METALLOENZIMEK SZERKEZETI ÉS FUNKCIONÁLIS MODELLEZÉSE

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Szilágyi István

Szegedi Tudományegyetem

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

SZEGED

2006

METALLOENZIMEK SZERKEZETI ÉS FUNKCIONÁLIS MODELLEZÉSE

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Szilágyi István

Témavezetők: Dr. Kiss Tamás, egyetemi tanár
Dr. Labádi Imre, egyetemi docens
Konzulens: Dr. Pálinkó István, egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

SZEGED

2006

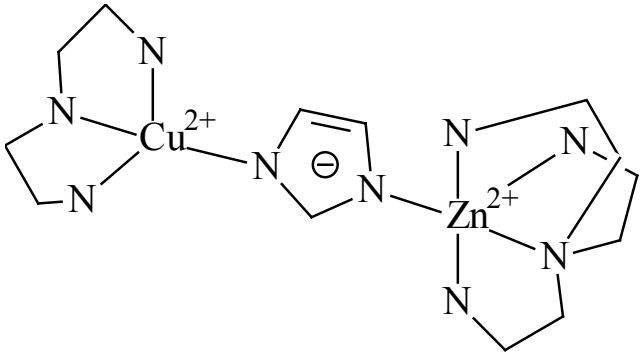
BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A biológiai rendszerekben a kémiai reakciók legnagyobb része katalizátor jelenlétében megy végbe. Ezek a katalizátorok specifikus tulajdonságú fehérjék, amelyeket enzimeknek nevezünk. Minden enzimre egyaránt jellemző a specifitás és a katalitikus képesség, amely azt jelenti, hogy csak egy bizonyos kémiai reakciót segítenek elő, és a legtöbb esetben azt is csak megfelelő körülmények (pH, hőmérséklet stb.) között. Az enzimek jelentős része lényeges alkotóelemként fémiont tartalmaz. Az aktív centrumukban fémiont tartalmazó enzimeket összefoglalóan metalloenzimeknek nevezzük. A metalloenzimekben jelenlévő fémion az enzimmolekula része, a fém és a fehérje sztöchiometrikus aránya meghatározott érték. Fiziológiás körülmények között a fémion nem szakad ki a metalloenzimből, ha azonban eltávolítjuk belőle, az enzim elveszti aktivitását.

A metalloenzimek között találunk olyan tulajdonságúakat, amelyek valamilyen redoxireakciót katalizálnak az élő szervezetben. Ilyenek például a szuperoxid dizmutáz, a katecholáz, a kataláz és a peroxidáz enzimek. A redoxi tulajdonságú enzimek aktív centrumában olyan fémionok találhatóak, amelyek maguk is redoxi tulajdonságokkal bírnak. Ilyen fém például a vas, a réz, a mangán. A fentemlített enzimeknek fontos szerepe van a szervezetben keletkező reaktív oxigénrészecskék (ROS) lebontásában. A reaktív oxigénrészecskék közé tartozik például a hidrogén-peroxid, illetve a szuperoxid- és hidroxilgyök is.

Munkánk során célul tűztük ki metalloenzimeket modellező fémkomplexek előállítását, illetve azok immobilizálását szervetlen hordozókon. Előzetes reményeink szerint a hordozó (az immobilizálás nyújtotta előnyökön túl) képes legalább részben betölteni a természetes enzimben található fehérjelánc szerkezetkialakító hatását. Vizsgálataink középpontjában egy réz(II)- és cink(II)ionokat tartalmazó kétmagvú komplex, a réz(II)-dietiléntriamin-μ-imidazolátó-cink(II)-trisz(2-aminoetil)amin (a későbbiekben Cu,Zn-komplex)

állt, amelyben a két fémiont imidazolátóhíd köti össze. Emellett tanulmányoztunk jónéhány kisebb molekulatömegű fémkomplex hasonló tulajdonságait, amelyek vagy a Cu,Zn-komplexet felépítő részrendszerek közé tartoztak (Cu(II)-dietiléntriamin, Cu(II)-dietiléntriamin-imidazol, Cu(II)-trisz(2-aminoetil)amin, Cu(II)-trisz(2-aminoetil)amin-imidazol), vagy egyéb, biológiai szempontból fontos ligandumot, illetve fémiont tartalmaztak (Cu(II)-hisztidin). A megfelelő tulajdonságok összehasonlítása sok esetben megkönnyítette a Cu,Zn-komplex kémiai viselkedésének magyarázatát.



A réz(II)-dietiléntriamin-μ-imidazolátó-cink(II)-trisz(2-aminoetil)amin komplex szerkezete

ALKALMAZOTT VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

Az oldategyensúlyi vizsgálatok során pH-potenciometriai titrálás adatai alapján számítottuk ki (Psequad és Superquad programok segítségével) a vizes közegben keletkező részecskék összetételét, illetve stabilitási állandóik számértékét. A kérdéses komplexek szerkezetét UV-Vis és ESR spektroszkópiai módszerekkel tanulmányoztuk. Tömegspektrometriai (ESI- és MALDI-MS) mérésekkel határoztuk meg az egyes rendszerekben képződő komplexek molekulatömegét. Az anyagok elektrokémiai viselkedését a ciklikus voltammetria módszerével tanulmányoztuk.

Az immobilizált komplexek fémiontartalmát atomabszorpciós spektrofotometriával határoztuk meg. Az immobilizálás sikerességét,

illetve a szilárd anyagok szerkezetét a következő módszerekkel vizsgáltuk: BET fajlagos felület meghatározás, FT-IR és ESR spektroszkópia, termikus (TG, DTA) vizsgálatok.

A potenciálisan enzimutánzó vegyületek szuperoxid dizmutáz, katechol oxidáz és kataláz aktivitását tesztreakciókkal tanulmányoztuk.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Oldategyensúlyi vizsgálatok

1. A pH-potenciometriai titrálások során meghatároztuk a Cu,Zn-komplexet alkotó ligandumok protonálódási állandóinak számértékét, illetve vizsgáltuk az ötkomponensű rendszerben és alrendszereiben képződő komplexmolekulák összetételét, és kiszámítottuk stabilitási állandóik értékét. Az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy vizes oldatban 7–11 pH-értékek között döntően az imidazolátóhidas szerkezetű forma, illetve annak deprotonált változata fordul elő az ötkomponensű rendszerben.

2. Ezt az eredményt megerősítették a pH-függő ESR- és UV-Vis spektroszkópiai mérések is. Az előbb említett két módszer segítségével meghatároztuk a rendszerben képződő részecskék oldatbeli szerkezetét. Megállapítottuk, hogy a semleges-lúgos tartományban képződő imidazolátóhidas részecskéhez két izomerszerkezet rendelhető, a koordinálódó nitrogénatomok elhelyezkedésétől függően.

3. Tömegspektrometriai módszerekkel is (MALDI- és ESI-MS) jellemeztük a Cu,Zn-komplexet, illetve a részrendszereiben képződő molekulákat. Meghatároztuk molekulatömegüket és fragmentációs lehetőségeiket.

4. Az oldategyensúlyi mérések végső lépésében jellemeztük a modellvegyületek elektrokémiai tulajdonságait, módszerként a ciklikus

voltammetriát alkalmazva. A vizsgálatok során tanulmányoztuk a Cu,Zn-komplex elektrokémiai viselkedésének pH-függését, illetve ezen tulajdonságait összehasonlítottuk egyes alrendszerei hasonló jellemzőivel. A mérési eredmények ebben az esetben is igazolták a Cu,Zn-komplex jelenlétét pH = 7 érték felett az oldatban, illetve azt is megállapítottuk, hogy a Cu,Zn-komplex megfelelően negatív potenciállal rendelkezik a szuperoxid-gyökanionok sikeres dizmutálásához.

Vizsgálatok szilárd fázisban

5. A Cu,Zn-komplex molekulát immobilizáltuk montmorillonitban (Mont–i–Cu,Zn), illetve szilikagélen. Szilárd mátrixként agyagásványt alkalmazva a hordozó ioncsere-kapacitásának megfelelő elektrosztatikus kölcsönhatások segítségével rögzítettük a komplexmolekulát a mátrix rétegei között. A szilikagél esetében az immobilizálást hidrogénhíd-kölcsönhatások segítségével (SG–h–Cu,Zn), illetve kovalens rögzítési módszer alkalmazásával (SG–c–Cu,Zn) végeztük el. Az immobilizálás sikerességét igazoltuk (atomabszorpciós spektrofotometria, BET felületmérések, FT-IR spektroszkópia), illetve a katalizátorok tulajdonságait többféle módszerrel jellemeztük (ESR spektroszkópia, termikus mérések).

6. ESR spektroszkópiai vizsgálataink szerint a Cu,Zn-komplex jelentősebb szerkezetváltozás nélkül kötődött meg a montmorillonit rétegei között, míg szilikagélen mind hidrogénhidas, mind kovalens rögzítés során kétféle szerkezetű réz(II)komplexet detektáltunk a katalizátorok felületén. Az ESR paraméterek alapján azt mondhatjuk, hogy ezeknél az anyagoknál az immobilizált molekula geometriai torzulást szenved. Az SG–h–Cu,Zn esetében a nagyobb mértékben előforduló részecske szerkezete, az ESR paraméterek alapján, jobban hasonlít a természetes Cu,Zn-SOD enzim aktív centrumához, mint a hordozó nélküli Cu,Zn-komplex.

7. Termoanalitikai (TG, DTA) méréseink szerint a szilikagélen rögzített katalizátoraink termikusan stabilisabbak, mint a Mont–i–Cu,Zn és a Cu,Zn-komplex, amelyek 300 ^{o}C körül robbanásszerűen elbomlanak.

Az anyagok katalitikus aktivitása

8. Anyagaink - mind a hordozó nélküli komplexek, mind immobilizált változataik - mutattak szuperoxid dizmutáz aktivitást. Bár az aktivitások elmaradtak a természetes enzimétől, azonban mindegyik anyag - megfelelően nagy koncentrációban - a tesztreakcióban keletkező szuperoxid-gyökök 80-90 %-át dizmutálta. Megállapítottuk, hogy az immobilizálás a hidrogénhidas rögzítés (SG–h–Cu,Zn) esetében jelentős aktivitásnövekedéssel járt. A jelentkező közel tízszeres aktivitásnövekedést a természetes enzimhez hasonló szerkezet kialakulásával magyaráztuk.

9. A katechol oxidáz tesztreakció során szintén mindegyik anyag esetében aktivitást tapasztaltunk. A Cu,Zn-komplex immobilizálása minden esetben aktivitásnövekedést eredményezett, és itt is a szilikagélen hidrogénkötésekkel rögzített Cu,Zn-komplex bizonyult a legaktívabbnak.

10. A Cu,Zn-komplex, illetve immobilizált változatai nem mutattak kataláz aktivitást az alkalmazott tesztreakció körülményei között, azaz a komplex sem szerkezeti, sem működési szempontból nem jó kataláz modell.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények

1. **I. Szilágyi**, I. Labádi, K. Hernadi, I. Pálinkó, T. Kiss
   Synthesis and IR spectroscopic characterisation of immobilised superoxide dismutase (SOD) mimicking complexes
   Journal of Molecular Structure **744-747,** 495 (2005) IF: 1,200

2. **I. Szilágyi**, I. Labádi, K. Hernadi, I. Pálinkó, I. Fekete, L. Korecz, A. Rockenbauer, T. Kiss
   Superoxide dismutase activity of a Cu-Zn complex – bare and immobilised
   New Journal of Chemistry **29,** 740 (2005) IF: 2,735

3. **I. Szilágyi**, I. Labádi, K. Hernadi, T. Kiss, I. Pálinkó
   Montmorillonite intercalated Cu(II)-histidine complex - synthesis, characterisation and superoxide dismutase activity
   Studies in Surface Science and Catalysis **158,** 1011 (2005) IF: 0,489

4. **I. Szilágyi**, I. Labádi, K. Hernadi, I. Pálinkó, N.V. Nagy, L. Korecz, A. Rockenbauer, Z. Kele, T. Kiss
   Speciation study of an imidazolate-bridged copper(II)–zinc(II) complex in aqueous solution
   Journal of Inorganic Biochemistry **99,** 1619 (2005) IF: 2,225

5. **I. Szilágyi**, Z. Kele, I. Labádi, K. Hernadi, I. Pálinkó, T. Kiss
   ESI–MS and MALDI–MS investigation of a superoxide dismutase mimicking imidazolato–bridged Cu–Zn complex
   Rapid Communications in Mass Spectrometry **19,** 2878 (2005) IF: 2,789

6. **I. Szilágyi**, L. Horváth, I. Labádi, K. Hernadi, I. Pálinkó, T. Kiss
   Mimicking catalase and catecholase enzymes by copper(II)-containing complexes
   Central European Journal of Chemistry **4**, 118 (2006) IF: 0,171

Összesített impakt faktor: **9,609**

A szerző egyéb közleményei

1. E. Princz, **I. Szilágyi**, K. Mogyorósi, I. Labádi
   Lanthanide complexes of ethylenediaminotetramethylene-phosphonic acid
   Journal of Thermal Analysis and Calorimetry **69,** 427 (2002) IF: 0,598

2. I. Labádi, **I. Szilágyi**, N. I. Jakab, K. Hernádi, I. Pálinkó
   Metal complexes immobilised in/on porous matrices – possible enzyme mimics
   Material Science **21,** 235 (2003) IF: 0,154

3. **I. Szilágyi**, G. Nagy, K. Hernádi, I. Labádi, I. Pálinkó
   Modeling copper-containing enzyme mimics
   Journal of Molecular Structure THEOCHEM **666,** 451 (2003) IF: 1,027

4. **I. Szilágyi**, E. Pál, L. Horváth, I. Labádi
   Az N-hidroxietil-glicin kölcsönhatása fémionokkal
   Magyar Kémiai Folyóirat **111,** 83 (2005) IF: –

Konferencia előadások és poszterek

1. Imre Labádi and **István Szilágyi**
   N-hydroxyethyl-glycine - a new environmental benign complexing agent
   IVth International Symposium 'Young People and Multidisciplinary Research'
   Temesvár (2002. november 14-15.) Románia Poszter

2. Labádi I., **Szilágyi I.**, Sitkei E., Pálinkó I., Hernádi K.
   Enzimutánzó fémkomplexek immobilizálása pórusos mátrixokban,
   Erdélyi Magyar Műszaki Tudományos Társaság VIII. Nemzetközi Vegyészkonferencia
   Kolozsvár (2002. november 15-17.) Románia Előadás

3. **Szilágyi I.**, Száva J., Labádi I.
   Gyors biológiai lebomlású komplexképzők vizsgálata
   The IXth Symposium on Analytical and Environmental Problems
   Szeged (2002. szeptember 30.) Magyarország Poszter

4. **István Szilágyi**, Imre Labádi, Klára Hernádi, István Pálinkó and Tamás Kiss
   SOD activity of immobilized enzyme mimicking complexes
   Vth International Symposium 'Young People and Multidisciplinary Research'
   Temesvár (2003. november 6-7.) Románia Poszter

5. **Szilágyi I.**, Labádi I., Hernádi K., Pálinkó I., Kiss T.
   Szuperoxid dizmutáz utánzó fémkomplex vizsgálata riboflavin/NBT tesztreakcióval
   Kémiai Előadói Napok (KEN)
   Szeged (2003. október 27-29.) Magyarország Előadás

6. I. Labádi, E. Pál, L. Horváth and **I. Szilágyi**
   N-hydroxyethylglycine – a new environmentally benign complexing agent
   20th International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry
   Smolenice (2005. június 5-10.) Szlovákia Előadás

7. Labádi I., **Szilágyi I.**
   Gyors biológiai lebomlású komplexképzők vizsgálata
   XXV. Kémiai Előadói Napok (KEN)
   Szeged (2002. október 28-30.) Magyarország Előadás

8. I. Labádi, **I. Szilágyi**, K. Hernadi, I. Pálinkó and I. Kiricsi
   Modelling of enzymatic processes by metallocomplexes immobilized on microporous matrices
   XIIIth Winter School on Coordination Chemistry
   Karpacz (2002. december 9-13.) Lengyelország Előadás

9. **I. Szilágyi**, J. Szava, I. Labádi
   New environmental benign complexons
   XIIIth Winter School on Coordination Chemistry
   Karpacz (2002. december 9-13.) Lengyelország Poszter

10. **I. Szilágyi**, G. Nagy, K. Hernádi, I. Labádi, I. Pálinkó
    Modeling copper-containing enzyme mimics
    The Role of Chemistry in the Evolution of Molecular Medicine (A Tribute of Professor Albert Szent-Györgyi)
    Szeged (2003. június 27-29.) Magyarország Poszter

11. **I. Szilágyi**, I. Labádi, K. Hernádi, I. Pálinkó, T. Kiss
    Immobilizing enzyme mimicking complexes
    IXth International Symposium on Inorganic Biochemistry
    Szklarska Poreba (2003. szeptember 4-7.) Lengyelország Poszter

12. **Szilágyi I.**, Labádi I., Kiss T., Pálinkó I., Hernádi K.
    Enzimutánzó fémkomplexek immobilizálása pórusos anyagokon – szuperoxid dizmutáz aktivitás
    XXXVIII. Komplexkémiai Kollokvium
    Gyula (2003. május 21-23.) Magyarország Előadás

13. **István Szilágyi**, Imre Labádi, Klara Hernadi, István Pálinkó, Tamás Kiss
    Potentiometric and spectroscopic study of a superoxide dismutase (SOD) mimicking imidazolate-bridged Cu(II)-Zn(II) complex
    International Symposium Metals, Environment, Health
    Szklarska Poreba (2004. június 24-27.) Lengyelország Poszter

14. **István Szilágyi**, Imre Labádi, Klara Hernadi, István Pálinkó
    Synthesis and IR spectroscopic characterization of immobilised superoxide dismutase (SOD) mimicking complexes
    XXVII. European Congress on Molecular Spectroscopy
    Kraków (2004. szeptember 5-10.) Lengyelország Poszter

15. **Szilágyi István**, Labádi Imre, Hernádi Klára, Pálinkó István, Győr Miklós, Rockenbauer Antal, Kiss Tamás
    Réz(II)-dietiléntriamin-imidazol-cink(II)-trisz(aminoetil)amin rendszer potenciometriai, spektrofotometriai és ESR spektroszkópiai vizsgálata
    XXXIX. Komplexkémiai Kollokvium
    Agárd-Gárdony (2004. május 26-28.) Magyarország Előadás

16. Czibulya Zsuzsanna, Sitkei Eszter, Pál Edit, **Szilágyi István** és Labádi Imre
    Az imidazol átmenetifém-komplexeinek előállítása és vizsgálata termikus és IR spektroszkópiai módszerekkel
    XXXIX. Komplexkémiai Kollokvium
    Agárd-Gárdony (2004. május 26-28.) Magyarország Előadás

17. Edit Pál, László Horváth, **István Szilágyi**, Imre Labádi
    N-hydroxiethyl-glycine – a new environmentally sound ligand
    8th International Symposium on Interdisciplinary Regional Research
    Szeged (2005. április 19-21.) Magyarország Poszter

18. **I. Szilágyi**, I. Labádi, K. Hernadi, T. Kiss, I. Pálinkó
    Montmorillonite intercalated Cu(II)-histidine complex – synthesis, characterisation and superoxide dismutase activity
    Federation of the European Zeolite Association 3 Conference
    Prága (2005. augusztus 22-26.) Csehország Poszter