

Biomolekulák szelenol-diszelenid egyensúlyainak jellemzése részecskespecifikus paraméterekkel

Doktori értekezés

Dr. Pála Tamás

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Noszál Béla, DSc., egyetemi tanár
Konzulens: Dr. Mirzahosseini Arash, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Hivatalos bírálók: Dr. Ambrus Attila, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Ósz Katalin, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:
Elnök: Dr. Szőkő Éva, DSc., egyetemi tanár
Tagok: Dr. Béni Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szakács Zoltán, Ph.D., senior kutató-fejlesztő

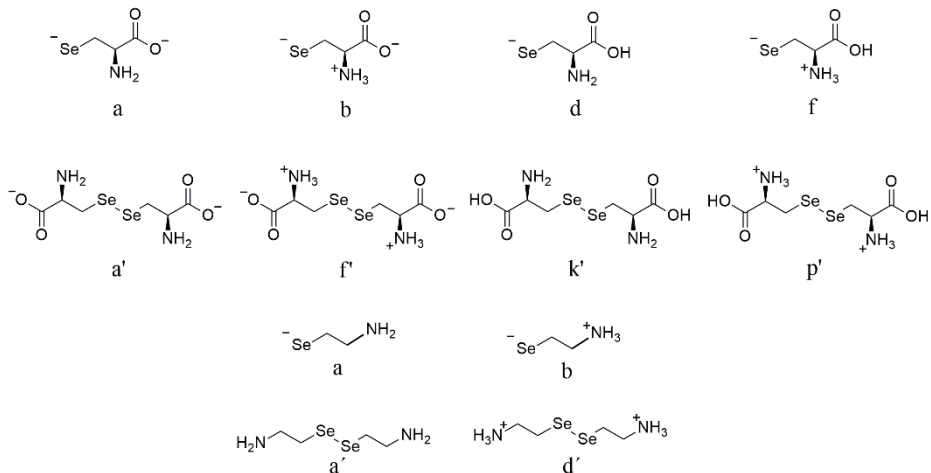
Budapest
2020

1. Bevezetés

Az élő szervezetben természetes anyagcsere-folyamatok során reaktív oxigénszármazékok termelődnek. A sejten belüli redoxi egyensúlyt, homeosztázist az antioxidáns rendszerek oxidoreduktáz enzimek és koenzimjei tartják fenn. Ezen enzimek által katalizált biokémiai folyamatok, bár szerteágazó és bonyolult rendszereket alkotnak, alapvetően egy vagy két elektronátmenettel járó elemi reakciókból épülnek fel, melyek nagyrészt tiol-diszulfid cserereakciók.

A redoxi homeosztázis fenntartásában, az oxidatív stressz elleni védelemben és számos egyéb biológiai funkcióban a tiol-diszulfid rendszerek mellett nagy szerepe van a szeléntartalmú fehérjéknek, a szelenoproteineknek. E fehérjékben a szelenocisztein, illetve (diszelenid-hidak képződésekor) a szelenocisztin tartalmaz szelénatomokat. Ezen aminosavakat tartalmazó fehérjérszek bizonyítottan elengedhetetlenek az általuk katalizált biokémiai redoxireakciókhoz.

A tiol-diszulfid redoxireakciókkal analóg szelenol-diszelenid folyamatok meghatározó jellemzője, hogy csak a deprotonált szelenolátcsoport vesz részt a redoxi folyamatban, vagyis a szelenolát anion oxidálódik diszeleniddé (1. ábra). Mivel a deprotonált forma előfordulása pH-függő, a szelenol-diszelenid rendszerek látszólagos redoxipotenciálja is függ a közeg pH-jától. Annak érdekében, hogy a lehető legpontosabb képet kapjuk a szelenol-diszelenid redoxi átalakulásról, a protonálódási és a redoxi folyamatok pH-független, mikroszkopikus szintű ismeretére egyaránt szükség van.



1. ábra: A selenocisztein (felül) és selenociszteamin (alul) szelenolátcsoporttal rendelkező mikrorészecskéi, alattuk rendre a velük egyensúlyban álló szelenociszteín és szelenociszteamin mikrorészecskék.

Az oxidatív stressz megelőzése és terápiás elhárítása egyaránt elképzelhetetlen ismert redukáló képességű, szelektív gyógyszeranyagok nélkül. Az antioxidánsként alkalmazott hatóanyagok fizikai-kémiai tulajdonságainak pontos ismerete pedig különösen fontos a gyógyszerhatás és az esetleges mellékhatások szempontjából.

Jelenleg a ^{77}Se NMR kémiai eltolódások kezelése a szakirodalomban nem egységes, különösen a referenciaként használt szelénvegyületek tekintetében, természetesen azonban igen fontos, hogy a mérési eredmények minél megbízhatóbbak legyenek.

2. Célkitűzés

Doktori munkám célja a biológiai jelentőségű, kismolekulás szelenol-diszelenid egyensúlyi rendszerek részecskespecifikus sav-bázis és redoxi tulajdonságainak jellemzése, valamint korreláció meghatározása az eredményül kapott egyes mikrorészecskékre jellemző sav-bázis és redoxi paraméterek, valamint a ^1H , ^{13}C és ^{77}Se NMR kémiai eltolódások között.

Ennek fontos része a szeléntartalmú molekulák jellemzése makro- és mikroszkopikus szinten, szükség esetén származék vegyületek előállításával és vizsgálatával.

További célunk az említett szelenol-diszelenid rendszerek ditiotreitokra vonatkoztatott, pH-független, részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandóinak, valamint részecskespecifikus standard redoxipotenciál értékeinek meghatározása. Ehhez előzetesen szükség volt a ditiotreitol/oxidált ditiotreitol tiol-diszulfid rendszer standard redoxipotenciál értékére is, melyet a glutation/glutation-diszulfid redoxirendszerrel alkotott kémiai egyensúly alapján kaptunk meg.

Annak érdekében, hogy kellőképpen pontos kémiai eltolódás értékeket kapjunk, célul tűztük ki egy ^{77}Se NMR spektroszkópiában vizes közegben belső standardként használható kémiai eltolódás referencia anyag részletes mérési adatokkal alátámasztott bevezetését.

3. Módszerek

A protonálódási makroállandók meghatározásához ^1H NMR-pH titrálást végeztünk. A csoportspecifikus protonálódási állandók meghatározása a molekulák szimmetrikus szerkezete alapján, származékvegyületek vizsgálatával, illetve deduktív módszer alkalmazásával történt. A részecskespecifikus ^1H , ^{13}C és ^{77}Se NMR kémiai eltolódásokat a titrálási görbe platószakaszain felvett NMR spektrumok alapján, az egyes funkciós csoportok protonálódásának hatását figyelembe véve adtuk meg.

A csoportspecifikus redoxi egyensúlyi állandókat, illetve a standard redoxipotenciál értékeket ditiotreitollal alkotott egyensúlyi rendszerek kvantitatív ^1H NMR spektroszkópiás vizsgálatával határoztuk meg.

A ^1H NMR-pH titrálási görbék nemlineáris paraméterillesztéséhez, illetve a végeredményként kapott paraméterek közti korrelációs analízishez az OriginPro 8.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) szoftvert használtuk.

Az NMR spektrumok kvantitatív kiértékelését az ACD/NMR Processor Academic Edition v12.01 (Advanced Chemistry Development, Toronto, ON, Canada) szoftverrel végeztük.

A vizes közegű ^{77}Se NMR mérésekben lehetséges kémiai eltolódás referenciavegyületek kémiai eltolódását hat különböző mérési körülmény (pH, hőmérséklet, ionerősség, koncentráció, D_2O -tartalom, mintakészítéstől eltelt idő) változtatása mellett követtük.

4. Eredmények

A négy vizsgált molekula (szelenocisztein, szelenocisztin, szelenociszteamin, szelenocisztamin) makroállandóit ^1H NMR-pH titrálás alapján kaptuk meg, ezen felül további számításokhoz meghatároztuk a szelenocisztin dimetil-észterének makroszkopikus protonálódási állandóit is (1. táblázat).

1. táblázat: A szelenociszteint, a szelenocisztint, utóbbi dimetil-észterét, illetve a szelenociszteamint és a szelenocisztamint jellemző protonálódási makroállandók.

	Szeleno- cisztein	Szeleno- cisztin	Dimetil- észter*	Szeleno- ciszteamin	Szeleno- cisztamin
$\log K_1$	$10,18 \pm 0,02$	$9,19 \pm 0,02$	$6,74 \pm 0,12$	$10,87 \pm 0,03$	$9,62 \pm 0,04$
$\log K_2$	$5,52 \pm 0,03$	$8,22 \pm 0,02$	$5,82 \pm 0,32$	$6,26 \pm 0,02$	$8,48 \pm 0,12$
$\log K_3$	$2,01 \pm 0,04$	$2,25 \pm 0,05$	-		
$\log K_4$	-	$1,58 \pm 0,07$	-		

* a szelenocisztin dimetil-észter származéka

A szelenocisztein példáján a makroszkopikus (K) és mikroszkopikus (k) protonálódási állandók között fenálló összefüggések a következők:

$$\beta_1 = K_1 = k^{\text{O}} + k^{\text{Se}} + k^{\text{N}} \quad (1)$$

$$\beta_2 = K_1 \cdot K_2 = k^{\text{O}} \cdot k_{\text{O}}^{\text{Se}} + k^{\text{N}} \cdot k_{\text{N}}^{\text{O}} + k^{\text{N}} \cdot k_{\text{N}}^{\text{Se}} = \dots \quad (2)$$

$$\beta_3 = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 = k^{\text{O}} \cdot k_{\text{O}}^{\text{Se}} \cdot k_{\text{SeO}}^{\text{N}} = k^{\text{N}} \cdot k_{\text{N}}^{\text{O}} \cdot k_{\text{NO}}^{\text{Se}} = \dots \quad (3)$$

ahol O, Se és N rendre a karboxilát-, a szelenolát- és az aminocsoportot jelenti, k_{O}^{Se} mikroállandó a protonálódó

szelenolátcsoportot (Se) jellemzi abban az esetben, ha a karboxilátcsoport (O) protonált állapotban van.

Amennyiben a molekula két protonálható csoportot tartalmaz és szerkezete szimmetrikus, mikroállandói közvetlenül meghatározhatóak a makroszkopikus állandókból. Példaként egy két aminocsoportot (N és N') tartalmazó szimmetrikus molekulára teljesülő összefüggések:

$$\log k^N = \log k^{N'} = \log K_1 - \log 2 \quad (4)$$

$$\log k_N^{N'} = \log k_{N'}^N = \log K_2 + \log 2 \quad (5)$$

Többcsoportos molekulák egymáshoz közel eső csoportjai esetén az egyik protonálódása általában csökkenti a másik bázicitását, ezt számszerűsíti a kölcsönhatási tényező (ΔE). A szelenocisztein példáján bemutatva a karboxilát- és aminocsoportok egymásra kifejtett hatását a következő összefüggésekkel jellemezhetjük:

$$\begin{aligned} \log \Delta E_{N/O} &= \log k^O - \log k_N^O = \log k_{Se}^O - \log k_{NSe}^O = \\ &= \log k^N - \log k_O^N = \log k_{Se}^N - \log k_{SeO}^N \end{aligned} \quad (6)$$

A deduktív módszer során alkalmazható egyik eljárás, hogy a modellvegyületként választott molekula bázicitás adatai helyett kölcsönhatási tényezőit használjuk fel a mikroállandók meghatározására.

A fent említett három alapösszefüggés felhasználásával meghatározhatóvá vált a négy vizsgált molekula összesen 34 különböző mikroállandója (2. táblázat).

2. táblázat: A vizsgált szelenol és diszelenid vegyületek mikroszkopikus protonálódási állapotai. A domináns protonálódási útvonalat leíró mikroállandók félkövérrel szedve láthatók.

Szelenocisztein		Szelenocisztin	
$\log k^N$	$10,18 \pm 0,02$	$\log k^N = \log k^{N'}$	$8,89 \pm 0,02$
$\log k^{Se}$	$6,81 \pm 0,04$	$\log k^O = \log k^{O'}$	$4,40 \pm 0,13$
$\log k^O$	$5,02 \pm 0,05$	$\log k_N^N = \log k_N^{N'}$	$8,52 \pm 0,04$
$\log k_N^{Se}$	$5,52 \pm 0,03$	$\log k_N^O = \log k_N^{O'}$	$3,84 \pm 0,05$
$\log k_N^O$	$3,13 \pm 0,05$	$\log k_N^O = \log k_N^{O'}$	$2,51 \pm 0,13$
$\log k_{Se}^N$	$8,89 \pm 0,02$	$\log k_O^N = \log k_O^{N'}$	$8,33 \pm 0,12$
$\log k_{Se}^O$	$3,90 \pm 0,04$	$\log k_O^N = \log k_O^{N'}$	$7,00 \pm 0,02$
$\log k_O^N$	$8,29 \pm 0,02$	$\log k_O^O = \log k_O^{O'}$	$4,33 \pm 0,14$
$\log k_O^{Se}$	$5,69 \pm 0,05$	$\log k_{NN}^O = \log k_{NN}^{O'}$	$1,95 \pm 0,05$
$\log k_{NSe}^O$	$2,01 \pm 0,04$	$\log k_{N'O}^N = \log k_{NO}^{N'}$	$6,63 \pm 0,04$
$\log k_{NO}^{Se}$	$4,40 \pm 0,06$	$\log k_{NO}^O = \log k_{NO}^{O'}$	$2,44 \pm 0,14$
$\log k_{SeO}^N$	$7,00 \pm 0,04$	$\log k_{N'O}^N = \log k_{NO}^{N'}$	$7,96 \pm 0,12$
Szelenociszteamin		$\log k_{NO}^{O'} = \log k_{NO}^{O'}$	$3,77 \pm 0,07$
$\log k^N$	$10,87 \pm 0,03$	$\log k_{OO}^N = \log k_{OO}^{N'}$	$6,44 \pm 0,12$
$\log k^{Se}$	$7,55 \pm 0,03$	$\log k_{NN'O}^{O'} = \log k_{NN'O}^{O'}$	$1,88 \pm 0,07$
$\log k_N^{Se}$	$6,26 \pm 0,02$	$\log k_{NOO}^{N'} = \log k_{N'OO}^N$	$6,07 \pm 0,12$
$\log k_N^{Se}$	$9,58 \pm 0,04$	Szelenocisztamin	
		$\log k^N = \log k^{N'}$	$9,32 \pm 0,04$
		$\log k_N^N = \log k_N^{N'}$	$8,78 \pm 0,12$

A részecskeszpecifikus redoxi paraméterek meghatározásához elsőként látszólagos, pH-függő redoxi egyensúlyi állandót határoztunk meg, a koncentrációkat kvantitatív ^1H NMR spektrumok kiértékelésével kaptuk.

$$K_C = \frac{[\text{RSeH}]^2 \cdot [\text{DTT}_{\text{ox.}}]}{[\text{DTT}] \cdot [\text{RSeSeR}]} \quad (7)$$

Az egymással összefüggő sav-bázis és redoxi folyamatokat egymástól elválasztva pH-független, részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandókat kapunk. Például egy szelenocisztein mikrorészecskére (*b*), ami az *f'* szelenocisztein részecske redukciója során keletkezik, felírható a következő összefüggés:

$$\begin{aligned} k^b &= \frac{[b]^2 \cdot [\text{DTT}_{\text{ox.}}]}{[\text{DTT}^{2-}] \cdot [f']} = \frac{[\text{CysSeH}]^2 \cdot \chi_b^2 \cdot [\text{DTT}_{\text{ox.}}]}{[\text{DTT}] \cdot \chi_{\text{DTT}^{2-}} \cdot [\text{CysSeSeCys}] \cdot \chi_f} = \\ &= K_C \cdot \frac{\chi_b^2}{\chi_{\text{DTT}^{2-}} \cdot \chi_f} \end{aligned} \quad (8)$$

ahol χ_b és $\chi_{\text{DTT}^{2-}}$ a *b* mikrorészecske és a deprotonált ditiotreitől móltörtje adott pH-n, mely a mikroszkopikus protonálódási állandók alapján kiszámítható. Az így kapott egyensúlyi állandókat, illetve a reakciópartner standard redoxipotenciálját felhasználva kiszámítható a vizsgált redoxirendszert jellemző részecskespecifikus standard redoxipotenciál (3. táblázat).

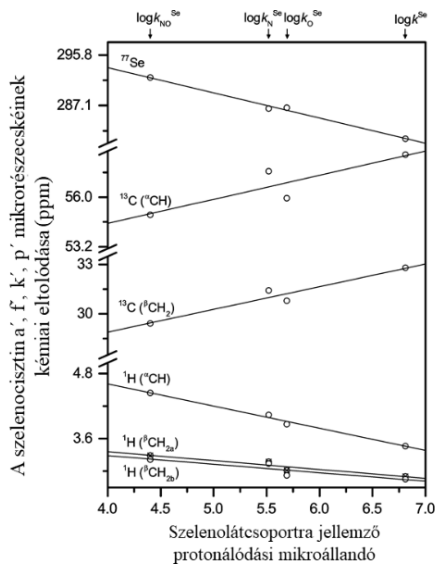
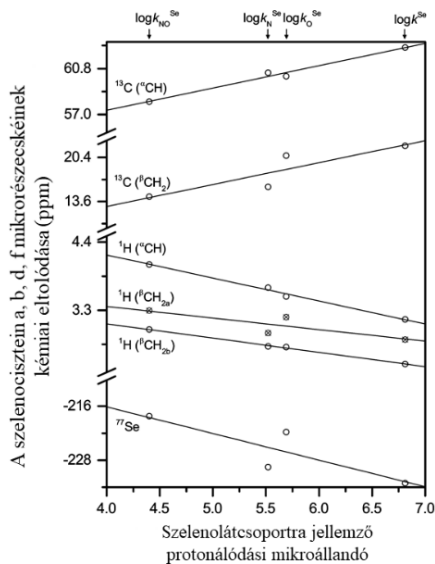
$$\begin{aligned} E^\circ_b &= E^\circ_{\text{DTT}_{\text{ox.}}/\text{DTT}^{2-}} + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[b]^2 \cdot [\text{DTT}_{\text{ox.}}]}{[f'] \cdot [\text{DTT}^{2-}]} = \\ &= E^\circ_{\text{DTT}_{\text{ox.}}/\text{DTT}^{2-}} + \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln k^b \end{aligned} \quad (9)$$

ahol E° a standard redoxipotenciál, R az egyetemes gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, z az elektronszám-változás, F a Faraday-állandó.

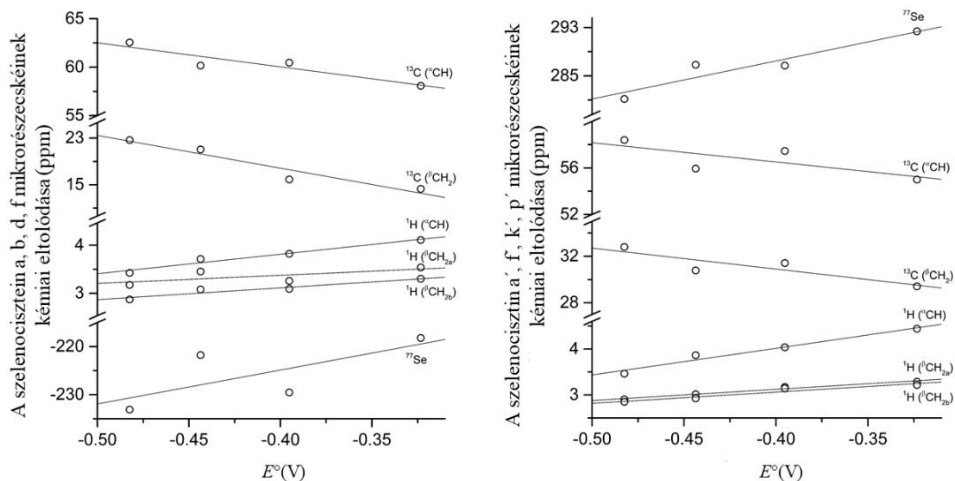
3. táblázat: A vizsgált redoxirendszerek részecskespecifikus standard redoxipotenciálja.

Szenecisztin/ Szenecisztein		Szeneciszttamin/ Szeneciszteamin	
részecske	E° (V)	részecske	E° (V)
a	$-0,482 \pm 0,01$	a	$-0,513 \pm 0,006$
b	$-0,395 \pm 0,01$	b	$-0,405 \pm 0,006$
d	$-0,444 \pm 0,01$		
f	$-0,323 \pm 0,01$		

Az eredményül kapott csoportspecifikus paraméterek között korreláció található (2. és 3. ábra).



2. ábra: A szenolátcsoportha mikroszkopikus protonálódási állandói és a részecskespecifikus kémiai eltolódások összefüggése.



3. ábra: A részecskespecifikus standard redoxipotenciál és kémiai eltolódás összefüggése.

A szelenol-diszelenid és tiol-diszulfid rendszereket összehasonlítva a $\log k-E^\circ$ egyenesek lefutása csaknem párhuzamos, amelyből arra következtethetünk, hogy az egyes tiolát- vagy szelenolátcsoportok bázicitásának megváltozása ugyanakkora hatással van a redoxi tulajdonságokra, azonban a kén helyett szelénatomok jelenléte jóval erősebb redukáló jelleget kölcsönöz az adott molekulának.

A robusztus, megbízható ^{77}Se NMR referenciavegyület megtalálására irányuló munkánkban a szelenát-ionok ^{77}Se , valamint a DSS ^1H NMR kémiai eltolódását különböző mérési paraméterek mellett követtük, a kapott eltéréseket az adott NMR-aktív mag mérési ablakának hányadában is megadtuk, hogy összehasonlítható adatokat kapjunk (4. táblázat).

4. táblázat: A szelenát-ionok ^{77}Se és a DSS ^1H NMR kémiai eltolódásának változása különböző mérési körülmények mellett. Az összehasonlíthatóság érdekében a kapott eltéréseket az adott mag mérési ablakának százalékos értékében is megadtuk. A pH hatását, illetve az eltarthatóságot 0,15 mol/dm³ (felül) és 1 mol/dm³ (alul) ionerősség mellett vizsgáltuk.

Paraméter	Tartomány	$\Delta\delta_{\text{SeO}_4^{2-}}^{77\text{Se}}$	relatív hiba	$\Delta\delta_{\text{DSS}}^1\text{H}$	relatív hiba
T (K)	293–328	1,49	0,053%	0,29	0,63%
c (mol/dm ³)	0,0025–0,5	0,46	0,016%	0,10	0,22%
I (mol/dm ³)	0,15–1	0,59	0,021%	0,08	0,17%
pH	1,36–11,68	2,78	0,099%	0,03	0,07%
	0,66–13,09	4,97	0,178%	0,14	0,30%
V/V% D ₂ O	5–100%	0,35	0,013%	0,02	0,04%
t (nap)	127	0,05	0,002%	0,02	0,04%
	133	0,08	0,003%	0,01	0,02%
Megbízható pH-tartományok					
pH	3,40–11,68	0,03	0,001%	0,04	0,09%
	3,55–13,09	0,11	0,004%	0,11	0,24%

Az eredmények alapján a szelenát széles pH-tartományban alkalmazható mint az első szeléntartalmú, vízben oldódó belső kémiai eltolódás referencia. Kémiai eltolódása az eddig gyakorlatban használt dimetil-szelenidhez képest 1048,65 ppm, míg a TMS ^1H jeléhez viszonyítva 1046,40 ppm.

5. Következtetések

- Meghatároztuk a korábban nem, vagy csak részlegesen vizsgált természetes, de nem klasszikus aminosavnak, a szelenociszteinnek és származékainak protonálódási állandóit makroszkopikus és mikroszkopikus szinten.
- Meghatároztuk a szelenocisztein, szelenocisztin, szelenociszteamin és szelenocisztamin valamennyi mikrorészecskéjében található NMR-aktív magok részecskespecifikus ^{77}Se , ^1H és ^{13}C NMR kémiai eltolódásait.
- Kvantitatív ^1H NMR spektroszkópia és erre a célra kidolgozott számítási módszer segítségével meghatároztuk a deprotonált ditiotreitoltól pH-független, részecskespecifikus standard redoxipotenciálját.
- Kvantitatív ^1H NMR spektroszkópiával meghatároztuk a két szelenol/diszelenid rendszer ditiotreitollal szembeni pH-függő, látszólagos redoxi egyensúlyi állandóját, valamint a pH-független, részecskespecifikus redoxi egyensúlyi állandóját és standard redoxipotenciálját.
- Korrelációt találtunk a szelenolátcsoportra jellemző mikroszkopikus protonálódási állandók és a standard redoxipotenciálok között.
- Összefüggést találtunk a szelenolát-diszelenid átalakulásokat jellemző mikroszkopikus redoxipotenciálok és a részecskespecifikus kémiai eltolódások között mind a redukált szelenol-, mind az oxidált diszelenid formák esetén. A korreláció lehetőséget teremt több

szelenátomot is tartalmazó makromolekulákat jellemző csoportspecifikus redoxipotenciálok meghatározására, e vegyületek szerkezetbeni viselkedésének előrejelzésére, hosszabb távon pedig az oxidatív stressz okozta betegségek gyógyászati befolyásolására.

- A korábban jellemzett tiol-diszulfid rendszerekkel összevetve értelmeztük a szelenol-diszelenid párok erősebb redukáló tulajdonságának okát.
- Bevezettük a szelenátot mint vizes közegű ^{77}Se NMR mérések során alkalmazható belső kémiai eltolódás referenciát.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Az értekezés alapját képző közlemények

1. **Pálla T**, Mirzahosseini A, Noszál B. (2020) The species-specific acid-base and multinuclear magnetic resonance properties of selenocysteamine, selenocysteine, and their homodiselenides. *Chem Phys Lett*, 741: 137076.
2. **Pálla T**, Mirzahosseini A, Noszál B. (2020) Species-Specific, pH-Independent, Standard Redox Potential of Selenocysteine and Selenocysteamine. *Antioxidants*, 9: 465.

6.2. Más témákhoz kapcsolódó közlemények

1. Mirzahosseini A, **Pálla T**, Orgován G, Tóth G, Noszál B. (2018) Dopamine: Acid-base properties and membrane penetration capacity. *J Pharm Biomed Anal*, 158: 346-350.
2. **Pálla T**, Tóth G, Kraszni M, Mirzahosseini A, Noszál B. (2018) Population, basicity and partition of short-lived conformers. Characterization of baclofen and pregabalin, the biaxial, doubly rotating drug molecules. *Eur J Pharm Sci*, 123: 327-334.
3. Mirzahosseini A, **Pálla T**, Orgován G, Tóth G, Noszál B. (2019) Characterization of the species-specific acid-base equilibria of adrenaline and noradrenaline. *J Pharm Biomed Anal*, 170: 215-219.
4. **Pálla T**, Fogarasi E, Noszál B, Tóth G. (2019) Characterization of the Site-Specific Acid-Base Equilibria of 3-Nitrotyrosine. *Chem Biodivers*, 16: e1900358.