

Doktori (PhD) értekezés tézisei



Az Al(III) kölcsönhatása kis biomolekulákkal.

Az idő hatása a részecskeeloszlásra

Lakatos Andrea



**MTA Biokoordinációs Kémiai Kutatócsoport
SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Szeged, 2001**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Az Al(III) kölcsönhatása kis biomolekulákkal.
Az idő hatása a részecskeeloszlásra**

Lakatos Andrea

témavezető: Dr. Kiss Tamás

MTA Biokoordinációs Kémiai Kutatócsoport
SZTE Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
Szeged, 2001



1. Bevezetés és célkitűzések

Az alumínium a harmadik leggyakoribb elem az oxigén és a szilícium után. Nagy negatív redukciós potenciáljának köszönhetően az alumínium a természetben kizárólag vegyületek formájában fordul elő. Mintegy 714 ásványban található meg, elsősorban oxidok, oxi-hidroxidok és szilikátok formájában. Földkéregbeli nagy gyakorisága ellenére a Föld vízkészlete nagyon kis mennyiségű alumíniumot tartalmaz. Ezen látszólagos kettősségnek az az oka, hogy a talajt alkotó alumíniumásványok vízdoldhatósága semleges pH-tartományban igen kicsi, valamint, hogy az elsődleges ásványaiból $Al(III)$ ion formájában felszabaduló alumínium hidroxidcsapadék formájában szinte azonnal kiválik.

Az alumínium nem létfontosságú fémion. Az élő szervezetekre gyakorolt káros hatását már több ízben bizonyították. Ásványainak oldhatatlansága következtében normál körülmények között csak igen korlátozott mennyiségben jut be az élő szervezetekbe. Az emberi tevékenység eredményezte savas esők azonban a talaj, valamint a tavak és folyók vizeinek elsavanyodását eredményezik, amelynek következtében jelentősen megnő az alumínium mobilitása, így a fémion egyre gyakrabban jelenik meg számottevő koncentrációban a felszíni vizekben, valamint a talajvízben. A természetes vizekben oldható szerves vagy szerves komplexek formájában előforduló $Al(III)$ bejuthat az élő szervezetekbe, amelyek nem rendelkeznek hatékony védekező rendszerrel ezen fémionnal szemben.

Az alumínium fitotoxicitása már a 20. század elején ismert volt. A talajban levő szabad $Al(III)$ ionok kompetitív reakcióban gátolják a növények kalciumfelvételét, ami a gyökerek elcsökevényesedéséhez és a növény pusztulásához vezethet. A savas esők hatásainak vizsgálata során összefüggést állapítottak meg a természetes vizek megnövekedett $Al(III)$ tartalma és a halállomány pusztulása között. A vizek 4–8 $\mu\text{mol/l}$ -nél nagyobb $Al(III)$ koncentrációja a halakra nézve toxikus hatású. Az $Al(III)$ szerepet játszik a halak ozmotikus egyensúlyának megbontásában és olyan légzési problémák kialakulásában, amelyeket a kopoltyúban található nyálka koagulálása okoz. Klinikai és epidemiológiai vizsgálatok sora bizonyítja az összefüggést az alumíniumnak az emberi szervezetben való felhalmozódása és egyes betegségek kialakulása között. Az alumínium toxikus hatását először a hosszan tartó hemodialízissel kezelt vesebetegeken észlelték, akiknél a kezelés során a dialízis demenciának nevezett neurológiai betegség tünetei jelentkeztek. A betegeken végzett vizsgálatok magas $Al(III)$ szintet mutattak ki a vérplazmában és a szövetekben, különösképpen az agyban. Megállapították, hogy ezekben az esetekben a fő alumíniumforrás a dialízishez

használt csapvíz, valamint az orálisan adagolt alumíniumtartalmú foszfátmegkötő-szerek voltak. A dialízis demencia társult betegségei a D-vitamin rezisztens csontlágyulás, amelynek jellemzői, hogy Al(III) halmozódik fel a csontokban; és a nem vashiányos vérszegénység, amelynek feltételezett oka, hogy a vörösvérsejtekbe jutott Al(III) gátolja a hem szintézisét. Az Al(III)-ot kapcsolatba hozzák korunk egyik legelterjedtebb, elsősorban az idősebb korosztályt érintő betegségével, az Alzheimer-kórral is.

A nagy számban végzett kutatások ellenére nem teljesen ismert a szervezetbe felszívódott Al(III) metabolizmusa és toxikus hatásainak mechanizmusa. Ennek megértéséhez és tisztázásához elengedhetetlenül fontos a fémion részecskeeloszlásának ismerete a fontosabb biológiai nedvekben és szövetekben. Számos, a fémion szállítására is alkalmas ligandum van a szervezetben, de azt, hogy fiziológiás körülmények között melyik lesz a kítüntetett molekula, a képződő komplexek stabilitása, valamint a kinetikai tényezők határozzák meg.

Az elmondottak fényében megvizsgáltuk az Al(III) kölcsönhatását olyan biológiai jelentőségű kismolekulákkal, mint az aminosavak, a foszforilált aminosavak, a citrát és a szerves foszfát. Az aminosavak és a foszforilált aminosavak — mint a peptidok és proteinek alkotórészei — az Al(III) számára fontos célmolekulák lehetnek az emberi szervezetben. Ezen kismolekulák Al(III)kötő képességének mennyiségi jellemzése segítséget nyújthat az Al(III)–fehérje rendszerek vizsgálatában. A citrát és a szerves foszfát potenciális Al(III)szállító molekulák: a vérplazma legfontosabb kis molekulatömegű Al(III)kötő biomolekuláiként tartják számon. Annak eldöntésére, hogy kettőjük közül melyik lehet a főbb Al(III)szállító kismolekula, megvizsgáltuk az Al(III)–citrát törzs- és az Al(III)–citrát–szerves foszfát egyes ligandumú rendszereket. Munkánk célja az volt, hogy:

1. meghatározzuk az Al(III) és az említett ligandumok vizes oldataiban a részecskeeloszlást és a képződő komplexek stabilitási állandóit;
2. multinukleáris NMR-spektroszkópia (^1H , ^{13}C , ^{31}P és ^{27}Al) alkalmazásával közvetlenül is alátámasztjuk az egyensúlyi adatok alapján számolt részecskeeloszlást;
3. amennyiben lehetséges, meghatározzuk a képződő komplexek kötési módját, a stabilitási adatok, valamint NMR-spektroszkópia segítségével;
4. azokban a rendszerekben, ahol lassú oligomerizációs folyamatok játszódnak le (Al(III)–citrát, Al(III)–citrát–L-foszfoserin és Al(III)–citrát–szerves foszfát rendszerek), potenciometria és NMR-spektroszkópia segítségével kimutassuk a részecskeeloszlás időbeli változását.

A biológiai rendszerek modellezése során, a részecskeeloszlás időfüggése azért lehet fontos, mert az élő szervezetekben általában nincs idő a termodinamikai egyensúly beállítására, illetve a lassú oligomerizációs folyamatok lejátszódására. A részecskeeloszlás időfüggése tehát megmutathatja, hogy fiziológiai körülmények között melyek lehetnek a jelentősebb mennyiségben és kedvezményezetten képződő komplexek, ezek pedig nem feltétlenül egyeznek meg a termodinamikai egyensúlyban számolt részecskeeloszlással.

2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

Munkánk során a pH-potenciometria és az NMR-spektroszkópia módszerét alkalmaztuk.

A potenciometriás mérésekhez kombinált üvegelektrodót és számítógép által vezérelt automatabürettát használtunk. Méréseinket 25 °C hőmérsékleten, állandó ionerősség mellett (0,2 mol dm⁻³ KCl) végeztük. A pH-metriás mérőrendszer kalibrálására erős sav–erős bázis titrálást végeztük, ennek segítségével meghatároztuk a mérési körülményeinkre jellemző víziionszorotat (13,756 ± 0,005) és az Irving-féle kalibrációs tényezőt, amely a mért pH-értékek H⁺-ion koncentrációjává alakítására szolgál. Az Al(III)–ligandum rendszerekben a képződő komplexek stabilitási szorzatait a PSEQUAD számítógépes programmal számoltuk ki.

Az Al(III)–citrát, Al(III)–citrát–L-foszfoszerin és Al(III)–citrát–szervetlen foszfát rendszerekben a lassú oligomerizációs folyamatok miatt az egyensúlyi titrálási görbéket külön minták készítésével vettük fel, 1:1 fém–ligandum aránynál és ligandumfeleslegnél egyaránt. Titrálási görbénként 30-35 különböző pH-jú mintát készítettünk. Az egyensúly beállítására 30 órát vártunk, ezután megmértük az oldatok pH-ját. A rendszerben végbemenő időbeli változások jellemzése céljából az idő függvényében követtük a különböző kezdeti pH-jú minták pH-jának változását. A pH–idő adatsorokból 0-ra extrapolálva megkaptuk a „0 időpillanatra” jellemző titrálási görbéket, amelyekből következtetni tudtunk arra, hogy milyen lehet a részecskeeloszlás a reaktánsok összekeverésének pillanatában.

Az ¹H, ¹³C, ³¹P és ²⁷Al NMR-spektroszkópiás méréseket Bruker 200, 360 és 500 MHz-es készülékeken végeztük. A spektrumokat a WINNMR-program segítségével értékeltük ki. A ¹³C és ³¹P NMR-spektrumok felvételénél a heteronukleáris HC, illetve HP csatolás megszüntetése céljából kompozit impulzus lecsatolást alkalmaztunk. Szükség esetén a jelek azonosítására két dimenziós korrelációs technikákat is használtunk (COSY, HSQC).

Az időfüggést úgy végeztük, hogy — a minták összetevőinek összekeverésétől számítva — meghatározott időpillanatokban felvettük az NMR-spektrumokat. Egyensúlyi állapotnak azt tekintettük, amikor két egymást követő spektrum azonos volt.

3. Új tudományos eredmények

Vizsgálataink legfontosabb új eredményei a következők:

1. Az egyszerű α -aminosavak a várakozásnak megfelelően gyenge Al(III)kötőknek bizonyultak. A gyenge kölcsönhatást potenciometria és NMR-spektroszkópia segítségével sikerült egyértelműen kimutatnunk. Az Al(III)-aminosav rendszerek jól leírhatók az AlA és AlAH₁ egymagvú 1:1, valamint (a glicin és a szerin esetében) az Al₂AH₁ kétmagvú komplexek feltételezésével. Az egymagvú 1:1 komplexekben egyfogu karboxilát koordináció valósul meg. Öttagú kelátgyűrű kialakulása az aminocsoport részvételével az Al(III)-nak az N-donorokhoz való kis affinitása miatt kevésbé valószínű. Kelátképződésre még a szerin esetében sem — ahol elvileg van lehetőség (COO⁻, O⁻) vagy (COO⁻, NH₂, O⁻)-típusú koordinációra — utalnak a stabilitási adatok. A kétmagvú Al₂AH₁ komplexben legvalószínűbben karboxilát- és dihidroxohidas koordináció valósul meg.
2. Az Al(III)-háromfogu aminosav (aszparaginsav, glutaminsav) rendszerekben potenciometria segítségével döntően egymagvú 1:1 komplexeket mutattunk ki. Ezek az aminosavak sokkal jobb Al(III)kötők, mint kétfogu társaik. A komplexek szerkezetét tekintve, modellvegyületekkel (borostyánkósvav, N-acetil-aszparaginsav) való összehasonlítás alapján igazoltuk, hogy az aszparaginsav esetén az aminocsoport deprotonálódásával és a fémionhoz való kötődésével háromfogu (COO⁻, NH₂, COO⁻) koordináció valósul meg. Ezt a kötémódot a komplexek ²⁷Al NMR-jeleinek kémiai eltolódás értékei is alátámasztják. A háromfogu koordináció a glutaminsavkomplexek esetén sem zárható ki, bár a képződő (5+7)-tagú csatolt kelát kétségtelenül kisebb stabilitással bír, mint az aszparaginsav (5+6)-tagú kelátkomplexei. Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a negatív töltésű karboxilátcsoportok mellett, kedvező térbeli elhelyezkedés esetén, az aminocsoport — nemcsak az aminosavak, de valószínűleg a peptidek és fehérjék esetében is — részt vehet az Al(III) megkötésében. Hasonlóan

kedvező térbeli helyzete ellenére, a merkaptoborostyánkősav tiocsoportja megnövekedett Al(III)kötő képességére nem utaltak a stabilitási adatok.

3. Az Al(III)–foszforilált aminosav rendszerekben a potenciometriás titrálási görbéket egymagvú 1:1 komplexek feltételezésével tudtuk legjobban kiértékelni. Az L-foszfortirozin Al(III)komplexei stabilitási állandóinak értéke döntően foszfátkoordinációra utal. A jelgazdag ^{31}P NMR-spektrumok az 1:1. komplexek több kötési izomerének jelenlétét mutatják. A foszfát koordinálódhat egyfogúként, kétfogúként négytagú kelátot képezve vagy kialakíthat hattagú kelátkomplexet az egyik foszfátotigén és a fémionhoz kapcsolódó egyik vízmolekula vagy OH^- -ion között kialakuló hidrogénkötés révén. Az L-foszfoszerin komplexeinél (5+6)-tagú csatolt kelátot tartalmazó izomert is valószínűsítettünk — a foszfát-, a karboxilát- és a deprotonált aminocsoport egyidejű koordinációjával. Ez ismét egy jó példa arra, hogy a hard jellegű Al(III)iont nem kedvelő aminocsoport is lehet kötési hely, kedvező sztérikus elrendeződés esetén.
4. Az Al(III)–citrát rendszerben a lassú oligomerizációs folyamatok következtében a hagyományos titrálási technika nem volt alkalmas a képződő komplexek összetételének és stabilitási állandóinak pontos meghatározására, ezért a potenciometriás titrálási görbéket külön minták készítésével vettük fel (2. fejezet). Az irodalomban közölt korábbi eredményeket alapul véve, a pH ~ 8-ig rendelkezésünkre álló potenciometriás adatok kiértékelése során a következő részecskéket találtuk: AlAH , AlA , AlAH_1 , AlAH_2 , AlA_2 , AlA_2H_1 , AlA_2H_2 és $\text{Al}_3\text{A}_3\text{H}_4$. A részecskeeloszlás időbeni változását követve kimutattuk, hogy kezdetben az egymagvú komplexek képződnek gyors egyensúlyi folyamatban, amelyek aztán lassú folyamatban hárommagvú $\text{Al}_3\text{A}_3\text{H}_4$ részecskévé alakulnak. Az egyensúlyban a hárommagvú komplex még ligandumfelesleg esetén is jelentős mennyiségben van jelen.
5. Az egymagvú 1:1 és 1:2 komplexeket, valamint a hárommagvú $\text{Al}_3\text{A}_3\text{H}_4$ részecskét ^1H , ^{13}C és ^{27}Al NMR-mérésekkel is azonosítottuk, illetve meghatároztuk az egymagvú komplexek oldatbeli szerkezetét. Az 1:1 komplexekben háromfogú koordináció valósul meg a citrát egyik terminális karboxilát-, centrális karboxilát- és hidroxilcsoportjának részvételével. Megállapítottuk, hogy a komplexek fluxionálisak, amit a jelszegény NMR-spektrumok is alátámasztanak. Az AlA és AlAH_1 komplexek esetén egy másik kötési izomer jelenlétére is utalnak az NMR-spektrumok, amelyben feltehetően (6+6)-os kelátkomplex jön létre, a két terminális karboxilát- és a deprotonált hidroxilcsoport koordinálódásával.

6. Az 1:2 komplexek vizes oldatban megőrzik a szilárd fázisban meghatározott szerkezetüket: a két citrátmolekula egymásra nézve szimmetrikusan, terminális és centrális karboxilát-, valamint deprotonált hidroxilcsoportjával kötődik az Al(III)-hoz. Az 1:2 komplexek is fluxionálisak, ami az NMR-spektrumok egyszerűségét és a jelek kiszélesedését okozza. A szilárd 1:2 komplexek vízben való oldása révén ^1H és ^{13}C NMR-mérésekkel bizonyítottuk, hogy ezek lassú oligomerizációval alakulnak hárommagvú $\text{Al}_3\text{A}_3\text{H}_4$ részecskévé. Az egyensúlyi spektrumban a megmaradt 1:2 komplex, a hárommagvú részecske és a szabad citrát jeleit látjuk. Az oligomerizáció során kimutattunk egy köztiterméket és meghatároztuk jellemző ^1H és ^{13}C NMR-paramétereit. Jelgazdag NMR-spektruma alapján a köztiterméket egy aszimmetrikus szerkezetű dimer komplexnek valószínűsítettük. Mind az 1:1, mind az 1:2 komplexek esetén gyors a protoncsere a különböző deprotonáltságú részecskék között. A szabad citrát és az egymagvú komplexek között 25 °C-on lassú ligandumcsere folyamatok játszódnak le.
7. A vegyes ligandumú rendszerek potenciometriás vizsgálata során is az Al(III)-citrát rendszerben használt technikát alkalmaztuk. Az Al(III)-citrát(A)-L-foszfoserin(B) rendszerben a törzskomplexek mellett az AlABH_2 és AlABH , valamint friss oldatokban az AlAB vegyes ligandumú komplexek képződését mutattuk ki, potenciometria és NMR-spektroszkópia alkalmazásával. Egyensúlyi állapotban ez utóbbi részecske elhanyagolható mennyiségben van jelen, mivel semleges és gyengén bázikus pH-tartományban képződő $\text{Al}_3\text{A}_3\text{H}_4$ részecske kiszorítja a foszfoserint komplexeiből.
8. Az Al(III)-citrát(A)-szervetlen monofoszfát(B) rendszerben a törzskomplexek mellett az AlABH_2 , AlABH , AlAB -t és AlABH_1 vegyes ligandumú komplexeket találtuk potenciometriásan. A vegyes ligandumú részecskék képződését ^{31}P NMR-mérésekkel is alátámasztottuk. Elsőként azonosítottuk — közvetlen, ^{31}P NMR-módszerrel — fiziológiás pH-n az Al(III)-foszfát törzskomplexeket. Potenciometria és NMR-spektroszkópia alkalmazásával mindkét vegyes ligandumú rendszerben kimutattuk a hárommagvú részecske lassú időbeni képződését.
9. A vérérum legjelentősebb Al(III)kötő kismolekulájának kérdésében (a citrát vagy a foszfát-e a jelentősebb), az Al(III)-citrát-foszfát rendszer stabilitási adatainak felhasználásával számolt részecskeeloszlás, azt mutatja, hogy fiziológiás pH-n és vérérumbeli koncentrációviszonyok mellett a nem transzferrinhez kötött Al(III) döntő része AlAH_2 citrátokomplex formájában van jelen, de az AlBH_1 foszfátokomplex és a vegyes ligandumú komplexek képződése sem elhanyagolható. Ilyen körülmények között az oligomerizációs folyamatok teljesen visszaszorulnak.

Az értekezés anyagához kapcsolódó közlemények

1. Tamás Kiss, Andrea Lakatos, Erzsébet Kiss and Bruce Martin, *Interaction of Al(III) with Biomolecules: Bioinorganic Chemistry and Biological Implication*, NATO ASI Series, Ed. N. Hadjiliadis, Kluwer Publ., Dordrecht, 1996
2. T. Kiss, I. Sóvágó, I. Tóth, A. Lakatos, R. Bertani, A. Tapparo, G. Bombi, R. Bruce Martin: Complexation of aluminium(III) with several bi- and tri-dentate amino acids, *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.*, 1967-1972, (1997)
3. Erzsébet Kiss, Andrea Lakatos, István Bányai and Tamás Kiss: Interactions of Al(III) with phosphorylated amino acids, *J. Inorg. Biochem.*, **69**, 145-151, (1998)
4. M. Matzapetakis, C.P. Raptopoulou, A. Terzis, A. Lakatos, T. Kiss, A. Salifoglou: Synthesis, Structural Characterization and Solution Behaviour of the first Mononuclear Aqueous Aluminum Citrate Complex, *Inorg. Chem.* **38**, 618, (1999)
5. Tamás Kiss, Tamás Jakusch, Melinda Kilyén, Erzsébet Kiss, Andrea Lakatos, *Polyhedron*, **19**, 2389-2401, (2000)
6. Andrea Lakatos, István Bányai, Patrick Decock, Tamás Kiss: Time dependent solution speciation of the Al^{III}-citrate system: potentiometric and NMR studies, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 461-469, (2001)
7. M. Matzapetakis, M. Kourgiantakis, M. Dakanali, C.P. Raptopoulou, A. Terzis, A. Lakatos, I. Bányai, T. Kiss, L. Iordanidis, T. Mavromoustakos, A. Salifoglou: Synthesis, pH-dependent Structural Characterization and Solution Behavior of Aqueous Aluminum and Gallium Citrate Complexes, *Inorg. Chem.* (megjelenés alatt)
8. Andrea Lakatos, Ferenc Evanics, György Dombi, Roberta Bertani, Tamás Kiss: Speciation of Al^{III} in blood serum: Al^{III}-citrate-phosphate ternary system, *Eur. J. Inorg. Chem.* (beküldve)

9. Andrea Lakatos, István Bányai, Tamás Kiss: Time dependent solution speciation of the Al(III)-citrate-L-phosphoserine system: potentiometric and NMR spectroscopy studies (előkészületben)

Az értekezés anyagához közvetlenül nem kapcsolódó közlemények

1. D. Champmartin, P. Rubini, A. Lakatos, T. Kiss: Complexes of aluminium(III) with glucose-6-phosphate in aqueous solution, *J. Inorg. Biochem.*, (megjelenés alatt)
2. A. Lakatos, R. Bertani, A. Venzo, D. Favretto, F. Benetello, A. Tapparo, G.G. Bombi, T. Kiss: Complexes of Al(III) with saccharic acid and mucic acid, (előkészületben)

Konferencia előadások és poszterek

1. Lakatos Andrea Kiss Tamás és Tóth Imre: Időfüggő részecskeeloszlási vizsgálatok az Al(III)-citromsav rendszerben XXXI. Komplexkémiái Kollokvium, Tata, 1996. Június 5-7. (előadás)
2. A. Lakatos, T. Kiss and I. Tóth: Time-dependent speciation in Al(III)-hydroxycarboxylic Acid Systems. Relevance to Modeling Calculations, Cytotoxic, Mutagenic and Carcinogenic Potential of Heavy metals Related to Human Environment, NATO Advanced Study Institute, Przesieka, Poland, 15-26 June, 1996 (poszter)
3. Lakatos A., Bányai I. és Kiss T., A vérplazma Al(III)-kötő sajátosságának vizsgálata. Al(III)-citrát-foszfát kölcsönhatás, XX. Kémiai Előadói Napok, Szeged, 1997. október 13-15. (előadás)
4. Lakatos A., Bányai I. és Kiss T., Kis molekulatömegű Al(III)-kötő ligandumok a vérplazmában, XXXIII. Komplexkémiái Kollokvium, Paks, 1998. május 27-29. (előadás)

5. A. Lakatos, T. Kiss and I. Bányai, Aluminium(III) speciation in blood plasma. Study of Al(III)-citrate-phosphate ternary system, COST D8 and EŠF WORKSHOP on Biological and Medicinal Aspects of Metal Ion Speciation, Szeged, August 22-25, 1998 (előadás)
6. A. Lakatos, T. Kiss and I. Bányai, Aluminium(III) speciation in blood plasma. Study of Al(III)-citrate-phosphate ternary system XXXIII ICC, Florence, Italy, Aug 30-Sept 4, 1998 (poszter)
7. Andrea Lakatos, Tamás Kiss, Henryk Kozłowski: Al(III)-binding capability of the phosphonic derivatives of nitrilotriacetate and iminodiacetate, Third Keele Meeting on Aluminium, Stoke-On-Trent, UK, February 22-24, 1999 (poszter)
8. Andrea Lakatos, Roberta Bertani, Tamás Kiss: Complexes of Al(III) with saccharic acid and mucic acid, V. Symposium on inorganic biochemistry towards molecular mechanisms of metal toxicity, Wrocław, Poland, September 23-27, 1999 (poszter)
9. Lakatos Andrea, Az Al(III) kölcsönhatása kis biomolekulákkal: pH-metriás és NMR-spektroszkópiás vizsgálatok, Komplex Kémiai Munkabizottsági Ülés, Szeged, 2000. március 23 (előadás)