

Debreceni Egyetem

*Hisztidint tartalmazó peptidek átmenetifémekkel történő
oldategyensúlyi vizsgálata*

Tudományos Diákköri Dolgozat

Laskai Aliz

Kémia BSc III. évfolyam

vegyész szakirány

Témavezető: Dr. Várnagy Katalin

egyetemi docens

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Technológiai Kar

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debrecen, 2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Célkitűzés.....	5
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1. A vizsgált fémionok élettani hatása, biológiai funkciója.....	6
3.2. A fémionok koordinációs kémiája.....	8
3.3. Hisztidintartalmú terminálisan védett peptidek jellegzetes kötémódjai.....	9
3.3.1. Egy hisztidint tartalmazó, terminálisan védett peptidek komplexképzése.....	9
3.3.2. Terminálisan védett multihisztidin peptidek komplexképzése.....	11
4. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek.....	13
4.1. pH-potenciometria.....	13
4.2. UV-VIS spektrofotometria.....	14
4.3. CD spektroszkópia.....	16
4.4. ¹ H-NMR spektroszkópia.....	17
5. Kísérleti eredmények és kiértékelésük.....	19
5.1. A vizsgált ligandumok sav-bázis sajátosságai.....	19
5.2. Az Ac-SPKTNMKHA-NH ₂ ligandum átmenetifém komplexei.....	21
5.2.1. Az Ac-SPKTNMKHA-NH ₂ Cu(II) komplexei.....	24
5.2.2. Az Ac-SPKTNMKHA-NH ₂ Ni(II) komplexei.....	29
5.3 A Cd(II) és a tetrapeptidek komplexképzése.....	31
Összefoglalás.....	37
Summary.....	38
Köszönetnyilvánítás.....	39
Irodalomjegyzék.....	40
Mellékletek, függelék.....	41
Nyilatkozat a dolgozat eredetiségéről.....	42

1. Bevezetés

Az élő szervezet megfelelő működésében a fémionok fontos szerepet játszanak: redoxi folyamatokban vesznek részt, ahol az egyes ritka oxidációs állapotokat (pl.: $Fe^{II}/Fe^{III}/Fe^{IV}$, Cu^I/Cu^{II} , $Ni^I/Ni^{II}/Ni^{III}$) biomolekulák stabilizálják. Továbbá segítik a szervezet szerkezetének felépítését és stabilizálását - a vázszerkezetek struktúráját és a biomakromolekulák másodlagos/harmadlagos szerkezeteinek kiépítését (pl.: Ca/Zn) -, szabályozó szerepet töltenek be az információ átvitelben és metabolikus folyamatokban (pl.: $Na/K/Mg/Ca$).^[1]

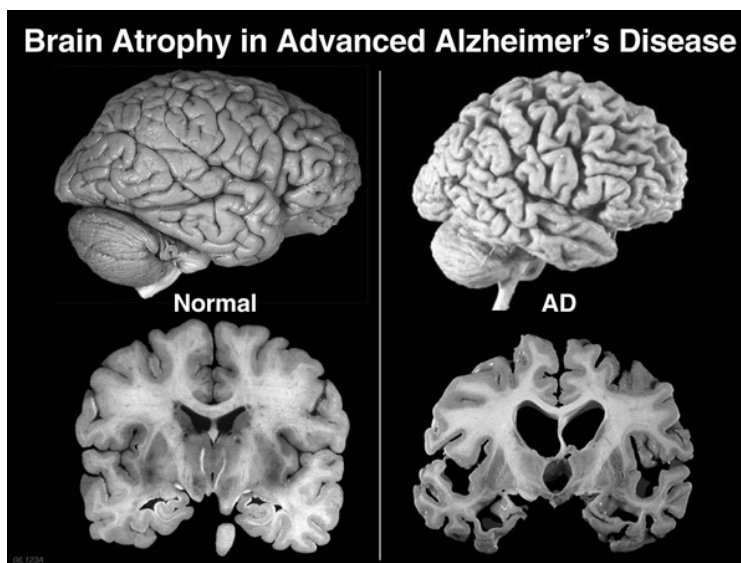
A szervezetnek szükséges fémionokat csoportosíthatjuk egyrészt az által, hogy milyen mennyiségben szükségesek a szervezet helyes működéséhez: makro tápelemek azon fémionok, amelyek mennyisége meghaladhatja a napi 100 mg bevitelt, ezek az ásványi anyagok (pl.: Ca/Mg). A mikro tápelemek körébe ezzel ellentétben azon fémionok sorolhatóak, amelyek napi bevitele a 100 mg-ot nem haladhatja meg, sőt, egyes irodalmak a napi 25 mg mennyiséget fogadják el megengedett beviteli mennyiségnek. Ezeket a fémionokat nyomelemeknek nevezzük (pl.: $Cu/Zn/Fe$).

Egy másik csoportosítási lehetőség az, amikor a fémionokat élettani hatásuknak megfelelően soroljuk be, ami szerint beszélhetünk hasznos, létfontosságú, káros és toxikus elemekről. Hasznosnak akkor minősítünk egy elemet, ha a szervezetben hiányakor irreverzibilis elváltozások indulnak be. Ha ez a hasznosság több faj esetén is fennáll, akkor az elem létfontosságú. Ez a létfontosság azonban egy adott koncentráció tartományon belül fejt ki pozitív biológiai-fiziológiai hatást, e koncentráció alatt hiánybetegség, felette pedig fölöslegbetegség lép(het) fel. Egy szervezet működésében zavarokat előidéző elemek a káros fémionok, toxikusak pedig azok, amelyeknek egyszerűen nem ismerünk pozitív hatását (pl.: $Pd/Hg/Cd$).^[2]

Napjainkban az is köztudott, hogy bizonyos betegségek „kísérőjeként” fémion felhalmozódás jelentkezik a szervezeten belül. Egyik ilyen betegségcsoportba tartoznak a neurodegeneratív megbetegedések, amelyek a társadalomban a harmadik leggyakoribb betegség csoport a daganatos és az érrendszeri megbetegedések után. Fő tüneteik a mozgáskoordinációs problémák, demencia (értelmi hanyatlás), identitásvesztés, mentális- és

viselkedészavarok. Számos betegség tartozik e csoportba, de talán a legismertebbek: az Alzheimer-kór, a Parkinson-kór, a Sclerosis multiplex és a Huntington-kór. ^{[3][4]}

A betegségek „külsőleg nem észrevehető” tünete az idegrendszer szerkezetének patológias elváltozása, a fehérjék konformációváltozása és az azt követő aggregációjuk. Az Alzheimer-kórban speciálisan kimutatható az amiloid prekursor protein (APP) túlermelődése és helytelen hasadásakor keletkező béta-amiloid ($A\beta$) felhalmozódás az agyszövetben, amelyek összekapcsolódásuk révén ún. plakkokat hoznak létre. Az Alzheimer-kórban kifejezetten ezen plakkokban, az extracelluláris térben mutattak ki fémion felhalmozódásokat ($Zn/Cu/Fe$). ^{[4][5][6]}



1. ábra: egy egészséges személy és egy Alzheimer-kórban szenvedő beteg agyáról készült felvétel ^[A]

Napjainkra az is egyértelművé vált előzetes kutatások alapján, hogy a biomakromolekulák közül a fehérjék azok, amelyek a fémionok megkötésében meghatározó szerepet játszanak. A létfontosságú elemek közül a cink és a réz szinte kizárólag fehérjemolekulákhoz kötődve fordul elő metalloenzimek vagy metalloproteinek formájában. Ugyanakkor a platinafémek, például a kadmium toxikussága is hasonló folyamatok mechanizmusaként írható le.

Továbbá előzetes kémiai kísérletek azt is kimutatták, hogy a fémionok kötődése leginkább a hisztidint és ciszteint tartalmazó fehérjerészekhez mutat nagyobb affinitást, ezzel egyidejűleg biológiai kutatások szintén igazolták, hogy a fémion felhalmozódások leginkább e két aminosavat nagyobb mennyiségben tartalmazó agyi szövetekben mutathatóak ki, lokálisan, a szervezet normális fémionháztartása ellenére. ^{[2][7]}

Ezen kutatások és tények háttérében felmerülhet a kérdés, hogy vajon lehetnek-e az egyes fémionok közvetlenül felelősek a neurodegeneratív betegségek kialakulásáért? S ha igen, milyen folyamatok eredményeként és hogyan kötődnek és okoznak konformáció megváltozást a fehérjeállományban?

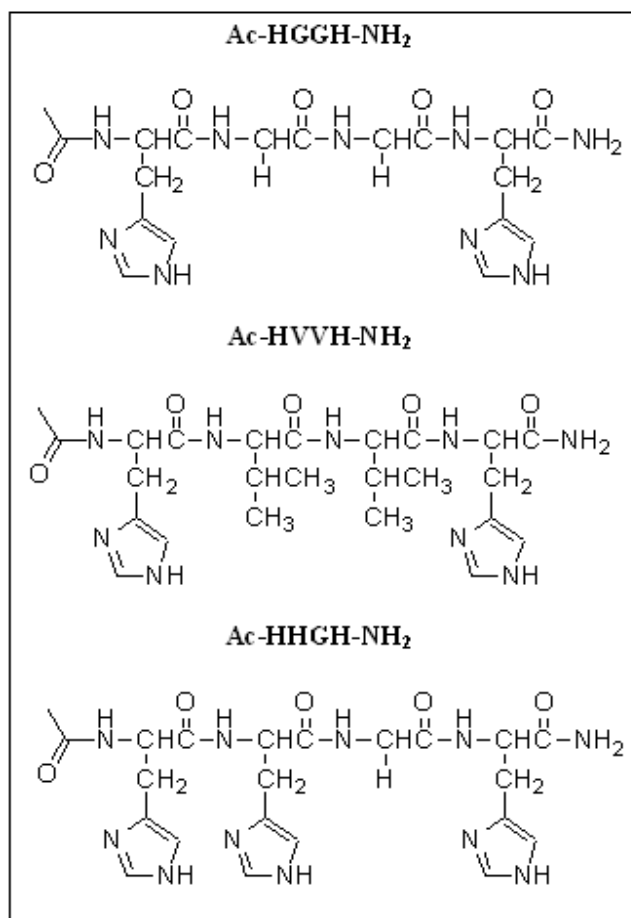
A betegségek elsődleges mechanizmusa, kiváltó oka a mai napig nem ismert pontosan, feltételezések vannak csupán. Így az ez irányú kutatások célja az - ami a Debreceni Egyetem Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportján belül is folyik -, hogy a lejátszódó folyamatokat „kémiailag” még jobban megismerjük és közelebb kerüljünk megértésükhöz, hogy az egyes fémionok közvetve, vagy közvetlenül, kiváltó, vagy nem kiváltó elemként lép(het)nek-e fel a neurodegeneratív betegségek kialakulásában.^[3]

Egy másik oldalról, az egyes átmeneti fémek komplexképződési mechanizmusát és jellegét felderítve lehetőség nyílt olyan kelátorok, fémmegkötő molekulák tervezésére, amelyek a fémion felhalmozódással járó betegségek esetén hatékonyak lehetnek a felesleges mennyiségük eltávolításában - szelektíven - a szervezetből.

2. Céltűzés

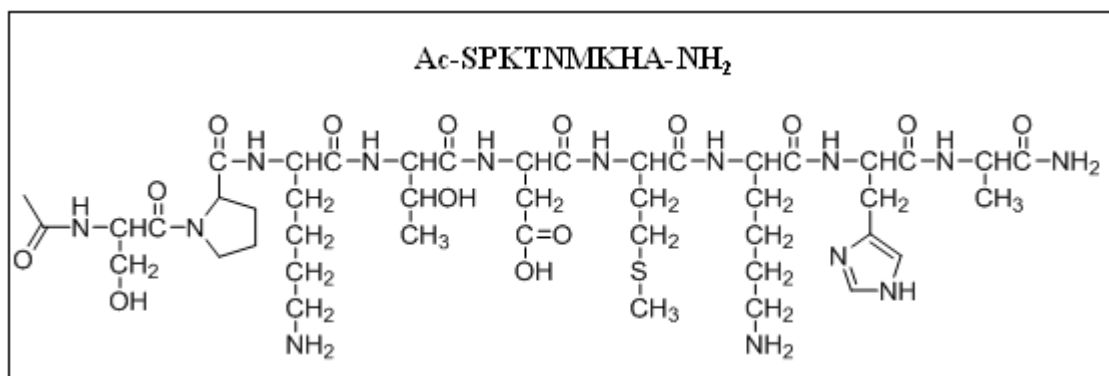
Csoportunkban egy pályázat keretében olyan ligandumok tervezése és vizsgálata a cél, amely a Cd(II)-iont nagy stabilitással és szelektíven képes kötni. Ezek tervezéséhez egy vagy több oldalláncbeli donorcsoportot tartalmazó peptidek szisztematikus vizsgálatára is szükség volt. Így az alapvető céltűzésem egy, két illetve három hisztidint tartalmazó védett peptidek Cd(II)-ionnal alkotott komplexeinek vizsgálata volt. Az egy hisztidint tartalmazó peptidként a prion-protein fémionkötő helyét is modellező nonapeptidet választottuk. Ebben az esetben vizsgálatainkat réz(II)-, nikkel(II)- és cink(II)-ionokra is kiterjesztettük.

Mivel az eredmények két fémion esetén (Zn(II) és Cd(II)) azt mutatták, hogy



2. ábra: a vizsgált tetrapeptidok szerkezete

komplekképzés a fémion-ligandum rendszerükben nem történt -, ezért munkám további részében a vizsgálatokat a két és három hisztidint tartalmazó peptidek kadmium(II)-komplexeinek tanulmányozásával folytattam (ezen peptidek réz(II), nikkel(II) és cink(II)-komplexeit korábban már tanulmányozták).

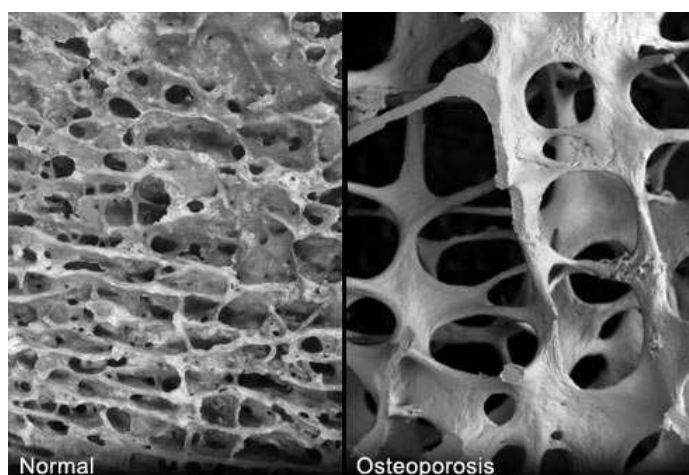


3. ábra: a vizsgált nonapeptid szerkezete

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A vizsgált fémionok élettani hatása, biológiai funkciója

A kadmiumot nagyon mérgező, vegyületeit mérgező vagy nagyon mérgező hatásúnak tartják számon, emellett karcinogén jellegét is feltételezik, toxikus elem. Kémiai szempontból szoros hasonlóságot mutat a cinkkel és a kalciummal és szoftabb fémionként képes kiszorítani a cinket a cisztein koordinált kötőhelyekről, a kalciumot pedig a csontokból, ezáltal akkumulálódva csonttörénységet és vázrendszertorzulást okoz. Blokkolja a kalcitriol szintézisét, ami



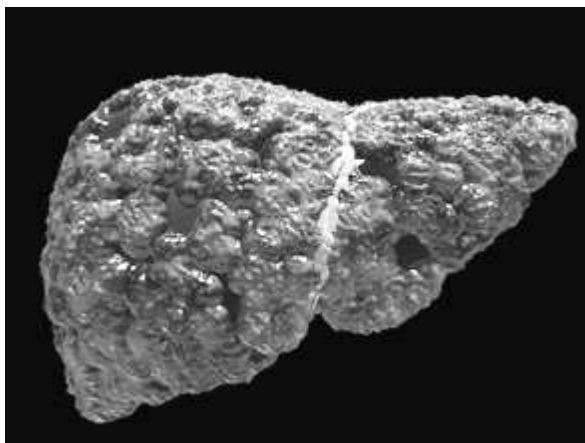
4. ábra: balra: egészséges csontszövetről készült felvétel, jobbra: kadmium okozta csonttritkulást mutató állomány ^[B]

ugyancsak a kalcium fehérjékhez való kötődését aktiválná. Nagy mennyiségben belélegezve tüdőtágulat, légcsőhurut, vesekárosodás léphet fel, a keringési rendszeren át eljut a májig, megzavarja a hormonháztartást és immunrendszert. A történelem során először az ötvenes években okozott tömeges betegséget Japánban (Itai-itai betegség), amikor kadmiummal erősen szennyezett vízzel öntözték a rizsföldeket, így bekerült táplálékláncba.^{[8][9]}

A nikkelt (vitatott létfontosságú) mikroelem, amiből az emberi szervezet kb. 10 mg-ot tartalmaz, s aminek nagy része leginkább a bőrben koncentrálódik. Táplálkozási szokástól függően naponta 100-300 µg nikkelt fogyasztunk el. A hasnyálmirigy működést serkenti, így a vércukorszint szabályozásában valamilyen szinten szerepet játszik. A kobalttal és a cinkkel együttműködve fontos katalizátor a biokémiai folyamatok számára. A nyomelem-terápiában ezt a három fémet gyakran alkalmazzák együttesen máj-, hasnyálmirigy-funkció- és zsírsanyagcsere zavarok kezelésére.

Vegyületei azonban toxikusak és karcinogén, mutagén hatásúak. Ahogy a kadmiumnál, úgy a nikkelnél is a belégzési expozíció a károsabb (leggyakrabban az iparban dolgozó megmunkálói körében), aminek során a többlet nikkelmennyiség szervezetbe kerülésével a következő betegségek kialakulásának kockázata megnövekedett: asztma, krónikus hörghurut, csökkent tüdőkapacitás, agyvérzés, májzsugor. Állatkísérletek révén kimutatták, hogy az utódnemzedékre is károsító hatással bír, ahol előfordult DNS károsodás, újszülött halálozás, alacsonyabb születési súly.^[8]

A réz a megfelelő fejlődéshez szükséges, különböző biológiai folyamatokban vesz részt,



5. ábra: a Wilson-kóros beteg mája ^[C]

a szervezetben az oxidoreduktáz enzim alkotórésze. Leginkább a bélből szívódik fel, ahonnan a véráramba kerülve a májba jut el a szérumalbuminhoz kötődve, ahol redoxiátalakulások után tárolódik. A légzési láncban hiányával oxigénhasznosítási nehézségeket okozhat, ami miatt károsodás léphet fel az agyban. Ennek az az oka, hogy a vas nem képes a hemoglobinba beépülni egy réztartalmú fehérje nélkül, ami a ceruloplazmin.

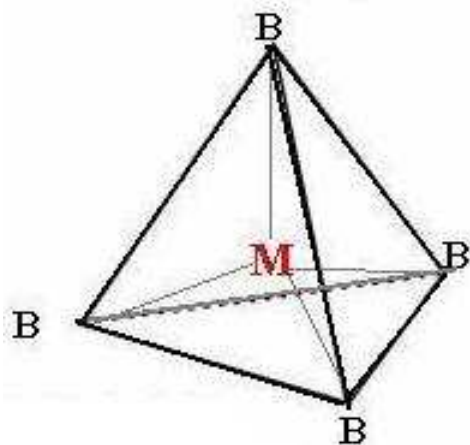
Legismertebb rézháztartás károsodásával kapcsolatos betegség a Wilson-kór, aminek következtében a réz a máj és agyszövetekben kötődik meg a már említett ceruloplazmin helyett, ezzel szervi károsodásokat okozva. A Menkes-betegség helytelen réztranszportból fakadó kórkép, ahol a rézhiány súlyos szellemi és fizikai fejlődési zavarokat idéz elő, jellegzetessége a göndör haj. A napi réz szükséglet 1-2 mg, de az ionos állapotban levő réz a szervezet számára erős mérég.^[2]

A cink hiánya növekedési rendellenességekhez vezet, terméketlenséget idézhet elő, az immunrendszer gyengülését és a gyulladásos megbetegedésekre való hajlamot erősíti. Továbbá szerepet tölt be a vércukorszint szabályozásban és anyagcsere folyamatokban, több mint 120 metalloenzim szerkezeti elemeként részt vesz a nukleinsavak és fehérjék szintézisében, valamint az enzimek, koenzimek működésében. Szinte valamennyi sejtünk tartalmaz cinket, de nagyobb mennyiségben a következő szervekben fordul elő: máj, hasnyálmirigy, a nemi- és endokrin mirigyek. Az optimális napi cinkszükséglet 15 mg.

Túladagolásakor mérgezési tünetek lépnek fel (hányás, hasmenés, fém íz, izom és mellkasi fájdalom), valamint rézhiányt idézhet elő.^{[2][10]}

3.2. A fémionok koordinációs kémiája

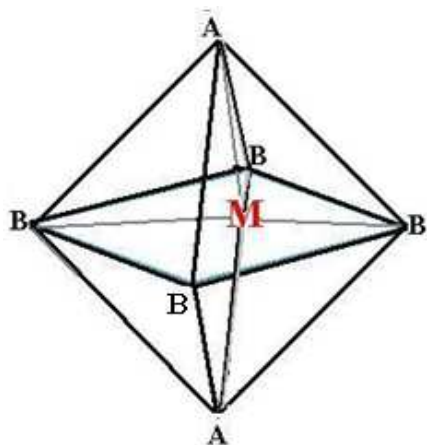
A kadmium ($[\text{Kr}]4d^{10}5s^2$) és a cink ($[\text{Ar}]3d^{10}4s^2$) hasonló elektronkonfigurációval rendelkező elem, ebből kifolyólag mindkét fém nagyon egyező koordinációs módú vegyülettípusokat épít ki. A d^{10} elektronkonfiguráció esetén a kristálytér-stabilizációs energiával nem kell számolni, így a komplexek térszerkezete a központi fématom méretétől, polarizációs képességétől és a ligandum térbeli felépítésétől függ. A telített d pályából fakadóan színtelen asszociátumokat képeznek, amelyek diamágneses sajátságúak. Mindkét elem leggyakoribb elrendeződése a tetraédes és az oktaédes szerkezet, az utóbbi a kadmiumnál gyakoribb a központi atom nagyobb méretéből kifolyólag. Emellett mindkét fémnél előfordul még a



6. ábra: a tetraédes koordináció szerkezete

lineáris, trigonális bipiramis, négyzetes piramis, pentagonális bipiramis elrendeződés, a cinknél pedig még a planáris és a torzult dodekaéder. A jellemző oxidációs szám a +2.

A nikkel elektronkonfigurációja $[\text{Ar}]3d^84s^2$. Sztereokémiai szempontból - a kadmiumhoz és a cinkhez hasonlóan - igen változatos komplexképzésre képes. Leggyakoribb elrendeződése a tetraédes koordináció főleg halogénekkal, valamint az oktaédes aqua- és amminkomplexképzés, ahol leggyakrabban kék/zöld szín tapasztalható (gyakran előfordul a lila is). Az oxidációs szám -1-től +4-ig változhat, a legjellemzőbb oxidációs állapot a +2-es, amely állapottal rendelkezve vizes közegben van a legkiterjedtebb kémiája.



7. ábra: az oktaédes koordináció szerkezete

A réz(I) $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$, a réz(II) $[\text{Ar}]3d^94s^2$ elektronkonfigurációjú elem. Komplexeit tekintve különböző szerkezet-felépítés figyelhető meg, amelyek közül Cu(I) esetén a lineáris és a tetraédes elrendeződés, Cu(II) esetén pedig a torzult oktaédes koordináció fordul elő leginkább. Az oxidációs szám változás -1-től +3(4)-ig történhet, amelyek közül a leggyakoribb a +2-es oxidációs állapot. A Cu(I) komplexek színtelenek a d^{10} betöltött pálya révén és diamágneses tulajdonságúak, ezzel ellentétben a Cu(II) komplexek a telítetlen d^9 -es pálya miatt színes, kék színű vegyületeket adnak és paramágnesesek.

A Cu(III) fémionok d pályáján nyolc elektron található. Komplexei síknégyzetes elrendeződést mutató, inert komplexek, amelyek sárga színűek, diamágneses tulajdonságúak.^{[11][12]}

3.3. Hisztidintartalmú terminálisan védett peptidek jellegzetes kötésmódjai

3.3.1. Egy hisztidint tartalmazó, terminálisan védett peptidek komplexképzése

A Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoportban számos olyan vizsgálatot végeztek már, ahol egy és több hisztidint tartalmazó, terminálisan védett peptidek komplexképzési

sajátságait tanulmányozták, s amelyek eredményéről több közlemény is megjelent az utóbbi években.

Az egyik kísérletsorozatban többek között a következő ligandumok komplexképzését írták le Cu(II)-ionokkal: Ac-FKHV-NH₂ és Ac-IKQHT-NH₂ ahol titráláskor savas tartományból indulva a hisztidin aminosav imidazol gyűrűje (H⁺N_{im}) és a lizin aminosav oldallánc aminocsoportja van protonált formában (NH₃⁺).

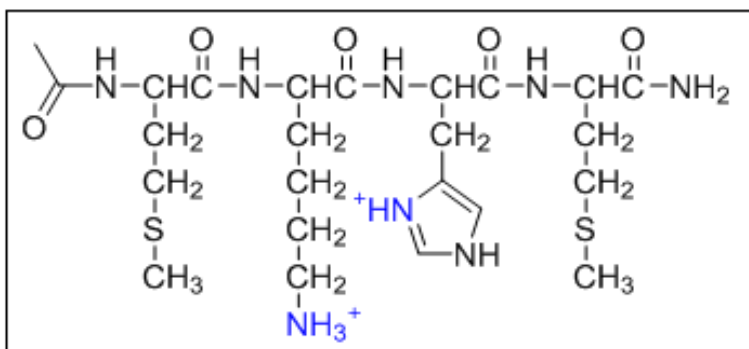
A koordinációs folyamat a fémionnak a - horgonycsoportként funkcionáló - hisztidin oldalláncon való megkötődésével indul, az imidazólium ion protonvesztésével. Ez a lépés indukálja a peptidgerincben lévő amidkötésű nitrogének deprotonálódását és kötődésüket a fémionhoz, ami nagyobb pH-tartományban játszódik le - egy stabilis [N_{im}, N⁻, N⁻] koordináción keresztül egészen az [N_{im}, N⁻, N⁻, N⁻] forma kiépüléséig, ahol az első két nitrogén protonvesztése egymással átfedő lépésben, kooperatív módon megy végbe.

Továbbá az Ac-FKHV-NH₂ és Ac-IKQHT-NH₂ peptideknél a hisztidin és lizin oldalláncok deprotonálódási folyamatai egymástól jól elkülönülnek, kimutatott, hogy a lizin nem vesz részt a koordinációban és nem zavarja azt, protonvesztése magasabb pH-tartományba esik, mint az amidkötésű nitrogének deprotonálódása.

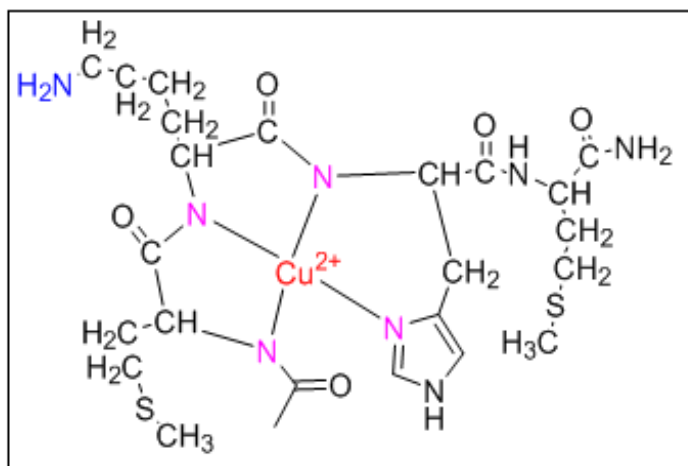
Az Ac-GTHS-NH₂ és az Ac-MKHM-NH₂ ligandumok Cu(II)-ionokkal való vizsgálatánál hasonló eredményről számoltak be a koordinációs mechanizmust illetően: az elsődleges fémkötőhelyet a hisztidin oldalláncok szolgáltatják, ezt követik az amidkötésben lévő nitrogén deprotonálódások és

kapcsolódásuk a fémionhoz, ahol fiziológiás pH-n az [N_{im}, N⁻, N⁻] szerkezet, nagyobb pH tartományban az [N_{im}, N⁻, N⁻, N⁻] koordinációs forma mutat nagyobb stabilitást. (Az [N_{im}, N⁻] összetételű

részecske önálló létezését az előző tanulmányhoz hasonlóan itt sem mutatták ki.)



8. ábra: az Ac-MKHM-NH₂ peptid protonált csoportjai



9. ábra: az Ac-MKHM-NH₂ peptid [N_{im}, N⁻, S] koordinációja

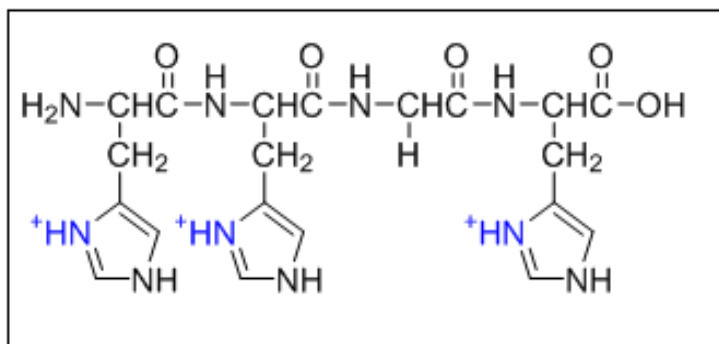
Az utóbbi két ligandum komplexei szerkezeti összetettségükben és geometriai elrendeződésükben szoros hasonlóságot mutattak, azonban stabilitásukban különbség adódott. Az eltérést a metionin aminosav jelenléte okozhatja, ahol egy [N_{im}, N⁻, N⁻, S] koordinációs forma is előfordul a tioéter csoport fémionhoz való kötődésével, ami kissé gátolja az [N_{im}, N⁻, N⁻, N⁻] szerkezet kialakulását.^{[13][14]}

3.3.2. Terminálisan védett multihisztidin peptidek komplexképzése

A multihisztidint tartalmazó peptidek közül többek között tanulmányozták az Ac-HGH-NHMe és az Ac-HHGH-NHMe tri- és terapeptid Cu(II)-ionokkal való komplexképzését.

A tripeptid esetén a komplexképzést a fémionnak az egyik hisztidin oldallánchoz való kötődése indítja meg, ahol egyidejűleg az imidazóliumion deprotonálódik.

Ezt a lépést követi a fémionnak a második imidazolgyűrűhöz való kapcsolódása, ezzel egy makrokelát rendszert létrehozva. A folyamatot a peptidgerincben lévő nitrogének deprotonálódása követi, ahol az első nitrogén protonvesztésével kialakult [N_{im}, N⁻, N_{im}] koordinációjú részecske kisebb koncentrációban van jelen az oldatban, míg a második nitrogén kötődésével és deprotonálódásával létrejövő



10. ábra: az Ac-HGGH-NH₂ peptid protonált csoportjai

asszociátumot $[N_{im}, N^-, N^-, N_{im}]$ nagyobb koncentrációban mutatták ki a mintában. Az utóbbi szerkezetekkel eltérő tagszámú kelátgyűrűk jönnek létre (7,5,6).

A pH emelésével - újabb deprotonálódási folyamat révén egy $[N_{im}, N^-, N^-, N^-]$ szerkezet létezését is kimutatták.

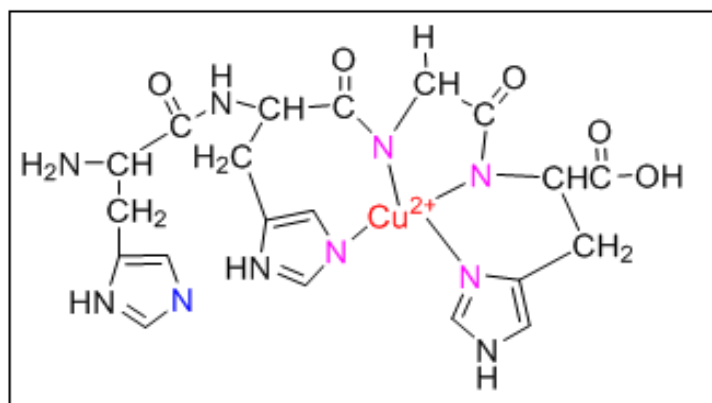
Az Ac-HHGH-NHMe tetrapeptid komplexképző mechanizmusa a tripeptidéhez nagyon hasonló, azonban változatosabb összetételű részecskék képződnek, ami az eggyel több hisztidin aminosav jelenlétéből fakad.

Először az imidazolgyűrűk koordinálódnak rendre a fémionhoz, ahol az első két oldallánc kötődése kooperatív módon történik, a harmadik hisztidin oldallánc kapcsolódásával pedig makrokelát rendszer alakul ki.

A folyamatot egy amidkötésben lévő nitrogén protonvesztése és kapcsolódása követi a fémionhoz, létrehozva az $[N_{im}, N_{im}, N_{im}, N^-]$ koordinációt. Az így létrejött részecskék egymás után egyre csökkenő stabilitást mutatnak, amit a koncentrációeloszlás függvény is tükröz.

Végezetül további két amidkötésben lévő nitrogén koordinációjával létrejönnek a $[CuLH_2]$ és $[CuLH_3]$ összetételű részecskék, amelyek magasabb pH-tartományban nagyobb koncentrációkban fordulnak elő.^[15]

Az Ac-HVH-NH₂ és az Ac-HVVH-NH₂ ligandumok Cu(II)-komplexeinek mérési adatai között párhuzamot vonva rámutattak arra, hogy a tripeptid makrokelát gyűrűje stabilabb szerkezetű, mint a tetrapeptidé - a hisztidinek alternáló pozíciója miatt.^[16]



11. ábra: az Ac-HHGH-NH₂ peptid $[N_{im}, N^-, N^-, N_{im}]$ elrendeződése

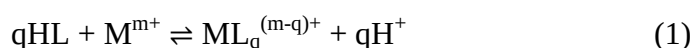
Összességében a multihisztidint tartalmazó védett peptidek esetén nem beszélhetünk egyszerű komplexképződési sémáról, hiszen azt több tényező is együttesen befolyásolhatja, úgy, mint a hisztidinek száma és azok egymáshoz viszonyított elhelyezkedése, egyéb koordinációra képes oldallánc csoportok jelenléte, a fémion-ligandum arány (stb).

4. Kísérleti körülmények és vizsgálati módszerek

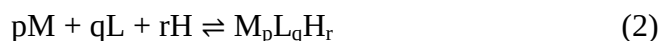
4.1. pH-potenciometria

A pH-metria segítségével az oldatfázisban lejátszódó komplexképzési folyamatok igen jól tanulmányozhatóak, a méréssel meghatározhatjuk a ligandumok protonálódási állandóit ($\beta(H_rL)$), továbbá a komplexek stabilitási állandóit ($\beta(M_pL_qH_r)$) és azok összetételét.

A pH-metria alkalmazására az ad lehetőséget, hogy a komplexképződés során kompetitív reakció játszódik le a H^+ és a fémion között a ligandum kötőhelyeiért. Így a H^+ koncentráció méréséből következtetni lehet a komplex stabilitására. A kompetitív folyamat az alábbi egyenlettel írható le:



Általánosan pedig a komplexképzési folyamatokat a következő egyenlettel írhatjuk le, ahol a töltéseket az egyszerűség kedvéért elhanyagoljuk:



ahol M a fémion, L a teljesen deprotonált ligandum, H a proton, p/q/r pedig sztöchiometriai együtthatók. A képződő részecskék stabilitási szorzata a fenti egyenletek alapján az alábbi egyenlettel definiálható:^{[17][18]}

$$\beta_{pqr} = [M_pL_qH_r] / [M]^p[L]^q[H]^r \quad (3)$$

Az oldatok titrálása számítógép által vezérelt automata MOL-AcS bürettával és MOLSPIN-pH mérővel történt, amihez egy Metrohm 6.0234.100 kombinált üvegelektrod csatlakozott. A $\sim 0,2 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú KOH mérőoldat adagolását 1 cm^3 végtérfogatú Hamilton fecskendő biztosította.

Az elektródot $0,050 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldattal kalibráltuk, aminek pH-ja 25°C -on 4,005. Az állandó hőmérsékletet ultratermosztáttal állítottuk be, az oxigén kizárását pedig az oldat fölé vezetett argongázzal biztosítottuk. A minta kevertetéséhez mágneses keverőt használtunk. A vizsgált minták térfogata 4 cm^3 volt.

A fémion-ligandum arányát tetrapeptidek kadmium rendszere esetén 1:1 és 1:3 között (Cd(II)), nonapeptidnél 1:1 (Cu(II)/Ni(II)) és 1:2 (Cd(II)/Zn(II)) között változtattuk. Az ionerősséget a Cd(II)-ot tartalmazó mintákban KNO₃-tal, a Zn(II), Ni(II), Cu(II) fémionokat tartalmazó rendszereknél KCl-dal biztosítottuk.

A diffúziós potenciál kiküszöbölésére és a mért pH értékekből a hidrogénion-koncentráció számítására az Irving és munkatársai által bevezetett módszert alkalmaztuk. A lúgoldat pontos koncentrációját ismert koncentrációjú kálium-hidrogén-ftalát oldat titrálási görbéjének Gran-féle linearizálásával határoztuk meg.^{[17][18]}

A keresett állandók meghatározására a SUPERQUAD és PSEQUAD programokat együttesen használtuk - amelyek alapja az un. Newton-Raphson iterációs közelítés -, ahol bemenő adatként megadandó: a fémion, a ligandum és hidrogén analitikai koncentrációja, a víziószorzat, a titráló oldat koncentrációja, az Irving-faktor, továbbá az asszociátumok összetétele M, L és H-re nézve és pontos vagy közelítő stabilitási szorzatuk.

A program meghatározza az összes képződő részecske egyensúlyi koncentrációját minden megadott pH-értéknél és a standard deviációt. Az iterációsorozat végén megkapjuk a finomított stabilitási szorzatokat és azok hibáját. (A stabilitási állandók közelítésekor az utolsó tizedes jegy hibáját zárójelben tüntettem fel.)^{[18][19]}

A kiindulási koncentrációk és a komplexek stabilitási szorzatai ismeretében megszerkesztettük a rendszerek koncentráció-eloszlási görbéit MEDUSA program segítségével.

4.2. UV-VIS spektrofotometria

Az UV/VIS spektroszkópia a molekula látható, illetve UV fénnel gerjeszthető molekulapályák közötti elektronátmeneteinek vizsgálatán alapszik. A fényelnyelésért un. kromofórok felelősek, amelyek adott elektronátmenetnek megfelelő fényabszorpcióhoz rendelhető csoportok.

Kromofóroknak minősülnek az átmenetifém-komplexek esetén a d-d átmenetek, amelyek a ligandumról a fémionra (vagy fordítva) lezajló töltésátviteli folyamatok gerjesztéséből, valamint a ligandum saját kromofórjainak gerjesztéséből származnak (delokalizált/aromás rendszer, többszörös kötésben vagy nemkötő pályán lévő elektronok).^[2]

A Cu(II)-komplexek spektroszkópiai sajátosságait már sokan vizsgálták, több irodalmi adat áll rendelkezésünkre, ennek ellenére nehéz általános törvényszerűséget leírni a $\lambda_{\max}$ értékére a koordinációs módok sokfélesége, s a spektrumot befolyásoló számos tényező miatt.

A főbb komplex szerkezet a tetragonálisan torzult oktaéderes elrendeződés, ahol gyenge és erős terű ligandumokkal négyfelé hasad az energiadiagram - a kristálytér-elmélet szerint. (A d^9 elektronok energiaszintje oktaéderes térben kétfelé hasad, majd a tetragonális torzulás mindkét energiaszintet újabb két-két szintre hasítja.)

A négy energiaszint között három átmenetnek kellene megjelennie, de ezek gyakran egyetlen sávvá olvadnak össze, s energiájuk és intenzitásuk jelentősen függ attól, hogy a ligandumnak hány donoratomja koordinálódott a fémionhoz. Ezen kívül a $\lambda_{\max}$ értéket befolyásolja a komplex pontos geometriája és a donoratomok kémiai minősége.^{[7][18]}

Elméleti számítások alapján többen megkíséreltek egyszerűbb következtetéseket levonni a $\lambda_{\max}$ várható értékére. Eőször Billo, majd Siegel és Martin, valamint Pettit és munkatársai végeztek kísérleteket és számításokat, amit később Prenesti pontosított: megállapították, hogy a koordinálódó donoratomok számának növelése az $\lambda_{\max}$ -ot a kisebb hullámhosszak felé tolja el.

Nem Gly származékok esetében a meghatározott empirikus képlet a következő:

$$\lambda_{\max} [\text{nm}] = \frac{10^3}{0,294(\text{C-O}/\text{H}_2\text{O}) + 0,346(\text{COO}^-) + 0,460(\text{NH}_2) + 0,494(\text{N}^-) + 0,434(\text{N}_{\text{Im}})} \quad (4)$$

ahol a nevezőben a Cu(II)-ionokhoz koordinálódó donorcsoportok hozzájárulási tényezői szerepelnek.^{[7][20]}

A nikkell komplexekben a két leggyakoribb elrendeződés a 4-es és 6-os koordináció. A 6-os koordinációjú oktaéderes komplexeknél három átmenet valósul meg, ahol a $\lambda_{\max}$ érték rendre: 1430-770 nm, 910-500 nm, 520-370 nm között van. A negyedik átmenet (spintiltott) gyakran vállként jelenik meg a spektrumban. A 4-es koordinációjú, tetraéderes komplexek nagyobb intenzitásúak, sávjuk $\lambda_{\max} = 900\text{-}500$ nm közötti, a síknégyzeteseké $\lambda_{\max} = 550\text{-}400$ nm közötti tartományba esik.^{[17][18]}

A spektrális vizsgálatokat a réz(II)-iont tartalmazó minták esetén 900-250 nm-es, a nikkel(II)-iont tartalmazó mintáknál 600-250 nm-es hullámhossz tartományban végeztük el. A spektrumokat Perkin Elmer Lambda 25 típusú kétsugaras spektrofotométeren, 1,000 cm-es küvettában vettük fel.

4.3. CD spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus mérésnél - az UV-VIS spektroszkópiához hasonlóan - fényabszorbancia mérése történik vizes oldatokkal, ahol síkban polarizált fényt alkalmazunk, ami felbontható két, azonos amplitudójú, jobbra, ill. balra cirkulárisan polarizált fény összegére.

Optikailag aktív anyagot tartalmazó mintán áthaladt, polarizált sugárzás nemcsak különböző törésmutatóval, de különböző abszorpciós koefficienssel is jellemezhető. (Az optikailag aktív anyagok a két fényösszetevővel eltérő módon lépnek kölcsönhatásba.) Ennek következtében a kilépő sugárzás elliptikusan polarizált lesz. A síkban polarizált fény két összetevőjének különböző abszorpcióját cirkuláris dikroizmusnak, más néven Cotton-effektusnak nevezzük.

A kétféle fénysugár abszorpciójának különbségét ($\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$) a hullámhossz függvényében ábrázolva megkapjuk a spektrumot. A mérés feltétele, hogy a molekulában legyen kromofor csoport, ami jelen esetben biztosítja az optikai aktivitást.

A CD görbe maximumai, illetve minimumai az elektrongerjesztési abszorpciós spektrum maximuma helyén, illetve ahhoz közel jelentkezőnek, és viszonylag keskeny Gauss-görbék, ellentétben az elektrongerjesztési spektrummal.

Optikailag aktív anyagoknak tekinthetőek a diszimmetrikus molekulák, amelyek másodrendű szimmetriaelemet nem tartalmaznak (tükörsík, inverziós centrum, tükrözéscsfordogás).^{[7][18][20]}

Az átmenetifém-komplexek optikai aktivitása egyrészt a komplex-molekula asszimmetriájából, másrészt a ligandum saját - komplexképzés előtt meglévő - asszimmetriájából származhat.^[2]

A CD méréseket Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén, JASCO-810 spektrométeren vettük fel, szobahőmérsékletű vizes oldatokban, különböző pH-értékeknél. A küveták hossza rendre: 0,100 és 1,000 cm volt. A CD méréseket a réz(II)-iont tartalmazó minták esetén 900-250 nm-es, a nikkel(II)-iont tartalmazó mintáknál 600-250 nm-es hullámhossz tartományban végeztük el.

A kapott spektrumok elemzését a gyártó cég által biztosított kezelő- és kiértékelő programmal végeztük. A kapott CD görbék elemzésével a kialakult komplexek szerkezetére, geometriájára, a koordinálódó donoratomok számára és jellegére tudtunk következtetni.

4.4. ^1H -NMR spektroszkópia

A ^1H -NMR spektroszkópia azt a jelenséget használja ki, hogy az atommagoknak impulzusmomentuma, s ezzel együtt mágneses momentum van (spin-impulzus momentum), amely ha mágneses környezetbe kerül, beáll a tér irányába. Vektormennyiség révén kvantáltsággal fog rendelkezni, ami azt jelenti, hogy a külső térrel olyan szöget zár be, aminek vetülete meghatározott nagyságú, $\gamma\hbar$ egész vagy fél-egésszámú többszöröse: $m\gamma\hbar$, ahol $\hbar = h/2\pi$; γ az ún. giromágneses tényező - egyes atommagokra jellemző állandó; m a mágneses spinquantumszám, értékei rendre $m = I, (I-1), (I-2) \dots -I$. Az I spinű magnak összesen $2I+1$ merőleges vetülete létezhet.

A kémiai környezet befolyással van a rezonanciafrekvenciára, aminek hatása kémiai eltolódást eredményez, s ezen át információt kaphatunk a molekulaszervezetről. A jelek intenzitása arányos a magok számával, vagyis az NMR-spektrumból megkapható a különböző kémiai környezetben előforduló, azonos minőségű és fajtájú magok száma. A spinek „érzékelik” szomszédaik kvantumállapotát, vagyis a szomszéd alap- vagy gerjesztett állapota eltérően hat a partnere körüli lokális mágneses tér nagyságára. A jól elkülönülő jelek száma és intenzitás-rátája a kémiai eltolódásnak megfelelő, de egyes jelek egymáshoz közeli vonalakra hasadva multiplett-ként adnak jelet. A vonaltávolságot hívjuk csatolási állandónak, amely rendkívül érzékeny a csatolódo spinek kölcsönös térbeli helyzetére.^[20]

A Cd(II)-peptid rendszereknél számításba jöhet a ^1H -NMR alkalmazása, hiszen az itt képződő asszociátumok esetén a szerkezetfelderítés nem valósítható meg az UV-VIS spektrofotometriával és CD spektroszkópiával, mert a mintáknak nincs fényelnyelése a két vizsgálati módszernél használatos hullámhossz-tartományban.

Az egyes, protonokat tartalmazó atomcsoportokra jellemző jelek spektrumban való megjelenéséből és kémiai eltolódásuk értékéből (δ) és a jelek felhasadásából következtetni lehet a koordinálódó ligandum különböző csoportjainak protonáltságára, ill. a fémionhoz való koordinálására, az esetleges izomerek jelenlétére, a szabad ligandumhoz viszonyítva.

A spektrumban megjelenő jelek pontos asszignálása érdekében felvettük a teljesen deprotonált ligandum spektrumát is.

A ^1H -NMR spektrumokat Bruker AM400 FT-NMR, típusú készülékkel rögzítettük. A spektrumokat a TopSpin programokkal regisztráltuk, kiértékelésükhöz a MestReNova nevű szoftvert alkalmaztuk.

A kémiai eltolódásokat belső standard (TSP = trimetilszilil-propionát) jeléhez viszonyítva ppm értékben adtuk meg. A $\text{Cd(II)-Ac-HVVH-NH}_2$ rendszerrel különböző pH értékeken, $\text{Cd:L}=1:1$ arány mellett vettük fel a spektrumokat. A fémion tartalmú törzsoldatokat könnyűvízben készítettük el, melyek a következő összetevőket tartalmazták: KNO_3 -oldat, ligandum törzsoldat, H_2O , és TSP.

Az egyedi minták térfogata minden esetben 500 μl volt. A kívánt pH értéket KOH oldattal állítottuk be közvetlen pH-méréssel. A mérés során az NMR csőben egy lezárt kapilláris tartalmazta a D_2O -t. A mérések során un. watergate impulzusprofil technikát alkalmaztunk a vízjel elnyomására.

5. Kísérleti eredmények és kiértékelésük

5.1. A vizsgált ligandumok sav-bázis sajátosságai

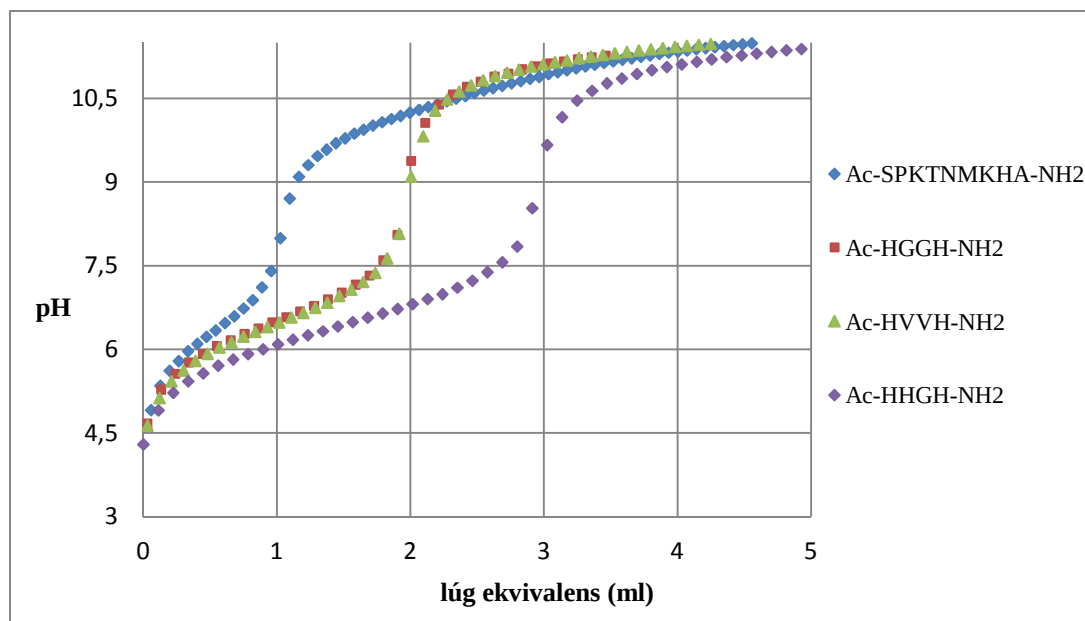
1. táblázat: a vizsgált ligandumok deprotonálódási állandóik ($\lg\beta$) és lépcsőzetes deprotonálódási állandóik (pK)

	Ac-SPKTNMKHA-NH ₂	Ac-HGGH-NH ₂	Ac-HVVH-NH ₂	Ac-HHGH-NH ₂
$\lg\beta_1$	10,71 (2)	6,84 (2)	6,80 (1)	7,07 (2)
$\lg\beta_2$	20,61 (2)	12,87 (2)	12,78 (1)	13,38 (2)
$\lg\beta_3$	26,86 (3)	-	-	19,13 (3)
pK_1	6,25	6,03	5,98	5,75
pK_2	9,90	6,84	6,80	6,31
pK_3	10,71	-	-	7,07

Mivel a komplexképződési-vizsgálatokat védett peptidekkel végeztük el, a ligandumok terminális végcsoportjai nem vesznek részt a deprotonálódási folyamatokban és a komplexképzésben. A sav-bázis titrálás kiinduló fázisában - erősen savas tartományban - az Ac-HGGH-NH₂, Ac-HVVH-NH₂ és az Ac-HHGH-NH₂ ligandumoknál a két hisztidin aminosavak imidazolgyűrűi ($\text{H}^+\text{N}_{\text{im}}$), az Ac-SPKTNMKHA-NH₂ peptidnél az egy hisztidin gyűrű mellett a két lizin aminosav oldallánc aminocsoportja (NH_3^+) van protonált formában.

A pH-potenciometriai mérésekkel meghatározott állandók értékét az 1. táblázat foglalja össze, amelyek jó egyezést mutattak az irodalmi adatokkal.

A különböző ligandumok titrálási adataiból megszerkesztett és együttesen ábrázolt görbék képét a 12. ábra mutatja be:



12. ábra: a vizsgált ligandumok titrálási görbéi (Ac-HVVH-NH₂ c(L) = $2,19 \times 10^{-3}$ M; Ac-HGGH-NH₂ c(L) = $2,19 \times 10^{-3}$ M; Ac-HHGH-NH₂ c(L) = $2,14 \times 10^{-3}$ M; Ac-SPKTNMKHA-NH₂ c(L) = $2,83 \times 10^{-3}$ M)

Látható, hogy a négy titrálási görbe közül kettő jól egymásra illeszkedik - ami az azonos számú hisztidin-tartalomnak tulajdonítható -, s amelyektől a másik két görbe lefutása jól elkülönül az eltérő hisztidin-mennyiségük miatt.

Továbbá leolvasható, hogy az imidazóliumionok deprotonálódása alacsonyabb pH-tartományban játszódik le. Ez a folyamat az Ac-SPKTNMKHA-NH₂ nonapeptid esetén a pH~6 körüli értéknél valósul meg, amelyhez viszonyítva a lizin aminosav-oldalláncok protonvesztése nagyobb pH-tartományban következik be - egy pH-ugrással jól elkülönülve, pH~9,5 és 10,5 értékeknél.

Az Ac-HGGH-NH₂ és az Ac-HVVH-NH₂ peptidek első protonvesztési folyamata pH~6, míg a második pH~7 körül jelentkezik. Az Ac-HGGH-NH₂ tetrapeptid első két deprotonálódási lépése - az előző két, kis tagszámú ligandum értékeihez viszonyítva -, valamivel alacsonyabb pH-intervallumban játszódik le pH~5,8 és pH~6,4 körül. A harmadik protonvesztéssel járó folyamat pH~7,2 körül történik meg.

Az is jól látható, hogy az egynél több hisztidint tartalmazó peptidek körében az imidazóliumionok deprotonálódási folyamatai egymással átfedő lépéseken keresztül játszódnak le - kooperatív módon -, hiszen a görbék ezen tartományaikban (Ac-HVVH-

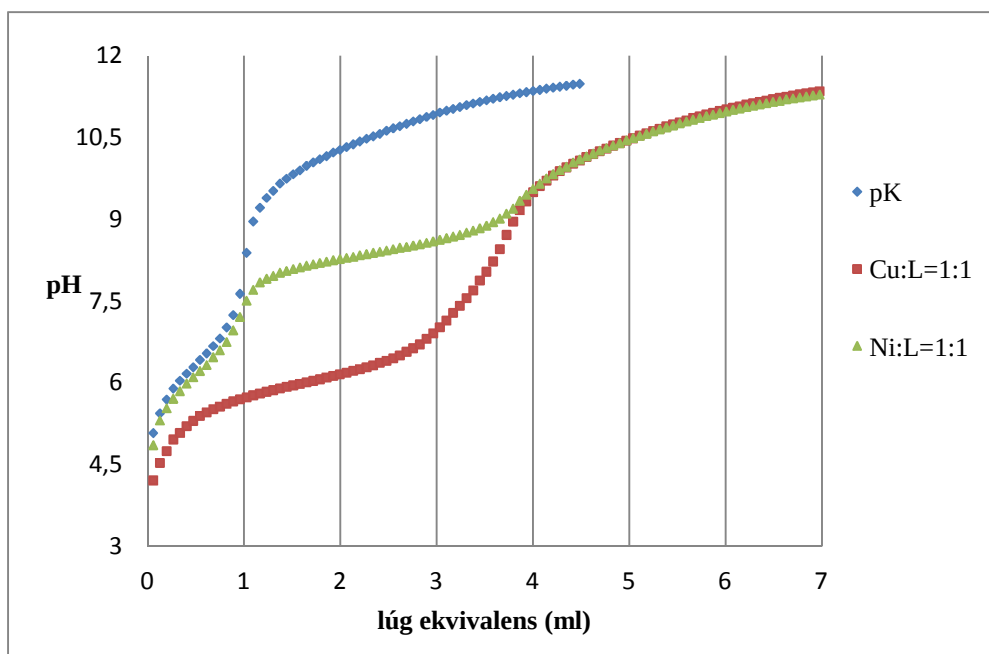
$\text{NH}_2/\text{Ac-HGGH-NH}_2$ pH= 5-8, Ac-HHGH-NH_2 pH= 5-9) nem mutatnak jól elváló, lépcsőzetes szakaszokat, pH-ugrásokkal.

5.2. Az Ac-SPKTNMKHA-NH₂ ligandum átmenetifém komplexei

Az Ac-SPKTNMKHA-NH₂ ligandum réz(II)- és nikkel(II)-ionokat tartalmazó mintáit pH-potenciometriásan vizsgálva a titrálás egészen pH=11,5-ig kivitelezhető és mérhető volt, csapadékképződés megjelenése nélkül.

Mindkét fémiont tartalmazó rendszernél a titrálást színváltozás kísérte: Cu:L =1:1 esetén pH~6 értéktől kék, pH~ 7-8 között lila, míg pH~ 8-10 tartományban rózsaszín átmenetek voltak megfigyelhetők. A Ni:L = 1:1 mintánál a mérés előrehaladtával fokozatosan mélyülő sárga szín volt detektálható.

A szabad ligandum és a két fémes rendszer mért adatait együttesen ábrázolva és szerkesztve az alábbi diagramot kapjuk:



13. ábra: az Ac-SPKTNMKHA-NH₂ ligandum titrálási görbéi réz(II)-, és nikkel(II)-ionokkal (Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ c(L) = $2,83 \times 10^{-3}$ M; Ni(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ c(L) = $2,26 \times 10^{-3}$ M)

A görbék között jelentős pH-effektus figyelhető meg. Ez a $\text{Cu:L}=1:1$ és a $\text{Ni:L}=1:1$ összetételű minták titrálási görbéinek kisebb pH-n való lefutását és eltolódását jelenti az „eredeti” pK görbe alakjához képest. Ennek hátterében az áll, hogy a fémionok koordinálódása a ligandumhoz a különböző protonált csoportokról hidrogéniont szorít le - ezzel elősegítve a deprotonálódást -, megnövelve a minta H^+ koncentrációját, így savasabb közeget eredményez.

Ezen kívül extra lúgfogyasztó folyamat is fellép, ami az ábrán abban mutatkozik meg, hogy a szabad ligandum titrálási görbéjén az imidazóliumion protonvesztéséhez rendelhető intervallum a fémiont tartalmazó rendszereknél sokkal nyújtottabb, szélesebb lúg ekvivalens tartományt ölel fel, jelezve, hogy nemcsak az imidazóliumion deprotonálódása megy végbe.

Mindkét fémiont tartalmazó mintánál összesen három-három lúgekvivalensnyi fogyásról beszélhetünk, továbbá a $\text{Cu:L}=1:1$ összetételű minta sokkal nagyobb pH-effektust mutat a $\text{Ni:L}=1:1$ arányú rendszerhez képest. A titrálás kezdeti szakaszában megindul a komplexképzés, amire a mérés kiinduló fázisában „azonnal elváló görbék” utalnak. Nikkel(II)-iont tartalmazó minta esetén csak nagyobb pH-n indul meg a részecskék képződése, amit egy ekvivalens lúg fogyásig a nem-elváló görbék jeleznek.

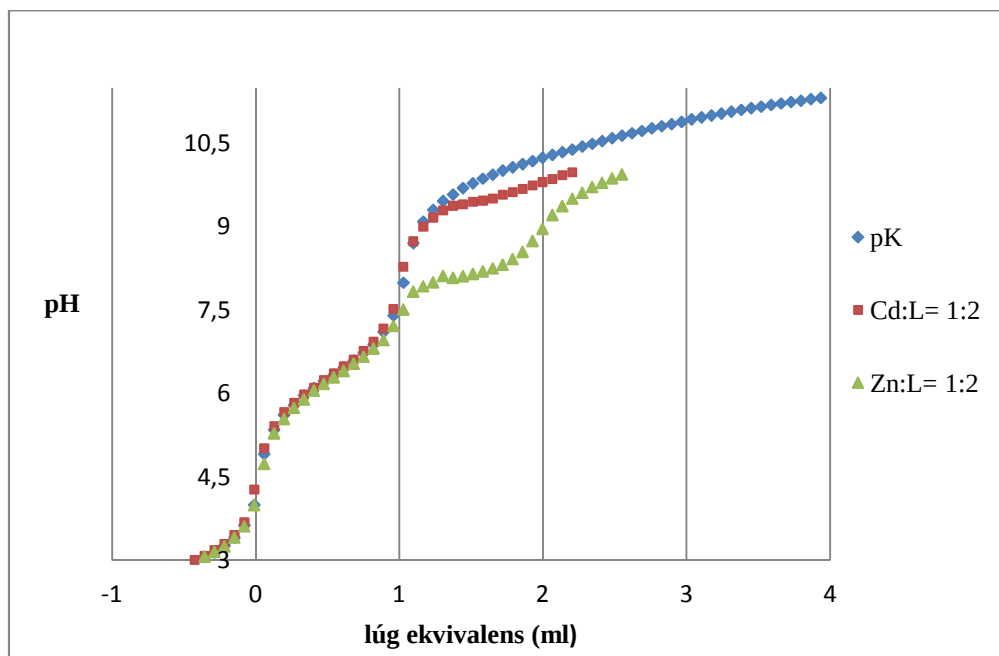
A lizin oldalláncok deprotonálódásához rendelhető titrálási görbe szakaszokat összehasonlítva láthatjuk, hogy a fémionokat tartalmazó minták ezen tartományai megegyező lefutásúak, alakjuk pedig a pK görbe megfelelő ábra-szakaszával azonos. Mivel pH-effektus nincs, ezért azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a lizinek nem vesznek részt a komplexképzésben.

Ezzel ellentétben a nonapeptidnek a kadmium- és cink ionokkal való vizsgálata egészen más eredményt hozott:

Titrálás során a mintákban - szemmel láthatóan - opálosodás és csapadékképződés jelent meg $\text{pH}_{\text{Cd}} \sim 9$ és $\text{pH}_{\text{Zn}} \sim 8$ értéknél. A megfelelő adatsorok együttes ábrázolásával egy olyan diagramot kapunk, ahol a három különböző rendszer titrálási görbéje a csapadékképződések megjelenésekig teljesen együtt fut.

Ezekből a megfigyelésekből és eredményekből arra következtethetünk, hogy az opálosodás előtti szakaszban - pH-effektus hiányában nem valószínű, hogy beszélhetünk

komplexbépzésről. Nagyobb pH-tartományban, csapadékbépződés $\text{pH}_{\text{Cd}} \sim 9$ és $\text{pH}_{\text{Zn}} \sim 8$ értékek felett elvileg felléphet részecskebépződés, de ez átfed a fémionok hidrolízisével.



14. ábra: az Ac-SPKTNMKHA-NH₂ ligandum titrálási görbéi kadmium(II) és cink(II) ionokkal (Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ c(L) = $2,83 \times 10^{-3}$ M; Ni(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ c(L) = $2,83 \times 10^{-3}$ M)

Az eredmények részletes kiértékelésére a SUPERQUAD és a PSEQUAD programokat is használtuk. A kadmium(II)- és cink(II)-iont tartalmazó mintáknál a program nem számolt részecskéket, viszont a réz(II)- és nikkel(II)-iont tartalmazó rendszereknél többféle összetételű komplexek is képződtek.

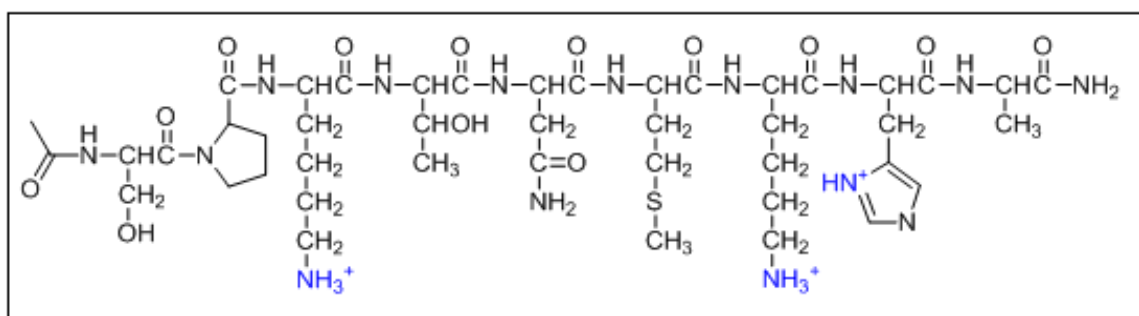
Az utóbbi mintáknál meghatározott komplex összetételeket és a számolt stabilitási állandókat a 2. táblázatban foglaltam össze, amit kiegészítettem egy tetrapeptid irodalmi adataival, aminek szekvenciája nagyban hasonlít a nonapeptid C-terminális végének aminosav-sorrendjével:

2.táblázat: a Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ és a Ni(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ rendszerek méréséből származó komplexek összetétele és deprotonálódási állandóik

	Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂	Cu(II)-Ac-MKHM-NH₂*	Ni(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂	Ni(II)-Ac-MKHM-NH₂*
MLH₂	24,32(4)	-	-	-
MLH	-	13,98	14,74(6)	13,09
ML	12,62(2)	-	-	5,08
MLH₁	5,36(3)	2,70	-1,33(1)	-
MLH₂	-4,57(4)	-6,26	-11,41(2)	-
MLH₃	-15,0(4)	-16,32	-22,04(2)	-
pK_{1,2amid}	5,85	5,64	-	-
pK_{2,3amid}	-	-	8,04	8,01
pK_{3amid}	7,26	8,96	-	-
pK_{lizin1}	9,93	10,06	10,08	-
pK_{lizin2}	10,43	-	10,63	-

* irodalmi adat^[14]

5.2.1. Az Ac-SPKTNMKHA-NH₂ Cu(II) komplexei



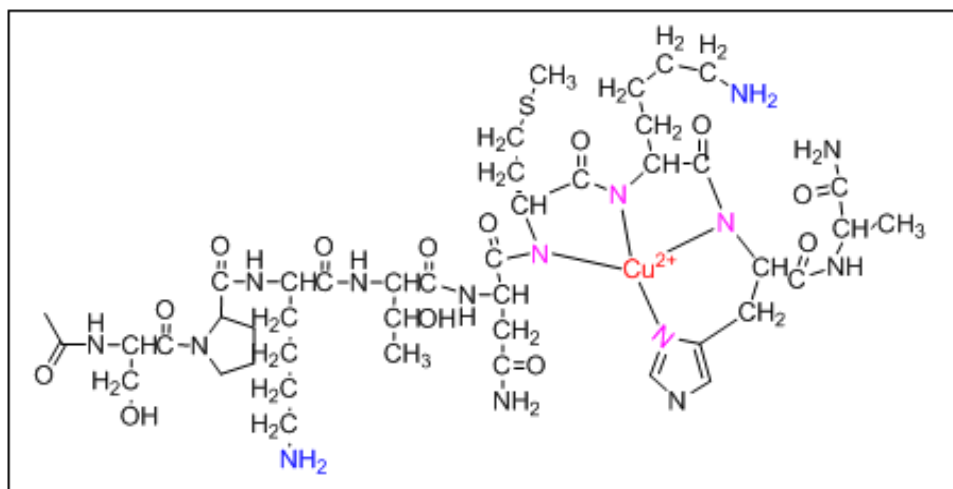
15. ábra: a nonapeptid szerkezeti képlete protonált csoportokkal

A különböző asszociátumok összetételének leírását az alábbi komplexképződési mechanizmussal értelmezhetjük: első lépésben az imidazólium deprotonálódik és koordinálódik a fémionhoz, ami az MLH₂ részecskét eredményezi.

Ezt a lépést követi az N-terminális irányba első két, peptidvázban lévő amidkötésű nitrogén kooperatív, egymást átfedő protonvesztése és kötődése a rézionhoz, amivel létrejön az ML összetételű komplex - ami valójában MLH_2H_2 felépítésű részecske. Az Ac-SPKTNMKHA-NH₂ és az Ac-MKHM-NH₂ peptid $pK_{amid1,2}$ értéke alig különbözik egymástól, tehát az eddigi folyamatok mindkét ligandum-fém rendszernél hasonlóan zajlik le. A köztes, MLH részecske jelenlétét nem tudtuk kimutatni.

Nonapeptidnél a folyamatot a harmadik, az aszparagin és a lizin aminosav közötti peptidkötésben lévő amidnitrogén deprotonálódása követi, létrehozva az MLH_1 részecskét. Ezt a harmadik amidnitrogén protonvesztését nonapeptidnél a $pK_{amid3} = 7,26$, tetrapeptidnél a $pK_{amid3} = 8,96$ érték jellemzi, ahol eltérés mutatkozik.

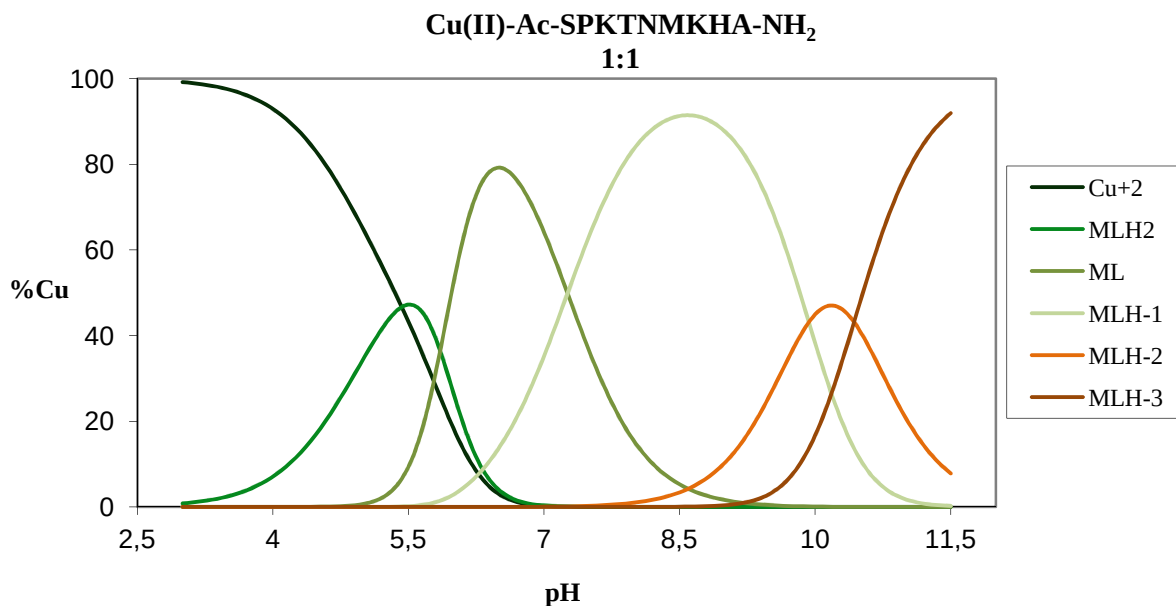
A különbséget az okozhatja, hogy terapeptidnél a harmadik amidkötésben lévő nitrogén protonvesztése és koordinációja a fémionhoz az acilezett aminos csoport nitrogénatomjától származik. Ez a molekularész általában nagyobb pH-n deprotonálódik, mint a peptidvázban lévő amidnitrogének.



Erősen lúgos pH-tartományban a két lizin aminosav deprotonálódása történik meg, amelyek nem vesznek részt a koordinációban.

16. ábra: a nonapeptid $[N_{im}, N', N', N']$ koordinációja

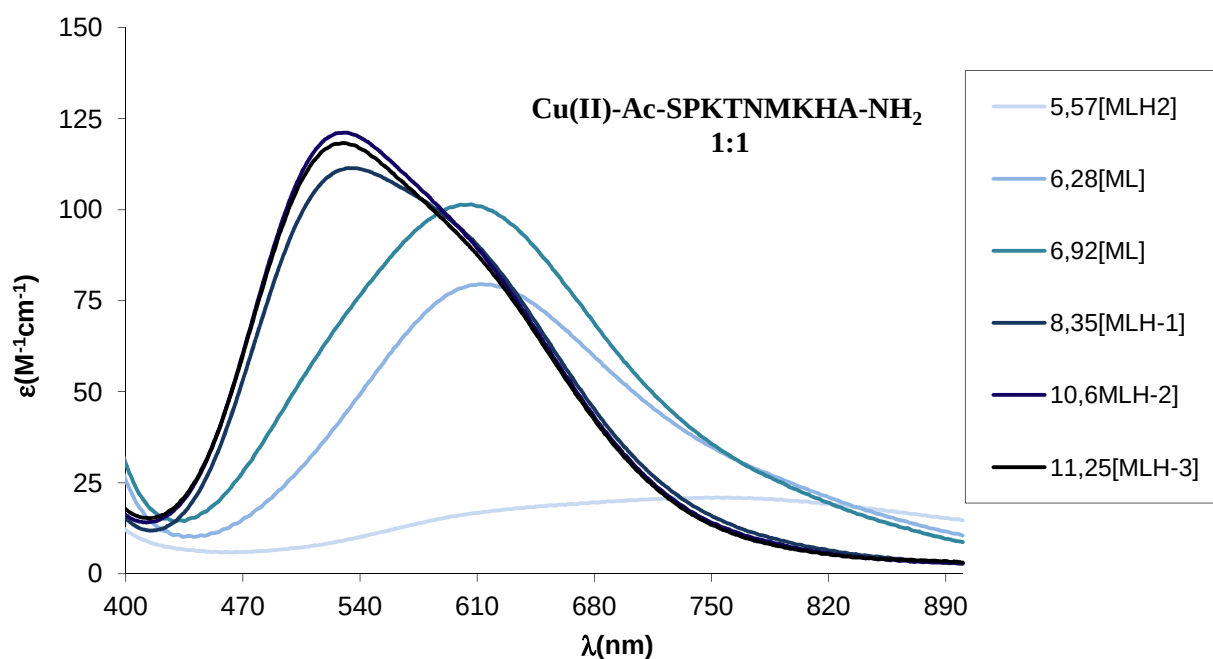
A képződött részecskék oldatban lévő előfordulási mennyiségének arányáról az eloszlásfüggvény ad információt a pH függvényében:



17. ábra: a Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ 1:1 arányú rendszer koncentráció-eloszlás görbéi

(Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ c(L) = $2,83 \times 10^{-3}$ M)

A koncentrációeloszlási görbe segítségével megállapítható az a pH, ahol az egyes komplexek maximális mennyiségben vannak jelen a vizsgált oldatban. Így az ezen pH értéken felvett UV-VIS-, illetve CD-spektrumok jelei az egyes komplexekhez rendelhetők.



18. ábra: Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ 1:1 arányú rendszer spektrofotometriás görbéi

Az egyes részecskékhez tartozó $\lambda_{\max}$ mért és (az empirikus képlet segítségével (4 egyenlet)) számolt értékeket az Ac-MKHM-NH₂ peptid ugyanazon koordinációs módú Cu(II)-komplexeinek adataival együtt egy táblázatban foglaltam össze:

3. táblázat: Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ 1:1 arányú rendszer részecskéihez tartozó $\lambda_{\max}$ mért és számolt értékeinek összehasonlítása az irodalmi Cu(II)-Ac-MKHM-NH₂ rendszer $\lambda_{\max}$ adataival

koordináció	Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH ₂ komplexek összetétele	Cu(II)-Ac-MKHM-NH ₂ komplexek összetétele	Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH ₂ $\lambda_{\max}$	$\lambda_{\max}$ számított	Cu(II)-Ac-MKHM-NH ₂ komplexek $\lambda_{\max}$ *
[N _{im}]	MLH ₂	MLH	817	760	–
[N _{im} , N ⁻ , N ⁻ , (S)]	ML	MLH ₁	617	582	629
[N _{im} , N ⁻ , N ⁻ , N ⁻]	MLH ₁	MLH ₃	531	522	521

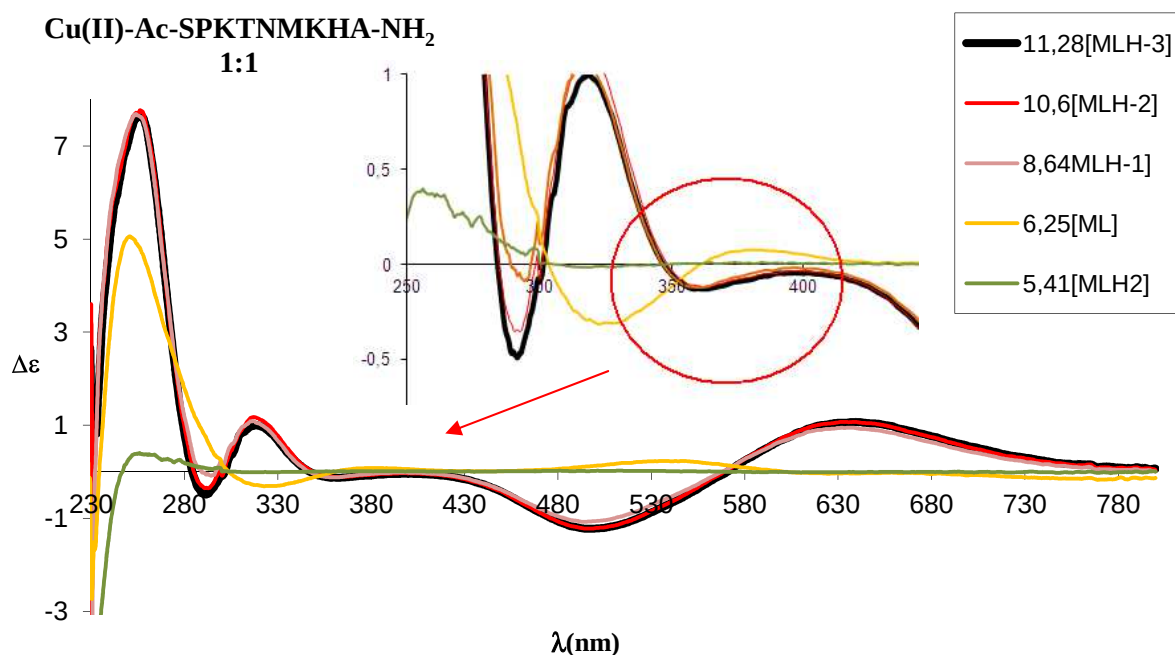
*irodalmi adat^[14]

A mért és a számolt értékek összehasonlításából alátámasztást kaphatunk arról, hogy az általunk feltételezett szerkezetű komplexek keletkeznek-e.

Az [N_{im}] elrendeződést mutató részecskénél valamivel nagyobb eltérés adódik a nonapeptid-fém rendszer $\lambda_{\max}$ értékeinek összehasonlításából - az empirikus adattal (~+60), ami a szabad fémion zavaró hatásának tudható be, ennek ellenére elfogadható a koordinációs mód igazolása.

Mindkét ligandum [N_{im}, N⁻, N⁻] elrendeződésű komplexének $\lambda_{\max}$ mért értéke egy nagyobb eltérés mutat az empirikus adathoz viszonyítva. Ez a különbség nagy valószínűséggel a metionin aminosav oldalláncának fémionhoz való koordinációjából adódhat, ami nagyobb $\lambda_{\max}$ értéket eredményez, de ennek biztos kötődését az UV/VIS méréssel nem tudjuk bizonyítani.

Az [N_{im}, N⁻, N⁻, S] szerkezet létezését a CD-mérésekkel tudtuk kimutatni. Az [N_{im}, N⁻, N⁻, N⁻] koordinációra kapott spektrális paraméterek jó egyezést mutatnak.



19. ábra: Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ 1:1 arányú rendszer CD spektrumai

ahol az egyes komplexekhez tartozó Cotton-effektus szélsőértékeket a Cu(II)Ac-MKHM-NH₂ rendszer irodalmi adataival az alábbi táblázatban foglaltam össze:

4.táblázat: a Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ és Cu(II)-Ac-MKHM-NH₂ rendszerek adott komplexeihez tartozó Cotton-effektusok

	Cu(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH ₂ λ _{max} (Δε dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Cu(II)-Ac-MKHM-NH ₂ * λ _{max} (Δε dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)
ML / MLH₁ [N _{im} , N ⁻ , N ⁻ , (S)]	-	660(+0,15)
	538(+0,23)	530(+0,33)
	380(+0,08)	380(+0,16)
	325(-0,03)	325(-1,27)
	250(+5,02)	248(+7,56)
MLH₃ [N _{im} , N ⁻ , N ⁻ , N ⁻]	638(+0,95)	653(+0,92)
	497(-1,07)	494(-1,56)
	-	354(-0,17)
	318(+1,06)	316(+0,74)
	292(-0,35)	289(-0,81)
	256(+7,63)	256(+4,80)

*irodalmi adat^[14]

Az összehasonlított szélsőértékek nagyon jó egyezést mutattak. A méréssel további bizonyítékot kaptunk az egyes komplex-összetételek feltételezett koordinációs módjáról, valamint mind a nonapeptid, mind a terapeptid esetén a részecskeképzés hasonló folyamatok eredményeképpen történik.

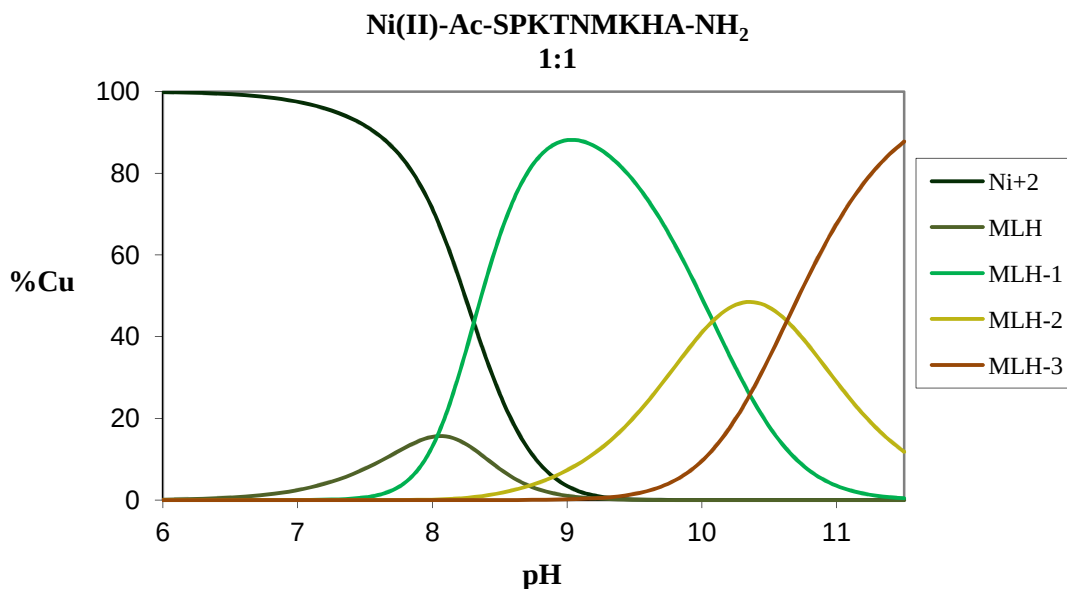
Továbbá mindkét fémion-ligandum rendszerénél ~ 380 nm hullámhossz értéken kimutatható az $[N_{im}, N^-, N^-, S]$ koordináció, pozitív Cotton-effektussal.

5.2.2. Az Ac-SPKTNMKHA-NH₂ Ni(II) komplexei

A $Ni:L=1:1$ rendszerénél, a titrálási görbe és a 2. táblázat adatai alapján azt mondhatjuk, hogy a komplexképződés nagyobb pH-n indul meg az imidazóliumion deprotonálódásával és koordinálódásával, valamint egy amikötésben lévő nitrogén protonvesztésével és kötődésével - kooperatív módon -, létrehozva a $[N_{im}, N^-]$ szerkezetet. Ezt követően további két, peptidkötésben lévő nitrogén deprotonálódik és koordinálódik a fémionhoz, amelynek eredményeképpen kialakul az $[N_{im}, N^-, N^-, N^-]$ elrendeződés.

A tetrapeptidnél ugyancsak létrejön - az első részecske megjelenésével - az $[N_{im}, N^-]$ koordináció, hasonlóan a $Ni(II)Ac-SPKTNMKHA-NH_2$ rendszerénél lezajló folyamatokhoz, de itt $[N_{im}, N^-, N^-, N^-]$ elrendeződés helyett „csak” $[N_{im}, N^-, N^-]$ formával számolhatunk, ahol az előbbi nagy valószínűséggel a metionin aminosav tioéter csoportja képes stabilizálni.

Egy-egy komplex legnagyobb mennyiségében az alábbi pH-értéken van jelen:

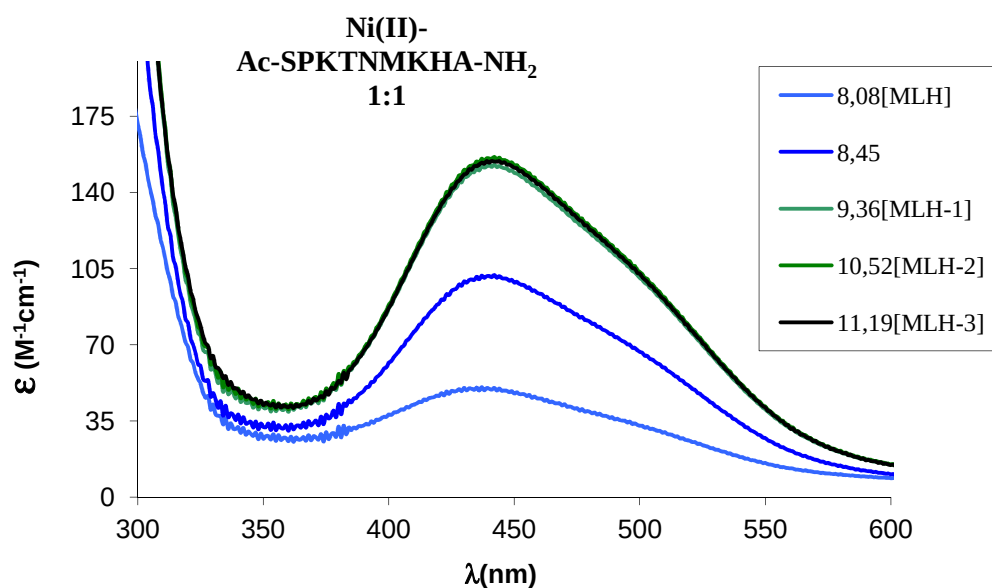


40. ábra: a Ni(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ 1:1 arányú rendszer koncentráció-eloszlás görbéi

(Ni(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ c(L)= 2,83×10⁻³ M)

ahol a titrálás során elsőként képződő részecske, az MLH ~20%-ban van jelen az oldatban pH=8 értéken, majd pH=9 körül az MLH₁, végül ~10,5-ös pH-n az MLH₂ komplex.

A spektrofotometriás mérés során azt tapasztaltuk, hogy a különböző pH-értékeken felvett spektrumok nem mutatnak $\lambda_{\max}$ eltolódást, csupán jelintenzitás-növekedés figyelhető meg:

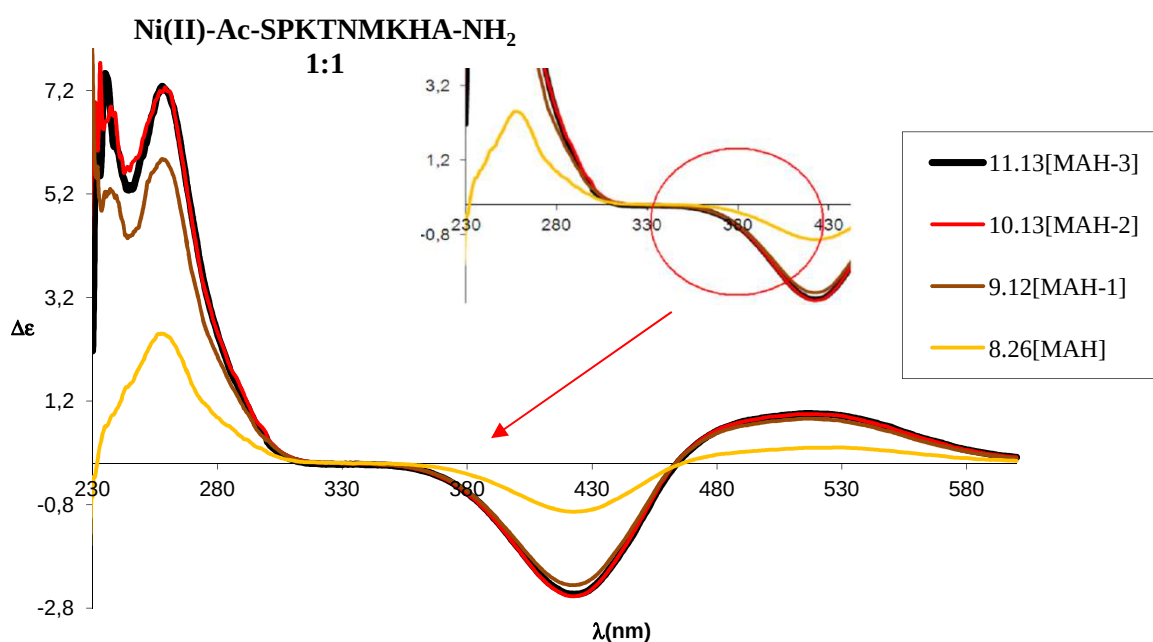


21. ábra: Ni(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ 1:1 arányú rendszer spektrofotometriás

úton felvett görbéi

A felvétel azt mutatja, hogy síknégyzetes elrendeződésű részecskék kialakulása zajlik - az amidnitrogének deprotonálódásával és kötődésével a fémionhoz -, hiszen a $\lambda_{\max}$ értéke 400-550 nm közé esik, ami tipikusan ezen koordinációra jellemző Ni(II)-komplexek esetén.

A CD spektroszkópia ugyanilyen eredményeket szolgáltatott, továbbá segítségével elmondható, hogy ennél a rendszernél nem észlelhető sajátos tioéter-csoport koordináció.



22. ábra: Ni(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ 1:1 arányú rendszer CD spektroszkópiás

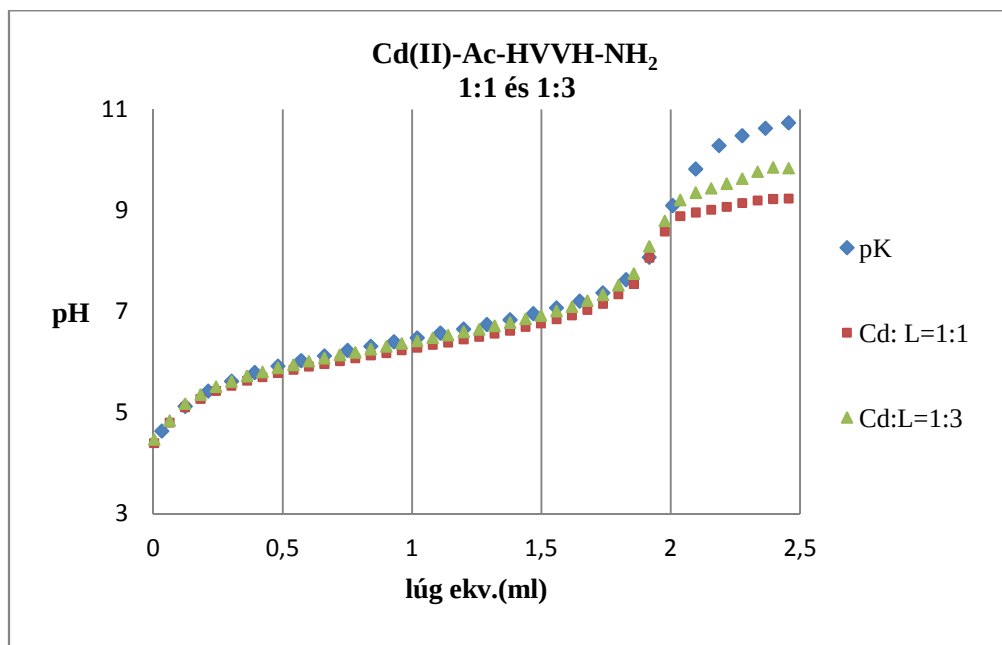
méréssel felvett görbéi

5.3 A Cd(II) és a tetrapeptidek komplexképzése

A Cd(II)-Ac-HGGH-NH₂, Cd(II)-Ac-HVVH-NH₂ és a Cd(II)-Ac-HHGH-NH₂ minták M:L=1:1 és M:L=1:3 arányú rendszeréről egyaránt készült pH-metriás vizsgálat. Egy-egy rendszerhez tartozó M:L=1:1 és M:L=1:3 arányú minta titrálási adatsorát együttesen ábrázoltuk a szabad ligandum pK görbéjével.

Mindhárom diagram nagy egyezést mutat, a titrálási görbék nagyon hasonló lefutásúak és alakúak, ahol a Cd(II)-Ac-HGGH-NH₂ és a Cd(II)-Ac-HVVH-NH₂ rendszereknél két

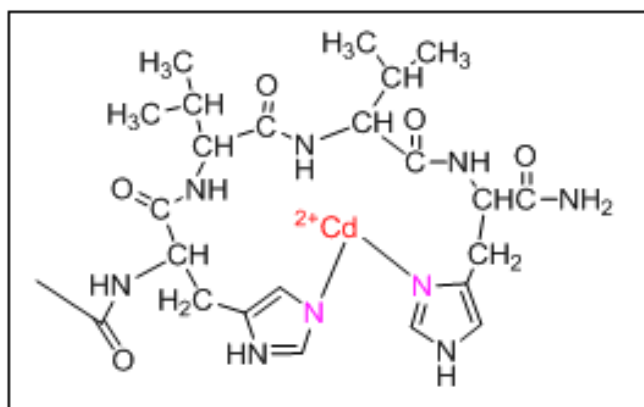
lúgekvivalens fogyásról beszélhetünk, a Cd(II)-Ac-HHGH-NH₂-nél pedig három lúgekvivalens fogy.



25. ábra: a Cd(II)-Ac-HVVH-NH₂ M:L=1:1 és M:L=1:3 arányú mintáinak és szabad

ligandumának titrálási görbéi (Cd(II)-Ac-HVVH-NH₂ 1:1 és 1:3 $c(L) = 2,18 \times 10^{-3}$ M)

A diagramokon belül kis pH-effektusok jellemzik a görbéket, ami azt sugallta, hogy gyenge komplexképzési folyamatok mennek/mehetnek végbe az oldatban.



26. ábra: az Ac-HVVH-NH₂ ligandum [N_{im}, N_{im}] koordinációja a Cd²⁺ ionnal

Mindhárom fémion-ligandum minta titrálásakor savas tartományból indulva, a hisztidin aminosavak imidazol oldalláncai vannak az oldatban protonált formában, amelyek a mérés előrehaladtával fokozatosan deprotonálódnak, s koordinálódnak a kadmium ionhoz kooperatív-módon.

A pH-metria mérési eredmények kiértékelésével arra jutottunk, hogy mindegyik rendszert csak egyfajta

összetételű, ML komplex-képződés jellemzi az $[N_{im}, N_{im}]$ koordinációval.

A kialakult asszociátumoknak a PSEQUAD és SUPERQUAD programokkal meghatározott stabilitási állandóit egy irodalmi adattal vettem össze az alábbi táblázatban:

5. táblázat: a meghatározott komplexek stabilitási állandóinak értéke összevetve az irodalomban fellelhető Cd(II)-Ac-HGH-NHMe komplexeinek adataival

	Cd(II)-Ac-HGGH-NH ₂	Cd(II)-Ac-HVVH-NH ₂	Cd(II)-Ac-HHGH-NH ₂	Cd(II)-Ac-HGH-NHMe*
MLH	–	–	–	–
ML	3,34	2,95	3,19	3,76
MLH₁	–	–	–	-5,90

* irodalmi adat^[21]

Az tapasztalható, hogy a kadmium(II)-ion összességében mindhárom ligandummal kis stabilitású komplexet képez, annak ellenére, hogy a peptid két és három hisztidint tartalmaz és viszonylag jó kötőhelynek minősül a fémion számára.

Megfigyelhető, hogy az Ac-HGGH-NH₂ és az Ac-HVVH-NH₂ peptidekben annak ellenére, hogy a hisztidin aminosavak ugyanolyan pozícióban foglalnak helyet a molekulában, az Ac-HVVH-NH₂ ligandum komplexe valamivel kisebb stabilitást mutat, ami valószínűleg a valin oldalláncának térigényéből származik, a glicinhez képest.

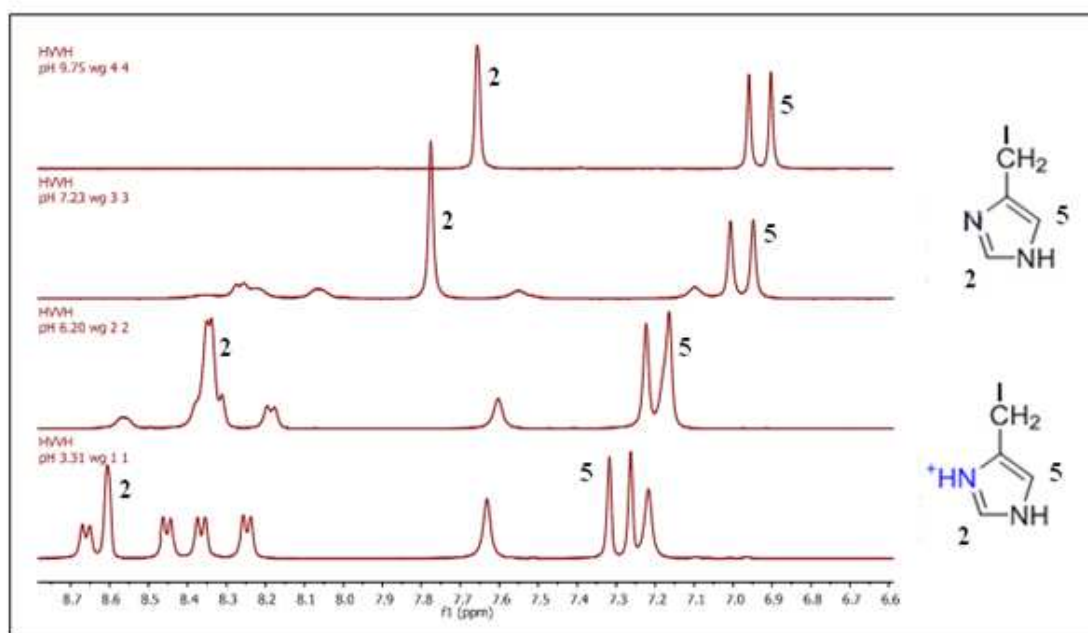
A több hisztidin-szám miatt a Cd(II)-Ac-HHGH-NH₂ ML komplexétől nagyobb stabilitást várnánk, ezzel szemben ez a rendszer egy kisebb értéket mutat. Ez azzal magyarázható, hogy a komplexképzésnek a hisztidinek közvetlen, egymás melletti elhelyezkedése nem megfelelő helyzetű egy stabil részecske létrejöttéhez. (kis tér, gyűrűfeszülés)

Az irodalomban közölt Ac-HGH-NHMe ligandummal létrejövő ML komplex mutatja a legnagyobb stabilitás értéket a már említett asszociátumok adataihoz viszonyítva, amiből az vonható le, hogy a peptidgerincben a His-X-His aminosav kapcsolódási sorrend szolgáltatja a legoptimálisabb komplexképzési lehetőséget, ezen át pedig a legstabilisabb formát.

A ^1H -NMR vizsgálatok célja az volt, hogy igazoljuk azt a feltételezésünket, hogy a Cd(II) -ion az oldalláncbeli imidazolgyűrűkhöz koordinálódik.

^1H -NMR méréseket egyrészt az Ac-HVVH-NH₂ szabad ligandumról készítettünk, amelynek mintájáról különböző pH értékeken vettünk fel spektrumot. Ezzel a peptid deprotonálódási folyamatairól nyerhettünk információkat.

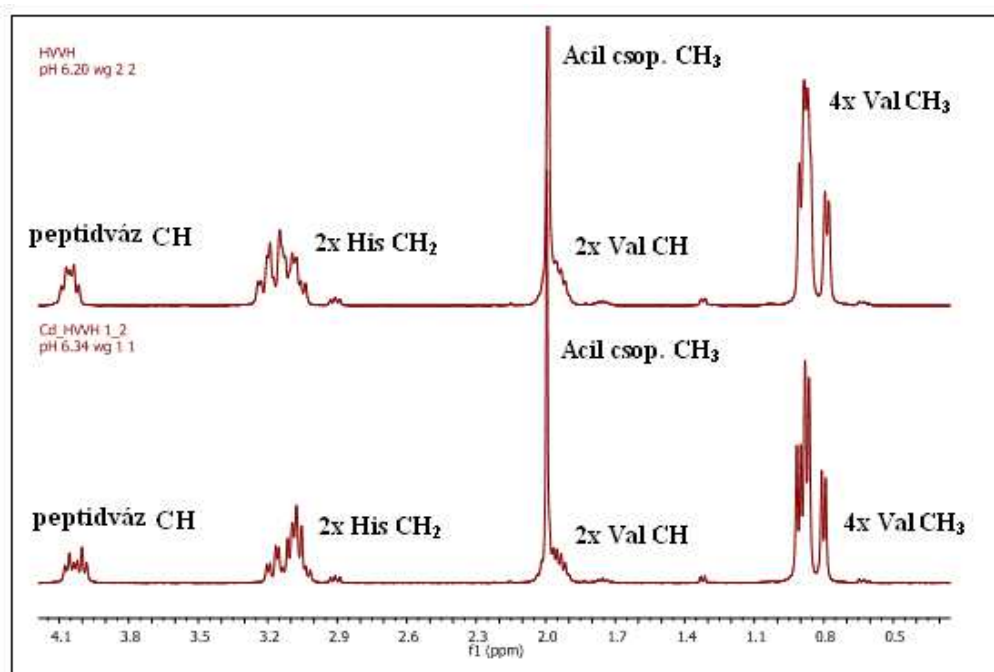
Másrészről a Cd(II) -Ac-HVVH-NH₂ rendszer pH-ját ~6 körüli értékre beállítva - ahol legnagyobb valószínűséggel képződik az ML komplex - a fémiont tartalmazó mintáról is készült felvétel.



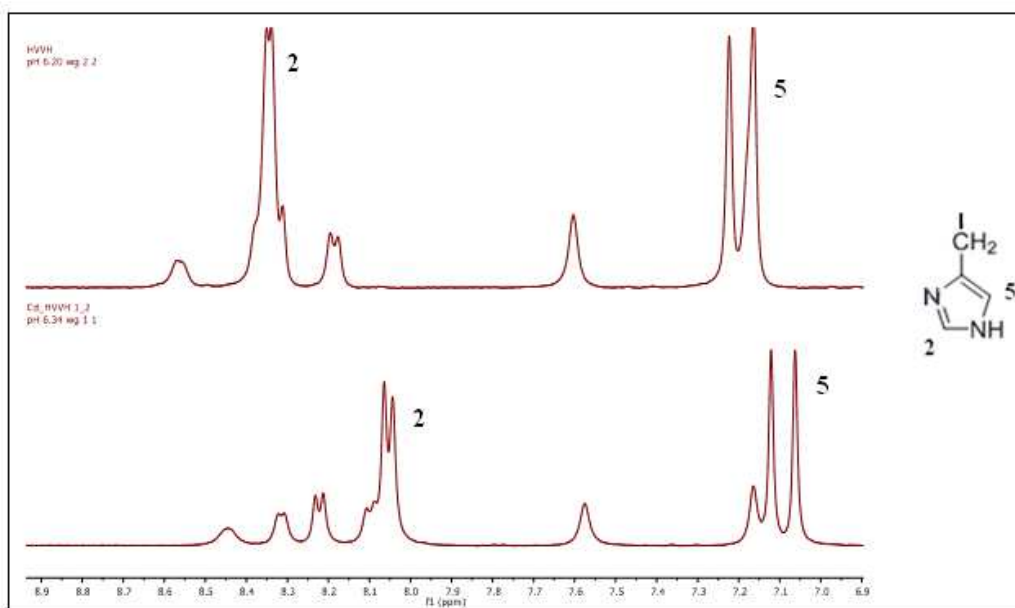
27. ábra: az Ac-HVVH-NH₂ szabad ligandum deprotonálódási folyamatainak vizsgálata ^1H -NMR méréssel a felvételek rendre pH = 3,31; 6,20; 7,23; 9,75 értéken történtek)

Az aromás tartományban az imidazolgyűrű C(2)H és C(5)H protonjai mellett savas tartományban a protonált NH csoportok jele is látható. Ezek azonban az imidazolgyűrű egyik NH-csoportjának deprotonálódásával eltűnnek, így azonosítható a két-két CH proton. Ennek jelei (C(2)H proton esetén szingulett, C(5)H proton esetén dublett) az imidazolgyűrű deprotonálódásával nagymértékben eltolódnak.

(Megjegyzendő, hogy a spektrumban a keresett fő csoportok jelei azonosításra kerültek, azonban olyan jelek is megjelentek az aromás tartomány felvételén, amelyeket nem sikerült pontosan azonosítani.)



28. ábra: a szabad ligandum (felső) és a Cd(II)-Ac-HVVH-NH₂ rendszer (alsó) alifás tartományáról készült felvétel pH~6 értéken



29. ábra: a szabad ligandum (felső) és a Cd(II)-Ac-HVVH-NH₂ rendszer (alsó) aromás tartományáról készült felvétel pH~6 értéken

Az alifás tartományban sem a hisztidin CH₂ jeleiben, sem a valin CH protonjaiban nem látunk jelentős változást a Cd(II)-ion jelenlétében. Ugyanakkor az aromás tartományban az imidazol CH protonokban jelentős változást figyelhetünk meg. Miután a vizsgált

koncentrációtartományban, 1:1 fémion-ligandum aránynál nem teljes a komplexképződés, így a felvett spektrum a ligandum és a CdL komplexre együttesen kapott jelsorozat. A CdL komplexben kötött ligandum jelei azonban nem külön jelként jelennek meg, ami $\text{Cd}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CdL}$ reakcióban gyors cserére utal.

Ugyanakkor a ligandum és a CdL komplex együttes jelenléte megváltoztatja az aromás CH protonok jelét és eltolódását, ami azt támasztja alá, hogy a Cd(II)-ion az aromás gyűrűkhöz koordinálódik.

Összefoglalás

Munkám során célul tűztük ki az egy, két, illetve három hisztidin aminosavat tartalmazó peptidek komplexképzésének vizsgálatát Cd(II)-ionnal, ahol az egy hisztidint tartalmazó peptid vizsgálatát kiegészítettük a Cu(II), Ni(II) és a Zn(II)-fémionok vizsgálatával is.

A Cu(II), Ni(II), Zn(II) és Cd(II)-fémionok Ac-SPKTNMKHA-NH₂ nonapeptiddel való komplexképzésének vizsgálatánál meghatároztuk az adott fémion-ligandum rendszerekre jellemző komplex összetételeket és a részecskék stabilitását, amelyen át információt kaphattunk az egyes fémionok ligandum-affinitásáról.

Legstabilabb komplexeket a Cu(II)-ion képezte, amely fémion-ligandum rendszerében változatos összetételű monokomplexek jöttek létre a titrálás előrehaladtával, s amelyek nagyobb koncentrációban fordultak elő az oldatban (MLH₂, ML, MLH₋₁, MLH₋₂, MLH₋₃).

Ugyancsak stabil komplexeket képez a Ni(II)-ion, de kevésbé változatos összetétellel, mint a Cu(II)-nonapeptid minta esetén (MLH, MLH₋₁, MLH₋₂, MLH₋₃).

Eredményeink alapján gyenge komplexképző ligandumnak bizonyult a Zn(II)- és a Cd(II)-ion, amelyekkel a vizsgált nonapeptid gyakorlatilag nem képzett komplexeket.

A leírt megfigyelések és tapasztalatok alapján a ligandum fémionmegkötő képessége a Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) ~ Cd(II) sorrendben változik.

A Cd(II)-tetrapeptidekkel alkotott rendszerében sikerült kimutatnunk részecskeképződést. A vizsgálati eredmények kiértékelései azt az eredményt hozták, hogy a hisztidin-szám növelése összességében megnöveli a kialakuló komplexek stabilitását, azonban nem mindegy, hogy a kötőhelyet biztosító aminosavak milyen pozícióban vannak jelen a molekulában.

A vizsgált hisztidin-elrendeződések az alábbi sorrendben biztosítanak optimálisabb kötődést és stabilabb koordinációt: HisXHis > HisHis > HisXXHis.

Az eredmények alapján így megállapíthatjuk, hogy önmagában a hisztidin oldalláncbeli imidazolgyűrűje - a hisztidinek számának növelésével sem - jelent stabilis kötőhelyet a Cd(II)-ion számára. Ugyanakkor növelhetjük a peptid Cd(II)-ion megkötő képességét és szelektivitását olyan peptidekkel, amelyek a hisztidin mellett vagy helyett oldalláncbeli kén-donoratomot tartalmaznak.

Így munkánkat ilyen peptidek tervezésével, szintézisével és vizsgálatával fogjuk folytatni.

Summary

In this work we studied the complex formation of Cd(II)-ion with peptides containing one, two and three histidyl amino groups. We also carried out the examination of the one histidyl containing peptide with Cu(II), Ni(II) and Zn(II)-ions.

At the studying of Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Cd(II)-ions with Ac-SPKTNMKHA-NH₂ nonapeptide we determined the composition of complexes and the stability constants. With these results we could obtain information about the ligand affinity of metal ions.

The most stable complexes were formed by the Cu(II)-ion where in the metal ion-ligand system formed variety composition monocomplexes (MLH₂, ML, MLH₁, MLH₂, MLH₃).

In the Ni(II)-Ac-SPKTNMKHA-NH₂ system likewise came into existence stability and variety composition monocomplexes (MLH, MLH₁, MLH₂, MLH₃)

Based on our results we found that the Zn(II) and Cd(II) ions weak complex formed. With this metal ions the nonapeptide practically didn't create any complexes.

According to our observation the metal binding ability of the ligand is the following: Cu(II) > Ni(II) > Zn(II) ~ Cd(II).

Our data supported that in the Cd(II)-terapeptide systems there were complexes. At these systems the more histidyl presence enhanced the stability of complexes. However the position of histidyl groups can influence the quality of binding site.

From the comparison studied systems and the literary data the favourable binding site positions the following: HisXHis > HisHis > HisXXHis.

In conclusion the more imidazole of histidyl groups don't contribute to increase the stability of complexes significantly.

In the future we will try to improve the Cd(II)-ion binding ability and selectivity of ligands with containing sulfur donor side chain.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, *Dr. Várnagy Katalin* egyetemi docensnek, hogy vállalta mentorálásomat és oktatói irányításával, biztatásával létrejöhetett ez a dolgozat. Hálás vagyok támogatásáért és őszinte szakmai gondviseléséért!

Szeretném megköszönni *Dávid Ágnes* PhD hallgatónak, hogy oly sokszor önzetlenül segítségemre volt a mérési módszerek és kiértékelési technikák elsajátításánál.

Köszönöm a *Bioszervetlen Kémiai Kutatócsoport* minden dolgozójának, hogy a munkám során felmerülő kérdésekben segítségemre voltak.

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program - Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működése országos program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A kutatáshoz a TÁMOP-4.2.2.A-11/KONV-2012-0043 (ENVIKUT) projekt is hozzájárult.

Irodalomjegyzék

- [1] Simon I. Noémi, PhD értekezés, Szeged, 2008.
- [2] Kiss T., Gajda T., Gyurcsik B., Bevezetés a bioszervetlen kémiába, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 2007.
- [3] Sóvágó I. Prof. emeritus, A fémionok és neurodegeneratív rendellenességek lehetséges kapcsolata. Okok és/vagy következmények /előadás felvétel/
(http://mindentudas.videotorium.hu/hu/recordings/details/2254,A_femionok_es_neurodegenerativ_rendellenessegek_lehetseges_kapcsolata._Okok_es_vagy_kovetkezhmenyek)
- [4] H Cayton, N. Graham, J. Warner, Alzheimer-kór és a demencia egyéb fajtái, Springmed kiadó, Budapest, 2006.
- [5] Prof. Leslie J. Findley, Bridget McCall, Parkinson-kór, Springmed kiadó, Budapest, 2011.
- [6] Penke B., Datki Zs., Zarándi M., Neurodegeneratív betegségek kémiai és biokémiai háttere, Magyar Tudomány folyóirat, 47. évf. 5. sz. 2003.
- [7] Kállay Cs., PhD értekezés, Debrecen, 2005.
- [8] <http://kockazatos.hu/>
- [9] Lukács M., Szakdolgozat, Debrecen, 2014.
- [10] <http://dietless.hu/cink-az-eros-immunrendszerert/>
- [11] N.N. Greenwood, A.Earnshaw, Az elemek kémiája, Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 1999.
- [12] Dr. Buglyó P. Szervetlen kémia II. oktatási jegyzet
- [13] V. Józai, Z. Nagy, K. Ősz, D. Sanna, G. Di Natale, D. La Mendola, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, Journal of Inorganic Biochemistry 100 (2006) 1399-1409
- [14] I. Turi, D. Sanna, E. Garribba, G. Pappalardo, I. Sóvágó, Polyhedron 62 (2013) 7-17
- [15] D. Sanna, G. Micera, Cs. Kállay, V. Rigó, I. Sóvágó, Dalton Transz., 2004, 2702-2707
- [16] S. Rajkovic, Cs. Kállay, R. Serényi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, Dalton Transz., 2008, 5059-5070
- [17] <http://www.staff.u-szeged.hu/~enyedy/kutatunk.html>
- [18] Tímári S., PhD értekezés, Debrecen, 2012.
- [19] Dávid Á., Diplomamunka, Debrecen 2012.
- [20] Paksi Z., PhD értekezés, Szeged, 2008.
- [21] S. Timári, Cs. Kállay, K. Ősz, I. Sóvágó, K. Várnagy, Dalton Transz., 2009, 1962-1971

Mellékletek, függelék

- ^[A] <http://www.findallpills.com/2014/02/marijuana-compound-found-superior-to-drugs-for-alzheimers-2.html>
- ^[B] <http://www.integratednaturalmedicine.com/osteoporosis-toxic-metal-effect/>
- ^[C] http://www.hazipatika.com/napi_egeszseg/hepatitis/cikkek/a_hepatitis_lefolyasa/nemcsak_az_italtol_zsugorodhat_ossze_a_majunk/20130219152633

NYILATKOZAT A DOLGOZAT EREDETISÉGÉRŐL

Alulírott *Laskai Aliz* (Neptun kód: G32MYK) jelen nyilatkozat aláírásával kijelentem, hogy a *Hisztidint tartalmazó peptidek átmenetifémekkel történő oldategyensúlyi vizsgálata* című TDK dolgozat önálló munkám, készítése során betartottam a szerzői jogról szóló 1999. évi LXXVI. tv. szabályait, valamint az Egyetem által előírt, a dolgozat készítésére vonatkozó szabályokat, különösen a hivatkozások és idézetek tekintetében.*

Kijelentem továbbá, hogy a dolgozat készítése során önálló munka tekintetében a témavezetőt nem tévesztettem meg. Meg nem engedett segítséget nem vettem igénybe, a dolgozatot más oktatási intézményben szakdolgozatként vagy diplomamunkaként korábban nem nyújtottam be.

Jelen nyilatkozat aláírásával tudomásul veszem, hogy amennyiben bizonyítható, hogy a dolgozatot nem magam készítettem, vagy a dolgozattal kapcsolatban szerzői jogsértés merül fel, illetve a dolgozatot korábban más oktatási intézményben is benyújtottam, úgy a Debreceni Egyetem megtagadja a dolgozat befogadását és ellenem fegyelmi eljárást indíthat. A dolgozat befogadásának megtagadása és a fegyelmi eljárás indítása nem érinti a szerzői jogsértés miatti egyéb (polgári jog, szabálysértési jog, büntetőjogi) jogkövetkezményeket.

.....

Hallgató aláírása

Alulírott témavezető kijelentem, hogy az ezúton benyújtott TDK dolgozat az én szakmai irányításommal, a jelölttel folytatott rendszeres szakmai konzultáció mellett készült, a hallgató önálló munkáját tükrözi. A dolgozatot áttekintettem, a záróvizsgán történő védeésre bocsátásra megfelelőnek és a könyvtár honlapjára feltölthetőnek találtam.

Debrecen, 2014.11.14.

.....

Témavezető aláírása

DE TTK, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

*1999. évi LXXVI. tv. 34. § (1) A mű részletét – az átvevő mű jelege és célja által indokolt terjedelemben és az eredetihez híven – a forrás, valamint az ott megjelölt szerző megnevezésével bárki idézheti. 36. § (1) Nyilvánosan tartott előadások és más hasonló művek részletei, valamint politikai beszédek tájékoztatás céljára - a cél által indokolt terjedelemben – szabadon

felhasználhatók. Ilyen felhasználás esetén a forrást – a szerző nevével együtt – fel kell tüntetni, hacsak ez lehetetlennek nem bizonyul.