, -malto-látó-komplexek oldatspeciációját és vér-szérum-transzportfehérjékkel való kölcsönhatását is részletesen jellemeztük [5]. Nagy területet ölelnek fel a fémorganikus Ru(II/III)komplexek oldategyensúlyi vizsgálatai is. Részletesen tanulmányoztuk két klinikai fázisban lévő Ru(III)komplex kölcsönhatását humán szérumalbuminnal, és megállapítottuk, hogy ennek a fehérjének kitüntetett szerepe van a komplexek szérumbeli eloszlásában [7]. A félszendvics fémorganikus ródium- és ruténiumkom-

plexek oldatspeciációs vizsgálatai rámutattak arra, hogy az (O,O), (O,N), (O,S) donor-atomok koordinációja egyre nagyobb stabilitást és növekvő biológiai aktivitást okoz [8, 9].

Antidiabetikus fémkomplexek

A cukorbetegségnek, korunk egyik krónikus civilizációs betegségének kezelésében szükségessé válhat inzulin adagolása, mely ma csak injekció formájában lehetséges. Számos fémion adagolása az inzulinéhoz jelentős mértékben hasonló hatást vált ki, de közülük csak a VO(IV/V) és a Zn(II) az, amely terápiás célra szóba jöhet. Mivel ezek az ionok, az inzulinval szemben, szájon át is a szervezetbe juttathatók, alkalmazásukkal szükségtelenné válhatna az injekció használata. A szervetlen vanádi-umsók azonban csak korlátozott inzulin-utánzó hatással bírnak, melyen komplexképzőkkel sikerül javítani. Legmegfelelőbbnek az oxovanádium(IV)ion kétfogú ligandummal alkotott semleges biszkomplexei bizonyultak. Csoportunk e komplexek jellemzésével, a stabilitási állandók és a részecskeeloszlások meghatározásán keresztül kapcsolódott be az 1990-es évek második felétől az antidiabetikus komplexek kutatásába: a vérszérumbeli részecskeeloszlás meghatározására törekedve.

Számos VO(IV) inzulinutánzó komplex részecskeeloszlását határoztuk meg, valamint vizsgáltuk kis molekulatömegű szérumalkotókkal történő vegyes ligandumú komplex képződését is.

A vérszérumban azonban fehérjék is képesek fémionokat megkötni, például a transferrin a Fe(III), a humán szérumalbumin a réz(II)ion szállításáért felelős. Az apotranszferrin (apoTf) két közel egyforma egysége kvantitatíve köt egy-egy vanádium(IV)iont, ezért a stabilitási állandók meghatározása ligandumkiszorításos módszerrel történt [10]. A humán szérumalbumin több nagyságrenddel gyengébben köti a VO(IV)iont [11].

A stabilitási állandók ismeretében modellszámításokat végezve igazoltuk, hogy a VO(IV), a terápiának megfelelő koncentrációtartományban (< 10 μ M), kizárólag az apoTf-hez köt, az eredeti ligandumok teljes mértékben kiszorulnak a fémion koordinációs szférájából. ApoTf-t nem tartalmazó egyéb részecskék csak akkor fontosak, ha az oxovanádium(IV) koncentrációja meghaladja a fehérjéét (37 μ M) [12]. Ez egyéb alkalmazásokban, például a rák-terápiában fordulhat elő.

Mindezek alapján állítjuk, hogy az antidiabetikus oxovanádium(IV)komplexek li-





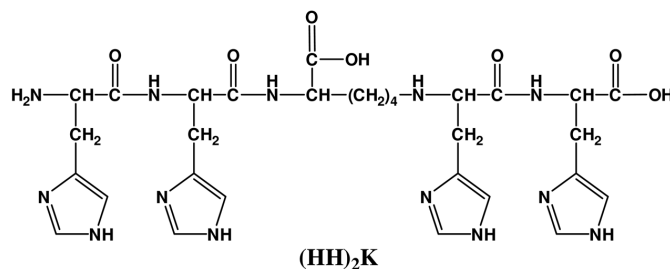
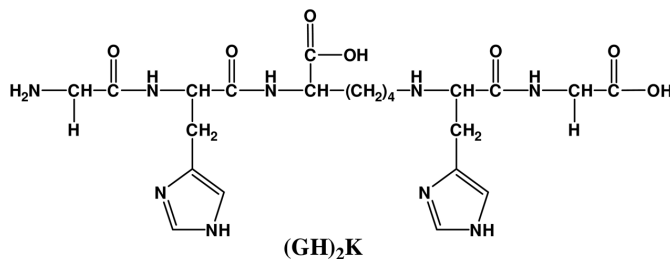
gandumainak nincs köze az effektushoz, a fémion az aktív metabolit, és csak olyan új ligandumok tervezése célszerű, amelyek a vanádium felszívódásának mértékét kívánják növelni. Sajnálatos módon az egyetlen, klinikumban tesztelt vanádiumkomplex a bisz-etilmaltolát-oxovanádium(IV) nem jutott túl a klinikai tesztek második fázisán [13].

Megemlítendőnek tartjuk, hogy 2004-ben Szegeden került megrendezésre a 4th International Vanadium Symposium 25 ország száznál több résztvevőjével, akik itt vitatták meg a vanádium biokémiájában és kémiájában elért legfrissebb eredményeket.

Kelátterápia alkalmazása az Alzheimer-kór gyógyításában

Az Alzheimer-kór a leggyakoribb formája a demenciának, melyet emlékezetkiesés és a kognitív képességek csökkenése jellemez. A betegség egyik fő szövettani kritériuma az agyban a sejten kívüli térben lerakódó fibrilláris peptidokból képződő plakkok megjelenése. A plakkok 40 vagy 42 db aminosavból álló töredékből, β -amiloidból állnak (A β). A kór bizonyos fémionok (leginkább Cu, Zn és Fe, esetleg Al) diszhomeosztázisával is erősen összefügg, feltételezik, hogy ezek az ionok – elsősorban a Zn(II) – indukálhatják a β -amiloidok oligomerizációját, majd aggregációját. A β -amiloid által megkötött vegyértékváltó fémionok – elsősorban a Cu(II) – képesek katalizálni az oxigén és az aszkorbinsav reakcióját, melynek során reaktív oxigéntartalmú részecskék („ROS, reactive oxygen species”) hidrogén-peroxid, illetve gyökök (szuperoxid-gyökönion: O₂⁻, hidroxilgyök: OH) keletkeznek, ami oxidatív stresszhez vezet. [14] Feltételezésünk szerint egy új típusú kelátterápiás módszerrel a fémionok homeosztázisa helyreállítható, illetve az oxidatív stressz szintje csökkenthető.

A kelátterápia alkalmazása ebben az esetben sokkal inkább a fémionok koncentrációjának szabályozása, a plakkokban elérhetetlen fémionok újrahasznosításának megteremtése, a fémionok katalitikus módon történő szállítása, a normális fémionháztartás visszaállítása a cél, semmint a fémionok végleges eltávolítása a szervezetből [14]. Ennek megfelelően nincs szükség a kelátterápiában gyakori, kiemelkedően nagy stabilitású komplexet képző ligandumokra. A Zn(II) esetében például a széleskörűen bevált kelátor, a hatfogú, membránon átjutó N,N,N',N'-tetrakis(2-piridilmetil)etiléndiammin (TPEN) helyett ennek négyfogú változatával, az N¹,N²-bisz-



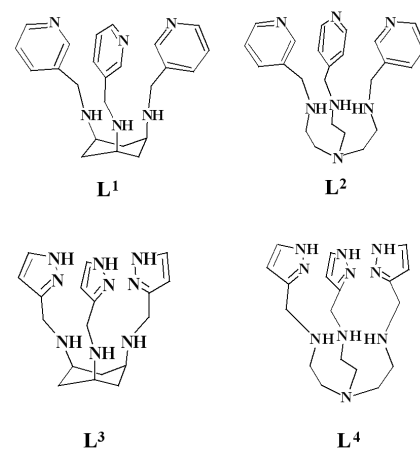
(piridin-2-il-metil)etán-1,2-diammin (EN-DIP) ligandummal kísérleteztünk. Az EN-DIP ekvimoláris körülmények között is képes már a Cu(II)ionok által indukált folyamatban aggregálódott A β -ot újra oldatba vinni. Zn(II) esetében mindehhez már nagyobb ligandumfeleslegre volt szükség. A ligandum kétfogú változata már Cu(II)ionok esetében sem hatásos [15,16].

Hasonló vizsgálatokat végeztünk hisztidinben gazdag oligopeptidekkel is, ahol GlyHis, illetve HisHis egységeket kapcsolunk peptidkötéssel egy-egy lizin mindkét aminocsoportjához. Az így kapott (GH)₂K, illetve (HH)₂K pentapeptidek képesek két Cu(II)ion kvantitatív megkötésére fiziológiai pH-n, miközben réziononként egy-egy amidnitrogén deprotonálódik. Zn(II)ionokkal csak a (HH)₂K ligandum képez hasonló komplexeket, de képződése közel sem kvantitatív fiziológiai pH-n. Mindezeknek megfelelően a Cu(II)ionok esetében a fémionon kívül a „pentapeptidek” képesek voltak részben, vagy közel teljesen visszazorítani, míg erre Zn(II)ionok esetében még tízszeres ligandumfelesleg mellett sem került sor [16,17].

Polidentát tripodális ligandumok biomimetikus fémkomplexei

Az utóbbi években számos, többszörösen funkcionális tripodális ligandum (2. ábra) átmenetifém-komplexeivel is foglalkoztunk [18–23]. A tripodális vegyületek preorganizált szerkezete jelentősen növelheti a komplex stabilitását. A tripodális platformok megfelelő funkcionálálása ugyanakkor olyan moduláris rendszer kialakítását teszi lehetővé, amelyben viszonylag könnyen változtatható a ligandum donorcsoportjainak száma/minősége, így annak

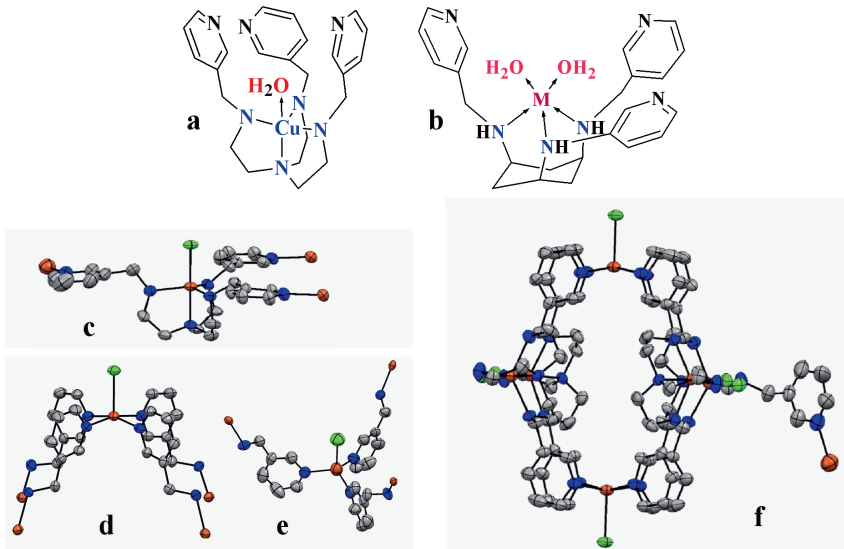
1. ábra. Kelátterápiás célú, hisztidinben gazdag oligopeptidek



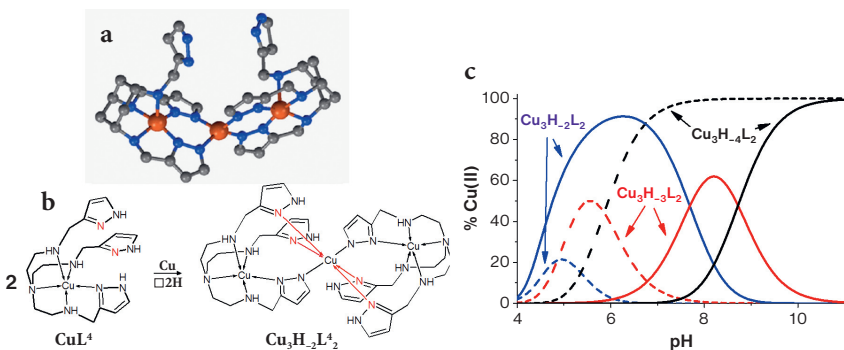
2. ábra. Néhány vizsgált tripodális ligandum sematikus szerkezete

fémionaffinitása vagy a kialakuló komplex szerkezete. Emellett további funkciók kiépítése, például újabb fémion(ok) megkötése is lehetővé válik, ami a többmagvú aktív centrumokhoz hasonlóan a fémionok kooperációjára vagy szupramolekuláris rendszerek kialakítására ad lehetőséget. A következőkben két-két ligandum komplexeinek összehasonlításával példázuk az ilyen moduláris rendszerekkel elérhető különböző sajátságokat.

Az L¹ és L² ligandumok piridin- és amino-nitrogénjei nem képesek ugyanazon fémionhoz kötődni. A trigonális bipiramisos szerkezetű CuL¹ komplexben a tren alegység négy nitrogénje koordinálja a fémiont (3.a ábra), a piridingyűrűk szterikus hatása miatt az ötödik koordinációs pozíció nagyobb ligandumok számára nehezen hozzáférhető, így a komplexek nem rendelkeznek számottevő enzimutánzó hatással. Az analóg CuL² komplex azonban jóval nyitottabb koordinációs szférával rendelkezik (3.b ábra), a pH 7 felett képződő CuL⁵(OH) komplex hatékonyan képes elő-



3. ábra. A CuL^1 (a) és CuL^2 (b) komplexek sematikus szerkezete, a 3D polimerben kialakuló három különböző réz(II)centrum (c, d, e), valamint a $\text{Cu}_6(\text{L}^2)_4$ alegység oldalnézete



4. ábra. A $\text{Cu}_3\text{H}_4\text{L}^3_2$ komplex kristályszerkezete (a), a $\text{Cu}_3\text{H}_2\text{L}^4_2$ komplex sematikus szerkezete (b), valamint L^3 (folytonos vonal) és L^3 (szaggatott vonal) ligandumok hárommagvú komplexeinek eltérő speciációja (c)

segíteni a foszforsav-diészterek hidrolízisét [18,19]. Bár oldatfázisban mindkét ligandum csak egymagvú komplexeket képez, a réz(II)- L^1 2/1 rendszerben már $\text{pH} = 4$ körül képződő csapadék érdekes 3D polimer (MOF metal-organic framework) szerkezettel bír, amiben három alapvetően eltérő koordinációs környezetben lévő réz(II)centrum található (3.c–e ábra). A

tbp és sp geometriájú fémionok alakítják ki a hatmagvú $\text{Cu}_6(\text{L}^2)_4$ alegységeket (3.f ábra), melyeket tetraédres rezes (3.e ábra) kötnék össze [18].

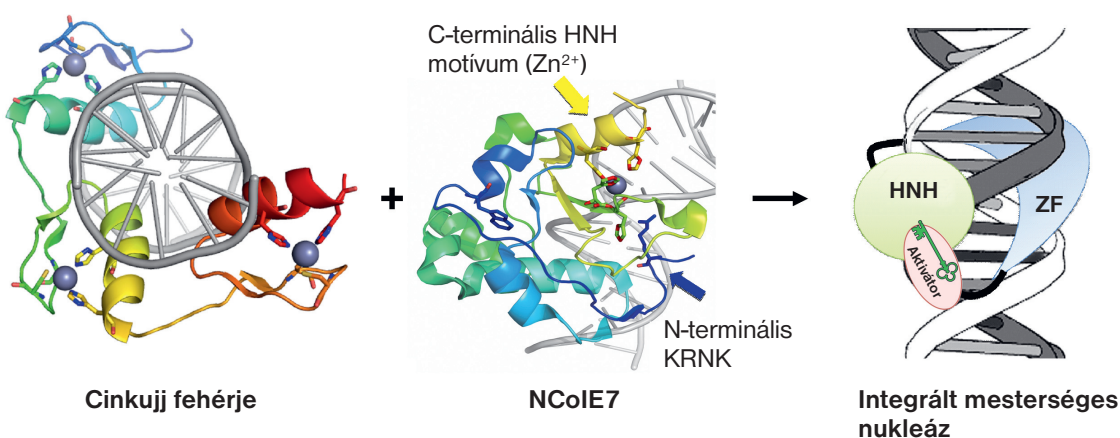
Hasonlóan érdekesek az L^3 és L^4 ligandumok hárommagvú réz(II)komplexei [20, 21]. A két ligandum $\text{Cu}_3\text{H}_4\text{L}_2$ komplexei hasonló szerkezetűek, két ML egységet pirazolát-hidakon keresztül egy tetraédres

réz(II) köt össze (4.a ábra). Azonban a köztes deprotonáltsági állapotú $\text{Cu}_3\text{H}_2\text{L}_2$ részecskékben a középső rézhez eltérő számú pirazolgyűrű koordinálódik. A $\text{Cu}_3\text{H}_2\text{L}_2$ komplexben kötődő négy pirazolgyűrű (4.b ábra) okozta extrastabilitás, a következő deprotonálódási lépésben kialakuló $\text{Cu}_3\text{H}_3\text{L}_2$ részecskék jelentősen eltérő speciációját eredményezi (4.c ábra). Eredményeink szerint ez utóbbi, háromszorosan deprotonált komplexek kiemelkedő catechol-oxidáz utánzó sajátossággal rendelkeznek [20,21]. Ilyen módon, a tripodális platform cseréjével széles határok között változtatható komplexeink katalitikus hatásának pH-optimuma.

Mesterséges metallonukleázok specifikus DNS hasításhoz

A metalloproteinek és modellvegyületeik párhuzamos kutatása kiegészíti egymást. Kutatócsoportunkban 2007 ősze óta foglalkozunk olyan fehérjékkel, melyeket saját laboratóriumunkban állítunk elő. Az azóta eltelt időszakban számos fiatal kutatónkak nyílt alkalmuk az ehhez szükséges molekuláris biológiai alapeszközök el-sajátítására Szegeden, illetve együttműködő partnereink (Kyosuke Nagata, Tsukuba Egyetem, Japán; Hans Erik és Mølager Christensen, Dán Műszaki Egyetem, Dánia) laboratóriumaiban.

A vizsgált fehérjék közül kiemelkedő figyelmet szentelünk a colicin E7 bakterialis toxin nukleáz doménjének (NCoIE7 – 5. ábra). Ez a fehérje ugyanis a C-terminális részén található Zn(II)ionot tartalmazó aktív központja révén katalizálja a DNS foszfodiészter-kötéseinek hídrolitikus hasítását, de e folyamat lezajlásához elengedhetetlen a fehérje N-terminális végének jelenléte [24]. Az itt található arginin (R447) és a cink együttesen kötik meg és aktiválják a hasítandó csoportot. A cinkhez a szubsztrátmolekulán kívül három hisztidin-imidazol-nitrogénje koordinálódik, ha-



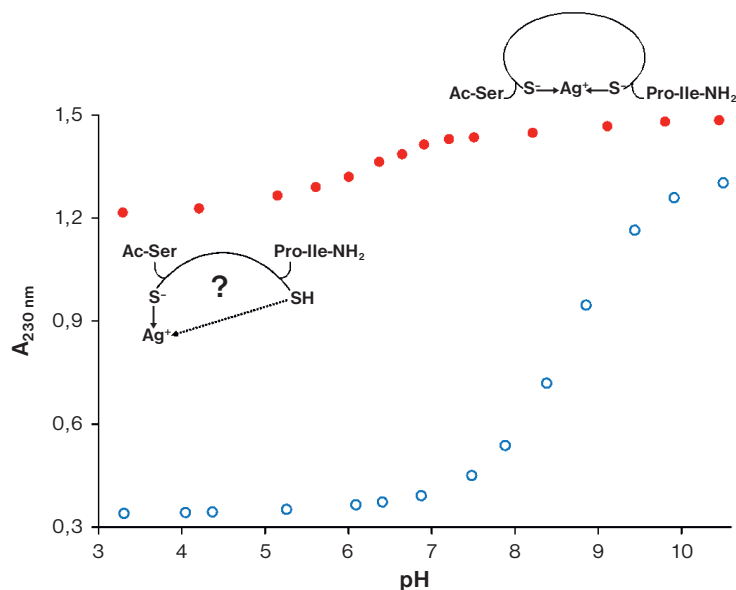
5. ábra. Az NCoIE7-alapú mesterséges nukleázok kialakításnak sematikus ábrája. Az integrált nukleázban az NCoIE7 cinktartalmú C-terminális katalitikus központja és az N-terminális aktivátorszekvencia a DNS-kötés során kerül közel egymáshoz



sonlóan a csoportunkban tanulmányozott oligopeptidekhez [25,26,27], melyek közül a KHPHPHQ Zn(II)komplexe elősegítette a DNS-molekula hidrolízisét. Az NCoLE7 aktív központját alkotó, ún. HNH motívum (nevét a megőrzött His és Asn aminosavokról kapta) $\beta\beta\alpha$ szerkezetben köti a fémiont. Önmagában ez a ~ 40 aminosavból álló szekvencia azonban nem biztosít elég nagy stabilitást a megfelelő szerkezet létrejöttéhez [27]. Az N-terminális hurok számos kölcsönhatást (hidrogénkötés, apoláris kölcsönhatások) alakít ki az aktív központtal, így stabilizálva annak szerkezetét [28]. Az N-terminális végen található argininnek a fentiekben túl további szerepét is valószínűsíthetjük. Számos, pontmutációt tartalmazó fehérje katalitikus aktivitását, szerkezetét, Zn^{2+} -ion, valamint DNS-kötő képességét cirkuláris és lineáris dikroizmus, fluoreszcencia- és NMR-spektroszkópia, tömegspektrometria, izotermais kalorimetriás titrálás, elektroforézis, illetve röntgendiffrakció segítségével tanulmányoztuk.

Az eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a láncvégi pozitív töltésű aminosavak a DNS-molekula hidrolitikus reakciót elősegítő torzulásának előidézésében, illetve a távozó csoport protonálásában is szerepet játszanak. Azaz az NCoLE7 N-terminális része intramolekuláris allosztérius szabályozást biztosít az enzim működéséhez. Bár maga az NCoLE7 nem specifikusan hat a DNS-molekulát, a fentiek ismeretében egy specifikusan és szabályozott módon működő mesterséges nukleáz alakítható ki belőle, ami munkánk egyik fő célja. A meglévő szerkezeti információk alapján molekulatervezéssel foglalkozó külföldi együttműködő partnereinkkel (Chris Oostenbrink, BOKU, Ausztria; Petr Bour és Lubomir Rulisek, Cseh Tudományos Akadémia, Csehország) együtt jelenleg olyan molekulák összeállításán dolgozunk, melyekben a nem specifikus DNS-kötő részt specifikus DNS-kötő fehérjékkel helyettesítjük. Ilyen, tetszőleges DNS-bázisszekvencia felismerése biztosítható a cinkuj-, illetve TALE fehérjékkel. Az előbbieknél funkcionális optimalizálásával csoportunk is foglalkozik [29].

Biztonságos mesterséges nukleázokkal nemcsak az *in vitro* molekuláris biológiai kutatások segíthetők elő, hanem sejteken belül gének alakíthatók át: javíthatók, változtathatók, vagy kiüthetők, az adott célnak megfelelően. A génterápiában történő jövőbeni alkalmazás sem zárható ki, ami olyan betegségek gyógyításához vezethet, melyek ma gyógyíthatatlanok: vagy halá-



6. ábra. Az egyik vizsgált CueR modellpeptid oldatában 230 nm hullámhosszon a pH függvényében mért abszorbanciaváltozás fémion jelen- (●) és távollétében (○), illetve a $pK_s \sim 6,5$ értékkel jellemezhető deprotonálódási folyamattal egymásba alakuló részecskék feltételezett szerkezete [27]

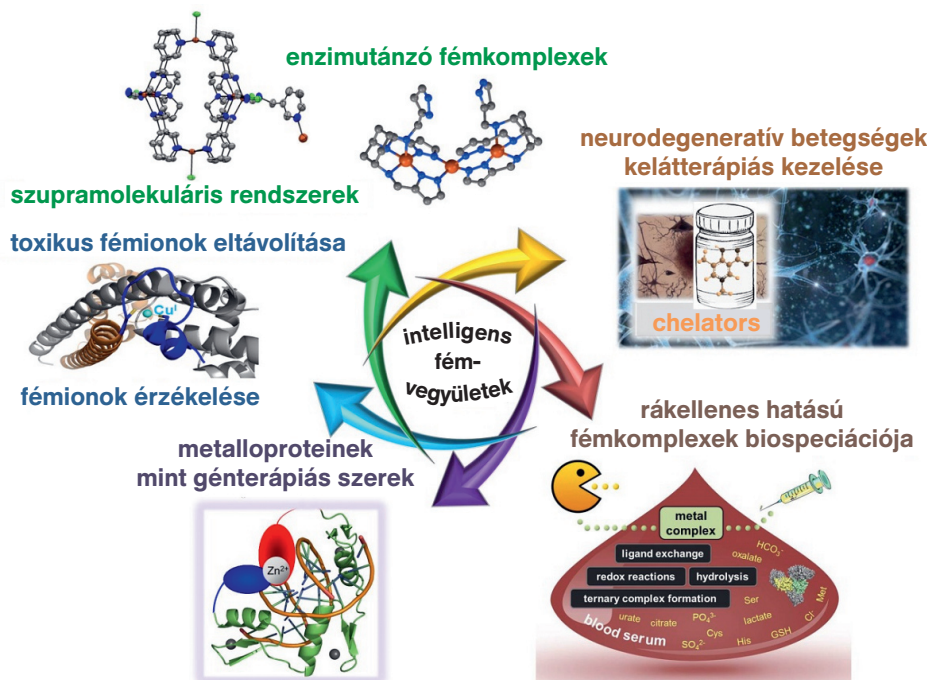
los kimenetelűek, vagy egy életen át tartó terápiát igényelnek [30].

Toxikus fémionok megkötése

A bakteriális fémion-homeosztázisban fontos szerepet játszó fémszabályzó fehérjék jelentős része a MerR családba tartozik, és a sejtek fémion-efflux, illetve detoxifikáló rendszereit transzkripció szinten aktiválják [31]. A molekulák közös jellemzője egy rövid, Cys- X_n -Cys ($n = 6-10$) fémkötő hurok a fehérje C-terminális szakaszán [32]. A MerR családba tartozó CueR (Cu-efflux regulátor) fehérjék szelektív transzkripció aktivitást mutatnak a II. csoport egyértékű fémionjainak (Cu(I), Ag(I), Au(I)) hatására, azaz az adott fémion sejten belüli koncentrációjának csökkentésében szerepet játszó fehérjék termelését indítják be. Ugyanakkor ilyen válasz kétértékű fémionok, például Hg(II) és Zn(II) esetében nem mérhető [32]. A fehérjék fémkötő szakaszának két ciszteinjé lineáris koordinációs környezetben kényszeríti az egyértékű fémionokat, a szelektív fémionfelismerésben azonban feltehetőleg más tényezők is szerepet játszanak [32]. Csoportunk egyik, néhány éve elindított kutatási iránya a MerR, s ezen belül a CueR fehérjék fémionszelektív működését meghatározó tényezők feltárását/megértését célozza. Az eredményeket olyan potenciális analitikai vagy környezatkémiai alkalmazások kifejlesztéséhez is igyekszünk hasznosítani, melyek toxikus fémionok hatékony megkötésén alapulnak. A kutatás során olyan rövid láncú oligopeptideket állítottunk elő, melyek szek-

venciái megegyeznek egyes CueR fehérjék fémkötő doménjével, vagy annak egy-két aminosavban módosított variánsai. Az előállított peptidok fémkötő sajátosságainak vizsgálata főként arra összpontosult, hogy a ligandumok két ciszteinjé mellett jelen lévő egyéb potenciális donorcsoportok (Asp/His), illetve a natív szekvenciák Pro egységeinek cseréje (P/S vagy P/H) milyen hatást gyakorolnak a Hg(II)-, Cd(II)-, Zn(II)-, illetve Ag(I)komplexeik szerkezetére és stabilitására [33-37]. A modellvizsgálatok legfigyelemreméltóbb eredménye, hogy a tanulmányozott Ag(I)-peptid rendszerekben egy $pK_s \sim 6,5$ értékkel jellemezhető fémion-indukált tiolcsoport-deprotonálódás játszódik le (6. ábra), ami jelentős eltérés a kétértékű fémionok viselkedéséhez képest, melyek pH ~ 6 -nál, vagy már savasabb körülmények között mindkét cisztein deprotonálódott tiolcsoportjához kötődnek [37]. A spektroszkópiai vizsgálatok eredményei alapján az sem zárható ki, hogy pH ~ 6 körül az Ag(I)ionokhoz mindkét cisztein tiolcsoportja kötődik, azonban ezek egyike tiolát, míg a másik tiol formában (6. ábra). Kvantumkémiai számítások alátámasztották, hogy ez akár az Ag(I)- vagy Cu(I)ionokat kötő CueR fehérjében is lehetséges [37]. Csoportunk molekuláris biológiai úton előállította az *E. coli* CueR fehérjét is [38].

Jelenleg a fehérjeszabályozott DNS komplex rendszerben a CueR Ag(I)- és Hg(II)ionokkal való kölcsönhatását jellemző különbségeket próbáljuk feltárni oldatspektroszkópiai módszerek, röntgenkristallo-



7. ábra. Az intelligens fémkomplexek szerepe az általunk vizsgált területek biológiai kémijának felderítésében

gráfiai mérések elvégzésére alkalmas egykristályok előállítása (Hg(II)ionokkal), valamint kvantumkémiai modellszámítások révén. A vizsgálatok reményeink szerint választ adhatnak arra, hogy milyen módon eredményezi a két fémion koordinációs módja/erőssége közötti potenciális különbség, illetve a fémion-koordináció révén a fehérje másodlagos/harmadlagos szerkezetében végbemenő szerkezeti változás a molekula fémion-szelektív működését.

Kilátások

Az MTA által támogatott kutatócsoport mandátuma 2017. június 30-cal lejárt, ezután tevékenységünket töretlen munkabírással tanszéki kutatócsoportként folytatjuk.

A szerkezeti változás ellenére a jövőt reményteljessé teszi, hogy sikerült a szegedi biológiai és gyógyszerkutatásokban eredményes csoportokat közös együttműködésre megnyerni fémtartalmú vegyületek gyógyszerként való alkalmazását célzó kutatások érdekében. Sikerral pályáztunk, és „Intelligens fémvegyületek” című GINOP-pályázatunk nyert, így a 2017–2020 években kicsit fellélegezhetünk az anyagiakat illetően, a kooperáció révén kialakíthatunk egy olyan együttműködési kapcsolatrendszert a társtudományokkal idehaza, a közelben, amely révén a kölcsönös és rendszeres visszacsatolásokon alapuló együttműködés termékenyítően hat a csoportok munkájára és feltétlenül meghozza ered-

ményét. A munka alapvetően a fenti témákban folyik, kiegészítve a mélyebb biológiai vizsgálatokkal, melyek eddig csak külföldi partnereink révén folytak, és gazdagodik újabb területekkel is, mint a fémionháztartás zavarainak és befolyásolásának mélyebb megismerése vagy az irányított gyógyszertranszport kihasználása a fent vázolt problémák megoldásában. A 7. ábra szematikusan mutatja, hogy mit értünk az intelligens vegyületek alkalmazásán az általunk vizsgálni kívánt különböző területek biológijának, kémijának, teljesebben biológiai kémijának megismerésében.

Itt tartunk ma, és remélhetőleg a szege-di biológiai kémiai kutatások 5 év múlva tovább öregbítik a térség hírnevét itthon és külföldön egyaránt.

IRODALOM

- [1] Gajda T., Enyedy É.A., Gyurcsik B., Jakusch T., Jancsó A., Magy. Kém. L. (2013) 12, 365.
- [2] J. C. Dabrowiak, *Metals in Medicine*, (2009) John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom; A. Sigel, H. Sigel, *Metal complexes in tumor diagnosis and as anticancer agents*, Marcel Dekker, 2004.
- [3] É. A. Enyedy, N. V. Nagy, É. Zsigó, C. R. Kowol, V. B. Arion, B. K. Keppler, T. Kiss, Eur. J. Inorg. Chem. (2010) 11, 1717.
- [4] É. A. Enyedy, M. F. Primik, C. R. Kowol, V. B. Arion, T. Kiss, B. K. Keppler, Dalton Trans. (2011) 40, 5895.
- [5] F. Bacher, O. Dömötör, A. Chugunova, N. V. Nagy, L. Filipović, S. Radulović, É. A. Enyedy, V. B. Arion Dalton Trans. (2015) 44, 9071.
- [6] É. A. Enyedy, O. Dömötör, K. Bali, A. Hetényi, T. Tucicardi, B. K. Keppler, J. Biol. Inorg. Chem. (2015) 20, 77.
- [7] O. Dömötör, C. G. Hartinger, A. K. Bytzek, T. Kiss, B. K. Keppler, É. A. Enyedy, J. Biol. Inorg. Chem. (2013) 18, 9.

- [8] É. A. Enyedy, É. Sija, T. Jakusch, C. G. Hartinger, W. Kandioller, B. K. Keppler, T. Kiss, J. Inorg. Biochem. (2013) 127, 161.
- [9] O. Dömötör, V. F. S. Pape, N. V. May, G. Szakács, E. A. Enyedy, Dalton Trans. (2017) 46, 4382.
- [10] Jakusch T., Hollender D., Enyedy É.A., González CS, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Costa Pessoa J, Tomaz I, Kiss T., Dalton Trans. (2009), 38, 2428.
- [11] Correia I., Jakusch T., Cobbinna E., Mehtab S., Tomaz I., Nagy N. V., Rockenbauer A., Costa Pessoa J., Kiss T., Dalton Trans. (2012) 41, 6477.
- [12] Jakusch T., Costa Pessoa J., Kiss T., Coord. Chem. Rev. (2011) 255, 2218.
- [13] Katherine H. Thompson, Licher J., LeBel C., Scaife M. C., McNeill J. H., Orvig C., J. Inorg. Biochem. (2009), 103, 554.
- [14] K. P. Kepp, Chem. Rev. (2012) 112, 5193.
- [15] A. Lakatos, É. Zsigó, D. Hollender, N. V. Nagy, L. Fülöp, D. Simon, Z. Bozsó, T. Kiss, Dalton Trans. (2010) 39, 1302.
- [16] A. Lakatos, B. Gyurcsik, N. V. Nagy, E. Wéber, Z. Csendes, L. Fülöp, T. Kiss, Dalton Trans. (2012) 41, 1713.
- [17] T. Kiss, T. Jakusch, B. Gyurcsik, A. Lakatos, É. A. Enyedy, É. Sija, Coord. Chem. Rev. (2012) 256, 125.
- [18] F. Matyuska, A. Szorcsik, N. V. May, Á. Dancs, É. Kovács, A. Bényei, T. Gajda, Dalton Trans. 2017, 46, 8626.
- [19] Gajda T., Szorcsik A., Dancs Á., Matyuska E.: *Polidentát tripodális ligandumok biomimetikus fémkomplexei Magyar Kémiai Folyóirat* (2017), 123, 94.
- [20] A. Szorcsik, F. Matyuska, A. Bényei, N. V. Nagy, R. K. Szilágyi, T. Gajda, Dalton Trans. (2016) 45, 14998.
- [21] F. Matyuska, N. V. May, A. Bényei, T. Gajda, New J. Chem. (2017) 41, 11647.
- [22] Á. Dancs, N. May, K. Selmezi, Zs. Darula, A. Szorcsik, F. Matyuska, T. Páli, T. Gajda, New J. Chem. (2017) 41, 808.
- [23] Á. Dancs, K. Selmezi, I. Bányai, Zs. Darula, T. Gajda, Inorg. Chim. Acta, 2017, in press (DOI: 10.1016/j.ica.2017.06.049)
- [24] A. Czene, E. Németh, I. Gy. Zóka, N. I. Jakab-Simon, T. Körtvélyesi, K. Nagata, H. E. M. Christensen, B. Gyurcsik, J. Biol. Inorg. Chem. (2013) 18, 309.
- [25] A. Kolozsi, A. Jancsó, N.V. Nagy, T. Gajda, J. Inorg. Biochem. (2009) 103, 940.
- [26] N. I. Jakab, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, J. Inorg. Biochem. (2008) 102, 1438.
- [27] N. I. Jakab, O. Lőrincz, A. Jancsó, T. Gajda, B. Gyurcsik, Dalton Trans. (2008) 6987.
- [28] B. Gyurcsik, A. Czene, H. Barát-Jankovics, N. I. Simon-Jakab, K. Slaska-Kiss, A. Kiss, Z. Kele, Protein Exp. Pur. (2013) 89, 210.
- [29] E. Németh, M. Kozířek, G. K. Schilli, B. Gyurcsik, J. Inorg. Biochem. (2015) 151, 143.
- [30] E. Németh, G.K. Schilli, G. Nagy, C. Hasenhiindl, B. Gyurcsik, C. Oostenbrink, J. Comp-Aid. Mol. Des. (2014) 28, 841.
- [31] B. Gyurcsik, A. Czene, Future Med. Chem. (2011) 3, 1935.
- [32] Z. Ma, Faith E. Jacobsen, D. P. Giedroc, Chem. Rev. (2009) 109, 4644.
- [33] A. Changela, K. Chen, Y. Xue, J. Holschen, C. E. Outten, T. V. O'Halloran, A. Mondragon, Science (2003) 301, 1383.
- [34] A. Jancsó, D. Szunyogh, F. H. Larsen, P. W. Thulstrup, N. J. Christensen, B. Gyurcsik, L. Hemmingsen, Metallomics (2011) 3, 1331.
- [35] A. Jancsó, B. Gyurcsik, E. Mesterházy, R. Berkecz, J. Inorg. Biochem. (2013) 126, 96.
- [36] D. Szunyogh, B. Gyurcsik, F. H. Larsen, M. Stachura, P. W. Thulstrup, L. Hemmingsen, A. Jancsó, Dalton Trans. (2015) 44, 12576.
- [37] D. Szunyogh, H. Szokolai, P. W. Thulstrup, F. H. Larsen, B. Gyurcsik, N. J. Christensen, M. Stachura, L. Hemmingsen, A. Jancsó, Angew. Chem. Int. Ed. (2015) 54, 15756.
- [38] R. K. Balogh, B. Gyurcsik, E. Hunyadi-Gulyas, H. E. M. Christensen, A. Jancsó, Protein Expr Purif. (2016) 123, 90.