



**EGY NISOD ENZIMMODELL: KOORDINÁCIÓS KÉMIA ÉS
KINETIKA**

TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI DOLGOZAT

Tóth Klaudia

III. évf. Kémia BSc

Témavezető: Dr. Lihi Norbert

**Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék**

**Debrecen
2022**

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK.....	3
2.1 A szuperoxid-dizmutáz enzimek	3
2.2 A nikkel szuperoxid-dizmutáz enzimek.....	5
2.3 A SOD mimetikumok	6
3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK	8
3.1 A felhasznált anyagok és vegyszerek	8
3.2 pH-potenciometria.....	8
3.3 Spektroszkópai módszerek	8
3.4 SOD aktivitás vizsgálati módszerek.....	9
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	12
4.1 A CCNiSOD sav-bázis tulajdonságai	12
4.2 A CCNiSOD komplexképződési reakciói nikkel(II)ionokkal.....	13
4.3 A Ni(II)-komplex oxidációja	17
4.4 A CCNiSOD SOD aktivitásának mérése.....	18
5. ÖSSZEFOGLALÁS	23
6. HIVATKOZÁSOK.....	24

1. BEVEZETÉS

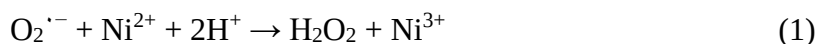
Az aerob élőlények metabolizmusa során reaktív oxigénrészecskék (továbbiakban ROS) képződnek. Ilyen például a szuperoxid gyökkanion ($O_2^{\cdot-}$), mely az oxigén egyelektronos redukciójával képződik. Kis koncentrációját a szuperoxid-dizmutáz enzimek (továbbiakban SOD) szabályozzák. Ezek hiányában a szuperoxid anion koncentráció valamilyen okból történő megemelkedésével fellép az oxidatív stressz állapota, amely során DNS károsodás vagy akár sejthalál is bekövetkezhet.

Valamennyi SOD enzim aktív centruma redoxi aktív fémiont tartalmaz, amelynek az oxidált és redukált formája közötti elektrontranszfer biztosítja a gyökkanion dizmutálódását, mely során a káros szuperoxid gyökkanionból molekuláris oxigén és hidrogén-peroxid képződik. A kétlépéses folyamatot „ping-pong” mechanizmusnak is nevezhetjük, hiszen a SOD enzimek biológiai katalizátorként visszaalakulnak az eredeti oxidációs állapotukba.¹

Ezen metalloenzimek csoportosítása rendszerint a központi fémion alapján történik, így léteznek MnSOD, FeSOD, Cu/ZnSOD, valamint NiSOD enzimek is. A szuperoxid-dizmutáz enzimek három fajtája található meg az emberi szervezetben; *SOD1*, *SOD2* és a *SOD3*. A *SOD1* és *SOD3* Cu/Zn központi fémionokat tartalmaz, míg a *SOD2* enzim mangánt.²

A nikkel-szuperoxid dizmutáz (a továbbiakban NiSOD) a legkésőbb felfedezett SOD enzim, mely aktív centrumában nikkel iont tartalmaz. A NiSOD enzim megtalálható a *Streptomyces* és cianobaktériumok egyes fajai között. Az enzim homohexamer felépítésű és négy hélix alegységből épül fel, amelyekben megtalálható a katalitikusan aktív nikkel ion.³ Az eddig ismert SOD enzimekkel szemben a NiSOD rendhagyó koordinációs környezetet mutat. Az enzim röntgenkristallográfiás vizsgálata azt mutatta, hogy a központi fémiont többek között két cisztein tiolát csoportja koordinálja, amelyről ismert, hogy fiziológiás pH tartományban könnyen oxidálható, emellett a terminális aminos csoport, és az amid nitrogén is részt vesz a koordinációban. Az így létrejövő koordinációs környezet egy hurkot hoz létre az első hat aminosav által, amelyet NiSOD kötő motívumnak is nevezünk.

A dizmutálási reakció mechanizmusa protontranszferrel csatolt elektrontranszfer, amellyel egyidejűleg megváltozik a fémion oxidációs állapota.

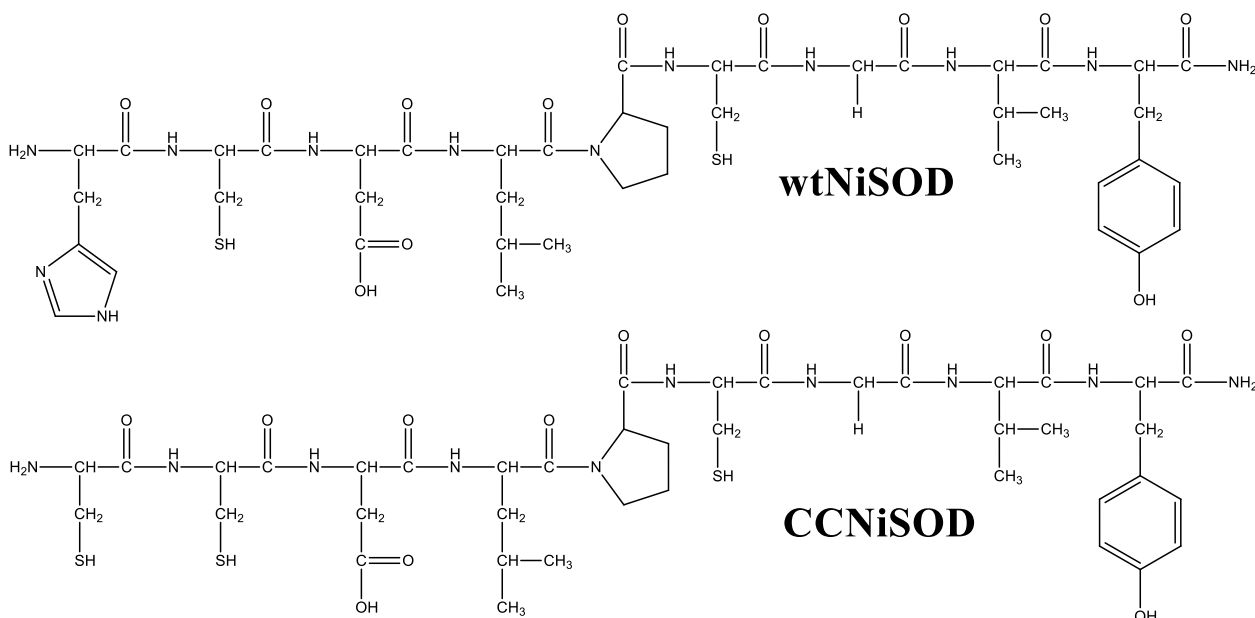


Az oxidáció (1) a koordinációs szféra megváltozásához vezet. A paramágneses tulajdonságú oxidált enzim aktív centruma négyzetes piramis elrendeződésű, amelyben a His1 imidazolil oldallánca axiálisan koordinálódik a nikkel(III)ionhoz. A dizmutálási reakcióban a ciszteinek tiolát csoportjai nem vesznek részt, ez alapján az feltételezhető, hogy az oxidációs reakció fémion központú, nem pedig ligandum alapú. Ezek alapján az említett aminosavaknak feltehetőleg a Ni^{II}/Ni^{III} redoxipotenciál finomhangolásában lehet szerepük.

Az N-terminális hisztidin (továbbiakban His1) kiemelt fontosságúnak bizonyult a dizmutálási reakció során, emellett a már említett axiális koordináció is megvalósul az enzim oxidált állapotában. Ugyanakkor a hisztidin aminosav szerepe további kérdéseket vet fel. A His1, aszparginsavval és alaninnal való pontmutációjával kapott NH₂-DCDLPCG és NH₂-ACDLPCG esetén a katalitikus hatás nem szűnt meg az axiális imidazol koordináció hiányában, de az enzim aktivitás jelentős csökkenést mutatott.⁴ Weston és munkatársai szintén arra a következtetésre jutottak, hogy a His1 nélkülözhető az adott funkció ellátása szempontjából.⁵ Ezen aminosavak ugyanakkor gyengén-, vagy nem koordinálódó oldalláncokat tartalmaznak, erősen koordinálódó aminosavak hatását eddig nem vizsgálták.

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Redoxi Reakciómechanizmusok Kutatócsoportja régóta vizsgálja a NiSOD enzim fragmenseinek egyensúlyi, spektroszkópiai és kinetikai sajátosságait. Ebbe a munkába bekapcsolódva célom az axiális hisztidin szerepének mélyebb megismerése volt egy olyan NiSOD mimetikum segítségével, amely a peptidláncban az ismertett natív enzim (wtNiSOD) szekvenciájával ellentétben a hisztidin helyett ciszteint tartalmaz (1. ábra).

A cisztein mutációt tartalmazó peptid (továbbiakban **CCNiSOD**) komplexképződési reakciót tanulmányoztam nikkell(II)ionokkal, valamint széles pH-tartományban jellemeztem a kialakuló komplexek szerkezetét. Vizsgáltam a fiziológias pH-n képződő komplex oxidációját KO₂ segítségével, valamint a komplex SOD aktivitását *stopped-flow* technika és indirekt SOD-aktivitás mérésekkel is.



1.ábra A natív enzimfragmens (wtNiSOD) és az általam vizsgált enzimfragmens (**CCNiSOD**) szerkezete.⁶

2. IRODALMI ELŐZMÉNYEK

2.1 A szuperoxid-dizmutáz enzimek

Az O_2 első megjelenése a Földön több milliárd évvel ezelőttre tehető vissza. A redukáló hatású ősi atmoszférában a maihoz képest más körülmények uralkodtak; főleg nitrogén volt a meghatározó komponens, ezen kívül megtalálható volt a vulkanikus eredetű vízpára és szén-dioxid is, mely kiegészült a Föld belsejében keletkező metángázzal. Az ózonréteg hiányában a Nap sugárzása teljes mértékben elérte a Föld felszínét és az UV sugárzás hatására bekövetkező vízbontás során, hidrogén és oxigén keletkezett. A keletkezett oxigén reaktív, oxidáló típusú molekula, mely képes reagálni az őslégkört alkotó komponensekkel. Az oxigén felhalmozódásához, a vízbontáson kívül, szükséges volt egy más típusú oxigéntermelő folyamatra is, ami biztosította, hogy több oxigén keletkezzen, mint amennyi elreagál.⁷ Ez az oxigéntermelő folyamat együtt járt egy új életforma kialakulásával, a Földet uraló metángázt szintetizáló baktériumok mellett 2,7 milliárd évvel ezelőtt megjelent egy új típusú, fotoszintetizáló életmódot folytató baktériumtörzs, melyet cianobaktériumoknak nevezünk.⁸

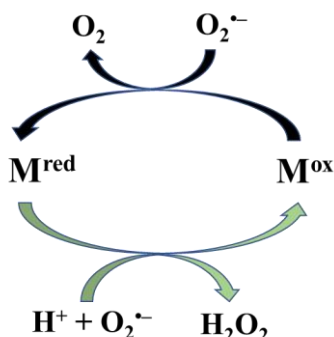
Ezek a mikrobák képesek voltak a Nap energiája által a vizet, és a levegőben megtalálható szén-dioxidot önfenntartásra hasznosítani, oly módon, hogy ezek lebontása során oxigén képződött melléktermékként. A cianobaktériumok elterjedésével párhuzamosan megkezdődött az oxigén felhalmozódása, ami utat nyitott az első komplex életformák megjelenéséhez. Az eltelt évmilliók alatt a felső légkörben ózonréteg keletkezett, mely továbbiakban védte a Földet a káros UV sugaraktól, a földfelszínhez közel pedig oxigén halmozódott fel, ami új evolúciós kaput nyitott a Föld történelmében. A cianobaktériumok fotoszintézise során a fotoszintetikus elektron transzferben generált O_2 mellett, megjelentek egyéb reaktív oxigénszármazékok is (ROS). A szingulett oxigén (1O_2) a vízből keletkezik energia besugárzás hatására a II. fotoszintetizáló egység segítségével. Ha a fénybesugárzás intenzitása megemelkedik, az oxigén mellett gyökös oxigénszármazékok is megjelennek, hiszen ekkor a ferredoxinról egyéb redukálható reakciópartner hiányában az elektron az O_2 -re kerül, ami szuperoxid anionokat eredményez. Ez a folyamat az I. fotoszintetizáló egységben zajlik le és Mehler reakciónak nevezzük.⁹ Ezek a részecskék nagy koncentrációban erősen toxikusak. A cianobaktériumoknak tehát valamilyen módon védekezniük kellett a reaktív oxigénrészecskék ellen, amit többek között az úgynevezett szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzimekkel valósítottak meg.

Az aerob élőlények metabolizmusa során is keletkeznek reaktív oxigénrészecskék, melyek a molekuláris oxigén redukciójának melléktermékei. Ide tartozik a szuperoxid gyökanion ($O_2^{\cdot-}$), a hidrogén-peroxid (H_2O_2), a szingulett oxigén (1O_2), és a hidroxil gyök ($HO^{\cdot}$). A sejtlégzéshez tehát elengedhetetlen a molekuláris oxigén, habár ebben a folyamatban számos ROS képződése játszódik le, melyek lehetnek jelzőmolekulák, toxikus részecskék vagy akár ártalmatlan intermedierek. Nemcsak a biológiai oxidáció során keletkezik szuperoxid gyökanion, hanem a fagocitáló nikotinamid dinukleotid foszfát oxidázból (NADH oxidáz) is, mint az immuniális védekezés eszköze. Az emberi test átlagosan 5 g ROS-t szintetizál egy nap alatt, ez főként szuperoxid gyök és hidrogén-

peroxid, lebontásukért enzimek felelnek. Normális körülmények között a biológiai rendszerek különböző enzimek segítségével kontrollálják a ROS szintet, melyek közül kiemelt jelentőségűnek bizonyultak a szuperoxid-reduktáz (SOR), illetve a szuperoxid-dizmutáz enzimek (SOD). Az előbbi katalizálja a szuperoxid gyökanion egyelektronos redukcióját, mely során hidrogén-peroxid képződik, míg a SOD enzimek a szuperoxid gyökaniont molekuláris oxigénné és hidrogén-peroxiddá bontják.¹⁰ Egyes tanulmányok szerint a ROS felhalmozódásának szerepe lehet a rákos megbetegedések kialakulásában a DNS szerkezetének megváltoztatása, illetve a daganatos folyamatokat visszaszorító gének inaktiválásán keresztül. Ezen felül számos neurodegeneratív megbetegedéssel is kapcsolatba hozható a megemelkedett ROS koncentráció.¹¹

Az aerob élőlények esetén a SOD enzimek felelnek a $O_2^{\cdot-}$ elleni védekezésért, ugyanis ezek a metalloenzimek bontják le őket hidrogén-peroxiddá és molekuláris oxigénné, ezáltal megvédik a sejteket az oxidatív stressztől és a sejthaláltól. A lebontás minden esetben a SOD enzimek központi fémionjainak oxidációs állapotának megváltozásával jár, ezáltal a csoportosításuk is a központi fémion/fémionok alapján történik. Így megkülönböztethetünk MnSOD, FeSOD, Cu/ZnSOD, valamint NiSOD enzimeket. Ezek közül a leggyakrabban fellelhető a Cu/Zn aktív centrumú SOD enzimek, melyek minden eukarióta élőlényben, köztük az emberben is fellelhetőek.⁶ A SOD enzimek három fajtája található meg az emberi szervezetben; *SOD1* a citoplazmában található, a *SOD2* az energiatermelésért felelős mitokondriumban fordul elő, míg a *SOD3* extracelluláris enzim. A *SOD1* és *SOD3* réz és cink központi fémionokat tartalmaz, míg a *SOD2* enzim mangánt.

A szuperoxid gyökanion lebontása az enzim aktív centrumában található központi fémion oxidációs állapotának változásán megy keresztül, mely során a NiSOD esetén a redukált fémionból oxidált fémion keletkezik, miközben hidrogén-peroxid képződik (1). Ezt követően az enzim oxidált formája lép kölcsönhatásba egy további szuperoxid gyökanionnal (2), miközben oxigén keletkezik, a fémion pedig visszaalakul az eredeti oxidációs állapotába. Ez a folyamat egy kétlépéses, úgy nevezett *ping-pong* mechanizmus szerint játszódik le (2. ábra).



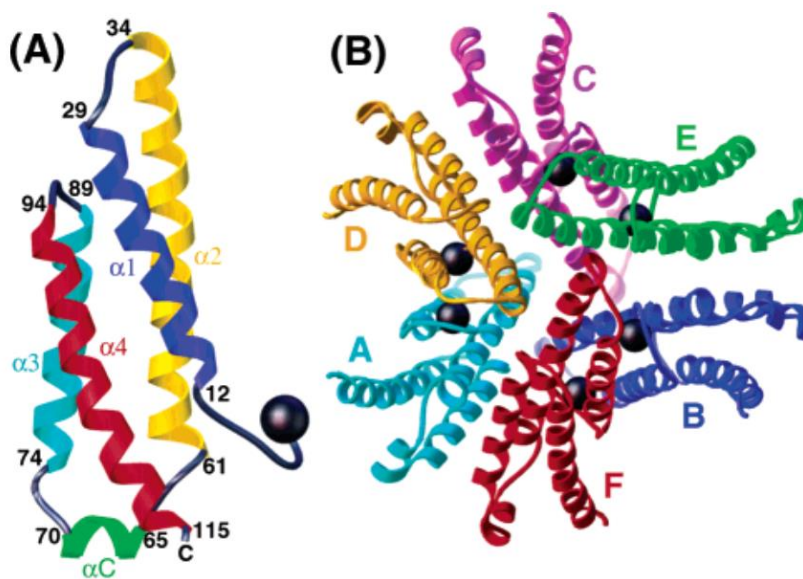
2. ábra A szuperoxid-dizmutáz enzimek *ping-pong* mechanizmusa.

A SOD enzimek hatékony dizmutálásának kulcsa, hogy nem igényelnek további redukáló, közvetítő szubsztrátumot, azaz, nincs szükségük elektron közvetítésre, emellett energia sem szükséges a sejttől, hogy kifejtsék hatásukat.¹²

2.2 A nikkell szuperoxid-dizmutáz enzimek

Az 1996-ban felfedezett nikkell szuperoxid-dizmutáz (NiSOD) aktív centrumában nikkell iont tartalmaz.¹³ Ez a legkésőbb izolált, *sodN* gén által kifejezett enzim megtalálható a *Streptomyces* és cianobaktériumok egyes fajai között. A *Streptomyces seoulensis* baktériumokól izolált NiSOD enzimek kristályszerkezetét 2004-ben határozták meg.² A NiSOD enzim egy viszonylag kis méretű, 117 aminosavból álló protein. Az enzim homohexamer felépítésű és a négy hélix alegység mindegyikében megtalálható a katalitikusan aktív nikkell ion (3. ábra). Az alegységek párhuzamosan párokba rendeződnek, így *R2/R3* és *R1/R4* párokat alkotnak, az *R2* és *R3* között egy rövid összekötő hélix is van. A hélixeket összekötő kanyarokat hidrogén kötések stabilizálják.¹³

A NiSOD enzim rendhagyó koordinációs környezetet mutat. A redukált, azaz Ni(II)-t tartalmazó oxidációs állapotban a fémion az enzim aminoterminális részéhez koordinálódik, a terminális aminos csoport, az amid nitrogén és a két cisztein tiolát csoportjain keresztül.

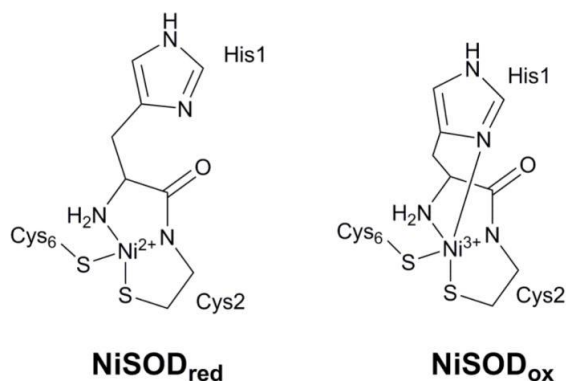


3.ábra A NiSOD alegységei és a homohexamer struktúra (A), illetve a NiSOD alegységek nikkell kötő hurokkal (B).¹³

Az így létrejövő koordinációs mintázat egy hurkot hoz létre az első hat aminosav által (HisCysAspLeuProCys), amelyet NiSOD kötő motívumnak is nevezünk. A natív enzimet alkotó N-terminális peptidrészlet szerkezete az 1. ábrán látható.

A redukált formában a fémion síknégyszetes geometriájú. A dizmutálási reakció protontranszferrel csatolt elektrontranszfer mechanizmusú, amellyel párhuzamosan megváltozik a

fémion oxidációs állapota. Az oxidált formában a nikkell +3-as oxidációs állapotú. Az oxidáció a koordinációs szféra megváltozásához is vezet; a paramágneses tulajdonságú oxidált enzim aktív centruma négyzetes piramis szerkezetű, melyben a His1 imidazolil oldallánca axiálisan koordinálódik a nikkell(III)ionhoz (4. ábra). A NiSOD esetén a dizmutálási reakció sebessége kb. negyede a CuZnSOD enzim esetén mértékhez képest, de a reakció így is rendkívül effektív és közelíti a diffúziókontroll határát.¹²



4. ábra A natív NiSOD enzimfragmens oxidált és redukált formáinak koordinációs módjai.⁴

2.3 A SOD mimetikumok

A SOD enzimek ígéretesnek bizonyulnak számos betegség kezelésében. Előklinikai és klinikai vizsgálatok zajlanak ezen enzimek védő szerepéről és egyéb jótékony hatású sajátságainak felhasználásáról. A natív enzimek esetén azonban problémát jelent ezek mérete, hiszen számos specifikus felhasználást akadályoz meg az, hogy nem képesek átdiffundálni a véráramból bizonyos sejtekbe és képtelenek átlépni a vér-agy gáton. Ezáltal a szuperoxid anion dizmutálódása kizárólag az extracelluláris térre és organelumokra limitálódik. Ez megakadályozza azt, hogy az idegrendszerrel kapcsolatos megbetegedések (pl. Parkinson kór) esetén farmakológiai vizsgálatokat végezhessünk, hiszen a vér-agy gát egy erősen szelektív membrán, mely passzív diffúzió által csak bizonyos kis molekulákat enged átjutni a véráramból a központi idegrendszer extracelluláris állományában. A természetes enzimek a korlátozott sejtmembrán transzport mellett rövidebb élettartammal rendelkeznek, és antigenetikus tulajdonságokkal bírnak, azaz az antitestek által specifikusan felismerhetők. Ezeket a korlátokat hivatottak átlépni a mesterségesen szintetizált, kis molekulatömegű SOD mimetikumok, melyek a natív enzimek különböző módusulatai.¹² A mimetikumokkal szembeni elvárások közül a legfontosabb, hogy őrizzék meg a katalitikus aktivitását a szuperoxid anionra nézve, legyenek stabilisak fiziológiai körülmények között és szintézisük legyen gazdaságos.

A NiSOD enzimek mélyebb megértése érdekében is kiemelt fontosságúak a mimetikumok vizsgálata, ezek összevetése a natív enzimmel, hiszen ezen információkon keresztül közelebb kerülhetünk a szuperoxid gyökanion bontásának pontos mechanizmusához, illetve az enzim kiemelkedő katalitikus aktivitásának kulcsához.

A NiSOD enzimmetikumok esetén, a dizmutálási reakcióban szerepet játszó N-terminális hisztidin aminosav szerepének vizsgálata kiemelkedően fontosságú, hiszen a dizmutálási reakcióban való részvétele mellett még axiálisan is koordinálódik a képződő nikkell(III)ionhoz. Ennek a láncvégi hisztidinek a szerepét igyekeztünk más aminosavra történő pontmutáció által megvizsgálni. Az így létrejövő mimetikumok koordinációs kémiai és kinetikai vizsgálata által kapott eredményeket, a natív enzimmel összevetve, értékes információt nyerhetünk.

Shearer és munkatársai a peptid N-terminális végén pontmutációval rendre alaninra (NH₂-ACDLPCG) és aszparginsavra (NH₂-DCDLPCG) cserélte a His1 aminosavat.⁴ A kapott eredményeket minden esetben összevetették a natív enzimre kapott eredményekkel. A SOD mimetikumok esetén a vártól eltérően, a terminális hisztidin hiányában nem szűnt meg az enzim katalitikus aktivitása, tehát a terminális hisztidin axiális imidazol koordinációja nem létfontosságú a dizmutálási reakció szempontjából. Ugyanakkor ezen mimetikumok enzim aktivitása jelentős csökkenés mutatott. A Ni(II) oxidációját követően a His1 imidazol elfoglalja az axiális pozíciót és ezt követően az egész katalitikus ciklus során kötött állapotban van.⁴ Buntkowsky és munkatársai alátámasztották ezen eredményeket, és számos modell rendszer vizsgálatával megállapították azokat a kulcs tényezőket, amelyek felelősek a NiSOD mimetikumok stabilitásáért, illetve katalitikus aktivitásáért.¹⁴

A Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszékének Redoxi Reakciómechanizmusok Kutatócsoportja évek óta foglalkozik NiSOD modellek vizsgálatával, melyek során létrehoztak egy kiemelkedő enzimaktivitású binukleáris nikkell-komplext, amelyben két, a natív enzim nikkellkötő hurkát alkotó aminosavszekvenciát a lizin aminosav amino csoportjainak segítségével kapcsoltak össze. A komplexképződési folyamatokat pH-függő CD spektroszkópia segítségével követték, illetve pH-potenciometriás és UV/látható spektroszkópiás mérésekkel alátámasztották, hogy fiziológiás pH-n egy Ni₂L összetételű komplex képződött. A két Ni(II)ion koordinációs szférája a natív enzimmel megegyező, két (NH₂, N⁻, S⁻, S⁻) donor egységet tartalmaz, síknégyszetes elrendeződésben. Ezen komplex SOD aktivitását vizsgálták szekvenciális *stopped-flow* módszer segítségével. A binukleáris enzimmodell aktivitása kiemelkedőnek bizonyult, a szuperoxid gyökanion mennyisége 15 ms alatt negyedére csökkent, habár a modellvegyület a natív enzimmel szemben gyors bomlást szenved, mely felveti a további kérdést, hogy a natív enzim esetén miért nem következik be ez a folyamat.¹⁵

3. KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEK, VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

3.1 A felhasznált anyagok és vegyszerek

Az általam vizsgált NiSOD modell, CysCysAspLeuProCysGlyValTyr-NH₂ (CCDLPCGVY-NH₂) aminosav szekvenciájú peptidet a SynPeptide Co. (Kína, Shanghai) szintetizálta, amely 95%-os tisztaságú, és további tisztítás nélkül került felhasználásra. A vizsgálatok során használt Ni(II) törzsoldatot szilárd NiCl₂ (99,5% tisztaságú, VWR Int. (USA)) vízben való oldásával nyertük, koncentrációját EDTA mérőoldattal komplexometriás titrálással határoztuk meg. A SOD aktivitás méréshez használt 18-korona-6 makrociklusos poliétert és a KO₂-t az Acros Organics gyártotta, míg a felhasznált dimetil-szulfoxidot (DMSO) a Molar Chemicals. A xantint, xantin-oxidázt és NBT-t Sigma Aldrich-től szereztük be.

3.2 pH-potenciometria

A ligandum törzsoldat pontos koncentrációjának meghatározása, valamint sav-bázis folyamatainak megismerése, így a savi disszociációs állandók meghatározása és a fémkomplexek stabilitási állandóinak meghatározása pH-potenciometria segítségével történt. A titrálás során alkalmazott MOLSPIN automata titrátort számítógép vezérelte, a pH mérése pedig Metrohm kombinált üvegelektrod (6.0234.110) segítségével történt. A pH-metriás titrálások vizes közegben történtek. A titrálásokat állandó hőmérsékleten ($25,0 \pm 0,1$ °C) és állandó ionerősség ($I = 0,2$ M (KCl)) mellett végeztük. Az ionerősség beállítására minden esetben analitikai tisztaságú KCl-ot használtunk. A CO₂ és molekuláris oxigén távoltartására oldatainkba vagy azok fölé inert gázt, nagy tisztaságú argont buborékolattunk. A mérőoldat kálium-hidroxid pontos koncentrációjú vizes oldata volt. A mérőoldat koncentrációját pontos beméréssel készített kálium-hidrogénftalát oldat titrálásával határoztuk meg. A ligandum 4,00 ml térfogatú oldatát titráltuk karbonátmentes kálium-hidroxid oldattal, míg a **CCNiSOD** komplexképződési sajátságainak vizsgálata nikkell(II)ionok jelenlétében 5%-os ligandumfelesleggel történt az előbb ismertetett körülmények között. Ezen kis mennyiségű ligandumfelesleg biztosítja, hogy a nikkell(II)ionok teljes mennyisége komplexált formában legyen, megakadályozva annak hidrolízisét. Ilyen körülmények között az elektród által mért pH értéket az Irving-féle módszerrel feleltettük meg egyensúlyi hidrogénion koncentrációnak, a vízionszorzat értéke pedig $K_w = 13,774 \pm 0,001$ -nek adódott. A savi disszociációs állandók és a fémkomplexek stabilitási állandóinak számítása a PSEQUAD¹⁶ program segítségével történt.

3.3 Spektroszkópiai módszerek

A **CCNiSOD** peptid és nikkell(II)iont 1:1 arányban tartalmazó rendszer vizes oldatban képződő komplexeinek koordinációs módjait Agilent Carry 60 (Agilent Technologies) UV-Vis fotométerrel igazoltuk. A pH-metriás titrálások minden pontjában elnyelési spektrumokat vettünk fel

300-800 nm hullámhossz-tartományban, melyhez 1 cm és 2 mm úthosszúságú kvarcküvetákat használtunk a koncentrációtól és a vizsgált hullámhossz-tartománytól függően.

A komplexképződés követése a pH változásának függvényében JASCO F810 CD spektropolariméter segítségével is megtörtént. A spektrumokat 1 mm-es vagy 1 cm-es kvarcküvetában, 200–800 nm hullámhossz tartományban rögzítettük vizes közegben, 298 K hőmérsékleten, 1,0 mM ligandumkoncentráció mellett.

Az X-sávú CW-ESR spektrumok rögzítése Bruker EleXsys E500 spektrométer segítségével történt Dr. May Nóra V. (ELKH-TTK, Budapest) segítségével. A spektrumok rögzítésekor az alábbi akvizíciós paramétereket alkalmaztuk: mikrohullám frekvenciája: 9,4 GHz, mikrohullám erőssége: 13 mW, amplitúdómoduláció: 5 G, frekvenciamoduláció: 100 kHz. A minták spektrumait 77 K-en, folyékony nitrogén alkalmazása mellett rögzítettük. A mintaelőkészítés során 0,2 mL térfogatú pH 7,6-on kialakult Ni(II):CCNiSOD komplexhez 0,05 mL KO₂/DMSO oldatát adtuk, amellyel *in situ* oxidáltuk a komplexet.

3.4 SOD aktivitás vizsgálati módszerek

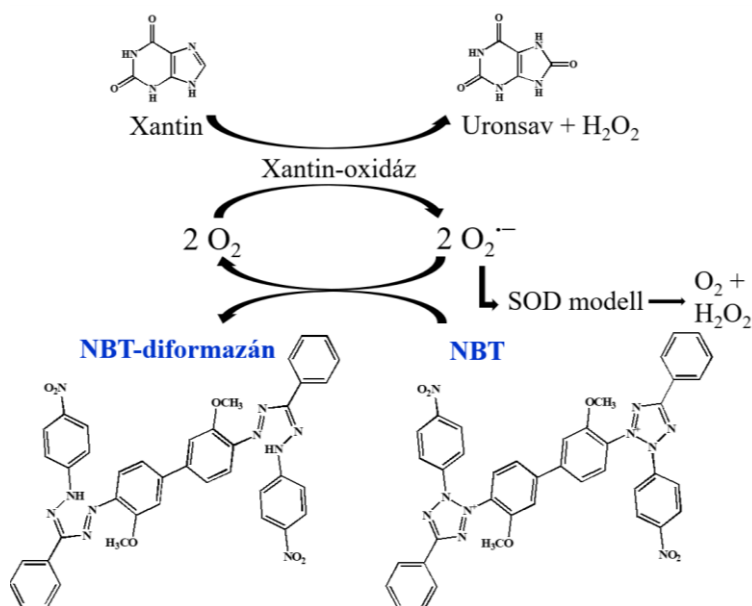
A szuperoxid gyökanion diszproporcionálódási folyamatai megnehezítik a szuperoxid törzsoldat készítését és eltartását, ezáltal a SOD aktivitás vizsgálatok komplex feladatmegoldást igényelnek. A fiziológias pH-n kialakult komplex SOD aktivitását indirekt (xantin/xantin-oxidáz/NBT) és direkt módszerekkel (*stopped-flow*) is vizsgáltuk.

A Ni(II):CCNiSOD SOD aktivitását klasszikus fotometriás módszerrel, az indirekt xantin/xantin-oxidáz/NBT módszer segítségével határoztuk meg, Agilent Technologies 8453 spektrofotométer segítségével. Ezen módszer a McCord-Fridovich indirekt tesztreakció, melynek segítségével *in situ* generálhatunk szuperoxid gyökanionokat.¹⁷ A szuperoxid-gyököt a xantin/xantin-oxidáz reakció segítségével állítjuk elő. A xantin-oxidáz (továbbiakban XO) egy enzim, mely a xantin átalakulását katalizálja uronsavvá, az átalakulást reaktív oxigénrészecskék képződése kíséri. Tehát az XO enzimek működése során reaktív oxigén részecskék szabadulnak fel. A keletkező gyökanion koncentrációját valamilyen festékmolekulával detektálhatjuk. A nitrokék-tetrazólium-klorid (NBT) két tetrazolcsoportból álló szintelen oxidálószer, melyet orvosdiagnosztikai vizsgálatokhoz is felhasználnak. A szuperoxid anion jelenlétében redukálódik, miközben kék színű diformazán képződik (5. ábra). A képződő diformazán 560 nm-en karakterisztikus elnyelést mutat.

Valamilyen SOD aktivitással bíró komplex esetében, azzal a feltételezéssel élve, hogy a komplex gyorsabban reagál a szuperoxiddal, mint az NBT-vel, kinetikai diszkriminációt eredményezve a diformazán képződése gátoltta válik és adott komplex koncentrációknál az inhibíció mértéke meghatározható. A McCord-Fridovich módszer vázlatos összefoglalását az 5. ábra mutatja be.

A módszer ezáltal alkalmas SOD mimetikumok aktivitásának mérésére, amennyiben ezek nem inhibíálják a xantin-oxidáz enzim működését. Erről úgy győződhetünk meg, hogy vizsgáljuk az uronsav képződését a mimetikum hiányában és jelenlétében. Értelmszerűen feltétel, hogy a mimetikum ne reagáljon a festékmolekulával, illetve a képződő hidrogén-peroxiddal, továbbá a komplex ne disszociálódjon az adott körülmények között, amit előzőleges egyensúlyi vizsgálatokkal tisztázhatunk.¹⁰

Az NBT redukcióját változó koncentrációjú **CCNiSOD** komplex jelenlétében, illetve annak távollétében is vizsgáltuk. Vizsgálataink során a szuperoxid gyökkanion generálás négy percig tartott, ekkor helyeztük a reakcióelegybe az általunk vizsgált Ni(II):**CCNiSOD** komplexet. Az NBT redukcióját diformazánná további négy percig követtük, 560 nm-en.



5. ábra A McCord-Fridovich féle indirekt xantin/xantin-oxidáz/NBT módszer sematikus vázlata.¹⁰

A SOD-aktivitást a xantin/xantin-oxidáz/NBT indirekt módszer alkalmazása során az *IC*₅₀ értékkel jellemezzük. Ez azt a komplex koncentrációt jelenti, ahol a diformazán képződése a komplex távollétében mért értékhez képest a felére csökken, azaz az 50%-os inhibícióhoz tartozó koncentráció értékét adja meg. Egy állandó pH-n és hőmérsékleten elvégzett mérőssorozat esetén a komplex betáplálása előtti és utáni meredekség hányadosa megadja az inhibíció százalékos értékét.

A kapott inhibíció adatokat a komplexek koncentrációjának függvényébe ábrázoljuk, majd ORIGIN PRO9 program segítségével illesztjük. A kapott hiperbolából az *IC*₅₀ érték kiszámítható, ez az érték minél kisebb, annál nagyobb az adott mimetikum aktivitása. A meghatározott *IC*₅₀ érték jó közelítést ad a SOD mimetikumok aktivitásáról, habár a számított érték erősen függ az indikátorként használt festékmolekula minőségétől és koncentrációjától. Ez megnehezíti az eredmények összehasonlítását más eredményekkel. Ez a probléma kiküszöbölhető azzal, ha kiszámítjuk a dizmutálási reakcióra jellemző sebességi együtthatót (*k*_{cat}), hiszen ez az érték nem függ a festékmolekulától.¹⁰

A SOD aktivitás méréseket direkt módszerrel, Applied Photophysics SX-20 készüléken, szekvenciális *stopped-flow* módszerrel végeztük el. A szekvenciális *stopped-flow* módszer segítségével közvetlenül követhetjük a szuperoxid törzsoldat és egy SOD mimetikum keveredésekor fellépő abszorbanciaváltozást.

A szuperoxid aniont frissen készített KO_2 törzsoldatból nyertük, melyet dimetil-szulfoxid (DMSO) oldószerrel készítettük, melyhez 18-korona-6-étert adtunk, ami a káliumion komplexálásán keresztül növeli a szuperoxid anion koncentrációját. Az elegyet egy órán keresztül kevertettük. Az ekképpen készített KO_2 törzsoldat stabilan eltartható a vizsgálatok időtartalma alatt. Ezen törzsoldat pontos koncentrációjának meghatározása is *stopped-flow* módszerrel történt, a kiértékelés során az irodalmi moláris abszorbancia értékeket használtuk ($\epsilon_{260\text{ nm}} = 2686\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)¹⁸. A szuperoxid anion abszorbancia maximuma 245 nm-hez tehető, de ezen a hullámhosszon jelentős elnyelése van a használt DMSO-nak, ezáltal a dizmutálási reakciót 260 nm-en követtük, ahol a DMSO zavaró hatása elhanyagolható. A ligandum és nikkel(II)-komplexének moláris abszorbanciáit is meghatároztuk 260 nm hullámhosszon. A *stopped-flow* készülék szekvenciális módjában (dupla keverés) négy ágon zajlik a mérés. Az „A” fecskendőbe került az előbb leírt módon készült és ismert koncentrációjú szuperoxid törzsoldat, míg a „B” fecskendőben vizes pufferoldat van (pH 7,6; CHEPES = 50 mM). A két fecskendő oldata a keverési cellába jut, ahol 40 s-os inkubációs idő után keveredik a vizsgált komplexszel („C” fecskendő), amelyet az abszorbancia detektálása követ $l = 2\text{ mm}$ úthosszúságú küvettában. A 40 s-os várakozási időt kutatócsoportunk korábbi vizsgálatok alapján határozta meg, ugyanis ennyi idő szükséges ahhoz, hogy a két különböző viszkozitású oldószer (víz és DMSO) elegyedése megtörténjen, és ne okozzon spektrális zavaró hatást.

A módszer lehetőség ad a katalitikus sebességi állandó (k_{cat}) direkt meghatározásához adott körülmények között. Ezen SOD aktivitás vizsgálatokban az abszorbanciát közvetlenül illesztettük a Scientist program segítségével.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 A CCNiSOD sav-bázis tulajdonságai

Munkánk első részében a **CCNiSOD** ligandum sav-bázis egyensúlyát tanulmányoztuk pH-potenciometria segítségével. A ligandum savi disszociációs állandóit az 1. táblázat tartalmazza. A ligandum szerkezetének megfelelően hat deprotonálódásra képes csoport van, amelyek közül a legkisebb disszociációs állandója az aszparginsav karboxilát csoportjának van. A pH növelésével megtörténik a terminális aminocsoport és a három cisztein tiol csoportjának deprotonálódása is, amelyek ugyanakkor jelentős átfedést mutatnak. Ezáltal az egyes deprotonálódási folyamatok megfelelő csoportokhoz való hozzárendelése csak a mikroállandók meghatározásával lenne lehetséges. Ugyanakkor irodalmi előzmények alapján feltételezhető, hogy ezen négy disszociációs folyamat közül a legkisebb pK érték a terminális aminocsoport deprotonálódásához köthető, amelyet az N-terminális cisztein deprotonálódása követ.^{19,20} Ezen deprotonálódási lépéseket követően $pH \sim 10$ körül a tirozin fenolos hidroxilcsoportjának deprotonálódása játszódik le. Ezeket a folyamatokat összevetve a natív enzimfragmens sav-bázis tulajdonságaival, az összbázicitás növekedését tapasztaljuk, amely egyértelműen a hisztidin cisztein aminosavra történő cseréjének, ezáltal a bázicitás növekedésének tudható be.

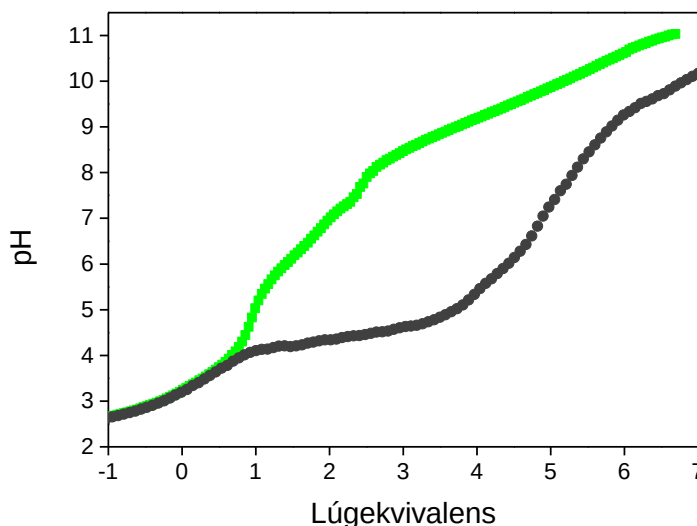
1.táblázat A ligandum savi disszociációs állandói ($\log K$). ^(a)

$\log K$	CCNiSOD	wtNiSOD ²¹
Részecske		
HL	$10,25 \pm 0,04$	9,88
H ₂ L	$9,36 \pm 0,04$	8,92
H ₃ L	$8,98 \pm 0,07$	8,25
H ₄ L	$7,86 \pm 0,07$	7,20
H ₅ L	$6,10 \pm 0,09$	5,48
H ₆ L	$3,5 \pm 0,1$	3,58
$\Sigma \log K$	46,05	45,74

(a) $I = 0,2 \text{ M (KCl)}$, $T = 298 \text{ K}$.

4.2 A CCNiSOD komplexképződési reakciói nikkel(II)ionokkal

A savi disszociációs állandók ismeretében vizsgáltuk a **CCNiSOD** peptid és nikkel(II)iont 1:1 arányban tartalmazó rendszer komplexképződési folyamatait. A pH-potenciometriából kapott titrálási görbéket a 6. ábra mutatja be.



6.ábra A **CCNiSOD** (zöld) és a **Ni(II):CCNiSOD** 1:1 arányú rendszer (fekete) pH-potenciometriás titrálási görbéi. $T = 298\text{ K}$, $I = 0,2\text{ M}$ (KCl). A negatív lúgekivalens értéket a mintában lévő extra sav eredményezi.

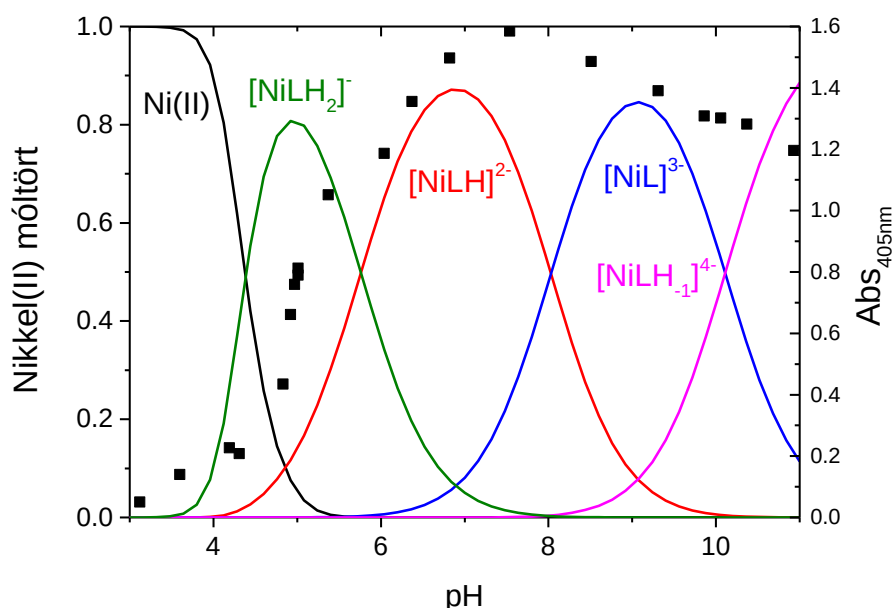
Ez alapján látható, hogy a komplexképződés $\text{pH} > 4$ felett indul, ahol a szabad ligandum titrálási görbéje elválík a fémes rendszert tartalmazó titrálási görbétől. Ezen túlmenően egy további lúgfogyasztó folyamatot is lehet detektálni, amely egyaránt lehet a fémion hidrolízise vagy egy olyan folyamat, amely csak a fémion jelenlétében játszódik le. Korábbi irodalmi előzmények, illetve a spektroszkópai adatok alapján ez a folyamat a peptidváz amidnitrogénjének fémion indukált deprotonálódásához és koordinációjához köthető.

A titrálási görbe illesztése során négy részecske képződését feltételeztük, amellyel a teljes vizsgált pH tartomány leírhatóvá vált. Az így nyert stabilitási állandókat az 2. táblázat tartalmazza, az egyes részecskék képződését a pH függvényében pedig a 7. ábra mutatja be. A képződő komplexek feltételezett szerkezeteit a 8.ábra mutatja be.

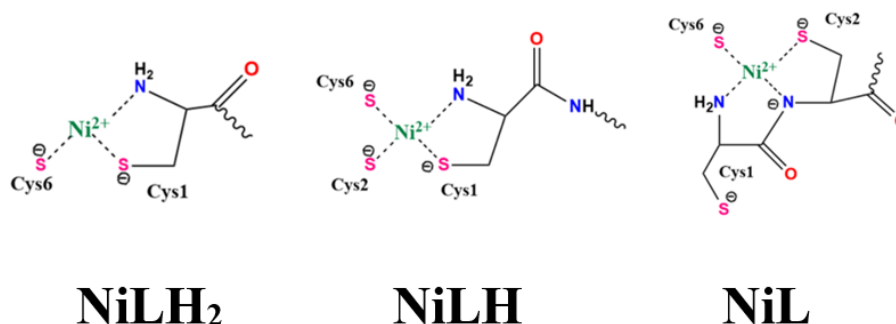
2.táblázat A **Ni(II):CCNiSOD** rendszerben képződő komplexek stabilitási állandói, kiegészítve a natív enzimfragmens nikkel(II)-komplexeinek stabilitási állandóival ($\log\beta$).^(a)

Részecske	CCNiSOD	Részecske	wtNiSOD ²¹
NiLH ₂	$32,39 \pm 0,03$	NiLH ₃	$33,44 \pm 0,03$
NiLH	$26,63 \pm 0,07$	NiLH	$22,22 \pm 0,07$
NiL	$18,60 \pm 0,1$	NiL	$15,71 \pm 0,1$
NiLH ₋₁	$8,85 \pm 0,1$	NiLH ₋₁	$6,45 \pm 0,1$

(a) $I = 0,2\text{ M}$ (KCl), $T = 298\text{ K}$.

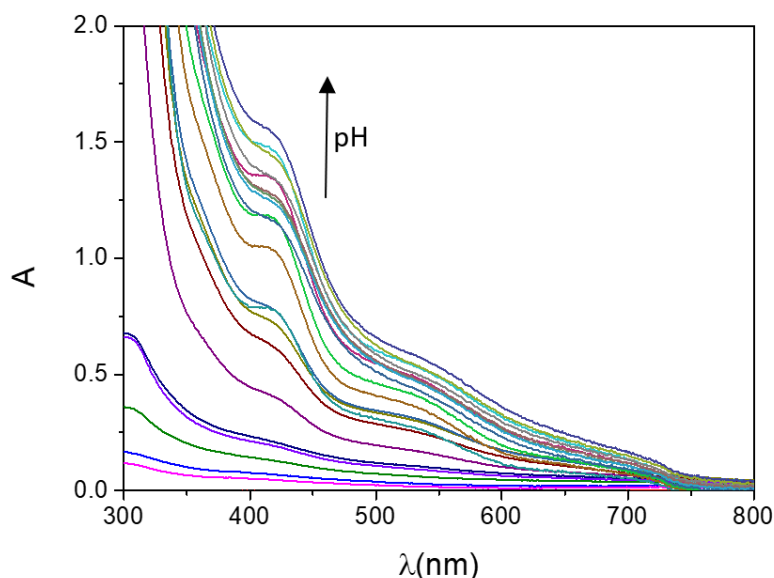


7. ábra A Ni(II):CCNiSOD 1:1 arányú rendszer komplexeinek eloszlása a pH-függvényében (folytonos vonal), kiegészítve a 405 nm-en mért abszorbancia értékekkel (■). $c_{\text{Ni(II)}} = 1,96 \text{ mM}$, $c_{\text{CCNiSOD}} = 2,08 \text{ mM}$, $T = 298 \text{ K}$, $I = 0,2 \text{ M (KCl)}$.



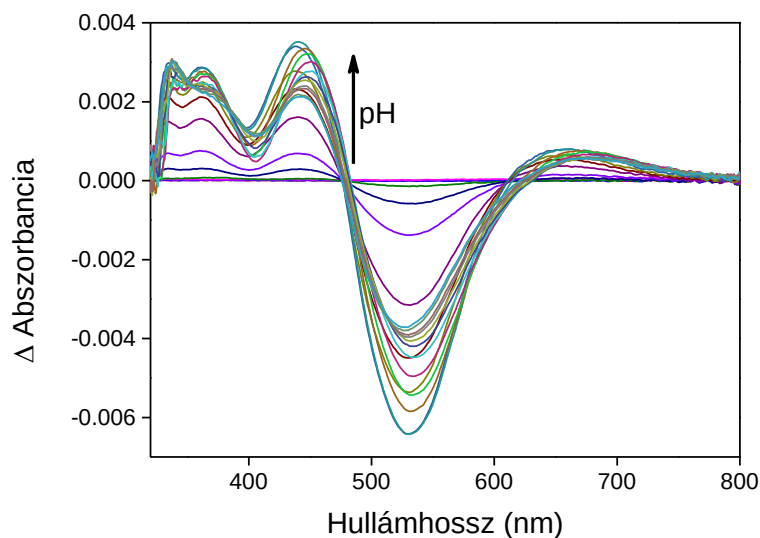
8. ábra A különböző pH-n képződő komplexek szerkezete.

A komplexképződés pH~4-től indul egy protonált, $[\text{NiLH}_2]^-$ sztöchiometriájú komplex megjelenésével, amelyben a fémiont az N-terminális cisztein amino és tiolát csoportja koordinálja, amely kiegészül a távoli cisztein tiolát csoportjának makrokelát kötődésével. A kötémódot a fotometriás titrálás során 330 nm-en jellemző Ni–S⁻ töltésátviteli sáv és a 405 nm-en megjelenő *d-d* átmenet bizonyítja, amely a síknégyszetes geometriájú Ni(II)-komplexekre jellemző. (9. ábra)



9. ábra A Ni(II):CCNiSOD 1:1 arányú rendszer pH-függő UV-látható spektrumai. $CCNiSOD = 2,08$ mM, $c_{Ni(II)} = 1,96$ mM, $l = 1$ cm, $T = 298$ K.

A pH-függő CD spektrumokat a 10. ábra mutatja be. Ezen pH-tartományban a CD spektrum is jelentős változást mutat. 531 nm-en egy negatív, míg 443 nm és 365 nm-en egy-egy pozitív Cotton-effektusú jel, továbbá 650 nm-nél egy kisebb intenzitású pozitív amplitúdójú sáv jelenik meg.



10. ábra A Ni(II):CCNiSOD 1:1 arányú rendszer pH-függő CD spektrumai pH = 2,85 – 10,84 közötti tartományban. $CCNiSOD = 2,08$ mM, $c_{Ni(II)} = 1,96$ mM, $T = 298$ K, $I = 0,2$ M (KCl).

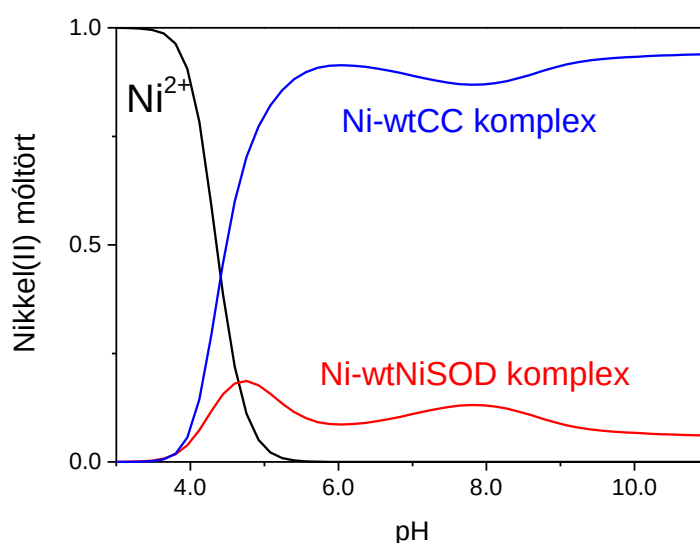
Utóbbi effektus korábbi irodalmi adatok alapján akkor detektálható, amikor a peptidváz C-terminális végén található donorcsoportok is részt vesznek a fémion koordinációjában.²²

A pH növelésével a $[NiLH]^{2-}$ komplex képződik. Ebben a komplexben egy újabb tiolát csoport kötődése valósul meg és egy $(NH_2,3S)$ koordinációs mód alakul ki. A komplex a fiziológiás pH-tartományban uralkodó részecske. Ezzel ellentétben a NiSOD natív enzimfragsménél egy amino, amid és két tiolát koordinációs módú komplex alakul ki. Ennek megfelelően a hisztidin

cisztein aminosavra való cseréje drasztikusan megváltoztatja a metallopeptid komplexképző tulajdonságait.

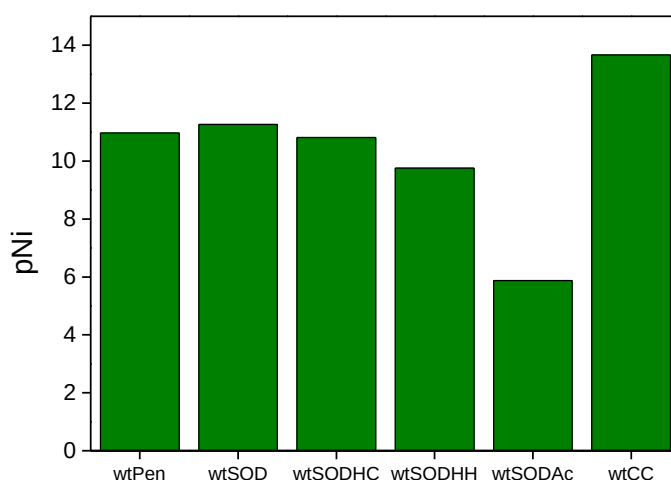
A komplex továbbra is síknégyzetes, diamágneses karakterű, amelyet az UV-látható és CD spektroszkópia egyértelműen igazol. A pH további növelésével a $[\text{NiL}]^{3-}$ komplex képződik. A komplex mennyiségének a maximumát 9-es pH-n éri el, melyben a natív enzim redukált formájára jellemző koordinációs mód alakul ki a peptidváz amid nitrogénjének fémion indukált deprotonálódása és koordinációja által. Következésképpen a hisztidintől erősebben koordinálódó oldalláncú aminosav, vagyis a cisztein tiolátcsoportja képes az enzim redukált formájára jellemző koordinációs környezet kialakulását a lúgosabb pH-tartomány felé tolni. A komplexre jellemző CD spektrum jó egyezésben van a natív enzimfragmens azonos koordinációs módú nikkel(II)-komplexének CD spektrumával, alátámasztva a feltételezett szerkezetet. A pH további növelésével a tirozin aminosav fenolos hidroxilcsoportjának deprotonálódása játszódik le. Az ezt jellemző egyensúlyi állandó értéke ($\log K = \log \beta([\text{NiL}]^{3-}) - \log \beta([\text{NiLH}_1]^{4-}) = 9,95$) jó egyezésben van a peptid tirozin hidroxilcsoportjának deprotonálódását jellemző savi disszociációs állandó értékével ($\log K = 10,25$). Ezek alapján, illetve a spektroszkópai vizsgálatok eredményeképpen a tirozin aminosav hidroxil csoportjának koordinációja nem valószínűsíthető, tehát a fémion koordinációs szférája nem változik.

A tisztán vizes oldatra meghatározott stabilitási állandók alapján a MEDUSA program segítségével számítottuk a két ligandum nikkel(II)-kötő affinitását oly módon, hogy a vizsgált **CCNiSOD** peptid, a natív peptidfragmens (wtNiSOD) és a fémion 1:1:1 mólarányban vannak jelen. Ily módon a két peptid nikkel kötő affinitása összemérhető. A fémion széles pH-tartományban kötődik a **CCNiSOD** peptidhez, ezáltal jobb nikkel(II)-kötő ágens, mint a natív enzimfragmens, amelyet a 11. ábra mutat be.



11. ábra A **CCNiSOD** peptid és a wtNiSOD peptid enzimkötő affinitásának összehasonlítása. $C_{\text{Ni(II)}} = 1,5 \text{ mM}$, $C_{\text{CCNiSOD}} = 1,5 \text{ mM}$, $C_{\text{wtNiSOD}} = 1,5 \text{ mM}$.

A fiziológias pH-n kialakult komplex rendkívül nagy stabilitású, összevetve más, NiSOD enzimfragmensek nikkell(II)-komplexeinek a stabilitásával. Ezt összehasonlítani legegyszerűbben a pNi látszólagos stabilitási állandó értékével lehet, amely figyelembe veszi az egyes enzimmodellek eltérő bázicitását is. Minél nagyobb a pNi értéke, az adott komplex annál stabilabb. A különböző koordinációs módú NiSOD enzimfragmensek és mutánsaik pNi értékeit az 12. ábra mutatja be. Ezek alapján egyértelmű, hogy a **CCNiSOD** kiemelkedő stabilitással képes kötni a nikkell(II)ionokat. A natív enzimfragszéhoz képest nagyjából másfél nagyságrenddel nőtt a Ni(II) kötő affinitás, ami egyértelműen a terminális cisztein stabilitásnövelő hatásával magyarázható.

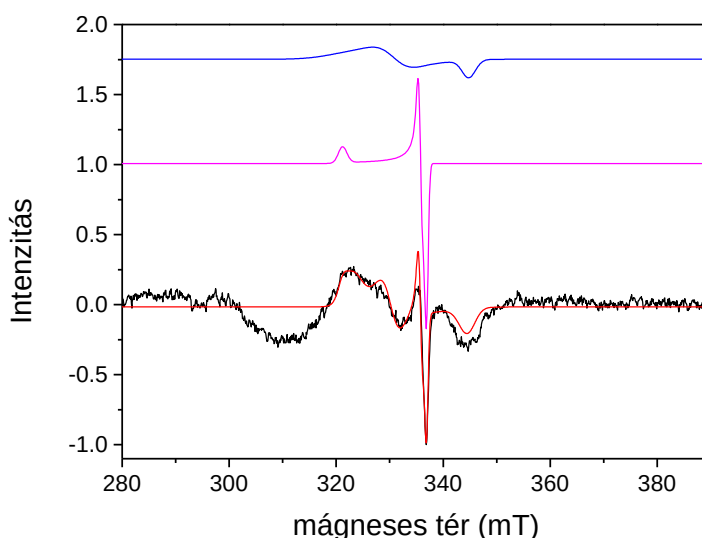


12. ábra Különböző koordinációs módú NiSOD enzimfragmensek és mutánsaik pNi értékei. $C_{Ni(II)} = 10 \mu M$, $C_L = 50 \mu M$, $pH = 7,6$, ahol $pNi = -\log[Ni(II)]$.¹⁰

4.3 A Ni(II)-komplex oxidációja

NiSOD mimetikumok esetén a redoxi ciklusban képződő Ni(III) oxidációs állapot vizsgálatára a leggyakrabban ESR spektroszkópiát alkalmaznak, hiszen az oxidáció eredményeképp képződő Ni(III) paramágneses karakterű. Emiatt a fiziológias pH-n kialakuló Ni(II)-komplext kálium-szuperoxiddal oxidáltuk és az így képződő köztterméket ESR spektroszkópia segítségével azonosítottuk. A kapott ESR spektrumot az 13. ábra mutatja be. A spektrum alapján egyértelmű, hogy a KO_2 indukált oxidáció egy paramágneses, vagyis +3-as oxidációs állapotú komplex megjelenését eredményezi. Ugyanakkor ennek az intenzitása csekély és átfed egy másik nagyobb intenzitású paramágneses részecske, a kálium-szuperoxid jeleivel, ami az ESR paraméterek meghatározását bizonytalanítja. A spektrum leírása a KO_2 és egy Ni(III)-komplex figyelembevételével történt. Az irodalomból ismert a KO_2 , mint paramágneses részecske ESR paraméterei, így azokat rögzítve a szimuláció során a Ni(III) komplex paramétereit is meg tudtuk határozni. A spektrumban 300-320 mT között egy negatív amplitudójú jel is detektálható, ugyanakkor ez a negatív fázisú jel semmilyen módon nem értelmezhető, így azt a spektrum leírásakor nem vettük figyelembe.

A kapott g paramétereket ($g_x = 1,956$, $g_y = 2,041$, $g_z = 2,087$) összevetve más, az irodalomban megtalálható Ni(III)-komplexek ESR paramétereivel, egyértelmű, hogy a párosítatlan elektron a d_{xy} vagy a $d_{x^2-y^2}$ pályán lokalizálódik. Ezzel ellentétben a natív enzimfragmens esetén a párosítatlan elektron a d_{z^2} pályán található meg. A különbség az oxidált forma különböző koordinációs környezetével jól magyarázható, vagyis a d_{xy} vagy a $d_{x^2-y^2}$ alapállapot abban az esetben tud megvalósulni, ha a donortom erős π viszontkoordinációval rendelkezik. Ezáltal a **CCNiSOD** esetén a Ni(III) formában a kén donortomok részvétele a koordinációs szférában igazolható. A komplex szerkezetéről, ugyanakkor a kis intenzitás miatt, további információ nem áll rendelkezésre.



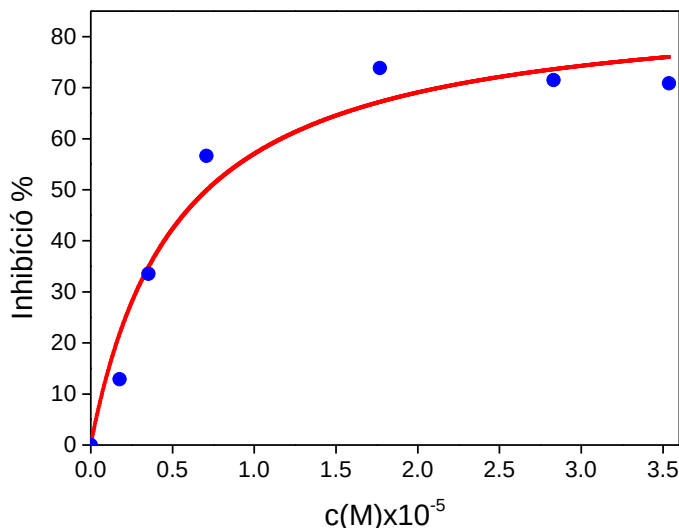
13. ábra A Ni(II):**CCNiSOD** fiziológiás pH-n képződő komplexének *in situ* oxidációjából nyert X-sávú ESR spektrum (fekete), valamint a szimulációból nyert Ni(III)-komplex (kék) és KO_2 (lila) komponens ESR spektrumai. A piros illesztett spektrum, mely a Ni(III)-komplex és KO_2 ESR spektrumainak 75 – 25 százalékosan történő súlyozásával nyerhető. $T = 77 \text{ K}$.

4.4 A **CCNiSOD** SOD aktivitásának mérése

A Ni(II):**CCNiSOD** SOD aktivitását klasszikus fotometriás módszerrel, az indirekt xantin/xantin-oxidáz/NBT módszer segítségével határoztuk meg, spektrofotometriásan, mely során az *in situ* képződő szuperoxid gyökanion által kiváltott NBT redukciót vizsgáltuk különböző komplex koncentrációk mellett.

A **CCNiSOD** Ni(II)-vel alkotott komplexe gyorsabban reagál a szuperoxiddal, mint az NBT, kinetikai diszkriminációt eredményezve. Előkísérletek során megállapítottuk, hogy a komplex nem inhibálja a xantin-oxidáz enzim működését, amelyről úgy győződünk meg, hogy vizsgáltuk az uronsav képződését a Ni(II):**CCNiSOD** hiányában és jelenlétében. Teljesült az a feltétel is, hogy a mimetikum nem reagált a festékmolekulával. A komplex nem disszociált az adott körülmények között, amit a már említett egyensúlyi vizsgálatokkal igazoltunk.

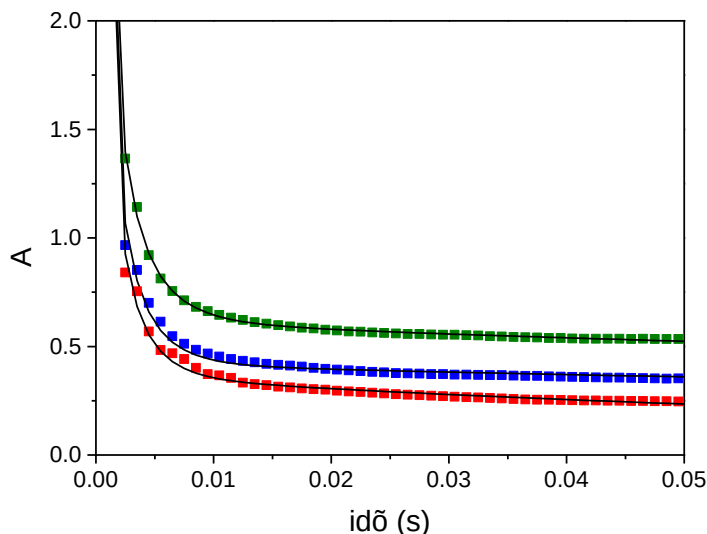
Az egyes koncentrációkhoz tartozó inhibíció értékét a Ni(II):CCNiSOD komplex koncentrációjának függvényében ábrázoltuk, majd illesztettük és az így nyert görbéből számítottuk az IC_{50} értéket (14. ábra). Az ábra alapján látható, hogy az inhibíció növekszik a komplex koncentrációjának növekedésével, telítési görbe szerint.



14. ábra A különböző Ni(II):CCNiSOD komplex koncentrációknál meghatározott inhibíció mértéke (kék, diszkrét pontok), valamint az illesztett inhibíciós görbe (piros). $T = 298$ K, foszfát-puffer (50 mM, pH = 7,60), $\lambda = 560$ nm, $l = 1$ cm.

A számított IC_{50} érték a CCNiSOD esetén 7 ± 2 μ M-nek adódott, ami összevethető a natív enzim értékével ($IC_{50} = 5$ μ M), tehát a cisztein beépítése a peptidvázba (a hisztidin aminosav helyett) a xantin/xantin-oxidáz/NBT módszerrel meghatározott SOD aktivitás értékét jelentősen nem változtatja meg. A meghatározott IC_{50} érték segítségével jó közelítést kaptunk a CCNiSOD, mint NiSOD mimetikum SOD aktivitásáról, habár az így számított érték függ az indikátorként használt molekula, jelen esetben az NBT koncentrációjától. Emiatt számítottuk a dizmutálásra jellemző sebességi együttható (k_{cat}) értékét, amely $k_{cat} = 3,8 \pm 0,2 \cdot 10^5$ $M^{-1}s^{-1}$ -nek adódott. A natív enzim esetén ez az érték, $k_{cat} = 6,9 \cdot 10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, tehát a CCNiSOD moderált SOD aktivitást mutat.

Az IC_{50} érték tehát jó tájékozódó eredményt ad a komplex SOD aktivitásáról, ugyanakkor a mérés során nem mindig biztosítottak a katalízishez szükséges koncentrációviszonyok. Emiatt a kutatócsoportban korábban már sikeresen kidolgozott SOD aktivitás mérési módszert alkalmaztunk, amelynek segítségével szekvenciális *stopped-flow* módszerrel közvetlenül mérjük 260 nm-en a szuperoxid anion fogyását. Az ily módon kapott kinetikai görbéket az 15. ábra mutatja be. Az ábrán jól látható, hogy egy jelentős mértékű abszorbancia csökkenés következik be a detektálás utáni első 5 ms-ban, amely egyértelműen a szuperoxid anion Ni-komplex katalizált dizmutálódásához rendelhető. Az abszorbancia időbeli változása ezután ugyanakkor monoton csökkenést mutat, amely egy további, lassabb reakciólépéshez köthető. Irodalmi előzmények alapján ezt a folyamatot a komplex intramolekuláris redoxi degradációja okozza.



15. ábra A szuperoxid anion és a Ni(II):CCNiSOD komplex közötti reakció kinetikai görbéi, melyben $c_{\text{Ni(II):CCNiSOD}} = 9,86 \mu\text{M}$ (zöld), $c_{\text{Ni(II):CCNiSOD}} = 4,93 \mu\text{M}$ (kék), $c_{\text{Ni(II):CCNiSOD}} = 1,98 \mu\text{M}$ (piros), $c_{\text{O}_2^-} = 1,61 \text{ mM}$. A fekete görbék minden esetben a kinetikai modell alapján számított kinetikai görbéket mutatják be az adott komplex koncentrációk esetén. A kísérlet 1:1 arányú vizes alapú HEPES puffer (50 mM, pH = 7,60) és DMSO oldószer keverékben történt. $\lambda = 260 \text{ nm}$, $l = 2 \text{ mm}$, $T = 298 \text{ K}$.

A kinetikai görbék leírása a (3) – (6) reakcióegyenletek alapján történt és az egyes részecskék időbeli változását a (7) – (11) differenciál-egyenletrendszer adja meg. A görbe illesztése ezen egyenletrendszer segítségével történt, ahol 260 nm-en a mért abszorbanciát közvetlenül illesztettük a (12) egyenletnek megfelelően.



$$\frac{d[\text{O}_2^-]}{dt} = -k_1 \times [\text{O}_2^-]^2 - k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}\text{L}][\text{O}_2^-] - k_3 \times [\text{Ni}^{\text{III}}\text{L}][\text{O}_2^-] \quad (7)$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = k_1 \times [\text{O}_2^-]^2 + k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}\text{L}][\text{O}_2^-] \quad (8)$$

$$\frac{d[\text{Ni}^{\text{II}}\text{L}]}{dt} = -k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}\text{L}][\text{O}_2^-] + k_3 \times [\text{Ni}^{\text{III}}\text{L}][\text{O}_2^-] \quad (9)$$

$$\frac{d[\text{Ni}^{\text{III}}\text{L}]}{dt} = k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}\text{L}][\text{O}_2^-] - k_3 \times [\text{Ni}^{\text{III}}\text{L}][\text{O}_2^-] - k_4 \times [\text{Ni}^*\text{L}] \quad (10)$$

$$\frac{d[\text{Ni}^*\text{L}]}{dt} = k_4 \times [\text{Ni}^{\text{III}}\text{L}] \quad (11)$$

$$Abs = \varepsilon_{\text{Ni(II)}} \times [\text{Ni}^{\text{II}}\text{L}] + \varepsilon_{\text{Ni(III)}} \times [\text{Ni}^{\text{III}}\text{L}] + \varepsilon_{\text{Ni}^*} \times [\text{Ni}^*\text{L}] + \varepsilon_{\text{O}_2^-} \times [\text{O}_2^-] + \varepsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \times [\text{H}_2\text{O}_2] \quad (12)$$

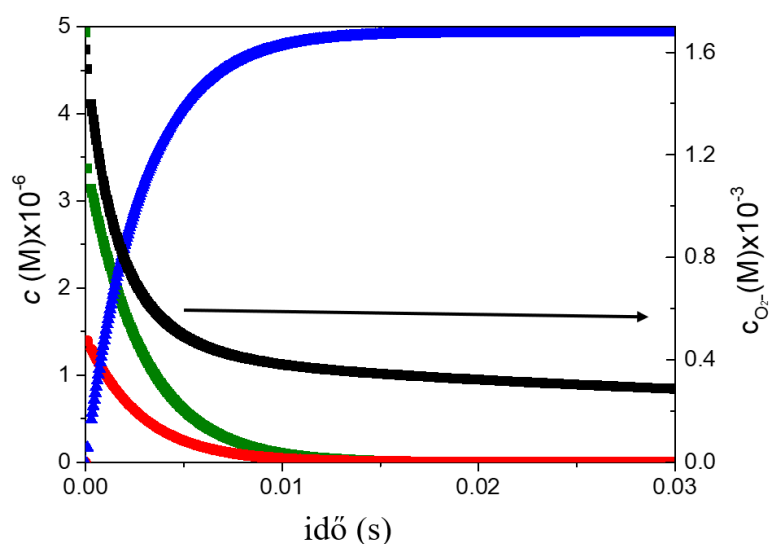
A kinetikai modell négy sebességi együtthatót foglal magába. Ezek a szuperoxid anion spontán diszproporcióját (k_1), a szuperoxid anion nikkell asszisztált katalízisét (k_2 és k_3), valamint a már említett redoxi degradációt (k_4) jellemző sebességi együtthatók. Mivel egyensúlyi kísérleteink során megállapítottuk, hogy a Ni(II) komplex stabilis ilyen körülmények között, ezért feltételezzük, hogy a Ni(III)-al alkotott komplex vesz részt a redoxi degradációban, az így keletkezett komplex(ek) egyelőre még nem definiált, ezáltal Ni^* -ként hivatkozunk rá. Független kísérletekben meghatároztuk a SOD aktivitás vizsgálatok körülménye között a kiindulási Ni(II)-komplex moláris abszorbanciáját, valamint a reakció végén keletkező termék(ek) moláris abszorbanciáját. Az így nyert, illetve a kinetikai görbék illesztéséből számított paramétereket a 3. táblázat tartalmazza.

A számított koncentrációeloszlási görbe (16. ábra) alapján látható, hogy a natív enzimfragszhoz hasonlóan, a Ni(II)-komplex nagyobb koncentrációban van jelen, mint a Ni(III)-komplex, ami kedvez a dizmutálási reakciónak. Ugyanakkor a natív enzimfragsz nikkell-komplexével ellentétben az intramolekuláris redoxi degradáció gyorsabb, amelynek terméke a Ni^* , amely katalitikusan nem aktív. Fontos megjegyezni, hogy a reaktánsok összekeverését követő első 5 ms-ban a kiindulási szuperoxid anion 75%-a a komplex asszisztált úton dizmutálódik, amely igen hatékony katalízist jelent.

3.táblázat A Ni(II):CCNiSOD és KO₂ közötti reakció sebességi együtthatói és moláris abszorbanancia értékei.^(a)

Paraméter	CCNiSOD	wtNiSOD ¹⁸	Mértékegység
k_1^a	$3,84 \times 10^4$	$3,84 \times 10^4$	$M^{-1}s^{-1}$
k_2	$(6,6 \pm 0,6) \times 10^7$	$9,6 \times 10^7$	$M^{-1}s^{-1}$
k_3	$(1,6 \pm 0,4) \times 10^8$	$1,72 \times 10^8$	$M^{-1}s^{-1}$
k_4	1310 ± 90	258 ± 2	s^{-1}
$\varepsilon_{Ni(II)}^a$	$(1,33 \pm 0,03) \times 10^4$	$1,48 \times 10^4$	$M^{-1}cm^{-1}$
$\varepsilon_{Ni(III)}$	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^4$	$2,44 \times 10^4$	$M^{-1}cm^{-1}$
$\varepsilon_{Ni^*}^a$	6180 ± 70	$1,8 \times 10^4$	$M^{-1}cm^{-1}$
$\varepsilon_{O_2^-}^a$	2686	2686	$M^{-1}cm^{-1}$
$\varepsilon_{H_2O_2}^a$	38	38	$M^{-1}cm^{-1}$

(a) A kinetikai görbék illesztése során rögzített értékek.

**16. ábra** A Ni(II):CCNiSOD és KO₂ közötti reakcióban képződő részecskék koncentrációi az idő függvényében. Fekete görbével a szuperoxid gyökanion, zölddel a Ni(II), pirossal a Ni(III), míg kékkel a Ni* komplex koncentrációi láthatóak. $c_{Ni(II):CCNiSOD} = 9,86 \mu M$, $c_{O_2^-} = 1,61 mM$.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A NiSOD egy, a cianobaktériumokban megtalálható enzim, amelynek feladata az oxigén metabolizmusa során képződő szuperoxid anion diszproporciós reakciójának katalízise molekuláris oxigénné és hidrogén-peroxiddá.

A munkám során célkitűzésem az axiális hisztidin szerepének vizsgálata volt egy olyan NiSOD mimetikum segítségével, amely az N-terminális hisztidin helyett cisztein aminosavat tartalmaz (**CCNiSOD**).

A cisztein mutációt tartalmazó peptid sav-bázis folyamatainak megismerése és a savi disszociációs állandók, valamint a nikkel(II)-ionnal alkotott fémkomplexek stabilitási állandóinak meghatározása után javaslatot tettünk a vizes oldatban képződő komplexek koordinációs módjaira. Ezek alapján fiziológiás pH-n a $[\text{NiLH}]^{2-}$ komplex a domináns részecske, melyben $(\text{NH}_2, 3\text{S})$ koordinációs módú komplex alakul ki. Ez a szerkezet eltér a natív NiSOD fiziológiás pH-n képződő nikkel(II)-komplexének koordinációs módjától. A peptid nagy stabilitással képes kötni a nikkel(II)ionokat széles pH-tartományban. A natív enzimfragmenshez képest a Ni(II) kötő affinitás jelentősebb, ami egyértelműen a terminális cisztein koordinációjával, így stabilitásnövelő hatásával magyarázható. A cisztein aminosav beépítése a terminális hisztidin helyére tehát megváltoztatta a metallopeptid komplexképző tulajdonságait. A **CCNiSOD** esetén a natív enzimfragmensre jellemző koordinációs környezet csak lúgos pH-tartományban alakul ki, így a hisztidin kulcsfontosságú szerepet tölthet be az enzim redukált formájában az aktív centrum kialakításában is.

A **CCNiSOD** fiziológiás pH-n kialakult komplexének *in situ* oxidációja a megfelelő Ni(III)-komplexet eredményezte, amelyről elmondható, hogy mindhárom kén donoratom jelen van a Ni(III) koordinációs szférájában. Ezt a fajta erős π viszontkoordinációt ESR spektroszkópiával igazoltuk. A komplex SOD aktivitás vizsgálata a kutatócsoport által kifejlesztett *stopped-flow* technika, illetve a klasszikus xantin/xantin-oxidáz/NBT módszer segítségével történt. A komplex jelentősen gyorsítja a szuperoxid anion bomlását.

A kapott eredmények alapján a cisztein beépítése nincs jelentős hatással a dizmutálódási reakció sebességére. A számított IC_{50} érték, valamint a sebességi együttható (k_{cat}) alapján a **CCNiSOD** a natív enzimfragmenssel összevethető SOD aktivitást mutat. A számított koncentrációeloszlási görbe alapján a dizmutálási reakció során a Ni(II)-komplex a natív enzimhez hasonlóan nagyobb koncentrációban van jelen, mint a Ni(III)-komplex, ami kedvez a dizmutálási reakciónak, ugyanakkor a natív enzimmel ellentétben egy gyors intramolekuláris redoxi degradációt szenved és ezáltal a katalízis megszűnik.

6. HIVATKOZÁSOK

- [1.] Lihi, N., Csire, G., Szakács, B., May, N. V., Várnagy, K., Sóvágó, I., Fábíán, I., Stabilization of the Nickel Binding Loop in NiSOD and Related Model Complexes: Thermodynamic and Structural Features. *Inorganic Chemistry*, 2019, 58(2), 1414–1424.
- [2.] Zelko, I. N., Mariani, T. J., Folz, R. J., Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 33(3), 337–349.
- [3.] Krause, M. E., Glass, A. M., Jackson, T. A., Laurence, J. S., A novel tripeptide model of nickel superoxide dismutase. *Inorganic Chemistry*, 2010, 49(2), 362–364.
- [4.] Neupane, K. P., Gearty, K., Francis, A., Shearer, J., Probing Variable Axial Ligation in Nickel Superoxide Dismutase Utilizing Metallopeptide-Based Models: Insight into the Superoxide Disproportionation Mechanism. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(47), 14605–14618.
- [5.] Schmidt, M., Zahn, S., Carella, M., Ohlenschläger, O., Görlach, M., Kothe, E., Weston, J., Solution Structure of a Functional Biomimetic and Mechanistic Implications for Nickel Superoxide Dismutases. *ChemBioChem*, 2008, 9(13), 2135–2146.
- [6.] Abreu, I. A., Cabelli, D. E., Superoxide dismutases a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2009, 1804(2), 263–274.
- [7.] Blaustein, R., The Great Oxidation Event. *BioScience*, 2016, 66(3), 189–195.
- [8.] Boden, J. S., Konhauser, K. O., Robbins, L. J., Sánchez-Baracaldo, P. Timing the evolution of antioxidant enzymes in cyanobacteria. *Nature Communications*, 2021, 12(1).
- [9.] Latifi, A., Ruiz, M., Zhang, C.-C. Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(2), 258–278.
- [10.] Lihi, N., Fábíán, I., Chapter One - Insight into the thermodynamic and catalytic features of NiSOD related metallopeptides. *Advances in Inorganic Chemistry, Academic Press*, 2022, 79(1) 1-22.
- [11.] Yang, S., Lian, G., ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2020, 467(1), 1–12.
- [12.] Salvemini, D., Riley, D. P., Cuzzocrea, S., Sod mimetics are coming of age. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1(5), 367–374.
- [13.] Barondeau, D. P., Kassmann, C. J., Bruns, C. K., Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Nickel Superoxide Dismutase Structure and Mechanism. *Biochemistry*, 2004, 43(25), 8038–8047.
- [14.] Tietze, D., Sartorius, J., Koley Seth, B., Herr, K., Heimer, P., Imhof, D., Buntkowsky, G., New insights into the mechanism of nickel superoxide degradation from studies of model peptides. *Scientific Reports*, 2017, 7(1).

- [15.] Lihi, N., Kelemen, D., May, N. V., Andrási, M., Gáspár, A., Fábián, I., High enzyme activity of a binuclear nickel complex formed with the binding loops of the NiSOD enzyme. *Chemistry – A European Journal*, 2020, 26(70), 16767-16773.
- [16.] Zekany, L., Nagypal, I., PSEQUAD. Computational Methods for the Determination of Formation Constants, 1985, 291–353.
- [17.] Beyer, W. F., Fridovich, I., Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 1987, 161(2), 559–566.
- [18.] Valentine, J. S., Curtis, A. B., Convenient preparation of solutions of superoxide anion and the reaction of superoxide anion with a copper(II) complex. *Journal of the American Chemical Society*, 1975, 97(1), 224–226.
- [19.] Lihi, N., Grenács, Á., Timári, S., Turi, I., Bányai, I., Sóvágó, I., Várnagy, K., Zinc(II) and cadmium(II) complexes of N-terminally free peptides containing two separate cysteinyl binding sites. *New Journal of Chemistry*, 2015, 39(11), 8364–8372.
- [20.] Sóvágó, I., Kiss, T., Várnagy, K., Révérend, B. D.-L., Cobalt(II) and zinc(II) complexes of cysteine containing dipeptides. *Polyhedron*, 1988, 7(12), 1089–1093.
- [21.] Bonczidai-Kelemen, D., Sciortino, G., May, N. V., Garribba, E., Fábián, I., and Lihi, N., Introducing the penicillamine moiety into a metallopeptide mimicking the NiSOD enzyme: electronic and kinetic effects. *Inorg. Chem. Front*, 2022, 9, 310-322.
- [22.] Raics, M., Lihi, N., Laskai, A., Kállay, C., Várnagy, K., Sóvágó, I., Nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of hexapeptides containing separate histidyl and cysteinyl binding sites. *New Journal of Chemistry*, 2016, 40(6), 5420–5427.