

Nikkeliont tartalmazó szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimmodellek SOD aktivitásának vizsgálata

Bonczidai-Kelemen Dóra^{1,2,3*}, Fábíán István^{1,4}, Borsos Attila³, Lihi Norbert^{1,4}

¹Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Kémiai Intézet, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Debrecen, Magyarország

²Debreceni Egyetem, Doktori Tanácsok és Iskolák, Kémia Doktori Iskola, Debrecen, Magyarország

³Premed Pharma Kft., Budaörs, Magyarország

⁴HUN-REN-DE Összetett Homogén és Heterogén Fázisú Kémiai Reakciók Mechanizmusa Kutatócsoport, Debreceni Egyetem, Debrecen, Magyarország

*Levelező szerző, e-mail: kelemen.dora@science.unideb.hu

Beérkezett: 2025. augusztus 12.; elfogadva: 2026. január 13.

Összefoglalás

A NiSOD (nikkel szuperoxid dizmutáz) enzim a legkésőbb izolált SOD enzim, amely a szuperoxid gyökánion bomlását katalizálja nagy hatékonysággal, ugyanakkor a dizmutálási reakció mechanizmusa még nem tisztázott. Ennek érdekében kutatómunkánk során a NiSOD enzim számos modellvegyületét vizsgáltuk. A peptidek nikkelkomplexeit különböző termodinamikai és szerkezetvizsgálati módszereknek vetettük alá. Tanulmányunk ezen komplexek SOD aktivitásának vizsgálatára irányul a McCord–Fridovich-módszer és stopped-flow technika segítségével. Megállapítottuk, hogy a dizmutálási ciklusban megjelenő Ni(III) komplex kialakulásának feltétele két tiolát-csoport együttes jelenléte, illetve, hogy a kis tagszámú modellek esetében a Ni(III) komplex intramolekuláris redoxidegradációja a SOD aktivitás elvesztését vonja magával.

Kulcsszavak: NiSOD, szuperoxid gyökánion, xantin/xantin-oxidáz/NBT, stopped-flow

SOD activity studies of nickel containing superoxide dismutase (SOD) enzyme models

Dóra Bonczidai-Kelemen^{1,2,3}, István Fábíán^{1,4}, Attila Borsos³, Norbert Lihi^{1,4}

¹Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

²Doctoral School of Chemistry, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

³Premed Pharma Ltd., Budaörs, Hungary

⁴HUN-REN-UD Mechanisms of Complex Homogeneous and Heterogeneous Chemical Reactions Research Group, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Summary

Superoxide dismutase (SOD) enzymes catalyze the disproportionation reaction of the superoxide radical anion to hydrogen peroxide and molecular oxygen. The nickel-containing SOD (NiSOD) was isolated ca. 20 years ago, and its structure and coordination mode significantly differ from those of other SOD enzymes. Previous studies have shown that the first six amino acid residues (HCDLPC) of the N-terminal region are essential in metal binding, and its nickel complex exhibits the same coordination mode that is characteristic for the NiSOD enzyme. However, the mechanism of the dismutation remains uncovered. Therefore, we investigated the native NiSOD enzyme fragment (HCDLPCGVY, wtNiSOD) and its mutants. The peptides and their nickel complexes were studied by thermodynamic and several spectroscopic methods (pH-potentiometry, UV-Visible, CD, and EPR spectroscopy) and their SOD activities were assessed by the xanthine/xanthine-oxidase/NBT assay (McCord–Fridovich assay) and by dedic-

ated stopped-flow measurements. While the McCord–Fridovich method is widely used, it provides only semi-quantitative description of the SOD activity and does not provide information on the reaction mechanism. For this reason, we also examined the reaction between the Ni(II) complexes and the superoxide radical anion using stopped-flow techniques.

In this study, we report the SOD activity measurements of six compounds modeling the NiSOD enzyme. By modifying the wtNiSOD peptide chain, we obtained the following mutants: SODHH (H₄DLPCGVY), SODHC (H₄DLPHGVY), wtPen (H₄PenDLPCGVY), wtCC (CCDLPCGVY), and DIM (H₄DLPCGVY-K-YVGCPLDCH), which is capable of binding two metal ions. Our results shown that the formation of the catalytically relevant Ni(III) complex requires the simultaneous existence of two cysteine residues. In accordance with this, the SODHH and SODHC mutants showed significantly lower SOD activity. The kinetic parameters obtained from the fitting of the kinetic traces indicated the appearance of a catalytically inactive component (Ni*). In the case of wtNiSOD, the complete conversion of the nickel complex to the Ni* form occurred within 50 ms, whereas for the wtPen, wtCC, and DIM mutants this transformation occurred in less than 20 ms. In NiSOD enzymes, intramolecular redox degradation does not need to be considered, so we assume that this process may be hindered due to secondary interactions originating from the structure of the enzyme.

Keywords: NiSOD, superoxide anion radical, xanthine/xanthine-oxidase/NBT, stopped-flow

Bevezetés

A szuperoxid dizmutáz (SOD) enzimek a szuperoxid gyökkanion ($O_2^{\bullet-}$) lebontásáért felelős enzimes család, amely reakcióban az $O_2^{\bullet-}$ molekuláris oxigénre és hidrogén-peroxidra bomlik (McCord–Fridovich 1969). A hidrogén-peroxid ezután különböző útvonalakon tovább bomlik a kataláz vagy a glutation-peroxidáz által katalizált útvonalakon (Abreu–Cabelli 2010). A SOD enzimek hiányában növekszik az $O_2^{\bullet-}$ koncentrációja, ami oxidatív stressz kialakulásához vezethet. Ezt az állapotot számos kóros elváltozással hozták összefüggésbe, mint a DNS-károsodás (Valko et al. 2004), szív- és érrendszeri megbetegedések (Bahorun et al. 2006), neurológiai betegségek (Christen 2000) és rákos megbetegedések (Moloney–Cotter 2018).

A SOD enzimeket szerkezetüket tekintve három csoportra oszthatjuk. A korábban felfedezett réz-/cink-, illetve mangán- és/vagy vastartalmú SOD enzimek részletes vizsgálata megtalálható a szakirodalomban (Miller 2004). A legkésőbb izolált SOD enzimek nikkellionokat tartalmaznak az aktív centrumukban, és szerkezetüket tekintve jelentősen eltérnek az eddig izolált enzimektől (Youn et al. 1996). A Fe/Mn- és Cu/ZnSOD-okban a fémionok megkötésében nitrogén és oxigén donoratomok vesznek részt, míg a NiSOD-ban nitrogén és a ciszteinek két donoratomjai (Bryngelson–Maroney 2007). A NiSOD enzimet a *sodN* gén expresszálja; alacsonyabb rendű élőlényekben, például tengeri cianobaktériumokban és különböző antibiotikumokat termelő *Streptomyces* fajokban fordul elő (Bryngelson et al. 2004).

A NiSOD enzim röntgenkristallográfiás vizsgálata kimutatta, hogy egy homohexamér, amely minden alegységben tartalmaz katalitikusan aktív nikkelliont (Choudhury et al. 1999). A fémionok a peptidek N-terminális régiójában helyezkednek el. A NiSOD enzim vizes oldatában fiziológiás pH-tartományban a nikkellionok +2-es és +3-as oxidációs állapotai egy időben vannak jelen. Az enzim redukált formájában a Ni(II)-ionokat az N-terminális

aminocsoport nitrogénje, az első amid nitrogén, valamint a második és hatodik helyen lévő ciszteinek tiolát-csoportjai koordinálják. Ezáltal egy (5,5)-tagú csatolt kelátrendszer alakul ki, amelyet a hatodik helyen lévő cisztein tiolát-csoportjával kialakuló makrokelát egészít ki. A fémion síknégyszetes geometriájú. Az enzim oxidált állapotában a Ni(III)-ionhoz ezeken felül az első helyen lévő hisztidin imidazol nitrogénje is koordinálódik axiális pozícióban, így négyszetes piramisos geometria alakul ki. A dizmutálási ciklusban a Ni(II)- és Ni(III)-ionok egymásba alakulása játszódik le egy protoncsatolt elektrontranszfer mechanizmuson keresztül, amely során két ekvivalens szuperoxid gyökkanion alakul át egy ekvivalens oxigén és egy ekvivalens hidrogén-peroxid molekulává. Ezeknek a reakcióknak a sebessége megközelíti a diffúziókontroll határát. Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a peptid N-terminális régiójának első hat aminosava (H₄DLPC) alkotja azt a minimális peptidszekvenciát, amely modellezi a NiSOD enzimek koordinációs módját és katalitikus tulajdonságait (Shearer–Long 2006).

A NiSOD enzimet szokatlan szerkezete és tulajdonságai miatt részletes vizsgálatoknak vetették alá annak érdekében, hogy felderítsék a szuperoxid gyökkanionnal lejáró reakciójának mechanizmusát. A vizsgálatok között szerepel az UV-látható (Kim et al. 1996), az elektronspin-rezonancia (ESR) spektroszkópia (Youn et al. 1996), a mágneses cirkuláris dikroizmus és a Raman spektroszkópia (Fiedler et al. 2005). Ezek a módszerek elősegítették, hogy felderítsék a szuperoxid gyökkanion NiSOD enzimek által katalizált dizmutálási reakcióját, azonban egyértelmű következtetéseket eddig nem sikerült levonni.

Az egyes komplexek, enzimek szuperoxid gyökkanionnal való reakciójának vizsgálatát SOD aktivitás mérésnek nevezzük. Az adatok kiértékelése során reakciósebességi állandókat határozhatunk meg, amelyek segítségével a különböző komplexeknek azt a tulajdonságát hasonlíthatjuk össze, hogy milyen mértékben képesek gyorsítani a szuperoxid gyökkanion bomlását. Az egyik lehetséges

módszer során impulzus-radiolízissel kvantitatívan állítják elő az $O_2^{\bullet-}$ -t, amelynek további átalakulása 260 nm-en, az $O_2^{\bullet-}$ abszorpciós maximumán detektálható UV-látható spektroszkópia segítségével. Ezzel a módszerrel közvetlen módon határozható meg a dizmutálási reakció sebességi együtthatója, és gyors időskálán milliszekundumtól szekundumig terjedő tartományban követhető a reakció (Schwarz 1981). Bár ezt a módszert az elsők között használták SOD aktivitás mérésére, hozzáférése limitált.

További, a szakirodalomban széles körben alkalmazott SOD aktivitás mérési módszer a McCord–Fridovich-féle módszer, amelynek során a xantinból húgysav és az oldott oxigénből $O_2^{\bullet-}$ képződik. Ezt a folyamatot a xantin-oxidáz enzim katalizálja. A SOD aktivitás mérése során egy indikátormolekulát, nitrokék-tetrazónium-kloridot (NBT) alkalmaznak, amely az $O_2^{\bullet-}$ -nal való reakciójában diformazánná alakul. A reakció spektrofotometriásan, 560 nm-en detektálható (Beyer–Fridovich 1987). A SOD aktivitás mérése során a kiindulási reakcióelegy a xantint, a xantin-oxidázt, valamint az NBT-t tartalmazza. Az $O_2^{\bullet-}$ és az NBT közötti reakció a vizsgált körülmények között ekkor nulladrendű kinetikát mutat. Egy adott időpillanatban az elegyhez keverjük a vizsgálni kívánt komplexet tartalmazó oldatot. Ekkor kompetíció alakul ki a szuperoxid gyökanyon iránt, mivel az NBT és a komplex is reakcióba lép vele. Ez törést okoz az eddig lineáris kinetikai görbén, és kisebb meredekségű egyenlő írá le a változást, mivel az NBT lassabban alakul át diformazánná. A két kinetikai görbe meredeksége alapján adott komplexkoncentrációnál meghatározható az inhibíció mértéke. Különböző komplexkoncentrációk esetében vizsgálva az inhibíció mértékét, egy telítési jellegű görbe írható le, amelyről leolvasható az 50 százalékos inhibícióhoz (IC_{50}) tartozó komplexkoncentráció. Az IC_{50} érték alapján összehasonlítható az egyes komplexek SOD aktivitása: minél kisebb ez az érték, annál hatékonyabban katalizálja a szuperoxid gyökanyon bomlását. Ez a módszer elterjedtebb, mint az impulzus-radiolízis, és jóval olcsóbban megvalósítható, azonban ennek is vannak hátrányai. A módszer csak szemikvantitatív mérést tesz lehetővé, a reakció mechanizmusáról nem kapunk információt, és nem közvetlenül az $O_2^{\bullet-}$ koncentrációját detektáljuk, illetve a xantin-oxidáz változó enzimaktivitása nehezíti a teszt reprodukálhatóságát.

A fentebb ismertetett SOD aktivitás mérések korlátai miatt kutatócsoportunkban kifejlesztettünk egy új, szekvenciális stopped-flow technikán alapuló mérési módszert. A szuperoxid gyökanyon modellezésére kálium-szuperoxidot (KO_2) használunk, amely dimetil-szulfoxidban (DMSO) jól oldódik, és kereskedelmi forgalomból, nagy tisztasággal beszerezhető. A DMSO és KO_2 elegyéhez 18-koronaétert adunk a nagyobb $O_2^{\bullet-}$ -koncentráció elérése érdekében. A kálium-szuperoxid vízzel hevesen reagál. Az általunk vizsgálni kívánt komplexek azonban vizes oldatok, ezért a méréseket víz és DMSO 1:1 térfogatarányú oldószerkeletben végezzük el.

A SOD aktivitás meghatározása főként fiziológiai pH-tartományban releváns. Ennek biztosítására 4-(2-hidroxil-etil)-piperazin-1-etánszulfonsav (HEPES) puffert alkalmazunk. A víz és a DMSO elegyede nem pillanatszerű, és spektrális változással, valamint hőfejlődéssel jár. A vizsgálatokat $25 \pm 0,1$ °C-on végezzük el, amit az oldatokat tartalmazó fecskendő és a mérőcella termosztálásával érünk el. A spektrális zavaró hatás kiküszöbölésére szekvenciális stopped-flow méréseket alkalmazunk (Kelemen et al. 2020).

A módszerfejlesztés során megállapítottuk, hogy 40 másodperc az a minimális idő, amely után már homogénnek tekinthető a víz és a DMSO elegy. A módszer során a KO_2 -ot tartalmazó DMSO és víz előkeverése történik, ami 40 s után nagy sebességgel keveredik össze a mérőcellában a komplexet tartalmazó HEPES:DMSO = 1:1 eleggyel. Az így kapott kinetikai görbék illesztéséből információkat kaphatunk a dizmutálási reakciók mechanizmusáról, illetve 260 nm-en közvetlenül a szuperoxid gyökanyon koncentrációjának változását detektálhatjuk (Kelemen et al. 2020). Ezzel a módszerrel nagyobb $O_2^{\bullet-}$ -koncentrációt érhetünk el, mint a xantin/xantin-oxidáz/NBT rendszerben, így valódi katalitikus körülmények között vizsgálhatjuk a dizmutálási reakciót. Ennek a módszernek a segítségével kívántuk vizsgálni a NiSOD enzim N-terminális végének első kilenc aminosavából (HCDLPCGVY) álló peptid-nikkelkomplexét, illetve ennek pontmutációit tartalmazó komplexek SOD aktivitását, felderítve ezáltal a szuperoxid gyökanyon NiSOD enzim által katalizált bomlásának mechanizmusát. Ez a tanulmány az általunk eddig vizsgált peptid-nikkel(II)komplexeinek SOD aktivitás vizsgálatára fókuszál, amelyben a klasszikus xantin/xantin-oxidáz/NBT rendszer és a szekvenciális stopped-flow technika segítségével meghatározott eredményeinket mutatjuk be.

Vizsgálati anyag és módszerek

Felhasznált vegyszerek

Az általunk vizsgált peptideket a Synpeptide Co. (Sanghaj, Kína) cég szintetizálta; ezeket további tisztítás nélkül használtunk fel. A ligandumok törzsadatainak koncentrációját pH-potenciometriás titrálással határoztuk meg. A spektrofotométer segítségével végzett SOD aktivitás méréshez használt xantin és xantin-oxidáz vegyszerek a Sigma-Aldrich Co., míg az NBT a Merck Kft. terméke. Az állandó pH biztosítására foszfát puffert használtunk, amelyhez a $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ a VWR International, a KH_2PO_4 pedig a Molar Chemicals Kft. által forgalmazott termék. A szekvenciális stopped-flow technikánál alkalmazott gyorskinetikai vizsgálatok során a Sigma-Aldrich Co. által forgalmazott KO_2 -ot és 18-koronaétert, valamint a Molar Chemicals Kft. DMSO oldószerét és a VWR International HEPES pufferét használtuk.

Vizsgálati módszerek

A klasszikus irodalmi SOD aktivitás méréseket Agilent Technologies Cary 8454 UV-VIS diódasoros spektrofotométer segítségével végeztük el 1,000 cm úthosszúságú kvarcküvetében 25 °C-on. A mintákban az NBT koncentrációja 0,047 mM, a xantiné 0,2 mM volt, a komplexek koncentrációja 0,5–800 μ M között változott a küvetében. Az adatok feldolgozása a spektrofotométerhez biztosított szoftverrel, a kiértékelés MS Excel és Origin programmal történt.

A stopped-flow mérések Applied Photophysics SX-20 készülékkel történtek, az adatok feldolgozása a cég által biztosított szoftverrel. A spektrofotometriás detektálás 260 nm-en, 2,000 mm úthosszúságú mérőcellában történt 25 °C-on. A vizsgálatok során a szuperoxid gyök-anion koncentrációja 0,98–1,6 mM, a Ni(II)-komplexeké 0,2–10 μ M között változott. A kinetikai görbék illesztése Scientist program segítségével valósult meg.

Vizsgálati eredmények

A peptidek és nikkellek komplexek termodinamikai és szerkezeti vizsgálatai

A NiSOD N-terminális végének első kilenc aminosavából felépülő peptidet (HCDLPCGVY; wtNiSOD) nikkellek hurokainak is nevezik. Eddigi munkánk során a peptid számos mutánsának nikkellek komplexeit vizsgáltuk. A ciszteinek szerepét cisztein-hisztidin pontmutációval térképeztük fel; ennek eredményeként két új peptidet kaptunk a második (HHDLPCGVY; SODHH) és a hatodik (HCDLPHGVY; SODHC) helyen lévő aminosav cseréjével (Libi et al. 2020). Ezután stabilizálni kívántuk a dizmutálási reakcióban átmenetileg képződő nikkellek(III) komplexet, ezért a második helyen lévő ciszteint egy penicillaminnal helyettesítettük (HPenDLPCGVY; wtPen) (Bonczidai-Kelemen et al. 2022). Az első helyen lévő hisztidin szerepét egy hisztidin-cisztein pontmutációval (CCDLPCGVY; wtCC) vizsgáltuk (Bonczidai-Kelemen et al. 2024). A NiSOD enzim több fémiont is köt, az eddig ismertett peptidek azonban csak egy nikkellekiont koordinálnak. Ezért két, az eredeti kilenc aminosavból álló peptidláncot kötöttünk össze C-terminális végükön egy lizin aminosavval (HCDLPCGVY-K-YVGCPLDCH; DIM) (Kelemen et al. 2020). Ezeket a peptideket és nikkellek komplexeket részletes termodinamikai és szerkezetvizsgálati módszereknek vetettük alá. Meghatároztuk a ligandumok protonálódási állandóit és nikkellek(II) komplexek stabilitási állandóit pH-potenciometria segítségével. A különböző pH-tartományokban feltérképeztük a komplexek szerkezetét UV-látható, CD, NMR spektroszkópia és tömegspektrometriás módszerekkel. A dizmutálási ciklus feltétele, hogy a Ni(II)-komplexekben a fémion +3-as oxidációs állapotba kerüljön az O₂⁻-nal reagálva. Az így képződő Ni(III)-komplexek szerkezetét

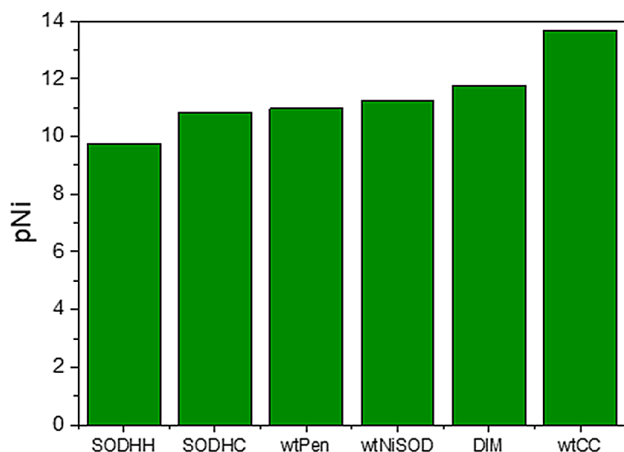
a fémion paramágneses tulajdonsága miatt ESR spektroszkópiával vizsgáltuk.

A ligandumokat érintő pontmutációk miatt a nikkellek(II) komplexek koordinációs módja különböző. A SOD aktivitás meghatározása fiziológiai pH-tartományban történik, így ilyen körülmények között releváns a Ni(II)-komplexek koordinációs módja. A wtNiSOD esetében a NiSOD-ra jellemző koordinációs mód valósul meg, vagyis a Ni(II)-iont az N-terminális hisztidin aminosav csoportja, a peptidváz első amid nitrogénatomja és a két cisztein (Cys2 és Cys6) tiolát-donorcsoportjai kötik, létrehozva az enzimben is kialakuló síknégyszetes elrendeződést. A SODHH peptid esetében ez módosul: a Ni(II)-iont az amino és a hatodik helyen lévő cisztein tiolát-donorcsoportjain kívül a két hisztidin (His1 és His2) imidazol nitrogénjei is koordinálják, oktaédres geometriát kialakítva és paramágneses komplexet létrehozva.

A SODHC esetében a natív fragmenshez képest úgy módosul a szerkezet, hogy a hatodik helyen lévő cisztein tiolát-csoportja helyett az itt található hisztidin imidazol nitrogénje koordinálódik a fémionhoz, síknégyszetes geometriát kialakítva. A penicillamint tartalmazó mutáns esetében a donorcsoportok nem módosultak a Ni(II)-komplex esetében a NiSOD-hoz képest. A wtCC mutánsnál szintén rendhagyó koordinációs mód figyelhető meg, mivel a nikkellek(II)iont az aminosav csoporton kívül a három cisztein (Cys1, Cys2, Cys6) tiolát-csoportjai koordinálják a síknégyszetes geometriájú komplexben. A DIM peptid az előzetes elvárásoknak megfelelően két fémiont képes megkötni, és a dinukleáris részecske képződése már a fémion és a ligandum 1:1 koncentrációarányú rendszerében is kedvezményezett fiziológiai pH-n. Az első fémion koordinációja viszonylag lassú, de ez szerkezeti átrendeződést indukál a peptid további részén, ami elősegíti a második fémion megkötését. A két fémionra a NiSOD enzim redukált formájára is jellemző amino-amid-két kén koordinációs mód és síknégyszetes geometria jellemző.

A vizsgált ligandumok különböző bázicitása miatt a nikkellek(II)komplexek stabilitása közvetlenül nem hasonlítható össze. Emiatt bevezetésre került egy a komplexek stabilitását jellemző, látszólagos egyensúlyi állandó, a pNi. Minél nagyobb ennek az értéke, az adott ligandum annál jobb fémkötő tulajdonsággal rendelkezik. A vizsgált ligandumok pNi-értékeit az 1. ábra mutatja be.

Az 1. ábra alapján egyértelmű, hogy a SODHH peptid mutatja a legkisebb fémionkötő affinitást a nikkellek(II) ionok irányában. Ez jó egyezésben van a komplex szerkezetével, ugyanis ebben a pH-tartományban az oktaédres komplex a domináns részecske, amelynek stabilitása kisebb, mint a síknégyszetes elrendeződésű nikkellek(II) komplexek stabilitása. A második helyen tiolát-csoporttal rendelkező aminosavat tartalmazó peptidekben a csatolt (5,5)-tagú kelátrendszerben a (NH₂,N⁻,S⁻) donoratomok nagy stabilitású, síknégyszetes geometriájú



1. ábra

A NiSOD enzimmodellek számított pNi-értékei (pH = 7,6; $c_{\text{Ni(II)}} = 10 \mu\text{M}$, $c_{\text{lig}} = 50 \mu\text{M}$, $\text{pNi} = -\log[\text{Ni}_{\text{szabad}}]$)
 Forrás: saját szerkesztés

komplexeit alkotnak. A komplexek stabilitását ilyen módon a negyedik koordinációs helyen lévő donoratom tulajdonsága határozza meg. Abban az esetben, ha a hisztidin aminosav imidazol nitrogénje (SODHC) helyett ez egy cisztein tiolát-csoportja (wtPen, wtNiSOD, DIM), a komplexek stabilitása nagyobb. A legjobb fémkötő tulajdonsággal a wtCC peptid rendelkezik, ami a három tiolát-csoport jelenlétével magyarázható a koordinációs szférában és a nikkel(II)ion két donoratomok iránt mutatott preferenciájával.

A Ni(II)-komplexek oxidációjával nyerhető Ni(III)-komplexek szerkezetét ESR spektroszkópia segítségével vizsgáltuk. A nikkel(II)komplexek oxidációja KO_2 és/vagy oxon segítségével történt fiziológiás pH-n. Korábbi tanulmányokban igazolták, hogy a NiSOD enzim oxidált formájában az ESR spektrumban található szuperhiperfinom felhasadás az N-terminális hisztidin imidazol nitrogénjének axiális koordinációjához rendelhető, aminek eredményeképp egy négyzetes piramisos geometriájú nikkel(III)komplex képződik (Libi et al. 2019). A SODHH és SODHC modellek esetében a spektrumokban nem található meg a jellegzetes felhasadás. A wtNiSOD, wtPen és DIM enzimmodellek esetében a NiSOD enzim oxidált formájára jellemző ESR spektrumokat kaptunk. A wtCC modell esetén hisztidin hiányában a Ni(III)-komplex jelenléte nem mutatható ki, azonban jelentős mennyiségű $\text{O}_2^{\cdot-}$ fogy el a rendszerből.

SOD aktivitás vizsgálata

a McCord–Fridovich-módszer alapján

A komplexek SOD aktivitásának vizsgálata az előzőekben leírt séma alapján történt. Az egyes mutánsok esetében a komplexkoncentráció tartománya SOD aktivitásuk függvényében változott. Az inhibíciós görbékből meghatároztuk a komplexekre jellemző IC_{50} értékeket, majd ebből az adatból az (1) egyenlet szerint megadható a

katalízisre jellemző sebességi állandó (k_{McCF}) értéke. Az így nyert sebességi együttható független az indikátor festékmolekula koncentrációjától, ezáltal jobb összehasonlíthatósági alapot ad az egyes modellekre nézve.

$$k_{\text{McCF}} = k_{\text{NBT}} \times [\text{NBT}] / IC_{50} \quad (1)$$

ahol $k_{\text{NBT}} = 5,94 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH = 7,8) és [NBT] a festékmolekula koncentrációját jelöli. Az IC_{50} és a belőle származó sebességi állandó értékeit az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat | A NiSOD enzimmodellek IC_{50} és katalitikus sebességi állandó értékei ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH = 7,8)

	IC_{50} (μM)	k_{McCF} ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
wtNiSOD	3,9	$6,9 \times 10^5$
SODHH	341	$7,9 \times 10^5$
SODHC	37,4	$7,2 \times 10^4$
wtCC	7	$3,8 \times 10^5$

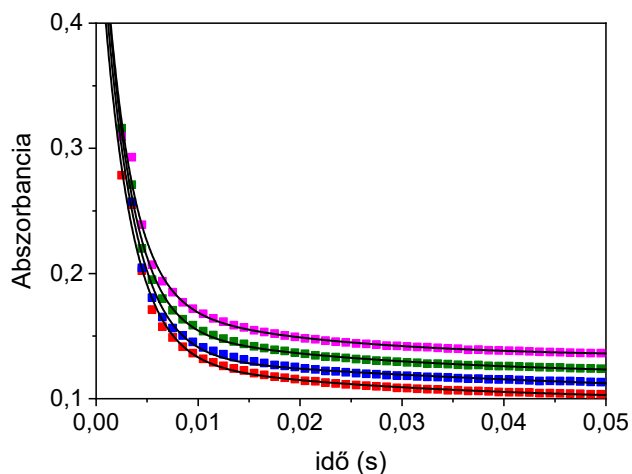
Forrás: saját szerkesztés

Az adatok alapján látható, hogy a cisztein–hisztidin pontmutáció mindkét pozícióban jelentősen csökkentette a komplexek SOD aktivitását. A hatodik helyen lévő cisztein cseréje egy, míg a második helyen lévő cisztein cseréje két nagyságrenddel növelte a modellevegyletek IC_{50} értékét. Ez összhangban van azzal a ténnyel, hogy SODHH és SODHC esetében nem sikerült detektálni a Ni(III)-komplexek ESR spektrumát. A natív enzimfragmens (wtNiSOD), továbbá a három ciszteint tartalmazó peptid (wtCC) nikkelkomplexei esetében hasonló SOD aktivitás értékeket kaptunk, ami arra enged következtetni, hogy a $(\text{NH}_2, 3\text{S}^-)$ koordinációs módú komplexek is alkalmasak lehetnek SOD mimetikumoknak.

SOD aktivitás vizsgálata szekvenciális stopped-flow készülékkel

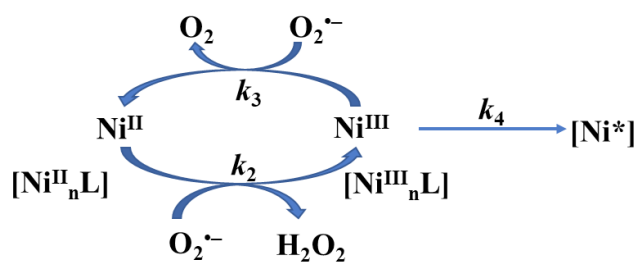
Az enzimmodellek SOD aktivitásának vizsgálata szekvenciális stopped-flow technikával részletesebb információkat adhat a dizmutálási reakció kinetikájáról. A szuperoxid gyökánion bomlása pH-függő folyamat, így fontos meghatározni az $\text{O}_2^{\cdot-}$ spontán bomlásának sebességét az alkalmazott pufferoldatban. A kinetikai vizsgálatokat ezután több különböző Ni(II)-komplex koncentráció mellett végeztük el. Ugyanakkor a szuperoxid gyökánion mindig nagy koncentrációban volt jelen, biztosítva ezáltal a katalitikus körülményeket. A wtPen nikkel(II)-komplexe és az $\text{O}_2^{\cdot-}$ közötti reakció koncentrációfüggő kinetikai görbét a 2. ábra mutatja be.

A 2. ábrán jól látható, hogy a detektálás indítását követő első 10 ms-ban a 260 nm-en detektált abszorbancia nagymértékű csökkenése tapasztalható, ami arra enged következtetni, hogy a komplex hatékonyan katalizálja az



2. ábra A szuperoxid gyökánion bomlásának időfüggése különböző kiindulási Ni(II)-wtPen komplexkoncentráció esetén HEPES (50 mM; pH=7,6) / DMSO 1:1 elegyben (piros: 19,4 μM; kék: 9,7 μM; zöld: 6,3 μM; lila: 4,8 μM) ($\lambda = 260 \text{ nm}$; $l = 2 \text{ mm}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)
 Forrás: Bonczidai-Kelemen et al. 2022

$\text{O}_2^{\cdot-}$ bomlását. A NiSOD enzimmodellek dizmutálási reakciója során a Ni(II)-komplexek oxidációja és a Ni(III)-komplexek redukciója valósul meg. A feltételezések szerint ez a ciklus Michaelis–Menten kinetikát követ, amelynek eredményeképpen a Ni(III)-komplex steady-state koncentrációban van jelen. Az általunk kapott kinetikai görbék ugyanakkor ezt nem támasztják alá. Ennek az az oka, hogy hosszabb időskálán az abszor-



2. ábra A NiSOD enzimmodellek dizmutálási reakciójának feltételezett mechanizmusa
 Forrás: saját szerkesztés

bancia monoton csökkenése tapasztalható, amihez további folyamat(ok) rendelhető(k). A dizmutálási reakció lejátszódása után a reakcióelegyet tömegspektrometria segítségével vizsgáltuk, ami igazolta, hogy a termékek nikkeliót tartalmaznak, illetve diszulfid-hidak és/vagy oxidálódott tiolát-csoportok találhatók bennük. A Ni(II)-komplexek $\text{O}_2^{\cdot-}$ távollétében stabilak, ezért ezek a további oxidációs termékek feltehetően a Ni(III)-komplexekből képződnek. A későbbiekben ezeket a termékeket Ni*-gal jelöljük. A 3. ábrán látható sémának megfelelően a kinetikai modell a (2–5) reakciókat veszi figyelembe. Az ezekhez tartozó differenciálegyenletrendszer pedig a (6–10) egyenletekkel adható meg, ahol a wtNiSOD, a wtPen és a wtCC modellek esetében $n = 1$, a DIM mutáns esetében pedig $n = 2$. A (2) egyenlet az $\text{O}_2^{\cdot-}$ spontán bomlásának egyenletét írja le. Az „L” minden esetben az adott peptidet jelöli.



$$\frac{d[\text{O}_2^{\cdot-}]}{dt} = -k_1 \times [\text{O}_2^{\cdot-}]^2 - k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}_n\text{L}][\text{O}_2^{\cdot-}] - k_3 \times [\text{Ni}^{\text{III}}_n\text{L}][\text{O}_2^{\cdot-}] \quad (6)$$

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

$$\frac{d[\text{Ni}^{\text{II}}_n\text{L}]}{dt} = -k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}_n\text{L}][\text{O}_2^{\cdot-}] + k_3 \times [\text{Ni}^{\text{III}}_n\text{L}][\text{O}_2^{\cdot-}] \quad (8)$$

$$\frac{d[\text{Ni}^{\text{III}}_n\text{L}]}{dt} = k_2 \times [\text{Ni}^{\text{II}}_n\text{L}][\text{O}_2^{\cdot-}] - k_3 \times [\text{Ni}^{\text{III}}_n\text{L}][\text{O}_2^{\cdot-}] - k_4 \times [\text{Ni}^*_n\text{L}] \quad (9)$$

$$\frac{d[\text{Ni}^*]}{dt} = k_4 \times [\text{Ni}^{\text{III}}_n\text{L}] \quad (10)$$

$$\text{Abs} = \epsilon(\text{Ni}^{\text{II}}_n\text{L}) \times [\text{Ni}^{\text{II}}_n\text{L}] + \epsilon(\text{Ni}^{\text{III}}_n\text{L}) \times [\text{Ni}^{\text{III}}_n\text{L}] + \epsilon(\text{Ni}^*) \times [\text{Ni}^*] + \epsilon(\text{O}_2^{\cdot-}) \times [\text{O}_2^{\cdot-}] + \epsilon(\text{H}_2\text{O}_2) \times [\text{H}_2\text{O}_2] \quad (11)$$

2. táblázat | A kinetikai görbék illesztéséből származó paraméterek

Paraméter	wtNiSOD érték	wtPen érték	wtCC érték	DIM érték	Egység
k_1^a	$3,84 \times 10^4$	$3,84 \times 10^4$	$3,84 \times 10^4$	$3,86 \times 10^4$	$M^{-1} s^{-1}$
k_2	$9,6 \times 10^7$	$>3,0 \times 10^8$	$6,6 \times 10^7$	$>1,0 \times 10^8$	$M^{-1} s^{-1}$
k_3	$1,72 \times 10^8$	$3,15 \times 10^7$	$1,6 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	$M^{-1} s^{-1}$
k_4	258	292	1310	215	s^{-1}
$\epsilon(Ni^{II}{}_nL)^a$	$1,48 \times 10^4$	$1,99 \times 10^4$	$1,33 \times 10^4$	$2,13 \times 10^4$	$M^{-1} cm^{-1}$
$\epsilon(Ni^{III}{}_nL)$	$2,44 \times 10^4$	$2,58 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$3,19 \times 10^4$	$M^{-1} cm^{-1}$
ϵ_{Ni^*}	$1,8 \times 10^4$	$1,57 \times 10^4$	$6,18 \times 10^3$	$6,60 \times 10^4$	$M^{-1} cm^{-1}$
$\epsilon(O_2^{\bullet-})^a$		2686			$M^{-1} cm^{-1}$
$\epsilon(H_2O_2)^a$		38			$M^{-1} cm^{-1}$

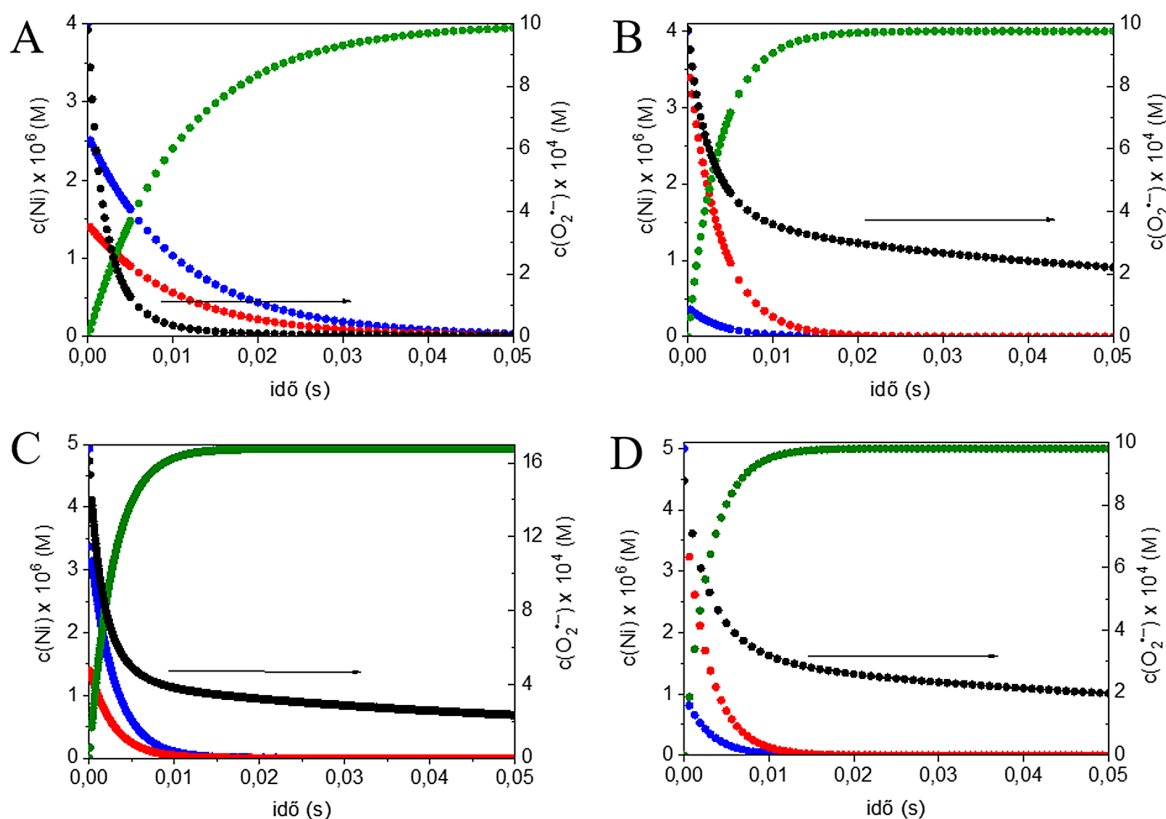
^afüggetlen kísérletekben meghatározva és rögzítve az illesztés során.

Forrás: saját szerkesztés

A korábbi tanulmányokkal összhangban a (3, 4) egyenleteket másodrendűnek, azaz minden reaktánsra vonatkozóan elsőrendűnek feltételezzük. A detektálás ezekben a rendszerekben 260 nm-en történik, ahol nemcsak az $O_2^{\bullet-}$ -nak van elnyelése, hanem a hidrogénperoxidnak és a nikkkelkomplexeknek is. Ezért az abszorbanciát a (11) egyenlet szerint fejezhetjük ki, ahol a szögletes zárójel az egyes komponensek pillanatnyi koncentrációját jelöli.

A kinetikai görbéket a (6–10) egyenletek figyelembevételével a nemlineáris legkisebb négyzetek elvét alkalmazva illesztettük, és meghatároztuk az egyes folyamatokra jellemző sebességi állandók értékeit. Az illesztésnél kapott, illetve az ahhoz szükséges adatokat a 2. táblázatban foglaltuk össze.

Az egyes folyamatok sebességi állandóit összehasonlítva a legszembetűnőbb különbség, hogy a wtNiSOD és wtCC modellek esetében a Ni(II)-komplex oxidációja



4. ábra

Az egyes részecskék számított koncentrációprofilja az idő függvényében a szuperoxid gyökönian bomlása során HEPES (50 mM; pH=7,6) / DMSO 1:1 elegyben. A: wtNiSOD, B: wtPen, C: wtCC, D: DIM. Fekete: $O_2^{\bullet-}$, kék: Ni(II)-komplex, piros: Ni(III)-komplex, zöld: Ni^* .

Forrás: saját szerkesztés

lassabb, mint a Ni(III)-komplex redukciója ($k_3 > k_2$). Ez azt jelenti, hogy a Ni(II)-komplex mindig nagyobb koncentrációban van jelen a rendszerben. A wtPen és DIM mutánsok esetében azonban megfordul ez a reláció. A Ni(III)-komplex a reakció kezdeti szakaszában felhalmozódik, és a reakció további részében az oxidált forma nagyobb mennyiségben van jelen a redukált formához képest.

A 2. táblázatban szereplő adatok alapján meghatároztuk az egyes részecskék idő-koncentráció profilját annak érdekében, hogy az egyes modellek esetében átláthatóbbak legyenek a dizmutálási reakcióban lejátszódó folyamatok (4. ábra). Ez alátámasztja a különböző modellek Ni(II)- és Ni(III)-komplexeinek mennyiségi viszonyait. A diagramokon látható, hogy a Ni*-gal jelölt forma felhalmozódásával együtt a dizmutálás hatékonysága csökken, amiből arra következtethetünk, hogy ez a részecske nem képes katalizálni a szuperoxid gyökanyon bomlását. A wtNiSOD modell esetében a leglassabb ennek a katalitikusan inaktív formának a megjelenése, ennek megfelelően a komplex által katalizált dizmutálási reakció itt a leghatékonyabb. A Ni* megjelenését a Ni(III)-komplex intramolekuláris redoxi degradációjához rendeltük, így azt várnánk, hogy a wtCC mutánsnál is visszaszorul kialakulásának mértéke, azonban az (5) egyenlet szerint lejátszódó reakció sebességi állandója (k_4) ebben a rendszerben a legnagyobb. Ez maga után vonja, hogy az $O_2^{\cdot-}$ teljes mennyisége a wtCC esetében sem bomlik el.

A vizsgálati eredmények értékelése, megvitatása, összefoglalása és következtetések levonása

Kutatómunkánk során a NiSOD enzim számos modelljét vizsgáltuk termodinamikai és szerkezetvizsgáló módszerekkel, illetve vizsgáltuk SOD aktivitásukat. A SODHH és SODHC mutánsok esetében nem a NiSOD enzim oxidált formájára jellemző koordinációs mód alakul ki a szuperoxid gyökanyionnal végbemenő reakciójukban. Ezzel együtt SOD aktivitásuk is drasztikusan csökkent a natív enzimfragsmenshez képest, ezért megállapítottuk, hogy a Ni(III)-komplex kialakulásához a peptidben két tiol-csoporttal rendelkező aminosav együttes jelenléte szükséges, illetve a második helyen lévő koordinálódó tiolát-oldallánc kulcsfontosságú az $O_2^{\cdot-}$ bontásában. A Ni(III)-komplex stabilizálása érdekében vizsgáltunk egy modellt, amely a második helyen lévő cisztein helyett egy penicillamint tartalmaz (wtPen), és a dizmutálási reakció során a Ni(III)-komplex nagyobb átmeneti koncentrációban volt jelen, mint a Ni(II)-komplex. A Ni(III)-komplex azonban egy további oxidációs folyamatban vesz részt, amelynek eredményeként egy katalitikusan inaktív, nikkeltartalmú, Ni*-gal jelölt komplex képződik. Az első helyen hisztidin-cisztein pontmutációt tartalmazó mutánsban (wtCC) a Ni(II)-komplex pillanatnyi koncentrációja a

nagyobb, azonban a Ni* képződése gyorsabb, mint a többi modell esetében, így ebben a rendszerben is viszonylag hamar felhalmozódik ez a forma. Vizsgáltunk egy dimer peptidet (DIM), amely két fémion megkötésére képes. Ebben a rendszerben szintén a Ni(III)-komplex felhalmozódása figyelhető meg a dizmutálási reakció során, amely gyorsan tovább alakul Ni*-gá. Meg kell említeni, hogy natív enzimfragsmensnél (wtNiSOD) is megjelenik a Ni*, holott erről a NiSOD enzim esetében nem számoltak be. A wtNiSOD peptid szekvenciája teljes egészében megegyezik a NiSOD enzim aktív helyének aminosavaival, de az általunk vizsgált ligandumok többségéhez hasonlóan csak kilenc aminosavból áll. Ez magyarázhatja a Ni* jelenlétét ezekben a rendszerekben, míg a NiSOD enzimek hosszú peptidláncai szerkezetük-ből adódóan védelmet nyújthatnak az intramolekuláris redoxi degradációval szemben.

Köszönetnyilvánítás

Az RH/527-5/2021 számú projekt a Kulturális és Innovációs Minisztérium Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatásával, a KDP-2020 pályázati program finanszírozásában valósult meg. A munka a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíjának és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal STARTING25 152343 sz. pályázatának támogatásával készült.



Irodalomjegyzék

- Abreu, I. A. & Cabelli, D. E. (2010) Superoxide dismutases – A review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1804. No. 2. pp. 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.005>
- Bahoron, T., Soobrattee, M. A., Luximon-Ramma, V. & Aruoma, O. I. (2006) Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update*, Vol. 1. No. 2. pp. 25–41. <https://doi.org/10.4314/ijmu.v1i2.39839>
- Beyer, F. W. Jr. & Fridovich, I. (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, Vol. 161. No. 2. pp. 559–566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
- Bonczidai-Kelemen, D., Sciortino, G., May, N. V., Garribba, E., Fábrián, I. & Lihi, N. (2022) Introducing the penicillamine moiety into a metalloprotein mimicking the NiSOD enzyme: Electronic and kinetic effects. *Inorganic Chemistry Frontiers*, Vol. 9. No. 2. pp. 310–322. <https://doi.org/10.1039/D1QI01025E>

- Bonczidai-Kelemen, D., Tóth, K., Fábrián, I. & Lihi, N. (2024) The role of the terminal cysteine moiety in a metalloprotein mimicking the active site of the NiSOD enzyme. *Dalton Transactions*, Vol. 53. No. 4. pp. 1648–1656. <https://doi.org/10.1039/D3DT03638C>
- Bryngelson, P. A., Arobo, S. E., Pinkham, J. L., Cabelli, D. E. & Maroney, M. J. (2004) Expression, Reconstitution, and Mutation of Recombinant *Streptomyces coelicolor* NiSOD. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 126. No. 2. pp. 460–461. <https://doi.org/10.1021/ja0387507>
- Bryngelson, P. A. & Maroney, M. J. eds. (2007) Nickel and its surprising impact in nature. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex. <https://doi.org/10.1002/9780470028131.ch10>
- Choudhury, S. B., Lee, J.-W., Davidson, G., Yim, Y.-I., Bose, K., Sharma, M. J. ... & Maroney, M. J. (1999) Examination of the Nickel Site Structure and Reaction Mechanism in *Streptomyces coelicolor* Superoxide Dismutase. *Biochemistry*, Vol. 38. No. 12. pp. 3744–3752. <https://doi.org/10.1021/bi982537j>
- Christen, Y. (2000) Oxidative stress and Alzheimer disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 71. No. 2. pp. 621–629. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.2.621s>
- Fiedler, A. T., Bryngelson, P. A., Maroney, M. J. & Brunold, T. C. (2005) Spectroscopic and computational studies of Ni superoxide dismutase: Electronic structure contributions to enzymatic function. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 127. No. 15. pp. 5449–5462. <https://doi.org/10.1021/ja042521i>
- Kelemen, D., May, N. V., András, M., Gáspár, A., Fábrián, I. & Lihi, N. (2020) High Enzyme Activity of a Binuclear Nickel Complex Formed with the Binding Loops of the NiSOD Enzyme. *Chemistry – A European Journal*, Vol. 26. No. 70. pp. 16767–16773. <https://doi.org/10.1002/chem.202002706>
- Kim, F. J., Kim, H. P., Hah, Y. C. & Roe, J. H. (1996) Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 241. No. 1. pp. 178–185. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308514101>
- Lihi, N., Csire, G., Szakács, B., May, N. V., Várnagy, K., Sóvágó, I. & Fábrián, I. (2019) Stabilization of the Nickel Binding Loop in NiSOD and Related Model Complexes: Thermodynamic and Structural Features. *Inorganic Chemistry*, Vol. 58. No. 2. pp. 1414–1424. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b02952>
- Lihi, N., Kelemen, D., May, N. V. & Fábrián, I. (2020) The Role of the Cysteine Fragments of the Nickel Binding Loop in the Activity of the Ni(II)-Containing SOD Enzyme. *Inorganic Chemistry*, Vol. 59. No. 7. pp. 4772–4780. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c00057>
- McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969) Superoxide Dismutase: An enzymic function for Erythrocyte (Hemocytin). *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 244. No. 22. pp. 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- Miller, A.-F. (2004) Superoxide dismutases: Active sites that save, but a protein that kills. *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 8. No. 2. pp. 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.02.011>
- Moloney, J. N. & Cotter, T. G. (2018) ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Vol. 80. pp. 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
- Schwarz, H. A. (1981) Free Radicals Generated by Radiolysis of Aqueous Solutions. *Journal of Chemical Education*, Vol. 58. No. 2. pp. 101–105. <https://doi.org/10.1021/ed058p101>
- Shearer, J. & Long, L. M. (2006) A Nickel Superoxide Dismutase Maquette That Reproduces the Spectroscopic and Functional Properties of the Metalloenzyme. *Inorganic Chemistry*, Vol. 45. No. 6. pp. 2358–2360. <https://doi.org/10.1021/ic0514344>
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J. & Telser, J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Vol. 266. No. 1–2. pp. 37–56. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89>
- Youn, H. D., Kim, J. E., Roe, J. H., Hah, Y. C. & Kang, S. O. (1996) A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *The Biochemical Journal*, Vol. 318. No. 3. pp. 889–896. <https://doi.org/10.1042/bj3180889>
- Youn, H. D., Youn, H., Lee, J. W., Yim, Y. I., Lee, J. K., Hah, Y. C. & Kang, S. O. (1996) Unique isozymes of superoxide dismutase in *Streptomyces griseus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 334. No. 2. pp. 341–348. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0463>

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID_1)