



Két hisztidint tartalmazó tetrapeptid réz(II)-komplexeinek vizsgálata

– TDK dolgozat –

Készítette:

Takács Gergely

II. éves Vegyészmérnök BSc hallgató

Témavezető:

Dr. Várnagy Katalin

Egyetemi docens

Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debrecen, 2012

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	3
2	Irodalmi áttekintés	4
2.1	A réz élettani szerepe	4
2.2	Réztartalmú metalloproteinek, metalloenzimek	5
2.3	A Cu(II)-ion lehetséges koordinációi peptidek esetén.....	6
2.3.1	Egyszerű di-, tri-, és tetrapeptidek.....	6
2.3.2	Hisztidin tartalmú peptidek	9
3.	Kísérleti körülmények	11
3.1	pH-potenciometria	11
3.2	UV-látható spektrofotometria	12
3.3	Cirkuláris dikroizmus (CD)-spektroszkópia.....	13
3.4	¹ H-NMR spektroszkópia.....	13
3.5	Használt vegyszerek	14
4.	Peptidszintézis	15
5.	Kísérleti eredmények és értékelésük	18
5.1	Protonálódási állandók.....	18
5.2	A ligandumok réz(II)-komplexei.....	19
5.2.1	pH-potenciometriás mérések	19
5.2.2	UV-látható spektrofotometriás mérések	24
5.2.3	CD-spektroszkópiás mérések	26
6.	Összefoglalás	30
7.	Summary.....	31
8.	Felhasznált irodalom	32

1. Bevezetés

Régóta ismert, hogy bizonyos elemek jelenléte nélkülözhetetlen az emberi szervezet számára. A nyomelemek kis mennyiségük ellenére nagyon fontos szerepet töltenek be. Ilyen nyomelem például a réz, mely az emberi szervezet nélkülözhetetlen egységét képezi. Sokrétű feladatot lát el, de legfőképp a redoxifolyamatok katalizálásában játszik szerepet. Az emberi szervezetben a réz(II)ion leggyakrabban fehérjéhez kötött állapotban található meg. Az ilyen fehérjéket metalloproteineknek, illetve metalloenzimeknek nevezzük. Ezekhez a szerves molekulákhoz a fehérjét felépítő aminosavak oldalláncain keresztül kapcsolódik. Az egyik legfontosabb kapcsolódási hely a hisztidin oldalláncában megtalálható imidazol donorcsoport. A fehérjékhez való kötődést kisebb számú aminosavakat tartalmazó peptidekkel modellezhetjük, amelyekkel így lehetőség nyílik a kötődési hely tanulmányozására.

A fémion-protein kölcsönhatások megértéséhez hozzájárulnak azok a vizsgálatok, amelyekben a különböző oldalláncokat tartalmazó peptidek Cu(II)-vel alkotott komplexeit tanulmányozzák. A Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportjában évek óta kiterjedt kutatások folynak a különböző peptidek Cu(II)-komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálatával kapcsolatban. A Tanszék automata peptidszintetizáló készülékével lehetőség nyílt két vagy több hisztidint tartalmazó peptidek szisztematikusan tervezett sorozatának az előállítására.

Ebbe a kutatási munkába kapcsolódtam be. A célom egy $\text{NH}_2\text{-His-Ala-Ala-His}$ szekvenciájú tetrapeptid szintetizálása és réz(II)-komplexeinek oldategyensúlyi vizsgálata volt. A kapott eredményeket összehasonlítottam a korábban vizsgált hasonló szerkezetű peptidekkel.

2. Irodalmi áttekintés¹⁻²

2.1 A réz élettani szerepe³

A réz mindennapjaink fontos részét képezi. Nemcsak az elektronikai eszközök alapegységeinek nélkülözhetetlen eleme, hanem az élő szervezetben betöltött helye is pótolhatatlan. A növényvilágban a fotoszintetikus folyamatokban vesz részt, mint elektronszállító. A puhatestű és ízeltlábú állatok esetén az oxigénszállító festékanyag, a hemocianin részét képezi. Az emberi szervezetben is nagyon sokféle, egymástól különböző feladatokat lát el, annak ellenére, hogy csak kis mennyiségben található meg benne. A redoxi folyamatok katalizálásáért felelős, de részt vesz a csontképződésben, a légzési láncban, segíti a vas felszívódását és beépülését. Nélkülözhetetlen a gyógyulási folyamatokhoz, a sejtek energiatermeléséhez és az ízérzékeléshez is.

Egy felnőtt szervezet átlagos réztartalma 80-120 mg közé eső érték. A szervezetünkben előforduló réz mennyiségének csupán 1%-át, azaz 1 mg-ot kell naponta pótolnunk. Napi 10-15 mg a megengedett beviteli érték, ettől nagyobb mennyiség esetén a rézmérgezés tünetei jelennek meg.

A réz a bélben és a gyomorban szívódik fel aktív transzport révén, a membránon való áthaladásban a Cu-ATP-áz enzimek segítik. Ezután a véráramba kerül az albuminnal alkotott komplex formájában. A májba érve Cu(II)-ion formába alakul redoxi folyamatok során, majd a ceruloplazminhoz kötődve tárolódik.

A rézion fehérjékhez kapcsolódva, metalloenzimekben és metalloproteinekben fordul elő, legnagyobb mennyiségben a májban, vesében, izmokban és az agyban található meg.

Az emberi szervezetben a rézion hiánya komoly problémákhoz vezethet. Ezt több tényező is okozhatja, például az alultápláltság, amikor az elfogyasztott ételek réztartalma nem fedezi a napi szükségletet. Bizonyos fémek nagy mennyiségben gátolhatják is a réz felszívódását, tárolását, ilyen fém a vas, a cink és a kadmium. De a réz felszívódását gátolhatja a felvételéhez szükséges réztranszport fehérjék hiánya is, mely betegséget Menkes-kórnak nevezünk. Ebben az esetben a rézion nem tud átjutni a bél falán keresztül, feldúsul a bélben és a vesében, és nem kerül a véráramba. A réz fontos szerepe, hogy segíti a csontképződést, a kalcium és a foszfor beépülését a csontokba. Dr. Robert O. Becker által publikált felfedezés alapján a réz(II)ion a kollagén rostokhoz kapcsolódik.⁴ Rézhiány esetén ez a kötődés nem valósulhat meg, ami csontritkuláshoz vezet. Megfelelő réz mennyiség nélkül a légzési láncban betöltött feladatát sem képes ellátni a citokróm-c oxidáz, így nem

tudja a molekuláris oxigén redukcióját katalizálni, és jelentős oxigén hasznosítási problémákat okoz. A vas beépülését is segíti az oxigén szállításáért felelős hemoglobinba. A réz felelős az agyi idegsejteket körülvevő myelin hüvely termeléséért is. Hiány esetén pótolni kell a rézion mennyiségét, Menkes-kór esetén ezt megfelelő rézvegyület intravénás beadásával is elérhetjük.

A túlzott mértékű rézbevitel is káros lehet. A napi 10-15 mg-ot meghaladó réz felvétele esetén a rézmérgezés tünetei jelennek meg; ezek a máj- és idegrendszeri károsodások, a hasmenés, a hányás és az izomfájdalmak. Ilyen nagy mennyiség bevitele történhet rézedényben tárolt ételek fogyasztása által, melyekbe beoldódott a réz, de leginkább a Wilson-kór a felelős érte. A májban a rézmegkötő szerepet betöltő ceruloplazmin hiánya folytán a rézion a máj- és az agyszövetekbe kötődik. Súlyos agyi rendellenességet, elbutulást és májkárosodást okoz. A betegség kelátterápiával orvosolható, mely esetben a D-penicillamin szervezetbe juttatása során megkötö a fémiont. A szervezetből való kimosásra megfelelő a diglicil-hisztidin nevezetű peptid, mely a megkötött fémiont a vizelettel együtt távolítja el.

2.2 Réztartalmú metalloproteinek, metalloenzimek

A rézion fehérjékhez kapcsolódva, metalloenzimekben és metalloproteinekben fordul elő szervezetünkben. A hozzájuk való kötődés alapján ezeket három fő csoportba soroljuk, de léteznek olyanok is, melyeknek eltérő a szerkezete. Közös jellemzőjük, hogy a Cu(I)-Cu(II) redoxi rendszer szolgál működésük alapjául.

Az első típus a "kék réz" centrumok. Ez a szerkezet az intenzív kék színéről kapta a nevét. Főként növényekben előforduló fehérjék esetében valósul meg ez a szerkezet. A kék réz centrumokban általában egy kettes oxidációs állapotú rézionhoz kapcsolódik két hisztidin, egy cisztein és egy metionin. A molekula alakja torzult tetraéderes. A kék réz fehérjék funkciója az elektronszállítás a Cu(II)- és a Cu(I)-ion egymásba történő reverzibilis átalakulásával. Ilyen szerkezetű fehérje a plasztocianin, mely a növények fotoszintézisében vesz részt elektrontranszferként. Az Azurin a baktériumok fotoszintézisében hasonló feladatot lát el. Mindkét fehérjére jellemző, hogy hozzájuk egy darab réz(II)ion kapcsolódik.

A második típus a "nem kék réz" centrumok. A nevével ellentétben ez a típus is kék színű, de a kék réz fehérjéknél jóval halványabb. Ez annak köszönhető, hogy ebben az esetben a rézionhoz nem kapcsolódik cisztein. A centrumban egy Cu(I)-ionhoz kapcsolódik három

hisztidin és egy vízmolekula. A molekula alakja síknégyzetes, gyenge axiális kölcsönhatásokkal. Ezek a fehérjék az oxigén molekula aktiválásában játszanak szerepet. A galaktóz oxidáz az alkoholok oxidációját segíti a gombákban. Az amin-oxidázok pedig az aminok karbonilvegyületekké való lebontásában vesznek részt. Ilyen centrumokat tartalmaz a Cu,Zn-szuperoxid-dizmutáz enzim. Ez az enzim két kicsi alegységből tevődik össze. Egy alegység egy réz- és egy cinkiont tartalmaz, melyeket egy imidazol gyűrű tart össze. A réz(I)ionhoz három darab hisztidin, míg a cink(I)ionhoz két hisztidin és egy aszparaginsav kapcsolódik. A Zn^{+} szerkezete torzult oktaéder, a Cu^{+} szerkezete tetragonális. A rézion a redoxi centrum, ő vesz részt a redoxi reakcióban, míg a cinkion a szerkezetalkító funkciót látja el.

A harmadik típusnál két rézionos centrum alakul ki. Két darab réz(I)ion kapcsolódik oxigén híddal egymáshoz, és mindkét réz(I)ionhoz három hisztidin kapcsolódik. Az oxigén-fém töltésátmenet következtében intenzív fényelnyeléssel rendelkeznek. Ilyen szerkezetű fehérje a hemocianin és a tirozináz is.

2.3 A Cu(II)-ion lehetséges koordinációi peptidek esetén⁵

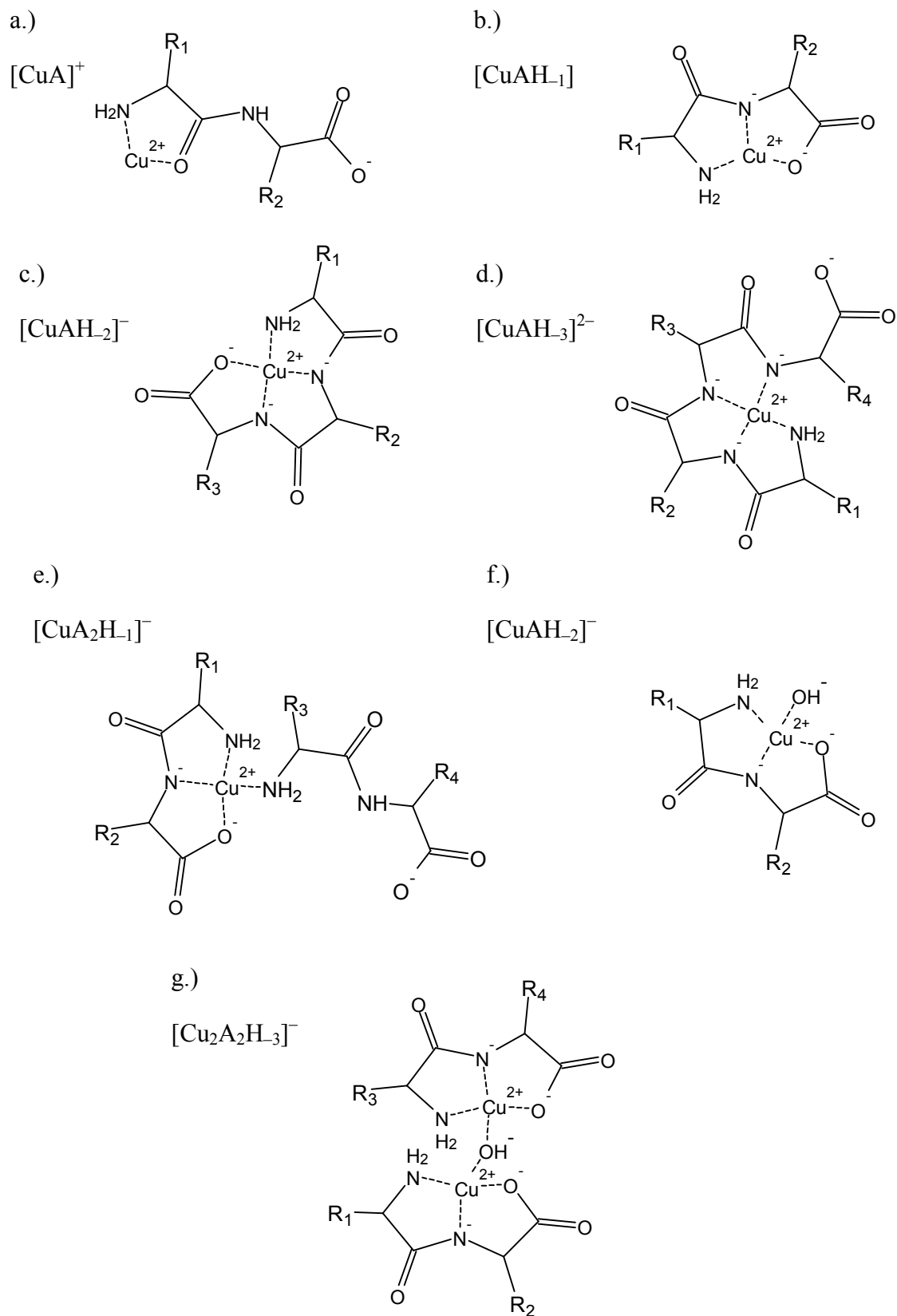
2.3.1 Egyszerű di-, tri-, és tetrapeptidek⁶

Az emberi szervezetben a rézionok fehérjékhez kötött állapotban találhatók meg. Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk a kötés minőségét, kisebb aminosavból álló rendszerekkel modellezhetjük a kötőhely viselkedését. Az oligopeptidek könnyen vizsgálhatók, a rézion velük komplexet képez. A komplexekre egyaránt jellemző, hogy bennük a fémion úgy helyezkedik el, hogy ötös- vagy hatos kelátgyűrűben legyen. Ezek stabilitása kiugróan nagy.

Egyszerű dipeptid esetén kis pH-n a legmegfelelőbb kötőhely az amino- és az oxocsoporttal kialakított ötös kelátgyűrű, mely az $[CuA]^{+}$ szerkezetnek (1.a ábra) feleltethető meg. Szabad ligandumban az amino- és a karboxilcsoport tud deprotonálódni, az amidnitrogének nem, de bizonyos fémionok ezt elő tudják segíteni, például a réz(II)-, palládium(II)- és a nikkel(II)ion. Ez azért kedvező, mert a fémion így hozzá is képes kötődni, csatolt kelátgyűrűt kialakítva, mely még nagyobb stabilitású komplexeket eredményez. A pH-t növelve a karboxilcsoport és az amidnitrogén deprotonálódik, és a réz(II)ion hozzájuk kötődve kialakítja a $[CuAH_{-1}]$ szerkezetet (1.b ábra).

A tri- és tetrapeptid esetén is hasonló komplexek keletkeznek azzal a kivétellel, hogy az ő esetükben már van esély további amidnitrogének deprotonálódására. Így képes a réz(II)ion a tripeptid esetében két, a tetrapeptid esetében pedig három amidcsoporthoz kapcsolódni. A tripeptid esetén az amino- és amidcsoportok mellett kapcsolódó karboxilátcsoporthoz telíti a réz(II)ion koordinációs szféráját. Így három csatolt kelátgyűrű alakul ki, mely stabilitása még nagyobb. A tetrapeptid esetében a karboxilátcsoporthoz már nem tud kötődni a rézionhoz. A szerkezetük $[\text{CuAH}_2]^-$ (1.c ábra) és $[\text{CuAH}_3]^{2-}$ (1.d ábra) alakban írható fel.

Megfigyelhető, hogy az $[\text{CuA}]^+$ és az $[\text{CuAH}_1]$ komplexek esetén a réz(II)ionnak még vannak kötőhelyei, ahová kapcsolódhat egy csoport. Így többféle komplex is kialakulhat a pH, és a fémion-ligandum arány változása során. A dipeptid esetén lehetőség van egy $[\text{CuA}_2\text{H}_1]^-$ (1.e ábra) összetételű komplex kialakulására, melyben a réz két amino-, egy amid-, és egy karboxilátcsoporthoz kapcsolódik. Nagy pH esetén lehetőség van arra, hogy a $[\text{CuAH}_1]$ komplexben a réz(II)ionhoz koordinálódó vízmolekula deprotonálódjon, és kialakuljon a $[\text{CuAH}_2]^-$ szerkezet (1.f ábra). Ebből levezethető a $[\text{Cu}_2\text{A}_2\text{H}_3]^-$ komplex (1.g ábra), melyben egy hidroxid híd kapcsolja össze a két réz(II)iont. A tri- és tetrapeptid esetében nincs esély más szerkezet kialakulására, mert ott a réz mind a négy koordinációs helye betöltött. Így belátható az is, hogy a hosszabb peptidek esetén is ugyanezek a szerkezetek alakulhatnak ki. Azonban az aminosavak oldalláncai jelentős mértékben befolyásolhatják a rézion koordinációját. A legnagyobb befolyásoló hatással a hisztidin oldallánca rendelkezik.



1. ábra: Egyszerű di-, tri- és tetrapeptidok lehetséges koordinációs módjai.

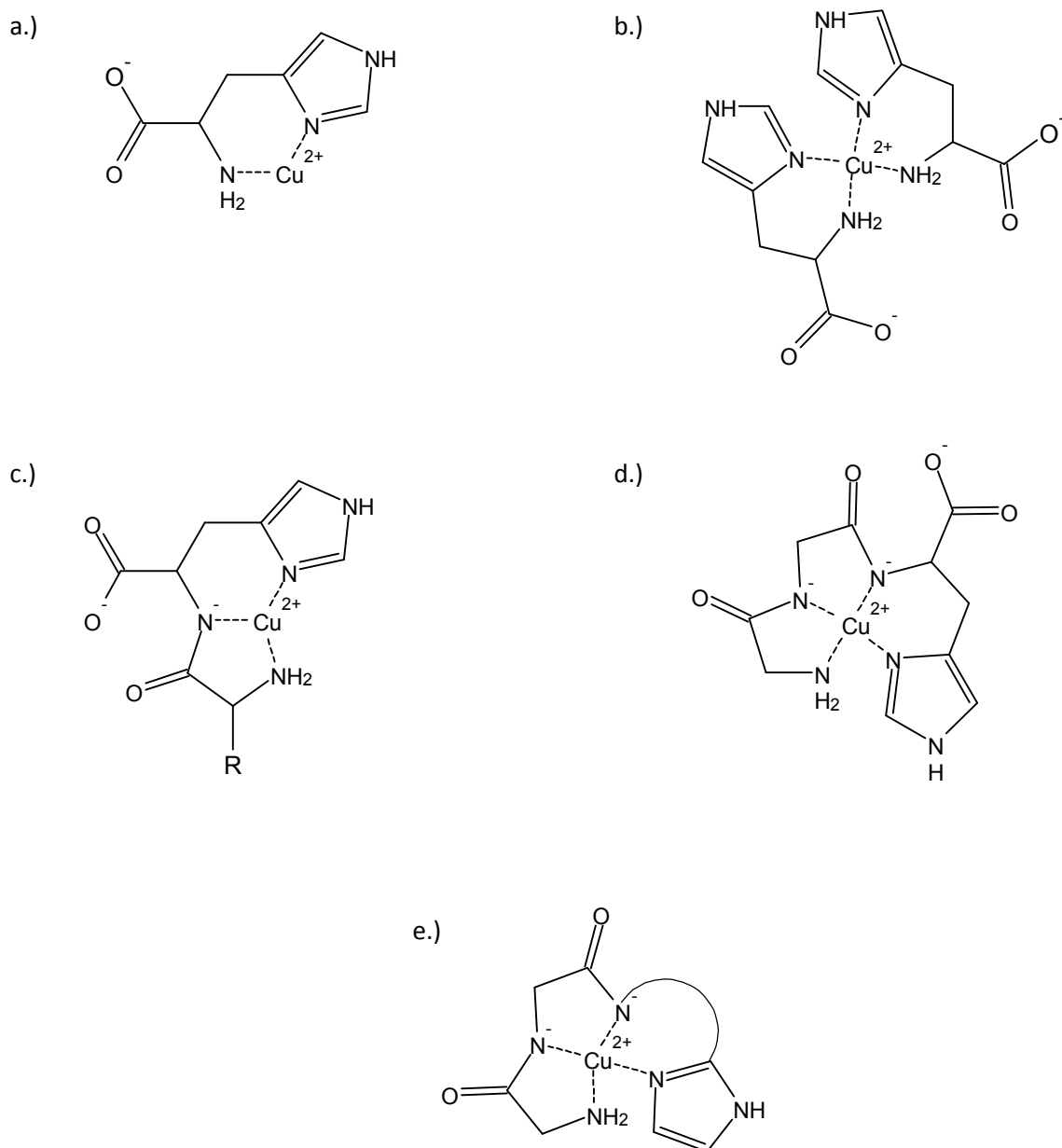
2.3.2 Hisztidin tartalmú peptidek

Hisztidin tartalmú peptidek esetén ha a hisztidin az N-terminális végen helyezkedik el, akkor a réz(II)ion az aminocsoporttal és az imidazolnitrogénnel alakít ki hatos kelátgyűrűt, melyet hisztaminszerű koordinációnak nevezünk (2.a ábra). Ez a szerkezet elég stabilis ahhoz, hogy az amidnitrogének deprotonálódási folyamatát nagyobb pH tartományba tolja. Miután ezen komplexben még vannak szabad koordinációs helyek, két molekula kapcsolódása is megtörténhet hisztaminszerűen, ez eredményezi a $[\text{CuA}_2]^{2+}$ komplexet (2.b ábra).⁷

Ha a második helyen helyezkedik el a hisztidin (XaaHis vagy XaaHisYaa), akkor a rézion egy amino-, egy amidcsoporttal és egy imidazolnitrogénnel alkot $[\text{CuAH}_1]^-$ összetételű komplexet (2.c ábra). Ez a Gly-His-szerű koordináció.

Ha harmadik helyen helyezkedik el a hisztidin (XaaYaaHis vagy XaaYaaHisZaa), akkor már két amidcsoport is képes lesz a rézionhoz kapcsolódni $[\text{CuAH}_2]^{2-}$ szerkezettel (2.d ábra). Ez a koordinációs módú komplex kiugróan nagy stabilitású. A réz az albuminhoz is hasonló szerkezettel kapcsolódik, ezen tulajdonsága miatt használhatják a réz eltávolítására a GlyGlyHis-t.

Ha az N-terminális részhez képest a negyedik helyen vagy ettől távolabb helyezkedik el a hisztidin, akkor az egyszerű peptidekhez hasonló szerkezetek alakulnak ki, de a láncvégi imidazolnitrogén is részt vehet a koordinációban. Az aminocsoport, és az őt követő egy vagy két amidcsoport kötődik a fémionhoz ($[\text{CuAH}_1]$ és a $[\text{CuAH}_2]^-$ komplex) csatolt kelátgyűrűket létrehozva, és az imidazolnitrogén is koordinálódik a réz(II)ionhoz makrokelát keletkezése közben (2.e ábra).



2. ábra: Hisztidin tartalmú peptidek lehetséges komplexei: a.) hisztaminszerű koordináció, b.) $[CuA_2]$, c.) GlyHis-szerű koordináció, d.) GlyGlyHis-szerű koordináció, e.) makroelátot tartalmazó $[CuAH_2]^-$ komplex.

3. Kísérleti körülmények

3.1 pH-potenciometria⁸

A pH-potenciometria az oldatok hidrogénion koncentrációjának meghatározására szolgál elektródpotenciál különbség mérésével. Ezt a módszert alkalmaztam a ligandum protonálódási állandóinak és a különböző összetételű réz(II)-komplexek stabilitási állandóinak meghatározására. A titrálásokat MOLSPIN pH-meter automata titrátorral végeztem, melyhez MOL-AcS gyártmányú buretta és kombinált üvegelektrod kapcsolódott. Az adagolás 1 ml végtérfogatú Hamilton fecskendővel történt.

A pH-mérőt $0,050 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldattal (melynek pH-ja 25°C -on 4,005-4,008) kalibráltam.

A mérések során kb. $0,2 \text{ mol/dm}^3$, pontosan ismert koncentrációjú karbonátmentes KOH titrálóoldattal dolgoztam.

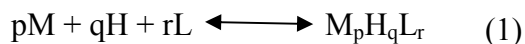
A méréshez szükséges állandó hőmérsékletet ultratermosztát segítségével biztosítottam, az oxigén kizárását argon gáz áramoltatásával, az oldat kevertetését pedig mágneses keverővel oldottam meg.

Az általam vizsgált rendszereket vizes oldatban, 3 és 4 cm^3 -es mintákban tanulmányoztam.

A ligandumok teljes kezdeti koncentrációja $1,5\text{-}2\cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ volt. A pH-metriás mérések segítségével és a titrálási görbe ekvivalencia pontjai alapján meghatároztam a ligandumok pontos koncentrációját. A minták fémion-ligandum aránya 1:2-2:1 között változott. A kiértékeléshez használt program a titrálások során fellépő térfogatváltozást figyelembe vette.

A minták állandó ionerősségét 1 mol/dm^3 -es KCl-oldat hozzáadásával biztosítottam. Ez lehetővé tette, hogy a titrálások során az ionerősség változása ne legyen hatással a elektródpotenciál különbségének mérésére.

Számítógépes programmal végeztem a potenciometriás mérések eredményeinek értékelését. A SUPERQUAD⁹ nevű programmal számoltam ki a ligandum koncentrációját és protonálódási állandóit, a PSEQUAD¹⁰ programmal pedig a különböző fémkomplexek $[\text{Cu}_p\text{A}_q\text{H}_r]$ stabilitási állandóit. A fentebb említett PSEQUAD program I. G. Sayce és D.D. Perrin SCOGS nevű programjának Zékány László és Nagypál István által továbbfejlesztett változata. Mindkét program megadja a protonkomplexek, illetve a fémkomplexek összetett stabilitási állandójának logaritmusát:



$$\beta_{pqr} = \frac{[M_pH_qL_r]}{[M]^p[H]^q[L]^r} \quad (2)$$

A program fontos tulajdonsága, hogy képes ugyanazon rendszer különböző fémion-ligandum arányánál vagy koncentrációinál kapott mérési adatait párhuzamosan kiértékelni. A különböző lépcsőzetes folyamatok eredőjéből adódik a β_{pqr} , így további lehetőség nyílik a lépcsőzetes egyensúlyokra vonatkozó állandók képzésére.

3.2 UV-látható spektrofotometria¹¹

A spektrofotométer olyan optikai berendezés, mely a monokromatikus fény intenzitását és annak változását képes mérni.

A spektrofotometriás vizsgálatokat réz(II)-komplekek esetén 250-900 nm hullámhossz tartományban végeztem el. A spektrumokat különböző fém-ligandum arányánál vettem fel 1 cm³-es kvarc küvettában a pH függvényében. A spektrális vizsgálatokat Perkin Elmer Instruments Lambda 25 UV/VIS kétsugaras spektrofotométeren és Hewlett Packard HP 8453 típusú egysugaras fotométeren végeztem.

A kapott spektrumok elemzésével következtetni tudunk a képződő komplexek szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donortomok számára és kémiai jellegére.

A réz(II)-komplekek előzetes vizsgálatai alapján rengeteg irodalmi előzmény áll rendelkezésre. Ennek ellenére mégsem lehet egyértelmű következtetést levonni a koordinációs módok sokfélesége és a sok befolyásoló tényező miatt.

A réz(II)-komplekek tetragonálisan torzult, oktaéderes szerkezetűek, melyekben a lehetséges átmenetek egyetlen összeolvadt sávként jelennek meg. A különböző komplexek intenzitása és energiája függ a réz(II)ionhoz koordinálódott donortomok számától és minőségétől. Az abszorpciós maximumok helyének a becslése az alábbi empirikus képlet alapján tehető meg¹²:

$$\lambda_{\max} = \frac{10^3}{0,294 (C=O / H_2O) + 0,346 (COO^-) + 0,46 (NH_2) + 0,494 (N=) + 0,434 (Im)} \quad (3)$$

A réz(II)ion vizes oldatban négy darab ekvatoriális vízmolekulát koordinál. Ligandum jelenlétében ezek a koordinációs helyek oxigén és nitrogén donortomokra cserélődnek ki. Ezek intenzitása kisebb hullámhossznál maximális, így az abszorpciós maximumok balra

tolódnak. Ez a jelenség különösen a nitrogén atomokra jellemző. Nehezíti az összefüggések elemzését az is, hogy a donoratom kémiai környezetén kívül a kelátgyűrű méretétől és a nem koordinálódó ligandumrészek nagyságától is függ az effektus nagysága. Ugyanakkor az axiális kölcsönhatás az abszorpciós maximumokat a nagyobb hullámhossz tartományba tolja. Ezeket a hatásokat figyelmen kívül hagyja a fentebb említett empirikus képlet.

3.3 Cirkuláris dikroizmus (CD)-spektroszkópia^{11,13}

A különböző komplexek geometriájának megállapítására cirkuláris dikroizmus-spektroszkópia vizsgálatokat végeztem.

A síkban polarizált fény felbontható két összetevőre, egy balra és egy jobbra cirkulárisan polarizált tényezőre. Az optikailag aktív anyagok a két összetevőt különböző mértékben térítik el. Egy ilyen közegben a fény polarizációs síkja elfordul, ha síkban polarizált fényt bocsátunk át rajta. Az elfordulás mértéke több tényezőtől is függ, ezek a törésmutató, oldószer, hőmérséklet és a mérés hullámhossza.

CD-nek nevezzük a síkban polarizált fény két összetevőjének különböző abszorpcióját. Ezek különbségét a hullámhossz függvényében ábrázolva kapjuk meg a CD görbét.

A CD görbe maximumai, illetve minimumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz igen közel helyezkednek és viszonylag keskenyek. A fémkomplexek optikai aktivitása származhat a komplex molekula asszimetriájából vagy akár a ligandum saját asszimetriájából.

A CD méréseket a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén végeztem. A spektrumokat JASCO-810 spektrométeren, szobahőmérsékletű vizes oldatokban vettem fel különböző pH-értékeknél, illetve fémion-ligandum arányoknál. 0,100 és 1,000 cm-es úthosszúságú kuvettákat használtam

3.4 ¹H-NMR spektroszkópia

A ligandum tisztaságát ¹H-NMR méréssel ellenőriztük. A ligandumot 99,8 %-os izotóptisztaságú D₂O-ban oldottam fel. A spektrumok felvételéhez 0,01 mol/dm³ koncentrációjú oldatot készítettem. A ¹H-NMR spektrumokat BRUKER AM360 MHz FT-

NMR készüléken vettük fel. A kapott spektrumot az NMR spektrométer saját szoftverével, illetve az 1D WinNMR programmal értékeltük ki.

3.5 Használt vegyszerek

A pH-potenciometriás méréseket kb 0,2 mol/dm³-es, pontosan ismert koncentrációjú, argon alatt tárolt, karbonátmentes KOH-oldattal végeztem. A mérőoldat karbonátmentességét a koncentráció meghatározására alkalmazott pH-potenciometriás méréssel ellenőriztem.

A kb. 0,2 mol/dm³-es sósavoldatot tömény sósav hígításával készítettem. A pontos koncentrációját az ismert koncentrációjú KOH-oldattal való titrálással határoztam meg a Gran-féle módszer segítségével.¹⁴

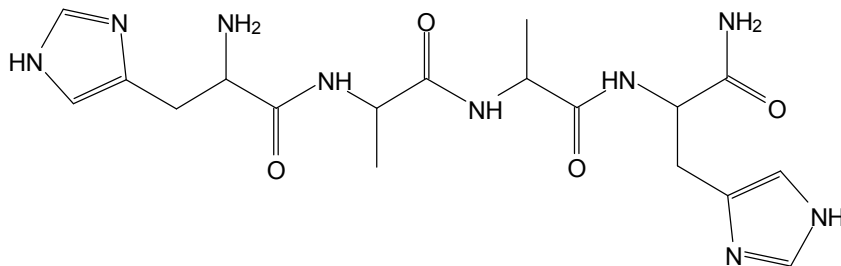
A CuCl₂ törzsoldat a Reanal cég által gyártott a.l.t. minőségű vegyszerből készült. A törzsoldat a fémionra nézve kb. 0,01 mol/dm³ koncentrációjú. A pontos fémion koncentrációt oxinát formájában gravimetriásan határozták meg.

A pH-potenciometriás méréseknél használt kálium-hidrogén-ftalát- és KCl-oldat háromszor ioncserélt víz felhasználásával szilárd vegyszerekből készült.

A vizsgált ligandumot (NH₂-HisAla₂His) a tanszéken állítottuk elő szilárd fázisú peptidszintézissel. A ligandum megfelelő szerkezetéről és tisztaságáról HPLC-s és ¹H-NMR-es méréssel győződünk meg. A peptidszintézishez felhasznált vegyszerek közül a Fmoc-hisztidint, Fmoc-alanint, Fmoc-Gly Wang gyantát, dimetilformamidot (DMF), o-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrafluoroborátot (TBTU), piperidint, N,N-diizopropil-etilamint (DIPEA) és a trifluorecetsavat (TFA) a Merck Kft-től szereztük be. A N-hidroxibenzol-triazolt (HOBt), triizopropil-szilánt (TIS), 1-metil-2-pirrolidint (NMP), dietil-étert a Sigma-Aldrich cégtől, a diklórmétánt (DCM) pedig a Spektrum-3D Kft-től vásároltuk.

4. Peptidszintézis

Az általam vizsgált peptid $\text{NH}_2\text{-His-Ala-Ala-His}$ szekvenciájú, mely savamidcsoportot tartalmaz a C-terminális végen (3. ábra)



3. ábra: Az $\text{NH}_2\text{-His-Ala-Ala-His}$ ($\text{NH}_2\text{-HisAla}_2\text{His}$) szerkezete.

A peptidet szilárd fázisú peptidszintézissel állítottam elő az öt felépítő aminosavakból, Liberty 1 mikrohullámú automata peptidszintetizáló készülékkel.

A szintézis során a Merrifield által kidolgozott szilárd fázisú peptidszintézisnek megfelelően oldhatatlan hordozó polimert (gyantát) alkalmaztunk.¹⁵ Ennek a felületéhez kötve történt a szintézis. A gyantához hozzákapcsolódott a peptid C-terminális vége, mely aminocsoportja védve volt. Ez lehetővé tette, hogy a következő aminosav vízkilépés közben a megfelelő helyen létesítsen peptidkötést. A kötés kialakulását kapcsolószerek segítik elő, ezek például a TBTU, HOBt, melyek aktiválják az aminosav karboxilcsoportját. A gyantához kapcsolódó peptidlánc a kapcsolódások során növekszik, melynek a fölösleges reagenstől való megtisztítása mosással és szűréssel történik.¹⁶

A módszer előnye, hogy a szintézis veszteségek nélkül, egyetlen reakcióedényben végrehajtható. Ezt az teszi lehetővé, hogy a minta minden egyes adagolás után szűrhető, így az elreagálatlan anyagok és a melléktermékek könnyen eltávolíthatóak. A folyamat végén a szűrőn már csak a kész peptid található a gyantához kapcsolódva.

A szilárd fázisú peptidszintézis során kétféle stratégiát különböztethetünk meg, a Boc/Bzl- és a Fmoc/tBu módszer. A peptid szintézisekor az utóbbit használtuk, mely során az aminosav-származékok α -aminocsoportját 9-fluorenil-metoxikarbonil (Fmoc), az oldalláncok funkciós csoportját pedig terc-butil védőcsoporttal láttuk el a mellékreakciók elkerülése végett.¹⁷

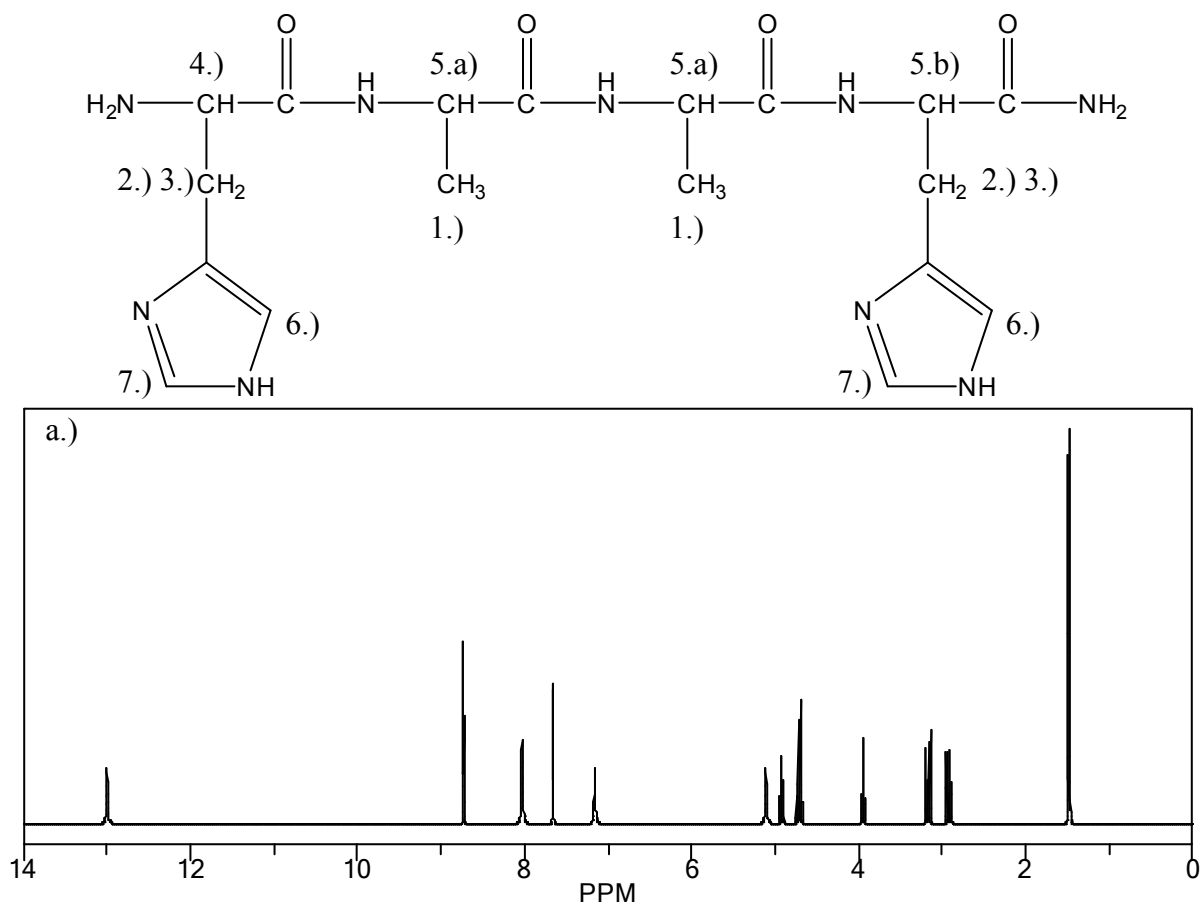
A szintézis alatt a gép automatikusan adagolta először az aminosavakat (Fmoc-His, Fmoc-Ala), aztán az aktivátort (HOBt, TBTU) és az aktivátor bázist (DIPEA), melyek katalizálják a reakciót. A kapcsolási lépések hatékonyságát mikrohullám alkalmazása növelte.

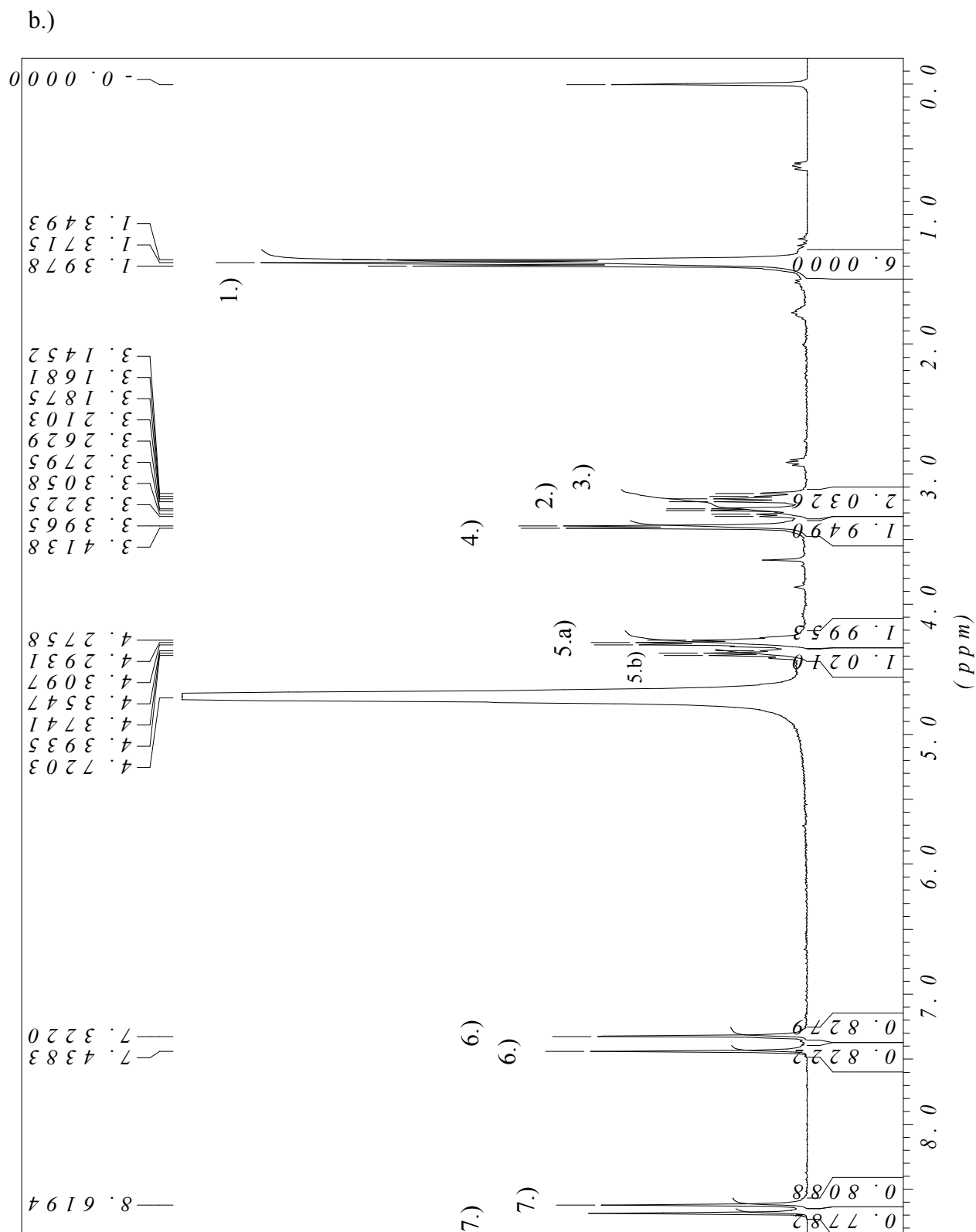
Így tiszta peptidet tudtam előállítani. Az Fmoc védőcsoport eltávolítása 20%-os piperidin-DMF eleggyel szintén mikrohullámmal történt. A gépből kivett peptid gyantához volt kötve, így az arról való hasítást kézzel végeztem a hasító eleggyel (TFA/TIS/H₂O/EDT). Az etán-ditiol (EDT) megakadályozta a hisztidin oldallánc oxidálódását. A peptidet dietil-éterrel csaptuk ki, éteres mosás és centrifugálás után a pelyhes csapadékot nagy tisztaságú argon alatt szárítottam, végül kevés vízben feloldottam és liofilizáltam.

A liofilizálás után a kinyert peptid tömege 154,67 mg volt. A peptidszintézist 0,25 mmol +10%-ra volt tervezve. Ez alapján a kitermelés 79,8%. Ennek tisztasága a titrálás során számított ligandum anyagmennyiségének és a mintába bemért anyagmennyiségének alapján 69,1%. A peptid mellett azonban csak inert szennyezés volt jelen.

A peptid tisztaságát nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás méréssel, HPLC-vel ellenőriztem. Az elválasztáshoz MeCN (6 %) és H₂O (94 %) elegyét használtam 0,1 %-os TFA tartalommal.

A ¹H-NMR spektroszkópia is megerősítette a peptid tisztaságát. A peptidre a Chemdraw program segítségével szerkesztett várható spektrum és a mért spektrum jó egyezésben van egymással. (4. ábra)





4. ábra: A ligandum várható (a.) és a kapott (b.) ^1H -NMR spektruma.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1 Protonálódási állandók

Az általam vizsgált HisAla₂His peptidet a HisGly₂His és a HisVal₂His szekvenciájú ligandumokkal hasonlítottam össze. A protonálódási állandókat az alábbi táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A HisAla₂His ligandum és az összehasonlításként használt peptidek protonálódási állandó értékei. A csillaggal jelzett vegyületek savamidcsoportot tartalmaznak a C-terminális végén.

	HisAla ₂ His*	HisGly ₂ His* ¹⁸	HisVal ₂ His* ¹⁸	Gly ₃ His ¹⁸
HL	7,41(1)	7,43	7,46	8,03
H ₂ L	13,81(1)	13,86	13,84	14,89
H ₃ L	19,11(2)	19,14	19,13	17,55
pK ₁	5,30(2)	5,28	5,28	2,66
pK ₂	6,40(1)	6,43	6,38	6,86
pK ₃	7,41(1)	7,43	7,46	7,59

A táblázat alapján látható, hogy három deprotonálódási lépés különíthető el. Ez a két hisztidin nitrogénjeihez, valamint az aminocsoportoz tartozik.

A két kisebb pK érték tartozik az imidazolnitrogének deprotonálódásához (~5,3 és ~6,4), a legnagyobb érték pedig az aminocsoportoz tartozik (~7,4). Ugyanez a tendencia figyelhető meg a HisGly₂His és a HisVal₂His rendszereknél is.

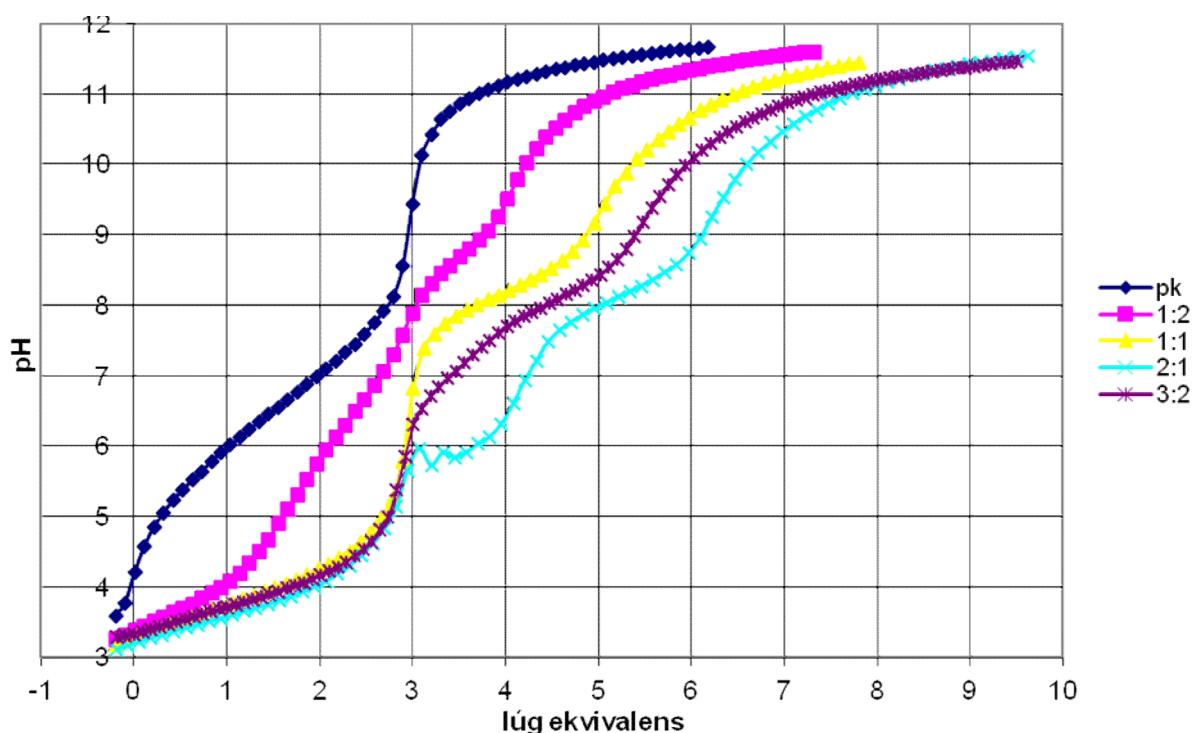
Ez a három deprotonálódási folyamat egymást átfedő lépésben játszódik le, így ezek a deprotonálódási lépések nem különülnek el egymástól. Ezért a pK értékeknek az adott donor csoportokhoz való rendelése csupán közelítő érték.

A két imidazol helyzete, környezete eltérő. Az N-terminális végén levő imidazolnitrogén van a kedvezőbb helyzetben, deprotonálódását elősegíti a mellette levő aminocsoport. A C-terminális végén savamidcsoport helyezkedik el, így az nem tudja elősegíteni az ott levő donorcsoport deprotonálódását. Korábbi vizsgálatok alapján a C-terminális részen levő imidazolnitrogén deprotonálódása nagyobb pH-n játszódik le. Ezt igazolja a Gly₃His molekulával való összehasonlítás, ahol a hisztidin imidazolnitrogénjéhez rendelhető pK₂ érték hasonló nagyságrendű.

5.2 A ligandumok réz(II)-komplexei

5.2.1 pH-potenciometriás mérések

A titrálásokat 1:1, 1:2, 3:2, 2:1 fém-ligandum aránynál végeztem el. A titrálás nagy fém feleslegben, 2:1 aránynál nem végezhető el, mert ~5-ös pH értéknél csapadék jelenik meg. Ez azért következik be, mert a ligandum nem képes megkötni ennyi fémet, és a feleslegben maradt réz(II)ionok csapadék formájában kiválnak. A többi aránynál a titrálás végig mérhető volt.



5. ábra: A HisAla₂His titrálási görbéi ($c_{\text{lig}} = 1,98 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$)

A titrálási görbe alapján megfigyelhető, hogy a komplexképződés már 3-as pH felett elkezdődik. A szabad ligandumhoz képest egy extra lúgfogyasztó folyamat jelenik meg. Egy olyan deprotonálódási folyamat figyelhető meg, mely a peptidre önmagában nem jellemző, ez a réz(II)ionnak köszönhető (5. ábra). A fémion jelenlétében kétszer annyi lúgra van szükség a titrálás során, mely feltételezhetően az amidnitrogének deprotonálódására és koordinálódására fordítódik. A pH-metriás mérések alapján az alábbi komplexeket feltételeztük (2. táblázat).

2. táblázat: A Cu(II)-komplexek összetétele és stabilitási állandó értékei ($\log\beta$) különböző peptidek esetén. A csillaggal jelzett molekulák savamidcsoportot tartalmaznak a C-terminális részen.

komplex	HisAla ₂ His*	HisGly ₂ His* ¹⁸	HisVal ₂ His* ¹⁸	Gly ₃ His ¹⁸
[CuAH] ²⁺	14,83(3)	14,97	15,02	12,24
[CuA] ⁺	10,53(4)	10,90	10,03	8,47
[CuAH ₁]	2,57(9)	3,14	2,55	1,63
[CuAH ₂] ⁻	-5,84(6)	-5,30	-6,47	-5,79
[CuAH ₃] ²⁻	-16,02(9)	-15,03	-16,41	-16,67
[Cu ₃ A ₂ H ₆] ²⁻	-18,44(19)	-15,00	-	-
pK(His)	4,30	4,07	4,99	3,77
pK ₁ (amid)	7,96	7,76	7,48	6,84
pK ₂ (amid)	8,41	8,44	9,02	7,42
pK ₃ (amid)	10,18	9,73	9,94	10,88

$$pK(\text{His}) = \log\beta([\text{CuAH}]^{2+}) - \log\beta([\text{CuA}]^{+})$$

$$pK_1(\text{amid}) = \log\beta([\text{CuA}]^{+}) - \log\beta([\text{CuAH}_1])$$

$$pK_1(\text{amid}) = \log\beta([\text{CuAH}_1]) - \log\beta([\text{CuAH}_2]^{-})$$

$$pK_1(\text{amid}) = \log\beta([\text{CuAH}_2]^{-}) - \log\beta([\text{CuAH}_3]^{2-})$$

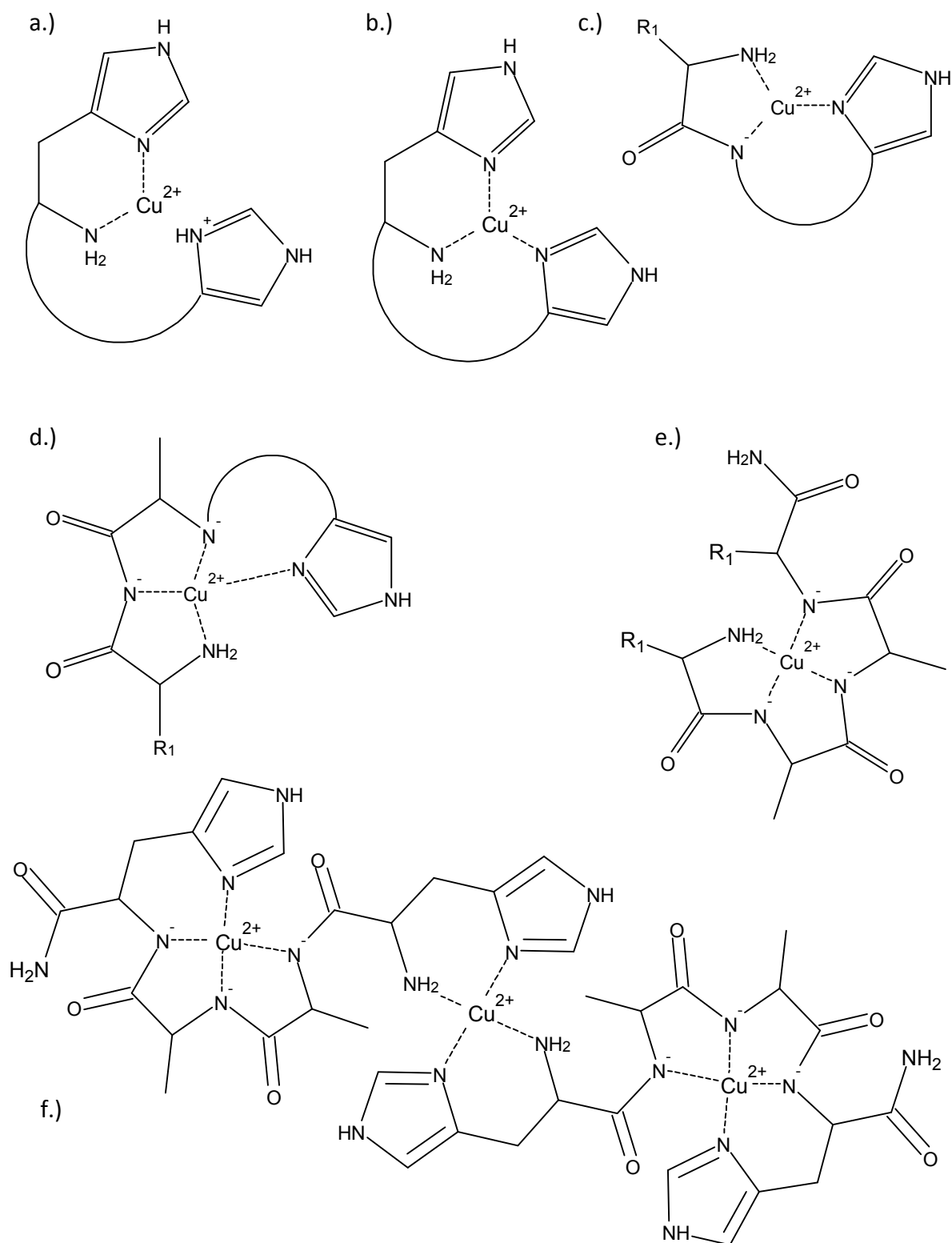
A [CuA₂]⁺ komplexek keletkezését nem feltételeztük, de a létezése nem zárható ki. A ligandum 1:1 arányú komplexeket képezett a réz(II)ionnal, de többmagvú komplex is megvalósulhat, hasonlóan a HisGly₂His ligandumhoz. Ebben az esetben két fémion kapcsolódik egy-egy ligandum C-terminális részéhez (Im, N⁻, N⁻, N⁻) koordinációval, a harmadik fémion pedig hisztaminszerű koordinációval kapcsolja össze a peptideket (6.f ábra). Ilyen komplex a HisVal₂His esetében nem feltételezhető.

A kis pH-n kialakuló [CuAH]²⁺ komplex a lúgos tartomány felé közeledve lépcsőzetes deprotonálódással [CuA]⁺ komplexen keresztül fokozatosan [CuAH₁], [CuAH₂]⁻ majd [CuAH₃]²⁻ komplex keletkezik (6.a, b, c, d ábra).

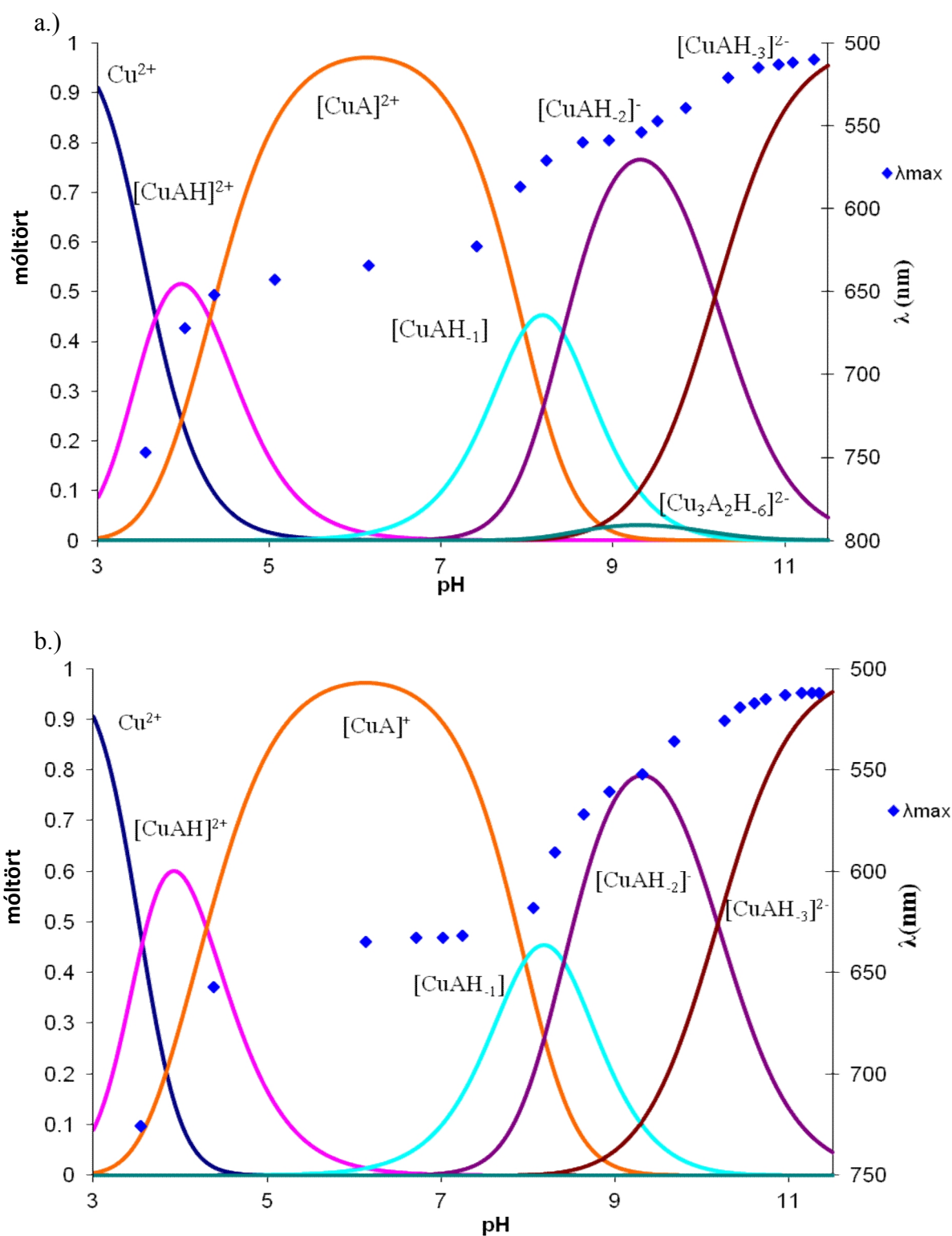
Első lépésben a koordinációban részt nem vevő imidazolnitrogén deprotonálódik, majd makrokelát létesítésével kötődik a rézionhoz, kialakítva a [CuA]⁺ szerkezetet. Erre utal, hogy a pK(His) értéke kisebb, mint a szabad ligandumra jellemző érték. Hasonló tendenciát mutat a HisGly₂His és a HisVal₂His szekvenciájú peptid is. Az így kialakult komplex gátolja az amidnitrogének deprotonálódását, ami által az nagyobb pH tartományban játszódik le. Ezt mutatja a Gly₃His ligandumnál nagyobb pK₁(amid) és pK₂(amid) érték.

Ezt követően az amidnitrogének deprotonálódása kezdődik meg. A HisGly₂His szerkezetnél jól elkülöníthető a három donorcsoport deprotonálódása. A HisVal₂His

molekulánál az első két amidnitrogén protonvesztése jól elkülöníthető, de a harmadik amidcsoport jellemző $pK_3(\text{amid})$ értéke már nem sokkal különbözik a $pK_2(\text{amid})$ értékétől. Az általam vizsgált HisAla₂His ligandumnál ezzel szemben az első két amidcsoport deprotonálódása zajlik közel azonos pH-n, és a harmadik amidcsoport deprotonálódása és koordinálódása gátolt. A C-terminális részen elhelyezkedő imidazolnitrogénnel kialakított makrokelát nagyobb pH tartományba tolja ezt a folyamatot és a HisGly₂His és a HisVal₂His ligandumnál is nagyobb $pK_3(\text{amid})$ értékkel rendelkezik. A láncvégi imidazolnitrogén koordinációja a $[\text{CuAH}_{-3}]^{2-}$ szerkezetnél már nem valósulhat meg, mert a réz(II)ion koordinációs szférája telítődik az amidnitrogénekkal (6.e ábra).



6. ábra: A vizsgált rendszerben a lehetséges koordinációs módok sematikus rajza:
 a.) $[CuAH]^{2+}$, b.) $[CuA]^+$, c.) $[CuAH_{-1}]$, d.) $[CuAH_{-2}]^-$, e.) $[CuAH_{-3}]^{2-}$, f.) $[Cu_3A_2H_{-6}]^{2-}$



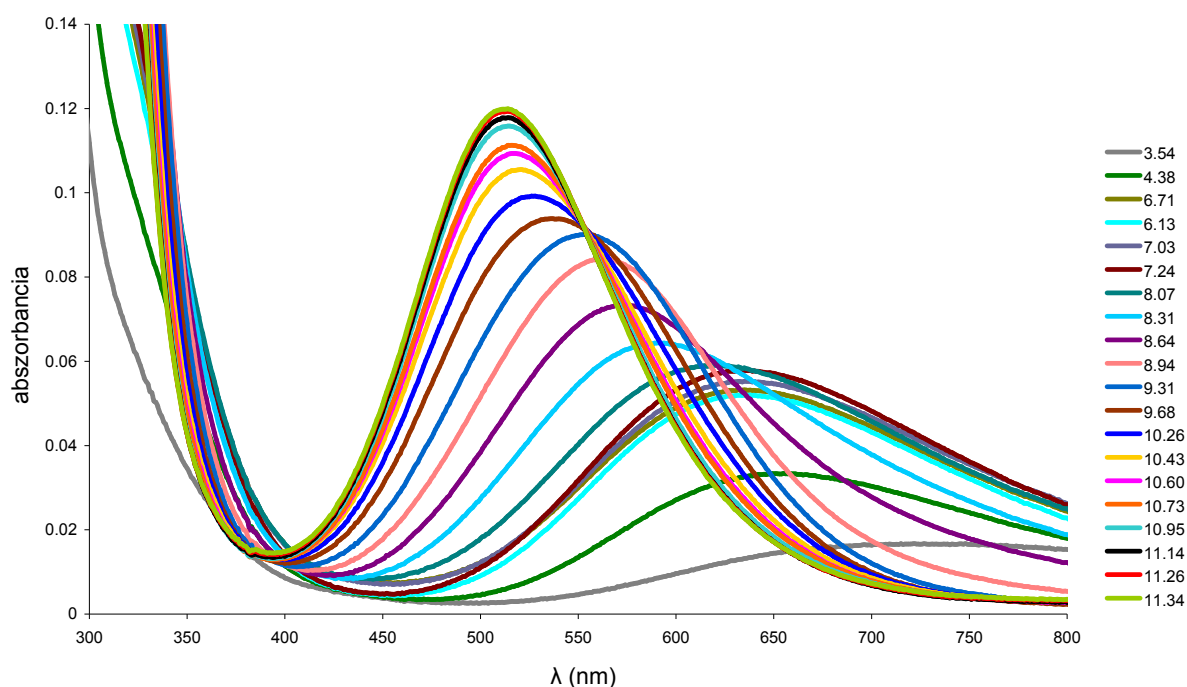
7. ábra: A komplexek eloszlás görbéi és az abszorpciós maximumokhoz tartozó hullámhossz a pH függvényében: (a másodlagos y-tengelyen a hullámhossz értékek (λ) csökkenő sorrendben szerepelnek)

a.) $\text{Cu(II)}\text{-}A=1:1$ $c(A)=2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$, b.) $\text{Cu(II)}\text{-}A=1:2$, $c(A)=2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$

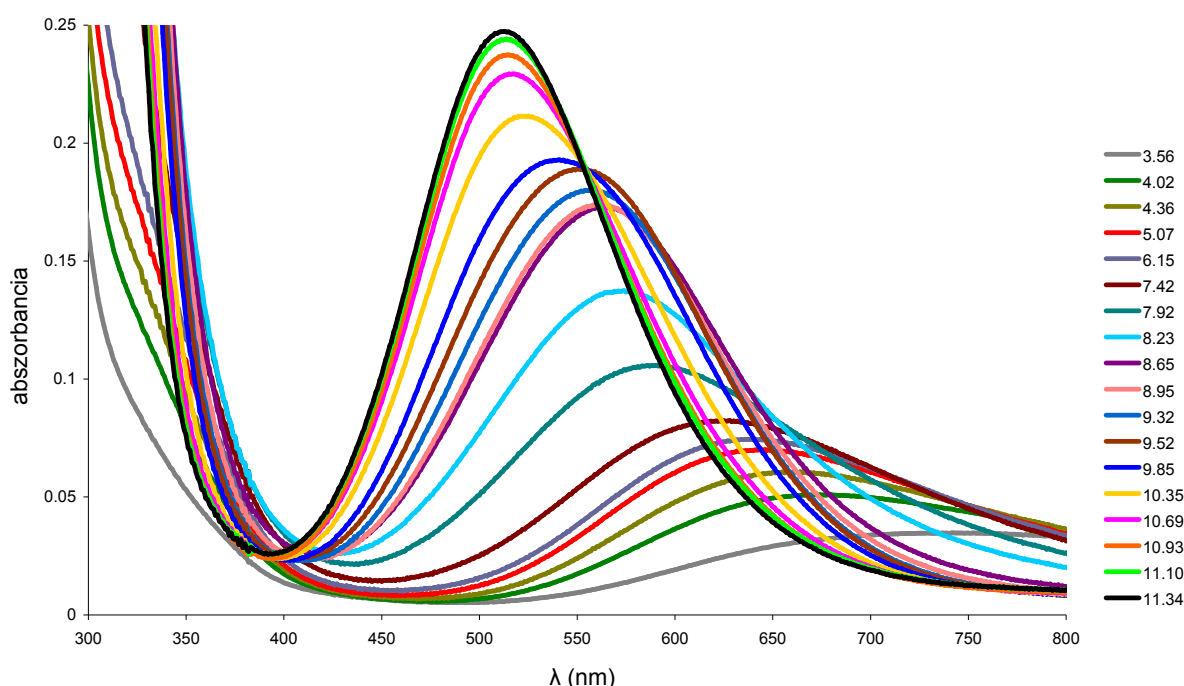
5.2.2 UV-látható spektrofotometriás mérések

A spektroszkópiás adatok alátámasztják a feltételezett szerkezeteket. A spektroszkópiás görbéken a $\lambda_{\max}$ értékek a pH növelésével kisebb értékeket vesznek fel. Ez az amidnitrogének deprotonálódására és koordinálódására utal.

Az eloszlási görbe alapján látható, hogy bizonyos pH tartományokban csak egyféle komplex van döntő mértékben jelen, a többi elhanyagolható mennyiségben található meg mellette. Így egy adott szerkezet abszorpciós maximumához tartozó hullámhossz érték megbecsülhető, mivel ezt a domináns komplex határozza meg.



8. ábra A Cu(II)-HisAla₂His 1:2 arányú rendszer UV-látható spektrumai a pH függvényében.



9. ábra: A Cu(II)-HisAla₂His 1:1 arányú rendszer UV-látható spektrumai a pH függvényében.

3. táblázat: A Cu(II)-komplexekre számolt és mért abszorpciós maximum ($\lambda_{\max}$) értékek.

	$\lambda_{\max}$ számított	$\lambda_{\max}$ mért	koordinálódó donorcsoportok
CuAH pH=4,02	675	672	NH ₂ , Im(N)
CuA pH=6,15	616	634	NH ₂ , Im(N), Im(N) távoli
CuAH ₂ pH=9,33	574	554	NH ₂ , N ⁻ , N ⁻
CuAH ₃ pH=11,5	531	510	NH ₂ , N ⁻ , N ⁻ , Im(N)
Cu ₃ A ₂ H ₆ pH~11	515	518	NH ₂ , N ⁻ , N ⁻ , N ⁻
	559	518	2x(NH ₂ , Im(N))
	522		N ⁻ , N ⁻ , N ⁻ , Im(N)

A [CuAH]²⁺ komplexben a fémion feltételezhetően egy hisztaminszerű koordinációval kapcsolódik a ligandumhoz. Ekkor a C-terminális részen elhelyezkedő imidazolnitrogén még protonált formában van jelen, így a koordinációban nem vehet részt. Ezt igazolja, hogy a mért $\lambda_{\max}$ megegyezik az empirikus képlet (3. egyenlet) alapján számolt értékkel.

A [CuA]⁺ szerkezet esetén feltételezhetően a távolabbi imidazol donorcsoport is kötődik a réz(II)ionhoz. Ezt igazolja, hogy az abszorpciós maximum a kisebb hullámhossz felé tolódott. A számított $\lambda_{\max}$ értéknél azonban nagyobb értéket vesz fel, ez a makrokelát

kialakulásával magyarázható, mert az empirikus képlet nem veszi figyelembe a kelátgyűrű nagyságát.

A $[\text{CuAH}_2]^-$ esetén is a kapott hullámhossz a számolt értékek közé esik. Itt is feltételezhető a távoli imidazol koordinációja, de mellette a réz(II)ion már nem hisztaminszerű koordinációban vesz részt, hanem egy amino- és két amidcsoporttal képez komplexet. A korábban vizsgált Gly_3His szerkezetű molekulánál az ugyanilyen a felépítésű komplexre kapott λ_{max} hasonló érték, 561 nm és az imidazolnitrogén koordinációja feltételezett volt.¹⁸

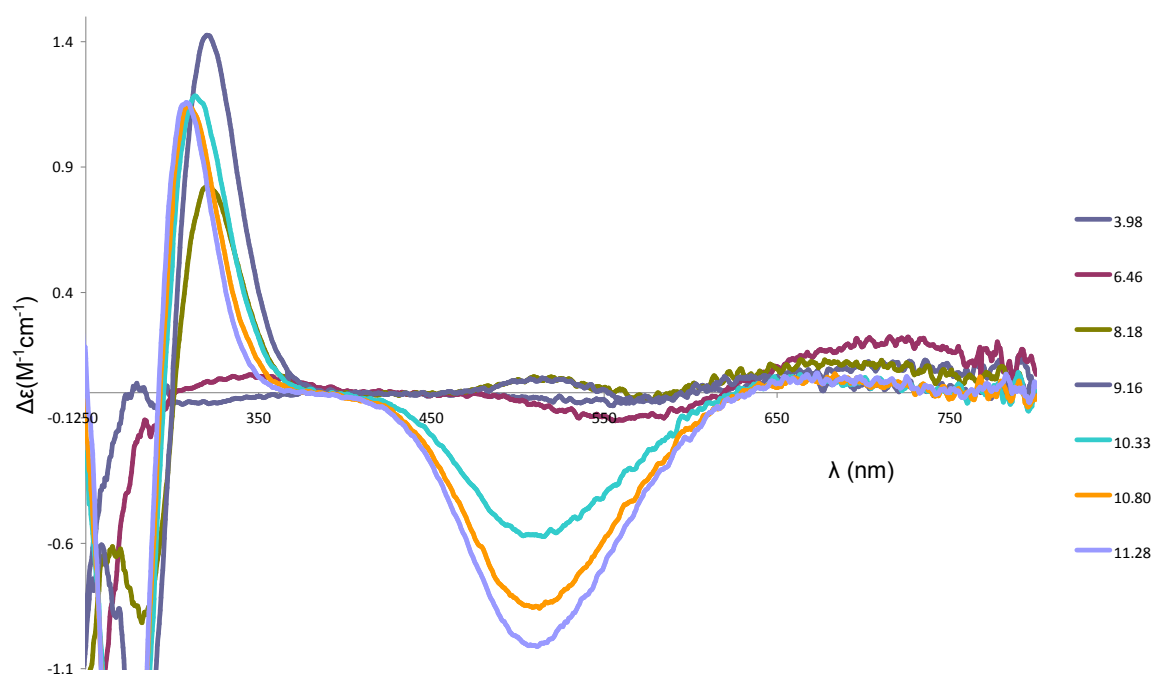
A $[\text{CuAH}_3]^{2-}$ szerkezetnél a réz(II)ion koordinációs szférája telített, így a távolabbi imidazol már hozzá kötődni nem képes. A számolt λ_{max} érték alig tér el a kapott eredménytől, mely a komplex feltételezett szerkezetét igazolja.

Többmagvú komplex esetén nehéz megbecsülni az abszorpciós maximumokhoz tartozó hullámhossz értékét. Az annál kialakuló bonyolult szerkezetet nem veszi figyelembe az empirikus képlet, csak a rézion koordinációs szférájában elhelyezkedő donorcsoportokat.

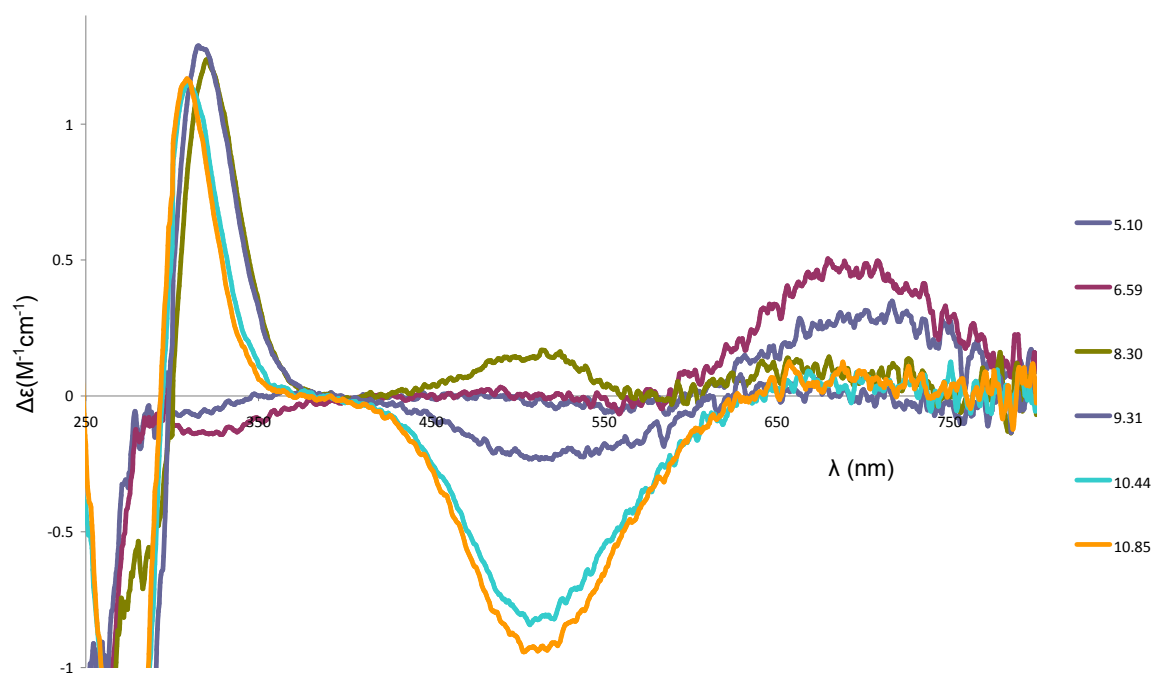
A spektroszkópiás mérések alátámasztották a feltételezett szerkezeteket. Az empirikus képlet alapján a mérési eredményekkel összeegyeztethető értékeket kaptunk.

5.2.3 CD-spektroszkópiás mérések

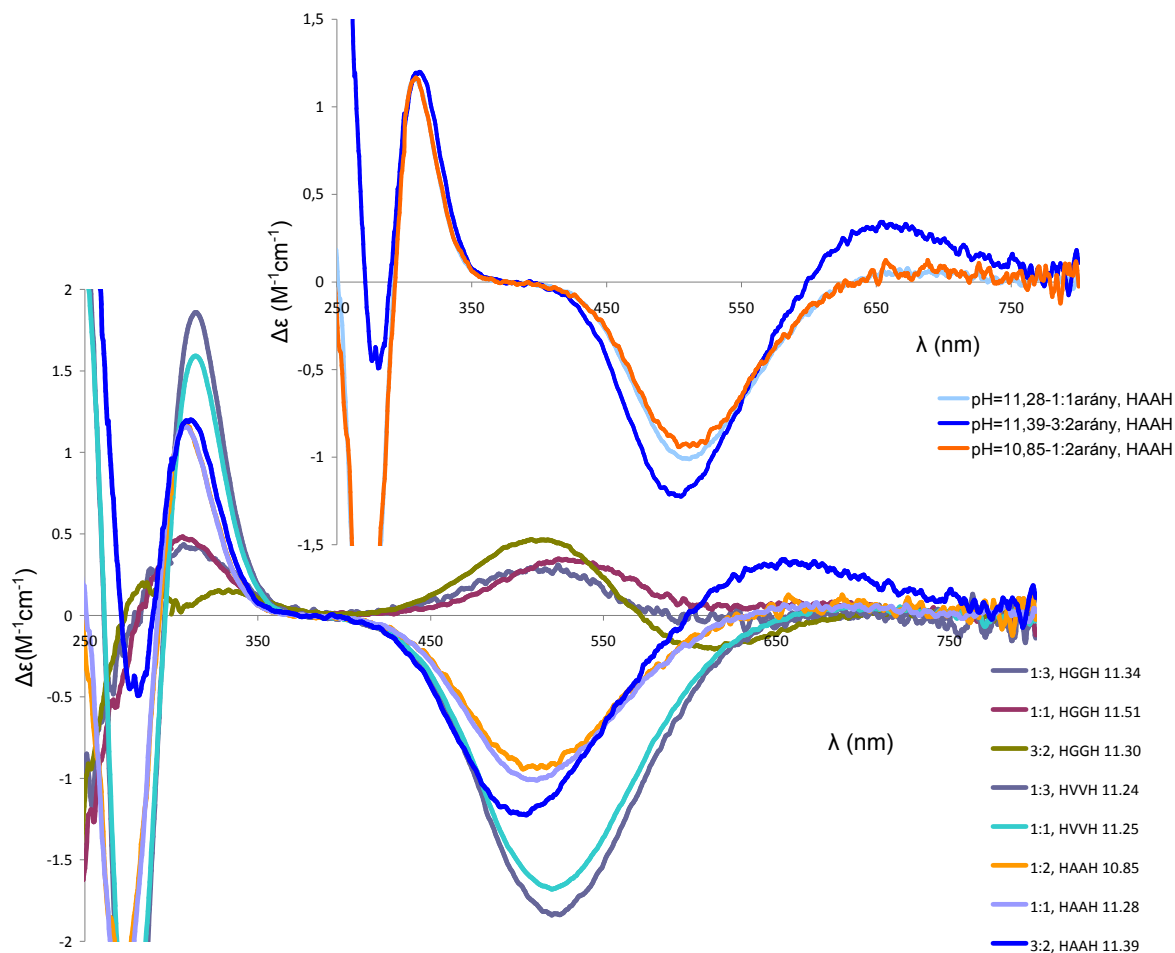
A feltételezett szerkezetek CD-spektroszkópiás vizsgálatokkal is ellenőriztem. A kapott eredményeket összehasonlítottam a Tanszéken már korábban vizsgált mérésekkel. A spektrumokat 1:1, 1:2, és 3:2 arányoknál vettem fel.



10. ábra: A Cu(II)-HisAla₂His 1:1 arányú rendszer CD spektrumai a pH függvényében.



11. ábra: A Cu(II)-HisAla₂His 1:2 arányú rendszer CD spektrumai a pH függvényében.



12. ábra: CD spektrumok ~11-es pH értéknél különböző rendszerekben.¹⁸

A CD-spektrumokon jól látható, hogy kb 5-6-os pH értéknél ~700 nm-nél egy kis intenzitású csúcs jelenik meg. Ez az abszorpciós maximum a hisztaminszerű koordinációnak feleltethető meg. A pH növelésével ez eltűnik és ~500 nm értéknél kis pH-n pozitív, majd nagyobb pH-n negatív csúcsok jelennek meg. A 8-as pH körül felvett spektrumoknál jelenik meg ez a pozitív csúcs, mely a $[\text{CuAH}_{-1}]$ komplexhez rendelhető. Az amid nitrogének deprotonálódása és koordinálódása eredményezi a negatív Cotton-effektust. Az amid nitrogének lépcsőzetes protonvesztése következtében a csúcs intenzitása megnő. A kis hullámhossz tartományban (~300 nm) megjelenő nagy intenzitású pozitív csúcs a $\text{Cu(II)} \rightarrow \text{N}^-$ töltésátviteli sáv, ami szintén az amidnitrogének deprotonálódását jelzi (10., 11. ábra).

A spektrumokat összehasonlítva a $\text{Cu(II)-HisGly}_2\text{His}$ és a $\text{HisVal}_2\text{His}$ rendszerek spektrumaival az tapasztalható, hogy az általam vizsgált $\text{HisAla}_2\text{His}$ peptid a $\text{HisGly}_2\text{His}$ -hez hasonló komplexképződési sajátságokat mutat. Az abszorpciós maximumok a két peptid esetén hasonló hullámhosszon jelennek meg. A különbség a ~500 nm-nél megjelenő

csúcsokban mutatkozik, a HisGly₂His molekulánál pozitív csúcs jelenik meg. Korábban vizsgált rendszereknél megállapították, hogy ha a molekula a C-terminális végétől számítva a harmadik helyen glicin aminosavat tartalmaz, akkor a Cotton-effektus ellentétes előjelű, mint a többi peptid esetén.

A HisVal₂His és a HisGly₂His rendszer spektrumai között azonban kis eltérés van, a ~500 nm-nél megjelenő negatív abszorpciós maximum a kisebb hullámhosszak felé tolódott az általam vizsgált peptid esetén (HisVal₂His: $\lambda_{\max} = 522$ nm (pH = 11,25), HisAla₂His: $\lambda_{\max} = 509$ nm (pH = 11,28)) (12. ábra).

A CD-spektrumok alátámasztották a potenciometria és UV-látható spektroszkópia alapján feltételezett szerkezeteket. A 3:2 aránynál a spektrum abszorpciós maximuma eltér a többi aránynál mért $\lambda_{\max}$ értéktől, mely többmagvú komplexek jelenlétére utal.

6. Összefoglalás

Az emberi szervezet számára feltétlenül szükséges a réz(II)ion jelenléte. Elengedhetetlen a redoxi folyamatok katalizálásának szempontjából, és sok más különböző folyamathoz is nélkülözhetetlen, nem csak az emberi szervezet számára. A növényvilágban a fotoszintetikus folyamatokban vesz részt, míg a puhatestű és az ízeltlábú állatok oxigénszállító festékanyagának a részét képezi. Az emberi szervezetben részt vesz a csontképződésben, a légzési láncban, segíti a vas felszívódását és beépülését. A fémion metalloproteinekben és metalloenzimekben aminosav oldallánchoz kötött formában található meg.

A legfontosabb kötőhely a hisztidin oldalláncában megtalálható imidazol donorcsoport. A vele alkotott komplex szerkezetét befolyásolja a hisztidin elhelyezkedése, illetve a peptidet felépítő aminosavak oldalláncai.

Munkám során olyan tetrapeptidet állítottam elő szilárd fázisú peptidszintézissel, mely a C- és az N-terminális végen is hisztidint tartalmaz ($\text{NH}_2\text{-His-Ala-Ala-His}$). Ezt követően réz(II)ionnal alkotott komplexeit vizsgáltam pH-potenciometria, UV-látható- és a CD-spektroszkópia segítségével.

A pH-metriás mérések során 1:1 fém-ligandum arányú komplexek keletkezésén kívül többmagvú szerkezetet is feltételeztünk. A réz(II)ion kis pH-n hisztaminszerűen kapcsolódik az imidazolnitrogénhez $[\text{CuAH}]^{2+}$ komplexet kialakítva. A pH-t emelve a láncvégi imidazolnitrogén deprotonálódik, majd az amidcsoportok protonvesztése és koordinálódása játszódik le kialakítva a $[\text{CuA}]^+$, $[\text{CuAH}_1]$, $[\text{CuAH}_2]^-$, $[\text{CuAH}_3]^{2-}$ komplexeket. A C-terminális részen elhelyezkedő imidazolnitrogén koordinációja is feltételezhető a $[\text{CuA}]^+$, $[\text{CuAH}_1]$, $[\text{CuAH}_2]^-$ komplexekben. A három koordinálódott amid donorcsoport és az aminocsoport telíti a réz(II)ion koordinációs szféráját, így ennél a szerkezetnél ($[\text{CuAH}_3]^{2-}$) már nem képes kapcsolódni a távolabbi imidazolnitrogén.

Egy $[\text{Cu}_3\text{A}_2\text{H}_6]^{2-}$ összetételű többmagvú komplex képződését is feltételeztünk. Az UV-látható spektrofotometriás eredmények és a CD-spektroszkópiás adatok is alátámasztják ezen szerkezetek keletkezését.

7. Summary

Copper(II) ion is an essential trace element for humans and animals. It plays an important role in catalysis of redox processes in the human body, animals and plants. Copper(II) ion takes part in the photosynthesis for plants, in the oxygen transport system for molluscs and arthropod, and in the ossification and in the respiratory chain for humans, moreover the uptake of iron requires also the presence of copper ion. The metal ions are usually bound to the side chain of donor atoms of the peptide chain of metalloproteins and metalloenzymes.

The histidine side chain of oligopeptides and proteins is the most important binding site for copper(II)ion. The structure of these complexes can be influenced by the number and location of histidine in the amino acid sequence.

During my work I synthesized a tetrapeptide containing histidine at the C- and the N-termini (NH₂-His-Ala-Ala-His). The synthesis was performed by means of automated peptide synthesis based upon the solid phase peptide synthesis.

The potentiometry data can be fitted by supposing the formation of molecular and polynuclear complexes. At acidic pH copper(II) ion binds to the N-terminal part of the molecule (histamine-like coordination) forming the [CuAH]²⁺ complex. Increasing the pH the deprotonation of the imidazole ring on the C-termini and the preceding amide nitrogens results in the formation of [CuA]⁺, [CuAH₋₁], [CuAH₋₂]⁻, [CuAH₋₃]²⁻ complexes. The participation of the C-terminal imidazole nitrogen is also supposed in the [CuA]⁺, [CuAH₋₁], [CuAH₋₂]⁻ complexes. The coordination of amino-, and three amide nitrogens in the [CuAH₋₃]²⁻ species however, saturates the coordination sphere of copper(II)ion, so the binding of the other imidazole nitrogen can be excluded.

We supposed the existence of a trinuclear complex [Cu₃A₂H₋₆]²⁻. Which is supported by UV-vis and CD-spectroscopic data.

8. Felhasznált irodalom

1. Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B.: *Bevezetés a bioszervetlen kémiába*, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest (2007)
2. Várnagy K., Sóvágó I., *Bioszervetlen kémia* (előadásanyag), Debreceni Egyetem
3. www.kolloidok.com/rezkolloid-rez-oldat/
4. R. O. Becker, A. A. Marino: *Electromagnetism & life*, State University of New York Press, Albany (1982)
5. I. Sóvágó, K. Ósz: *Metal ion selectivity of oligopeptides*, Dalton Trans., 3841-3854 (2006)
6. I. Sóvágó: *Metal complexes of peptides and their derivatives* (IV.) in *Biocoordination Chemistry* (e.d: K. Burger, Ellis Horwood, 1990)
7. N. I. Jakab, B. Gyurcsik, T. Körtvélyesi, I. Vosekalna, J. Jensen, E. Larsen, *J. Inorg. Biochem.*, 101, 1376-1385 (2007)
8. Zékány L., *pH-potenciometria* (oktatási segédanyag), Debreceni Egyetem
9. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1196 (1985)
10. L. Zékány, I. Nagypál, in: *Computational Methods for the Determination of Formation Constants*, (e.d.: D. J. Legett), Plenum Press, New York, 1985, pp 291-299
11. Fábián I., *Spektrofotometria* (oktatási segédanyag), Debreceni Egyetem (2009)
12. H. Sigel and R. B. Martin: *Chem. Rev.*, **82**, 385
13. Cantor, C. R.; Schimmel, P. R., in: *Biophys. Chem.*, Vol. 2, Chapter 8 (1980)
14. G. Gran: *Acta Chem. Scand.*, **4**, 559 (1950)
15. R. B. Merrifield: *J. Am. Chem Soc.*, **85**, 2149 (1963)
16. Merrifield B. ACS, *Washington, D.C.J.I.Seeman.Ed.* (1993)
17. Carpino L. A., Han G. Y., *J. Org. Chem*, **37**, 3404-3409 (1972)
18. Serfőző Dóra: *SOD-enzimet modellező peptidek szintézise és réz koplexeinek vizsgálata*, Diplomamunka, Debrecen (2012)

Köszönetnyilvánítás

Őszintén köszönöm témavezetőmnek, Dr. Várnagy Katalin egyetemi docensnek a munkám során nyújtott sokrétű, önzetlen segítségét, végtelen türelmét és megértését.

Köszönettel tartozom a Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport minden tagjának a munkám során adott tanácsaikért, segítségükért és biztatásukért, valamint azért, hogy a munkám elvégzéséhez baráti légkört biztosítottak

A dolgozat a TÁMOP-4.2.2/B-10/-1-2010-0024 pályázat anyagi támogatásával készült.