

A fémion-fehérje kölcsönhatások modellezése és szerepe a neurodegeneratív betegségek okainak felderítésében és új enziminhibitorok tervezésében

SÓVÁGÓ Imre* és FARKAS Etelka

Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, 4010 Debrecen, Pf. 21.

1. Bevezetés

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékén az 1960-as években kezdődtek el azok a kutatások, amelyek kiindulópontját az aminosavak és egyszerű származékaik komplexképződési folyamatainak megismerése jelentette. Ez az időszak egyben a koordinációs kémia és ezen belül az egyensúlyi kémia virágkora volt, ami lehetővé tette, hogy az említett témakörre alapozva a 70-es években egy nemzetközileg is elismert kutatócsoport alakuljon ki. A számítástechnikában, a biokémiában és az alkalmazható analitikai módszerekben párhuzamosan végbement fejlődés azonban új kutatási irányok lehetőségét is felvetette. A korábbi koordinációs kémikusok számára ezen új kutatási irányok egyik legizgalmasabb területe a bioszervetlen kémia volt, amelynek elterjedése világszerte a XX. század utolsó harmadára esett.

Napjainkban a bioszervetlen kémia egy általánosan elfogadott határtudománynak tekinthető, amelynek önálló folyóiratai és rendszeresen ismétlődő tematikus konferenciái vannak. A területen megjelenő új szakkönyvek száma évente is több tucatra tehető, míg a vonatkozó közlemények száma már több ezres nagyságrendű. A bioszervetlen kémia, mint önálló tantárgy a legtöbb egyetem képzési rendszerébe is beépült mind az alap-, mind a mester- vagy doktorképzés területén.

A bioszervetlen kémiai kutatások célja az élő szervezetben megtalálható nem-szerves eredetű nyomelemek biológiai funkciójának megismerése, illetve az ehhez szükséges molekuláris szintű kémiai alapok feltárása. Ma már általánosan elfogadott tény, hogy ezen nyomelemek egy része nélkülözhetetlen a normális életfolyamatok fenntartása céljából (pl. Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Se, stb.), míg más elemek toxikus hatásának kivédése a környezet védelme szempontjából jelent komoly kihívást (pl. Hg, Cd, Pb, Be, Tl, stb.). További fontos alkalmazási területet jelentenek a szervetlen vegyületekre alapozott új gyógyszerekkel (pl. rákellenes platina- és ruténiumkomplexek) vagy új gyógyászati területek kifejlesztésével kapcsolatos kísérletek (pl. metalloenzim inhibitorok). Az utóbbi években a különösen rohamosan fejlődő korszerű diagnosztikai eljárások (pl. MRI, PET, stb.) további fontos alkalmazási lehetőségeket jelentenek a bioszervetlen kémiával foglalkozók számára.

Tanszékünkön mintegy 3 évtizede folynak azok a kutatások, amelyek témája a bioszervetlen kémia tárgykörébe sorolható. Amint arra a bevezető mondattal is utaltunk ezek a kutatások az egyszerű aminosavak koordinációs

kémiájának megismerésével indultak, de a gyors technikai fejlődés az egyre összetettebb rendszerek vizsgálatát is lehetővé tette. Ennek megfelelően számos közlemény látott napvilágot a különböző tagszámú peptidok, nukleotidok valamint hidroxámsavak és származékaik komplexképző sajátságainak értelmezésére. Fontos kiemelni, hogy ezek a közlések már nem pusztán az egyensúlyi kémiai vagy termodinamikai jellemzők meghatározására irányultak, hanem a fém-ligandum kölcsönhatás szerkezeti jellemzőinek felderítését is célozták. Ezen összefoglalónak nem lehet a célja, hogy valamennyi fontosabb eredmény vagy akár csak kutatási terület részletes ismertetésére vállalkozzon. A kutatócsoport tagjai által az elmúlt 25-30 évben nemzetközi folyóiratokban publikált közlemények száma ugyanis jóval meghaladja a 200-at és mintegy két tucatra tehető a nagyobb áttekintést nyújtó összefoglaló közlemények vagy könyvfejezetek száma. Jelen összeállításban ezért csak két, egymástól független, de a megközelítési módban és az alkalmazott technikák tekintetében szorosan összefüggő kutatás főbb eredményeinek és jövőbeli lehetőségeinek ismertetésére szorítkozunk. Ezen témakörök egyike jelen fázisában szigorúan alap kutatás jellegű, mivel a napjainkban igen gyakori, de a kóros folyamatok mechanizmusát tekintve lényegében ismeretlen idegrendszeri elváltozások (pl. prion betegségek és Alzheimer-kór) molekuláris hátterének megismerését célozza. A másik vizsgálati terület az új, hidroxámsav-alapú vegyületek előállításán és komplexképző sajátságainak jellemzésén keresztül már egy a gyakorlati alkalmazás szempontjából is közelebbi fázist képvisel, főleg a szelektív enziminhibitorok tervezésén keresztül.

2. A fémionok és a neurodegeneratív betegségek lehetséges kapcsolatai

A neurodegeneratív megbetegedések legismertebb formái az Alzheimer-kór vagy Parkinson-kór már hosszú ideje ismertek, de az csak az utóbbi években vált nyilvánvalóvá, hogy ezek az elváltozások szoros kapcsolatban vannak más idegrendszeri rendellenességekkel is, mint pl. a prionbetegségek (BSE vagy közismertebb nevén kergető marhakór). Bár a felsorolt betegségek egyikének kialakulása és lefolyása sem ismert teljes bizonyossággal, és sajnos egyikük sem gyógyítható teljes mértékben, de számos közös jellemző már egyértelműen azonosítható. Ezen jellemzők között talán a leglényegesebb, hogy valamennyi ilyen betegség lefolyása a szervezetben normális körülmények között is megtalálható fehérjék konformációváltozásával,

* e-mail: sovago@science.unideb.hu

illetve az ezen fehérjékből létrejövő fehérjeaggregátumok (pl. amyloid plakkok az Alzheimer-kóros betegek esetén) képződésével van összefüggésben. Sokan ezért az idegrendszeri elváltozásokat „konformációs betegségek” néven is szokták említeni. Számos elmélet látott napvilágot ezen konformációváltozások okainak és ezáltal a betegségek kialakulásának értelmezésére vonatkozóan, de napjainkban még egyik elmélet sem képes végleges választ, és ezáltal egyértelmű kezelési stratégiát adni ezekre az elváltozásokra. Értelemszerűen adódhat a kérdés; hogyan jönnek a fémionok a képbe, ha a betegség molekuláris hátterét a fehérjeszerkezet megváltozásában keressük? A betegségek két további fontos és lényegében közös jellemzőjét emelhetjük ki ebben a tekintetben: (i) a fehérjeaggregátumok igen gyakran, szokatlanul magas koncentrációban tartalmaznak egyes egyébként létfontosságú nyomelemeket (pl. Fe, Cu, Zn), (ii) az érintett fehérjék szekvenciája a molekula jól hozzáférhető helyein tartalmaz olyan aminosavakat, amelyek kiugróan nagy fémionaffinitással rendelkeznek (pl. hisztidin).

Az a tény, hogy a peptidek és fehérjék fémion-koordinációja alapvetően megváltoztatja a biológiailag fontos molekula térszerkezetét ma már általánosan elfogadott tekinthető és számos metalloprotein/metalloenzim esetén nagyon pontosan ismert. Értelemszerűen következik ezekből a kísérleti eredményekből, hogy az említett fehérjék és azok peptidfragmenseinek koordinációs kémiai vizsgálata közelebb vihet bennünket az elváltozások okainak feltáráshoz, és ezt követően a betegségek kezelésének kimunkálásához. Két olaszországi egyetemmel való szoros együttműködésben a prion fehérje és az amyloid- β peptid komplexképződési folyamatait tanulmányoztuk az elmúlt közel 10 évben és ezen vizsgálatok főbb megállapításait összegezzük a következő két alfejezetben.

2.1. A prion fehérje peptidfragmenseinek komplexképződési folyamatai

A prion fehérje egy közel 250 aminosavból álló sejtfelületi glikoprotein, amely megtalálható minden emlős szervezetében. Pontos biológiai funkciója nem ismert, de újabban egyre többen valószínűsítik, hogy a réznek a sejtmembránon történő átjutásában, illetve a rézionok koncentrációjának szabályozásában és ezáltal a reaktív oxigénradikálok elleni védelemben van szerepe. A fehérje N-terminális része rendezetlen, míg a további tartományok α -helixben gazdag struktúrával jellemezhetők. A fehérjének ez a formája (PrP^C) könnyen oldható, lebontható és veszélytelen. Májig nincs egyetértés abban, hogy mi a kiváltó oka annak a konformációváltozásnak, ami a β -redőkben gazdag kóros formát eredményezi (PrP^{Sc}), amely semmiben nem oldódik, nem lebontható és felhalmozódása a neuronok pusztulását okozza. A prion betegségeknek az ember és más emlős állatok esetén számos formája ismert, de szerencsére az előfordulásuk viszonylag ritka. Fontos ugyanakkor megemlíteni, hogy ezen betegség jelentőségét elsősorban a fertőző jellege okozza illetve, hogy ezen fertőzések terjedésével szemben meglehetősen nehéz/költséges védekezni. A prion, mint fertőző ágensek egy új formájának felfedezéséért 1997-ben Stanley Prusiner amerikai orvosprofesszor Nobel díjat kapott.¹ A prion hipotézis lényege, hogy a megváltozott konformációjú kóros fehérje templátként működik és elsőségi a normális molekulák konformációváltozását (PrP^C \rightarrow PrP^{Sc}).

A prion betegség terjedésének újszerűsége a vizsgálatok sorát indította el és ma már nagyszámú összefoglaló munka is megjelent ebben a témakörben. A komplexképződési folyamatok tanulmányozása²⁻⁵ is kiemelt helyen szerepel ezekben a vizsgálatokban, amit elsősorban a fehérje aminosav szekvenciájával lehet magyarázni. Az emberi prion fehérje (human prion protein, HuPrP) összesen 10 hisztidin aminosavat tartalmaz, amelyek közül 6 a fehérje rendezetlen N-terminális tartományában található. Az elmúlt 10-15 évben számos kutatócsoport tanulmányozta ennek a fehérjének és különböző fragmenseinek réz(II)ionnal való komplexképződési folyamatait és általánosan elfogadottnak tekinthető, hogy az úgynevezett „oktarepeat domain” tekinthető az elsődleges fémkötőhelynek.^{6,7} Az oktarepeat négy ismétlődő oktapeptidből épül fel, (PHGGGWGQ)₄, azaz összesen 4 hisztidint tartalmaz és ennek megfelelően 4 réz(II)ion megkötésére képes. A további vizsgálatok azonban kiderítették, hogy a fehérje több mint négy rézionot tartalmazhat, azaz a molekula további részei is fémkötőhelyek lehetnek. Kutatócsoportunk ezen a ponton kapcsolódott a világszerte nagy intenzitással folyó vizsgálatokba és elsődleges célunk a kutatásoknak az alább részletezett irányokba történő kiterjesztése volt:

- (i) A fehérje rendezetlen tartománya az oktarepeat mellett további 2 hisztidint (H96 és H111) tartalmaz, amelyek potenciális kötőhelyek lehetnek,
- (ii) Az oktarepeat hisztidinek és a H96, H111 aminosavak közvetlen környezete jelentősen különbözik, így fémkötőképességük is jelentősen különböző lehet,
- (iii) A réz(II)ionoknak meghatározott helyeken való kötődése befolyásolhatja a további réz(II)ionok kapcsolódását (pl. kooperativitás vagy anti-kooperativitás révén), ami indokolta a különböző tagszámú fragmensek és mutánsok szisztematikus vizsgálatát,
- (iv) A korábbi irodalmi adatok szinte kizárólag a réz(II)ionnal való komplexképződési folyamatok megismerésére irányultak. A peptid koordinációs kémiájára vonatkozó saját kutatásaink alapján azonban nyilvánvaló volt, hogy a peptidek más átmenetifémionokkal is stabilis kölcsönhatásra képesek, ami indokolta az egyes fragmensek fémionszelektivitásának tanulmányozását is.⁸

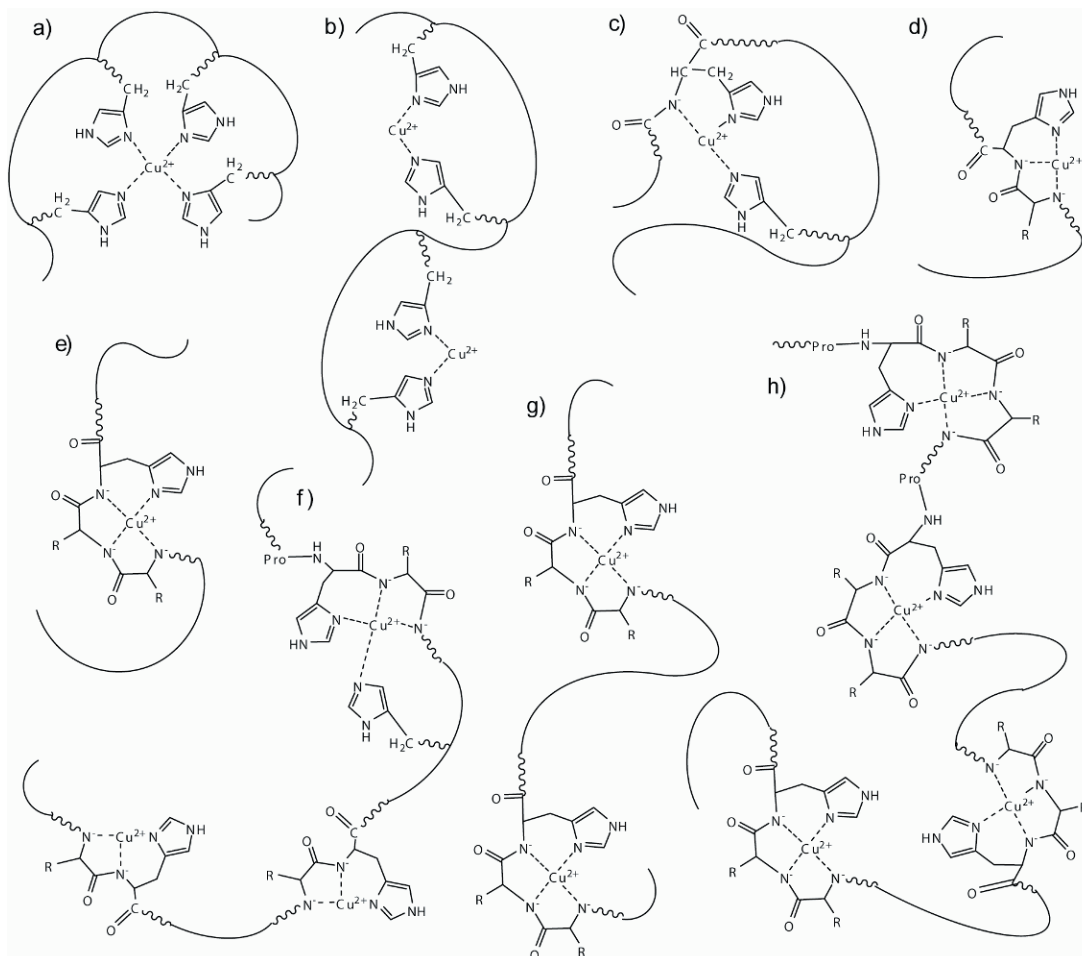
A fenti célkitűzések megválaszolása érdekében mintegy 20 peptid komplexképződési folyamatait tanulmányoztuk, amelyek 4-39 aminosavat és 1-4 hisztidint tartalmaztak, beleértve az oktarepeaten belüli és kívüli tartományokat. A fémionok tekintetében a vizsgálatokat a réz(II)ionok mellett a cink(II), nikkell(II), mangán(II), kobalt(II) és palládium(II) komplexekre is kiterjesztettük. Ezen vizsgálatok döntő részét az elmúlt években már publikáltuk,⁹⁻¹⁴ így e helyen csak a fontosabb eredmények összegzésére és az általánosítható következtetések levonására törekszünk.

- A hisztidin imidazolil-N donoratomok tekinthetők az elsődleges réz(II)ion koordinációs helynek valamennyi peptid esetén. Több hisztidint tartalmazó molekulákkal ez a folyamat makrokelátok kialakulását eredményezi (1.a és b. ábra), amelyek stabilitása a donoratomok számától és térbeli viszonyától egyaránt függ.¹⁵

- A pH növelésével bekövetkezik a peptidamidcsoportok deprotonálódása és fémionkoordinációja. Az első két amidcsoport deprotonálódása kooperatív és pH = 5,5-7,0

tartományban játszódik le, míg a harmadik amidcsoport csak enyhén lúgos közegben koordinálódik (1.c.-e. ábrák). Ezekben a komplexekben akár valamennyi hisztidin

független kötési helynek tekinthető és a peptidok maximum annyi rézion megkötésére képesek, ahány hisztidint tartalmaz a szekvencia (1.f.-h. ábrák).



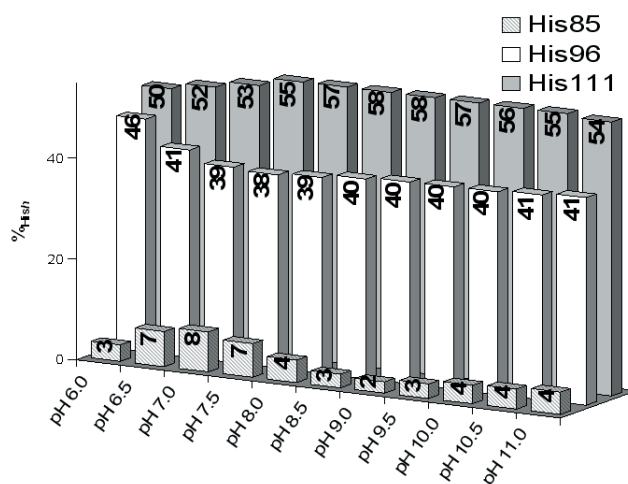
1. Ábra. A Cu(II)-HuPrP(76-114) rendszerben képződő komplexek lehetséges szerkezetei.

- A stabilitási állandók összevetéséből megállapítható volt, hogy az oktarepeat tartományon kívül elhelyezkedő hisztidinek fémionkötő képessége nagyobb, mint az oktarepeaten belülieké. Ezt a jelenséget a kelátgyűrűk eltérő tagszámával értelmeztük. Az oktarepeat esetén a prolin jelenléte miatt csak a hisztidinhez képest C-terminális irányban lévő amidnitrogének kapcsolódhatnak, ami héttagú kelátot eredményez, szemben a H96 vagy H111 kötési helyekkel megvalósuló hattagú keláttal.

- A független hisztidin koordinációs helyek többmagvú komplex kialakulását is lehetővé teszik. A statisztikai megfontolásokkal egyezésben a többmagvú komplexek már ekvimoláris oldatokban is jelen vannak, rézion fölöslege esetén pedig a többmagvú komplexek képződése közel 100 %.

- Ekvimoláris mintákban a független koordinációs helyek koordinációs izomerek jelenlétét is lehetővé teszik. Ezek aránya nagyjából megfelel az egyes monohisztidin peptidok rézionaffinitása alapján számítható arányoknak. Ezt szemlélteti a 2. ábra, amelyen a Cu(II)-HuPrP(84-114) rendszer fémioneloszlását mutatjuk a 3 kötőhely (H85, H96, H111) között.

- Megállapítottuk, hogy a prion peptidfragmensek számos egyéb átmenetifémvel is komplexet képezhetnek és a



2. Ábra. A rézionok megoszlása a független kötési helyek között a Cu(II)-HuPrP(84-114) rendszerben.

kétértékű fémionok stabilitási sora az alábbiak szerint alakul: Pd(II) > Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) > Cd(II) ~ Co(II) > Mn(II). A felsorolt fémionok közül azonban csak a Pd(II), Cu(II) és Ni(II) ionok képesek indukálni az amidcsoportok deprotonálódását és fémion koordinációját, míg a többi

esetben az imidazolnitrogének kapcsolódása kizárólagos.

- A többmagvú komplexek képződését a nikkell(II)ionokkal is kimutattuk. A két fémion kötődésének preferenciája azonban különbözőnek bizonyult: a réz(II)ionra $H111 > H96 > H85$, míg a nikkelle $H96 > H111 > H85$ sorrendet kaptunk.

- A Cu(II)-Ni(II)-peptid és/vagy Cu(II)-Zn(II)-peptid rendszerekben vegyesfém komplexek kialakulása is lehetségesnek bizonyult. Megállapítottuk, hogy sem a nikkell(II)- sem a cink(II)ionok nem képesek a rezet kizorítani a komplexekből, de mindkét fémion átrendezheti a réz(II)ionok koordinációs helyek közötti megoszlását.

2.2. Az amiloid- β peptid komplexképződési folyamatai réz(II)-, nikkell(II)- és cink(II)ionokkal

Az Alzheimer-kórt a neurodegeneratív betegségek leggyakoribb és legismertebb formájaként szokás említeni. Már napjainkban is az időskorú lakosság igen jelentős hányadát érinti, de az emberi életkor várható hosszabbodásából adódóan egyes becslések szerint a XXI. század 3. évtizedére csak az Egyesült Államokban már több, mint tízmillió beteggel lehet számolni. Egy korábbi magyar nyelvű ismeretterjesztő cikkünkben már beszámoltunk a betegség főbb klinikai és molekuláris jellemzőiről,¹⁶ így e helyen csak a leglényegesebb információk és saját kutatási eredményeink ismertetésére szorítkozunk. A betegség jellemző tüneteinek első leírása Alois Alzheimer (1864-1915) német orvosprofesszor nevéhez fűződik. A betegség molekuláris hátterét csak jóval később sikerült azonosítani, de ma már általánosan elfogadott, hogy egy 40-42 aminosavból álló polipeptid aggregációja (amiloid plakkok képződése) jelenti a közvetlen kiváltó okot. Az amiloid- β peptid ($A\beta_{42}$) egy jóval nagyobb tagszámú fehérje, az amiloidprekursor-protein (APP) rendellenes hasadásával jön létre. Sajnos sem a kóros folyamat beindulásának közvetlen kiváltó oka, sem a betegség biztos gyógyításának módja nem ismert jelenleg, így érthető, hogy a témakörben világszerte kiterjedt kutatások folynak.

A 42 aminosavból álló polipeptid és kisebb fragmenseinek koordinációs kémiai vizsgálatát két tényező is indokolja: (i) analitikai eredmények igazolják, hogy az amiloid plakkokban az agy egyéb területeihez képest jelentősen megnövekedett fémion-koncentráció (főleg réz és cink) mérhető, (ii) a polipeptid aminosav szekvenciája egyértelműen alkalmasnak látszik az átmenetifém-ionokkal való stabilis komplexképzésre. Saját kutatásaink ezen utóbbi tényre alapozva kezdődtek. A szekvencia részletesebb tanulmányozásából az is kiderült, hogy a fémionokkal való kölcsönhatás szempontjából az N-terminális részt alkotó 16 aminosav a meghatározó jelentőségű. Ennek megfelelően az $A\beta(1-16)$ hexadekapeptid és ennek kisebb fragmenseinek vizsgálatára koncentráltunk. Fontos megemlíteni, hogy maga 16 aminosavból álló peptid és fémkomplexei rosszul oldódnak, ezért a vizsgálatok nagyobb részét a polietilén-glikol konjugátummal $A\beta(1-16)$ -PEG végeztük. A réz(II), cink(II) és nikkell(II) ionokkal folytatott kutatások főbb eredményeit már publikáltuk,¹⁷⁻¹⁹ ezért ezen vegyületcsoporttal kapcsolatban is csak a főbb megállapítások ismertetésére szorítkozunk.

- Az amiloid- β peptid és a prion fehérje peptidfragmenseinek komplexképződési folyamatai sok tekintetben hasonlóak,

de számos jelentős különbség is megemlíthető. Ezek a különbségek abból fakadnak, hogy a prion peptidekben a hisztidinek szinte kizárólagos fémkötőhelyet jelentenek és más, a fémionokkal való kölcsönhatás szempontjából jelentős aminosavak nincsenek. Ezzel szemben az $A\beta(1-16)$ a három hisztidin (H6, H13, H14) mellett szabad terminális aminosocsoportot, két aszparaginsavat, két glutaminsavat és egy tirozint is tartalmaz, amelyek mind hozzájárulhatnak a fémion-koordinációhoz.

- Az előzőeknek megfelelően az amiloid- β peptid komplexeinek termodinamikai stabilitása kiugróan nagy. A megnövekedett stabilitás a réz(II)- és nikkell(II)komplexekre is igaz, de különösen szembetűnő a cink(II)ionnal való kölcsönhatás esetén.

- Az amiloid- β peptid maximum 4 rézion felvételére képes, amelyek kötési helyeit a terminális-NH₂, és a H6, H13, H14 hisztidin imidazolnitrogének jelentik. Ezen elsődleges donorcsoportok kötődése minden esetben indukálja a szomszédos amidcsoportok deprotonálódását és fémion-koordinációját is.

- Az amiloid- β peptid maximum 3 cink(II)ion megkötésére képes és ebben az esetben is a hisztidinek az elsődleges kötési helyek. A prion fragmensekre kapott eredményekkel szemben azonban az amidnitrogének is részt vesznek a cink(II)ionokkal való kölcsönhatásban.

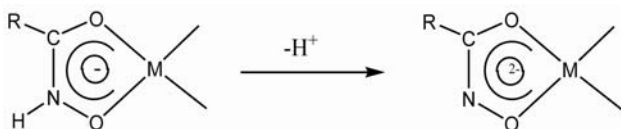
- Nikkell(II)ionnal csak kétmagvú komplexek képződhetnek, és a terminális aminosocsoport valamint a H13/H14 aminosavak az elsődleges kötési helyek.

- A fenti eredmények szerint többmagvú komplexek mindhárom fémionnal képződhetnek, ami a vegyes fémkomplex kialakulását is lehetővé tette. Ezek képződése különösen kedvező volt a Cu(II)-Zn(II) rendszerekben mivel a réz(II) és cink(II)ionok koordinációs preferenciája különböző: a réz(II) a terminális aminosocsoportot, míg a cink(II) a szomszédos hisztidineket preferálja.

3. Hidroxámsavak fémmegkötő sajátságai

A hidroxámsavak fémkomplexeire vonatkozó oldategyensúlyi kutatások a Tanszéken mintegy két évtizede kezdődtek az aminosavakkal és peptidekkel kapcsolatos korábbi oldategyensúlyi eredményekre építve, azokból a karboxilcsoport átalakítása révén hidroxámsav származékokat kialakítva. A hidroxámsavak azon túlmenően, hogy a sziderofórok egyik típusaként a mikroorganizmusok vasfelvételében alapvető szerepet játszanak^{20,21} a magasabbrendű élőlényekben is számos biológiai hatással bírnak. Ezek közül a metalloenzim inhibíciós hatás (pl. ureázokra^{22,23} matrix metalloproteinázokra (MMP-k)^{24,25}, peroxidázokra²⁶ gyakorolt inhibíciós hatás), illetve a potenciális gyógyászati jelentőség különösképpen felkeltette a kutatók érdeklődését. Ma is több hidroxámsav bír gyógyászati jelentőséggel, de közülük minden bizonnyal a trihidroxámsav típusú természetes sziderofór, a deszferrioxamin B (DFB) a legismertebb, melyet évtizedek óta alkalmaznak a Thalassemiás betegek gyógyításában a vasfelesleg eltávolítására, valamint egyéb toxikus fémionok szervezetből történő kivonására^{27,28}. Minden fentebb említett biológiai szerep, hatás, gyógyászati alkalmazás kétséget kizáróan a hidroxámsavcsoport(ok) erős fémmegkötő sajátságával van kapcsolatban, ezért is van különös jelentősége a hidroxámsavak fémkomplexei tanulmányozásának.

A hidroxámsavak jellemző funkciós csoportja ($-\text{CO}(\text{R}_N)\text{NOH}$) a mérhető pH-tartományban egy proton leadására képes és ez a disszociációs folyamat fémion távollétében általában a pH 7.5 – 10.0 tartományban játszódik le. Fémion azonban a protont már kisebb pH-n, pl. Fe^{3+} -ion már részben pH 1 alatt is, leszoríthatja és ezáltal jellemzően az un. hidroxamát típusú stabilis 5-tagú kelát képződik (**I**). Amennyiben az $\text{R}_N = -\text{H}$, az a fémion elektronszívó hatása folytán a koordinált hidroxamátban deprotonálódhat, ami a még nagyobb stabilitású, un. hidroximát kelátot eredményez (**II**). Ilyen kelát képződését Cu^{2+} -komplexekben pH 10 felett elsőként közöltünk az irodalomban²⁹, majd megjelenését néhány más fémionnal is bizonyítottuk, pl., Mo(VI) -komplexeknél már pH 6 körül képződhet³⁰.



3. Ábra. Kötésmódok a hidroxamát és hidroximát kelátokban.

Tekintve, hogy a hidroxámsavak fémmegkötő sajátosságait számos körülmény befolyásolja, mint például a molekulában megtalálható egyéb donatoratom(ok), ezért a Tanszékünkön végzett kutatások célja a hidroxámsavak fémmegkötő sajátosságait befolyásoló, valamint a megkötés szelektivitását befolyásoló tényezők minél szélesebb körű felderítése. A kapott eredmények fontosak lehetnek pl. a hidroxámsavak metalloenzim inhibíciós hatásának teljesebb megértése érdekében, vagy új, célzott biológiai hatással bíró hidroxámsav alapú molekulák tervezésénél.

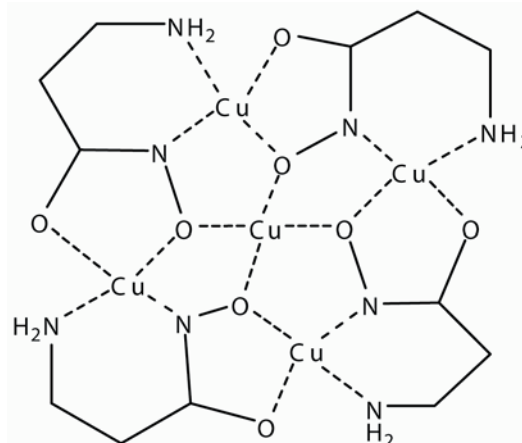
A Debrecenben ezideig vizsgált hidroxámsavak az alábbiak szerint csoportosíthatók:

- A metalloenzim inhibíció molekuláris hátterének mélyebb megértése, valamint potenciális enziminhibitorok kutatása érdekében előállított/vizsgált molekulák: (i) egyszerű monokarbonsavak hidroxámsav származékai, (ii) aminosavak hidroxámsav származékai (aminohidroxámsavak), valamint imidazol analógjaik, illetve (iii) peptidhidroxámsavak.
- Potenciális fémkivonó ágensekként vizsgáltuk két természetes sziderofór (deszferrioxamin B és deszferrikoprogén), valamint a deszferrioxamin B számos előállított dihidroxámsav modelljének fémmegkötő sajátosságait.

A tanulmányozott fémionok között elsőként említhető a Fe(III) ion, melyet a természetes sziderofórok igen nagy szelektivitással képesek komplexbe vinni, a Mo(VI) , melynek mikroorganizmusokbeli felvételénél ugyancsak feltételezett a sziderofórok szerepe, továbbá a metalloenzimek katalitikus centrumában gyakran előforduló $2+$ oxidációs állapotú $3d^5$ - d^{10} átmeneti fémionok (Mn(II) , Fe(II) , Co(II) , Ni(II) , Cu(II) , Zn(II)), valamint néhány toxikus fémion (pl. Al(III) , Pb(II)), illetve az esszenciális Ca(II) , Mg(II) . Újabban előállításra és karakterizálásra kerültek új potenciális gyógyászati jelentőségű Ru(II) félszandvics típusú hidroxamát komplexek is. A hidroxámsavak fémmegkötő kapcsolataival kapcsolatosan nemzetközi folyóiratokban közölt közleményeink száma jóval meghaladja az 50-et, így e dolgozat keretein belül egyetlen témakör, a metalloenzim inhibitor-modell aminohidroxámsavak átmenetifém (elsősorban Ni(II)),

Cu(II) - és Zn(II) -komplexeire vonatkozó néhány eredmény kerülhet csupán rövid bemutatásra.

A hidroxámsavak által kifejtett metalloenzim inhibíció egyértelműen a kompetitív gátlás mechanizmusa szerint értelmezhető, ahol a szubsztrát-analóg inhibitor molekula hidroxamátcsoportja révén a katalitikus centrumbeli fémionhoz koordinálódik, meggátolva ezáltal a szubsztrátnak a kapcsolódását. Lényegi molekulaelemek tehát a "fém-kötő" csoport (gyakran hidroxamát), valamint az enzim potenciális alkötőhelyeivel kölcsönhatásba lépni képes, azaz a szelektivitás szempontjából fontos molekularészek. A témakörben tanulmányozott néhány egyszerűbb aminohidroxámsav illetve imidazol-analóg képletét az 1. táblázat mutatja. Látható, hogy e molekulák a hidroxámsavcsoporton kívül α -, vagy β -helyzetben legalább egy amino- (illetve imidazol)csoportot tartalmaznak, továbbá a hidroxamát-N szubsztituense (R_N) lehet hidrogen, vagy metilcsoport. Ezen ligandumok Ni(II) -, Cu(II) - és Zn(II) -komplexeire kapott főbb eredmények az alábbiak: (i) Amennyiben az α - és β -aminosavak terminális aminocsoportja kelátot képezhet a deprotonálódása után koordinálódni képes hidroxamát-N-nel, akkor akár teljesen alárendeltté is válhat a hidroxamát-típusú (O,O)-koordinációs mód. Ez legkifejezettebb a Ni(II) esetén, mely fémionhoz az α -Alaha csak amino- és hidroxamát-N donorjai révén koordinálódik, de még a β -Alaha-val is domináns a nitrogének általi koordináció^{31, 32}. A Cu(II) ion és az α -Alaha kölcsönhatásában is csupán átmeneti tartományban (pH 3.5-5.5 között) van vegyes koordinációs mód, mely részben többmagvú komplex képződéséhez vezet. E fölötti pH-n viszont már itt is csak a nitrogének koordinálnak.³² Különösen érdekesek a Cu(II) - β -Alaha rendszerre vonatkozó eredmények, melynél az irodalomban elsőként közöltük egy $[\text{Cu}_5\text{H}_4\text{L}_4]^{2+}$ összetételű, fémkorona típusú komplex széles pH-tartománybeli kizárólagos képződését oldatban és szilárd fázisban egyaránt³³. Zn(II) ionnal különféle kötési izomerek jelennek meg.³¹



4.Ábra. A Cu(II) - β -alaninhidroxámsav rendszerben a pH 4-9 tartományban kizárólagosan képződő $[\text{Cu}_5\text{H}_4\text{L}_4]^{2+}$ összetételű fémkorona típusú komplex.

Amennyiben az N-metil származékokat előállítva a hidroxamát nitrogéneket, mint donatoratomokat kiiktatjuk, tehát azok a koordinációban nem vehetnek részt, a β -származékkal ($N\text{-Me-}\beta\text{-Alaha}$) már valóban csak

a hidroxamát általi koordináció figyelhető meg, de a Cu(II)-*N*-Me- α -Alaha esetén még továbbra is lényeges marad az amino-N koordinációban játszott szerepe és meghatározó az a koordinációs mód, ahol az amino-N és a hidroxamát oxigén képez egy 6-tagú kelátot³⁴. A nagy bázicitású aminocsoportot a számottevően kisebb

bázicitást mutató imidazolra cserélve, a hidroxamát szerepe méginkább, már a komplexképződés savas pH tartományában is, visszaszorul. Ezen származékokban a fémiont elsődlegesen megkötő (horgony) szerepét is már egyértelműen az imidazol-N tölti be. További eltérés, hogy a β -Alaha imidazol-analógiájával nem csupán a Cu(II)ion,

1. Táblázat. Néhány aminosav és imidazol analógiájuk képlete.

(Z) (E)

Ligandumok	R_C	R_N
L- α -alaninhidroxámsav (α -Alaha)		-H
L-N-Metil- α -alaninhidroxámsav (<i>N</i> -Me- α -Alaha)		-CH ₃
β -alaninhidroxámsav (β -Alaha)		-H
N-Metil- β -alaninhidroxámsav (<i>N</i> -Me- β -Alaha)		-CH ₃
Imidazol-4-karbohidroxámsav (<i>Im</i> -4- <i>Cha</i>)		-H
N-Metil-imidazol-4-karbohidroxámsav (<i>N</i> -Me- <i>Im</i> -4- <i>Cha</i>)		-CH ₃
Imidazol-4-acetohidroxámsav (<i>Im</i> -4- <i>Aha</i>)		-H

hanem a Ni(II)- és Zn(II)ionok is képeznek fémkorona típusú komplexet³⁴.

A fent részletezett eredmények azt mutatják, hogy amennyiben az $R_N \neq -H$, a β -aminosavak hidroxámsav származékaival, illetve azok imidazol-analógiáival már dominánssá válik a hidroxamát-(O,O) koordináció. Amennyiben azonban $R_N = -H$, sem az α -, sem a β -származékokban nem játszik mérhető szerepet a hidroxamát-(O,O) kelát a Ni(II)-, Cu(II)- és Zn(II)ionokkal való komplexképzésben. Sőt, amint azt mások eredményei³⁵ és saját³⁶ legújabb eredményeink is mutatják, még a γ -helyzetben elhelyezkedő amino-, vagy imidazolcsoport is erősen befolyásolhatja a koordináció módját. Így például, Cu(II)ionnal a γ -aminovajsav hidroxámsav származéka³⁵ és a Z-védett hisztidin hidroxámsav származéka³⁶ is fémkorona típusú komplexet képez. Meglepően, ezekben az igen nagy stabilitású komplexekben csatolt 5- és 7-tagú kelátok kapcsolják össze a fémionokat.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnénk köszönetet mondani a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport valamennyi korábbi és jelenlegi tagjának, akik a közleményben összefoglalt kutatásokban eredményesen közreműködtek: Dr. Várnagy Katalin és Dr. Buglyó Péter egyetemi docensek, Dr. Nagy Zoltán, Dr. Ósz Katalin és Dr. Enyedy Éva Anna egyetemi adjunktusok, Dr. Kállay Csilla és Dr. Józai Viktória posztdoktorok, Szőke József és Dr. Bátka Dávid okleveles vegyészek, Dr. Csapó Edit tudományos munkatárs, valamint Turi Ildikó, Timári Sarolta, Józsa Éva, Bíró Linda, Szabó Orsolya PhD hallgatók. A kutatások anyagi támogatásáért az OTKA 48352, OTKA T034674, OTKA T049652, OTKA-NKTH 77586, OTKA PD 72321, TAMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 kutatási pályázatoknak és az MTA-CNR valamint Tét magyar-portugál P-5/01, P-7/03, Port-1/2005 kétoldali együttműködési programoknak tartozunk köszönettel.

Hivatkozások

- Prusiner, S.B. *Science*, **1997**, 278, 245.
- Millhauser, G.L. *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 79.
- Brown, D.R.; Kozłowski, H. *Dalton Trans.* **2004**, 1907.
- Crichton, R.R.; R.J. Ward, R.J. *Metal-based Neurodegeneration*, Wiley, Chichester. **2006**.
- Kozłowski, H.; Brown, D.R.; Valensin, G. *Metallochemistry of Neurodegeneration*, RSC Publishing, Cambridge. **2006**.
- Łuczowski, M.; Kozłowski, H.; Stawikowski, M.; Rolka, K.; Gaggelli, E.; Valensin, D.; Valensin, G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2002**, 2269.
- Burns, C.S.; Aronoff-Spencer, E.; Dunham, C.M.; Lario, P.; Avdievich, N.I.; Antholine, W.E.; Olmstead, M.M.; Vrielink, A.; Gerfen, G.J.; Peisach, J.; Scott, W.G.; Millhauser, G.L. *Biochemistry*, **2002**, 41, 3991.
- Sóvágó, I.; Ósz, K. *Dalton Trans.* **2006**, 3841.
- Jószai, V.; Nagy, Z.; Ósz, K.; Sanna, D.; Di Natale, G.; La Mendola, G.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I. *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100, 1399-1409.
- Di Natale, G.; Grasso, G.; Impellizzeri, G.; La Mendola, D.; Micera, G.; Mihala, N.; Nagy, Z.; Ósz, K.; Pappalardo, G.; Rigó, V.; Rizzarelli, E.; Sanna, D.; Sóvágó, I. *Inorg. Chem.*, **2005**, 44, 7214-7225.
- Grasso, D.; Grasso, G.; Guantieri, V.; Impellizzeri, G.; La Rosa, C.; Milardi, D.; Micera, G.; Ósz, K.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sanna, D.; Sóvágó, I. *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 537-547.
- Ósz, K.; Nagy, Z.; Pappalardo, G.; Di Natale, G.; Sanna, D.; Micera, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I. *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 7129-7143.
- Di Natale, G.; Ósz, K.; Nagy, Z.; Sanna, D.; Micera, G.; Pappalardo, G.; Sóvágó, I.; Rizzarelli, E. *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 4239-4250.
- Turi, I.; Kállay, C.; Szikszai, D.; Pappalardo, G.; Di Natale, G.; De Bona, P.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I. *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, 104, 885-891.
- Kállay, C.; Várnagy, K.; Malandrinos, G.; Hadjiliadis, N.; Sanna, D.; Sóvágó, I. *Inorg. Chim. Acta*, **2009**, 362, 935-945.
- Ósz, K.; Lente, G.; Sóvágó, I. *Természet Világa*, **2009**, 140, 547-550.
- Damante, C.A.; Ósz, K.; Nagy, Z.; Pappalardo, G.; Grasso, G.; Impellizzeri, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I. *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 9669-9683.
- Damante, C.A.; Ósz, K.; Nagy, Z.; Pappalardo, G.; Grasso, G.; Impellizzeri, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I. *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 10405-10415.
- Józsa, É.; Ósz, K.; Kállay, C.; De Bona, P.; Damante, C.A.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I. *Dalton Trans.*, **2010**, 39, 7046-7053.
- Crumbliss, A.L., in *Handbook of Microbial Iron Chelates*, (Ed.: Winkelmann G.), CRC, New York, **1991**.
- Albrecht-Gary, A-M., Crumbliss, A. L., in *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 35 (Eds.: Sigel, A., Sigel, H.), Marcel Dekker, New York, **1998**.
- Benini, S.; Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., Miletto, S., Ciurli, S., Mangani, S., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5, 110.
- Muri, E. M. F., Mishra, H., Avery, M. A., Williamson, J. S., *Synth. Commun.* **2003**, 33, 1977.
- Muri, E. M. F., Nieto, M. J., Sindelar, R. D., Williamson, J. S., *Current Med. Chem.* **2002**, 9, 1631.
- Puerta, D. T., Cohen, S. M., *Current Topics in Med. Chem.* **2004**, 4, 1551.
- Tsukamoto, K.; Itakura, H.; Sato, K.; Fukuyama, K.; Miura, S.; Takahashi, S.; Ikezawa, H.; Hosoya, T. *Biochemistry*, **1999**, 38, 12558.
- Liu, Z. D., Hider, R. C., *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 232, 151.
- Kalinowski, D. S., Richardson, D. R. *Pharm. Rev.*, **2005**, 57, 547.
- Farkas, E., Kozma, E., Pethő, M., Herlihy, K.M., Micera, G., *Polyhedron*, **1998**, 17, 3331.
- Farkas, E., Csóka, H., Tóth, I., *Dalton Trans.*, **2003**, 1645.
- Kurzak, B., Kozłowski, H., Farkas, E., *Coord. Chem. Rev.*, **1992**, 114, 169.
- Farkas, E., Szőke, J., Kiss T., Kozłowski, H., Bal, W., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1989**, 2247.
- Kurzak, B., Farkas, E., Glowiak, T., Kozłowski, H., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1991**, 163.
- Farkas, E., Bátka, D., Csapó, E., Buglyó, P., Haase, W., Sanna, D., *Polyhedron*, **2007**, 26, 543.

Modelling the interactions of metal ions with proteins and their role in the development of neurodegenerative disorders and design of new enzyme inhibitors.

Two major areas of the research performed in the Bioinorganic Chemistry Research Group of the Department of Inorganic and Analytical Chemistry at the University of Debrecen are described in the paper. The first subject covers the studies on the role of metal ions in neurodegeneration. The neurodegenerative disorders are often called as conformational diseases because the development of the disorders is linked to the conformational changes of the corresponding proteins. Metal complexes of the peptide fragments of prion proteins and amyloid- β were studied by the combined application of potentiometric and spectroscopic techniques. The results revealed the high copper(II) binding affinity of all peptide fragments, but the outstanding zinc(II) binding of amyloid fragments has also been justified. It was found in all cases that neither nickel(II) nor zinc(II) coordination can replace copper(II) ions in the complexes, but both metal ions can significantly change the distribution of copper(II) ions among the available binding sites.

The second subject focuses on metal complexation of various hydroxamic acids ($R_C\text{-CO}(R_N)\text{N-OH}$) in solution. Out of the results obtained in this field, those, which relate to the nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes of simple α -, β -aminohydroxamic acids and imidazole analogues are discussed. The reason for this choice is that amino acid based or peptide based hydroxamic derivatives are often among the possible candidates as inhibitors for various metalloenzymes and, for this reason, it is interesting to know the main factors affecting the metal binding ability/binding mode of such molecules. The results show that the hydroxamate-type (O,O)-coordination is almost completely suppressed in the complexes of α -derivatives, if, at the same time, $R_N = -H$. Interesting metallacrown complex predominates in the copper(II)- β -Alaha system. With the imidazole analogues not only the copper(II), but also the nickel(II) and cobalt(II) form metallacrowns. The hydroxamate becomes the main coordinating site with N -methylated β -derivatives.