



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

OTDK DOLGOZAT

**Rákellenes Ga(III)-komplexek kölcsönhatása
vérszérum-fehérjékkel**

KÉSZÍTETTE:

Bali Krisztina

III. Kémia BSc

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Enyedy Éva Anna, egyetemi adjunktus

dr. Dömötör Orsolya, PhD hallgató

Szeged

2012

Tartalomjegyzék

1. Tartalmi összefoglaló.....	3
2. Bevezetés és irodalmi áttekintés	4
2.1 Rákellenes fémkomplexek a gyógyászatban	4
2.2 A legfontosabb vérszérum fehérjék bemutatása	7
2.3 A KP46 és a <i>trisz</i> (maltoláto)Ga(III) komplexek kölcsönhatása a szérumfehérjékkel: irodalmi előzmények	9
3. Célkitűzés	11
4. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek	12
4.1 Felhasznált vegyszerek	12
4.2 Spektrofluorimetria	12
4.3 Ultraszűrés	17
4.4 Ultraibolya-látható spektrofotometria.....	18
4.5 Mágneses magrezonancia spektroszkópia	19
5. Eredmények	20
5.1 A komplexek kölcsönhatása HSA-nal	20
5.2 A komplexek kölcsönhatása apoTf-nel.....	24
6. Összefoglalás	31
7. Irodalomjegyzék	32
8. Köszönetnyilvánítás.....	34

1. Tartalmi összefoglaló

A gallium(III) gyógyászati alkalmazása a diagnosztikán túl is, elsősorban a kemoterápiában egyre szélesebb körű. Biológiai hatása a vas(III)-hoz való hasonlóságán alapul, a tumoros sejtekben feldúsulva képes azok pusztulását okozni. Fiziológiás pH-n hidrolizál, így biohasznosulása rossz, ezért a galliumsók helyett inkább a komplexeit alkalmazzák. Klinikai fázis I kísérleteken túljutott komplexei a *trisz*(maltoláto)Ga(III) és a *trisz*(8-kinolináto)Ga(III) (KP46).

Egy gyógyszerhatóanyag farmakokinetikáját (és ezzel a hatás kialakulását is) nagyban befolyásolja a vészérum-fehérjékhez való kötődése. Egy galliumkomplex esetén fontos megismernünk a humán szérum transzferrinnel (Tf) való kölcsönhatást, mert a feltételezett hatásmechanizmusban nagy szerepe van ennek a fehérjének. Nagy koncentrációja miatt azonban az albuminnal (HSA) való kölcsönhatás is lényeges lehet.

Munkánk során ezeket a kölcsönhatásokat vizsgáltuk elsősorban spektrofotometriás módszerrel, illetve ultraszűrőssel, spektrofotometriával és ^1H NMR mérésekkel. A kapott kötési állandók segítségével a fémion eloszlást modellezni tudtuk a különböző vészérum-fehérjék jelenlétében. Rámutattunk arra, hogy a spektrofotometriás méréseket is jól tudjuk használni modellszámolással kapott speciációk igazolására fluoreszcens komplexek (pl. KP46) esetén.

Az eredményeink azt mutatják, hogy míg a *trisz*(maltoláto)Ga(III) esetén elhanyagolható a HSA-nal való kölcsönhatás, a KP46 esetén nagy jelentősége van, ami akár a komplexek hatékonyságát is befolyásolhatja.

Kulcsszavak: albumin, transzferrin, fluorimetria, speciáció, antitumor komplexek

2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

2.1 Rákellenes fémkomplexek a gyógyászatban

A rákos megbetegedések világszerte a leggyakoribb megbetegedések közé tartoznak. Hozzávetőlegesen minden harmadik ember megbetegszik, és minden ötödik meghal valamilyen daganatos elváltozás következtében.¹ A rák nem egyetlen betegség, hanem több mint kétszáz különféle betegség gyűjtőneve. Bár a kialakulás hátterében álló folyamat a sejtek szintjén hasonló, az egyes betegségek a legkülönbélebb tünetekkel jelentkezhetnek, eltérő a viselkedésük, más a választandó kezelés és a várható kimenetel, az életkilátások sem egyformák.

A daganatos megbetegedések korszerű gyógyítása a sebészi beavatkozás és a sugárterápia mellett elsősorban gyógyszeres kezeléssel alapul. A kemoterápia alkalmazhatóságát megnehezíti, hogy a tumoros sejt nagyon hasonlít az egészséges sejtre, így a jelenlegi, különböző hatásmechanizmusú és támadáspontú gyógyszerek egyike sem specifikus a kialakult daganatra, hanem többé-kevésbé hat az egészséges sejtekre is. Ez okozza az onkológiában használt szerek toxikusságát, amely meghatározó jelentőségű a gyógyászati alkalmazás szempontjából. Alapvető különbség azonban, hogy a rákos sejtek sokkal gyorsabban osztódnak, így sokkal nagyobb pl. a vasisigényük. Számos potenciális gyógyszer-molekula próbálja kihasználni ezt a sajátosságot.

Az első gyógyászatban alkalmazott fémkomplex a ciszplatin volt,² amit széles körben alkalmaznak elsősorban a hererák, és egyéb szerekkel kombinálva a fej, nyak, petefészek és a húgyhólyag daganatos elváltozásainak kezelésére. Hatása azon alapul, hogy passzív transzporttal átjutva a sejtmembránon, a sejtben lévő kisebb klorid-koncentráció miatt hidrolizál, és a képződő akva-komplex a DNS guanin-N(7) donorcsoportjaihoz kötődve leginkább 1,2-intrastrand keresztkötést képezve gátolja a DNS-replikációt^{3,4} és a sejt szaporodását. Bár áttörésnek számított a kemoterápiában, nem alkalmazható mindig. Számos esetben rezisztencia alakul ki. Az ún. multidrog-rezisztens daganatsejtek keresztrezisztenciát mutatnak szerkezetükben és hatásmechanizmusukban különböző citotoxikus szerekkel szemben, megakadályozzák azok sejtben belüli felhalmozódását.⁵ További probléma, hogy a platinakomplexek jellemző mellékhatása a hányinger és a hányás, amely a ciszplatin esetében olyan súlyos is lehet, hogy a beteg visszautasítja a kezelést. Kölcsönhatásba léphet plazmafehérjékkel és a vesén keresztül ürülve

vesekárosodást okozhat.⁶ Rosenberg felfedezése óta csaknem negyven további platinakomplexet vizsgáltak, de klinikai alkalmazásban csak a ciszplatin, a karboplatin és az oxaliplatin van.⁴ Megfelelő hatékonyság mellett jobban tolerálható és rezisztenciát nem okozó kemoterápiás szerek kifejlesztésére van szükség.

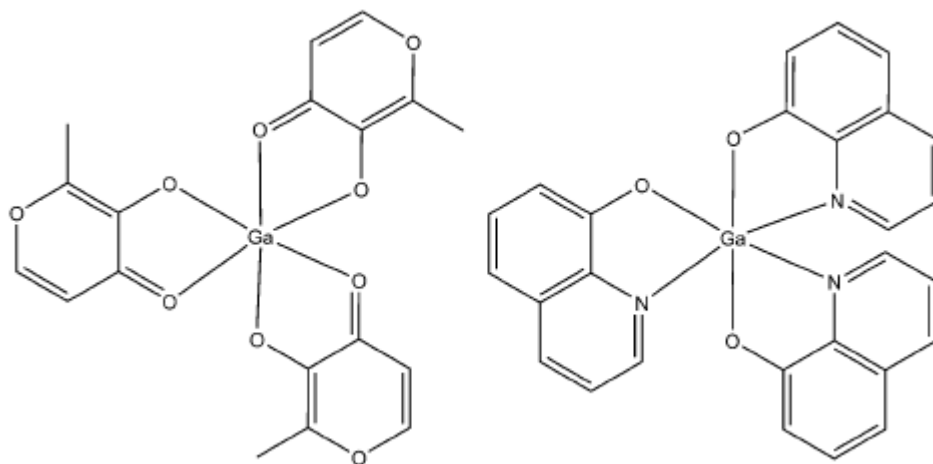
A platinakomplexek negatívumai miatt előtérbe került más fémek – például a ruténium, a ródium, a titán, a réz illetve a gallium – potenciálisan rákellenes komplexeinek vizsgálata.^{3,7-10}

A gallium alkalmazása az egészségügyben nem újdonság, a ⁶⁷Ga(III) és a ⁶⁸Ga(III) elsősorban a diagnosztikában,¹¹ míg a citráttal stabilizált Ga(NO₃)₃-ot (GaniteTM intravénás injekció) a rákos megbetegedésekkel járó hiperkalcémia (magas vérszérumbeli kalcium-koncentráció) kezelésére használják.¹² Klinikai kísérletek alapján egyes limfómák, hólyagrák és a myeloma multiplex kezelésében is hatásosnak bizonyult.^{13,16} A Ga(NO₃)₃ biohasznosulása azonban rossz, fiziológiás pH-n hidrolizál és a képződő gallát nagyon megterheli a vesét. A hidrolízis elkerülése érdekében a Ga(III) különböző komplexeit alkalmazzák.

A *trisz*(3-hidroxi-2-metil-4H-pirán-4-onáto)Ga(III) (*trisz*(maltoláto)Ga(III)) és a *trisz*(8-kinolináto)Ga(III) (KP46) (ld. 1. ábra) sikeresen túljutott klinikai fázis I kísérleteken.^{14,15} Mindkét vegyület szájon át adagolható és vizes oldatukban fiziológiás pH-n döntően a semleges, *trisz*-ligandumú komplex van jelen. Oktaéderes geometriájúak, a maltol (O,O), a 8-hidroxi-kinolin (oxin) pedig (O,N) donoratomokon keresztül koordinálódik a fémionhoz, ebből adódik nagy stabilitásbeli különbségük. Az eltérő stabilitást jól szemlélteti a 2. ábrán bemutatott koncentrációeloszlási diagram. További fontos különbség, hogy a KP46 fluoreszcens, a *trisz*(maltoláto)Ga(III) viszont nem. Oldhatóságukban és lipofilitásukban is jelentős eltérés mutatkozik (ld. 1. Táblázat).

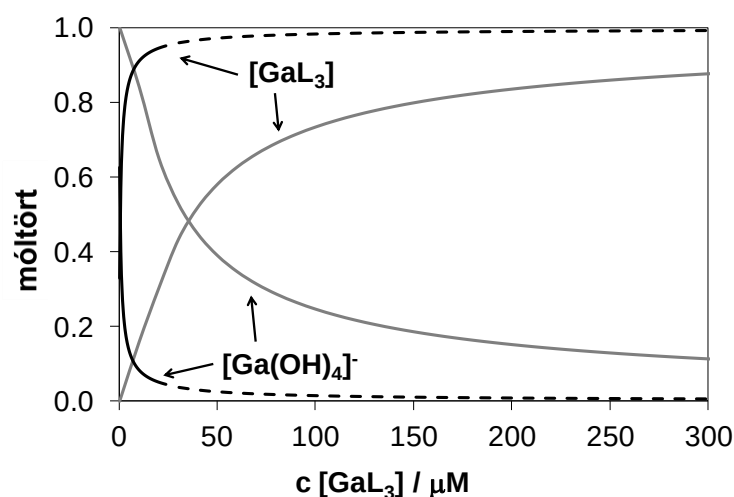
1. Táblázat: A KP46 és *trisz*(maltoláto)Ga(III) komplexek legfontosabb jellemzői

	KP46	<i>trisz</i>(maltoláto)Ga(III)
$\lg\beta[\text{GaL}_3]$ ^[13]	36,79	28,77
Lipofilitás (lgP) ^[5,15]	0,88	0,41
Oldhatóság (S) ^[5,15]	$3,6 \times 10^{-5}$ M	$2,5 \times 10^{-2}$ M



1. ábra: A trisz(maltoláto)Ga(III) és a KP46 komplex szerkezeti képlete

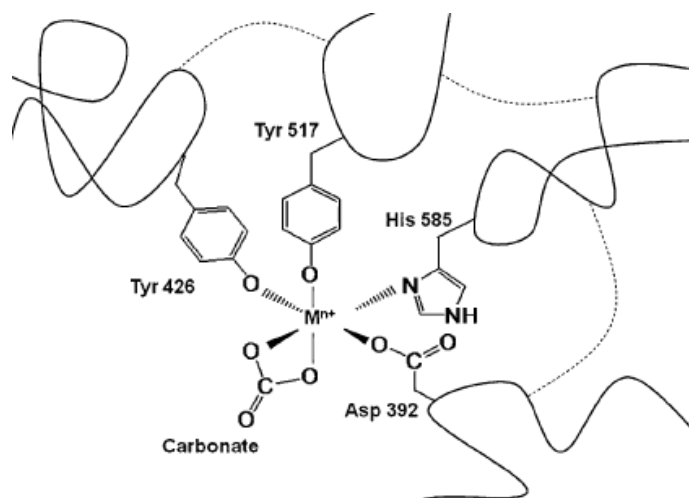
A Ga(III) rákellenes hatása a vas(III)-hoz való hasonlóságán (méret, elektronegativitás, töltés és koordinációs geometria) alapul. Képes azt helyettesíteni, így szintén felhalmozódik a tumoros sejtekben, azonban a Ga(III) nem vegyértékváltó, így a fémion kicserélődése után az eredetileg vastartalmú biomolekulák nem képesek ellátni funkciójukat. Általánosan elfogadott, hogy a vérben a gallium a transferrinhez kötődve szállítódik és feltételezhetően a transferrin-receptorok segítségével kerül a sejtbe, ahol a DNS-szintézishez létfontosságú ribonukleotid-reduktázban lévő vas galliumra cserélődésével először az enzim működését majd magát a DNS szintézist is gátolja, a rákos sejtek apoptózisát okozva. Az egészséges sejtek, még abban az esetben is, ha gyorsan szaporodnak (hajhagyma, gyomorfal), nagyon kevés vasat (illetve galliumot) vesznek föl, mert a vas a normális szövetben újrahasznosul. Ebből adódóan a gallium nem dúsul föl az egészséges sejtekben és nem is károsítja őket. Továbbá a gallium nem tud beépülni a hemoglobinba, ezért nem befolyásolja a vörösvértestek működését illetve az oxigénszállítást.¹⁶ Mivel a gallium fiziológiás pH-n túlnyomó részt gallátként van jelen,¹⁷ főleg különféle komplexeit alkalmazzák terápiás szerként.



2. ábra: A KP46 (fekete vonalak) és a *tris*(maltolato)Ga(III) (szürke vonalak) komplexek reprezentatív koncentrációeloszlási görbéi fiziológias pH-n változó analitikai koncentrációk mellett¹³

2.2 A legfontosabb vérszérum fehérjék bemutatása

Fontos kérdés, hogy az alkalmazott fémkomplex a véráramba kerülve milyen mértékben kötődik a transferrinhez, illetve befolyásolja-e kötődését a nagy mennyiségben jelen levő albumin. A transferrinek (ovotranszferrin, laktoferrin és szérum transferrin) 80 kDa molekulatömegű glikoproteinek. Egy polipeptidláncból állnak, melynek harmadlagos szerkezete két alegységet határoz meg, ezek mindegyike egy-egy vaskötő helyet tartalmaz. A vas torzult oktaéderes koordinációs szféráját két tirozin fenolát-O, egy hisztidin imidazol-N, egy aszparaginsav karboxilát-O és a kétfogúán kötődő karbonát két O-je telíti (ld. 3. ábra). A két részből álló egység fémmentesen nyitott konformációja a Fe(III) és a szinergista HCO_3^- anion bekötődése után zárt, egymásra hajló konformációt vesz fel.

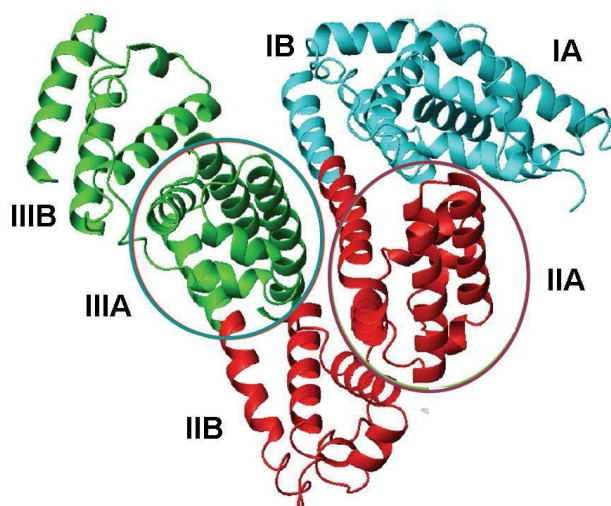


3. ábra: A transferrin vaskötő-helye¹⁸

A két konformáció reverzibilis egymásba alakulása alapvető fontosságú a hatékony vastranszporthoz.¹⁹ A Ga(III) mindkét fémkötő helyen képes megkötődni, a következő kötési állandókkal, $\lg K_1 = 20,3$ és $\lg K_2 = 19,3$, fiziológias szérumszén-dioxid-koncentráció mellett. (Fe(III)-ra $\lg K_1 = 22,8$ és $\lg K_2 = 21,5$).²⁰ A szérumszén-dioxid-koncentrációja a vérben $\sim 37 \mu\text{M}$, vaskötő-helyeinek $\sim 33\%$ vassal telített.²¹

Az emlős szervezet legfőbb szállítófehérjeje az albumin. A teljes szérumszén-dioxid-koncentráció 60%-át ($\sim 630 \mu\text{M}$) teszi ki. A többi plazmafehérje közül már jelentős mennyisége is kiemelkedik, funkciói a következők: ozmózisnyomás biztosítása az érrendszerben, pH pufferezése, szabadgyökök deaktiválása, különböző szervetlen ionok és szerves molekulák szállítása, így oldhatóságuk javítása.²²

A humán szérumszén-dioxid-koncentráció (továbbiakban HSA) egyetlen, 585 aminosavból álló egyszerű globuláris molekula. Szerkezeti szempontból három egységre bontható: I-, II- és III-as egység (domén). Ezeket két-két alegységre szokás tovább osztani, melyet IA, IB stb. formában jelölnek (ld. 4. ábra). A molekula tizenhét diszulfidhidat, egy szulfhidril-csoportot, továbbá egyetlen triptofán aminosavat (Trp214) tartalmaz. A HSA számos kötőhellyel rendelkezik, a megkötött molekuláknak nagy hányadát teszik ki a zsírsavak, melyek kötésére megközelítőleg hat kötőhely áll rendelkezésre az albuminon. Találunk továbbá peptidhormonok, szteroidok, fémionok – mint pl. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} – szállításáért felelős molekularészeket is.²²



4. ábra: A humán szérum albumin háromdimenziós szerkezete

Számos endogén metabolit és kívülről bevitt farmakon is HSA-hoz kötve jut el rendeltetési helyére.

A gyógyszerhatóanyagok a vérben reverzibilisen kötődnek a vér makromolekuláihoz. A kötődés alapvetően befolyásolja a gyógyszer eloszlását, hatástartamát, metabolizmusát, szervezetből való kiürülését, azaz a farmakokinetikáját.

2.3 A KP46 és a *trisz*(maltoláto)Ga(III) komplexek kölcsönhatása a szérumfehérjékkel: irodalmi előzmények

Irodalmi adatok alapján a Ga(III) sók szájon át való alkalmazásakor a biohasznosulás csupán 1-2%-os, de ezt a komplexképző ligandumok nagymértékben képesek növelni (pl. a maltol komplexe esetén 25-57%). A ligandumhoz nem kötött Ga(III) fiziológiás pH-n $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ formájában van jelen, ami nem képes azonnal a Tf-hez kötődni.¹⁵ A fehérjéhez nem kötött $[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$ viszont gyorsan kiürül. Citrát és maltol komplexe esetén azonban mind a termodinamikai modellszámolások, mind a közvetlen mérések azt mutatták, hogy a Ga(III) 50 μM -os koncentrációjáig a Tf-hez való kötődése lesz a domináns.^{21,23} A.V. Rudnev és munkatársai⁵ a KP46 komplex HSA-hoz és Tf-hez való kötődésének tényét és reakciósebességét mutatják be közleményükben ($3,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), mely alapján a kölcsönhatás nem pillanatszerűen jön létre egyik fehérjével sem. CE-ICP-MS mérésekkel szintén jellemezték a KP46 kölcsönhatását humán szérum fehérjékkel. Az eredmények azt

mutatták, hogy a $\text{KP46:Tf} = 2:1$ aránynál, 6 órás inkubálás után a Ga(III) 71%-a kötődik a vasat nem tartalmazó Tf-hez (apoTf). Külön kísérletben azt találták, hogy a HSA-hoz viszont csak csekély mennyiségű KP46 kötődik, azonban megjegyezzük, hogy a valós szérumkoncentrációk mellett ez a gyenge kölcsönhatás sem elhanyagolható. A mérési eredményeknek további kvantitatív kiértékelése, esetlegesen kötési állandók meghatározása azonban hiányzik.²³

Röntgen abszorpciós spektrofotometriával (XANES) a Ga(III) koordinációs szféráját közvetlenül tudták vizsgálni, viszont nem tapasztaltak változást a fehérjék jelenlétében.²⁴ A vizsgált mintákban azonban a KP46 koncentrációja nagyban meghaladta az oldhatóságot és a mintákat a mérés előtt lefagyasztották. Így nem kizárt, hogy a KP46 döntő része nem is volt oldatfázisban, amikor a fehérjét, illetve szérumot hozzáadták.

Az irodalmi adatok meglehetősen hiányosak a KP46 komplex humán szérum fehérjékhez való kötődésének kvantitatív jellemzése terén, főképp olyan mérési technikák alkalmazásával, melyek a kémiai egyensúlyt nem tolják el (pl. spektroszkópai módszerek). A kötési állandók hiánya részben magyarázható a KP46 komplex rossz vízoldhatóságával is. A KP46 ill. a *trisz*(maltoláto) Ga(III) szérumbeli eloszlásának modell számolásához azonban nem elegendő a Ga(III) -apoTf kölcsönhatás²⁰ és a Ga(III) -oxin valamint a Ga(III) -maltol rendszerek oldatspeciációjának¹³ ismerete, hanem a komplex-HSA; ligandum-HSA kölcsönhatások kvantitatív leírása is szükséges. A munkánk célja ezen hiányzó adatok meghatározása elsősorban fluorimetriás és ultraszűrési vizsgálatokkal, majd a stabilitási állandók birtokában megjósolt Ga(III) eloszlások bizonyítása. A KP46 fluoreszcens sajátságát még senki nem használta ki, illetve az irodalmi adatok alapján a KP46-ot eddig minden esetben szerves oldószerben oldották, mi viszont tiszta vizes oldatokat tanulmányoztunk.

3. Célkitűzés

Munkánk célja, hogy meghatározzuk a rákellenes *trisz*(maltoláto)Ga(III) és a *trisz*(8-kinolináto)Ga(III) (KP46) eloszlását olyan vizes oldatokban, amelyek humán szérumban apotranszferrint, illetve albumint tartalmaznak. A kapott kötési állandók, azaz a képződő komplexek stabilitásának ismeretében pedig szeretnénk alátámasztani a modellszámításokkal kapott koncentrációeloszlásokat.

Ezért vizsgáljuk:

- a) a maltol illetve a *trisz*(maltoláto)Ga(III) komplex kölcsönhatását humán szérumban albuminnal spektrofotometrián, ultraszűréssel és ^1H NMR mérésekkel;
- b) az oxin (KP46 liganduma) és a KP46 kölcsönhatását humán szérumban albuminnal spektrofotometrián és UV-látható spektrofotometrián;
- c) a maltol, illetve a *trisz*(maltoláto)Ga(III) komplex kölcsönhatását humán szérumban apotranszferrinnel spektrofotometrián, spektrofotometrián és ^1H NMR mérésekkel;
- d) az oxin és a KP46 kölcsönhatását apotranszferrinnel spektrofotometria segítségével.

4. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek

4.1 Felhasznált vegyszerek

A vizsgálataink során felhasznált maltol, 8-hidroxi-kinolin (oxin), GaCl_3 , HSA (99%), apoTf (97%), KCl, KHCO_3 és a pufferként alkalmazott 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinétánszulfonsav (HEPES) a Sigma-Aldrich Kft. termékei voltak.

A ligandumokból további tisztítás nélkül, beméréssel készítettünk ~2-5 mM-os koncentrációjú törzsoldatokat. Az oxint először sósavban oldottuk föl az oldódás elősegítésére. A fehérjeoldatokat puffer-oldattal készítettük, pontos koncentrációjukat spektrofotometriásan határoztuk meg. A GaCl_3 törzsoldatot szilárd GaCl_3 oldásával készítettük, pontos fémtartalmát komplexometriásan mértük meg.

Az oldatkészítéshez ioncserélt vizet használtunk.

4.2 Spektrofluorimetria

Napjaink egyik közkedvelt vizsgálati módszere. Népszerűségét elsősorban érzékenysége (µM koncentrációtartomány) és egyszerű használatának köszönheti. Számos alkalmazási területe közül a fehérjék, fehérjékkel kölcsönható vegyületek vizsgálatára főleg a biokémikusok, molekuláris fizikusok alkalmazzák. Hátránya azonban, hogy a mért intenzitásváltozásokból a kötődés helyére csak közvetve következtethetünk, illetve egyes esetekben a fehérje kötőhelyei közül nem mind érzékeny erre a módszerre. Kötőhely marker anyagokkal történő kompetíciós vizsgálatokkal szélesebb körű alkalmazhatóság (több kötőhely vizsgálata) érhető el, de csak az adott kötőhelyről való leszorítást jelzik, ami nem feltétlenül egyezik a fehérjéről való teljes leszorítással.

A módszer elméleti háttere: bizonyos vegyületek az UV-látható sugárzás abszorpciója következtében fotolumineszcenciát mutatnak, azaz fényt bocsátanak ki. Attól függően, hogy a fény kisugárzása a gerjesztés után 10^{-4} másodpercnél rövidebb vagy hosszabb idő alatt következik be, fluoreszcens illetve foszforeszcens fényről beszélünk.²⁵ A fény kibocsátásáért felelős molekularészletet fluorofor csoportnak hívjuk.

Fehérjék esetében három fluoreszcens aminosav van: aromás jellegüknél fogva a fenilalanin, tirozin (Tyr) és a triptofán (Trp).²⁶

A HSA-ban egyetlen Trp található a 214-es helyzetben. Amennyiben csak ezt az aminosavat akarjuk gerjeszteni a fehérjében, úgy a besugárzó fény hullámhosszát $\lambda_{EX} = 295$ nm-nek választjuk. A Trp214 a IIA domén „hidrofób zsebe” közelében helyezkedik el. Tehát, ha az I-es kötőhelyhez beköt egy vagy több vegyület (ligandum), akkor a megváltozó hidrofób-hidrofil viszonyok hatással vannak a Trp emissziójának intenzitására. Az ilyen típusú vizsgálatok az ún. „kioltás” (kvencselés, angolul quenching) jelenségén alapulnak: a HSA kezdeti emissziós intenzitása valamely vegyület hozzáadásával folyamatosan csökken, a csökkenés mértékéből pedig a fehérje-ligandum kölcsönhatásról, a kötés erősségéről nyerhetünk információt.

A Tf mindkét vaskötő helyén két Tyr van, melyek emissziós intenzitását nagyban befolyásolják a kötőhelyre bekötődő fémionok. A Tyr esetén a gerjesztő sugárzás hullámhossza 280 nm. Az emissziós intenzitás csökkenéséből következtethetünk a kötődésre, tehát ez szintén kvencselési vizsgálat.

Maga a KP46 is fluoreszcens,¹³ így olyan típusú méréseket is végeztünk, ahol $\lambda_{EX} = 367$ nm-en a KP46 emissziós intenzitását mértük. Az ideális gerjesztési hullámhosszat előzetes mérések alapján határoztuk meg. Ebben az esetben az emissziós intenzitás változása a fehérje hozzáadásakor telítési görbe jellegű volt.

A fluorimetriás méréseket igen híg oldatban végezzük (μ M-os koncentrációk) a jelentős önabszorpció elkerülése miatt. Az alacsony koncentráció a disszociációnak kedvez, így fluorimetriás mérések alapján elsősorban az 1:1 arányú komplexekre lehet kötési állandókat meghatározni.

4.2.1 A fluorimetriás mérések körülmények

A mérések Hitachi F-4500 típusú spektrofluoriméterrel készültek, 240 nm/min pásztázási sebesség mellett. 1,00 cm úthosszú kvarc küvettát használtunk. A mérések pH = 7,40 pufferelt közegben történtek. Pufferként 10 mM-os HEPES-t használtunk, az ionerősséget KCl-dal 0,10 M-ra állítottuk be, az apoTf-t tartalmazó mintákba 25 mM-os koncentrációban KHCO_3 -ot is tettünk. Egyedi mintákat készítettünk, 2,00 cm³ térfogatban. A mérések során minden esetben alkalmaztunk a háttérre (puffer) vonatkozó korrekciót. A vizsgált rendszertől függően, ahol szükséges volt, korrigáltunk a mért intenzitásokat a minta önabszorpciójával is. Spektrofluorimetriás méréseknél ugyanis állandó probléma a komponensek fényelnyelése. Ezt a jelenséget önabszorpciónak nevezzük, amely két típusra

osztható attól függően, hogy a gerjesztő, vagy az emittált fényt nyeli el az adott komponens. Gyakran a vizsgált anyag nemcsak a gerjesztő, hanem az emissziós hullámhosszakon is elnyel. Irodalmakból számos korrekciós módszer ismert. A leggyakrabban használt korrekciós egyenlet abból indul ki, hogy a gerjesztő fény intenzitása (I_0) és a detektált fluoreszcens jel (I) között a következő összefüggés áll fenn:

$$I = I_0 \times \Phi \times 2,3 \times A(\text{EX})$$

tehát

$$I_{\text{kor}} / I_{\text{mért}} = 10^{[(A(\text{EX}) + A(\text{EM})) / 2]} \quad 26$$

ahol

- Φ - kvantumhasznosítási tényező
- I_{kor} - korrigált fluoreszcens intenzitás
- $I_{\text{mért}}$ - mért fluoreszcens intenzitás
- $A(\text{EX})$ - abszorpció a gerjesztő hullámhosszon
- $A(\text{EM})$ - abszorpció az emissziós hullámhosszon

Többféle fehérje és komplex koncentráció mellett végeztünk méréseket, az alábbi körülmények között:

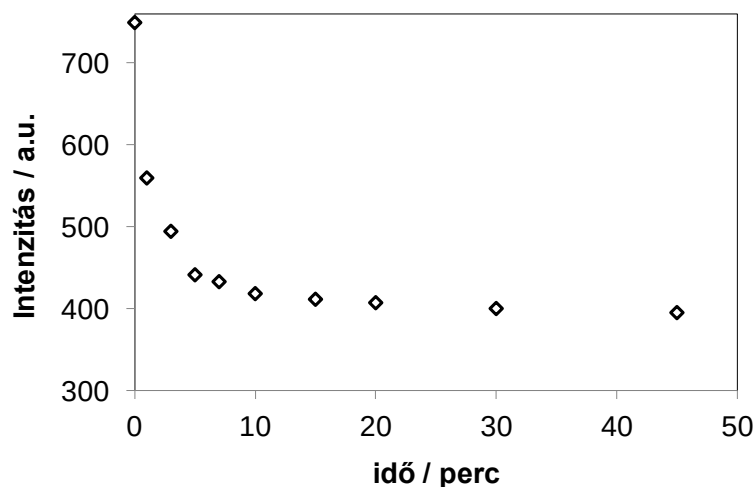
2. Táblázat: A KP46 fluorimetriás mérési körülményei

	$C_{\text{KP46}}/\mu\text{M}$	$C_{\text{fehérje}}/\mu\text{M}$	$\lambda_{\text{EX}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{EM}}/\text{nm}$	Résszélesség $\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{EM}}$
HSA	0,5-25	1	367	450-650	10/10
	1,5-30	50	367	450-650	10/10
	16	1-95	367	450-650	10/10
apoTf	1,5-65	1	367	450-650	10/10
	1,5-20	25	367	450-650	10/10
	2,5-15	25	367	450-650	10/10
	0,2-4	0,2	280	290-450	5/10

3. Táblázat: A trisz(maltoláto)Ga(III) fluorimetriás mérési körülményei

	$C_{\text{komplex}}/\mu\text{M}$	$C_{\text{fehérje}}/\mu\text{M}$	$\lambda_{\text{EX}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{EM}}/\text{nm}$	Résszélesség $\lambda_{\text{EX}}/\lambda_{\text{EM}}$
HSA	0,5-40	1	295	305-410	5/5
apoTf	1-80	2	280	290-450	5/5
	0,2-4	0,2	280	290-450	5/10

A méréseket szobahőmérsékleten végeztük, általában 1 vagy 2 óra inkubációs idővel, néhány esetben pedig másnap megismételtük a mérést. A szükséges inkubációs időt egy-egy minta időfüggésének vizsgálatával állapítottuk meg (ld. pl. 5. ábra).

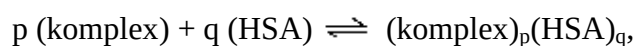


5. ábra A KP46-apoTf rendszer időfüggésének vizsgálata spektrofotometriásan $\lambda_{EX} = 367 \text{ nm}$

$\lambda_{EM} = 521 \text{ nm}$ ($c_{apoTf} = 25 \text{ } \mu\text{M}$; $c_{KP46} = 8 \text{ } \mu\text{M}$; $\text{pH} = 7,4$; $t = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}$)

A kiértékelésre használt PSEQUAD program²⁷ több szempontból is előnyös számunkra: teljes spektrumok analízisére alkalmas, illetve több komponens emisszióját képes egyszerre kezelni.

A program a következő adatok alapján számol: az egyedi mintáknál nyert intenzitás értékek; a mintában található komponensek koncentrációja; a rendszerben megtalálható komponensek és asszociátumok megadása (pl. HSA, komplex, HSA+komplex); az emittáló vegyületek megjelölése; a képződő asszociátumok közelítő stabilitási állandói. A program az adatsorokból az alábbi anyagmérlegek alkalmas matematikai módszerrel való megoldásával számítja a keresett kötési állandókat, azok szórását és az emittáló komponensek „egyedi spektrumát”. Ez utóbbi lényegében az abszorpciós spektroszkópiából ismert moláris abszorbancia megfelelője a fluorimetriában.



$$\beta_{pq}^* = [(\text{komplex})_p(\text{HSA})_q] / [\text{komplex}]^p [\text{HSA}]^q,$$

$$c_{\text{komplex}} = [\text{komplex}] + \sum_{i=1}^n p_i \beta_{pi}^* [\text{komplex}]^{p_i} [\text{HSA}]^{q_i},$$

$$c_{\text{HSA}} = [\text{HSA}] + \sum_{i=1}^n q_i \beta_{pq}^* [\text{komplex}]^{p_i} [\text{HSA}]^{q_i}$$

ahol,

β_{pq}^* = látszólagos kötési állandó HSA-komplex adduktumra

c_x = x komponens analitikai (teljes) koncentrációja

$[x]$ = x komponens egyensúlyi koncentrációja

$q, p = 1$ (Fluorimetriás körülmények között a nagy hígítások miatt csak 1:1 arányú komplexek létrejöttével számolhatunk.)

komplex = a mi esetünkben KP46

Spektrofluorimetriában a mért intenzitás a következő összefüggésben áll a komponensek/asszociátumok koncentrációjával:

$$I_i = \phi_{\text{komplex}}^i \times [\text{komplex}] + \phi_{\text{HSA}}^i \times [\text{HSA}] + \phi_{\text{HSA-komplex}}^i \times [\text{HSA - komplex}]$$

ahol,

I_i = fluoreszcenciás emisszió intenzitása az "i"-edik hullámhosszon

ϕ_x^i = "moláris intenzitás"

A különbségfüggvényeket az alábbi módon számoltuk:

$\Delta I = I_{\text{mért, oxin+HSA}} - I_{\text{HSA}} - I_{\text{oxin}}$, ahol I a megfelelő minta intenzitása egy adott hullámhosszon.

4.3 Ultraszűrés

Az ultraszűrés²⁸ segítségével a fehérjéhez kötött és a nem-kötött frakciót választjuk el az egyensúly beállítását követően. Az összeállított mintát (HSA + *trisz*(maltoláto)Ga(III)) megfelelő idejű és körülményű inkubálás után egy speciális szűrőre viszik fel, mely csak az adott méretnél kisebb molekulákat engedi át (10 kDa). A megfelelő ideig tartó, alkalmas fordulatszámon végzett centrifugálást követően két frakció keletkezik: a szűrőn fennmaradt rész az ún. HMM („high molecular mass” nagy molekulatömegű rövidítéséből), míg a szűrőn átjutott rész az LMM („low molecular mass” azaz kis molekulatömegű) frakció. A szűrőn marad tehát a fehérje és a hozzá kötött ligandum, míg a nem-kötődő anyagok átjutnak. Mindkét frakció összetétele vizsgálható alkalmas analitikai módszerrel, pl. UV-látható spektrofotometria, ICP-AES, AAS stb.

4.3.1 Mérési körülmények

A méréseket 0,50 cm³ térfogatban, 25 °C-on végeztük. A minták 200 µM HSA-t tartalmaztak, amelyhez 50-150 µM *trisz*(maltoláto)Ga(III)-t adtunk. Vizsgáltuk még az apoTf kölcsönhatását maltollal, 1:1 arányú mintát használva, melyben a koncentráció 50 µM volt. A szűréshez Eppendorf MiniSpin plus centrifugát használtunk, 12000 rpm fordulaton, amíg a minták kb. 80 %-a átszűrődött. A szűrő Microcon YM-10, Amicon, Millipore membránszűrő volt. A leszűrt mintákat UV-látható spektrofotometriával vizsgáltuk.

4.4 Ultraibolya-látható spektrofotometria

Ultraibolya-látható spektrofotometriával azok az anyagok vizsgálhatóak, melyek az adott hullámhossztartományban (~200-800 nm) fényt nyelnek el, azaz kromofórcsoportokat tartalmaznak. Gerjesztés hatására az elektronok alacsonyabb energiájú elektronpályákról magasabb energiájú szintekre kerülnek (pl. kötő pályáról lazítóra, nemkötőre). Fémkomplexek esetében elnyelést okozhatnak a fémion d-d átmenetei, a fémion és a ligandum közötti töltésátmenetek (CT sávok) illetve a ligandum molekulán belüli elektronátmenetei. Ga(III) vizsgálatoknál csak a ligandumsávok változása figyelhető meg, mert a Ga(III) d-pályái telítettek, így nincsenek d-d átmenetek és CT sávok sem. A ligandumsávok általában az UV-tartományban jelennek meg és nagy moláris abszorbancia jellemzi őket, viszont a komplexképződésre kevésbé érzékenyek.

4.4.1 Mérési körülmények

A spektrofotometriás méréseket szobahőmérsékleten, pH = 7,4 pufferelt (HEPES) közegben, KCl-dal beállított 0,10 M-os ionerősség mellett végeztük. Az oxint tartalmazó minták esetén a kis moláris abszorbancia miatt 2,00 cm úthosszú küvettában mértünk, egyéb mintáknál 1,00 cm-es küvettát használtunk. Az apoTf-t tartalmazó mintákba KHCO₃-ot is tettünk 25 mM-os koncentrációban. A fehérje koncentrációja néhány 10 µM volt, amihez képest a komplexeket 4-5 ekvivalensig adagoltuk.

A spektrumok felvételéhez egy számítógéppel vezérelt Hewlett Packard 8452A típusú diódasoros spektrofotométert használtunk 190-820 nm tartományban.

A különbségfüggvényeket az alábbi módon számoltuk:

$\Delta A = A_{\text{mért, oxin+HSA}} - A_{\text{HSA}} - A_{\text{oxin}}$, ahol A a megfelelő minta abszorbanciája egy adott hullámhosszon.

4.5 Mágneses magrezonancia spektroszkópia

Az NMR spektroszkópia a mágneses atommagok ($I \neq 0$) és a külső mágneses tér kölcsönhatásának vizsgálatán alapul. A magok mágneses momentuma a külső mágneses tér hatására a térrel párhuzamosan áll be és a mag körül, a mágneses momentuma pedig a mágneses tér körül forog. Ezen tér hatására a mag energiája $2I+1$ nívóra hasad föl (ahol I a mag spinkvantumszám), amelyek közötti energiakülönbség arányosan nő a külső mágneses térrel. Ha az elektromágneses sugárzás mágneses tere ugyanakkora körfrekvenciával forog körbe a külső tér körül, mint a mag mágneses momentuma, létrejön az NMR átmenet. A magok mágneses momentuma a lokális mágneses térrel lép kölcsönhatásba, amit nagyban befolyásol a mag körüli elektroneloszlás. Ezt az ún. árnyékolási tényezővel jellemezhetjük, amely különböző minőségű és kémiai környezetben levő magok esetén eltérő, vagyis azok rezonanciafrekvenciája is különböző. Egy adott mag saját rezonanciafrekvenciája és egy referenciaként választott anyag (pl. TMS (tetrametil-szilán) vagy DSS (4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav)) rezonanciafrekvenciájának különbségét kémiai eltolódásnak (δ) nevezzük. A kémiai eltolódás a kémiai szerkezetről ad információt. A szomszédos magok spinjei is hatnak egymásra, $2I+1$ jelre hasítják fel az eredetileg várt csúcsokat, így a jel nem szingulett hanem multipllett (dublett, tripllett) lesz. A jelek intenzitása azonos az azokat okozó magok számával, így meghatározható a különböző kémiai környezetben levő protonok száma.

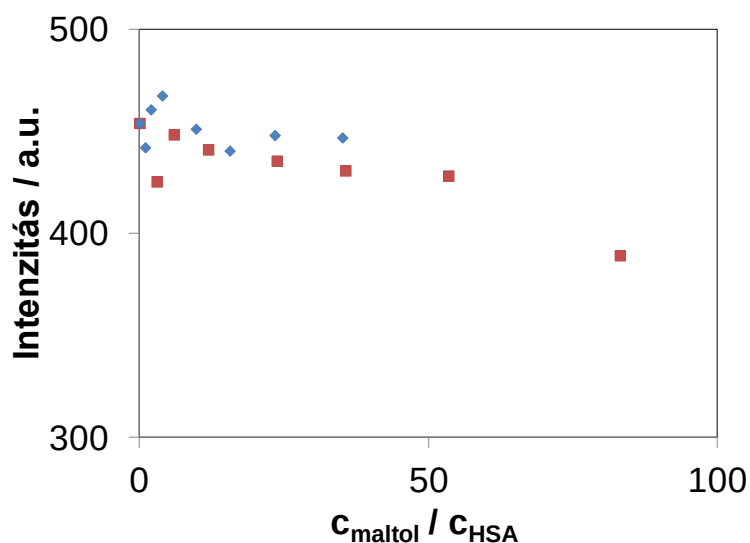
A ^1H NMR vizsgálatokat egy Bruker Ultrashield 500 Plus típusú készüléken végeztük, referenciaként a DSS jelét alkalmaztuk, a spektrumokat a MestReNova²⁹ nevű programmal értékeltük ki.

A minták 1 mM *trisz*(maltoláto)Ga(III)-t és 0,5 mM HSA-t illetve apoTf-t tartalmaztak, pufferként 20 mM-os HEPES-t használtunk, amely 10 % D_2O -t tartalmazott. Az ionerősséget KCl-dal 0,10 M-ra állítottuk.

5. Eredmények

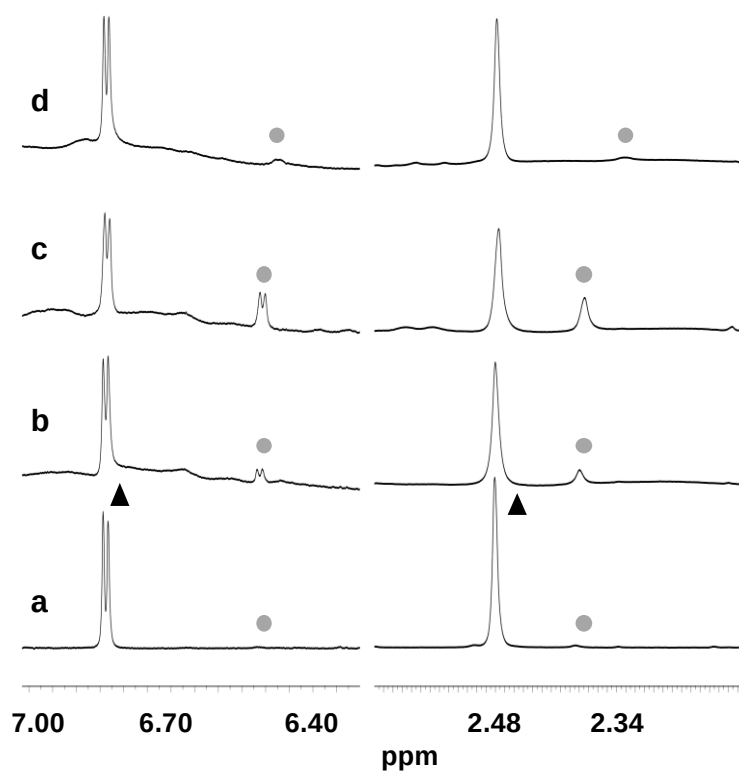
5.1 A komplexek kölcsönhatása HSA-nal

A maltol fiziológias pH-n 92%-ban HL formájában van jelen ($pK = 8,45$), lipofilitása $\lg D_{7,4} = 0,10$.³⁰ Ultraszűrés-UV vizsgálatok alapján már megállapították, hogy a maltol gyengén kötődik a HSA II-es kötőhelyén, $\lg K' = 3,47$.³¹ Kvencseléses (kioltási) vizsgálatok ($\lambda_{EX} = 295 \text{ nm}$) alapján a maltol az I-es kötőhelyen valószínűleg nem kötődik.³¹ A felvett spektrumok alapján a maltol kvencselése elhanyagolható és ugyanez mondható el a *trisz*(maltoláto)Ga(III) komplexről is. (ld. 6. ábra)



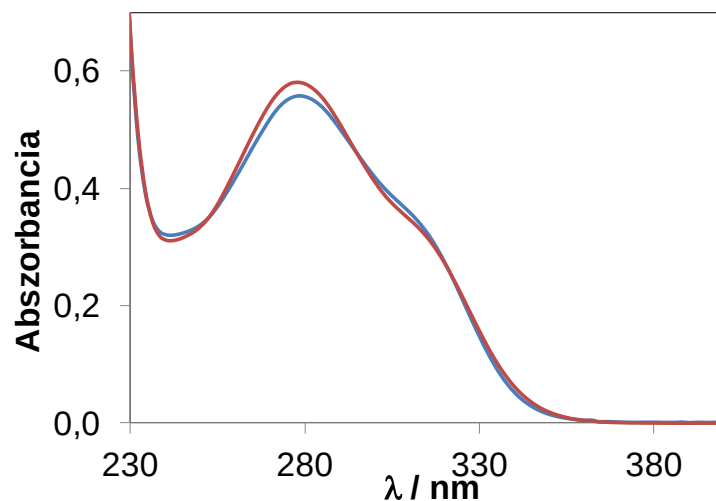
6. ábra: A *trisz*(maltoláto)Ga(III)-HSA (piros jelölő) és a maltol-HSA (kék jelölő) emissziós intenzitásai különböző ligandum-fehérje arány mellett, $\lambda_{EX} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{EM} = 337 \text{ nm}$, ($C_{\text{HSA}} = 1 \mu\text{M}$; $C_{\text{maltol}} = 1\text{-}36 \mu\text{M}$; $C_{\text{komplex}} = 0,5\text{-}40 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 7,4$; $t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,10 \text{ M (KCl)}$)

A komplex és a komplex+HSA ^1H NMR spektrumán a szabad maltol jele valamelyest eltolódott a fehérjét tartalmazó mintában a maltol kötődése miatt (ld. 7. ábra/a és d). A komplex jele viszont nem változott, ami arra utal, hogy a komplex nem kötődik jelentősen a fehérjéhez.



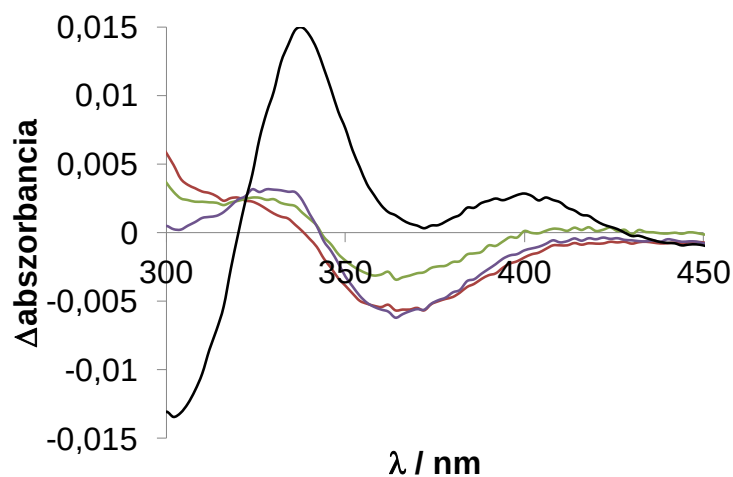
7. ábra: ^1H -NMR spektrumok a *trisz*(maltoláto)Ga(III) komplexre (a) és a *trisz*(maltoláto)Ga(III)-Tf HCO_3^- jelenléte nélkül (b) HCO_3^- jelenlétében (c) ill. *trisz*(maltoláto)Ga(III)-HSA (d) rendszerekre, ▲ : komplexben kötött-, ●: szabad ligandum;
 $c_{\text{komplex}} = 1,00 \text{ mM}$, $c_{\text{apoTf}} = c_{\text{HSA}} = 0,50 \text{ mM}$, 10 % D_2O

Az ultraszűrési vizsgálatok alapján szintén arra a következtetésre jutottunk, hogy nem mérhető jelentős kötődés a *trisz*(maltoláto)Ga(III) komplex és a HSA között; a fehérje jelenlétében is gyakorlatilag ugyanannyi komplex ment át a szűrőn, mint nélküle. A két UV spektrum közötti kis különbség oka, feltehetően a szabad ligandum gyenge megkötődése a fehérjéhez, ami az egyensúly eltolódásához vezet (ld. 8. ábra).



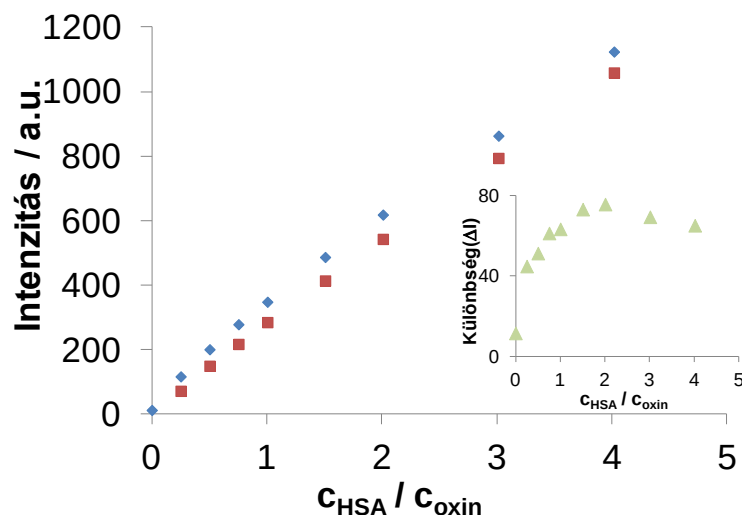
8. ábra: Ultraszűrt minták UV-látható spektrumai (4-szeres hígítás után) piros jelölő: csak *trisz*(maltoláto)Ga(III) komplexet tartalmazó, kék jelölő: komplex+fehérje tartalmú minták (Az eredeti mintákban: $c_{\text{komplex}} = 150 \mu\text{M}$; $c_{\text{HSA}} = 200 \mu\text{M}$; pH = 7,4; $l = 1 \text{ cm}$; $t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 0,10 \text{ M}$ (KCl))

A 8-hidroxi-kinolin (oxin) fiziológiás pH-n szinte 100%-ban HL-formában van jelen ($pK_1=4,99$; $pK_2=9,51$), lipofilitása $\lg D_{7,4}=1,87$.¹³ A rossz oldhatóság miatt nem alkalmazható ultraszűrés, így a HSA-nal való kölcsönhatását fluorimetriás és fotometriás módszerrel vizsgáltuk. (ld. 9. és 10. ábra)



9. ábra: Oxin-HSA rendszer UV-látható különbségspektrumai ($C_{\text{oxin}} = 20\text{-}160 \mu\text{M}$; $C_{\text{HSA}} = 20 \mu\text{M}$; pH = 7,4; $l = 2 \text{ cm}$; $t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$)

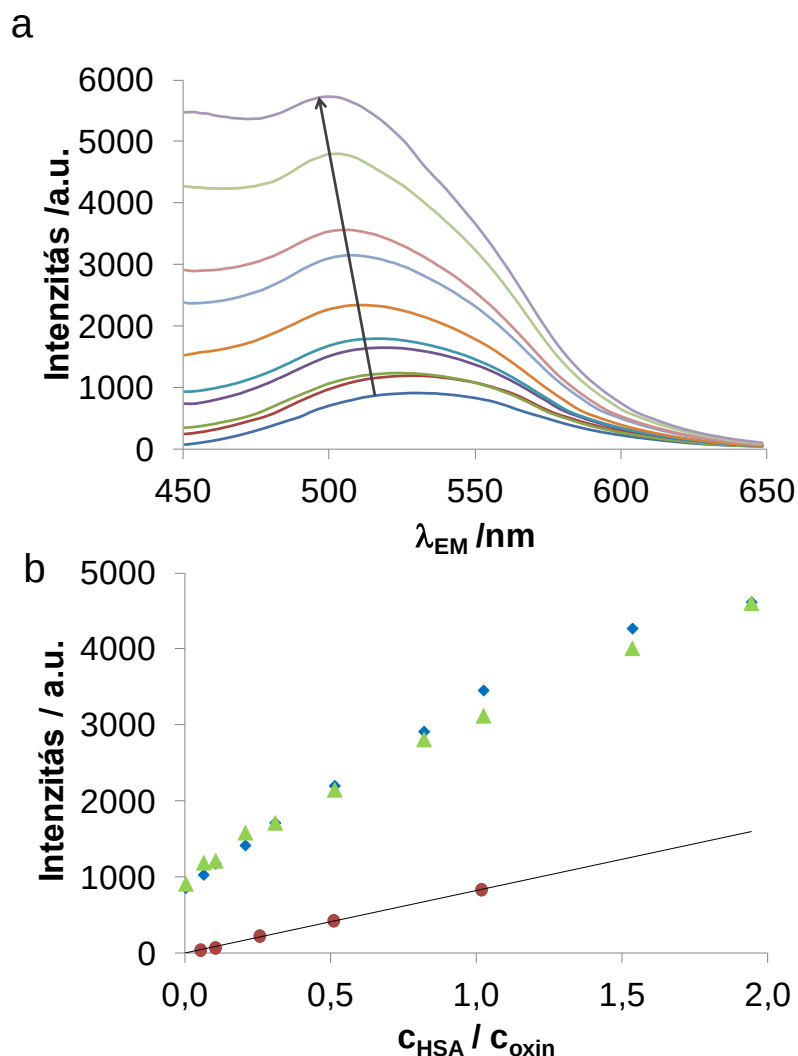
Eredményeink alapján elmondható, hogy nem additív sem a fluorimetriás sem a fotometriás spektruma a fehérjének és a komplexnek, amiből arra következtetünk, hogy valamilyen kölcsönhatás biztosan fellép a fehérje és a ligandum között, ez azonban alig kimérhető, állandó számítására nem volt alkalmas.



10. ábra: A HSA-oxin rendszer fluorimetriás emissziós intenzitásai különböző HSA-oxin arány esetén $\lambda_{\text{EX}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 540 \text{ nm}$, piros jelölő: HSA kalibrálósor; kék jelölő: oxin+HSA ($c_{\text{oxin}} = 20 \text{ } \mu\text{M}$; $c_{\text{HSA}} = 5\text{-}80 \text{ } \mu\text{M}$; $\text{pH} = 7,4$; $t = 25,0^\circ\text{C}$)

295 nm-es gerjesztés esetén a HSA intenzitása nem változott az oxin hozzáadására, tehát ha van kötődés, akkor nem a fehérje I-es kötőhelyén. A II. kötőhelyen való kötődést együttműködés segítségével szeretnénk molekulamechanikai (dokkoló) számításokkal is megerősíteni.

A KP46 komplex és a HSA kölcsönhatását fluorimetriásan vizsgáltuk a komplex gerjesztési maximumán. Itt a fehérje is gyengén emittál, amit figyelembe kell venni. A KP46 komplexhez adtunk egyre több fehérjét a mérés során. A KP46 saját emisszióját látjuk a kiindulási pontban, ami a HSA hozzáadására megnő. Mivel nem a HSA külön kalibrációjából számolt meredekséggel, hanem attól jóval nagyobb mértékben nő meg az intenzitás, ez egyértelműen a komplex és a fehérje kölcsönhatására utal (ld. 11. ábra). Megfigyelhető az is, hogy az emissziós maximum is jelentős mértékben eltolódik. A képződő HSA-KP46 adduktum a méréseink alapján igen jelentős mértékben emittál.



11. ábra: A KP46-HSA rendszer fluorimetriás spektrumai $\lambda_{\text{EX}} = 367 \text{ nm}$ (a), $\lambda_{\text{EM}} = 532 \text{ nm}$ -en ábrázolt pontok, piros jelölő: HSA kalibrálás, kék ill. zöld jelölő: KP46+HSA két külön mérés alapján(b) ($c_{\text{KP46}} = 16 \text{ } \mu\text{M}$; $c_{\text{HSA}} = 3\text{-}95 \text{ } \mu\text{M}$; $\text{pH} = 7,4$; $t = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}$)

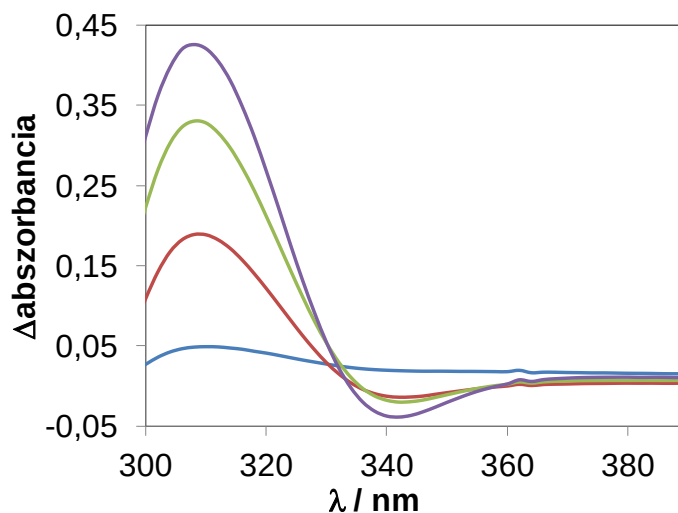
Ezen típusú mérésekből a HSA és a KP46 komplex saját emisszióját is figyelembe véve a PSEQUAD programmal kötési állandót is tudtunk számolni a HSA-KP46 komplex képződésére vonatkozóan. A KP46-HSA kölcsönhatásra $\lg K' = 4,04 \pm 0,08$ látszólagos képződési állandót határoztunk meg.

5.2 A komplexek kölcsönhatása apoTf-nel

Fluorimetriás méréssel 280 nm-es gerjesztésnél meggyőződünk róla, hogy a maltol és az apoTf között nem tapasztalható kölcsönhatás, kioltás (kvencselés) nem történik. A maltol esetén ultraszűrész-UV mérések is egyértelműen mutatták, hogy a maltol nem

kötődik ehhez a fehérjéhez. Az apoTf esetén elsősorban a vaskötőhelyen a Ga(III)-ion megkötődésével kell számolni.

Fotometriás méréseink alapján viszont egyértelműen látszik, hogy a *trisz*(maltoláto)Ga(III) kölcsönhatásba lép az apoTf-nel, a komplex és a fehérje spektruma nem additív (ld. 12. ábra).

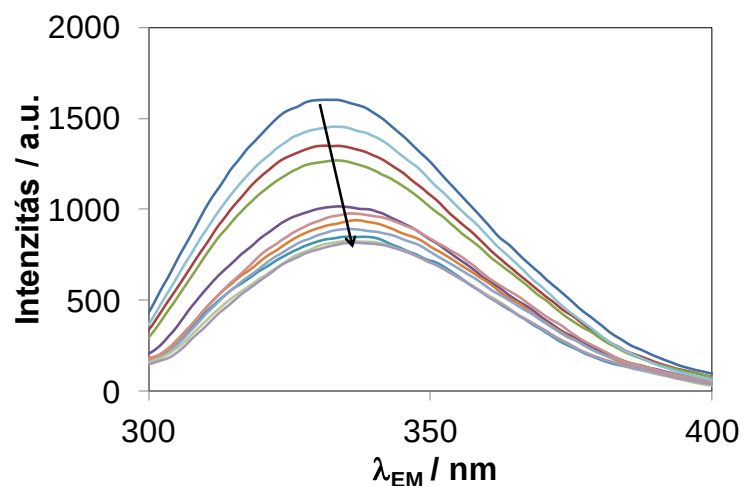


12. ábra: Az apoTf és a *trisz*(maltoláto)Ga(III) fotometriás különbségspektrumai

($C_{\text{apoTf}} = 37 \mu\text{M}$; $c_{\text{komplex}} = 16\text{-}160 \mu\text{M}$; pH = 7,4; $l = 1 \text{ cm}$; $t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$)

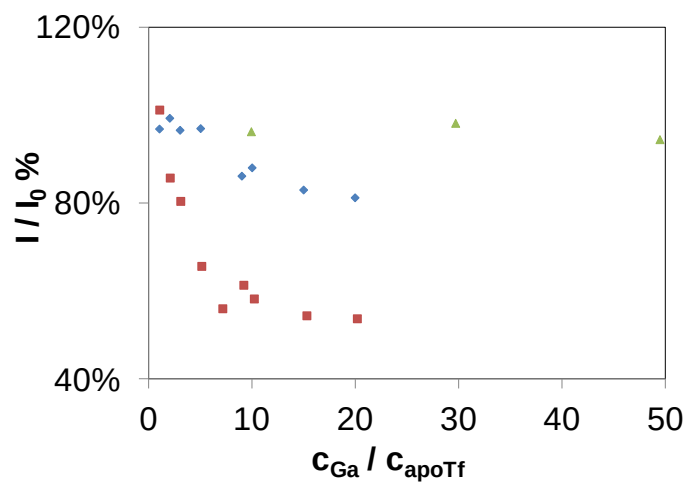
A ^1H NMR spektrumokon (ld. 7. ábra/b és c) jól látszik, hogy apoTf jelenlétében megnő a szabad maltolhoz tartozó jelek intenzitása, azonban nem integrálhatók ki pontosan, mert a Tf-nek is vannak ott jelei, ami erősen megemeli az alapvonalat. Hidrogén-karbonátot is tartalmazó minta esetén a szabad maltol jeleinek intenzitása még nagyobb mértékben nő, tehát a szinergista karbonát nagymértékben segíti a Ga(III) kötődését. Feltételezésünk alapján a *trisz*(maltoláto)Ga(III) esetén asszociatív mechanizmussal kötődik a Ga(III) az apoTf-hez, ami a komplex széteséséhez vezet, ezért nő meg a szabad maltol mennyisége.

Fluorimetriás vizsgálatok során, amikor a 280 nm-es hullámhosszal gerjesztjük a mintát, egyértelmű kvencselés tapasztalható, ami szintén alátámasztja a kölcsönhatás tényét (ld. 13. ábra).



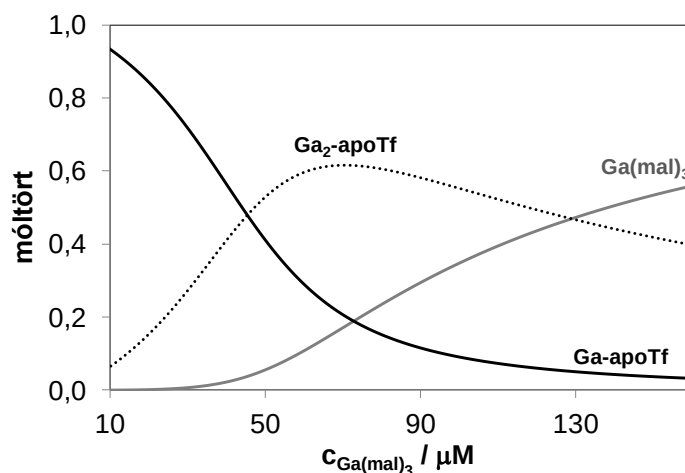
13. ábra: Az apoTf és a *tris*(maltoláto)Ga(III) fluorimetriás spektrumai $\lambda_{\text{EX}} = 280 \text{ nm}$
 $(c_{\text{apoTf}} = 0,2 \text{ } \mu\text{M} ; c_{\text{komplex}} = 0,2\text{-}4 \text{ } \mu\text{M}; \text{pH} = 7,4; t = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C})$

Ha összehasonlítjuk a *tris*(maltoláto)Ga(III) illetve a GaCl_3 kvencselését, akkor megállapíthatjuk, hogy a *tris*(maltoláto)Ga(III) esetében a kvencselés sokkal erősebb, aminek valószínűleg kinetikai okai vannak. Termodinamikai adatok alapján (ld. Ga(III)-apoTf kötési állandóit a 2.2 Fejezetben) a gallát kötődésének meg kellene történnie már 1-2 fémionequiválens hozzáadásakor, mi azonban azt tapasztaltuk, hogy még több 10 ekvivalensnél sem látható számottevő kötődés 4 óra inkubálási időt alkalmazva.



14. ábra: Az apoTf fluoreszcens intenzitásának százalékos változása *tris*(maltoláto)Ga(III) (piros jelölő), KP46 (kék jelölő) ill. GaCl_3 (zöld jelölő) hozzáadásának hatására az apoTf saját intenzitására (I_0) vonatkoztatva, $\lambda_{\text{EX}} = 280, \text{ nm}$ $\lambda_{\text{EM}} = 340 \text{ nm}$ ($c_{\text{apoTf}} = 0,2 \text{ } \mu\text{M}$; $c_{\text{komplex}} = 0,2\text{-}4 \text{ } \mu\text{M}$; illetve $c_{\text{apoTf}} = 2 \text{ } \mu\text{M}$; $c_{\text{GaCl}_3} = 20\text{-}100 \text{ } \mu\text{M}$; $\text{pH} = 7,4; t = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}$)

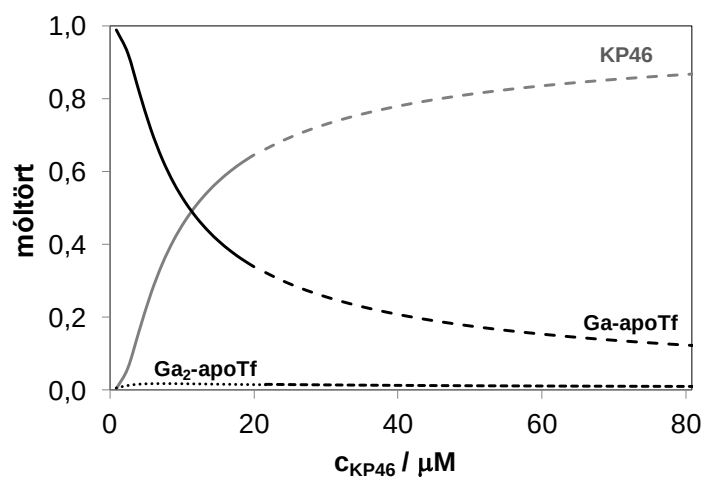
A termodinamikai alapon várt koncentrációeloszlás a 15. ábrán látható a *tris*(maltoláto)Ga(III)-apoTf rendszerre vonatkozóan. A számításoknál a Tf szérumbeli koncentrációját alkalmaztuk ($37\ \mu\text{M}$), a Ga(III)-komplex vizsgált koncentrációtartományát pedig az alapján választottuk, hogy a vérben eddig mért legmagasabb koncentrációja $160\ \mu\text{M}$ volt.²¹ Az eloszlás alapján megállapítható, hogy $\sim 40\ \mu\text{M}$ -os komplexkoncentrációig a Ga(III) számottevő része az apoTf-hez kötődik, és még $160\ \mu\text{M}$ -os koncentrációnál is csak alig több mint a fele marad a maltolhoz kötve.



15. ábra: A *tris*(maltoláto)Ga(III) komplex koncentrációeloszlási görbéi fiziológiás pH-n $37\ \mu\text{M}$ -os apoTf és változó analitikai komplex-koncentrációk mellett

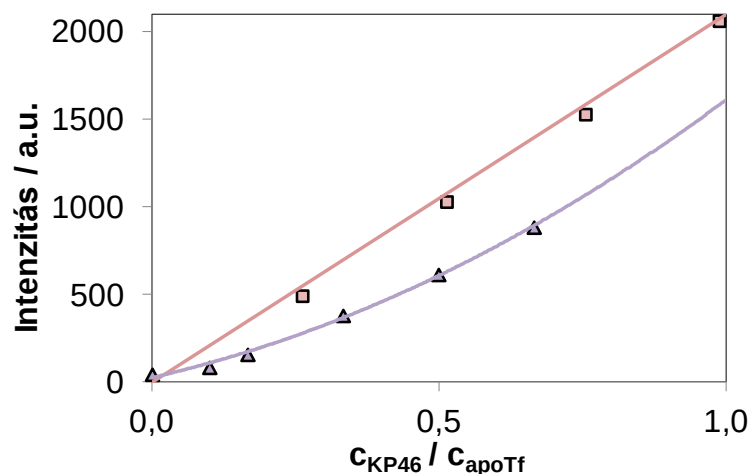
A KP46 komplex stabilitása sokkal nagyobb, mint a *tris*(maltoláto)Ga(III) komplexé,¹³ ezért már a termodinamikai adatok alapján várt speciáció is jelentősen eltér, illetve a rosszabb oldhatóság miatt csak kisebb koncentráció tartományban vizsgálható (ld. 16. ábra). A termodinamikai adatok szerint alig van olyan apoTf, amely két galliumot is kötne, szemben a *tris*(maltoláto)Ga(III) esetén, ahol egyes koncentrációknál gyakorlatilag ez a domináns részecske. Illetve a vérben eddig mért legmagasabb KP46 koncentrációnál $(20\ \mu\text{M})^8$ is csak a gallium mintegy harmada kötődik az apoTf-hez, aminek valószínűsíthető oka a KP46 nagy stabilitása.¹³

A Tyr kvencselés alapján a KP46 kisebb mértékű kölcsönhatást mutat az apoTf-nel a maltoláto-komplexhez és a Ga(III)-hoz (azaz ezen a pH-n a galláthoz) képest (ld. 14. ábra), melynek oka szintén a komplexstabilitások különbségében keresendő. A feltételezett mechanizmus szerint a Ga(III) kötődik a Tf-hez, tehát az eredeti komplexnek disszociálnia kell, ami könnyebben végbemegy a kisebb stabilitású *tris*(maltoláto)Ga(III) esetén.



16. ábra: A KP46 komplex koncentrációeloszlási görbéi fiziológias pH-n 37 μM -os apoTf és változó analitikai komplex-koncentrációk mellett

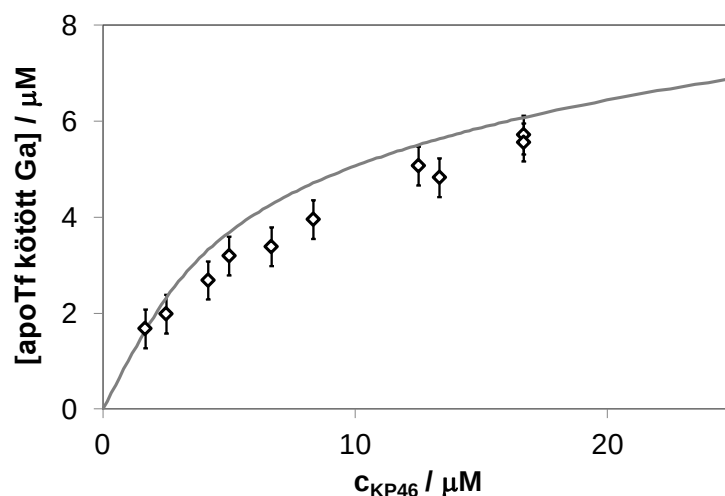
A KP46 komplex gerjesztési maximális hullámhosszán (367 nm) mérve intenzitáscsökkenést tapasztalhatunk apoTf jelenlétében, a KP46 kalibrálása alatti pontokat kapunk (ld. 17. ábra). Az oxin viszont nem mutat jelentős kölcsönhatást az apoTf-nel 280 nm-es gerjesztést alkalmazva, ahogyan azt már korábban is leírtuk.



17. ábra: Az apoTf-KP46 rendszer fluorimetriás emissziós intenzitásai: KP46 kalibrálás (négyzet), apoTf+KP46 (háromszög) $\lambda_{\text{EX}} = 367 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 532 \text{ nm}$
($c_{\text{apoTf}} = 25 \mu\text{M}$; $c_{\text{KP46}} = 2,5\text{-}17 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 7,4$; $t = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$)

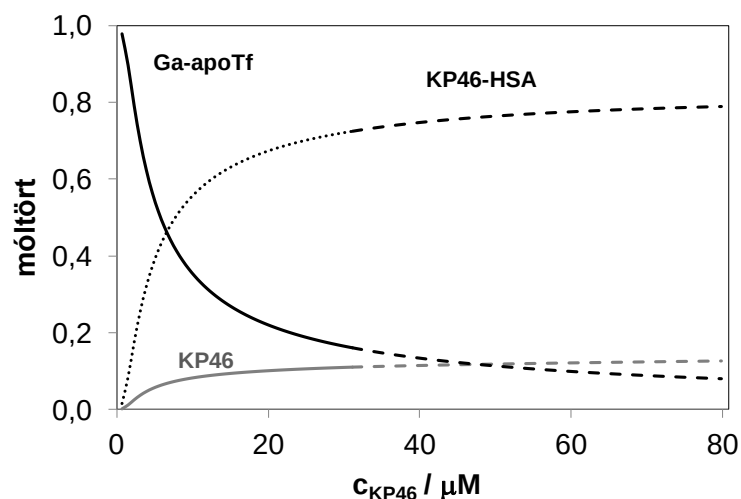
Amennyiben az apoTf megköti a Ga(III)-iont a KP46 komplexből, a nem-kötött ligandumnak az emissziója elhanyagolható ilyen mérési körülmények között. A mért intenzitásból így közvetlenül kiszámítható a változatlan formában megmaradt KP46

komplex koncentrációja (feltételezve, hogy az apoTf-hez maga a fémion kötődik és nem a komplex). A KP46 eredeti és az így kiszámolt koncentrációjából pedig következtetni tudunk a fehérjéhez kötött gallium mennyiségére. A számolás eredményét mutatja a 18. ábra. Ugyanakkor a KP46 komplex stabilitási állandóinak¹³ és a Ga(III)-fehérje kötési állandóinak²⁰ ismeretében a vizsgálati körülményeink mellett is kiszámítható a fehérjéhez kötött Ga(III) mennyisége. Ha összehasonlítjuk a modellszámolással kapott kötött Ga(III) koncentrációkat a fluorimetriás eredményeinkkel, akkor nagyon jó egyezést kapunk (ld. 18. ábra). Mindez jól bizonyítja, hogy a fluorimetriás mérést is jól tudjuk használni modellszámolással kapott speciációk igazolására fluoreszcens komplexek esetén.



18. ábra: Az apoTf-hez kötött Ga(III)-ionok koncentrációja változó KP46 koncentrációk mellett a KP46-apoTf rendszerben a fluorimetriás mérésekből számolt adatok (ld. 16. ábra) alapján ($\diamond$) és a stabilitási állandók segítségével számolva (folyamatos vonal) ($c_{\text{apoTf}} = 25 \mu\text{M}$; $c_{\text{KP46}} = 2,5\text{-}17 \mu\text{M}$; $\text{pH} = 7,4$; $t = 25,0 \text{ } ^\circ\text{C}$)

A korábbiakban már meghatároztuk a KP46-apoTf rendszerben a Ga(III) eloszlását, amit fluorimetriás eredményekkel alá is támasztottunk (ld. 16-18. ábrák), továbbá kiszámítottunk a HSA-KP46 kötési állandóját (ld. 4.1. Fejezet). Ezen ismeretek alapján számoltunk egy koncentrációeloszlást arra az esetre is, amikor az apoTf és a HSA egyaránt jelen van a rendszerben a KP46 komplex mellett, a szérumbeli koncentrációjuknak megfelelően (ld. 19. ábra).



19. ábra: A KP46 komplex koncentrációeloszlási görbéi fiziológias pH-n 37 μM -os apoTf, 630 μM -os HSA és változó analitikai komplex-koncentrációk mellett

A modellszámítás alapján bár a HSA-KP46 kölcsönhatására kapott kötési állandó nem túl nagy ($\lg K' = 4,04$), a HSA nagy szérumkoncentrációja miatt ez a fehérje jelentős mértékben megkötheti a KP46-ot, feltehetőleg a hidrofób zsebében, másodlagos kölcsönhatásokkal. A HSA-hoz kötött komplex reverzibilisen kötődik, vagyis a fehérje csak ideiglenesen tárolja. Tehát ez a közepes erősségű kötődés a hatásmechanizmust valószínűleg nem befolyásolja, a HSA tulajdonképpen meghosszabbítja a komplex vérben való tartózkodási idejét. Ilyen viselkedést tapasztaltak pl. bizonyos Ru(III) komplexek esetében is (KP1019/1339), ahol a HSA szerepe szintén az ideiglenes megkötés/tárolás (reservoir) volt.³² Ugyanakkor az is ismert, hogy a tumoros sejtek fokozott mértékben képesek az albumint felvenni és hosszabb ideig a sejtben tartani, ami HSA akkumulációhoz vezet; ezt a stratégiát számos HSA-hoz kötött gyógyszermolekula fejlesztése is kihasználja,³³ így akár az is elképzelhető, hogy a KP46 egy része a HSA-hoz kötve kerül be a sejtbe.

A *trisz*(maltoláto)Ga(III) esetében viszont nem jelentős a HSA szerepe, mert az apoTf nagymértékben megköti a Ga(III)-ot.

A méréseink is rámutattak arra, hogy a két vizsgált Ga(III)-komplex viselkedése nagymértékben eltér, ez egyrészt az eltérő stabilitásukból adódik, ami a Tf-nel való kompetíciót befolyásolja, másrészt pedig a HSA-hoz való kötődésükben tapasztalt eltérésnek köszönhető.

6. Összefoglalás

A klinikai kipróbálás alatt álló antitumor hatású *trisz*(maltoláto)Ga(III) és a KP46 komplexek kölcsönhatását vizsgáltuk apoTf-nel és HSA-nal elsősorban spektrofotometrián. A vizsgálataink fő célja a kölcsönhatások jellemzése, aminek segítségével megjósolhatjuk a Ga(III)-ion vérérszumbeli eloszlását, ami igen fontos farmakokinetikai jellemző. Különböző technikák kombinálásával bizonyítottuk, hogy a *trisz*(maltoláto)Ga(III) komplex nem, a KP46 viszont jelentős mértékben képes kötödni a HSA-hoz fiziológiás koncentrációviszonyok között. A Ga(III) apoTf-hez való kötődését elsősorban a fémkötő helyen lévő Tyr fluoreszcens intenzitásának csökkenésén keresztül mértük. Másrészt a KP46 fluoreszcens sajátságát kihasználva kvantitatíven mérni is tudtuk a ligandum/Tf cserét a Ga(III) koordinációs szférájában. A kapott eredmények alapján a legfontosabb következtetéseink az alábbiak:

A *trisz*(maltoláto)Ga(III) komplex esetén a Ga(III) legnagyobb része apoTf-hez kötődik, szabad maltol képződése mellett, a fémmion koordinációs szférájában egyszerű ligandumcsere történik. A méréseink alapján HSA-nal nem tapasztaltunk jelentős kölcsönhatást sem a ligandum, sem a komplex esetén, tehát feltételezhető, hogy a vérérszumban is csak az apoTf befolyásolja a Ga(III) eloszlását. A modellszámolásaink is alátámasztják, amit az irodalomban is leírtak már, hogy a maltol mivel gyengébben köti a fémmiont, nem képes megtartani azt az apoTf-nel szemben, így a Ga(III) a Tf-hez kötődik és így szállítódik a vérben. Ez lehetőséget ad arra, hogy a fémmion a Tf-receptorok segítségével kerüljön be a sejtbe. Ezzel szemben a KP46 nagyobb stabilitása miatt kisebb részben kötődhet a Ga(III) az apoTf-hez, másrészt igen jelentős a kötődése a HSA-hoz is. A HSA-hoz feltehetően maga a komplex köt, másodlagos kölcsönhatásokon keresztül, reverzibilisen. Ezek alapján a HSA egyrészt tároló szerepet tölthet be, megnövelve a szervezetben eltöltött időtartamot, másrészt a komplex sejtbe kerülését is segítheti. Ilyen módon a KP46 a Tf-receptorok közvetítésével és anélkül is képes lehet a sejtbe kerülni.

7. Irodalomjegyzék

1. M. Kásler, Az onkológia alapjai, Medicina Kiadó Zrt., Budapest, (2011)
2. B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, Nature, 222 (1969) 385-386.
3. C.X. Zhang, S.J. Lippard, Curr. Opin. Chem. Biol. 7 (2003) 481-489.
4. Gyires Klára, Fürst Zsuzsanna, Farmakológia, Farmakológia és farmakoterápia I., Medicina Könyvkiadó Zrt.: Budapest, (2007).
5. A.V. Rudnev, L.S. Foteeva, C. Kowol, R. Berger, M. A Jakupiec, V.B Arion, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, J. Inorg. Biochem. 100 (2006) 1819-1826.
6. Y. Jung, S.J. Lippard, Chem. Rev. 107 (2007) 1387-1407.
7. M.A. Jakupiec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Dalton Trans. (2008) 183-194.
8. A.R. Timerbaev, Metallomics 1 (2009) 193-198.
9. W. Kandioller, A. Kurzwernhart, M. Hanif, S. M. Meier, H. Henke, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, J. Organomet. Chem. 696 (2011) 999-1010.
10. M. Chua, L. Bernstein, R. Li, S. So, Anticancer Res. 26 (2006) 1739-1743.
11. Bernstein, L. R. Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine, (Eds: Gielen and Tiekink) John Wiley & Sons, Ltd, (2005) pp. 259-277.
12. P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, Critical Reviews in Oncology Hematology 42 (2002) 283-296.
13. É.A. Enyedy, O. Dömötör, E. Varga, T. Kiss, R. Trondl, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, J. Inorg. Biochem. 117 (2012) 189–197.
14. M.A. Jakupiec, B.K. Keppler, Curr. Top. Med. Chem. 4 (2004) 1575–1583.
15. L. R. Bernstein, T. Tanner, C. Godfrey, B. Noll, Metal-Based Drugs 7 (2000) 33-47.
16. <http://home.earthlink.net/~alixapharm/GAMBackground.html>
17. C.F. Baes Jr., R.E. Mesmer, The Hydrolysis of Cations, Wiley, New York (1976)
18. C.D. Quarles Jr., K.M. Randunu, J.L. Brumaghim, R.K. Marcus, Metallomics 3 (2011) 1027-1034.

19. Kiss Tamás, Gajda Tamás, Gyurcsik Béla, Bevezetés a bioszervetlen kémiába, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, (2007).
20. W.R. Harris, V.L. Pecoraro, *Biochem.* 22 (1983) 292-299.
21. L.R. Bernstein, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 665-682.
22. T. Peters, *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, (1996).
23. M. Groessl, A. Bytze, C.G. Hartinger, *Electrophoresis* 30 (2009) 2720-2727.
24. A.A. Hummer, C. Bartel, V.B. Arion, M.A. Jakupiec, W. Meyer-Klaucke, T. Geraki, P.D. Quinn, A. Mijovilovich, B.K. Keppler, A. Rompel, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 5601-5613.
25. Pataki László, Zapp Erika, *Analitikai kémia*, Tankönyvkiadó: Budapest, (1972).
26. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, (1983).
27. L. Zékány, I. Nagypál, in: D.L. Leggett (Ed.), *Computational Methods for the Determination of Stability Constants*, Plenum Press, New York, (1985) 291-353.
28. H. Kurz, in: M.M. Reidenberg, S. Erill (Eds.), *Drug Protein Binding*, Praeger Publishers, New York, pp. 70–92, (1986).
29. <http://www.mestrelab.com>
30. É.A. Enyedy, D. Hollender, T. Kiss, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 1073-1081.
31. É.A. Enyedy, L. Horváth, A. Hetényi, T. Tuccinardi, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, T. Kiss, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 4202-4210.
32. O. Dömötör, C.G. Hartinger, A.K. Bytze, T. Kiss, B.K. Keppler, É.A. Enyedy, *J. Biol. Inorg. Chem.* (2012) in press DOI: 10.1007/s00775-012-0944-6
33. F. Kratz, *Journal of Controlled Release* 132 (2008) 171-183.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Enyedy Éva Anna egyetemi adjunktusnak és dr. Dömötör Orsolya PhD hallgatónak a lelkiismeretes témavezetést, a sok tanácsot és segítséget, amellyel lehetővé tették munkám elkészítését.

Köszönöm Prof. Dr. Kiss Tamás tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette számomra a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéken a tudományos diákköri munkám elkészítését.

Köszönet illeti Szűcsné Tóth Katalin technikust a labormunkám során nyújtott gyakorlati tanácsaiért.