

Zárójelentés

Oxidatív katalízis metalloenzim modellekkel

c. OTKA témáról

Témavezető:
Dr. Simándi László

OTKA szám: K60241

MTA Természettudományi Kutatóközpont
2012

Bevezetés

Az élő szervezetben lejátszódó oxidációs reakciók nagy részét valamilyen oxidoreduktáz enzim katalizálja. A reakciók során melléktermékként keletkező reaktív oxigén származékokat (ROS: szuperoxid gyök-anion, hidroxil gyök, peroxid stb.), mely az adott enzim hiányos működésének vagy túltermelésének a következménye számos betegség (gyulladásos betegségek, rák, idegi alapú rendellenességek) kiváltó okaként tartják számon. Ennek eredményeképpen az utóbbi évtizedben jelentős érdeklődés irányult mesterséges vegyületek (bioutánzó enzimek) előállítására, szerkezeti és működési modellek vizsgálatára.

A kutatásaink során, új és korábban előállított oxim típusú ligandumokkal alkotott vas-, és mangán- fémkomplexek oxidoreduktáz enzimutánzó tulajdonságainak vizsgálatát tűztük ki célul. Úgyszintén fontosnak tartottuk a modellreakciók vizsgálatát nemcsak szerves, hanem vizes közegben is, közelítve ez által az élő szervezetben lejátszódó folyamatokhoz.

Az OTKA pályázat futamideje alatt sajnálatos események és számos szervezeti változás történt. Az MTA Központi Kémiai Kutató Intézetben működő és általam vezetett Biomimetikus Katalízis Osztály megszűnése (2006 folyamán) és egészségi állapotom megromlása, a pályázat egyik résztvevőjének, Szigyártó Imolának, átkerülését eredményezte a Felületmódosítás és Nanoszerkezetek Osztályára; majd az ottani és a pályázatunk haladását támogató osztályvezetőnek, Dr. Kálmán Erikának, halála, újabb osztályátszervezést eredményezett és a Biológiai Nanokémia Osztályra került át a résztvevő. A pályázat másik résztvevője (Simándi Lászlóné) végleg nyugdíjba vonult (2007).

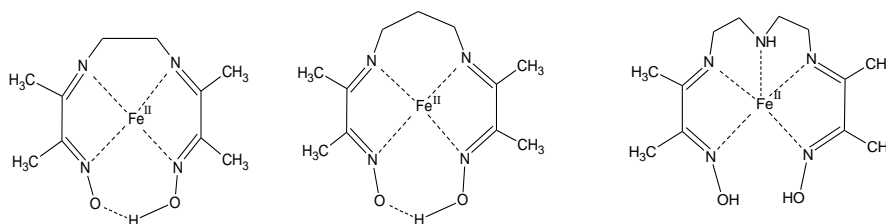
A zárójelentésben az alábbi fő témákról számolunk be:

1. Dioximátó-vas(II)komplexek, mint funkcionális oxidáz enzim modellek;
2. Fenoxazinon szintetáz modellek aktivitásának vizsgálata;
3. Új nikkell komplex előállítása, jellemzése és katalitikus vizsgálata;
4. A mangán(II) katalitikus tulajdonsága szerves és vizes közegben;
5. Szuperoxid dizmutáz és kataláz modellkomplex vizsgálata.

1. Dioximátó-vas(II)komplexek, mint funkcionális oxidáz enzim modellek

Folyamatos érdeklődés tapasztalható a dioxigén aktiválására, mely szorosan kapcsolódik a természetes oxigénhordozók (hemoglobin ill. mioglobin) szerepének és működési mechanizmusának tanulmányozásához, valamint a hem-típusú monooxigenázok (pl. citokrom P-450) ill. a nem-hem-típusú dioxigenázok vizsgálatához és modellezéséhez. Az előállított vas-porfirin komplexek nagy része - bár mutatta a citokróm P-450 aktivitását és szelektivitását -, a porfirinyűrű bomlása a katalitikus tulajdonságokat rontotta. Az egyik fontos nem-hem-típusú enzimcsalád a pirokatechin oxidáz, mely az *o*-difenol származékok oxidációját katalizálja a megfelelő *o*-benzokinonná. A pirokatechin oxidázok fontos szerepet töltenek be az élővilágban. Fontos szerepük van továbbá a gyümölcsök (pl. banán) levegő hatására bekövetkező elszíneződésében, ill. az emberi bőrt színező melanin bioszintézisében.

1.1. A dioximátó-vas(II) komplexek (1. ábra.) a dioxigén aktiválására alkalmasnak bizonyultak és katalitikus hatást fejtettek ki a 3,5-di-*terc*-butil-pirokatechin (H₂dtbc) oxidációjában, metanol oldószerben. A ligandumokat diacetil-monoxim (dm) és etilén-diamin (ed), propilén-diamin (pd), ill. dietilén-triamin (dt) kondenzációjával állítottuk elő.



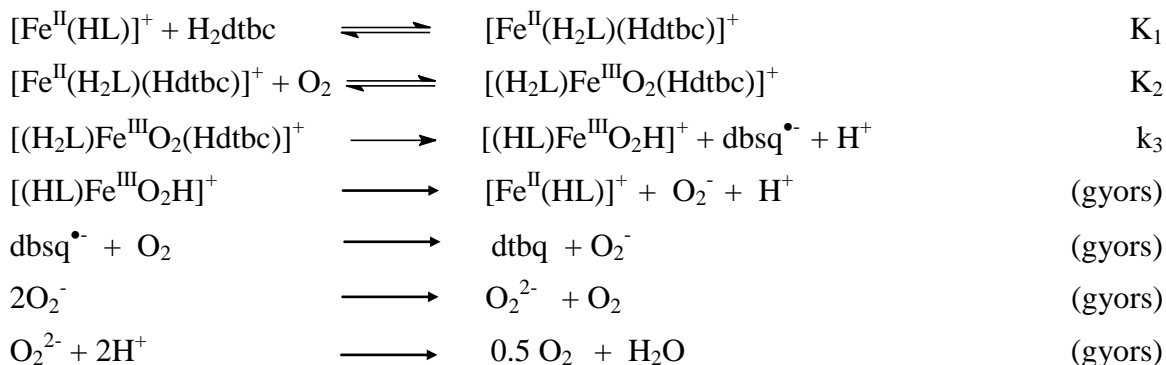
1. ábra. Az $[\text{Fe}(\text{Hdmed})]^+$; $[\text{Fe}(\text{Hdmpd})]^+$; $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{dmdt})]^{2+}$ komplexek szerkezete

A katalitikus reakciók mechanizmusának megállapítására részletes kinetikai vizsgálatokat végeztünk. A kinetikai méréseket állandó nyomáson, gázvolumetriás módszerrel, az O_2 -elnyelés kezdeti sebességének (V_k) mérésével végeztük látszólagos elsőrendű körülmények között.

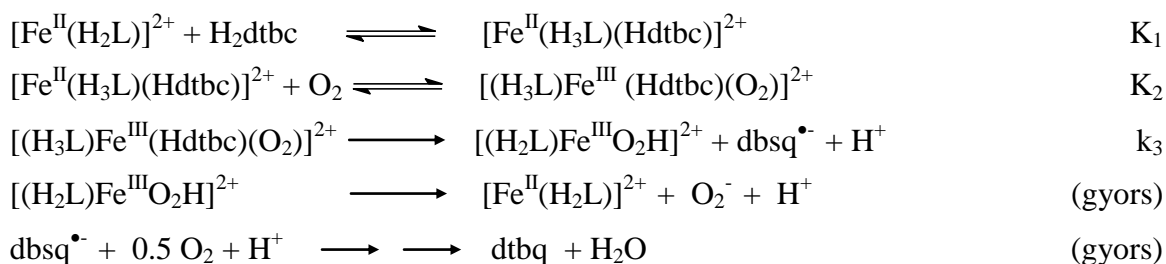
A kezdeti O_2 -elnyelési sebesség (V_k) függése a katalizátor kezdeti koncentrációjától lineáris függést mutat. A katalizátorra vonatkozó részrend tehát mindhárom katalizátor-komplex esetében egységnyinek adódik. Úgyszintén lineáris függést tapasztalunk a dioxigén felvétel kezdeti sebességére a kezdeti dioxigén koncentrációtól. A kezdeti O_2 -elnyelési sebesség telítési görbe szerint változik a szubsztrátum kezdeti koncentrációjával, ami az enzimkinetikából jól ismert katalizátor-szubsztrátum komplex képződésére utal (Michaelis-Menten kinetika).

A javasolt reakciómechanizmus összhangban van a sebességi egyenlettel, figyelembe véve a ligandum szerkezetét: H_2dmed és H_2dmpd esetén négyfogú, míg H_2dmdt esetén ötfogú a ligandumként funkcionál. Erre a feltételezett közbenső termékek felírásánál tekintettel kell lenni, mivel két eset különböztethető meg:

1. eset: $\text{H}_2\text{L} = \text{H}_2\text{dmed}$ vagy H_2dmpd



2. eset: $\text{H}_2\text{L} = \text{H}_2\text{dmdt}$



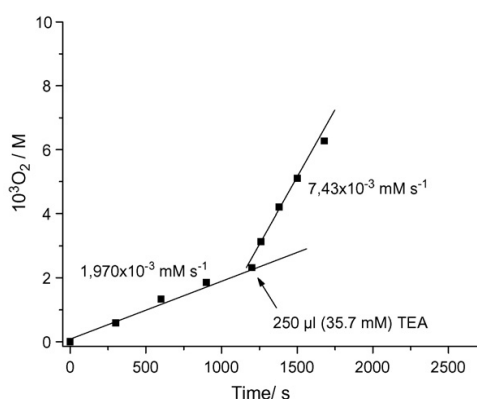
A bruttó reakciók sztöchiometriája szerint mindkét esetben a dioxigén mindkét oxigénatomja vízzé redukálódik. A $\text{dbsq}^{\bullet-}$ szemikínon gyökanion diagnosztikus értékű köztitermék, amelyet ESR spektroszkópiás módszerrel sikerült kimutatnunk és így a reakció gyökös jellegének fontos bizonyítékához jutottunk. Az ESR mérések és a spektrumok kiértékelése az MTA KK ESR Spektroszkópiai Laboratóriumába készültek (Dr. Korecz László és Dr. Rockenbauer Antal).

A fenti reakciómechanizmusoknak megfelelő kinetikai egyenlet a következő:

$$V_k = \frac{k_3 K_2 K_1 [\text{Fe}]_0 [\text{H}_2\text{dtbc}]_0 [\text{O}_2]_0}{1 + K_1 [\text{H}_2\text{dtbc}]_0}$$

1.2. Vas-aktivált bázis katalízis

Trietil-amin bázis jelenlétében a 3,5-di-*terc*-butil-pirokatechin oxidációja benzokinonná háromszor-négyszer gyorsabb metanol oldószerben, mint bázis nélkül. Ezt szemlélteti a 2. ábra.

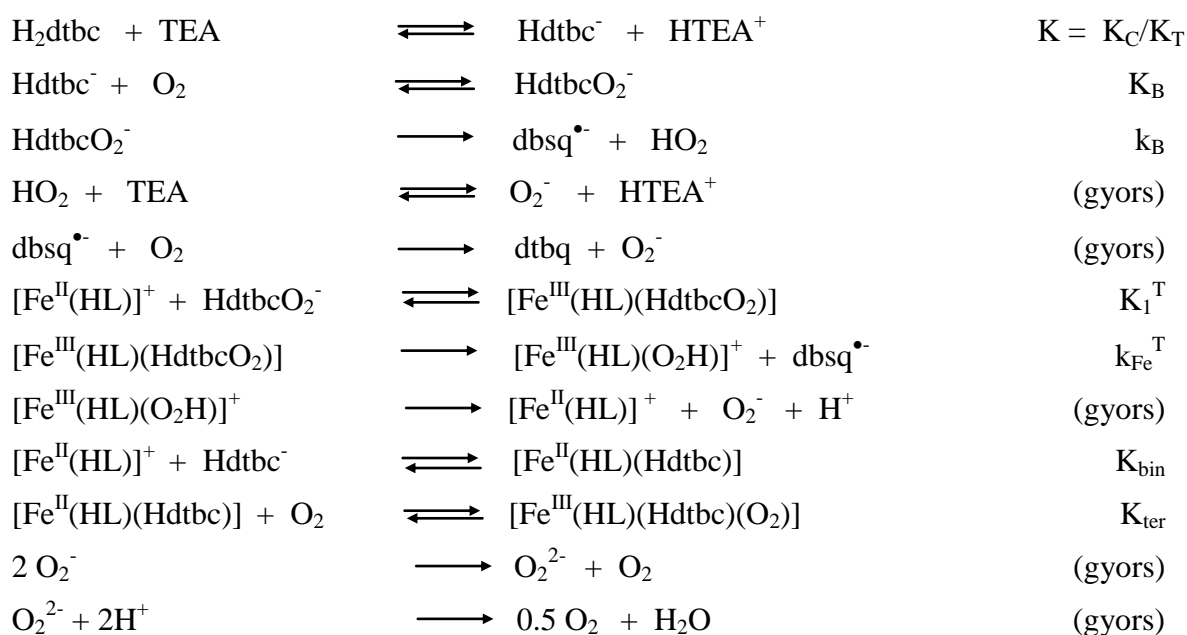


2. ábra. Dioxigén felvétel kezdeti sebessége TEA beinjektálás előtt és után

A kinetikai méréseket trietil-amin (TEA, $\text{pK}_a = 9,73$) jelenlétében végeztük. Erős lúg (NaOH, KOH) használatát a komplex bomlása miatt mellőztük. Gyenge bázisok esetén, mint a piridin vagy az 1-metil-imidazol, a gyorsító hatás nem jelentős.

A promotor-hatást feltételezésünk szerint a bázist katalizált pirokatechin oxidáció hidroperoxid jellegű köztiterméke (HdtbcO_2^-) és a vas(II) közötti terner komplexképződés idézi elő. A reakciómechanizmus megállapítására ebben az esetben is részletes kinetikai méréseket végeztünk. Hasonlóan a bázis nélküli rendszerekhez itt is megállapítottuk a reaktánsok részrendjét. A dioxigénfelvétellel jellemzett oxidáció kezdeti sebessége elsőrendű függést mutat a kezdeti katalizátor- és dioxigén koncentrációtól, míg telítési görbe szerint változik a szubsztrátum és TEA kezdeti koncentrációjával, mindhárom fémkomplex esetén. Ezekben a modellrendszerekben a megfigyelt kinetikai viselkedés összhangban van a következő reakciómechanizmussal:

1. eset: $H_2L = H_2dmed$ vagy H_2dmpd



2. eset: $H_2L = H_2dmdt$

Ebben az esetben a reakciómechanizmus kissé módosul: a K_{ter} egyensúly elhagyható, mert 7-es koordinációjú terméket eredményezne.

A bázis által katalizált oxidációban a H_2dtbc először deprotonálódik, majd a monoanion O_2^- -t köt meg a $HdtbcO_2^-$ hidroperoxid formájában. A fő és egyben leggyorsabb oxidációs reakciót a hidroperoxid aktiválása a vaskomplex által, ami az $[Fe^{II}(Hdmed)(HdtbcO_2)]$, $[Fe^{II}(Hdmpd)(HdtbcO_2)]$ és az $[Fe^{II}(H_2dmdt)(HdtbcO_2)]^+$ hidroperoxo köztitermék-komplexeket eredményezi. E komplexek mindegyike $dbsq^{\bullet-}$ gyökianiont képes eliminálni, amely gyors lépésben tovább oxidálódik kinonná. Elvileg a H_2dtbc oxidációja TEA részvétele nélkül, tehát egyedül a vas komplexek hatására is lejátszódhat, bár csak elhanyagolható sebességgel.

A 'vas-aktivált bázis katalízis' a következő kinetikai egyenlettel írható le:

$$V_{in} = \frac{(k_B + k_{Fe}^T K_1^T [Fe]_o) K_B [H_2dtbc]_o [O_2]_o}{1 + K_C [H_2dtbc]_o / K_T [TEA]_o}$$

A feltételezett reakciómechanizmus összhangban van a megfigyelt kinetikai viselkedéssel.

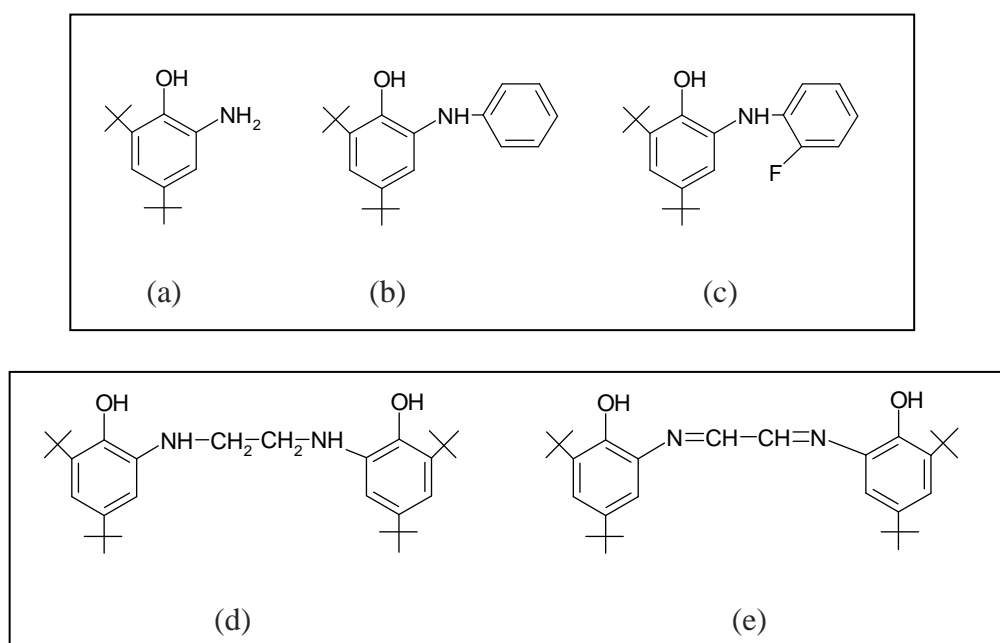
Az általunk előállított és pirokatechin oxidáz aktivitást mutatott vas(II)komplexekről hazai és nemzetközi fórumon számoltunk be. Eredményeink 2 publikációban és egy doktori disszertációban kerültek bemutatásra [1,2,3].

2. Fenoxazinon szintetáz modellek aktivitásának vizsgálata

A fenoxazinon szintetáz enzim katalizálja egy amino-fenol származék összekapcsolódást aktinomicinsavvá, mely az utolsó előtti intermedier az aktinomicin D bioszintézisében, mely a klinikai gyakorlatban is alkalmazott citosztatikum.

Kimutattuk, hogy a dioximáto-mangán(II), valamint a dimetil-glioximáto-vas(II) funkcionális modelljei ezen enzimnek is és vizsgáltuk a 2-amino-fenol katalitikus oxidációját 2-amino-fenoxazin-3-onná.

A funkcionális modellek tárházát kívántuk bővíteni a 2-amino-fenol származékokkal. Szubsztrátumként a 2-amino-4,6-di-terc-butil-fenolt (a), 2-anilino-4,6-di-terc-butil-fenolt (b), 2-(2-fluor-anilino)-4,6-di-terc-butil-fenolt (c), az N,N'-bis(2-hidroxi-3,5-di-terc-butil-fenil)-etilén-diamint (d) és a glioxál-bis(2-hidroxi-3,5-di-terc-butil-fenil)-imint (e) állítottunk elő (3. ábra.).

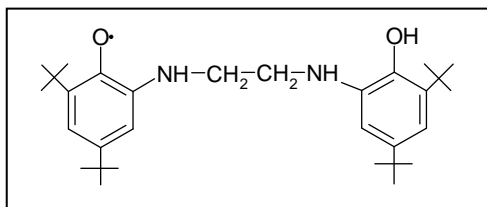


3. ábra. A 2-amino-fenol származékok, mint modell szubsztrátumok

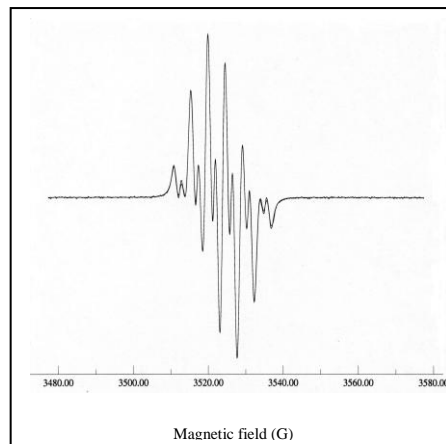
A ligandumokat elemvizelés, NMR-spektroszkópiával és ESI-MS spektroszkópia segítségével jellemeztük.

Megállapítottuk, hogy metanolos oldatban a ferroximnak nevezett komplex [bis(dimetil-glioximáto)-bis(N-metil-imidazol)-vas(II)] katalizálja ezen szubsztrátumok oxidációját a megfelelő o-benzokinon-monoimin származékokká. A 2-amino-fenol katalitikus oxidációja során tapasztalt dimerizáció (2-amino-fenoxazin-3-on keletkezik), a módosított szubsztrátumok esetén elmarad. Ezt igazolják a szabadgyök köztitermékek ESR-spektrumai is: míg a benzokinon monoimin egy instabilis köztitermék és egy újabb 2-amino-fenol molekulával gyors lépéseket követően fenoxazinonná alakul, addig az o-imino-benzoszemikinonáto szabadgyökök stabilitása szterikus sajátosságukkal magyarázható és nincs lehetőség a dimerizációra.

Az N,N'-bis(2-hidroxi-3,5-di-*tert*-butil-fenil)-etilén-diamin oxidációja ferroxim jelenlétében az alábbi ábrán (4. ábra.) feltüntetett szemikinonáto szabadgyökön keresztül játszódik le:

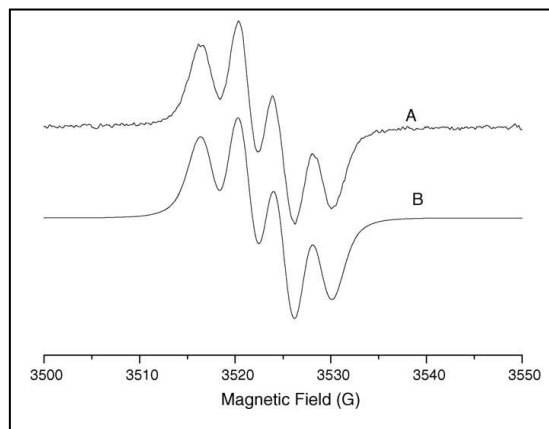
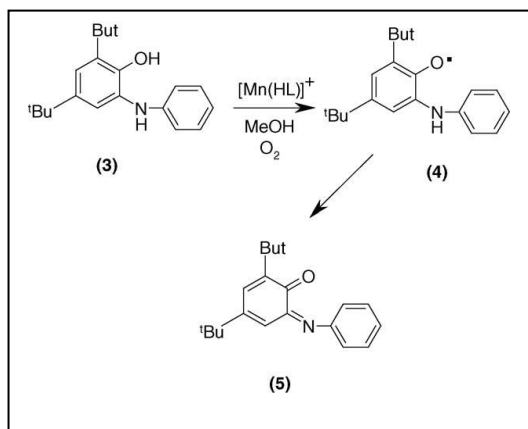


Paraméterek: $g = 2.0034$, $a_N = 4.45$ G,
 $2a_H = 4.79$ G, $a_H = 4.28$ G,
 $a_H = 1.83$ G, $a_H = 0.68$ G



4. ábra. A szemikinonáto szabadgyök ESR spektruma

Hasonlóan a ferroximhoz, a dioximátó-mangán(II)komplex is katalizálja a 2-anilino-4,6-di-*tert*-butilfenol (3) oxidációját N-fenil-4,6-di-*tert*-butil-1,2-benzokinon monoiminné (5) metanolban. Az 5. ábrán a reakció során keletkező szabadgyök mért (A) és szimulált (B) ESR-spektruma látható (paraméterek: $g = 2.0038$, $a_N = 3.51$ G, $a_H = 3.98$ G, $a_H = 1.04$ G (2H), $a_H = 0.41$ G (18H).)

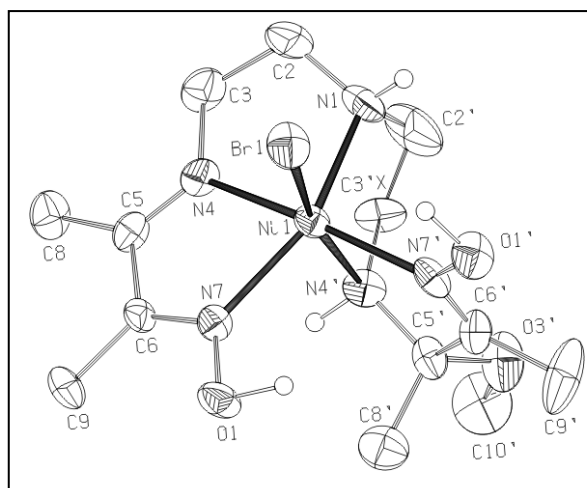


5. ábra. A szabadgyök köztitermék ESR spektruma

3. Új nikkell komplex előállítása, jellemzése és katalitikus vizsgálata [4]

A dioximátó-vas(II)komplexek katalitikus tulajdonságaiból kiindulva előállítottunk nikkell(II)komplex analógot. Korábban Brezina és munkatársai (Coll. Czech. Chem.

Commun., 1986, 830-835) előállították a H₂dmdt és a H₂dmed ligandumok perklorát- és bromid-tartalmú nikkell komplexeit, amelyek más szerkezetet eredményeztek. Kutatásunk során a diacetyl-monoxim és dietilén-triamin kondenzációjából előállított H₂dmdt ligandumot NiBr₂ metanolos oldatával kevertettük és refluxáltattuk. Majd jeges hűtés után az oldatból kivált szilárd anyagot etanolból átkristályosítottuk. Az így nyert egykristályok röntgen diffrakciós mérésre alkalmasnak bizonyultak, és a Ni(H₂dmdt)Br(MeOH) szerkezetű komplexet eredményezték (6. ábra.). A komplex röntgenszerkezetében változás mutatkozik, egy metanol molekula kovalensen kötődik a ligandum N4'=C5' kettős kötéséhez.



6. ábra. A [Ni(H₂dmdt)Br(MeOH)] komplex röntgen diffrakciós szerkezte

Megállapítottuk, hogy metanol oldószerben a komplex nem reagál a dioxigénnel és önmagában nem katalizálja a 3,5-di-*tert*-butil-pirokatechin, a pirokatechin, a hidrokinon, a 4-metil-pirokatechin, a tetrakloro-pirokatechin, mint modell szubsztrátumok oxidációját a megfelelő kinon származékká (hasonlóan a mangán-dioximáto komplexhez). Ha azonban a nikkell-komplexet az adott szubsztrátum és trietil-amin dioxigénnel reagáló elegyéhez adjuk, akkor a bázis katalizált oxidáció sebessége jelentős mértékben meggyorsul. A pirokatechin oxidáz aktivitást mutató [Ni(H₂dmdt)(MeOH)Br] hatásmechanizmusát, kinetikai viselkedését UV-látható spektrofotometriás módszerrel tanulmányoztuk. Követtük a megfelelő termékképződés kezdeti sebességének (v_k) változását a különböző katalizátor/szubsztrátum/bázis kiindulási koncentráció arány esetén. Az eredményeket az alábbi táblázat (1. táblázat) tartalmazza:

| Szubsztrát | $10^4 v_k / M s^{-1}$ | $10^4 v_b / M s^{-1}$ | v_k / v_b |
|---|-----------------------|-----------------------|-------------|
| 3,5-di- <i>tert</i> -butil-pirokatechin | 17,30 | 7,39 | 2,34 |
| 4-Me-pirokatechin | 8,05 | 5,60 | 1,44 |
| pirokatechin | 2,17 | 0,27 | 8,04 |
| tetrakloro-pirokatechin | 0,14 | 0,04 | 3,08 |
| hidrokinon | 10,30 | 0,04 | 233 |

1. táblázat: A nikkell-promotor hatás a báziskatalizált reakció sebességére (v_b)

4. A mangán(II) katalitikus tulajdonsága szerves és vizes közegben

4.1. Dioximáto-mangán(II) mint pirokatechin oxidáz modell: 3,5-di-*tert*-butil-pirokatechin oxidációja acetonitril oldószerben

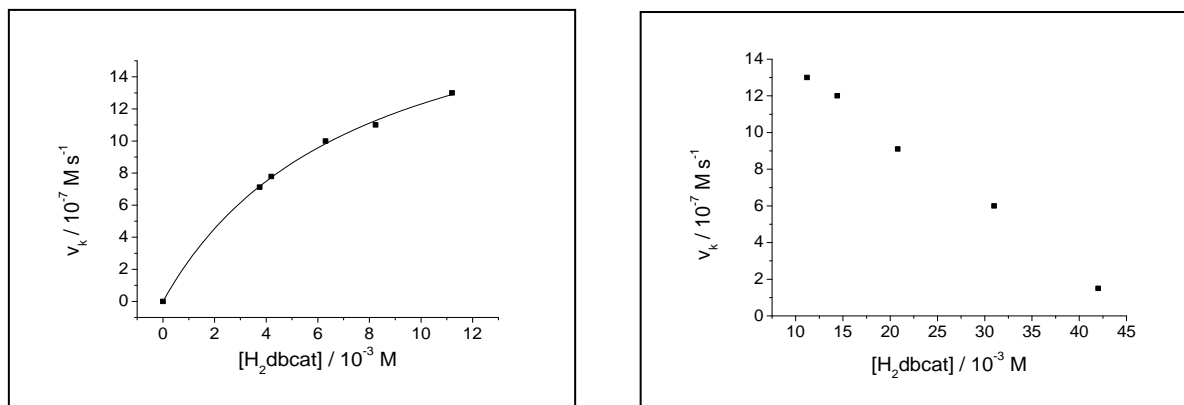
A $[\text{Mn}_2(\text{Hdmdt})_2](\text{BPh}_4)_2$ komplexről, ahol H_2dmdt $[\text{HON}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)=\text{NCH}_2\text{CH}_2]_2\text{NH}$ ligandumot jelöli, megállapítottuk, hogy gyorsítja a di-*tert*-butil pirokatechin származék bázis-katalizált oxidációját metanol oldószerben.

A dimer szerkezetű mangán komplex acetonitriles oldatának ESR spektruma nem mutatja a monomerre jellemző 6-vonalas szerkezetet, mint azt a metanolos oldatban tapasztaltuk.

Részletesen vizsgáltuk a 3,5-di-*tert*-butil-pirokatechin oxidáció kinetikáját spektrofotometriás módszerrel. Követtük az *o*-benzokinon képződés kezdeti sebességének változását a kiindulási katalizátor és szubsztrátum koncentrációjától.

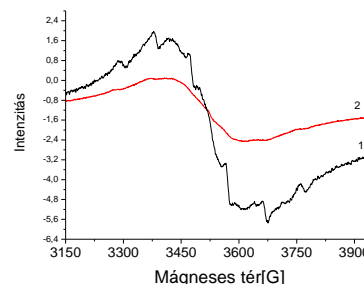
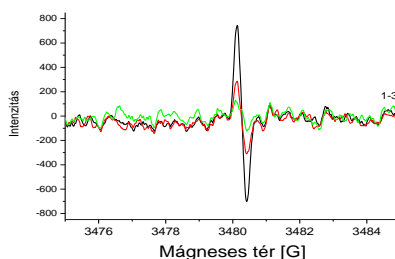
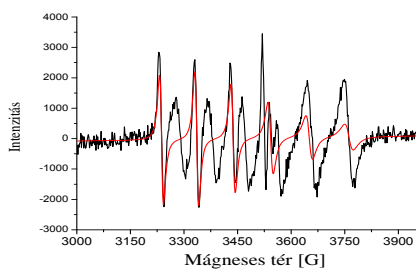
A katalizátor koncentrációjának függvényében ábrázolva a reakciósebességet, a pontokra egyenes fektethető, melynek meredeksége $(1,50 \pm 0,06) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Ez alapján a katalizátor részrendje egynek tekinthető.

A kinon képződés kezdeti sebességének függése a szubsztrátum koncentrációjától két részre bontható (7. ábra.): i.) a kiindulási szubsztrátum koncentrációja a katalizátor 30-szoros koncentráció feleslegig telítési görbe szerint változik, ami az enzimkinetikából jól ismert „enzim-szubsztrátum” vegyes komplex kialakulására utal (A); ii.) 30-szoros szubsztrátum felesleg fölött a kinon képződés sebessége lineárisan csökken (B).



7. ábra. Az oxidációs reakció sebessége a H_2dbcat kiindulási koncentrációjának függvényében, $[\text{Mn}_2]_0 = 4,20 \times 10^{-4} \text{ M}$; (A): telítési görbe, $[\text{H}_2\text{dbcat}] = 0 - 1,2 \times 10^{-2} \text{ M}$; (B): lineáris csökkenés, $[\text{H}_2\text{dbcat}] = 1,2 \times 10^{-2} - 4,2 \times 10^{-2} \text{ M}$

A reakciót ESR-spektroszkópiával is követtük: az i.) részben megjelenik a szemikinonátogyökkanion, valamint egy $\text{Mn}(\text{IV})$ -oxo komplex jelenlétét is sikerült azonosítani (8. ábra.); az ii.) részben pedig már a reakció legelején megjelenik egy szabadgyök, mely a reakció előrehaladtával a 15-ik perc után teljesen eltűnik a spektrumból. Ezzel egyidőben megjelenik egy elnyuló, inkább mangán dimerre jellemző spektrum (9-10. ábra.).



8. ábra. $[H_2dbcat] = 5,24 \times 10^{-3} M$
 $[Mn_2] = 3,41 \times 10^{-4} M$; $g = 2.015$, $a_{Mn} = 104.9 G$

9-10. ábra. $[H_2dbcat] = 4,15 \times 10^{-2} M$, $[Mn_2] = 4,17 \times 10^{-4} M$;
 9. ábra. 1-3: spektrumfelvétel 5 percnként
 10. ábra. 1: reakció kezdete, 2: 250 perc után

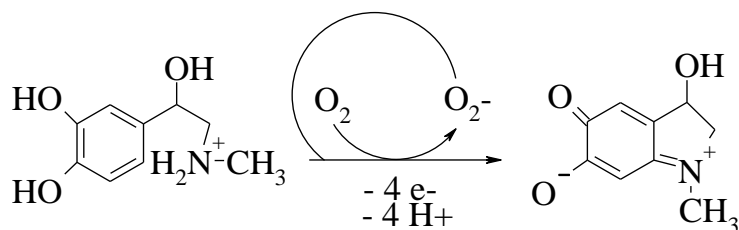
Az elvégzett reakciókinetikai mérések és az ESR vizsgálatok alapján az alábbi reakció-mechanizmust javasoljuk: feltételezésünk szerint a vizsgált reakció két előegyensúlyi lépéssel kezdődik, az elsőben kialakul a szubsztrátum-katalizátor vegyes komplex, majd a dioxigén koordinálódása történik meg, melynek során egy dioxigén-szubsztrátum-katalizátor addukt keletkezik. E terner komplex a sebességhatározó lépésben hidroperoxo-mangán(III) komplexre és szemikinon gyökianionra bomlik. A következő lépésben a peroxo-mangán(III) O-O kötése homolitikusan hasad és az így keletkező reaktív $[(HL)Mn(IV)=O]$ komplex egy pirokatechin jelenlétében további gyors lépésekben visszaképződik a katalizátor, valamint kinon és víz keletkezik. Ha azonban a szubsztrátum kiindulási koncentrációja a katalizátor koncentrációjához képest 30-szorosnál nagyobb feleslegben van, fellép a szubsztrát-inhibíció.

A dioximátó-mangán(II)komplex pirokatechin oxidáz funkcionális modellezését metanol és acetonitril oldószerben részletesen vizsgáltuk. Az eredmények egy része már publikáció formájában megjelent [5,6], másik részük hazai és nemzetközi konferenciákon ismertette lettek [I, II, III, IV, V], valamint előkészületben van publikáció [7].

4.2. A dioximátó-mangán, mint tirozináz modell

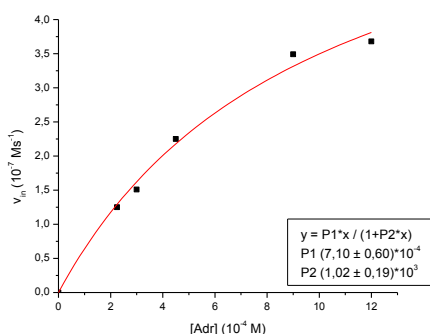
A tirozináz enzim is a polifenol-oxidázok egyik tagja és a tirozin valamint a dopamin oxidációját katalizálja. Modell szubsztrátként egy másik katecholamin származékot, az adrenalin alkalmaztunk, mely a központi idegrendszerben és a mellékvese állományban termelődik.

Az adrenalin oxidációja $NaHCO_3$ - $NaCO_3$ pH 10.2-es pufferben adrenokrómot eredményez (11. ábra.).

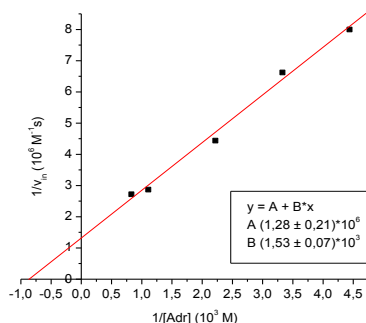


11. ábra. Adrenalin auto-oxidációja

Vizsgáltuk a dioximáto-mangán komplex hatását ezen oxidációra. Megállapítottuk a komplex gyorsító hatását az oxidációra. Részletes kinetikai vizsgálatokat végeztünk a reakció mechanizmusának megállapítására. A reakció során spektrofotometriásan követtük az adrenokróom képződés kezdeti sebességének változását. A reaktánsok részrendjének megállapítása során, a szubsztrátum esetén *Michaelis-Menten*-típusú telítési görbét kaptunk (12. ábra). Ebből arra következtettünk, hogy az oxidáció elején egy átmeneti, komplex-szubsztrátum rendszer képződik.



11. ábra. Az oxidációs reakció sebessége a szubsztrátum kiindulási koncentrációjától

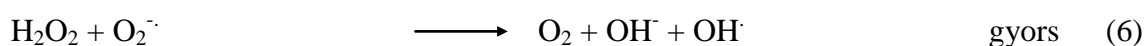
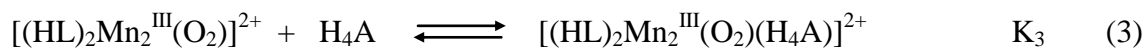
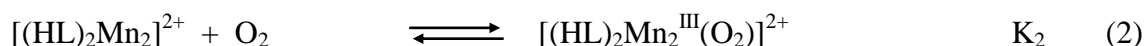


12. ábra. Lineweaver-Burk diagram

A Michaelis-állandó (K_M) és a maximálisan elérhető sebesség (V_{max}) értékeit a Lineweaver-Burk diagram segítségével határoztuk meg (12. ábra). A reakciósebességi állandó reciprokát a szubsztrátum koncentráció reciprokának függvényében ábrázolva egyenest kapunk. Meghatároztuk az állandókat $K_M = 1,19 \times 10^{-3} \text{ M}$, a $V_{max} = 7,81 \times 10^{-7} \text{ Ms}^{-1}$, a katalitikus aktivitás értéke $k_{cat} = 0,31 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, az időegység alatt átalakított szubsztrátum mennyiségét, azaz az enzim hatékonysága $k_{cat} / K_M = 0,26 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ értéknek adódik.

A katalizátor részrendjének megállapítására a reakciókat különböző katalizátor koncentrációk mellett is nyomon követtük, állandó értéken tartva a dioxigén-, valamint a kiindulási szubsztrátum koncentrációkat. A kapott reakciósebességi adatokat ábrázolva a katalizátor koncentrációjának függvényében másodfokú összefüggéshez jutottunk.

A kinetikai eredmények alapján javaslatot tettünk a reakciómechanizmusra:



A fenti mechanizmusnak megfelelő kinetikai egyenlet a következő:

$$V_{\text{in}} = \frac{k_4 K_1 K_2 K_3 [\text{Mn}]_o^2 [\text{O}_2]_o [\text{H}_4\text{A}]_o}{1 + K_3 [\text{H}_4\text{A}]_o}$$

A reakciót ESR spektroszkópiával is követtük. A monomer mangán(II) 6-vonalas szerkezete a $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ pufferben nem jelenik meg. A reakcióban keletkező hidroxid-ion kimutatására 5,5'-dimetil-1-pirrolin-N-oxid (DMPO) gyökfogót használtunk.

A mangán(II)komplex a polifenol oxidáz funkcionális modelljének tekinthető. Eredményeink hazai és nemzetközi fórumon is bemutatásra kerültek [VI, VII, VIII, IX, X], valamint publikáció is van előkészületben [8].

5.1. A dioximáto-mangán(II) nem funkcionális modellje a szuperoxid dizmutáz enzimnek

A szuperoxid dizmutázok (SOD) olyan metalloenzimek, amelyek a szervezetben lejátszódó oxidációs reakciók melléktermékeként keletkező szuperoxid gyök-aniont alakítják vízzé és hidrogén-peroxiddá. Számos közvetlen és közvetett módszer fejlődött ki az évtizedek folyamán az enzim aktivitásának mérésére.

Szuperoxid gyök-anion forrásként az adrenalin-adrenokróom reakciót választottuk, az oxidációban keletkező szuperoxid-ion jelenlétét az enzim csökkenti, ezáltal az adrenokróom képződés sebessége lecsökken. Ezzel szemben a dioximáto-mangán(II)komplex az oxidációt nem gátolja, hanem gyorsítja, így a komplex nem tekinthető a SOD funkcionális modelljének.

5.2. A mangán(II) mint kataláz modell

A szuperoxid-dizmutáz mellett a kataláz a másik oxidatív stresszt csökkentő enzim, mely a hidrogén peroxid bomlását katalizálja oxigénné és vízzé. Tehát nem meglepő, hogy ezen enzim modellezése is a figyelem középpontjába áll.

A reakció során a hidrogén-peroxid bomlását követtük spektrofotometriásan. Kísérleteinket szobahőmérsékleten, $\text{pH} = 7.0$ foszfát pufferben végeztük. A peroxid bomlás kezdeti sebességének (V_k) függése a katalizátor kezdeti koncentrációjától lineáris függést mutat. A katalizátorra vonatkozó részrend tehát egységnyinek adódik. A peroxid bomlás kezdeti sebesség telítési görbe szerint változik a szubsztrátum kezdeti koncentrációjától, ami az enzimkinetikából jól ismert katalizátor-szubsztrátum komplex képződésére utal (Michaelis-Menten kinetika). E vizsgálatok fő eredménye a reakciómechanizmus tisztázása. A kinetikai eredményekből meghatároztuk a katalízis sebességét (k_{cat}), a Michaelis-állandót (K_M) és az enzimmodell hatékonyságát (k_{cat}/K_M). Feltételezésünk szerint a reakció első lépésében egy mangán(III)komplex alakul ki, mely egy második hidrogén-peroxid molekulával reagálva mangán-hidrogén-peroxid adduktott eredményez. A sebességmeghatározó lépésben az addukt bomlik, visszaképződik a mangán(III) és víz valamint oxigén keletkezik.

Összefoglalásként megállapítottuk, hogy a dioximáto-mangán(II)komplex katalizálja a hidrogén-peroxid bomlását vízzé és oxigénné, tehát a kataláz enzim funkcionális modellének tekinthető.

Közlemények:

- 1.) Z. May, L.I. Simándi, Z. Németh:
A novel iron-enhanced pathway for base-catalyzed catechol oxidation by dioxygen.
React. Kinet. Catal. Lett., 89, 349-358, 2006
- 2.) Z. May, L.I. Simándi, A. Vértes:
Iron-assisted, base-catalyzed biomimetic activation of dioxygen by dioximatoiron(II) complexes. Kinetics and mechanism of model catecholase activity.
J. Mol. Catal. A (Chemical), 266, 239-248, 2007
- 3.) May Z.:
A dioxigén homogén katalitikus aktiválása dioximátovas(II) komplexekkel
PhD dolgozat, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Doktori Iskola, 2007
- 4.) Z. May, L. Párkányi, I. Cs. Szigyártó, L.I. Simándi:
Catalytic oxidation activity and molecular structure of a new dioximatonickel(II) complex.
Inorg. Chim. Acta, előkészületben
- 5.) I.Cs. Szigyártó, L.I. Simándi, L. Párkányi, L. Korecz, G. Schlosser:
Biomimetic oxidation of 3,5-di-*tert*-butylcatechol by dioxygen via Mn-enhanced base catalysis.
Inorg. Chem., 45, 7480-7487, 2006
- 6.) Szigyártó I.Cs.:
Dioximáto-mangán(II)komplex alkalmazása oxidáz enzimek funkcionális modellezésében
PhD dolgozat, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Doktori Iskola, 2007
- 7.) I.Cs. Szigyártó, L. Korecz, L.I. Simándi:
Solvent effect in the kinetics of dioximatomangane(II)-catalyzed oxidation of 3,5-di-*tert*-butylcatechol by O₂
J. Mol. Catal. A (Chemical), benyújtás előtt
- 8.) I.Cs. Szigyártó, L. Szabó and L.I. Simándi:
Kinetic studies on the oxidation of epinephrine catalyzed by manganese(II)complex.
J. Mol. Catal. A (Chemical), benyújtás előtt

Előadások és posztetek:

- I. Szigyártó I.Cs., Simándi L.:
Dioximáto-mangán(II) komplex alkalmazása oxidáz enzimek funkcionális modellezésében.
MTA-KKKI, X. Doktori Kémiai Iskola, Mátraháza 2007. május 7-9, (előadás)

- II. Szigyártó I.Cs., Simándi L.:
A dioxigén biomimetikus aktiválása átmenetifém-komplexekkel.
MTA, Polányi Mihály díjátadás, 2008. március 11 (előadás)
- III. I.Cs. Szigyártó, L.Korecz, L.I. Simándi:
Solvent effect in the kinetics of dioximatomanganese(II)-catalyzed oxidation of catechol derivative.
10th International Symposium Activation of Dioxygen and Homogeneous Catalytic Oxidation, July 20-25, 2008 San Servolo – Venice, Italy (poszter)
- IV. Szigyártó I.Cs., Simándi L.:
Pirokatechin oxidáz enzim funkcionális modellezése. Katalízis és/vagy inhibíció.
MTA Kutatóközponti Tudományos Napok, Budapest, 2008. december 3-5 (előadás)
- V. I.Cs. Szigyártó, L.Korecz, L.I. Simándi:
Dyxygen activation by manganese(II)-based functional oxidase model.
10th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, September 25-28, 2009 Debrecen, Hungary (poszter)
- VI. I. Cs. Szigyártó, L. Szabó, L.I. Simándi:
Functional models for catechol oxidase and phenoxazinone synthase.
5th Central European Conference – Chemistry towards Biology, Primošten, Croatia, 8-11 September, 2010 (poszter)
- VII. Szigyártó I.Cs., Szabó L., Simándi L.:
Metalloenzimek funkcionális modellezése mangán(II)komplexszel.
MTA, Kutatóközponti Tudományos Napok, 2010, november 23-25 (előadás)
- VIII. I. Cs. Szigyártó, L. Szabó, L.I. Simándi:
Kinetic studies on the autooxidation of epinephrine catalyzed by manganese(II)complexes.
XXIII International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry, Smolenice, Slovakia, June 5-10, 2011 (előadás)
- IX. Szigyártó I.Cs., Szabó L., Simándi L.:
Mangántartalmú komplex enzimutánzó tulajdonságainak vizsgálata.
MTA, Kutatóközponti Tudományos Napok, 2011, november 22-24 (előadás)
- X. I. Cs. Szigyártó, L. Szabó, L.I. Simándi:
Investigating oxidoreductase enzymes mimicking properties of manganese complex.
XI International Symposium on Applied Bioinorganic chemistry, Barcelona, Spain, 2-5 December, 2011 (poszter)