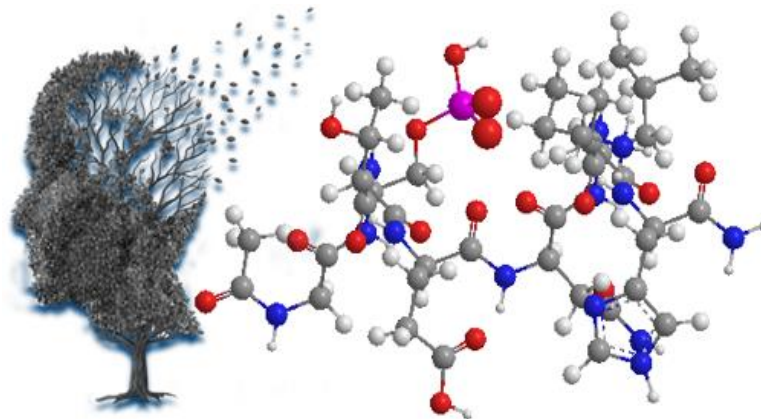


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΔΠΜΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ



ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ  
Cu(II) ΜΕ ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ  
τ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ. ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ ΣΤΗ ΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΗ  
ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ALZHEIMER



Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

Δήμητρα Κυριάκου  
ΧΗΜΙΚΟΣ

Ιωάννινα 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΔΠΜΣ ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ



ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ  
Cu(II) ΜΕ ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ  
τ-ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ. ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ ΣΤΗ ΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΗ  
ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥΣ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ALZHEIMER

Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

**Δήμητρα Κυριάκου**  
ΧΗΜΙΚΟΣ

Ιωάννινα 2018



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά τη χρονική περίοδο 2016-2018.

Το θέμα της εργασίας, μου ανατέθηκε από τον Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Γεράσιμο Μαλανδρίνο, στον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για το μεγάλο ενδιαφέρον, τις χρήσιμες συμβουλές του και τη συνεχή επίβλεψη του θέματος μου. Τον ευχαριστώ πολύ για όσα μου δίδαξε και την ευχάριστη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος, αλλά κυρίως για τη βοήθεια του στο επόμενο μου βήμα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Δρ. Βασίλη Μούση, μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Χημείας για τη βοήθεια του σε θέματα πεπτιδικής σύνθεσης, καθώς και το συνεχές του ενδιαφέρον και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια της προσπάθειάς μου. Οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή του τμήματος Φυσικής κ. Ιωάννη Δεληγιαννάκη και την Δρ. Ελίνα Μπλέτσα για την καταγραφή των φασμάτων EPR. Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Δρ. Δημήτρη Κρικοριάν, μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Χημείας, για τη βοήθεια του στον καθαρισμό των πεπτιδίων, καθώς και το Δρ. Κωνσταντίνο Τσιαφούλη, μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Χημείας, για την καταγραφή των φασμάτων NMR.

Ευχαριστώ θερμά τους φίλους και συναδέλφους που εκπόνησαν τις εργασίες τους την ίδια χρονική περίοδο στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας και στο εργαστήριο Χημείας Πεπτιδίων για την υποστήριξη, την άριστη συνεργασία και τις υπέροχες στιγμές που περάσαμε κατά τη διάρκεια της διατριβής. Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένειά μου για τη στήριξη και την ενθάρρυνσή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

Δήμητρα Κυριάκου

Ιωάννινα 2018



## Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 .....	1
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer .....	1
1.2 Παράγοντες κινδύνου.....	3
1.2.1 Γενετικός κίνδυνος.....	3
1.2.2 Οικογενειακό ιστορικό.....	3
1.2.3 Το φύλο .....	4
1.2.4 Τρόπος ζωής και περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	4
1.3 Συμπτώματα και στάδια της νόσου Alzheimer .....	6
1.4 Τα παθολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου Alzheimer .....	8
1.5 β-αμυλοειδές πεπτίδιο .....	10
Κεφάλαιο 2.....	14
2.1 τ-πρωτεΐνη.....	14
2.2 Δομή της τ-πρωτεΐνης .....	16
2.3 Λειτουργικές περιοχές.....	22
2.4 Η φωσφορυλίωση της τ-πρωτεΐνης.....	23
2.5 Παθολογία – tau .....	25
Κεφάλαιο 3 .....	27
3.1 Βιοχημικός ρόλος ιόντων Cu(II).....	27
3.2 Ο πιθανός ρόλος ιόντων Cu(II) στη νόσο Alzheimer .....	28
Κεφάλαιο 4 .....	36
4.1 Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια .....	36
4.2 Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων .....	37
4.3 Αλληλεπίδραση ιόντων Cu(II) με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη .....	38
Κεφάλαιο 5 .....	41
Σκοπός.....	42
Βιβλιογραφία θεωρητικού μέρους .....	44
Κεφάλαιο 6 .....	48
Πειραματικό μέρος.....	49
6.1 Αντιδραστήρια-Υλικά .....	49
6.2 Πορεία σύνθεσης των πεπτιδίων Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH <sub>2</sub> και Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH <sub>2</sub> στη στερεά φάση.....	51
6.3 Μέθοδοι καθαρισμού .....	55
6.4 Ποτενσιομετρία .....	56
6.4.1 Εισαγωγικές έννοιες.....	56

6.4.2 Πειραματική πορεία ποτενσιομετρίας.....	59
6.5 Φασματοσκοπικές Τεχνικές .....	60
6.5.1 Φασματοσκοπία UV/Vis .....	60
Λήψη φασμάτων UV/Vis .....	63
6.5.2 Φασματοσκοπία EPR .....	64
Λήψη φασμάτων EPR .....	66
6.5.3 Φασματοσκοπία NMR .....	66
6.5.4 Φασματομετρία μάζας ESI-MS.....	68
Κεφάλαιο 7 .....	69
Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	70
7.1 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH <sub>2</sub> .....	70
7.2 Αλληλεπίδραση ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο Ac-GS(P)TENLKH-NH <sub>2</sub> .....	76
7.2.1 Ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις .....	76
7.2.1.1 Προσδιορισμός τιμών pK <sub>a</sub> του ελεύθερου πεπτιδίου.....	76
7.2.1.2 Αλληλεπίδραση Cu(II) : πεπτιδίου Ac-GS(P)TENLKH-NH <sub>2</sub> .....	78
7.3 Φασματοσκοπική μελέτη .....	80
7.3.1 Φασματοσκοπία UV-Vis.....	80
7.3.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα EPR.....	82
7.4 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων .....	83
7.5 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH <sub>2</sub> ...91	
7.6 Αλληλεπίδραση ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο Ac-GSTENLKH-NH <sub>2</sub> .....	97
7.6.1 Ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις .....	97
7.6.1.1 Προσδιορισμός τιμών pK <sub>a</sub> του ελεύθερου πεπτιδίου.....	97
7.6.1.2 Αλληλεπίδραση Cu(II) : πεπτιδίου Ac-GSTENLKH-NH <sub>2</sub> .....	99
7.7 Φασματοσκοπική μελέτη .....	100
7.7.1 Φασματοσκοπία UV-Vis.....	100
7.7.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα EPR.....	102
7.8 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων .....	103
Κεφάλαιο 8 .....	109
Συμπεράσματα .....	109
Κεφάλαιο 9 .....	116
Περίληψη.....	116
Summary .....	118
Συντομογραφίες .....	120



Βιβλιογραφία πειραματικού μέρους-αποτελεσμάτων.....	122
---	-----



## Κεφάλαιο 1

### 1.1 Γενικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer

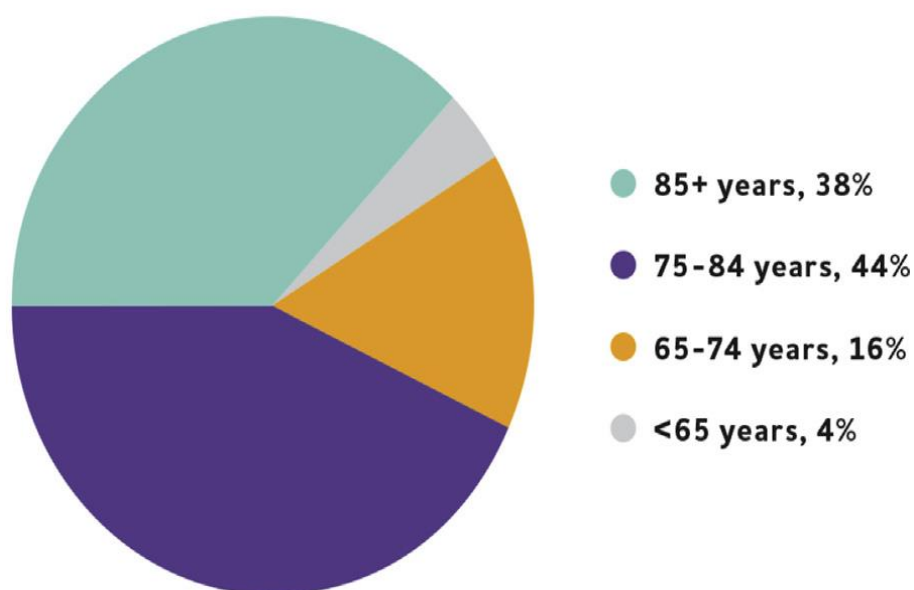
Η νόσος Alzheimer (Alzheimer Disease, AD) είναι μια χρόνια νευροεκφυλιστική ασθένεια του εγκεφάλου και αποτελεί το συχνότερο αίτιο της άνοιας. Η κύρια εκδήλωση της είναι η διαταραχή στη μνήμη, τη σκέψη και τη συμπεριφορά. Είναι μια ασθένεια μη θεραπεύσιμη, εκφυλιστική και θανατηφόρα, η οποία περιγράφηκε αρχικά από το Γερμανό ψυχίατρο και νευροπαθολόγο Αλοΐσο Αλτσχάιμερ το 1906. [1] Η διάρκεια της νόσου κυμαίνεται μεταξύ 3 και 20 χρόνων και εξαπλώνεται σταδιακά μέσα στον εγκέφαλο, ενώ τα συμπτώματα του ατόμου χειροτερεύουν με την πάροδο του χρόνου. [2]

Έχουν παρατηρηθεί δύο μορφές Alzheimer: η σποραδική νόσος Alzheimer (μη κληρονομική) και η οικογενειακή νόσος. Η σποραδική νόσος, η πιο συνηθισμένη (95% όλων των περιπτώσεων), οφείλεται σε πολλαπλούς παράγοντες, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών, γενετικών και επιγενετικών παραγόντων. Οι υπόλοιπες περιπτώσεις Alzheimer (λιγότερες από 5%) είναι κληρονομικές, και τα συμπτώματα ξεκινούν πριν από την ηλικία των 65 ετών. [3]

Η πρόοδος στην επιστήμη και την τεχνολογία είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας ζωής, την πρόληψη και θεραπεία ασθενειών και την αύξηση του προσδόκιμου ζωής. Ωστόσο, η μακροβιότητα συνοδεύεται με ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία όπως η νόσος Alzheimer. Η νόσος αυτή αποτελεί την έκτη κύρια αιτία θανάτου και μία από τις βασικότερες αιτίες άνοιας στις ΗΠΑ.[4] Έχει υπολογισθεί ότι 5.5 εκατομμύρια Αμερικάνοι έπασχαν από Alzheimer το 2017. Ο αριθμός αυτός περιλαμβάνει περίπου 5.3 εκατομμύρια άτομα ηλικίας 65 ετών και άνω και περίπου 200.000 άτομα ηλικίας κάτω των 65 ετών. [5]

Γενικότερα, ένας στους δέκα ανθρώπους 65 ετών και άνω έχουν άνοια λόγω Alzheimer. Το ποσοστό των ανθρώπων με άνοια αυξάνεται με την ηλικία: 3% των ανθρώπων ηλικίας 65-74, 17% των ανθρώπων ηλικίας 75-84, και 32% των ανθρώπων ηλικίας 85 ετών και άνω (σχήμα 1). Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες κάθε 66 δευτερόλεπτα υπάρχει μια νέα περίπτωση AD και παγκοσμίως κάθε 3.2 δευτερόλεπτα. Δεν έχει βρεθεί θεραπεία για τη νόσο και το κόστος της φροντίδας τέτοιων ασθενών θέτει τεράστια οικονομική επιβάρυνση για τις οικογένειες, την κοινωνία και το έθνος. Η νόσος Alzheimer αναδύεται τώρα ως μια μείζων κρίση στην παγκόσμια υγεία,

σύμφωνα με τον όλο και αυξανόμενο αριθμό των ατόμων που αναμένεται να νοσήσουν. [5]



**Σχήμα 1:** Ηλικία ατόμων με Alzheimer στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 2017.[5]

Αν και η ακριβής αιτία είναι άγνωστη, φαίνεται ότι πολλαπλοί παράγοντες αλληλεπιδρούν για την εμφάνισή της και συνδέονται με έναν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Η ηλικία είναι ο πιο γνωστός παράγοντας κινδύνου, αφού όσο αυξάνεται τόσο η πιθανότητα προσβολής από τη νόσο διογκώνεται. Το οικογενειακό ιστορικό είναι ένας ακόμη σημαντικός επιβαρυντικός παράγοντας, αφού είχε αποδειχθεί ότι όσοι έχουν παραπάνω από ένα άτομο στην οικογένεια με Alzheimer, κινδυνεύουν 2-3 φορές περισσότερο να προσβληθούν από τη νόσο. Εκτός από τους παραπάνω παράγοντες που δεν μπορούν να αλλάξουν, υπάρχουν και άλλοι που ερευνώνται με προσοχή από τους επιστήμονες ώστε να διαπιστωθεί η ακριβής συσχέτιση τους με τη νόσο. Έτσι οι έρευνες έχουν δείξει ότι οι κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις, το οξειδωτικό στρες και η επίδραση του εξωτερικού περιβάλλοντος αυξάνουν την πιθανότητα προσβολής. Ωστόσο, ευεργετικά φαίνεται να δρουν παράγοντες όπως η υγιεινή διατροφή, η μόρφωση, η κοινωνικότητα, καθώς και η τακτική πνευματική και σωματική άσκηση.[2]

## 1.2 Παράγοντες κινδύνου

### 1.2.1 Γενετικός κίνδυνος

Η απολιποπρωτεΐνη E (apolipoprotein E, APOE) είναι ο πιο γνωστός γενετικός παράγοντας κινδύνου για την έναρξη της νόσου Alzheimer. Το γονίδιο APOE, που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19, έχει τρία κύρια αλληλόμορφα γονίδια ε2, ε3 και ε4, με έξι πιθανούς γονότυπους (ε2 / ε2, ε2 / ε3, ε2 / ε4, ε3 / ε3, ε3 / ε4, ε4 / ε4). Το ε2 αλληλόμορφο γονίδιο παρουσιάζει μέτρια προστατευτική επίδραση έναντι της νόσου και το ε4 προκαλεί αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της. Η συχνότητα εμφάνισης του ε4 αλληλόμορφου γονιδίου είναι περίπου 15% στον γενικό πληθυσμό, αλλά περίπου το 40% των ασθενών με Alzheimer.

Η APOE ε4 δεν καθορίζει ποιος θα αναπτύξει την ασθένεια, αλλά σχετίζεται με την πρόωρη ανάπτυξη της νόσου. Επιπλέον, ο ομόζυγος που φέρει το αλληλόμορφο γονίδιο ε4 (ε4 / ε4 γονότυπο) παρουσιάζει υψηλότερο κίνδυνο να προσβληθεί από την ασθένεια. Ο ρυθμιστής της χοληστερόλης, το APOE ε4 σχετίζεται τόσο με την υψηλότερη απορρόφηση χοληστερόλης στο έντερο όσο και με τα υψηλότερα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα. Η σχέση της APOE ε4 με αγγειακές παθήσεις, διαβήτη και άνοια υποδηλώνει ότι μαζί με τις παρούσες περιβαλλοντικές μεταβλητές, η συμβολή της είναι τουλάχιστον επιβλαβής.

Παρόλο που το APOE ε4 έχει συνδεθεί με διαταραχές της υγείας καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, συνδέεται πρωτίστως με ασθένειες της γήρανσης και η αρνητική του επίδραση πιθανότατα πραγματοποιείται στη μέση ηλικία. Οι ομόζυγοι APOE ε4 αρχίζουν να παρουσιάζουν μειωμένη νοητική απόκριση περίπου στα 50, ενώ οι ετεροζυγώτες στα 60 έτη και η γνωστική υποβάθμιση των μη φορέων καθυστερεί μέχρι τα 70 έτη. [1], [6]

### 1.2.2 Οικογενειακό ιστορικό

Οι απόγονοι γονέων με Alzheimer έχουν έξι φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου σε σύγκριση με εκείνους χωρίς οικογενειακό ιστορικό. Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η APOE ε4 παρουσιάζει αυξημένη παρουσία σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό. Ωστόσο, φαίνεται ότι το οικογενειακό ιστορικό ενέχει έναν κίνδυνο (είτε γενετικό, περιβαλλοντικό είτε και τα δύο) που ασκεί επίδραση πέρα

από το ε4. Η παρουσία οικογενειακού ιστορικού μαζί με το APOE ε4 αυξάνει το συνολικό κίνδυνο για Alzheimer. Για τους συγγενείς πρώτου βαθμού των ασθενών με γονότυπο 3/3 ο κίνδυνος να νοσήσουν είναι 29,2%. Ο κίνδυνος αυξάνεται σε 46,1% για τους συγγενείς πρώτου βαθμού με γονότυπο 3/4 και αυξάνεται περαιτέρω στο 61,4% για εκείνους με γονότυπο 4/4. [1], [7]

### 1.2.3 Το φύλο

Η ανάπτυξη, η δομή και η λειτουργία του εγκεφάλου διαφέρουν με το φύλο. Τόσο οι γυναίκες όσο και οι άνδρες παρουσιάζουν διαφορετική κλινική εικόνα. Έχει παρατηρηθεί ότι οι γυναίκες που έχουν διαγνωσθεί με Alzheimer εμφανίζουν ταχύτερη εξέλιξη της ατροφίας του ιππόκαμπου σε σχέση με τους άνδρες. Επιπλέον, οι γυναίκες τείνουν να έχουν πιο συναισθηματικά συμπτώματα και αναπηρία, αλλά περισσότερο χρόνο ζωής. Αντιθέτως, οι άνδρες εμφανίζουν πιο επιθετική συμπεριφορά και υψηλότερη θνησιμότητα. [8]

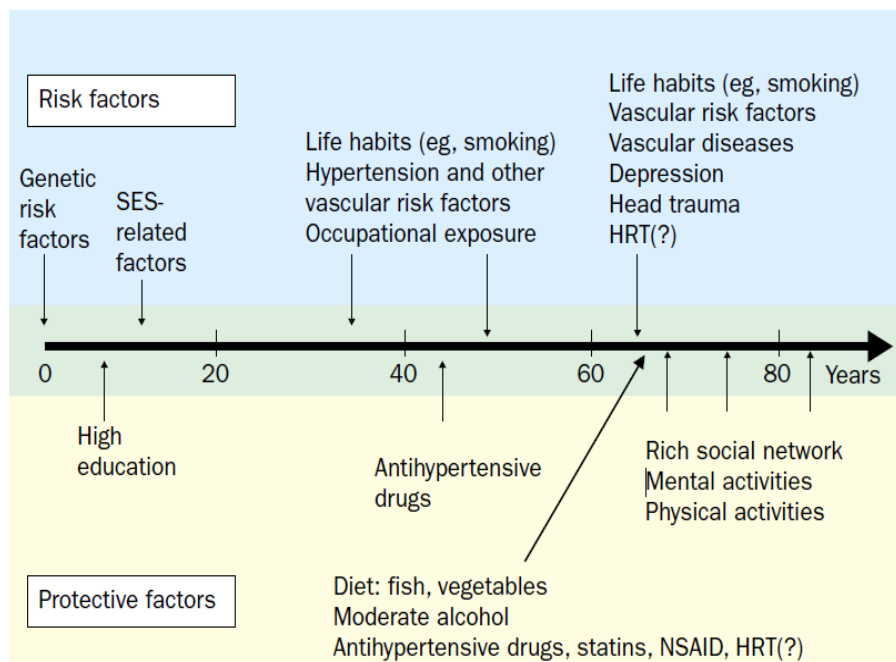
Κάποια πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι οι γυναίκες αντιπροσωπεύουν περίπου τα δύο τρίτα των ασθενών με Alzheimer. [9] Ο αυξημένος κίνδυνος των γυναικών για Alzheimer συμπίπτει με την εμμηνόπαυση, γεγονός που συνεπάγεται με έλλειψη οιστρογόνων ως κύριο παράγοντα εμφάνισης της νόσου που σχετίζεται με το φύλο. Το οιστρογόνο μειώνει το σχηματισμό του β-αμυλοειδούς και προστατεύει από τις τοξικές του επιδράσεις in vitro. Επιπρόσθετα, αρκετές μελέτες σε μοντέλα ζώων με Alzheimer υποστηρίζουν ένα προστατευτικό ρόλο των οιστρογόνων κατά της ασθένειας, αν και ορισμένα αποτελέσματα είναι αμφιλεγόμενα και απαιτείται επιπλέον μελέτη. [1]

### 1.2.4 Τρόπος ζωής και περιβαλλοντικοί παράγοντες

Εκτός από τις γενετικές ή εγκεφαλικές μεταβολές, οι κοινωνικοί παράγοντες έχουν επίσης σημαντικό ρόλο στην πορεία και την έκβαση της άνοιας. Ίσως τα πιο σημαντικά παραδείγματα είναι τα επίπεδα εκπαίδευσης και επαγγέλματος, τα οποία έχουν αποδειχθεί επανειλημμένα ότι επηρεάζουν τον κίνδυνο ασθένειας. Ο τρόπος ζωής και συμπεριφοράς, όπως η χρήση καπνού και οινοπνεύματος, αποτελούν παράγοντες αγγειακού κινδύνου και επηρεάζουν το βαθμό αναπηρίας σε άτομα με άνοια. Οι συμπεριφορές και οι εμπειρίες ενός ατόμου σε σχέση με τη διάρκεια ζωής

επηρεάζουν τον εγκέφαλο και πολλοί από αυτούς τους παράγοντες ποικίλλουν ανάλογα με το φύλο.[8]

Ποικίλοι παράγοντες (σχήμα 2) συμβάλλουν στην αποφυγή εμφάνισης της νόσου Alzheimer, όπως η υγιεινή διατροφή, η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ και η κοινωνική δραστηριότητα ή υποστήριξη.[10]. Η εκπαίδευση θεωρείται επίσης ότι συμβάλλει στην προστασία έναντι της νόσου. Μελέτες μονοζυγωτικών διδύμων με διαφορετικά επίπεδα βασικής εκπαίδευσης, δείχνουν ότι το πιο μορφωμένο δίδυμο που ασχολείται με ψυχικά διεγερτικές δραστηριότητες, καθυστερεί να εμφανίσει άνοια σε σύγκριση με το άλλο δίδυμο.[1] Συνεπώς φαίνεται η ευεργετική δράση της εκπαίδευσης, καθώς η μάθηση οδηγεί σε αλλαγές του εγκεφάλου που επιτρέπουν στους ανθρώπους να αντιμετωπίζουν πιο αποτελεσματικά τις εγκεφαλικές βλάβες. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί εάν η ευεργετική δράση της εκπαίδευσης γενικεύεται σε κλινικό πλαίσιο. Τέλος, τόσο η ψυχική δραστηριότητα όσο και η σωματική δραστηριότητα έχει επίσης συνδεθεί με τη βελτίωση της νοημοσύνης και την πρόληψη του Alzheimer. [11], [12].



**Σχήμα 2:** Χρονοδιάγραμμα με τους παράγοντες κινδύνου και τους προστατευτικούς παράγοντες της άνοιας.[12]

### 1.3 Συμπτώματα και στάδια της νόσου Alzheimer

Κάθε ασθενής με Alzheimer, μπορεί να έχει τη δική του εξελικτική εικόνα με διάφορα συμπτώματα . Το πρώτο σύμπτωμα είναι η διαταραχή στην καταγραφή νέων πληροφοριών, δηλαδή ο ασθενής αδυνατεί να θυμηθεί πρόσφατα γεγονότα. Ακόμη παρουσιάζει διαταραχή στην αντίληψη του χώρου και του χρόνου. Στη συνέχεια, εμφανίζει σύγχυση στην ομιλία και τη συμπεριφορά. Ο ασθενής φαίνεται αδιάφορος, ευερέθιστος καθώς και με έντονες ψυχικές και συναισθηματικές μεταπτώσεις, όπως ψευδαισθήσεις, κατάθλιψη και νευρική κατάσταση. Η πρόοδος της νόσου ποικίλλει, ωστόσο στα τελικά στάδια εγκαθίσταται έκπτωση των σωματικών λειτουργιών και απώλεια της ικανότητας του ατόμου να εκτελέσει τις καθημερινές του δραστηριότητες.

Ενώ η διάρκεια της νόσου ποικίλει σε μήκος και δριμύτητα από ασθενή σε ασθενή, τα συμπτώματα της αναπτύσσονται σταδιακά, ανάλογα με την περιοχή του εγκεφάλου που εντοπίζεται η εκφύλιση. Τυπικά η εκφύλιση των νευρώνων ξεκινάει στον ιππόκαμπο, μια περιοχή του εγκεφάλου κρίσιμη για τη βραχυπρόθεσμη μνήμη. Από εκεί εξαπλώνεται σε άλλες περιοχές που ελέγχουν τη γνώση, την κρίση, τη συμπεριφορά και τη σωματική κίνηση. Με άλλα λόγια, η νόσος Alzheimer ταξινομείται σε στάδια (σχήμα 3), ανάλογα με τις εκδηλώσεις του ασθενούς και τις λειτουργικές του ικανότητες.

Ειδικότερα, στο πρώιμο στάδιο της ασθένειας, που καλείται προκλινική νόσος Alzheimer, υποστηρίζεται ότι οι επιπτώσεις στον εγκέφαλο ξεκινούν 10 με 20 χρόνια πριν να αρχίσουν τα συμπτώματα της νόσου. Αρχικά, η εκφύλιση αναπτύσσεται στον έσω ρινικό φλοιό, μια περιοχή προσκολλημένη στον ιππόκαμπο. Το πρώτο σύμπτωμα φαίνεται να είναι μια ελαφριά, δυσδιάκριτη απώλεια μνήμης. Χαρακτηριστικά σημεία αυτού του αρχικού σταδίου, είναι η συνακόλουθη αδυναμία αφομοίωσης νέων πληροφοριών και η εμφάνιση απάθειας, που εκδηλώνεται με τη μορφή της έλλειψης ενδιαφέροντος για πράγματα που παλαιότερα κατείχαν σημαντική θέση στη ζωή του.

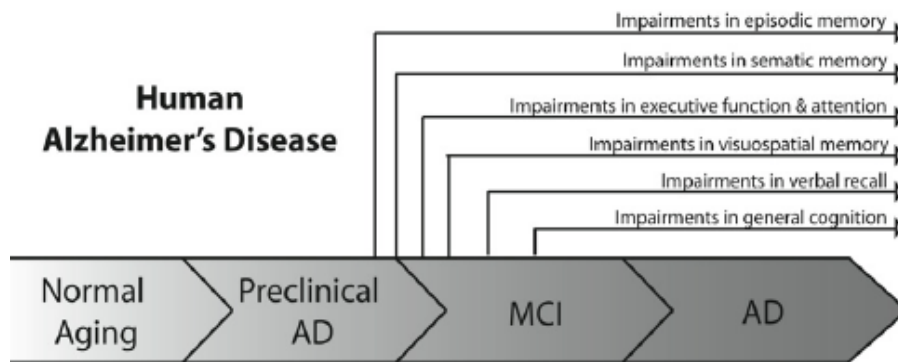
Μόλις η εκφύλιση των νευρώνων εξαπλωθεί στον εγκεφαλικό φλοιό, τα κλιμακωτά προβλήματα στη μνήμη και στη γνωστική λειτουργία γίνονται εμφανή. Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται ως ήπια νόσος Alzheimer και αποτελεί μια μεταβατική κατάσταση της ασθένειας. Το οικογενειακό περιβάλλον καθώς και οι φίλοι αναγνωρίζουν και επιβεβαιώνουν τις δυσκολίες του ασθενούς, και προχωρούν σε κλινική εξέταση. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται στο στάδιο αυτό είναι σύγχυση σχετικά με τον προσανατολισμό σε οικεία μέρη, βραδύτητα στην εκτέλεση απλών



δραστηριοτήτων και δυσκολία στη διαχείριση οικονομικών ζητημάτων. Ο ασθενής έχει έλλειψη αυθορμητισμού και λήψης πρωτοβουλιών και εμφανίζει εναλλαγές στη διάθεση και στην προσωπικότητα. Παράλληλα, χάνει πολύτιμα αντικείμενα ή τα τοποθετεί σε λάθος μέρη. Παρουσιάζει προβλήματα στην απόδοση και στην εργασία του καθώς και στις κοινωνικές εκδηλώσεις, που γίνονται αντιληπτά από τρίτους.

Στο επόμενο στάδιο, που καλείται μέτρια νόσος Alzheimer, η εκφύλιση των νευρώνων επεκτείνεται σε περιοχές που ελέγχουν το λόγο και τη λογική. Τα συμπτώματα επιδεινώνονται, καθώς η ατροφία συνεχίζει να εξαπλώνεται. Ο ασθενής μπορεί να έχει μία τάση να περιπλανιέται και εκνευρίζεται από τη ρουτίνα της καθημερινότητας. Ενδεικτικά συμπτώματα της μέτριας νόσου Alzheimer είναι η προοδευτική απώλεια της μνήμης, σύγχυση και αδυναμία αναγνώρισης φίλων και οικογένειας. Επιπλέον εμφανίζει γλωσσικές δυσκολίες, καθώς και δυσκολίες στην ανάγνωση, στη γραφή και στις απλές μαθηματικές πράξεις. Το άτομο μοιάζει σαν υποταγμένο και να έχει αποσυρθεί, ιδίως από κοινωνικές ή πνευματικά απαιτητικές καταστάσεις.

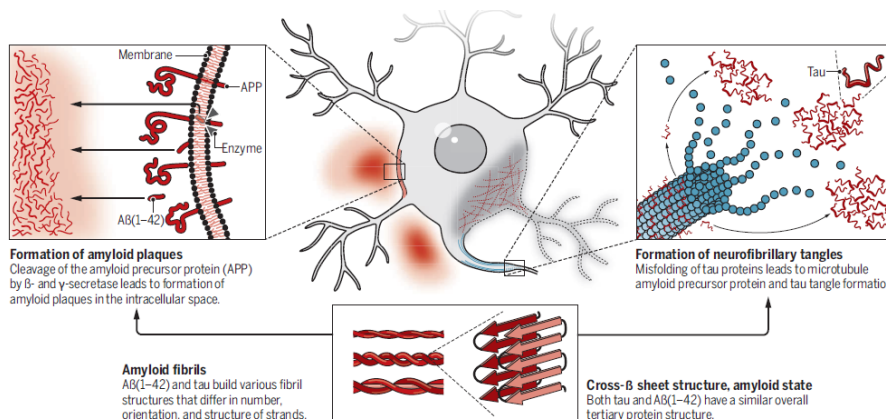
Στην πιο προχωρημένη φάση της νόσου παρατηρείται γενικευμένη ατροφία. Ο ασθενής εξαρτάται απολύτως από τους άλλους και δεν είναι σε θέση να αναγνωρίσει τα αγαπημένα του πρόσωπα. Επίσης, χάνει την ικανότητα να ανταποκρίνεται στο περιβάλλον του, την ικανότητα ομιλίας και ελέγχου των κινήσεων. Μπορεί να λέει κάποιες λέξεις ή φράσεις, αλλά είναι μη αναγνωρίσιμες. Χρειάζεται συνεχή φροντίδα για να φάει και γενικά έχει πλήρη ακράτεια. Πρώτα χάνεται η ικανότητα να περπατάει χωρίς βοήθεια, μετά να κάθεται, να χαμογελάει και να κρατάει όρθιο το κεφάλι του. Τα αντανακλαστικά γίνονται ανώμαλα, οι μύες γίνονται δύσκαμπτοι και υπάρχει διαταραχή στην κατάποση. Ο θάνατος επέρχεται συνέπεια πολλών αιτιών στο τελικό αυτό στάδιο. Η απώλεια νευρώνων διαταράσσει το αίσθημα της πείνας και της δίψας, οδηγώντας στις επιλοκές της αφυδάτωσης και της υποθρεψίας. Οι λοιμώξεις μπορεί να καταλήξουν σε σήψη. [13], [14], [15]



**Σχήμα 3:** Τα στάδια της νόσου Alzheimer. [15]

### 1.4 Τα παθολογικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της νόσου Alzheimer

Ο εγκέφαλος ασθενούς με Alzheimer χαρακτηρίζεται από δύο κύρια παθολογικά χαρακτηριστικά: τις εξωκυτταρικές αποθέσεις πρωτεϊνών (αμυλοειδείς πλάκες) και τις ενδοκυτταρικές αποθέσεις πρωτεϊνικής επίσης φύσεως που ονομάζονται νευροϊνώδη συσσωματώματα (neurofibrillary tangles, NFT), τα οποία συσσωρεύονται στον ιππόκαμπο, την αμυγδαλή και το νεοκρότεινο, περιοχές του εγκεφάλου κρίσιμες για τη μνήμη, τη σκέψη και τη συμπεριφορά. Πιο αναλυτικά (σχήμα 4), οι πλάκες αμυλοειδούς ή αλλιώς γεροντικές πλάκες αποτελούνται κυρίως από το β – αμυλοειδές πεπτίδιο. (amyloid β –peptide, Aβ), ενώ τα νευροϊνώδη συσσωματώματα αποτελούνται από υπερφωσφορυλιωμένη τ-πρωτεΐνη (tau protein). [16-19]



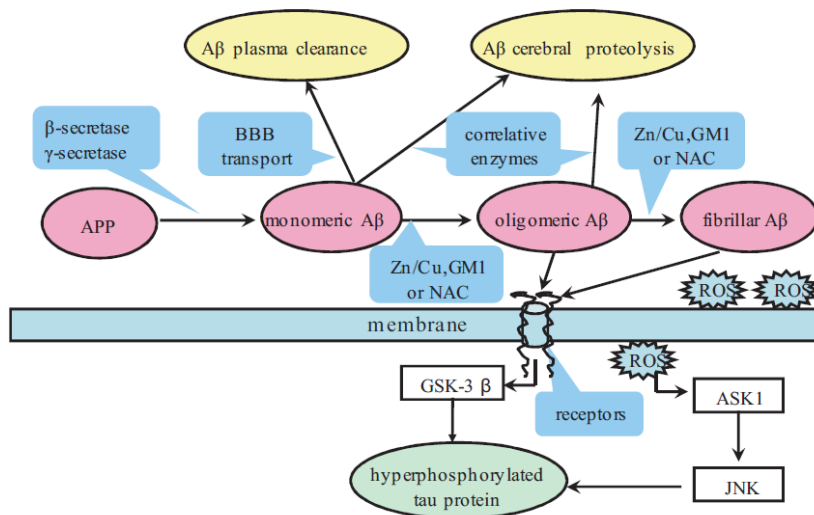
**Σχήμα 4:** Οι αμυλοειδείς πλάκες και τα νευροϊνώδη συσσωματώματα που συσσωρεύονται σε εγκέφαλο ασθενούς με Alzheimer αποτελούνται από διαφορετικά συστατικά αλλά παρόμοιες τριτοταγείς πρωτεϊνικές δομές. [19]

Τα αίτια που προκαλούν τα παραπάνω παθολογικά χαρακτηριστικά είναι ακόμα και σήμερα υπό διερεύνηση. Ταυτόχρονα, υπάρχει διαμάχη για το ποια συμβαίνουν πρώτα. Γενικά, η φυσιολογική γήρανση του εγκεφάλου μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό πλακών και δικτύων, ωστόσο στα άτομα που πάσχουν από Alzheimer τα χαρακτηριστικά αυτά αναπτύσσονται σε μεγαλύτερο ρυθμό και μάζα. Επιπλέον, είναι γενικά αποδεκτό ότι η νευροπαθολογία της νόσου εξελίσσεται αργά πριν από την κλινική διάγνωση, ενώ μια οριστική διάγνωση της ασθένειας γίνεται μόνο μετά το θάνατο. [20]

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν μετά το θάνατο σε άτομα χωρίς άνοια καθιστούν εμφανές ότι περίπου το 40% των ατόμων ηλικίας 65 ετών και άνω μπορεί να αποκτήσει Alzheimer. Επιπλέον, η ασθένεια απουσία άνοιας έχει βρεθεί σε εκπληκτικά νεαρές ηλικίες. Σε μια αξιολόγηση 2661 εγκεφάλων που ελήφθησαν από άτομα ηλικίας 25-95, βρέθηκαν πλάκες και ινίδια σε άτομα στη χαμηλότερη ηλικιακή ομάδα (κάτω των 30 ετών). Στην ηλικιακή κατηγορία 41-50, βρέθηκε ένα ποσοστό αμυλοειδούς παθολογίας σε περίπου 10% των ατόμων, ενώ στην αντίστοιχη 51-60, το ποσοστό ήταν πάνω από 15%. Η πλειονότητα αυτών των περιπτώσεων δεν θα ικανοποιούσε τα διαγνωστικά κριτήρια και η πιθανότητα τα ινίδια και οι πλάκες αποτελούν χαρακτηριστικό της καλοήθους γήρανσης δεν μπορούν να αποκλειστούν. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η παθολογία της νόσου φαίνεται να είναι μια συνεχής διαδικασία. [21]

Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις αιτίες που προκαλούν τη νόσο Alzheimer και έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις. Η πρώτη υπόθεση αναφέρεται σε γονιδιακή μετάλλαξη. Ειδικότερα, μεταλλάξεις ή πολυμορφισμός των γονιδίων της πρόδρομου αμυλοειδούς πρωτεΐνης (Amyloid-β protein precursor, APP), της πρεσενιλίνης 1/2 (presenilin 1/2, PS1/2) και της απολιποπρωτεΐνης E (APOE) προκαλούν συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, με αποτέλεσμα τον εκφυλισμό των νευρώνων. Στη συνέχεια, η δεύτερη υπόθεση αναφέρεται στο οξειδωτικό στρες και την πιθανή σχέση του με σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με το β-αμυλοειδές. Το β-αμυλοειδές πεπτίδιο και ιόντα χαλκού / ψευδαργύρου σχηματίζουν ένα σύμπλοκο Αβ-μετάλλου, το οποίο προάγει τον σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), όπως  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  και  $\bullet OH$ . Οι ROS οξειδώνουν τα νευρωνικά λιπίδια, τις πρωτεΐνες και οδηγούν στην οξειδωτική αποικοδόμηση του DNA. Η τρίτη υπόθεση σχετίζεται με τη μεταγωγή σήματος των υποδοχέων β-αμυλοειδούς. Το Αβ δεσμεύεται στους υποδοχείς της νευρωνικής μεμβράνης και αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες

οι οποίες ρυθμίζουν τη νευρωνική απόπτωση. Η τελευταία υπόθεση επικεντρώνεται στην υπερφωσφορυλιωμένη τ-πρωτεΐνη. Η διαταραχή της ομοιόστασης του  $Ca^{2+}$  προκαλεί υπερφωσφορυλίωση της τ-πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να χάνει την ικανότητα της να δεσμεύει μικροσωληνίσκους, προκαλώντας τελικά απόπτωση των νευρώνων. [22]



**Σχήμα 5:** Η σύνδεση του Aβ με την υπερφωσφορυλιωμένη τ-πρωτεΐνη στη νόσο Alzheimer. [22]

Τα παθολογικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν παραπάνω πιθανόν να συνδέονται μεταξύ τους (σχήμα 5). Η πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς διασπάται (προτεόλυση) στα Aβ και sAPP μονομερές από τις β- και γ-σεκρετάσες. Το μονομερές Aβ σχηματίζει ολιγομερή και ινίδια Aβ, τα οποία συσσωρεύονται στους νευρώνες και μπορούν να προκαλέσουν μεταγωγή σήματος, με αποτέλεσμα να υπερφωσφορυλιώνεται η τ-πρωτεΐνη. Η υπερφωσφορυλιωμένη τ-πρωτεΐνη χάνει την ικανότητα της να δεσμεύει μικροσωληνίσκους και στη συνέχεια οδηγεί στην απόπτωση των νευρώνων. [22]

### 1.5 β-αμυλοειδές πεπτίδιο

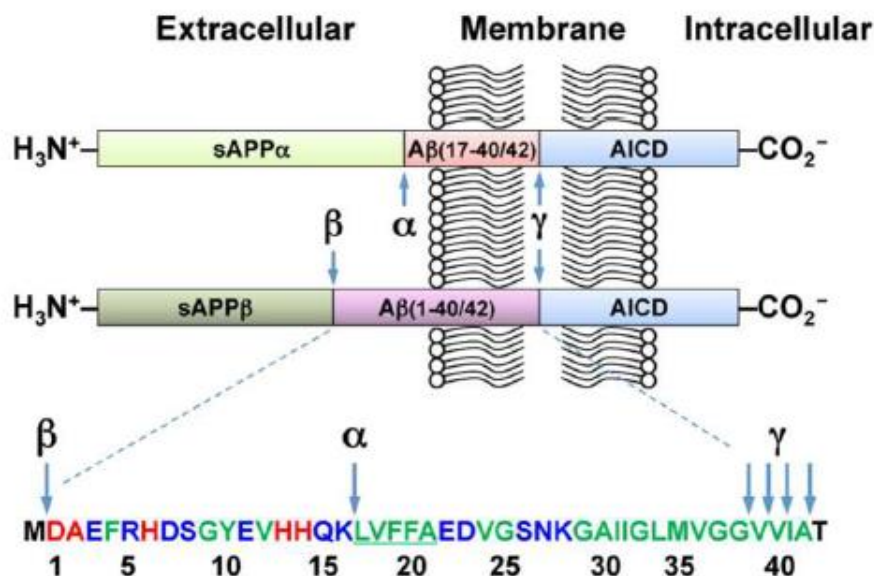
Οι αμυλοειδείς πλάκες είναι πλάκες πρωτεϊνικής φύσης που εντοπίζονται στον εξω-κυτταρικό χώρο και αφθονούν στον εγκέφαλο ασθενών με Alzheimer. Τα ινίδια αμυλοειδούς έχουν νηματοειδή δομή και διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου, με τυπική

διάμετρο περίπου ~10 nm και μήκος έως και μερικά μικρόμετρα. Σχηματίζονται από μια πληθώρα πεπτιδίων και πρωτεϊνών με διαφορετικές αλληλουχίες και μοριακά βάρη. Οι πλάκες αυτές ανάλογα με τη μορφολογία τους, διακρίνονται σε διάχυτες πλάκες ή πλάκες πυκνού πυρήνα. Οι τελευταίες έχουν ιώδη πυρήνα και συνδέονται με δυστροφικούς νευρίτες, μικρογλοία και δραστικά αστροκύτταρα. Οι διάχυτες πλάκες είναι άμορφες αποθέσεις του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, οι οποίες δεν έχουν πυρήνα. [23], [24], [25]

Η υπόθεση που αναφέρεται στις αμυλοειδείς πλάκες προτείνει τη συσσώρευση του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου. Οι αμυλοειδείς αποθέσεις αποτελούνται κυρίως από β-αμυλοειδές πεπτίδιο, όπου το Αβ (1-40) είναι η κυρίαρχη διαλυτή μορφή στα βιολογικά υγρά, ενώ το Αβ (1-42) είναι μια επίσης σημαντική μορφή που ανιχνεύθηκε ως συστατικό των αμυλοειδών πλακών. Οι αμυλοειδείς αποθέσεις στον εγκέφαλο ασθενούς που πάσχει από Alzheimer προέρχονται από μια μεγαλύτερη πρωτεΐνη, που λέγεται πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (Amyloid precursor protein, APP). Η πρωτεΐνη αυτή (APP) ανήκει στην πολυγονιδιακή οικογένεια που περιλαμβάνει τις αμυλοειδείς πρόδρομες πρωτεΐνες, όπως τις APLP1 και APLP2. [26]

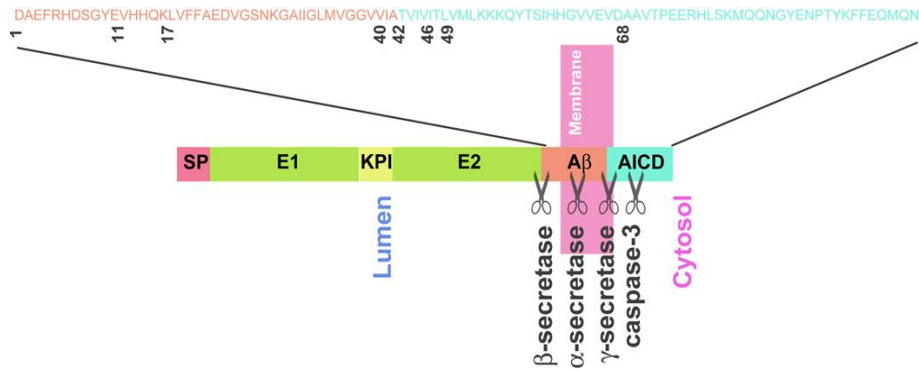
Η πρόδρομος πρωτεΐνη του αμυλοειδούς, από όπου προέρχεται το β-αμυλοειδές πεπτίδιο, είναι μια μεγάλη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 110 με 130 kDa. Το ανθρώπινο γονίδιο της APP βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 21 και περιέχει τουλάχιστον 18 εξόνια. Ο φυσιολογικός ρόλος της APP δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Η παρουσία της στον εγκέφαλο έχει συνδεθεί με τη συμμετοχή της σε μηχανισμούς νευροκυτταρικής επιδιόρθωσης βλαβών, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη «συναπτογένεση». Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση των κυττάρων σε υγιή κατάσταση.

Η APP εκφράζεται σε πολλά κύτταρα του σώματος και έχουν αναγνωρισθεί τρεις κυρίες ισομορφές της που αποτελούνται από 695 με 770 αμινοξέα. Τα κύρια APP γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι 695, 751 και 770 αμινοξέων (APP<sub>695</sub>, APP<sub>751</sub> και APP<sub>770</sub>). Αυτές οι ισομορφές εκφράζονται στους περισσότερους ιστούς. Η πιο χαρακτηριστική της ισομορφή που συναντάται συχνά στους νευρώνες, σε σχέση με τις άλλες δυο μορφές, είναι η APP<sub>695</sub>. Το N-τελικό άκρο βρίσκεται στην εξωκυτταρική περιοχή, ενώ το C-τελικό άκρο, που ονομάζεται ενδοκυτταρική περιοχή του APP, βρίσκεται εν μέρει στο κυτταρόπλασμα. [22], [27]



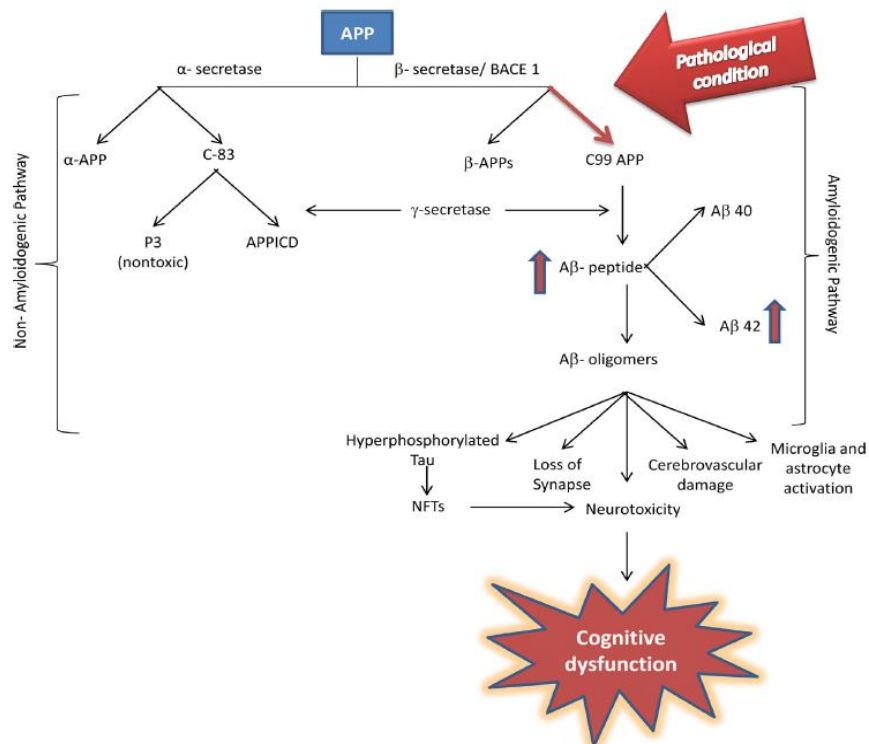
**Σχήμα 6:** Σχηματική απεικόνιση της APP και της διάσπασης της από τις  $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ -σεκρετάσες. [27]

Η APP υφίσταται μια μετα-μεταφραστική επεξεργασία, μέσω δύο κύριων μονοπατιών, στα οποία συμμετέχουν διάφορες σεκρετάσες και πρωτεάσες (σχήματα 6,7). Στο μη αμυλοειδογόνο μονοπάτι, η APP διασπάται διαδοχικά από την  $\alpha$ - και  $\gamma$ -σεκρετάση, απελευθερώνοντας μία μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή (sAPP- $\alpha$ ) και ένα θραύσμα συνδεδεμένο με τη μεμβράνη στο C-τελικό άκρο, το οποίο αποτελείται από 83 αμινοξέα. Στο αμυλοειδογόνο μονοπάτι, η APP διασπάται από τις  $\beta$ - και  $\gamma$ -σεκρετάσες, απελευθερώνοντας το sAPP- $\beta$  και ένα θραύσμα στο C-τελικό άκρο που αποτελείται από 99 αμινοξέα. Η διάσπαση αυτή απελευθερώνει  $\beta$ -αμυλοειδές πεπτίδιο, το οποίο συσσωματώνεται για να σχηματίσει πλάκες αμυλοειδούς στον εγκέφαλο. [22]



**Σχήμα 7:** Πρωτεολυτική διάσπαση της APP. [22]

Πολλές μελέτες δίνουν έμφαση στο ρόλο των ολιγομερών του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, καθώς τα τελευταία επηρεάζουν τις συνάψεις και εν τέλει την λειτουργία του εγκεφάλου. Σύμφωνα με την υπόθεση του αμυλοειδούς καταρράκτη (σχήμα 8), η APP διασπάται κανονικά από την α-σεκρετάση, ενώ σε μη ελεγχόμενο βαθμό από την β- και γ-σεκρετάση. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στη συσσωμάτωση των διαλυτών ολιγομερών, σχηματίζοντας αδιάλυτα ινίδια με διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου και τελικά στη δημιουργία των γεροντικών πλακών. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα ολιγομερή Aβ (1-42) προάγουν το οξειδωτικό στρες και την υπερφωσφορυλίωση της τ-πρωτεΐνης. [28]



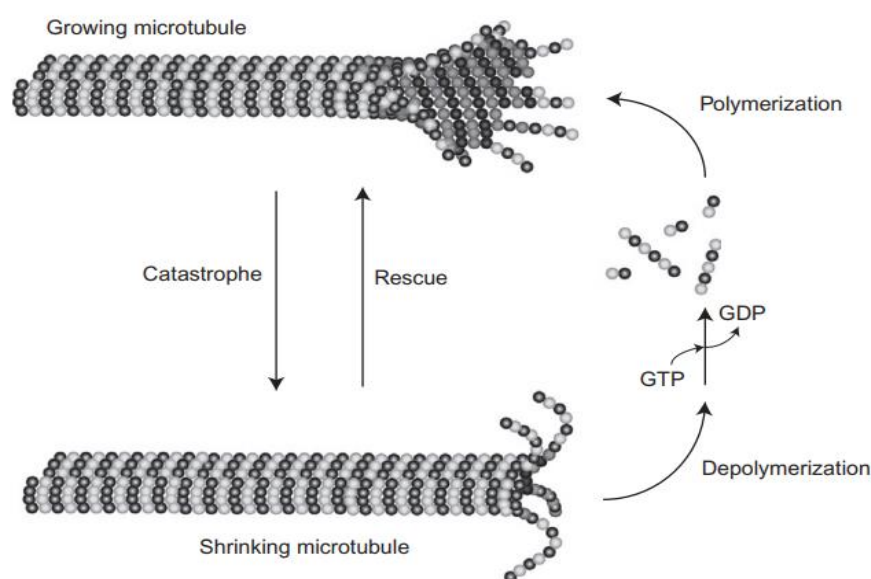
**Σχήμα 8:** Διαγραμματική απεικόνιση του αμυλοειδούς καταρράκτη. [28]

## Κεφάλαιο 2

### 2.1 τ-πρωτεΐνη

Η τ-πρωτεΐνη (tubulin-associated unit, tau) ανακαλύφθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1970, μελετώντας παράγοντες απαραίτητους για το σχηματισμό μικροσωληνίσκων. Ανήκει στην ομάδα των MAP (microtubule-associated protein), δηλαδή των πρωτεϊνών συνδεδεμένων με τους μικροσωληνίσκους, που αφθονούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Η τ-πρωτεΐνη προωθεί τη συναρμολόγηση της τουμπουλίνης σε μικροσωληνίσκους, μια από τις σημαντικότερες συνιστώσες του νευρωνικού κυτταροσκελετού που καθορίζει τη φυσιολογική μορφολογία και παρέχει διαρθρωτική στήριξη στους νευρώνες. Η δέσμευση της τουμπουλίνης ρυθμίζεται από την κατάσταση φωσφορυλίωσης της τ-πρωτεΐνης, η οποία με τη σειρά της ρυθμίζεται από τη συντονισμένη δράση κινασών και φωσφατασών. [29]

Οι μικροσωληνίσκοι συμβάλλουν στην αξοπλασμική μεταφορά, μια απαραίτητη κυτταρική διαδικασία. Οι περισσότερες αξονικές πρωτεΐνες συντίθενται στο νευροσύστημα και μεταφέρονται στις νευρικές απολήξεις μέσω του κυτταροσκελετού. Η αξονική μεταφορά συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια ζωής ενός νευρώνα και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την επιβίωση του. Στους νευρώνες ασθενών με Alzheimer πιστεύεται ότι η αξονική μεταφορά διακόπτεται, εμποδίζοντας τα κυστίδια να φθάσουν στις συνάψεις, με αποτέλεσμα το νευρωνικό εκφυλισμό (σχήμα 9). [30], [31]

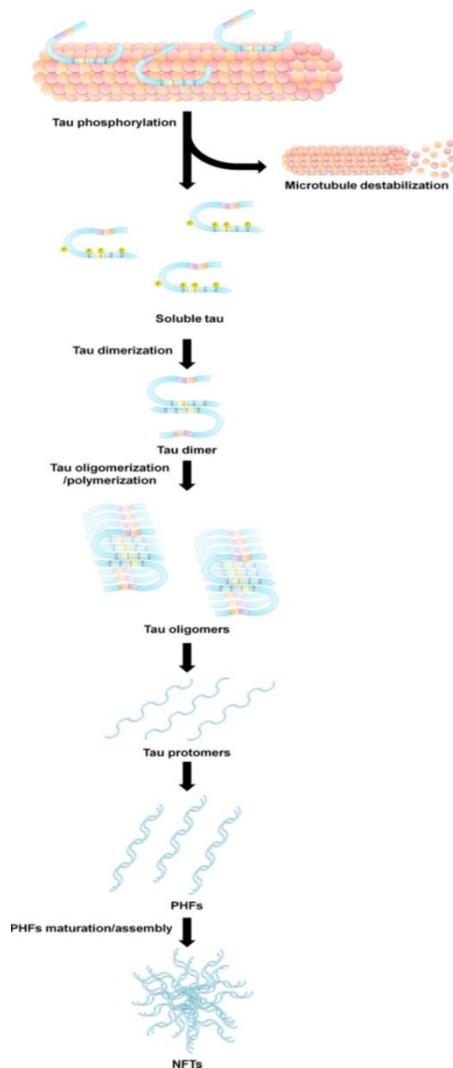


**Σχήμα 9:** Δυναμική αστάθειας των μικροσωληνίσκων. [31]



Μεγαλύτερη προσοχή δόθηκε στην τ-πρωτεΐνη, όταν διαπιστώθηκε ότι είναι το συστατικό των ταξινομημένων κατά ζεύγη ελικοειδών ινιδίων (paired helical filaments, PHFs), τα οποία σχηματίζουν τα νευροϊνώδη συσσωματώματα (neurofibrillary tangles, NFT), που εντοπίζονται στον εγκέφαλο ασθενών που πάσχουν από Alzheimer. Σε παθολογικές καταστάσεις παρατηρείται μεταβολή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών μέσω της φωσφορυλίωσης και αδυναμία της φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης να συνδεθεί με τους μικροσωληνίσκους, σχηματίζοντας ινιδιακά συσσωματώματα. Οι παράγοντες αυτοί οδηγούν σε δυσλειτουργίες των μικροσωληνίσκων, με αποτέλεσμα το νευρωνικό εκφυλισμό.

Τα PHF συσσωματώνονται καθώς η σύνδεση της τ-πρωτεΐνης με τους μικροσωληνίσκους εξασθενεί και η τ-πρωτεΐνη απελευθερώνεται με μια διαλυτή μορφή. Στη συνέχεια, η διαλυτή tau υφίσταται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που άμεσα ή έμμεσα μεταβάλλουν τη διαμόρφωση της, προωθώντας τον διμερισμό με έναν αντιπαράλληλο τρόπο. Τα σταθερά διμερή tau σχηματίζουν tau-ολιγομερή, τα οποία συνεχίζουν τη διαδικασία συσσωμάτωσης και αποτελούν υπομονάδες νηματίων, που ονομάζονται πρωτόμετρα (σχήμα 10). Δύο πρωτόμετρα το ένα γύρω από το άλλο σχηματίζουν PHFs και τα PHF συσσωματώματα δημιουργούν τα NFTs [32].



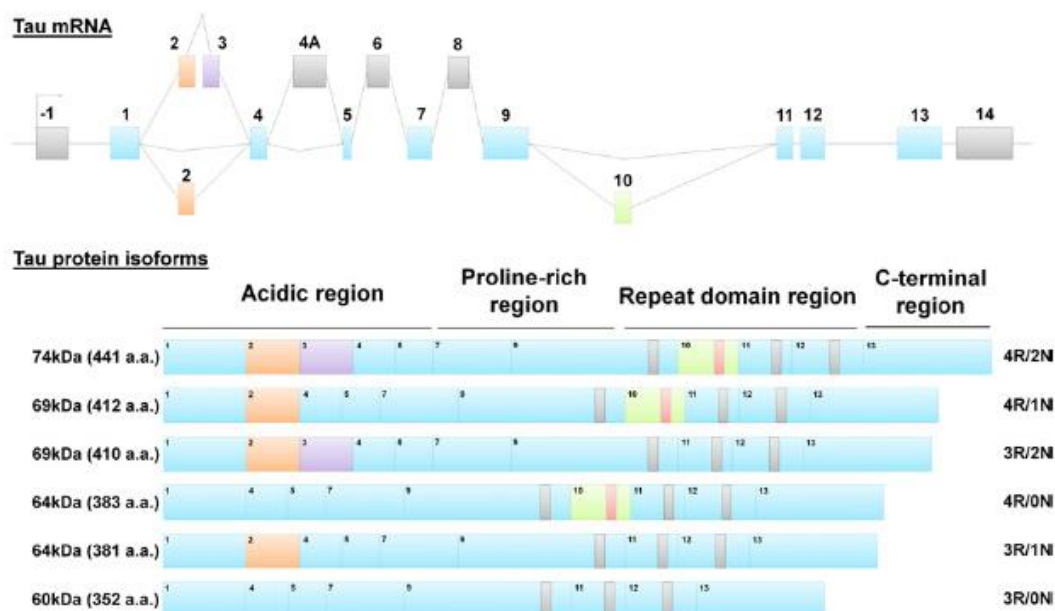
**Σχήμα 10:** Διαδικασία συσσωμάτωσης τ-πρωτεΐνης. Αρχικά, εξασθενεί η δέσμευση της τ-πρωτεΐνης με τους μικροσωληνίσκους, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτής μορφής (μονομερές). Στη συνέχεια, τα μονομερή σχηματίζουν διμερή τ-πρωτεΐνης που συναρμολογούνται σε ολιγομερή. Τα ολιγομερή οργανώνονται σε πρωτόμετρα που με τη σειρά τους συγκεντρώνονται σχηματίζοντας τα PHFs. Το τελικό βήμα είναι η τελική συσσωμάτωση των PHFs, σχηματίζοντας NFTs. [32]

## 2.2 Δομή της τ-πρωτεΐνης

Η τ-πρωτεΐνη ταυτοποιήθηκε το 1975. Πρόκειται μια εξαιρετικά διαλυτή κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, που συνδέεται με μικροσωληνίσκους και βρίσκεται αποκλειστικά σε ευκαρυώτες. Η τ-πρωτεΐνη δεν έχει σταθερή τριτοταγή δομή, με αποτέλεσμα να μην γίνονται κατανοητές οι αλλαγές της διαμόρφωσής της. Εκφράζεται κυρίως σε νευρώνες και ο πρωταρχικός της ρόλος, μέσω της αλληλεπίδρασης με τους

μικροσωληνίσκους, είναι η σταθεροποίηση του νευρωνικού κυτταροσκελετού. [32], [33], [34]

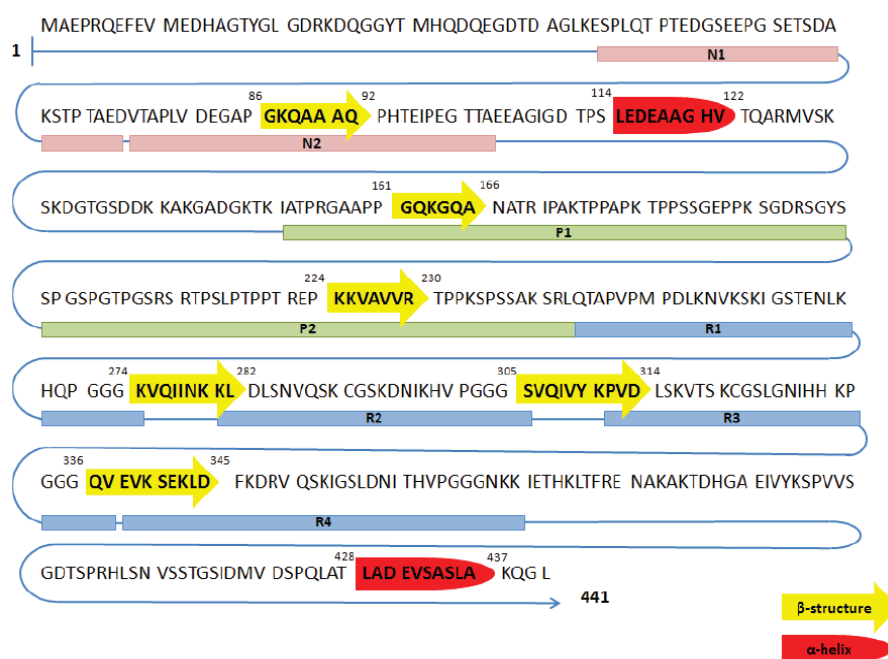
Η τ-πρωτεΐνη κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο που βρίσκεται στο 17q21.3 στον άνθρωπο και περιέχει 16 εξόνια (σχήμα 11). Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τα εξόνια 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 και 13 μεταγράφονται συνεχώς. Τα εξόνια 4A, 6 και 8 μεταγράφονται μόνο στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Το εξόνιο -1 και 14 μεταγράφεται αλλά παράγει ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού που παρεμποδίζει τη μετάφραση. Μόνο τα εξόνια 2, 3 και 10 υποβάλλονται σε εναλλακτικό μάτισμα, και το εξόνιο 3 δεν εμφανίζεται ποτέ απουσία του εξονίου 2. Έτσι, το εναλλακτικό μάτισμα αυτών των τριών εξονίων της τ-πρωτεΐνης παράγει έξι ισομορφές 352-441 αμινοξέων με μοριακό βάρος μεταξύ 60 και 74 kDa.[29], [32], [35]



**Σχήμα 11:** *Tau mRNA και πρωτεϊνικές δομές. Το γονίδιο της tau περιλαμβάνει 16 εξόνια. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τα εξόνια 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 και 13 (με μπλε) μεταγράφονται συνεχώς, ενώ δε συμβαίνει το ίδιο για τα εξόνια -1, 4A, 6, 8 και 14 (με γκρι). Τα εξόνια 2 (με πορτοκαλί), 3 (με μοβ) και 10 (με πράσινο χρώμα) υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα. Αυτή η σύνδεση δημιουργεί έξι ισομορφές tau 352-441 αμινοξέων με μοριακό βάρος μεταξύ 60 και 74 kDa. [32]*

Η τ-πρωτεΐνη υποδιαιρείται σε τέσσερις περιοχές: (Α) μία όξινη περιοχή στο N-τελικό άκρο που κωδικοποιείται από τα εξόνια 1-5, (Β) μία πλούσια σε προλίνη περιοχή που κωδικοποιείται από το εξόνιο 7 και το πρώτο μισό του εξονίου 9, (Γ) μία περιοχή υπεύθυνη για την πρόσδεση της τ-πρωτεΐνης στους μικροσωληνίσκους που

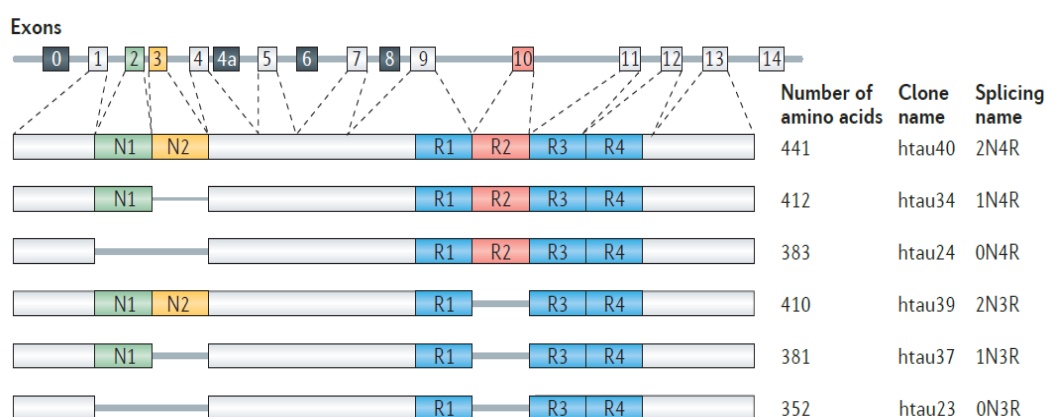
κωδικοποιείται από τα εξόνια 9-12 και περιέχει τέσσερις επαναλαμβανόμενες περιοχές R1, R2, R3 και R4 επίσης αποκαλούμενες περιοχές σύνδεσης των μικροσωληνίσκων (microtubule-binding domains, MBD) και (Δ) το C-τελικό άκρο που κωδικοποιείται από το εξόνιο 13. Η αλληλουχία της μεγαλύτερης tau ισομορφής φαίνεται στο σχήμα 12. [36]



**Σχήμα 12:** Αλληλουχία της μεγαλύτερης tau ισομορφής και πιθανή δευτεροταγής δομή στο κεντρικό νευρικό σύστημα. [36]

Ανάλογα με την παρουσία ή την απουσία του εξονίου 10, οι ισομορφές της τ-πρωτεΐνης ονομάζονται 4R (με το εξόνιο 10) ή 3R (χωρίς το εξόνιο 10). Οι ισομορφές της τ-πρωτεΐνης χωρίς N-τελικό άκρο ονομάζονται 0N, 1N (με ένα N-τελικό άκρο που κωδικοποιείται από το εξόνιο 2) ή 2N (με δύο N-τελικά άκρα που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 2 και 3). Προκύπτουν έξι συνδυασμοί που αντιστοιχούν στις έξι tau ισομορφές: 4R / 2N, 4R / 1N, 3R / 2N, 4R / 0N, 3R / 1N και 3R / 0N (Σχήμα 13). Στον ανθρώπινο εγκέφαλο ενός ενήλικα, οι αλληλουχίες της 3R και 4R περιοχής εμφανίζονται περίπου ίσες φορές, ενώ η ισομορφή 2N εμφανίζεται λιγότερο σε σχέση με τις άλλες ισομορφές. Ειδικότερα, οι ισομορφές 0N, 1N και 2N της τ-πρωτεΐνης παρατηρούνται σε ποσοστό ~ 37%, ~ 54% και ~ 9%, αντίστοιχα. Κάθε περιοχή επανάληψης περιέχει την αλληλουχία KxGS (x: Pe ή Cys), της οποίας το κατάλοιπο σερίνης μπορεί να φωσφορυλιωθεί. Η φωσφορυλίωση της σερίνης στην αλληλουχία

αυτή, που ανήκει στην περιοχή σύνδεσης των μικροσωληνίσκων (MBD), εξασθενεί τη δέσμευση της τ-πρωτεΐνης με τους μικροσωληνίσκους, με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του νευρωνικού κυτταροσκελετού. Η αποσταθεροποίηση του κυτταροσκελετού είναι γνωστό ότι επιδρά στις κυτταρικές λειτουργίες, όπως την αξονική ανάπτυξη, τη μεταφορά κυστιδίων και οργανιδίων καθώς και τη μετάδοση του νευρικού σήματος κατά μήκος του νευρωνικού δικτύου που σχηματίζεται από τους μικροσωληνίσκους. [29], [32], [35]-[40]

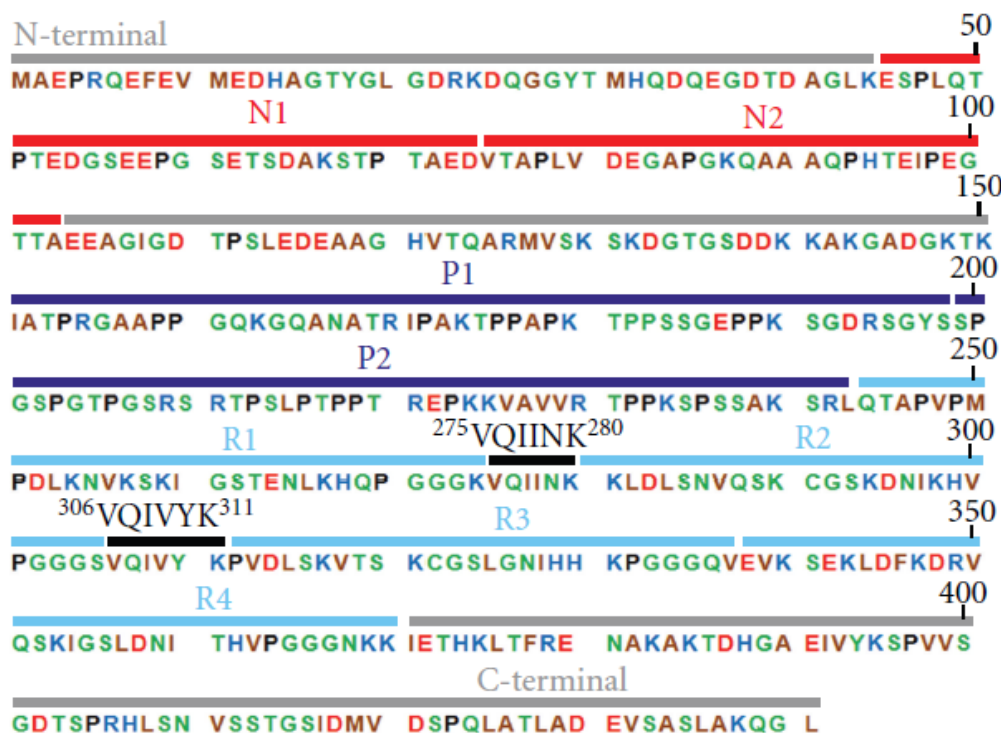


**Σχήμα 13:** Το ανθρώπινο γονίδιο της τ-πρωτεΐνης και οι ισομορφές που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα στον ανθρώπινο εγκέφαλο. [40]

Η τ-πρωτεΐνη είναι μια ασυνήθιστα υδρόφιλη πρωτεΐνη (και έτσι εξαιρετικά υδατοδιαλυτή). Είναι επίσης σταθερή σε όξινες συνθήκες και υψηλές θερμοκρασίες. Το τμήμα της τ-πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους μπορεί να υποδιαιρεθεί σε δυο κύριες περιοχές: τη C-τελική και τη N-τελική περιοχή. Το πλούσιο σε προλίνη τμήμα συνδέει τις δύο περιοχές και περιέχει 7 αλληλουχίες τύπου -PXXP- που χρησιμεύουν ως θέσεις δέσμευσης για πρωτεΐνες σηματοδότησης.

Η μεγαλύτερη ισομορφή της (2N4R) (σχήμα 14) περιέχει 80 κατάλοιπα Ser ή Thr, 56 αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα Asp ή Glu, 58 θετικά φορτισμένα κατάλοιπα Lys ή Arg και 8 αρωματικά κατάλοιπα (5 Tyr και 3 Phe), αλλά όχι Trp. Στο σύνολο της, η τ-πρωτεΐνη είναι βασική. Ωστόσο, αποτελείται από 120 αμινοξέα στο N-τελικό άκρο που είναι κυρίως όξινα και 40 κατάλοιπα στο C-τελικό άκρο που είναι περίπου ουδέτερα. Αυτή η ασυμμετρία επηρεάζει τους μικροσωληνίσκους, όσον αφορά την εσωτερική αναδίπλωση τους και τη συσσωμάτωση της τ-πρωτεΐνης. Η μεσαία περιοχή

της πρωτεΐνης (αμινοξέα 150-240) περιέχει ένα μεγάλο αριθμό καταλοίπων προλίνης με αλληλουχία SP ή TP. [39], [40]



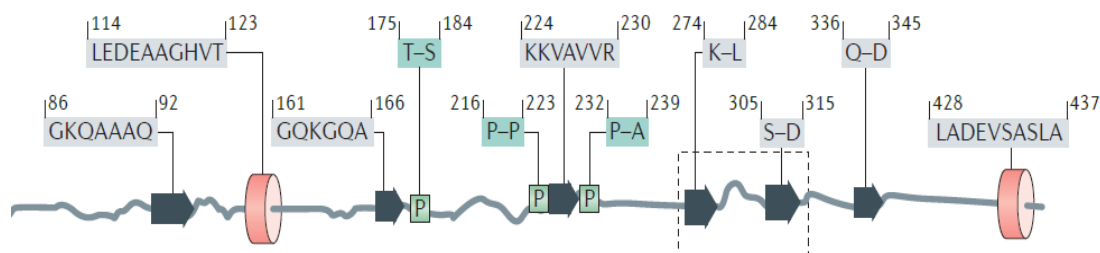
- X = Basic AA (+)
- X = Polar uncharged AA (hydrophilic)
- X = Nonpolar AA (hydrophobic)
- X = Acidic AA (-)

**Σχήμα 14:** Αλληλουχία αμινοξέων της μεγαλύτερης ισομορφής της τ-πρωτεΐνης (441 αμινοξέα). N1 και N2 : οι πολυπεπτιδικές αλληλουχίες που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 2 και 3. P1 και P2 : πλούσια σε προλίνη περιοχές. R1 - R4: θέσεις μικροσωληναριακής δέσμησης που κωδικοποιούνται από εξόνια 9-12. <sup>275</sup>VQIINK<sup>280</sup> και <sup>306</sup>VQIVYK<sup>311</sup> : αλληλουχίες με διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου. [29]

Μελέτες αποκάλυψαν ότι η ταυ είναι μια μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη (Intrinsically disordered protein, IDP), εξαιρετικά ευέλικτη και με μεταβλητή διαμόρφωση. Ωστόσο, η έλλειψη σταθερής δευτεροταγούς δομής, έχει ως αποτέλεσμα τη δυσκολία επίλυσης της δομής της με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Έτσι, μόνο η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι η μόνη αξιόπιστη μέθοδος ανάλυσής της.

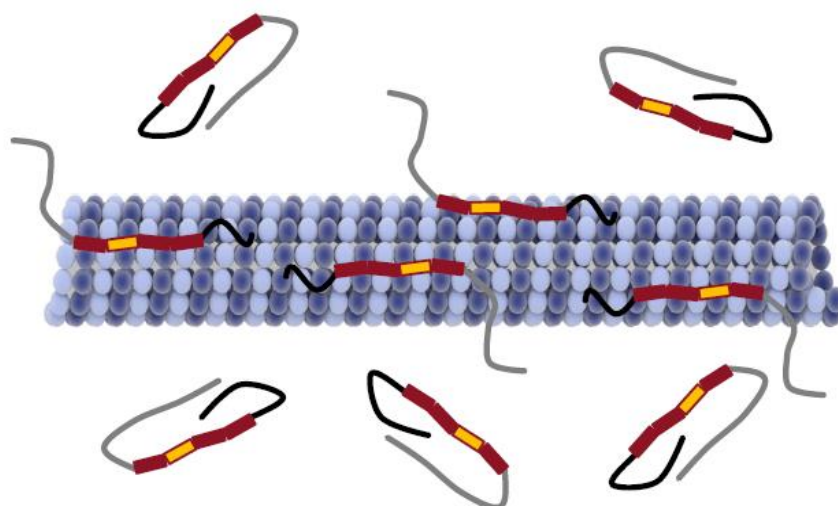
Η δομή της ταυ σύμφωνα με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού περιγράφεται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 15). Στην πλειοψηφία της φαίνεται να είναι μία μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη (γκρι γραμμή). Κατά μήκος της

πολυπεπτιδικής αλυσίδας υπάρχουν μικρές αλληλουχίες με δευτεροταγή δομή όπως α-έλικας (ροζ κύλινδοι) και β-πτυχωτού φύλλου (μαύρα βέλη). Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι υπάρχει μια περιοχή που περιέχει δύο εξαπεπτίδια (διακεκομμένες γραμμές) που συμβάλλουν στη συσσωμάτωση της τ- πρωτεΐνης (VQIVYK στο R2 και VQIINK στο R3). Η δομή β-πτυχωτού φύλλου προωθεί το σχηματισμό ολιγομερών, τα οποία με τη σειρά τους σχηματίζουν τα ελικοειδή ινίδια (PHF). [40], [41], [42]



**Σχήμα 15:** Δομή της ταυ σύμφωνα με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. [40]

Επιπλέον, δεδομένα που συλλέχθηκαν και από άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές (κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, φασματοσκοπία υπερύθρου, κυκλικός διχρωσμός, φασματοσκοπία φθορισμού) είναι συμβατά με αναδίπλωση της τ- πρωτεΐνης σε συγκεκριμένες περιοχές. Πράγματι, υποστηρίζεται ότι η τ- πρωτεΐνη υιοθετεί δομή ‘συνδετήρα’. Πιο αναλυτικά, όταν η τ- πρωτεΐνη βρίσκεται ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα, το C-τελικό άκρο έρχεται σε επαφή με το N-τελικό άκρο. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η σύνδεση των δύο άκρων εξασθενεί, όταν η τ- πρωτεΐνη δεσμεύεται στους μικροσωληνίσκους, αφού τα δύο άκρα απομακρύνονται και το N-τελικό άκρο προεξέχει από την επιφάνεια των μικροσωληνίσκων (σχήμα 16). [15]



**Σχήμα 16:** Σύνδεση της τ-πρωτεΐνης με τους μικροσωληνίσκους [15]

### 2.3 Λειτουργικές περιοχές

Οι ισομορφές της τ-πρωτεΐνης που συναντώνται στο κεντρικό νευρικό σύστημα περιέχουν δύο βασικές λειτουργικές περιοχές: Α) την περιοχή προβολής (projection domain), η οποία καταλαμβάνει τα δύο-τρίτα της πρωτεΐνης και περιλαμβάνει το Ν-τελικό άκρο και Β) την περιοχή σύνδεσης στους μικροσωληνίσκους (microtubule binding domain, MTB), η οποία καταλαμβάνει το υπόλοιπο ένα-τρίτο, και περιλαμβάνει το C-τελικό άκρο. Τόσο η περιοχή προβολής, όσο και η περιοχή σύνδεσης παίζουν σημαντικό ρόλο, αφού είναι υπεύθυνες για την επαφή της πρωτεΐνης με τους μικροσωληνίσκους.

#### Α) Περιοχή προβολής (projection domain)

Το Ν – τελικό άκρο αναφέρεται ως τμήμα προβολής, αφού προεξέχει από την επιφάνεια των μικροσωληνίσκων, με αποτέλεσμα να μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλα στοιχεία του κυτταροσκελετού και της νευρωνικής μεμβράνης. Στην πραγματικότητα, τα πεδία προβολής της πρωτεΐνης καθορίζουν την απόσταση μεταξύ των μικροσωληνίσκων στον νευράξονα. Περιφερικοί νευρώνες συχνά προβάλλουν ένα πολύ μακρύ άξονα με μεγάλη διάμετρο. Αυτό το είδος νευρώνων περιέχουν μια επιπλέον Ν – τελική αλληλουχία τ-πρωτεΐνης, η οποία κωδικοποιείται από το εξόνιο 4Α, και έτσι δημιουργείται μια ειδική ισομορφή που ονομάζεται ‘big tau’.

#### Β) Περιοχή σύνδεσης στους μικροσωληνίσκους (microtubule binding domain)

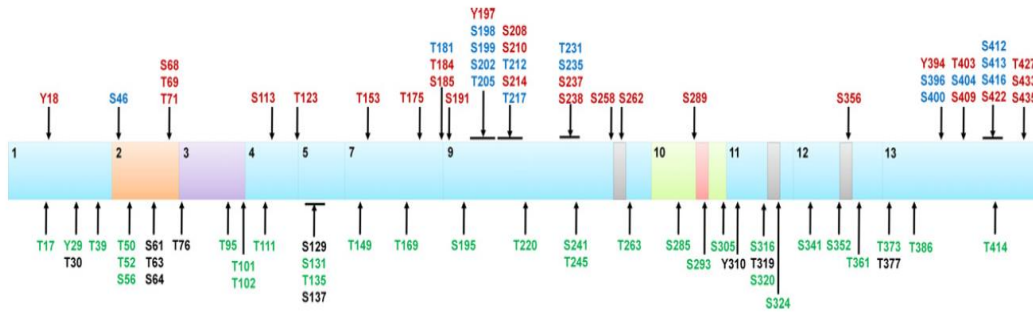


Η τ-πρωτεΐνη δεσμεύεται στους μικροσωληνίσκους μέσω των επαναλαμβανόμενων περιοχών R1-R4, οι οποίες εντοπίζονται στο C – τελικό άκρο του μορίου. Κάθε επανάληψη αποτελείται από τμήματα 18 αμινοξικών κατάλοιπων, και διαχωρίζονται μεταξύ τους από 13 – 14 αμινοξικά κατάλοιπα. In vitro μελέτες, υποδεικνύουν ότι η τ-πρωτεΐνη αυξάνει την ταχύτητα πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων και ταυτόχρονα αναστέλλει το ρυθμό αποπολυμερισμού. Οι επαναλήψεις των 18 αμινοξέων δεσμεύονται στους μικροσωληνίσκους μέσω μιας σειράς συγκεκριμένων περιοχών. Η τ-πρωτεΐνη των ενηλίκων προωθεί τη δημιουργία μικροσωληνίσκων πιο ενεργών από την εμβρυική μορφή. [29]

#### 2.4 Η φωσφορυλίωση της τ-πρωτεΐνης

Η φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης είναι η προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας με εστεροποίηση σε τρία διαφορετικά αμινοξέα: σερίνη (S), θρεονίνη (T) και τυροσίνη (Y). Η φωσφορυλίωση είναι η πιο συνηθισμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της τ-πρωτεΐνης και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της φυσιολογικής της λειτουργίας, συμπεριλαμβάνοντας τη δέσμευση στους μικροσωληνίσκους και επομένως τη σταθεροποίηση και τη συναρμολόγηση των τελευταίων. Για τη βέλτιστη λειτουργία της τ-πρωτεΐνης απαιτείται ένα φυσιολογικό επίπεδο φωσφορυλίωσης, ενώ η υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη χάνει τη βιολογική της δραστηριότητα.

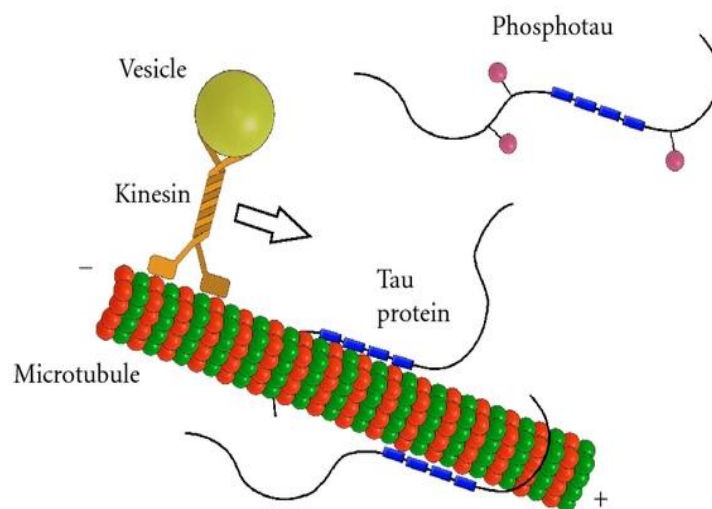
Μεταξύ των 85 πιθανών θέσεων φωσφορυλίωσης της τ-πρωτεΐνης (σχήμα 17), 45 είναι σερίνες (53%), 35 είναι θρεονίνες (41%) και μόνο 5 είναι τυροσίνες (6%). Οι περισσότερες από αυτές τις πιθανές περιοχές βρίσκονται στην πλούσια σε προλίνη περιοχή, καθώς και στο C – τελικό άκρο του μορίου της πρωτεΐνης, με εξαίρεση τη Ser262, Ser293, Ser324 και Ser356. Η φωσφορυλίωση της τ-πρωτεΐνης στη S262, S293, S324 και S356, που βρίσκονται αντίστοιχα στην αλληλουχία KxGS των περιοχών R1, R2, R3 και R4, έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε εξασθένιση της σύνδεσης της τ-πρωτεΐνης στους μικροσωληνίσκους. Επίσης, η φωσφορυλίωση της τ-πρωτεΐνης στα κατάλοιπα T231, S235 και S262 συμβάλλει στην αποδέσμευσή της από τους μικροσωληνίσκους κατά 26%, 9% και 33% αντίστοιχα. [32]



**Σχήμα 17:** Θέσεις φωσφορυλίωσης της τ-πρωτεΐνης σε εγκέφαλο με Alzheimer (με κόκκινο χρώμα), στον υγιή εγκέφαλο (με πράσινο χρώμα) και εκείνες που υπάρχουν τόσο σε υγιή όσο και σε πάσχον εγκέφαλο (με μπλε χρώμα), στη μεγαλύτερη ται ισομορφή. Πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης που δεν έχουν ακόμη αποδειχθεί να φωσφορυλιώνονται *in vitro* ή *in vivo* (με μαύρο χρώμα).[32]

Η τ-πρωτεΐνη που απομονώθηκε από εγκέφαλο ενός υγιή ενήλικα περιέχει κατά μέσο όρο 3 mol φωσφορικά / mol tau. Ωστόσο, ο εγκέφαλος ασθενούς με Alzheimer, που αποτελείται από υπερφωσφορυλιωμένη tau, περιέχει 8 mol φωσφορικά / mol tau. [30] Η φωσφορυλίωση της τ-πρωτεΐνης ρυθμίζεται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της εμβρυικής και νεογνικής ηλικίας. Έχει παρατηρηθεί ότι η εμβρυική tau είναι φωσφορυλιωμένη σε μεγάλο ποσοστό, όπως αντίστοιχα και στους ασθενείς που πάσχουν από Alzheimer. [43]

Η κατάσταση φωσφορυλίωσης μιας πρωτεΐνης ρυθμίζεται κανονικά από τη συντονισμένη δράση κινασών-φωσφατασών. Αλλαγή στην κατάσταση φωσφορυλίωσης της τ-πρωτεΐνης, ενδεικτική διαταραχής του παραπάνω συντονισμού επηρεάζει τη βιολογική λειτουργία και τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης (σχήμα 18). [29]



**Σχήμα 18:** Η φυσιολογική λειτουργία της τ-πρωτεΐνης . Η τ-πρωτεΐνη σταθεροποιεί τους μικροσωληνίσκους μέσω των τεσσάρων περιοχών σύνδεσης (μπλε κουτιά) στην περίπτωση της μεγαλύτερης tau ισομορφής. Η σύνδεση της τ-πρωτεΐνης στους μικροσωληνίσκους διατηρείται σε ισορροπία με συντονισμένες δράσεις κινασών και φωσφατασών. Η φωσφορυλίωση της τ-πρωτεΐνης (ροζ μπάλες) ρυθμίζει τη ικανότητα της να δεσμεύεται με τους μικροσωληνίσκους. [29]

## 2.5 Παθολογία – tau

Η παθολογία – tau χαρακτηρίζεται από την παρουσία υπερφωσφορυλιωμένης τ-πρωτεΐνης, η οποία χάνει την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους. Η μη φυσιολογική φωσφορυλίωση (υπερφωσφορυλίωση), η ακετυλίωση, η γλυκοζυλίωση, η ουβικιτινίωση, η νίτρωση, η πρωτεολυτική διάσπαση και άλλες τροποποιήσεις, φαίνεται ότι επηρεάζουν τη φυσιολογική λειτουργία της τ-πρωτεΐνης. Στη νόσο Alzheimer, το αυξημένο ποσοστό φωσφορυλίωσης είναι αποτέλεσμα είτε αυξημένης δραστηριότητας των κινασών, είτε μειωμένης δραστηριότητας των φωσφατασών. Οι κινάσες που πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη φωσφορυλίωση της τ-πρωτεΐνης στον εγκέφαλο είναι η GSK-3β (glycogen-synthase kinase-3β), η Cdk5 (cyclin-dependent protein kinase 5), η PKA (cAMP-dependent protein kinase) και η MARK (microtubule affinity regulating kinase). Στον πίνακα που ακολουθεί (σχήμα 19) απεικονίζονται οι θέσεις φωσφορυλίωσης της τ-πρωτεΐνης από διάφορες κινάσες. [44]-[49]

Groups	Enzyme	Phosphorylation sites	
AGC	PKA	Ser-195 Ser-198 Ser-199 Ser-202 Thr-205 Thr-212 Ser-214 Thr-217 Thr-231 Ser-235 Ser-258 Ser-262 Ser-324 Ser-356 Ser-409 Ser-412 Ser-413 Ser-416 Ser-422 Ser-435	
	PKB/Akt	Thr-212 Ser-214	
	PKC	Ser-258 Ser-293 Ser-324 Ser-352	
	PKN	Ser-214 Ser-258 Ser-320 Ser-352	
	RSK	Thr-212 Ser-214	
	MSK1	Ser-214 Ser-262 Ser-305	
	SGK1	Ser-214	
	p70S6K	Thr-212 Ser-214 Ser-262	
	ROCK	Thr-245 Ser-262 Thr-377 Ser-409	
	p110 kinase	Ser-262	
CAMK	CaMK II	Ser-214 Thr-217 Thr-231 Ser-235 Ser-262 Ser-396 Ser-404	
	AMPK	Thr-231 Ser-262 Ser-396 Ser-404	
	BRSK	Ser-262	
	MARK	Ser-262 Ser-320 Ser-324 Ser-356	
		Thr-17 Thr-95 Ser-113 Ser-131 Thr-149 Thr-169 Ser-184 Ser-198 Ser-208 Ser-214 Ser-237 Ser-238	
CK1	CK1	Ser-241 Ser-258 Ser-262 Thr-263 Ser-285 Ser-289 Ser-305 Ser-341 Ser-352 Ser-356 Thr-361 Thr-373	
		Thr-386 Ser-412 Ser-416 Ser-433 Ser-435	
	TTBK 1/2	Ser-198 Ser-199 Ser-202 Ser-208 Ser-210 Ser-422	
CMGC	CDK5	Thr-181 Ser-199 Ser-202 Thr-205 Thr-212 Ser-214 Thr-217 Thr-231 Ser-235 Ser-396 Ser-404	
	ERK1/2	Ser-46 Thr-50 Thr-153 Thr-181 Ser-199 Ser-202 Thr-205 Thr-212 Thr-217 Ser-235 Ser-396 Ser-404 Ser-422	
	JNK	Thr-181 Ser-199 Ser-202 Thr-205 Thr-212 Thr-217 Ser-396 Ser-404 Ser-422	
	CDC2	Thr-153 Ser-202 Thr-205 Thr-212 Thr-231 Ser-235 Ser-404	
	GSK-3β	Ser-46 Thr-50 Thr-181 Ser-184 Ser-199 Ser-202 Thr-205 Thr-212 Ser-214 Thr-217 Thr-231	
	DYRK1A	Thr181 Ser-199 Ser-202 Thr205 Thr212 Thr217 Thr231 Ser-396 Ser-400 Ser-404 Ser-422	
	SAPK	Thr50 Thr69 Thr153 Thr-181 Ser-199 Ser202 Thr205 Thr-212 Thr-217 Ser235 Ser-396 Ser404 Ser422	
	Other	CK2	Thr-39 Ser-199 Ser-396 Ser-400

**Σχήμα 19:** Θέσεις φωσφορυλίωσης της τ-πρωτεΐνης από διάφορες κινάσες. [49]

## Κεφάλαιο 3

### 3.1 Βιοχημικός ρόλος ιόντων Cu(II)

Ο χαλκός είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς βοηθά στην εκτέλεση διαφόρων βιολογικών λειτουργιών, όπως π.χ. στην απορρόφηση του σιδήρου, στη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης και στην ενεργοποίηση των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας. Συμβάλλει στη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος, ενώ συμμετέχει στον σχηματισμό και στη συντήρηση της μυελίνης. Στα βιολογικά συστήματα, ο χαλκός αποτελεί μέρος των ενεργών κέντρων πρωτεϊνών ή ενζύμων. Οι διάφοροι τρόποι με τους οποίους ο χαλκός συνδέεται στα ενεργά αυτά κέντρα έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Ο χαλκός είναι ένα οξειδοαναγωγικά ενεργό μέταλλο μετάπτωσης και οι δύο κύριες οξειδωτικές καταστάσεις που εμφανίζεται είναι η +2 και η +1. Ο τρόπος ένταξης του με ένζυμα/πρωτεΐνες πραγματοποιείται με τη βοήθεια κατάλληλων ατόμων δοτών N, O, ή S των αμινοξικών καταλοίπων ιστιδίνης (ιμιδαζόλιο), ασπαρτικού/γλουταμικού, κυστεΐνης/μεθειονίνης, αντίστοιχα. Αν και η αντίδραση οξειδοαναγωγής (Cu(II)/Cu(I)) είναι θεμελιώδους σημασίας για τη βιολογική δραστηριότητα ενός μεγάλου αριθμού ενζύμων, μπορεί να γίνει εξαιρετικά επικίνδυνη αν δεν ρυθμίζεται με ακρίβεια. Για τους λόγους αυτούς, τα ιόντα χαλκού δεν μπορούν να κυκλοφορήσουν ελεύθερα. [50], [51]

Ο χαλκός λαμβάνεται συνήθως μέσω της διατροφής, καθώς εμπεριέχεται σε διάφορα τρόφιμα. Ιδιαίτερα περιεκτικά σε χαλκό είναι τα θαλασσινά, τα ψάρια, το κρέας και συγκεκριμένα το συκώτι, οι ξηροί καρποί, τα φασόλια, τα μανιτάρια και τα δημητριακά. Παράλληλα, σημαντική περιεκτικότητα σε χαλκό, μπορεί να έχει και το πόσιμο νερό που περνάει μέσα από χάλκινες σωληνώσεις. Ωστόσο, το πόσιμο νερό δε συμβάλλει σημαντικά στην πρόσληψη χαλκού. Η συγκέντρωση του ελεύθερου ιόντος χαλκού έχει εκτιμηθεί  $10^{-18}$ - $10^{-13}$  M σε κύτταρα ζυμομυκήτων και στο πλάσμα ανθρώπινου αίματος, αντίστοιχα. Καθημερινά προσλαμβάνονται 2 - 5 mg/24h, ενώ η συνολική ποσότητα του χαλκού στον οργανισμό είναι περίπου 80 - 120 mg. [52], [53]

Στον υγιή ενήλικο εγκέφαλο του ανθρώπου, η περιεκτικότητα σε χαλκό (περίπου 7,3% του συνολικού σωματικού χαλκού) είναι συγκρίσιμη με αυτή του ήπατος (περίπου 9%), το κεντρικό όργανο ομοιόστασης του χαλκού. Ο εγκέφαλος

περιλαμβάνει το 2% της συνολικής μάζας σώματος, αλλά παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό οξειδωτικού μεταβολισμού, καταναλώνοντας περίπου το 20% του συνολικού οξυγόνου του σώματος. Παραδόξως, ο εγκέφαλος είναι προικισμένος με δυσανάλογα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικής δράσης, γεγονός που τον καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτο στο οξειδωτικό στρες. Ως εκ τούτου, η αυστηρή ρύθμιση της μεταφοράς χαλκού στον εγκέφαλο είναι απαραίτητη για την ακεραιότητα της υγείας των νευρώνων. Για το λόγο αυτό, η συγκέντρωση του ελεύθερου χαλκού στο εσωτερικό του κυττάρου διατηρείται σε υπερβολικά χαμηλά επίπεδα. [54]

### 3.2 Ο πιθανός ρόλος ιόντων Cu(II) στη νόσο Alzheimer

Οι εκφυλιστικές εγκεφαλικές διαταραχές έχουν πολλούς παράγοντες προέλευσης, τόσο γενετικούς όσο και περιβαλλοντικούς. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι διαταραχή στην ομοιόσταση του μετάλλου μπορεί να προκαλέσει και να επιταχύνει το νευροεκφυλισμό. Παρά το μεγάλο πλήθος εργασιών σχετικά με το ρόλο των μετάλλων σε αυτόν, δεν έχει αποδειχθεί ακόμη αν η διαταραχή της ομοιόστασης είναι επιβαρυντικός παράγοντας ή απλώς η συνέπεια της νευροεκφυλιστικής εξέλιξης. Ωστόσο, αυτή η διαταραχή είναι κοινή σε διαφορετικά είδη νευροεκφυλιστικών διαταραχών, γεγονός που υποδηλώνει μια πολύ στενή και πιθανώς αποκλειστική σχέση. [55]

Έρευνες έχουν αποκαλύψει ότι ο χαλκός και ο ψευδάργυρος σχετίζονται με τις αποθέσεις του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Aβ) στις γεροντικές πλάκες και ότι οι συγκεντρώσεις τους παρουσιάζονται σημαντικά αυξημένες στη νόσο Alzheimer. Συγκεκριμένα στις πλάκες αμυλοειδούς εγκεφάλου ασθενών έχει βρεθεί υψηλή συγκέντρωση χαλκού και ψευδαργύρου ( $25,0 \pm 7,8$  και  $69,0 \pm 18,4$   $\mu\text{g} / \text{g}$  αντίστοιχα). Επιπλέον, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (cerebrospinal fluid, CSF) ασθενών που πάσχουν από Alzheimer και Parkinson, η συγκέντρωση του χαλκού και του ψευδαργύρου είναι σχεδόν δύο ή τρεις φορές υψηλότερη από τα επίπεδα ελέγχου (10,2 και 5,3  $\text{ng} / \text{g}$  για τον χαλκό και τον ψευδάργυρο αντίστοιχα). Παράλληλα, παρατηρείται και συσσώρευση σιδήρου σε περιοχές του εγκεφάλου που συνδέονται με τις ασθένειες Parkinson και Alzheimer [51,56]. Ως εκ τούτου, ένας σημαντικός αριθμός ερευνών έχει εστιαστεί στη διαλεύκανση της χημείας ένταξης των Cu(II) και Zn(II) με το Aβ.

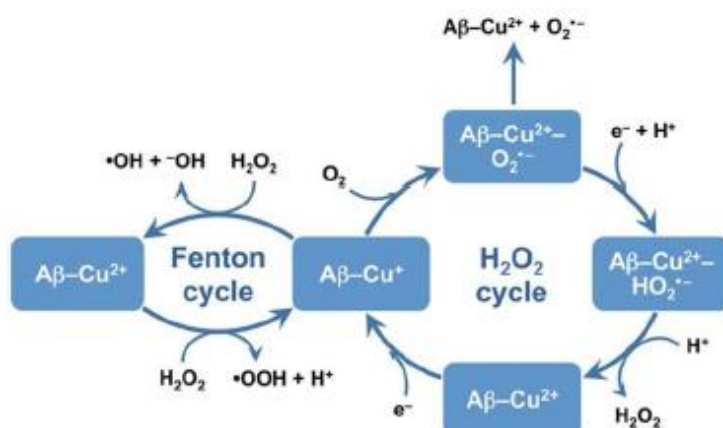
Η διαταραχή της ομοιόστασης του Cu(II) στον εγκέφαλο πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της νόσου Alzheimer. Όπως και για τα υπόλοιπα μεταλλικά ιόντα, τα εξω- και ενδοκυτταρικά επίπεδα του χαλκού διατηρούνται εντός ορίων, με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών δέσμευσης. Η ρύθμιση της συγκέντρωσης του Cu (II) εντός φυσιολογικών ορίων είναι πολύ σημαντική καθώς δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι είναι οξειδοαναγωγικά δραστικός και μπορεί να καταλύει την ενεργοποίηση του O<sub>2</sub> δημιουργώντας δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), όπως OH•, O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>. Αυτοί οι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες εμπλέκονται σε ποικίλες οξειδωτικές βλάβες που περιλαμβάνουν υπεροξείδωση λιπιδίων, οξείδωση DNA, οξείδωση των πρωτεϊνών και προχωρημένη γλυκοζυλίωση τελικών προϊόντων (advanced glycation end-products, AGEs). [57]

Πράγματι το αυξημένο οξειδωτικό στρες, το οποίο συνδέεται με τη φυσιολογική γήρανση, επιδεινώνεται σε νευροεκφυλιστικές διαταραχές όπως η νόσος Alzheimer και η νόσος Parkinson. Το οξειδωτικό στρες αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός στην εξέλιξη της νόσου Alzheimer και το οποίο προάγεται εν μέρει από την παθολογική αύξηση των αλληλεπιδράσεων Cu(II) με το Αβ, οι οποίες με τη σειρά τους διευκολύνουν την παραγωγή ROS. Το οξειδωτικό στρες αναπτύσσεται υπό συνθήκες δυσομοιόστασης, όπου η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί από τους διαθέσιμους κυτταρικούς αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς. [57]

Στο σχήμα 20 παρουσιάζονται οι πιθανές οδοί σχηματισμού δραστικών μορφών οξυγόνου παρουσία των συμπλόκων Αβ-Cu<sup>2+/1+</sup>. Η ανηγμένη μορφή Αβ-Cu<sup>+</sup> είναι βιολογικά προσβάσιμη σε εξωκυτταρικά αναγωγικά όπως το ασκορβικό ή η γλουταθειόνη. Πειράματα in vitro υπέδειξαν ότι το σύστημα Αβ-Cu<sup>2+/1+</sup> μπορεί να δράσει καταλυτικά όσον αφορά την παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και τη συμμετοχή του σε αντιδράσεις τύπου Fenton, οι οποίες οδηγούν σε παραγωγή ελεύθερων ριζών υδροξυλίου χρησιμοποιώντας το ασκορβικό ως αναγωγικό.

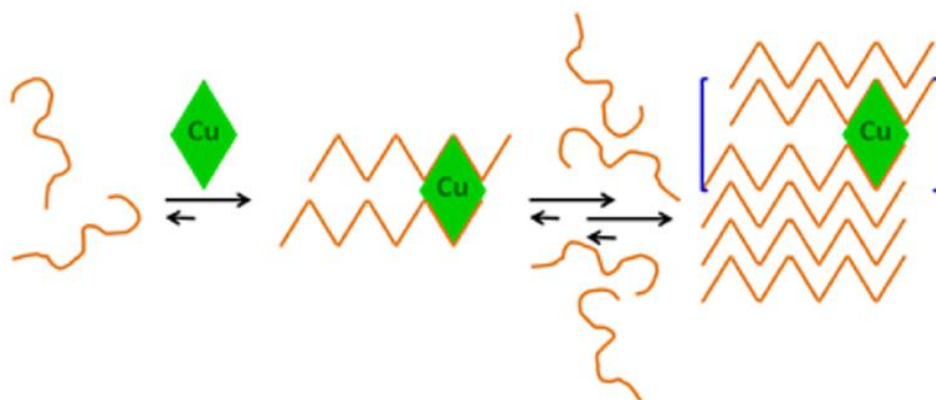
Αμέσως μετά την αναγωγή του Αβ-Cu<sup>2+</sup> σε Αβ-Cu<sup>+</sup> υπάρχει η δυνατότητα δυο οδών συνέχισης της αντίδρασης. Ο πρώτος κύκλος (καταλυτικός ως προς το σύμπλοκο Αβ-Cu<sup>2+</sup>) ή κύκλος H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> περιλαμβάνει τη δέσμευση O<sub>2</sub>, την αναγωγή του (ελεύθερη ρίζα σουπεροξειδίου) με μεταφορά e<sup>-</sup> από το ιόν Cu<sup>+</sup> και τελικά το σχηματισμό H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μέσω πρωτονίωσης, με ενδιάμεσο μια υδροξυ-υπερόξο ρίζα. Για την αναγέννηση του Αβ-Cu<sup>+</sup> χρησιμοποιούνται ποσοτικά εξωγενή αναγωγικά με αποτέλεσμα να καθίσταται διπλά καταστροφικός για τα κύτταρα. Παράλληλα πραγματοποιείται και ο κύκλος Fenton κατά τον οποίο δεσμεύεται το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από το σύμπλοκο Αβ-Cu<sup>+</sup> (αντί του O<sub>2</sub>)

προς παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου. Ο τελευταίος ενοείται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων  $H_2O_2$  (που παράγεται όπως προαναφέρθηκε) ή/και χαμηλής συγκέντρωσης  $O_2$ . [57]



**Σχήμα 20:** Μηχανιστικές οδοί παραγωγής ROS παρουσία του  $A\beta-Cu^{2+,1+}$  [57]

Μια άλλη παρατήρηση αφορά τη δυνατότητα σχηματισμού συσσωματωμάτων  $A\beta$  πεπτιδίου, όταν τα ιόντα  $Cu(II)$  αντιδρούν (εντάσσονται) με το πρώτο με παράλληλο σχηματισμό ROS. Οι παράγοντες που επιδρούν στη μορφολογία των συσσωματωμάτων περιλαμβάνουν το pH, τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, την αναλογία μετάλλου - πρωτεΐνης, τη θερμοκρασία, το ρυθμό ανάδευσης κλπ. Εντυπωσιακό είναι και το γεγονός ότι ακόμα και σε υποστοιχειομετρικές ποσότητες τα ιόντα  $Cu(II)$  μπορούν να σχηματίσουν μικροϊνίδια του συμπλόκου  $Cu(II)-A\beta$  τα οποία δρουν ως πυρήνες συσσωμάτωσης του ελεύθερου  $A\beta$  πεπτιδίου. Βέβαια όπως αποδείχθηκε τα σχηματιζόμενα συσσωματώματα είναι ασταθή. (σχήμα 21)

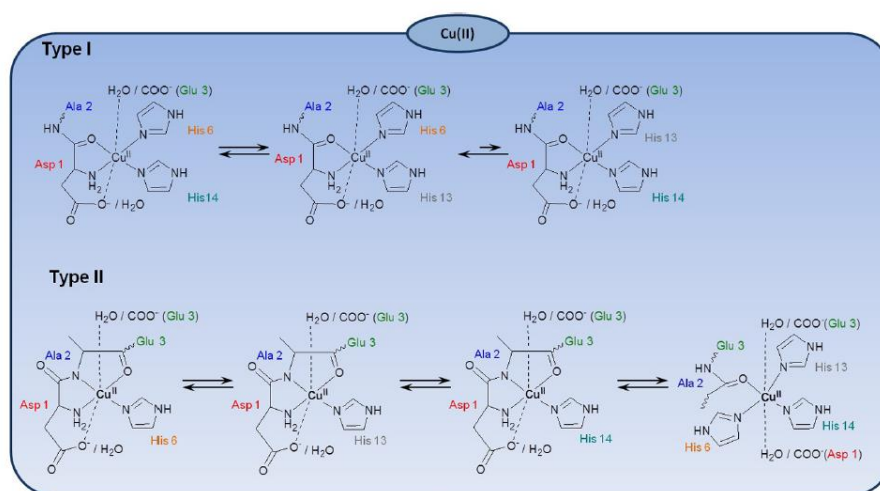


**Σχήμα 21:** Μηχανισμός σχηματισμού συσσωματωμάτων  $A\beta$  παρουσία  $Cu(II)$  [57]



Μέχρι στιγμής, είναι σχετικά σαφές ότι τα ιόντα Cu(II) συνδέονται ταχύτατα με μονομερή Αβ. Έτσι, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η συσσωμάτωση ξεκινά με ένα μονομερές σύμπλοκο Cu(II) – Αβ. Από την άλλη, η παρουσία His είναι απαραίτητη καθώς παρατηρήθηκε ότι το τροποποιημένο Αβ40 πεπτιδίο (που δεν περιείχε ιστιδίνη) δεν συσσωματώνεται παρουσία Zn(II), Cu(II) ή Fe(II).

Όσον αφορά το τρόπο ένταξης του Cu(II) με το Αβ πεπτιδίο (σχήμα 22) έχουν προταθεί δύο κύριοι τύποι σε φυσιολογικές τιμές pH (pH 7.4). Ο πρώτος και κυριότερος περιλαμβάνει την N- τελική αμινομάδα (Asp<sup>1</sup>), την καρβοξυλική ομάδα του Asp<sup>1</sup> και δύο κατάλοιπα ιστιδίνης (ιμιδαζόλιο) (His<sup>13</sup>, His<sup>14</sup> ή His<sup>6</sup>), ενώ ο δεύτερος την N-τελική αμινομάδα του Asp<sup>1</sup>, το αμιδικό NH (Ala<sup>2</sup>), την ομάδα C=O του αμιδίου της Ala<sup>2</sup> και μία ιστιδίνη (His<sup>13</sup>, His<sup>14</sup> ή His<sup>6</sup>). Επιπλέον υποκαταστάτες, όπως η καρβοξυλική ομάδα ή ένα μόριο νερού μπορούν να δεσμευτούν στην αξονική θέση. Οι παραπάνω τρόποι ένταξης είναι pH-εξαρτώμενοι. Με τη βοήθεια φασματοσκοπίας EPR διαπιστώθηκε ότι το 80% των συμπλόκων Cu (II) υιοθετούν τον πρώτο τρόπο ένταξης, ενώ σε λίγο υψηλότερη τιμή (pH 7.8) ανιχνεύθηκαν σύμπλοκα στα οποία ο Cu(II) εντάσσεται και με τον δεύτερο τρόπο (αναλογία 1<sup>ου</sup> : 2<sup>ου</sup> τρόπου 1:1) [27].



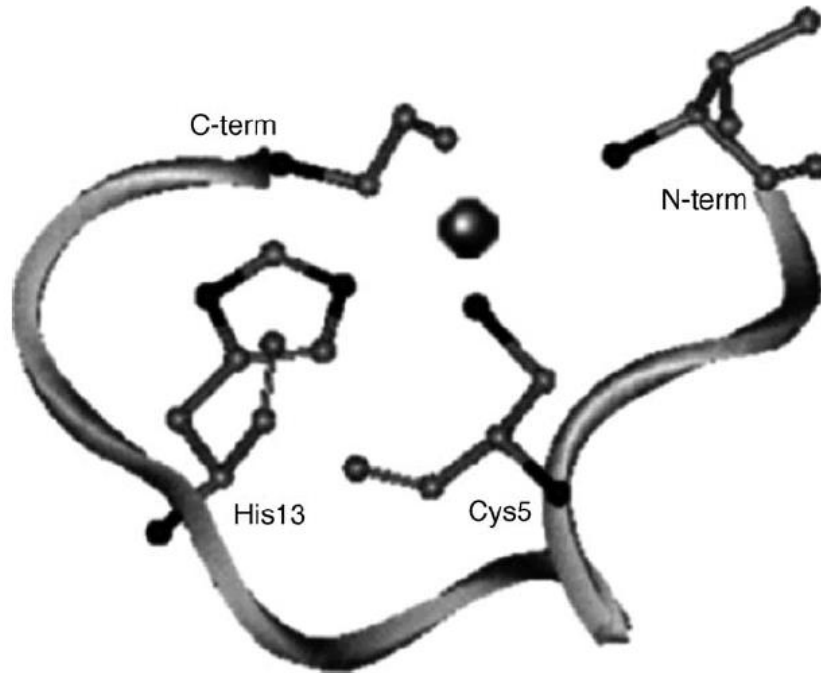
**Σχήμα 22:** Τρόποι ένταξης του Cu(II) με το πεπτιδίο Αβ [27]

Οι μελέτες αλληλεπίδρασης Cu(II) με την τ-πρωτεΐνη ή τη φωσφορυλιωμένη τ-πρωτεΐνη και τμήματά τους (tau/ptau) είναι λιγότερες σε σχέση με αυτές για το β-αμυλοειδές πεπτιδίο. Ο Cu(II) εντάσσεται σε θραύσματα της tau που περιέχουν διαφορετικές επαναλήψεις της περιοχής δέσμευσης των μικροσωληνίσκων και έχουν ταυτοποιηθεί με φασματομετρία μαζών, κυκλικό διχρωισμό και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. [27]

Μελέτες *in vitro* υποστηρίζουν ότι η τ-πρωτεΐνη είναι ικανή να συνδεθεί με το χαλκό παρόμοια με το β-αμυλοειδές πεπτιδίο και να συμβάλλει στο οξειδωτικό στρες. Πραγματοποιήθηκε σύνθεση πεπτιδίων, τα οποία αντιστοιχούν στην πρώτη, δεύτερη και τρίτη περιοχή επανάληψης μικροσωληνίσκων και μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή τους με το ιόν Cu(II) σε κατάλληλο pH και στοιχειομετρία. Ο Cu(II) συνδέεται με τη δεύτερη και την τρίτη περιοχή επανάληψης μικροσωληνίσκων προκαλώντας το σχηματισμό δομής α-έλικας, η οποία προάγει τη συσσωμάτωση των πεπτιδίων. Εν τούτοις, το πεπτιδίο που περιέχει μόνο την πρώτη περιοχή επανάληψης δεν συσσωματώνεται παρουσία Cu(II), πράγμα που υποδηλώνει ότι αυτή η περιοχή επανάληψης πιθανόν να ρυθμίζει τη συσσωμάτωση της τ-πρωτεΐνης *in vivo*. [54]

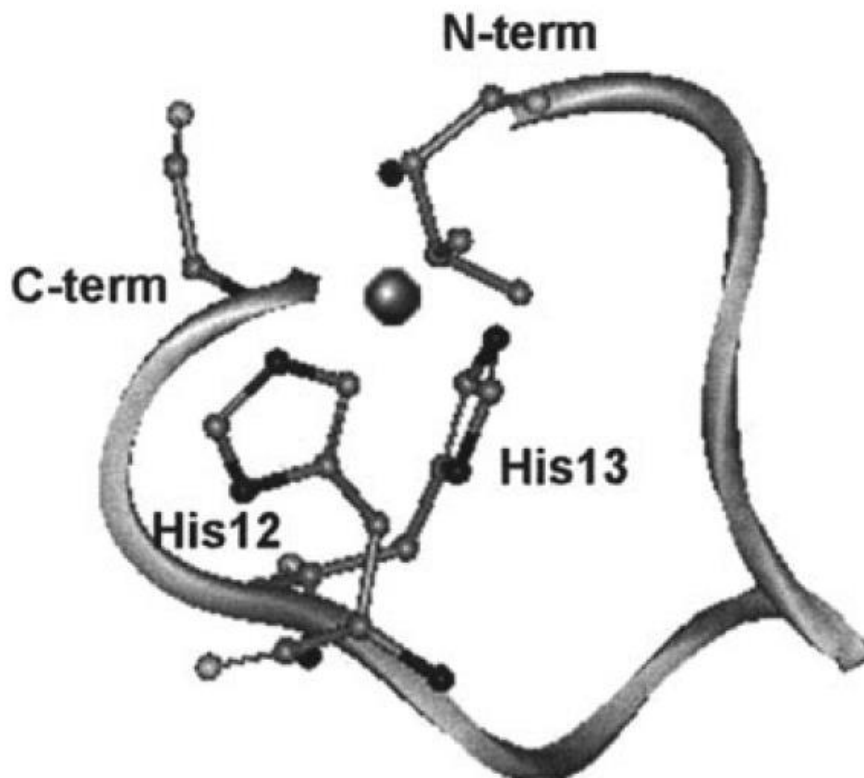
Σύμφωνα με μία άλλη έρευνα [58], η His268, της πρώτης περιοχής επανάληψης R1, είναι το πιο σημαντικό αμινοξικό κατάλοιπο για την ένταξη του Cu(II). Πιο συγκεκριμένα, τα ιόντα Cu(II) εντάσσονται μέσω του αζώτου (N3) του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης σε ήπια όξινες συνθήκες, μεταβάλλοντας τη δευτεροταγή δομή του πεπτιδίου. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από φασματοσκοπικά δεδομένα, τα οποία αποδεικνύουν την αλληλεπίδραση του χαλκού μέσω της His268, χωρίς τη συμμετοχή του C- και N-τελικού άκρου στη σφαίρα ένταξης του μεταλλικού ιόντος. Σε αντίθεση με τα αναμενόμενα αποτελέσματα, τα πειράματα αποκάλυψαν ότι η παρουσία του Cu(II) στο πεπτιδίο R1 δε συμβάλλει στη συσσωμάτωση, αλλά μάλλον την αναστέλλει. [58]

Όσον αφορά τη δεύτερη επανάληψη της περιοχής δέσμευσης των μικροσωληνίσκων ο Cu(II) εντάσσεται (σχήμα 23) στο ιμιδαζολικό άτομο αζώτου της His299 και στην Cys291 σε υψηλές τιμές pH (pH 6,5 και πάνω). Επιπλέον, είναι σαφές ότι η γεωμετρία μεταβάλλεται καθώς αυξάνεται το pH, ενώ οι φασματοσκοπικές παράμετροι υποδεικνύουν στοιχειομετρία 2:1 για την ένταξη του χαλκού με το πεπτιδίο (pH > 7.5). Παράλληλα, παρητηρήθηκε ότι το πεπτιδίο R2 υιοθετεί δομή α-έλικας και μπορεί να οδηγήσει στη συσσωμάτωση του και το σχηματισμό ινιδίων *in vitro*. [58],[59]



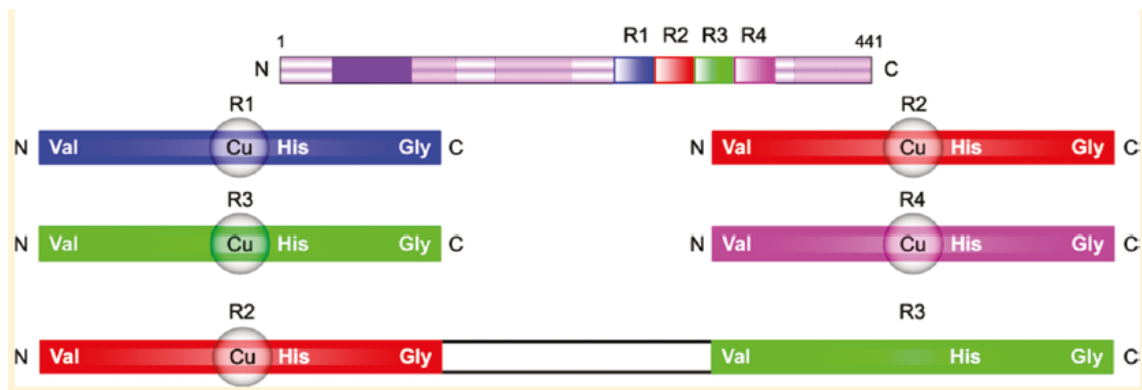
**Σχήμα 23:** Μοντέλο ένταξης του Cu (II) στο πεπτίδιο R2. Ο χαλκός εντάσσεται στους υποκαταστάτες μέσω της καρβοξυλικής ομάδας του C - τελικού άκρου, την αμινομάδα του N-τελικού άκρου, το ιμιδαζόλιο της His και την Cys, με επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Απεικονίζεται η κύρια ένταξη παρουσία 1 ισοδ. Cu (II) σε pH 7.5. [59]

Στην τρίτη επανάληψη, R3, ο χαλκός εντάσσεται μέσω δυο καταλοίπων ιστοιδίνης. Η φασματοσκοπική μελέτη έδειξε ότι το πεπτίδιο R3 υιοθετεί δομή β – πτυχωτού φύλλου μετά την προσθήκη 1 ισοδυναμού Cu(II). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το πεπτίδιο αυτό μπορεί να σχηματίσει συσσωματώματα και ινίδια στις πρωτεΐνες. Για παράδειγμα, τα PHF, τα οποία αποτελούν συστατικό της τ-πρωτεΐνης, περιέχουν δομή β - πτυχωτού φύλλου. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να είναι χρήσιμα για την κατανόηση των γεγονότων που συμβαίνουν στο αρχικό στάδιο της μη φυσιολογικής συσσωμάτωσης ινιδίων της τ-πρωτεΐνης στη νόσο Alzheimer. [60]



**Σχήμα 24:** Μοντέλο ένταξης του Cu (II) στο πεπτίδιο R3. Ο χαλκός εντάσσεται στους υποκαταστάτες μέσω της καρβοξυλικής ομάδας του C - τελικού άκρου, την αμινομάδα του N-τελικού άκρου και δύο ιμιδαζόλια His με επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Απεικονίζεται η κύρια ένταξη παρουσία 0.25 ισοδ. Cu (II) σε pH 7.5. [60]

Τέλος, μια άλλη ενδιαφέρουσα μελέτη [61] εστιάζει στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των ιόντων Cu(II) με πεπτιδικά μοντέλα (18-36 αμινοξέων) των υψηλά διατηρημένων αμινοξικών αλληλουχιών των επαναλήψεων R1-R4. Βρέθηκε ότι για όλα τα μοντέλα σε φυσιολογική τιμή pH ο πιθανότερος τρόπος ένταξης περιλαμβάνει το ιμιδαζολικό (από ένα αμινοξικό κατάλοιπο ιστιδίνης) άτομο αζώτου και ένα αμιδικό. Παράλληλα παρατηρήθηκε η ύπαρξη ενός τουλάχιστον σημείου ένταξης ανά μελετώμενο τμήμα (R1-R4). Ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι ακόμα και στο μεγαλύτερο πεπτιδικό μοντέλο που μελετήθηκε (36 αμινοξέων) η θέση και ο τρόπος ένταξης του Cu(II) δεν αλλάζει σε σχέση με τα μικρότερα. [61]



**Σχήμα 25:** Ύπαρξη ενός τουλάχιστον σημείου ένταξης ανά μελετώμενο τμήμα (R1-R4). [61]

Συνοψίζοντας, η tau και η ptau μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μεταλλικά ιόντα. Ειδικότερα αναμένεται ότι φωσφορυλίωση μπορεί να δράσει θετικά όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσης του Cu(II), αφού κατ' αυτή εισάγονται αρνητικά φορτία, τα οποία ευνοούν την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση. Προφανώς απαιτείται πιο εκτεταμένη μελέτη της χημείας ένταξης του Cu (II) με τις tau και ptau *in vitro* και κυρίως *in vivo*. [61]

## Κεφάλαιο 4

### 4.1 Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια

Οι συστηματικές μελέτες για τα σύμπλοκα μετάλλων με πεπτίδια ξεκίνησαν στις αρχές της δεκαετίας του εξήντα τον εικοστό αιώνα. Τα πειράματα ξεκίνησαν με την παρατήρηση ότι διάφορα μεταλλικά ιόντα είναι ικανά να προωθήσουν την αποπρωτονίωση και ένταξη του μεταλλικού ιόντος στις αμινομάδες των πεπτιδίων και να σχηματίσουν σταθερά σύμπλοκα. Επιπλέον, η πρόοδος στη Βιοανόργανη Χημεία έδωσε ώθηση στην έρευνα για το χαρακτηρισμό των αλληλεπιδράσεων των μεταλλικών ιόντων με διάφορους βιοϋποκαταστάτες, ενώ οι πιο πρόσφατες μελέτες επικεντρώνονται σε συγκεκριμένες πτυχές της μεταλλοπεπτιδοχημείας.[62,63]

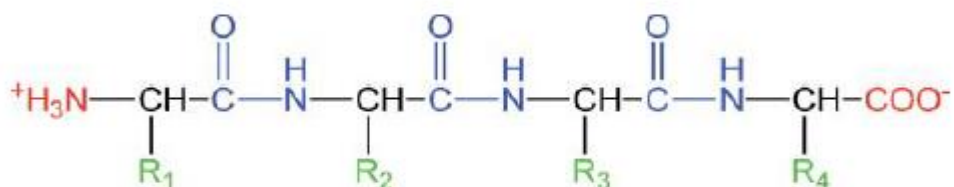
Ένας μεγάλος αριθμός διαφορετικών πεπτιδικών μορίων εμφανίζονται στα βιολογικά υγρά και κύτταρα. Η ένταξη των μεταλλικών ιόντων στα πεπτίδια συχνά εμπλέκεται σε διάφορες καταλυτικές ή βιοχημικές διαδικασίες. Από την άλλη πλευρά, οι αλληλεπιδράσεις μετάλλων με πεπτίδια συνοδεύονται με σημαντική μεταβολή στη διαμόρφωση των βιομορίων, που αντικατοπτρίζει τον έμμεσο ρόλο της χημείας μεταλλοπεπτιδίων σε βιολογικά συστήματα. Τα 20 φυσικά αμινοξέα εντάσσονται με κάποιο μέταλλο σχηματίζοντας σταθερό πενταμελή χηλικό δακτύλιο ( $\text{NH}_2, \text{COO}^-$ ). Ωστόσο, η παρουσία διαφορετικών καταλοίπων με τις πλευρικές τους ομάδες, έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές διαφορές στη θερμοδυναμική σταθερότητα και στις δομικές ιδιότητες των συμπλόκων.

Τα πεπτίδια είναι πολύ αποτελεσματικοί και συχνά εκλεκτικοί υποκαταστάτες για πολλά μεταλλικά ιόντα, δεδομένου ότι περιέχουν ένα πλήθος ατόμων που μπορούν να συμπλεχθούν με αυτά. Γενικά, ο τρόπος ένταξης μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια, εξαρτάται από την ικανότητα του ιόντος να προκαλεί αποπρωτονίωση σε γειτονικά, ως προς την ομάδα από την οποία θα αρχίσει η ένταξη, αμιδικά άτομα αζώτου. Το ποια θα είναι αυτή η ομάδα, εξαρτάται κατά πολύ από την πρωτοταγή δομή του πεπτιδίου. Έτσι, σε φυσικά πεπτίδια, δηλαδή πεπτίδια που αποτελούνται από συνδυασμούς αμινοξέων, πρωταρχικός υποκαταστάτης μπορεί να είναι το άτομο αζώτου της Ν-τελικής αμινομάδας, το ιμιδαζολικό άζωτο ενός καταλοίπου ιστιδίνης ή το άτομο θείου μιας κυστεΐνης.

Η χημική δομή των πεπτιδίων αντιπροσωπεύει μια ενδιάμεση φάση/στάδιο μεταξύ αμινοξέων και πρωτεϊνών. Σύμπλοκα μετάλλων με αμινοξέα έχουν ήδη μελετηθεί για σχεδόν όλα τα μεταλλικά ιόντα του περιοδικού πίνακα και το πιο σημαντικό έχουν διευκρινιστεί ικανοποιητικά τα θερμοδυναμικά, κινητικά και δομικά τους χαρακτηριστικά. [62] Οι συστηματικές μελέτες σχετικά με τα σύμπλοκα μετάλλων με πεπτίδια ξεκίνησαν στα μέσα του περασμένου αιώνα, όταν ο χαλκός (II) και το νικέλιο (II) προκάλεσαν αποπρωτονίωση και ένταξη αυτών στον πεπτιδικό δεσμό (-CONH-). Είναι σαφές ότι τα πεπτίδια δεσμεύονται ισχυρά με τα μέταλλα, αλλά τόσο η θερμοδυναμική σταθερότητα, όσο και η γεωμετρία των συμπλόκων με πεπτίδια επηρεάζονται από την αλληλουχία των αμινοξέων. [64]

#### 4.2 Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων

Η δομή ενός απλού τετραπεπτιδίου απεικονίζεται στο σχήμα 26, όπου παρουσιάζονται οι πιθανές περιοχές σύνδεσης, συμπεριλαμβανομένου του C- και N-τελικού άκρου (κόκκινο), του αμιδίου (μπλε) καθώς και πιθανών ατόμων δοτών της πλευρικής αλυσίδας (πράσινο).



**Σχήμα 26:** Η δομή ενός απλού τετραπεπτιδίου. [64]

Η ένταξη του μεταλλικού ιόντος σε πεπτίδια μέσω των καρβονυλικών-καρβοξυλικών ατόμων οξυγόνου δεν είναι ισχυρή. Αντιθέτως, η ένταξη μέσω της N-τελικής αμινομάδας είναι πιο αποτελεσματική καθώς οδηγεί στο σχηματισμό πενταμελούς χηλικού δακτυλίου με το άτομο της καρβονυλομάδας του πεπτιδικού δεσμού. Από την άλλη, οι αμιδικές (πεπτιδικές) ομάδες είναι ουδέτερες σε όλη την κλίμακα pH. Οι οξεο-βασικές ιδιότητες των αμιδίων έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα και οι τιμές pK<sub>a</sub> είναι περίπου -0.7 και 15.0 για τις πρωτονιωμένες μορφές του καρβονυλικού -O και του αμιδικού-N, αντίστοιχα. Αρκετά μεταλλικά ιόντα είναι, ωστόσο, ικανά να προκαλέσουν αποπρωτονίωση και ακολούθως ένταξη του αμιδικού (πεπτιδικού)

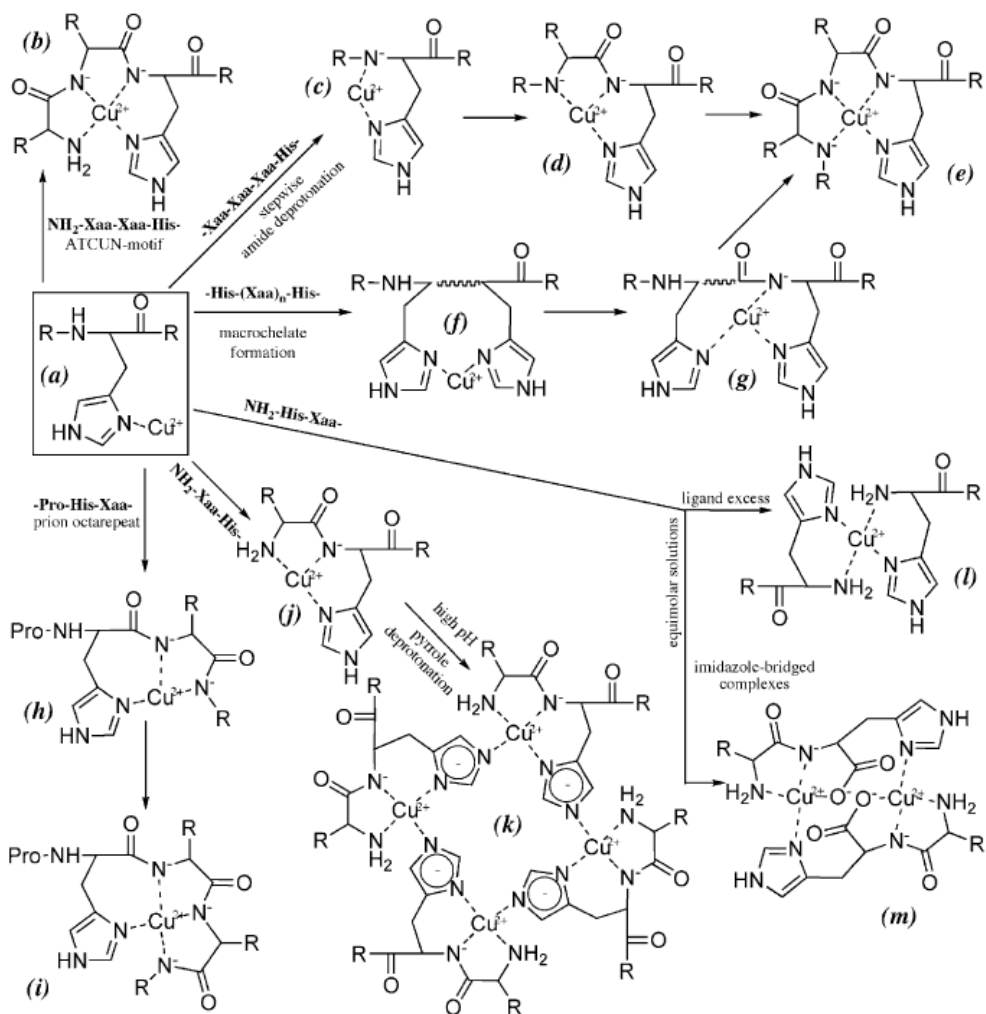
ατόμου αζώτου. Απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί αυτό είναι η ύπαρξη ενός ατόμου δότη με ικανότητα ισχυρής ένταξης (όπως N-τελική αμινομάδα ή το ιμιδαζόλιο ενός ιστιδινικού καταλοίπου).

Τα ιόντα χαλκού(II) και νικελίου(II) ήταν τα πρώτα για τα οποία παρατηρήθηκε το παραπάνω φαινόμενο (τιμές pK για τον ιονισμό του αμιδικού 4.0 και 8.0 σε απλά διπεπτίδια). Ο γενικός τρόπος ένταξης του Cu(II) με μικρά πεπτίδια που δεν περιέχουν ιστιδίνη στην αμινοξική τους αλληλουχία συναρτήσκει της τιμής pH περιλαμβάνει αρχική ένταξη μέσω της N-τελικής αμινομάδας και εν συνεχεία διαδοχική αποπρωτονίωση και ένταξη άλλων τριών ατόμων δοτών αμιδίου (κορεσμός της σφαίρας ένταξης στο ισημερινό επίπεδο) [64]

#### 4.3 Αλληλεπίδραση ιόντων Cu(II) με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη

Το ιμιδαζολικό άτομο N είναι η πιο συνηθισμένη θέση ένταξης στις μεταλλοπρωτεΐνες. Ο ρόλος της ιστιδίνης στην ένταξη του μεταλλικού ιόντος με πεπτίδια είναι συγκεκριμένος και εξαρτάται από τη θέση της στην αμινοξική αλληλουχία. Έχει βρεθεί ότι το άτομο αζώτου του ιμιδαζολίου αποτελεί πρωταρχική θέση ένταξης ακόμη και με την παρουσία N-τελικών αμινομάδων. Επίσης, με το συγκεκριμένο άτομο αζώτου φαίνεται να σχηματίζονται μακροχρηλικοί δακτύλιοι, αλλά με την αύξηση του pH κυριαρχεί ο δεσμός του χαλκού με το αμιδικό άτομο αζώτου. Κατά συνέπεια, η παρουσία καταλοίπων ιστιδίνης στην αμινοξική ακολουθία οδηγεί σε μια ποικιλία συμπλόκων. Αυτό αποδεικνύεται και παρακάτω (σχήμα 27), όπου παρουσιάζονται οι πιο σημαντικές πορείες συμπλοκοποίησης πεπτιδίων που περιέχουν ιστιδίνη. [62], [63]





**Σχήμα 27:** Πορεία συμπλοκοποίησης (συναρτήσεως της τιμής pH ή/και άλλων συνθηκών) ιόντων  $\text{Cu}^{2+}$  με πεπτίδια που περιέχουν ιστοδίνη σε διάφορες θέσεις της αμινοξικής αλληλουχίας [64]

Τόσο ο τρόπος ένταξης όσο και το είδος και η στοιχειομετρία των συμπλόκων που σχηματίζονται εξαρτώνται από παράγοντες όπως η αναλογία μετάλλου προς υποκαταστάτη, η θέση και ο αριθμός των καταλοίπων ιστοδίνης, η ύπαρξη ή μη N<sup>-</sup> τελικής αμινομάδας κ.α. Όταν η ιστοδίνη βρίσκεται στη C-τελική θέση αναμένεται να ακολουθείται η πορεία a-c-d-e, στο πάνω μέρος του σχήματος 27 που αφορά προστατευμένα στις N<sup>-</sup>, C-τελικές θέσεις πεπτίδια που περιέχουν ιστοδίνη στο (ή κοντά στο) C-τελικό άκρο. Πιο συγκεκριμένα η αρχική ένταξη πραγματοποιείται σε μέτρια όξινες τιμές pH (~4) μέσω του ατόμου N3 του ιμιδαζολίου ( $\text{N}_{\text{im}}$ ). Σε υψηλότερες τιμές pH παρατηρείται διαδοχική (ή κάποιες φορές συνεργατική) αποπρωτονίωση των δυο πρώτων πεπτιδικών δεσμών που προηγούνται της ιστοδίνης (αμιδικά άτομα αζώτου, N<sup>-</sup>) και η συνακόλουθη ένταξή τους προς σχηματισμό συμπλόκων με σφαίρα ένταξης στο

ισημερινό επίπεδο 2N ((1N<sub>im</sub>, N<sup>-</sup>), εξαμελής χηλικός δακτύλιος) και 3N ((1N<sub>im</sub>, 2N<sup>-</sup>), εξαμελής + πενταμελής χηλικός δακτύλιος). Η μεγάλη θερμοδυναμική σταθερότητα του 3N συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση ιονισμού και ένταξης του τελευταίου πεπτιδικού ατόμου αζώτου (pK<sub>α</sub> > 8.5-9) προς σχηματισμό του καταληκτικού 4N συμπλόκου με σφαίρα ένταξης ((1N<sub>im</sub>, 3N<sup>-</sup>), (ένας εξαμελής και δυο πενταμελείς χηλικοί δακτύλιοι). [64]

## Κεφάλαιο 5



## Σκοπός

Όπως αναφέρθηκε και στο εισαγωγικό μέρος, η υπερφωσφορυλίωση της tau-πρωτεΐνης οδηγεί στην αποσύνδεσή της απ' τους μικροσωληνίσκους (ένα σημαντικό συστατικό του κυτταρικού σκελετού των νευρώνων) και την εν τέλει συσσωμάτωσή της στον ενδοκυττάριο χώρο με τη μορφή αποθέσεων γνωστών ως νευροινώδη συσσωματώματα ή νευροινώδεις πλάκες (neurofibrillary tangles, NFT's). Η παραπάνω διεργασία (ένα από τα χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer) οδηγεί στον σταδιακό εκφυλισμό και τελικά στο θάνατο των νευρώνων. [16-19] Από την άλλη ο ρόλος των μεταλλικών ιόντων και ιδίως του βιολογικά σημαντικού ιόντος Cu(II) (η ομοιόσταση του οποίου επηρεάζεται σημαντικά κατά τη νόσο Alzheimer) δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Οι γνώσεις μας είναι φτωχές ειδικά όσον αφορά την εμπλοκή του ιόντος Cu(II) στο σχηματισμό των NFT. Αυτές περιορίζονται στη διαπίστωση ότι ο Cu(II) μπορεί να αλληλεπιδράσει με ένα ιστιδινικό κατάλοιπο (ιμιδαζολικός δακτύλιος) και ένα αμιδικό (πεπτιδικό) άτομο αζώτου [57, 61], ενώ απουσιάζουν θερμοδυναμικές μελέτες (σε αντίθεση με το Αβ αμυλοειδές) όπου θα μπορούσε να προσδιοριστεί η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου Cu(II)-πεπτιδικού μοντέλου (άρα και η δεσμευτική ισχύς σε φυσιολογικές συνθήκες). Η παραπάνω πληροφορία κρίνεται πολύ σημαντική γιατί θα μπορούσε να δώσει απαντήσεις σχετικά με την κατανομή του ιόντος μεταξύ διαφορετικών βιολογικών του στόχων άρα και της ομοιόστασής του. Απόρροια της έλλειψης δημοσιεύσεων σχετικών με το αντικείμενο είναι και η αδυναμία διευκρίνησης του πιθανού καταλυτικού ρόλου του ιόντος Cu(II) σε αντιδράσεις τύπου Fenton παρουσία της tau-πρωτεΐνης ή της πιθανής εμπλοκής του στο μηχανισμό που ρυθμίζει την ενζυμική δράση κινασών (π.χ GSK-3b) /φωσφατασών (π.χ PP2A) που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα την tau-πρωτεΐνη οδηγώντας σε υπερφωσφορυλίωση (π.χ ↑ δράσης GSK-3b, ↓δράσης PP2A ). [49]

Σκοπός της εργασίας μας είναι να συνεισφέρουμε σε αυτό το πεδίο με έμφαση στη θερμοδυναμική (για πρώτη φορά) αλλά και στη φασματοσκοπική μελέτη της αλληλεπίδρασης του ιόντος Cu(II) με μικρά πεπτιδικά μοντέλα της τ-πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, μετά από βιβλιογραφική αναζήτηση επιλέχθηκε το πεπτιδικό μοντέλο της τ-πρωτεΐνης Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-His-NH<sub>2</sub> (προστατευμένο στα N- και C-τελικά άκρα) και το αντίστοιχο φωσφορυλιωμένο παράγωγο Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-His-NH<sub>2</sub>. Το συγκεκριμένο αποτελεί τμήμα (261-268) της μεγαλύτερου μήκους ισομορφής της τ-πρωτεΐνης (τμήμα R1). Η συγκεκριμένη περιοχή συνδεεται με

τους μικροσωληνίσκους, περιέχει το αμινοξύ ιστιδίνη ως πιθανή θέση αρχικής ένταξης του Cu(II) ενώ το αμινοξύ Ser έχει βρεθεί φωσφορυλιωμένο σε εγκεφάλους ασθενών. Η πορεία εργασίας περιλαμβάνει (α) τη σύνθεση-καθαρισμό και φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό των πεπτιδίων (β) ποτενσιομετρική μελέτη της αλληλεπίδρασης Cu(II)-πεπτιδίων και την εξαγωγή θερμοδυναμικών παραμέτρων (για πρώτη φορά) (γ) Το φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό των συμπλόκων που ανιχνεύονται με τη βοήθεια των ποτενσιομετρικών μετρήσεων (δ) Συσχέτιση των παραπάνω πληροφοριών με την βοήθεια των οποίων μπορούν να εξαχθούν κάποια αρχικά συμπεράσματα σε σχέση με τη δεσμευτική ικανότητα των δυο πεπτιδίων ως προς το ιόν Cu(II), τον πιθανό ρόλο της φωσφορικής ομάδας, κ.α.

Ευελπιστούμε ότι η μελέτη μας θα μπορούσε να αποτελέσει μια μικρή μεν αλλά σημαντική δε συνεισφορά προς την κατεύθυνση διαλεύκανσης του ρόλου των ιόντων Cu(II) στη νόσο Alzheimer με έμφαση στην αλληλεπίδρασή του με την τ-πρωτεΐνη.

## Βιβλιογραφία θεωρητικού μέρους

- [1]. B. B. Bendlin, C. M. Carlsson, C. E. Gleason, S. C. Johnson, A. Sodhi, C.L. Gallagher, L. Puglielli, C. D. Engelman, M. L. Ries, G. Xu, W. Wharton, S. Asthana, *Maturitas*, (2010), 65(2), 131–137
- [2]. K.S. Osborn, O.E. Wraa, A.B. Watson, “*Medical-Surgical Nursing τόμος Α*”, ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, Αθήνα, **2012**
- [3]. Marie Jouanne, Sylvain Rault, Anne-Sophie Voisin-Chiret, *Eur J Med Chem*, (2017), 139, 153–167
- [4]. AdannaG.Alexander, VanessaMarfil, ChrisLi, *Front Genet*, (2014), 5, 279
- [5]. Alzheimer’s Association Report, *Alzheimer’s & Dementia*, (2017), 13, 325–373
- [6]. Caselli RJ, Dueck AC, Osborne D, Sabbagh MN, Connor DJ, Ahern GL, Baxter LC, Rapcsak SZ, Shi J, Woodruff BK, Locke DE, Snyder CH, Alexander GE, Rademakers R, Reiman EM., *N Engl J Med*, (2009), 361(3), 255–263
- [7]. Jayadev S, Steinbart EJ, Chi YY, Kukull WA, Schellenberg GD, Bird TD, *Arch Neurol*, (2008), 65(3), 373–378.
- [8]. Carolyn M Mazure, Joel Swendsen, *Lancet Neurol*, (2016) 15(5), 451–452
- [9]. Christian J. Pike, *Journal of Neuroscience Research*, (2017), 95, 671–680
- [10]. Hakansson K, Rovio S, Helkala EL, Vilska AR, Winblad B, Soininen H, Nissinen A, Mohammed AH, Kivipelto M, *BMJ*, (2009), 339, 99
- [11]. Sando SB, Melquist S, Cannon A, Hutton M, Sletvold O, Saltvedt I, White LR, Lydersen S, Aasly J, *Int J Geriatr Psychiatry*, (2008), 23(11), 1156–1162.
- [12]. Fratiglioni L, Paillard-Borg S, Winblad B, *Lancet neurology*, (2004), 3(6), 343–353.
- [13]. P. LeMone, K. Burke, G. Bauldoff, “*Medical-Surgical Nursing, τόμος Β*”, Ιατρικές εκδόσεις Λαγός, Αθήνα, **2011**
- [14]. International AD. World Alzheimer Report. 2016
- [15]. Scott J.Webster, Adam D.Bachstetter, Peter T.Nelson, Frederick A.Schmitt, Linda J. Van Eldik, *Front Genet*, (2014), 5, 88
- [16]. Tong Guo, Wendy Noble, Diane P. Hanger, *Acta Neuropathol*, (2017), 133, 665–704
- [17]. Amritpal Mudher, Simon Lovestone, *Trends Neurosci.*, (2002), 25, 22-6.
- [18]. A. Lloret, T. Fuchsberger, E. Giraldo, J. Viña, *Free Radical Biology and Medicine*, (2015), 83, 186-191

- [19]. Sabrina Pospich, Stefan Raunser, *Science*, (2017), 358, 45-46
- [20]. Price JL, McKeel DW Jr, Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M, Hansen LA, Petersen RC, Parisi JE, Dickson DW, Smith CD, Davis DG, Schmitt FA, Markesbery WR, Kaye J, Kurlan R, Hulette C, Kurland BF, Higdon R, Kukull W, Morris JC, *Neurobiol Aging*, (2009), 30, 1026–1036
- [21]. Braak H, Braak E, *Neurobiol Aging*, (1997), 18(4), 351–357
- [22]. Han-Chang Huang, Zhao-Feng Jiang, *Journal of Alzheimer's Disease*, (2009), 16, 15–27
- [23]. Aneta T. Petkova, Yoshitaka Ishii, John J. Balbach, Oleg N. Antzutkin, Richard D. Leapman, Frank Delaglio, Robert Tycko, *PNAS*, (2002), 99, 16742–16747
- [24]. Margaret Rak, Marc R. Del Bigio, Sabine Mai, David Westaway, Kathleen Gough, *Biopolymers*, (2007), 87, 207-217
- [25]. Alberto Serrano-Pozo, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, Bradley T. Hyman, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, (2011), 1, 513-522
- [26]. Astrid Sigel, Helmut Sigel and Ronald K.O. Sigel (eds), “*Neurodegenerative Diseases and Metal Ions, Volume 1*”, John Willey & Sons, Chichester, England, 2006
- [27]. Masha G. Savelieff, Sanghyun Lee, Yuzhong Liu and Mi Hee Lim, *ACS Chem. Biol*, (2013), 8(5), 856
- [28]. Anil Kumar, Arti Singh, Ekavali, *Pharmacological Reports*, (2015), 67, 195–203
- [29]. Michala Kolarova, Francisco Garcia-Sierra, Ales Bartos, Jan Ricny, and Daniela Ripova, *International Journal of Alzheimer's disease*, (2012), 2012, 731526
- [30]. Alejandra D. Alonso, John Di Clerico, Bin Li, Christopher P. Corbo, Maria E. Alaniz, Inge Grundke-Iqbal, Khalid Iqbal, *The Journal of Biological Chemistry*, (2010), 285, 30851–30860
- [31]. Jorge G. Ferreira, Ana L. Pereira, Helder Maiato, *International Review of Cell and Molecular Biology*, (2014), 309, 59-140
- [32]. Ludovic Martin , Xenia Latypova , Faraj Terro, *Neurochemistry International*, (2011), 58, 458-471
- [33]. Gabriel Pascual, Jehangir S., et al. *Acta Neuropathol*, (2017), 133, 767–783
- [34]. Elias Akoury, Marco D. Mukrasch, Jacek Biernat, Katharina Tepper, Valery Ozenne, Eckhard Mandelkow, Martin Blackledge, Markus Zweckstetter, *Protein Science*, (2016), 25, 1010—1020
- [35]. C.-X. Gong, F. Liu, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, *J Neural Transm*, (2005), 112, 813–838

- [36]. Goran Šimić, Mirjana Babić Leko, Selina Wray, Charles Harrington, Ivana Delalle, Nataša Jovanov-Milošević, Danira Bažadona, Luc Buée, Rohan de Silva, Giuseppe Di Giovanni, Claude Wischik, Patrick R. Hof, *Biomolecules*, **(2016)**, 6(1), 6
- [37]. Martin Schwalbe, Harindranath Kadavath, Jacek Biernat, Valery Ozenne, Martin Blackledge, Eckhard Mandelkow, Markus Zweckstetter, *Cell Press*, **(2015)**, 23, 1448–1458
- [38]. Melvin L. Billingsley, Randall L. Kincaid, *Biochem. J.* **(1997)** 323, 577-591
- [39]. Eva-Maria Mandelkow, Eckhard Mandelkow, *Cold Spring Harb Perspect Med*, **(2012)**, 2, 006247
- [40]. Yipeng Wang and Eckhard Mandelkow, *Nat Rev Neurosc*, **(2015)**, 17, 5-21
- [41]. Marco D. Mukrasch, Stefan Bibow, Jegannath Korukottu, Sadasivam Jeganathan, Jacek Biernat, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, Markus Zweckstetter, *Plos Biol*, **(2009)**, 7, 1000034
- [42]. Shaolong Zhu, Agnesa Shala, Alexandr Bezginov, Adnan Sljoka, Gerald Audette, Derek J. Wilson, *Plos One*, **(2015)**, 10, 0120416
- [43]. Jacob I. Ayers, Benoit I. Giasson, David R. Borchelt, *Society of Biological Psychiatry*, **(2018)**, 83, 337-346
- [44]. Patrick Reilly, Charisse N. Winston, Kelsey Baron, Margarita Trejo, Edward M. Rockenstein, Johnny C. Akers, Najla Kfoury, Marc Diamond, Eliezer Masliah, Robert A. Rissman, Shauna H. Yuan, *Neurobiology of Disease*, **(2017)**, 106, 222-234
- [45]. Aurélien Lathuilière, Pamela Valdés, Stéphanie Papin, Matthias Cacquevel, Catherine Maclachlan, Graham W. Knott, Andreas Muhs, Paolo Paganetti, Bernard L. Schneider, *Scientific Reports*, **(2017)**, 7, 13556
- [46]. C.-X. Gong, K. Iqbal, *Curr Med Chem*, **(2008)**, 15, 2321–2328
- [47]. Shreyasi Chatterjee, Tzu-Kang Sang, George M. Lawless, George R. Jackson, *Human Molecular Genetics*, **(2009)**, 18, 164-177
- [48]. A. Schneider, J. Biernat, M. von Bergen, E. Mandelkow, E.-M. Mandelkow, *Biochemistry*, **(1999)**, 38, 3549-3558
- [49]. Jian-Zhi Wang, Yi-Yuan Xia, Inge Grundke-Iqbal, Khalid Iqbal, *Journal of Alzheimer's Disease*, **(2013)**, 33, 123–139
- [50]. Peter Verwilt, Kyoung Sunwoo, Jong Seung Kim, *Chem. Commun.*, **(2015)**, 51, 5556-5571
- [51]. Henryk Kozłowski, Marek Luczkowski, Maurizio Remelli, Daniela Valensin, *Coordination Chemistry Reviews*, **(2012)**, 256, 2129–2141



- [52]. H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (2003), 57, 386–398
- [53]. Ivo F. Scheiber, Julian F.B. Mercer, Ralf Dringen, *Progress in Neurobiology*, (2014), 116, 33-57
- [54]. Ya Hui Hung, Ashley I. Bush, Robert Alan Cherny, *J Biol Inorg Chem*, (2010), 15, 61-76
- [55]. Caterina Migliorini, Elena Porciatti, Marek Luczkowski, Daniela Valensin, *Coordination Chemistry Reviews*, (2012), 256, 352-368
- [56]. Joana S. Cristóvão, Renata Santos, and Cláudio M. Gomes, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (2015), 2016, 9812178
- [57]. Patrick Gamez, Ana B. Caballero, *AIP Advances*, (2015), 5, 092503
- [58] Lian-Xiu Zhou, Jin-Tang Du, Zhi-Yang Zeng, Wei-Hui Wu, Yu-Fen Zhao, Kenji Kanazawa, Yasuko Ishizuka, Tadashi Nemoto, Hiroshi Nakanishi, Yan-Mei Li, *Peptides*, (2007), 28, 2229-2234
- [59]. Qingfeng Ma, Yanmei Li, Jintang Du, Huadong Liu, Kenji Kanazawa, Tadashi Nemoto, Hiroshi Nakanishi, Yufen Zhao, *Peptides*, (2006), 27, 841-849
- [60]. Qing-Feng Ma, Yan-Mei Li, Jin-Tang Du, Kenji Kanazawa, Tadashi Nemoto, Hiroshi Nakanishi, Yu-Fen Zhao, *Biopolymers*, (2005), 79, 74-85
- [61]. Byong-kyu Shin and Sunil Saxena, *The Journal of Physical Chemistry B*, (2011), 115, 15067
- [62]. Imre Sovago, Csilla Kallay, Katalin Varnagy, *Coordination Chemistry Reviews*, (2012), 256, 2225– 2233
- [63]. Imre Sóvágó, Katalin Várnagy, Norbert Lihi, Ágnes Grenács, *Coordination Chemistry Reviews*, (2016), 327-328, 43–54
- [64]. Imre Sovago, Katalin Osz, *Dalton Trans*, (2006), 32, 3841–3854

## Κεφάλαιο 6



## Πειραματικό μέρος

### 6.1 Αντιδραστήρια-Υλικά

Η σύνθεση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield σύμφωνα με την Fmoc/tBu στρατηγική [1]. Ως πολυμερικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η {4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)αμινομεθυλ]-φαινοξυ}-ρητίνη ή Rink Amide ρητίνη (*Rink Amide AM*, G.L. Biochem, Shanghai, China).

Οι διαλύτες, τα αντιδραστήρια σύζευξης, τα προστατευμένα αμινοξέα καθώς και άλλα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των πεπτιδίων έχουν ως ακολούθως:

#### Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια της σύνθεσης των πεπτιδίων είναι:

- Διχλωρομεθάνιο (*DCM*, >99.9% Fluka – Schnellendorf, Germany).
- Διμέθυλοφορμαμίδιο (*DMF*, >99.9% Fluka – Schnellendorf, Germany), το οποίο είχε υποστεί απόσταξη υπεράνω νινυδρίνης, προκειμένου να δεσμευτούν οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της διάσπασής του.
- Τριφθοροξικό οξύ (*TFA*, 99% SAFC – Aldrich, Germany) για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και την απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων.
- Πιπεριδίνη (*Piperidine*, 99% Aldrich, Germany) για την αποπροστασία της Fmoc-ομάδας.
- Διαιθυλαιθέρας (>99.5% Riedel-de Haen, Germany) για την καταβύθιση του πεπτιδίου μετά την αποκοπή του από τη ρητίνη.
- Εξάνιο (*n-Hexane*, LAB-SCAN, Dublin, Ireland) κατά την απομάκρυνση του τριφθοροξικού οξέος σε περιστροφικό εξατμιστήρα.
- Ισοπροπανόλη για τη συρρίκνωση των κόκκων της ρητίνης.
- Μεθανόλη για τη συρρίκνωση των κόκκων της ρητίνης και τον καθαρισμό του πεπτιδίου.
- Ακετονιτρίλιο (*CH<sub>3</sub>CN*, > 99.9% LAB-SCAN) κατά τον καθαρισμό του πεπτιδίου.
- Τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (*TIS*, 99% Sigma-Aldrich) ως μόριο 'παγίδα' για τη δέσμευση των καρβοκατιόντων που προκύπτουν κατά την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη.

- Διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη (*DIEA*, 98% Fluka, Switzerland) ως τριτοταγής βάση για να δημιουργηθεί το καρβοξυλικό άλας του προστατευμένου αμινοξέος και να ιονιστεί το *HOBt*.
- Οξικός ανυδρίτης (*Ac<sub>2</sub>O*, 99% Merk, Germany) για την ακετυλίωση των ελεύθερων αμινομάδων.

#### Αντιδραστήρια σύζευξης

Κατά τη διάρκεια της σύζευξης των αμινοξέων στη ρητίνη, χρησιμοποιήθηκαν ως αντιδραστήρια σύζευξης:

- το ο-βενζοτριαζολυλο-τετραμεθυλο-ισοουρονικό τετραφθοροβορικό άλας, (*TBTU*, Neosystem – Strasbourg, France ή G.L. Biochem, Shanghai, China)
- το διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (*DIC*, Fluka, Germany ή G.L. Biochem, Shanghai, China).

Ως βοηθητικό πυρηνόφιλο χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των συζεύξεων το 1-υδρόξυβενζοτριαζόλιο (*HOBt*, Neosystem – Strasbourg, France ή G.L. Biochem, Shanghai, China).

#### Αντιδραστήρια για την παρασκευή του διαλύματος του Test Kaiser

- Νινυδρίνη (*C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>*, Sigma-Aldrich),
- Κυανιούχο κάλιο, (*KCN*, Fluka Chemie AG),
- Αιθανόλη (*C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O*, Fiscer Scientific),
- Φαινόλη (*C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O*, Riedel-de Haen) και
- Πυριδίνη (*C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N*, Lab-Scan Analytical)

#### Προστατευμένα αμινοξέα

Τα προστατευμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση είναι τα εξής:

- |                                      |            |
|--------------------------------------|------------|
| ○ Fmoc-Gly -OH                       | MB = 297.3 |
| ○ Fmoc-Ser(HPO <sub>3</sub> .Bzl)-OH | MB = 497.4 |
| ○ Fmoc-Ser(t-Bu)-OH                  | MB = 383.4 |
| ○ Fmoc-Thr(t-Bu)-OH                  | MB = 397.5 |
| ○ Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH                 | MB = 425.5 |
| ○ Fmoc-Asn(Trt)-OH                   | MB = 596.7 |
| ○ Fmoc-Leu-OH                        | MB = 353.4 |

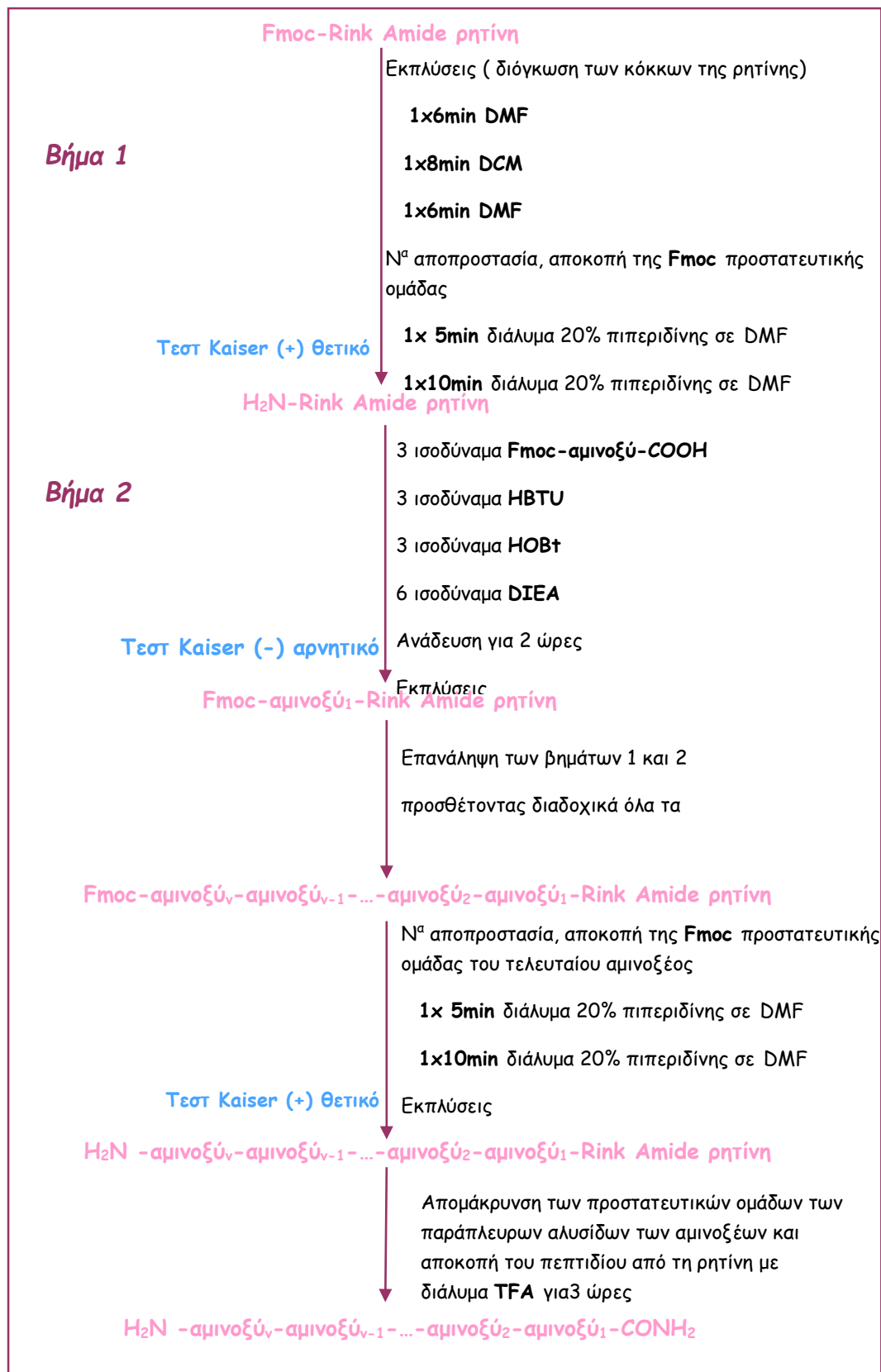
- Fmoc-Lys(Boc)-OH MB = 468.5
- Fmoc-His(Trt)-OH MB = 619.7

Για την παρασκευή και τιτλοδότηση διαλυμάτων πεπτιδίου- Cu(II)

- Πρότυπο διάλυμα  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (1g  $\text{Cu}^{2+}$ / l) του οίκου Sigma-Aldrich
- Πρότυπα διαλύματα KOH,  $\text{HNO}_3$  0.1 M και  $\text{KNO}_3$  του οίκου E.Merck

6.2 Πορεία σύνθεσης των πεπτιδίων Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub> και Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub> στη στερεά φάση

Η σύνθεση του πεπτιδίου έγινε σύμφωνα με τη μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής. Ένα γενικό σχήμα της πορείας που ακολουθήθηκε παρατίθεται στο σχήμα 1:



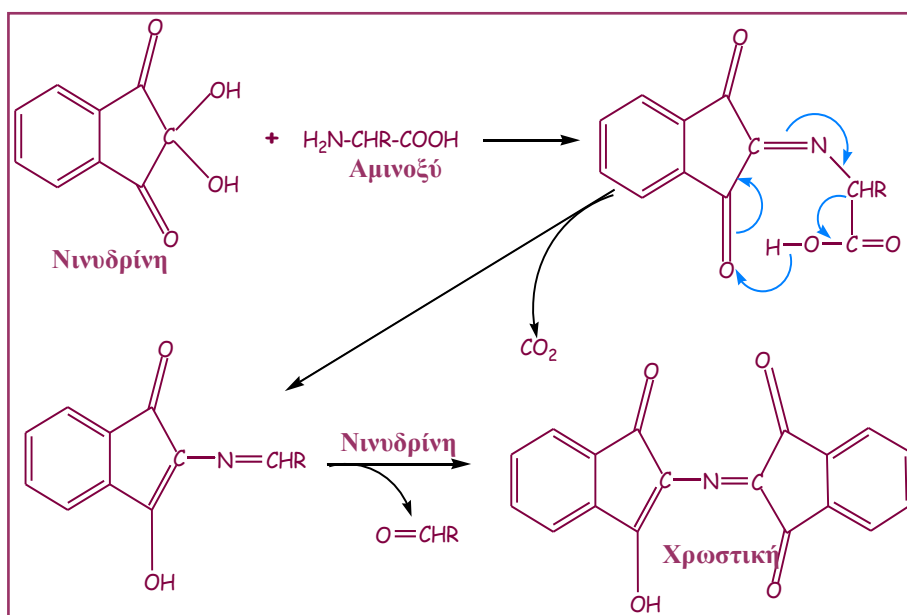
**Σχήμα 1:** Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με τη Fmoc/tBu μεθοδολογία.

Η αποπροστασία της α-αμινομάδας των αμινοξέων από την Fmoc ομάδα έγινε με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε διμεθυλοφορμαμίδιο. Αρχικά λαμβάνει χώρα η απομάκρυνση του μεγαλύτερου ποσοστού των καρβοκατιόντων που σχηματίζονται (1x10 min), ενώ στη συνέχεια ποσοτική απομάκρυνση της Fmoc ομάδας (1x20 min). Αφού γίνει η απομάκρυνση των παραπροϊόντων με τους κατάλληλους διαλύτες (DMF, DCM, DMF), η αποπροστασία της αμινομάδας διαπιστώθηκε με test Kaiser.

Η σύζευξη των αμινοξέων έγινε χρησιμοποιώντας τριπλάσια περίσσεια τόσο του προστατευμένου αμινοξέος όσο και των αντιδραστηρίων σύζευξης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 3/3/3/1 : αμινοξύ/HOBt/TBTU/ρητίνη, ενώ ως διαλύτης το μίγμα διχλωρομεθάνιο (DCM): διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) σε αναλογία 1:1. Η χρήση του HOBt, ως βοηθητικού πυρηνόφιλου, είναι απαραίτητη, αφού συμβάλλει στη δημιουργία ενός ισχυρού και δραστικού ακυλιωτικού μέσου και ταυτόχρονα ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο της ρακεμοποίησης.

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε συγκεκριμένα είχε ως εξής: αρχικά το Fmoc-προστατευόμενο αμινοξύ και το βοηθητικό πυρηνόφιλο HOBt διαλύθηκαν σε μίγμα 1:1 DMF/DCM. Ακολουθεί προσθήκη του αντιδραστηρίου σύζευξης TBTU. Στη συνέχεια, προστέθηκε το DIEA και αφέθηκε για ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2-3 min. Η παρουσία της DIEA κρίνεται απαραίτητη τόσο για την αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας του Fmoc-προστατευμένου αμινοξέος όσο και για τον ιονισμό του HOBt. Τέλος το διάλυμα σύζευξης προστέθηκε στη πεπτιδορητίνη και η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 3-4 h. Ο έλεγχος της ολοκλήρωσης της σύζευξης πραγματοποιήθηκε με test Kaiser (αρνητικό(-) test Kaiser). Για τις εκπλύσεις της πεπτιδορητίνης χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες το DMF και το DCM.

Το test Kaiser βασίζεται στην αντίδραση της νινυδρίνης με πρωτοταγείς αμίνες η οποία δίνει μια κυανοϊώδη χρωστική και δίνεται στο σχήμα 2:



**Σχήμα 2:** Αντίδραση νινυδρίνης

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η αποπροστασία του N-τελικού αμινοξέος από την Fmoc ομάδα και ακολούθησε η αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη, με ταυτόχρονη απομάκρυνση και των υπόλοιπων προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Το πεπτίδιο ελήφθη στην ελεύθερη μορφή του μετά από κατεργασία τις πεπτιδορητίνης με τριφθοροξικό οξύ (TFA) παρουσία νερού και τριϊσοπροπυλοσιλανίου (TIS) ως μόρια παγίδες για τα καρβοκατιόντα. Η πεπτιδορητίνη και το διάλυμα TFA/H<sub>2</sub>O/TIS μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη και αφήθηκαν για ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια έγινε διήθηση τις ρητίνης και το TFA εξατμίστηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα, ενώ στο υπόλειμμα προστέθηκε διάλυμα DCM:εξάνιο (1:1) και συμπυκνώθηκε εκ νέου. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τέσσερις με πέντε φορές με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του TFA. Τα πεπτίδια καταβυθίστηκαν με την προσθήκη παγωμένου διαιθυλαιθέρα. Ακολούθησε διήθηση και κατεργασία με αιθέρα για την απομάκρυνση των μορίων – παγίδων (scavenger TIS, EDT) που χρησιμοποιήθηκαν. Τα πεπτίδια παραλείφθηκαν σε υδατικό διάλυμα με διάλυση σε οξικό οξύ 2N και στη συνέχεια λυοφιλοποιήθηκαν. [1]-[3]



### 6.3 Μέθοδοι καθαρισμού

Η Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) έχει καθιερωθεί ως η κορυφαία τεχνική για την ανάλυση, το διαχωρισμό συστατικών της μίγματος καθώς και τον καθαρισμό μεγάλου αριθμού μορίων τις είναι οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια. Για τον καθαρισμό των συνθετικών πεπτιδίων, η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (RP-HPLC). Στηρίζεται στην αρχή της υδροφιλικότητας και λιποφιλικότητας και ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη συνδυαστική δράση μιας στατικής και μιας κινητής φάσης.

Πιο συγκεκριμένα τα πεπτίδια διαλύονται με  $H_2O-CH_3CN$ , αλληλεπιδρούν με την οργανική στατική φάση και στη συνέχεια εκλύονται από μία σειρά οργανικών διαλυτών της κινητής φάσης. Ο πιο διαδεδομένος ανιχνευτής που χρησιμοποιείται στην HPLC είναι ο που ανιχνεύει μεταβολές τις τιμές απορρόφησης σε υπεριώδη ή και ορατή ακτινοβολία της κινητής φάσης. Όταν στην κινητή φάση εκλύονται πεπτίδια τότε ανιχνεύονται μεταβολές σε περιοχές 214-220 nm, αφού στην περιοχή αυτή απορροφά ο πεπτιδικός δεσμός. [4], [5]

#### ➤ Αναλυτική RP-HPLC

Για τον προσδιορισμό του συστήματος έκλυσης και τον ποιοτικό έλεγχο καθαρότητας των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC χρωματογραφία με τη χρήση του οργάνου Agilent 1200, Quaternary Pump, Diode Array Detector. Το σύστημα έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν : (A)  $H_2O/0.1\%$  TFA, (B)  $CH_3CN/0.1\%$  TFA και ο χρόνος έκλυσης: 30 min. Η ανίχνευση έγινε στα 214 nm.

#### ➤ Παρασκευαστική RP-HPLC

Για τον καθαρισμό του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε παρασκευαστική RP-HPLC, (Shimadzu, Preparative Liquid Chromatograph, LC-8A Pump, SPD-M20A Diode Array Detector, με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10AF). Ειδικότερα, το σύστημα έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν : (A)  $H_2O/0.1\%$  TFA, (B)  $CH_3CN/0.1\%$  TFA και ο χρόνος έκλυσης: 30 min. Η ανίχνευση έγινε στα 214 nm.

## 6.4 Ποτενσιομετρία

### 6.4.1 Εισαγωγικές έννοιες

Η ποτενσιομετρία είναι μία από τις απλούστερες και πιο επιτυχημένες τεχνικές που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των σταθερών σχηματισμού συμπλόκων μετάλλων με διάφορους υποκαταστάτες. Ανήκει στην κατηγορία των ηλεκτροχημικών τεχνικών ανάλυσης και βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς δυναμικού που αναπτύσσεται μεταξύ τις ηλεκτροδίου αναφοράς και τις εκλεκτικού ηλεκτροδίου ιόντων σε διάλυμα (π.χ υποκαταστάτη ή υποκαταστάτη-μεταλλικού ιόντος) συναρτήσει του όγκου προστιθέμενης βάσης ή οξέος γνωστής συγκέντρωσης. Για την μέτρηση του pH, συνήθως χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο υάλου. [6]-[10]

Οι πληροφορίες που αντλούμε με την ποτενσιομετρία είναι:

- Προσδιορισμός συγκέντρωσης (M, L, κλπ)
- Παράμετροι βαθμονόμησης ηλεκτροδίου
- Προσδιορισμός pK<sub>a</sub> υποκαταστάτη
- Προσδιορισμός στοιχειομετρίας και σταθερών σχηματισμού συμπλόκων που σχηματίζονται
- Διαγράμματα κατανομής σωματιδίων συναρτήσει του pH, pL, pM

#### Ένταξη μεταλλικών ιόντων σε διάφορους υποκαταστάτες

Όσον αφορά τις σταθερές σχηματισμού (K<sub>f</sub>) μπορούν να οριστούν με τη βοήθεια των παρακάτω εξισώσεων (L=υποκαταστάτης)



Ή απλούστερα

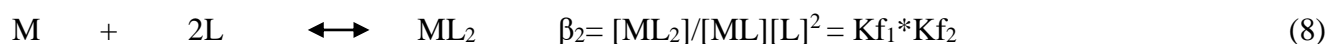
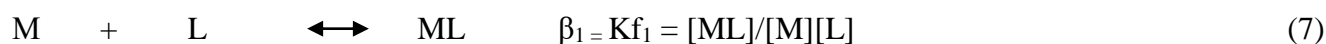


Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις L λαμβάνουν χώρα οι παρακάτω διαδοχικές αντιδράσεις:





Παράλληλα, μπορούμε να ορίσουμε τις ολικές σταθερές σχηματισμού ( $\beta$ ) για τις συνολικές αντιδράσεις:



Αφού λοιπόν έχουμε:

$$\beta_n = K_n * K_{n-1} * K_{n-2} \dots K_1 \quad (11)$$

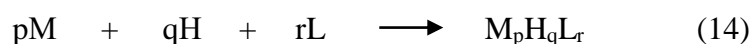
Ισχύει:

$$\log \beta_n = \log K_n + \log K_{n-1} + \log K_{n-2} \dots \log K_1 \quad (12)$$

Και:

$$\log \beta_n - \log \beta_{n-1} = \log K_n \quad (13)$$

Οι ισορροπίες που περιλαμβάνουν  $p$  μεταλλικά ιόντα,  $q$  πρωτόνια και  $r$  μόρια υποκαταστάτη περιγράφονται απ' την εξίσωση:



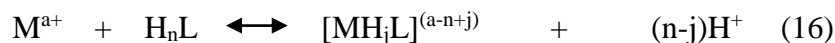
Στην περίπτωση της δικής μας μελέτης ο υποκαταστάτης περιλαμβάνει πρωτόνια, επομένως οι ολικές σταθερές σχηματισμού ορίζονται με την παρακάτω σχέση:

$$\beta_{p,q,r} = [M_p H_q L_r] / [M]^p [H]^q [L]^r \quad (15)$$

Κατά την ένταξη πεπτιδικών ατόμων αζώτου η παράμετρος  $q$  μπορεί να πάρει και αρνητικές τιμές. Αυτό οφείλεται στην αδυναμία των πεπτιδικών αζώτων να ιονιστούν απουσία μεταλλικών ιόντων σε υδατικά διαλύματα, γεγονός το οποίο τα αποκλείει από τον μοριακό τύπο του υποκαταστάτη. Επιπλέον, αξίζει να αναφέρουμε

ότι αρνητικές τιμές της παραμέτρου  $q$  παρατηρούνται και στην περίπτωση υδρόλυσης μορίων  $H_2O$ , τα οποία συνδέονται με το μεταλλικό ιόν.

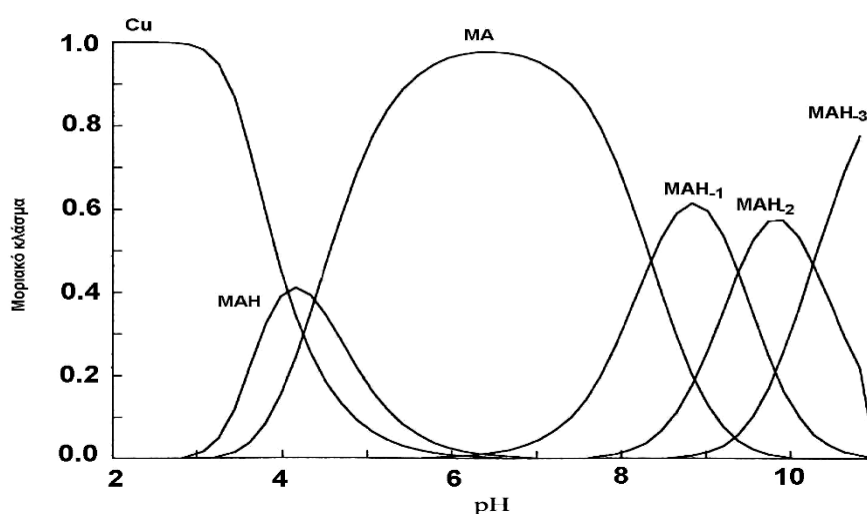
Η αντίδραση των μεταλλικών ιόντων με διάφορους υποκαταστάτες μπορεί να περιγραφεί και ως αντίδραση ανταγωνισμού πρωτονίων:



Η σταθερά ισορροπίας παρόμοιων αντιδράσεων απεικονίζεται ως  $K^*$ . Οι τιμές των σταθερών  $K^*$  μπορούν εύκολα να προκύψουν από τις σταθερές σχηματισμού:

$$\log K^* = \log \beta(MH_jL) - \log \beta(H_nL) \quad (17)$$

Με βάση τις ολικές σταθερές σχηματισμού και τις γνωστές αρχικές συγκεντρώσεις μετάλλου – πεπτιδίου, μπορεί να σχεδιαστεί το διάγραμμα κατανομής των σωματιδίων, συναρτήσει των τιμών pH του διαλύματος.



**Σχήμα 3:** Παράδειγμα διαγράμματος κατανομής σωματιδίων (συμπλόκων)

Το διάγραμμα αυτό είναι σημαντικό γιατί μας επιτρέπει να επιλέξουμε τις τιμές pH στις οποίες θα πραγματοποιήσουμε τη φασματοσκοπική μελέτη, δηλαδή θα δούμε την τιμή pH στην οποία μεγιστοποιείται το μοριακό κλάσμα κάθε συμπλόκου. Επίσης, μας δείχνει τα σύμπλοκα που επικρατούν σε φυσιολογικές τιμές pH. [6]-[10]

#### 6.4.2 Πειραματική πορεία ποτενσιομετρίας

Τα πειράματα ποτενσιομετρίας πραγματοποιήθηκαν σε ποτενσιόμετρο τύπου Molspin συνδεδεμένο με αυτόματη προχοίδα και ηλεκτρόδιο υάλου||Ag|AgCl. Το σύστημα είναι πλήρως αυτοματοποιημένο και ελέγχεται από H/Y με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού. Ο προσδιορισμός των θερμοδυναμικών παραμέτρων (σταθερές ιοντισμού, ολικές σταθερές σχηματισμού, κλπ) τόσο των ελεύθερων πεπτιδίων όσο και των συστημάτων Cu(II)-πεπτιδίων σε μοριακή αναλογία 1:1.1-1.3 πραγματοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα ιοντικής ισχύος 0.1 (KNO<sub>3</sub>) και σε θερμοκρασία 298 K (25° C). Για κάθε σύστημα πραγματοποιήθηκαν τρεις ογκομετρήσεις. Πιο συγκεκριμένα η πορεία εργασίας έχει ως εξής:

##### a) Βαθμονόμηση ηλεκτροδίου υάλου

Πραγματοποιήθηκε με ογκομέτρηση πρότυπου διαλύματος, που περιείχε 0.1 ml HNO<sub>3</sub> 0.1 M και 2.5 ml KNO<sub>3</sub> 0.1 M με πρότυπο διάλυμα KOH. [8] Στη συνέχεια, με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Glee) προσδιορίστηκαν οι παράμετροι E<sup>0</sup> και S της τροποποιημένης εξίσωσης Nerst για το ηλεκτρόδιο υάλου:

$$E = E^0 - S \text{ pH} \quad (18)$$

Όπου E: δυναμικό του ηλεκτροδίου

E<sup>0</sup>: δυναμικό του ηλεκτροδίου όταν pH = 0

S: η κλίση του ηλεκτροδίου (mV/pH)

##### b) Προσδιορισμός τιμών logβ και pK<sub>a</sub> για τα πεπτίδια Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub> και Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub>

Πραγματοποιήθηκαν ογκομετρήσεις διαλυμάτων των πεπτιδίων συγκέντρωσης 2.3 mM και 2.6 mM αντίστοιχα και όγκου 2 ml (ιοντική ισχύς 0.1 M KNO<sub>3</sub>) στους 25°C με πρότυπο διάλυμα KOH (ελεύθερων ανθρακικών ιόντων), υπό ροή αερίου αργού.

##### c) Προσδιορισμός τιμών logβ και pK<sub>a</sub> για τα συστήματα πεπτιδίων Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub> και Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub> με Cu(II)

Οι ογκομετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με πρότυπο διάλυμα KOH. Τα συστήματα περιείχαν πεπτίδιο συγκέντρωσης 2.3 mM και 2.6 mM αντίστοιχα και ιόντα

Cu(II) συγκέντρωσης 2 mM (ιονική ισχύς 0.1M KNO<sub>3</sub>). Οι ογκομετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25°C με πρότυπο διάλυμα KOH (ελεύθερο ανθρακικών ιόντων), υπό ροή αερίου αργού. Η προσομοίωση των πειραματικών με τις αντίστοιχες θεωρητικές καμπύλες ογκομέτρησης καθώς και η εξαγωγή των παραπάνω τιμών για τα συστήματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (Hyperquad) [11].

## 6.5 Φασματοσκοπικές Τεχνικές

Η χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών για την επαλήθευση του είδους των συμπλόκων που σχηματίζονται από την ένταξη των ιόντων Cu(II) στα πεπτίδια που μελετώνται, πραγματοποιήθηκε σε τιμές pH που αντιστοιχούν στη μέγιστη συγκέντρωσή τους, όπως εκτιμάται από τα υπολογιζόμενα διαγράμματα κατανομής των σχηματιζόμενων σωματιδίων. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι : (i) Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), (ii) Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR), (iii) Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), (iv) Φασματομετρία μάζας ESI-MS.

### 6.5.1 Φασματοσκοπία UV/Vis

#### Εισαγωγικές έννοιες

Η απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή υπεριώδους (Ultra Violet, UV) και ορατού (Visible, VIS) είναι αποτέλεσμα των ενεργειακών μεταβολών στην ηλεκτρονική δομή των μορίων. Η περιοχή υπεριώδους είναι μεταξύ 10 και 380 nm μήκους κύματος και η περιοχή ορατού μεταξύ 380 και 780 nm. Η απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων σθένους. Οι συχνότερα παρατηρούμενες ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις, είναι d-d μεταπτώσεις, π-π\* μεταπτώσεις μεταξύ των υποκαταστατών και ταινίες μεταφοράς φορτίου από το μέταλλο στον υποκαταστάτη και αντίστροφα.

Η ενέργεια και η ένταση των ταινιών απορρόφησης, παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για το είδος των υποκαταστατών που περιβάλλουν ένα μεταλλικό ιόν, όπως και για την γεωμετρία των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Τα σύμπλοκα των μετάλλων των στοιχείων μετάπτωσης, που περιέχουν μη συμπληρωμένα d τροχιακά,

εμφανίζουν χαρακτηριστικά φάσματα στην ορατή περιοχή. Η απορρόφηση οφείλεται στην άρση του εκφυλισμού των d τροχιακών.

Πειραματικά οι εντάσεις των ταινιών απορρόφησης μετρούνται με το μοριακό συντελεστή απορρόφησης ( $\epsilon$ ). Η απορρόφηση ( $A$ ) σε ένα μήκος κύματος  $\lambda$  είναι μέτρο της σχετικής έντασης μιας δέσμης φωτός πριν ( $I^0$ ) και αφότου ( $I$ ) περάσει διαμέσου ενός διαλύματος, που περιέχει την ουσία που απορροφά, και δίνεται από τον νόμο Lambert-Beer:

$$A = \log ( I^0 / I ) = \epsilon c l, \quad (19)$$

Όπου  $c$  είναι η συγκέντρωση (M)

$l$  είναι το μήκος οπτικής διαδρομής εντός της κυψελίδας (cm) και  
 $\epsilon$  η μοριακή απορροφητικότητα ( $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ).

Από τη μελέτη μεγάλου πλήθους συμπλόκων Cu(II)-πεπτιδίων με διαφορετικά άτομα δότες στο ισημερινό επίπεδο οι Sigel και Martin πρότειναν την παρακάτω εξίσωση με τη βοήθεια της οποίας είναι δυνατή η θεωρητική πρόβλεψη της σφαίρας ένταξης του Cu(II) στο ισημερινό επίπεδο με μικρή απόκλιση [12]:

$$\lambda_{\max} = 10^3 / [0.294 (\text{C=O}, \text{H}_2\text{O}) + 0.346 (\text{COO}^-) + 0.434(\text{N}_{\text{Im}}) + 0.460 (\text{NH}_2) + 0.494 (\text{N}^-)] \quad (20)$$

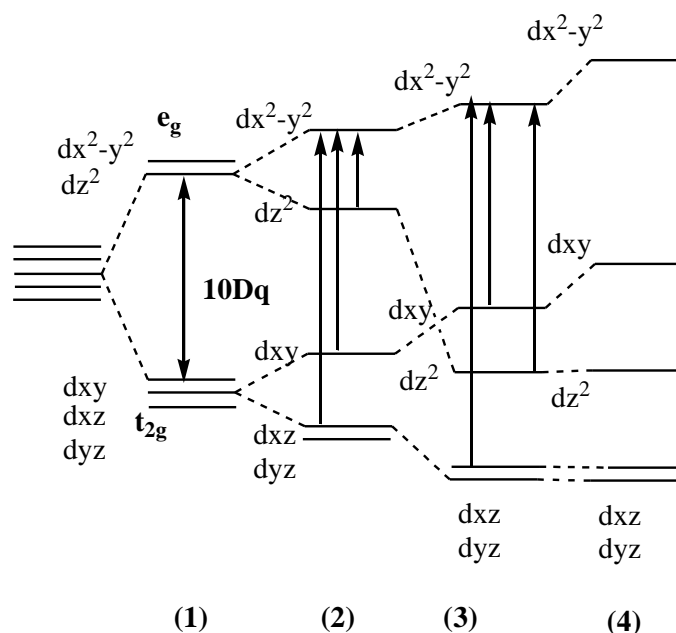
( $\text{N}_{\text{Im}}$  = ιμιδαζολικό άτομο αζώτου,  $\text{N}^-$  = αμιδικό άτομο αζώτου)

Με τη σχέση αυτή μπορεί να υπολογιστεί η τιμή  $\lambda_{\max}$  αν γνωρίζουμε το πλήθος και το είδος των χαρακτηριστικών ατόμων δοτών που εντάσσονται στο ισημερινό επίπεδο (πίνακας 1). Από τις τιμές  $\lambda_{\max}$  και  $\epsilon$  που προκύπτουν από τη φασματοσκοπία ορατού μπορούμε να εξάγουμε πληροφορίες σχετικά με τη φύση των ατόμων δοτών που εντοπίζονται στη σφαίρα ένταξης των μεταλλικών ιόντων σε σύμπλοκα με πεπτίδια. Μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ θεωρητικά προβλεπόμενης και πειραματικά προσδιοριζόμενης τιμής, προς την περιοχή του ερυθρού (μεγαλύτερες τιμές  $\lambda_{\max}$ ) αποτελούν ένδειξη αξονικής ένταξης ατόμου δότη ισχυρότερου του ατόμου O του  $\text{H}_2\text{O}$ .

**Πίνακας 1:** Εφαρμογή της εξίσωσης Sigel-Martin για διάφορα άτομα δότες στο ισημερινό επίπεδο

α/α	άτομα δότες	$\lambda_{\max}$ (nm)
1	1 $N_{im}$ , 3 O ( $H_2O$ )	760
2	1 $N_{im}$ , 2 O ( $H_2O$ ), 1 O ( $COO^-$ )	731
3	1 $N_{im}$ , 1 $N^-$ , 2 O ( $H_2O$ )	660
4	1 $N_{im}$ , 1 $N^-$ , 1 O ( $H_2O$ ), 1 O ( $COO^-$ )	637
5	1 $N_{im}$ , 2 $N^-$ , 1 O ( $H_2O$ )	583
6	1 $N_{im}$ , 3 $N^-$	522

Στα φάσματα ορατού συμπλόκων  $Cu(II)$ , ηλεκτρονιακής απεικόνισης  $d^9$ , παρουσιάζεται το φαινόμενο Jahn-Teller και μπορούν να ερμηνευθούν με τη βοήθεια του παρακάτω σχήματος.



**Σχήμα 4:** Ενεργειακό διάγραμμα  $d$  τροχιακών ενός ηλεκτρονίου στην περίπτωση (1) οκταεδρικής γεωμετρίας (2) τετραγωνικά παραμορφωμένης με ελαφρά επιμήκυνση των δεσμών στην αξονική θέση (3) τετραγωνικά παραμορφωμένης με μεγάλη επιμήκυνση των δεσμών στην αξονική θέση και παράλληλη ισχυροποίηση των δεσμών στο ισημερινό επίπεδο (4) επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Τα βέλη στις περιπτώσεις (2) και (3) υποδηλώνουν τις παρατηρούμενες ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις

Με βάση το παραπάνω σχήμα γίνεται εμφανές ότι αντί μιας ταινίας που αντιστοιχεί στην μετάπτωση  $t_{2g} \rightarrow e_g$  (σχήμα) αναμένονται περισσότερες. Στα



τετραγωνικά παραμορφωμένα σύμπλοκα αναμένονται θεωρητικά τρεις ταινίες που αντιστοιχούν στις μεταπτώσεις  $dxz, dyz \rightarrow dx^2-y^2$  ( ${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2E_g$ ),  $dxy \rightarrow dx^2-y^2$  (ενεργειακής διαφοράς ίσης με  $\Delta o = 10Dq$  ( ${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2B_{2g}$ )) και  $dz^2 \rightarrow dx^2-y^2$  ( ${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2A_{1g}$ ).

Όπως φαίνεται και στο σχήμα η ταινία μεγάλης ενέργειας  $dxz, dyz \rightarrow dx^2-y^2$  (μικρού μήκους κύματος) παρουσιάζει κυανή μετατόπιση (δηλαδή μετατόπιση προς μικρότερα μήκη κύματος). Με άλλα λόγια, όσο εξασθενούν οι αξονικές αλληλεπιδράσεις, τόσο αυξάνει η τετραγωνική παραμόρφωση. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται ως εξής: καθώς το μήκος δεσμού Cu(II)-υποκαταστατών αυξάνεται στην αξονική θέση (εξασθένιση αλληλεπίδρασης), η αλληλεπίδραση στο ισημερινό επίπεδο αυξάνει. Αυτό σταθεροποιεί περισσότερο τα τροχιακά με χαρακτήρα z (ενεργειακή μείωση) και αποσταθεροποιεί αυτά με χαρακτήρα x,y (ενεργειακή αύξηση). Η ενεργειακή διαφορά  $dxz, dyz - dx^2-y^2$  αυξάνει και η ταινία παρουσιάζεται σε μικρότερο μήκος κύματος (περιπτώσεις 2,3 σχήματος 4).

Η ισχυροποίηση των δεσμών στο ισημερινό επίπεδο (με παράλληλη εξασθένιση στο αξονικό) παρατηρείται κατά τη διαδοχική αντικατάσταση μορίων  $H_2O$  από άτομα δότες αζώτου (ιμιδαζόλιο, αμιδικά). Ένα άλλο αποτέλεσμα της σταδιακής μετάβασης σε γεωμετρία μικρότερης συμμετρίας από την οκταεδρική είναι η συνεχόμενη αύξηση του συντελεστή ε. Παράλληλα είναι δυνατόν να μεταβούμε και από την περίπτωση 3 στην περίπτωση 2 του σχήματος (μείωση τετραγωνικής παραμόρφωσης). Αυτό μπορεί να συμβεί αν σε ένα σύμπλοκο με μεγάλη τετραγωνική παραμόρφωση ενταχθεί υποκαταστάτης στην αξονική θέση, ο οποίος αλληλεπιδρά ισχυρότερα (μικρότερο μήκος δεσμού) από τον ήδη υπάρχον. Η τετραγωνική παραμόρφωση μειώνεται και παρατηρείται μετατόπιση προς το ερυθρό (προς μεγαλύτερα μήκη κύματος). [12]-[16]

### Λήψη φασμάτων UV/Vis

Για την καταγραφή φασμάτων ορατού (Vis) χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UVPC-2401. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους  $25^\circ C$ , στη φασματική περιοχή 350-850 nm. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε κυβελίδες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Συγκεκριμένα, αρχικά παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα του συστήματος πεπτιδίου:Cu(II). Στο διάλυμα προστίθενται διαδοχικά μικρές ποσότητες αραιού υδατικού διαλύματος KOH, καταγράφεται η τιμή pH (με τη βοήθεια ηλεκτροδίου συνδυασμού υάλου ||Ag|AgCl) και λαμβάνεται το φάσμα σε διάφορες τιμές pH (εύρος τιμών pH 5-12). Οι τιμές pH που επιλέχθηκαν αντιστοιχούν στο

μέγιστο των καμπυλών κατανομής για κάθε σωματίδιο και προκύπτουν από την επεξεργασία των ποτενσιομετρικών δεδομένων. [13]-[16]

## 6.5.2 Φασματοσκοπία EPR

### Εισαγωγικές έννοιες

Η φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR) ή Συντονισμού Ηλεκτρονικού Spin (Electron Spin Resonance, ESR), είναι παρόμοια με τη φασματοσκοπία NMR, αλλά το φάσμα στην περίπτωση της ESR παράγεται από το συντονισμό του ηλεκτρονικού spin μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο με την επίδραση ακτινοβολίας μικροκυμάτων. Με τη βοήθεια της τεχνικής Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (ΗΠΣ) παρατηρούμε τις μεταβάσεις μεταξύ των διαφόρων κβαντικών ενεργειακών καταστάσεων της μαγνητικής ροπής ενός ασύζευκτου ηλεκτρονικού spin ( $\uparrow$ ) μέσα σε ένα εφαρμοζόμενο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.

Προϋπόθεση για τη λήψη φασμάτων EPR μίας ελεύθερης ρίζας ή ενός παραμαγνητικού κέντρου γενικότερα, είναι η ικανοποίηση της σχέσης συντονισμού:

$$E_{\uparrow} - E_{\downarrow} = \Delta E = h \nu = g_e \beta_e B \quad (21)$$

Όπου  $E_{\uparrow}$  και  $E_{\downarrow}$  οι ενεργειακές στάθμες του spin του ηλεκτρονίου (ιδιοστροφορμή), με παράλληλο και αντιπαράλληλο προσανατολισμό αντιστοίχως, ως προς εξωτερικό μαγνητικό πεδίο εντάσεως

$B$ ,  $h$  η σταθερά του Planck,

$\beta_e$  η μαγνητόνη Bohr,

$g_e$  ο τανυστής ή παράγοντας  $g$ ,  $\nu$  η συχνότητα συντονισμού στην περιοχή των μικροκυμάτων.

Κατά τη λήψη του φάσματος EPR καταγράφεται η ένταση του εξωτερικού πεδίου  $B_{\text{res}}$  για την οποία έχουμε συντονισμό. Ο πειραματικά προσδιοριζόμενος παράγοντας  $g$ , υπολογίζεται με βάση το πεδίο συντονισμού:

$$g = h \nu / B_{\text{TOP}} \beta_e \quad (22)$$

όπου  $g$ : ο παράγοντας Lande,  
 $h$  η σταθερά του Planck,  
 $\nu$  η συχνότητα συντονισμού στην περιοχή των μικροκυμάτων,  
 $B_{\text{τοπ}}$  πεδίο συντονισμού,  
 $\beta_e$  η μαγνητόνη Bohr.

Οι πυρήνες των μετάλλων στοιχείων μετάπτωσης, διαθέτουν επίσης πυρηνικό spin ( $I$ ) (π.χ  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $I=3/2$ ) που μπορεί να συζευχθεί με το spin του ασύζευκτου ηλεκτρονίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την κατάτμηση των κορυφών του EPR φάσματος σε πολλαπλές κορυφές, ο αριθμός των οποίων δίνεται από τη γενική σχέση  $2I+1$ , όπου  $I$  ο πυρηνικός κβαντικός αριθμός του spin. Η τιμή  $g$  σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό στοιχείο για την ταυτοποίηση του υπό μελέτη συστήματος. Επίσης, σημαντικές πληροφορίες παρέχει και η σταθερά υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης  $A$  που περιγράφει την αλληλεπίδραση ηλεκτρονικών-πυρηνικών spin. [17], [18]

Τα φάσματα EPR συμπλόκων του ιόντος  $\text{Cu(II)}$  με πεπτιδία χαρακτηρίζονται γενικά από αξονική συμμετρία, χαρακτηριστική της τετραγωνικά παραμορφωμένης οκταεδρικής γεωμετρίας τους, με τον παράγοντα  $g_{\parallel}=g_z > g_x=g_y=(g_{\perp})$  και τον τελεστή υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης  $A_{\parallel}=A_z > A_x=A_y=(A_{\perp})$ . Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι στην περιοχή του φάσματος που εντοπίζονται τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά  $g_{\parallel}$ ,  $A_{\parallel}$  θα εμφανίζονται τέσσερις φασματικές γραμμές λιγότερο ή περισσότερο διευρυμένες (λόγω της σύζευξης ηλεκτρονιακού ( $S=1/2$ ) με το πυρηνικό spin του  $\text{Cu}$  ( $I=3/2$ )). Αυτή η περιοχή αξιοποιείται περισσότερο για τη εξαγωγή πληροφοριών σχετικά με τη σφαίρα ένταξης του  $\text{Cu(II)}$ . Αντιθέτως η περιοχή  $g_{\perp}$ ,  $A_{\perp}$  είναι σημαντικά διευρυμένη και η υπέρλεπτη αλληλεπίδραση δεν διακρίνεται. [17] Οι τιμές των  $g_{\parallel}$ ,  $A_{\parallel}$  επηρεάζονται σημαντικά τόσο από την αλλαγή του τρόπου ένταξης στην αξονική θέση όσο και από τη γεωμετρία. Από τη μελέτη μεγάλου πλήθους συμπλόκων  $\text{Cu(II)}$ -πεπτιδίων με φασματοσκοπία EPR [19-22] προκύπτει ως γενικό συμπέρασμα ότι κατά τη διαδοχική αντικατάσταση μορίων  $\text{H}_2\text{O}$  από άτομα δότες αζώτου στο ισημερινό επίπεδο των ιόντων  $\text{Cu(II)}$  παρατηρείται μείωση της τιμής του παράγοντα  $g_{\parallel}$  και αύξηση της τιμής  $A_{\parallel}$ . Το εύρος μεταβολής των παραπάνω ποικίλλει και είναι ενδεικτικό της σφαίρας ένταξης του ιόντος και της γεωμετρίας που υιοθετεί. [23]

### Λήψη φασμάτων EPR

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε φασματογράφο Bruker ER200D εξοπλισμένο με έναν μετρητή συχνότητας Agilent 5310A, σε θερμοκρασία υγρού αζώτου (77 K) και συχνότητα 9.53 GHz. Τα δείγματα προς μέτρηση προετοιμάστηκαν ως εξής: αρχικά παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα του συστήματος πεπτιδίου : Cu(II). Στο διάλυμα προστίθενται διαδοχικά μικρές ποσότητες αραιού υδατικού διαλύματος KOH, καταγράφεται η τιμή pH (με τη βοήθεια ηλεκτροδίου συνδυασμού υάλου ||Ag|AgCl) και λαμβάνεται το φάσμα σε διάφορες τιμές pH (εύρος τιμών pH 5-12). Στα δείγματα προστέθηκε 10% διάλυμα γλυκερόλης. Οι τιμές pH που επιλέχθηκαν αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής για κάθε σωματίδιο και προκύπτουν από την επεξεργασία των ποτενσιομετρικών δεδομένων.

### 6.5.3 Φασματοσκοπία NMR

#### Εισαγωγικές έννοιες

Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear magnetic resonance, NMR) είναι ένα φυσικό φαινόμενο στο οποίο οι πυρήνες σε ένα μαγνητικό πεδίο απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Αυτή η ενέργεια έχει μια συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού που εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες του ισότοπου των ατόμων. Το NMR επιτρέπει την παρατήρηση ειδικών κβαντικών μαγνητικών ιδιοτήτων του ατομικού πυρήνα. Η συχνότητα συντονισμού των πυρήνων του υδρογόνου στις διάφορες ομάδες δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον και το είδος του δεσμού.

Η μεγάλη σημασία των φασμάτων NMR οφείλεται στην ύπαρξη αυτού του φαινομένου, που είναι γνωστό ως χημική μετατόπιση. Οι χημικές μετατοπίσεις είναι απαραίτητες για την κατανόηση περαιτέρω μελετών, π.χ. δομικά δεδομένα, δυναμική και αλληλεπιδράσεις. Για τις πρωτεΐνες οι χημικές μετατοπίσεις είναι διαγνωστικές της δευτερογενούς δομής: π.χ. α- έλικα. Οι χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  ενός αμινοξέος προσδιορίζονται από την ομοιοπολική δομή (τύπος αμινοξέος), τα γειτονικά κατάλοιπα, τις αλληλεπιδράσεις στο χώρο κοντινών αμινοξέων και το διαλύτη.

Με τη φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (NMR 2D, Two Dimensional NMR), ο επιστήμονας έχει τη δυνατότητα να χαρακτηρίσει επιπλέον τη μαγνητική αλληλεπίδραση των πυρήνων σε συνάρτηση με τη δομική διάταξη στο μόριο και τη γειτνίαση στο χώρο. Τα φάσμα NMR δύο διαστάσεων (2D NMR) είναι συνδυασμός

αρκετών απλών φασμάτων που έχουν σαφώς μεγαλύτερο πλεονέκτημα από τα απλά φάσματα στην ερμηνεία της δομής οργανικών ενώσεων. Στο φάσμα 2D NMR οργανικών ενώσεων γίνεται καταγραφή μαγνητικών πληροφοριών σε δύο διαστάσεις. Στη μία διάσταση καταγράφονται συνήθως οι απορροφήσεις ενός συγκεκριμένου πυρήνα μιας οργανικής ουσίας και στην άλλη διάσταση οι σταθερές σύζευξης ή απορρόφησης άλλων πυρήνων που αλληλεπιδρούν ή συσχετίζονται με τους πυρήνες της πρώτης διάστασης. [13], [24]-[27]

Για την πορεία ταυτοποίησης των πυρήνων  $^1\text{H}$  πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες τεχνικές:

- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY: Η χρήση της φασματοσκοπίας ολικού συσχετισμού TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) μπορεί να συσχετίσει όλους τους πυρήνες ενός συγκεκριμένου συστήματος σπιν, όπως π.χ. τα πρωτόνια μιας αλειφατικής αλυσίδας.
- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY: Η τεχνική NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) στηρίζεται στην αλληλεπίδραση πυρήνων μεταξύ των αξόνων, όπου συμβαίνει ομοπυρηνική επίδραση διπόλου-διπόλου. Το φάσμα που λαμβάνεται είναι παρόμοιο με το COSY, με διαγώνιες και σταυρωτές κορυφές, ωστόσο οι διασταυρούμενες κορυφές συνδέουν πυρήνες που βρίσκονται πιο κοντά στο χώρο σε σχέση με εκείνα που συνδέονται με δεσμό. Το μεγάλο μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι για ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους μεταξύ 1000 και 3000 οι διασταυρούμενες κορυφές εξαφανίζονται εξαιτίας της εξάρτησης του φαινομένου NOE από το χρόνο συσχέτισης. Αντίθετα, το φαινόμενο NOE στο περιστρεφόμενο πλαίσιο και υπό συνθήκες 'κλειδώματος των σπιν' είναι πάντα θετικό. [17]

### Λήψη φασμάτων NMR

Για την καταγραφή των φασμάτων NMR μιας και δύο διαστάσεων ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  TOCSY,  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  NOESY) των ελεύθερων πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε όργανο Bruker Avance με συχνότητα συντονισμού  $^1\text{H}$  500MHz. Ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης ήταν μίγμα  $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  σε αναλογία 9:1 v/v (για την παρατήρηση των σημάτων των αμιδικών

πρωτονίων) και η θερμοκρασία καταγραφής 298 K. Η συγκέντρωση των πεπτιδίων ήταν 5mM και η τιμή pH 2.5.

#### 6.5.4 Φασματομετρία μάζας ESI-MS

##### Εισαγωγικές έννοιες

Η πιο δημοφιλής μέθοδος για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των πεπτιδίων είναι η φασματομετρία μάζας, η οποία παρέχει μεγάλη ευαισθησία, εξειδίκευση και ταχύτητα στην ανάλυση των πεπτιδικών μορίων. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής αυτής στηρίζεται στον ιονισμό των μορίων και στη μετέπειτα ταξινόμηση και προσδιορισμό τους ανάλογα με την αναλογία μάζας/φορτίου ( $m/z$ ). Για τον υπολογισμό του λόγου μάζας/φορτίο χρησιμοποιείται η εξίσωση:

$$m/z = M + nH^+ / n \quad (23)$$

Όπου  $M$ : η μοριακή μάζα του δείγματος

$n$ : ο αριθμός των θετικών φορτίων

$H^+$ : η μάζα του πρωτονίου

Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι πεπτίδια και διάφορα άλλα μόρια πρωτεϊνικής φύσης εμφανίζουν πολλαπλά φορτία λόγω παρουσίας πολλών ομάδων όπως αμινομάδες και καρβοξυλομάδες που μπορούν να ιονιστούν. Με αυτόν τον τρόπο εφόσον τα φασματόμετρα μάζας ανιχνεύουν ιόντα σύμφωνα με το λίγο  $m/z$  μπορούν να ταυτοποιήσουν και ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους. [14], [28]

##### Λήψη φασμάτων ESI-MS

Για την καταγραφή των φασμάτων μάζας με την τεχνική ESI χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος μάζας Micromass Platform LC Quadrupole. Για τη λήψη των φασμάτων τα δείγματα των ελεύθερων πεπτιδίων διαλύονται σε διάλυμα  $H_2O/CH_3CN$ : 1/1 (v/v) που περιείχε 0.05% TFA.

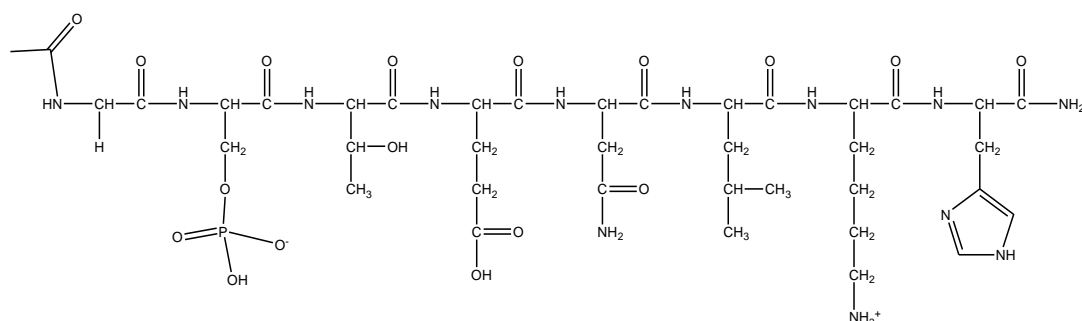
## Κεφάλαιο 7



## Αποτελέσματα - Συζήτηση

### 7.1 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub>

Η σύνθεση του πεπτιδίου Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub> (σχήμα 5) έγινε με βάση τις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield σύμφωνα με την Fmoc/tBu στρατηγική [1] και ταυτοποιήθηκε με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας (ESI-MS) καθώς και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

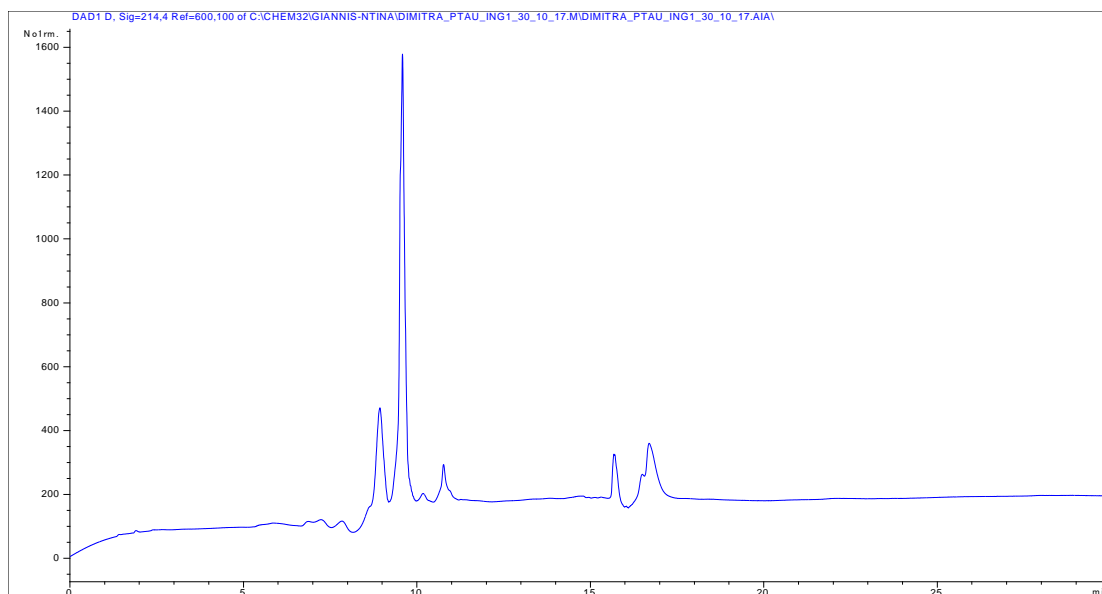


**Σχήμα 5:** Το οκταπεπτίδιο Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub>

Το ποσό της πεπτιδορητίνης που συντέθηκε ήταν 1,0068g και η απόδοση σύνθεσης 95,4%. Στη συνέχεια, μετά την αποκοπή της ρητίνης και των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, ελήφθησαν 0,152g πεπτιδίου με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 48,9%.

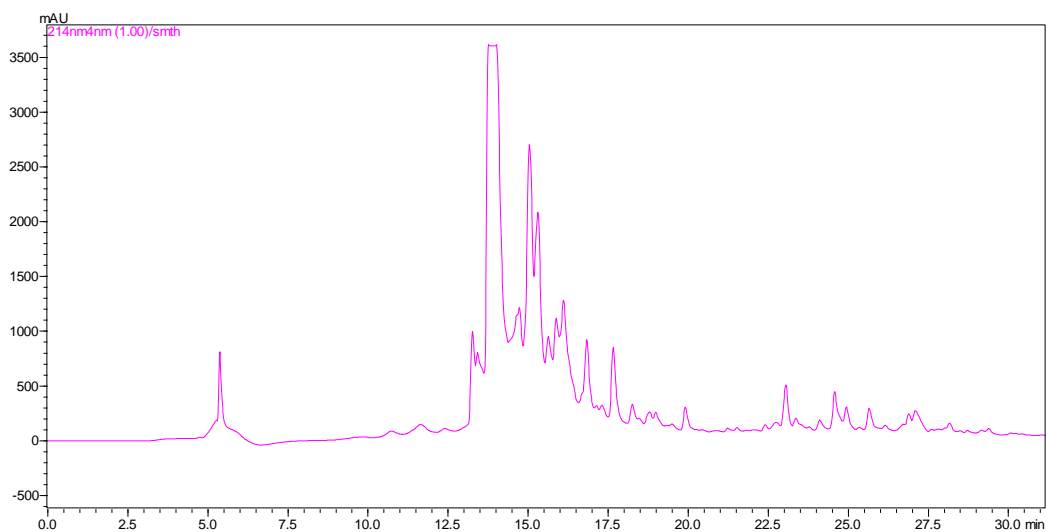
Στη συνέχεια, για τον προσδιορισμό του συστήματος έκλυσης πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC, με σύστημα έκλυσης: (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA από A/B: 100/0% σε A/B:30-70%





**Σχήμα 6:** Αναλυτική RP-HPLC, σύστημα έκλουσης: (A)  $H_2O/0.1\%$  TFA, (B)  $CH_3CN/0.1\%$  TFA από A/B: 100/0% σε A/B:30-70%

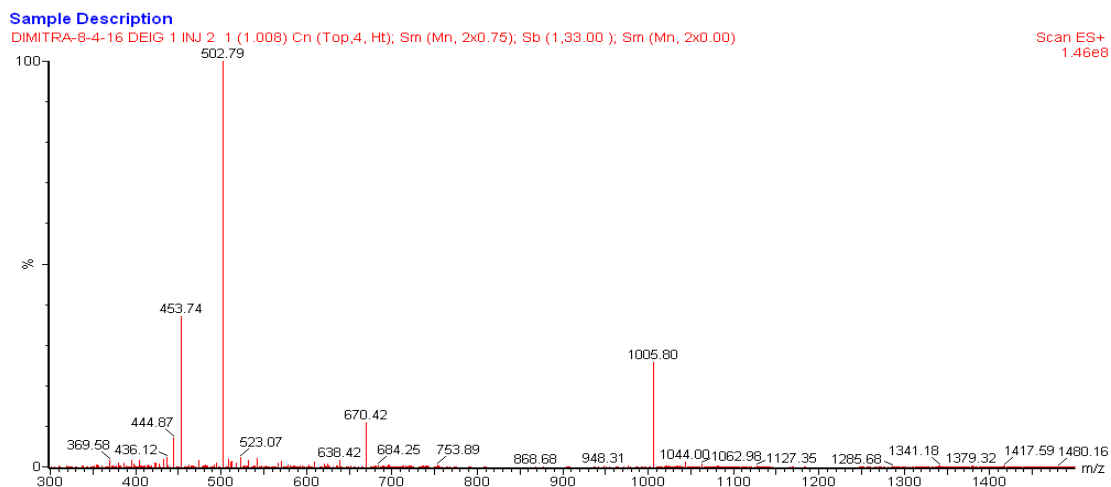
Ο καθαρισμός του ελεύθερου πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με παρασκευαστική RP-HPLC. Στο παρακάτω σχήμα 7 παρατίθεται το χρωματογράφημα του πεπτιδίου.



**Σχήμα 7:** Παρασκευαστική RP-HPLC, σύστημα έκλουσης: (A)  $H_2O/0.1\%$  TFA, (B)  $CH_3CN/0.1\%$  TFA από A/B: 100/0% σε A/B:50-50%

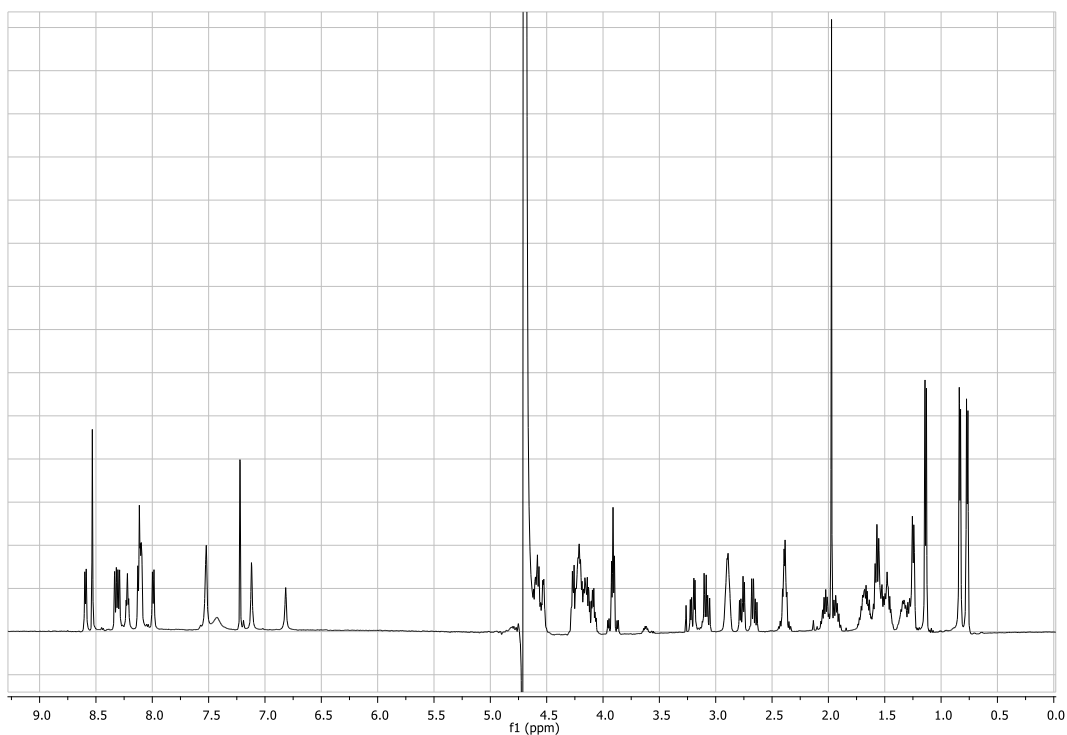
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας ESI-MS. Το φασματογράφημα παρουσιάζεται στο σχήμα 8. Η κορυφή σε τιμή  $m/z = 1005.8$  amu αποδίδεται στο μοριακό ιόν  $[L+H^+]^+$  (θεωρητική τιμή 1006.40 amu), ενώ η κορυφή σε τιμή  $m/z = 502.79$  amu στο  $[L+2H^+]^{2+}$ . Μικρές

αποκλίσεις μεταξύ των θεωρητικών-πειραματικών τιμών οφείλονται στον τρόπο βαθμονόμησης (mass calibration) του οργάνου.

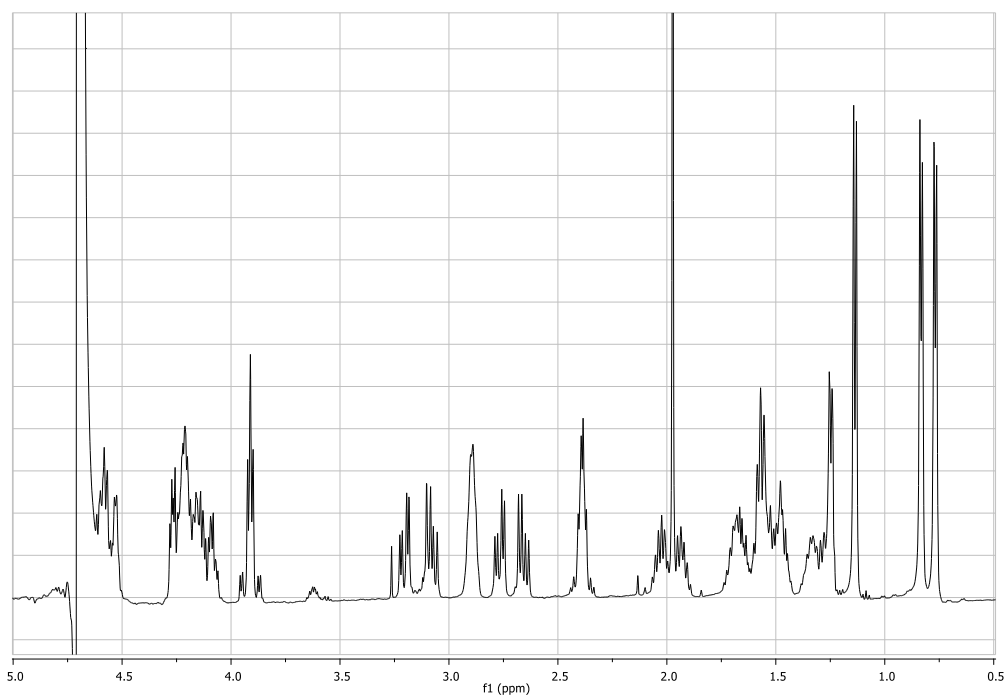


**Σχήμα 8:** Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου *Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub>*

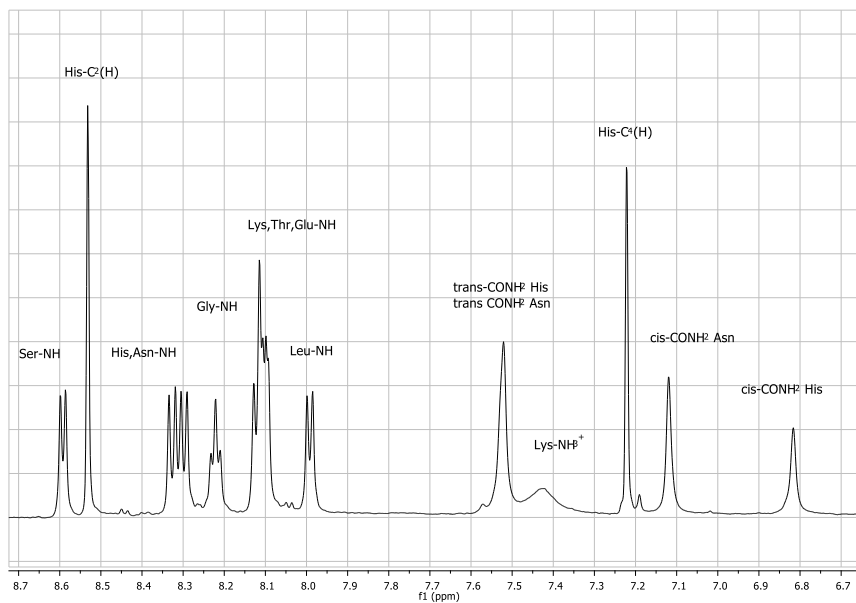
Για τον πλήρη χαρακτηρισμό του πεπτιδίου καταγράφηκαν επιπρόσθετα τα φάσματα <sup>1</sup>H (σχήματα 9, 10, 11), <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H TOCSY (σχήμα 12), <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H NOESY (σχήμα 13) σε διαλύτη H<sub>2</sub>O : D<sub>2</sub>O (9 : 1 v/v), pH=2.5, T=298 K. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των φασμάτων συνοψίζονται στον πίνακα 2 και βρίσκονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικές τιμές για παρόμοια πεπτίδια [19-22].



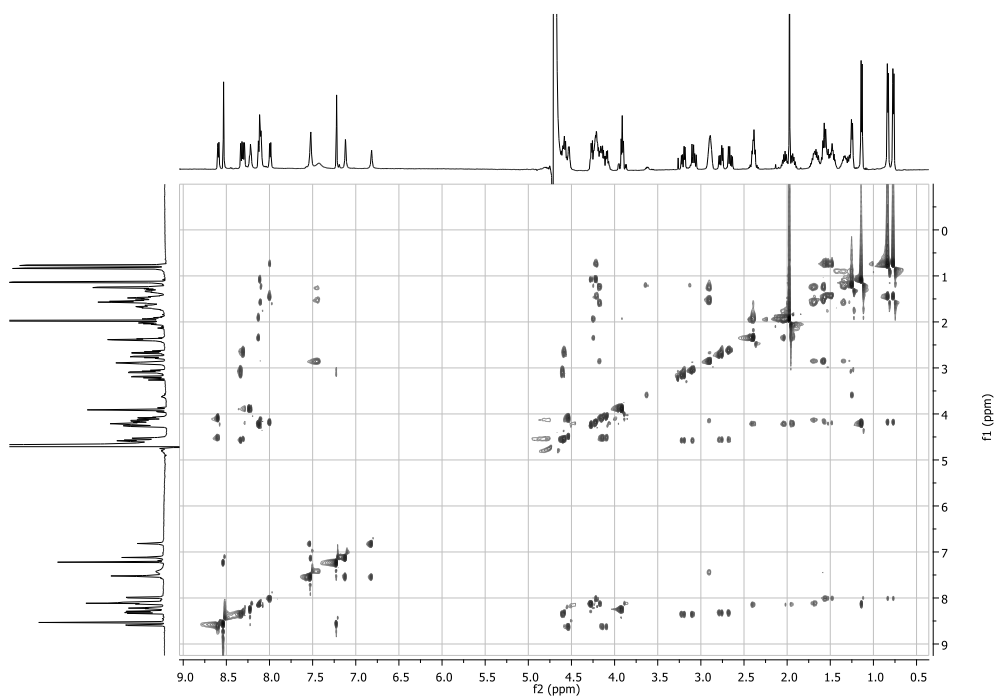
**Σχήμα 9:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του πεπτιδίου  $\text{Ac-GS(P)TENLKH-NH}_2$  σε διάλυμα  $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$  9:1,  $\text{pH}=2.5$



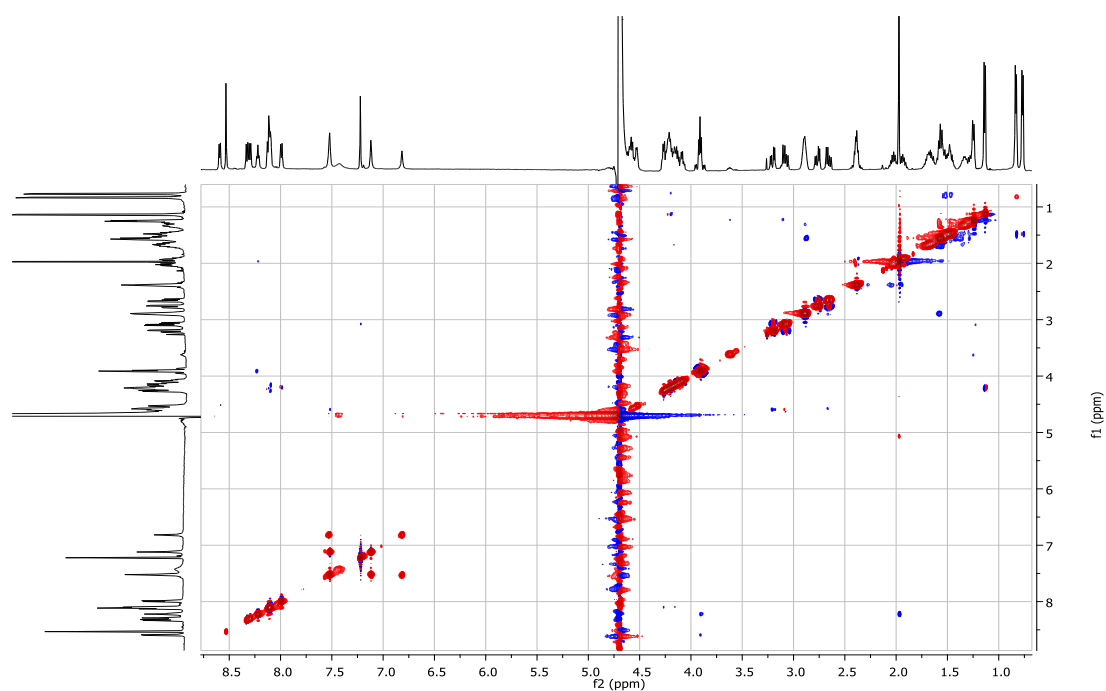
**Σχήμα 10:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του πεπτιδίου  $\text{Ac-GS(P)TENLKH-NH}_2$  (0.5-5.0 ppm) σε διάλυμα  $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$  9:1,  $\text{pH}=2.5$



**Σχήμα 11:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του πεπτιδίου  $\text{Ac-GS(P)TENLKH-NH}_2$  (6.6-8.8 ppm), σε διάλυμα  $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$  9:1,  $\text{pH}=2.5$



**Σχήμα 12:** Φάσμα  $^1\text{H-}^1\text{H-TOCSY}$  NMR του πεπτιδίου  $\text{Ac-GS(P)TENLKH-NH}_2$  σε διάλυμα  $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$  9:1,  $\text{pH}=2.5$



**Σχήμα 13:** Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY NMR του πεπτιδίου Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub> σε διάλυμα H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, pH=2.5, T=298 K

**Πίνακας 2:** Χημικές μετατοπίσεις (δ, ppm)  $^1\text{H}$  του πεπτιδίου Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub> (pH = 2.5, T = 298K)

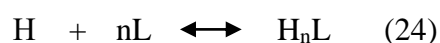
	αH	βH	γH	γCH <sub>2</sub>	CONH <sub>2</sub>	δCH <sub>2</sub>	δCH <sub>3</sub>	εCH <sub>2</sub>	εNH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	C <sub>2</sub> H	C <sub>4</sub> H	NH
<b>Ac</b>	1.97											
<b>Gly</b>	3.91 3.96	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	8.23
<b>Ser</b>	4.53	4.09, 4.14	---	---	---	---	---	---	---	---	---	8.60
<b>Thr</b>	4.22	4.27	1.14	---	---	---	---	---	---	---	---	8.11
<b>Glu</b>	4.28	1.95, 2.03	2.40	---	---	---	---	---	---	---	---	8.09
<b>Asn</b>	4.58	2.67, 2.76	---	---	7.52(trans) 6.67(cis)	---	---	---	---	---	---	8.30
<b>Leu</b>	4.21	1.52, 1.55	1.52 1.55	---	---	---	0.83, 0.77	---	---	---	---	8.00
<b>Lys</b>	4.17	1.69	---	1.34	---	1.58	---	2.89	7.44	---	---	8.10
<b>His</b>	4.60	3.03, 3.14	---	---	---	---	---	---	---	8.53	7.22	8.34
<b>CONH<sub>2</sub> His</b>	---	---	---	---	7.52(trans) 6.82(cis)	---	---	---	---	---	---	---

## 7.2 Αλληλεπίδραση ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub>

### 7.2.1 Ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις

#### 7.2.1.1 Προσδιορισμός τιμών pK<sub>a</sub> του ελεύθερου πεπτιδίου

Το πεπτίδιο Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub> (συμβολισμός LH<sub>4</sub>) περιέχει τέσσερις ομάδες που είναι ικανές να ιονιστούν σε περιοχή pH 2-12. Ειδικότερα, οι ομάδες αυτές περιλαμβάνουν την καρβοξυλομάδα του γλουταμικού οξέος, τη φωσφορική ομάδα της σερίνης, το άτομο αζώτου (N3) του ιμιδαζολικού δακτυλίου και την αμινομάδα της λυσίνης. Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι ολικές σταθερές πρωτονίωσης (logβ) καθώς και οι σταθερές ιονισμού (pK<sub>a</sub>) των παράπλευρων ομάδων. Οι αντιδράσεις σχηματισμού των πρωτονιωμένων σωματιδίων του πεπτιδίου περιγράφονται από την εξίσωση:



Ενώ οι ολικές σταθερές πρωτονίωσης (logβ) ορίζονται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\beta (LH_n) = [LH_n] / [H]^n [L] \quad (25)$$

Οι τιμές pK<sub>a</sub> υπολογίστηκαν ως εξής:

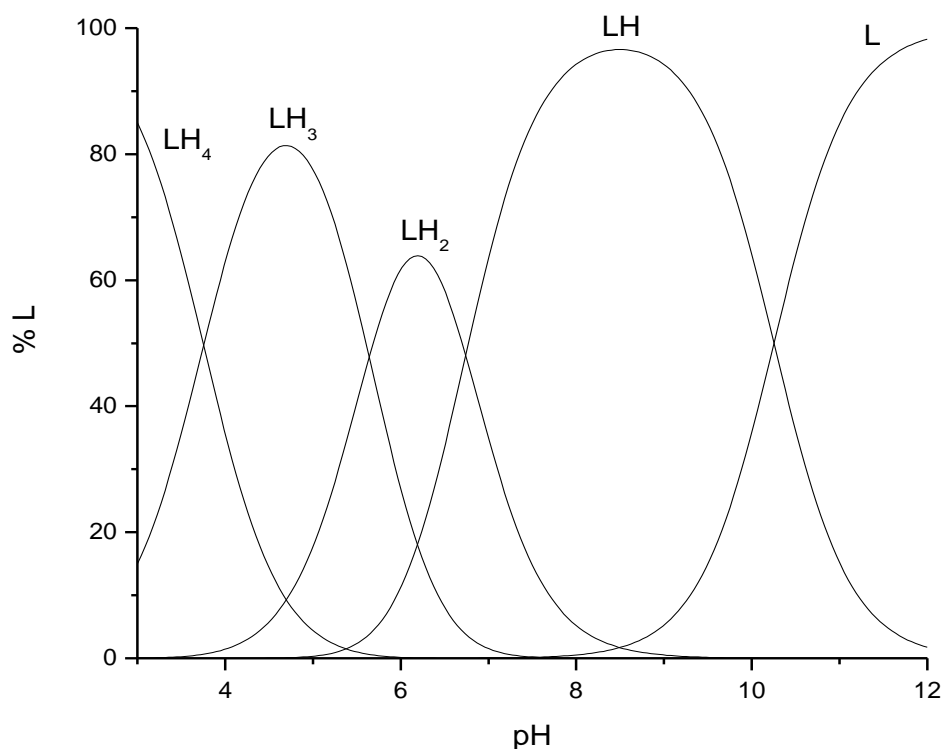
$$pK_a (LH_n) = \log\beta (LH_n) - \log\beta (LH_{n-1}) \quad (26)$$

**Πίνακας 3:** Ολικές σταθερές πρωτονίωσης και τιμές pK<sub>a</sub> για το πεπτίδιο Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub> (T = 298K, I = 0.1M KNO<sub>3</sub>)

Σωματίδια	logβ (*)	pK <sub>a</sub>	Χαρακτηριστική ομάδα
LH <sub>4</sub>	26.39(2)	3.76	Glu-γ-COOH
LH <sub>3</sub>	22.63(1)	5.64	Ser-(HPO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
LH <sub>2</sub>	16.99(1)	6.74	His-Im
LH	10.25(1)	10.25	Lys-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>

\*Τυπική απόκλιση \*10<sup>-2</sup>

Στο παρακάτω σχήμα 14 παρουσιάζεται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων.



**Σχήμα 14:** Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του πεπτιδίου  $Ac-GS(P)TENLKH-NH_2$  ( $C_{peptide} = 2.3 \text{ mM}$ )

Από το σχήμα, είναι φανερό ότι σε πολύ όξινες τιμές pH το πεπτίδιο βρίσκεται στην πλήρως πρωτονιωμένη του μορφή  $LH_4$ . Αύξηση του pH του διαλύματος οδηγεί αρχικά στην αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας του γλουταμικού ( $Glu-\gamma-COOH$ ). Η τιμή  $pK_a = 3.76$  που υπολογίστηκε είναι μικρότερη σε σύγκριση με βιβλιογραφικές τιμές που αντιστοιχούν στον ιονισμό της ίδιας ομάδας σε πεπτίδια όπως  $-TESHAK-$ ,  $-TESAHK-$ ,  $-ELAKHA-$ ,  $-EVRHQK-$ ,  $-TRRSHTSEGTR-$  (4.04, 4.04, 4.05, 4.04, 4.01 αντίστοιχα). Η διαφορά αυτή πιθανόν οφείλεται στην ύπαρξη της φωσφορικής ομάδας η οποία ενδέχεται να σταθεροποιεί το ανιόν  $Glu-\gamma-COO^-$  λόγω σχηματισμού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου. Όπως θα φανεί και στην επόμενη ενότητα, στο μη φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο η αντίστοιχη τιμή  $pK_a$  δεν παρουσιάζει αυτή τη μεταβολή [20-22], [28-31].

Περαιτέρω αύξηση του pH οδηγεί στην αποπρωτονίωση της φωσφορικής ομάδας της σερίνης. Η τιμή  $pK_a = 5.64$  που αποδίδεται στον εν λόγω ιονισμό

συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα για πεπτίδια που περιέχουν φωσφορυλιωμένη σερίνη στην αμινοξική αλληλουχία. [32-35]

Σταδιακή αύξηση του pH οδηγεί στην αποπρωτονίωση του ατόμου N<sub>3</sub> του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης. Η υπολογιζόμενη τιμή pK<sub>a</sub> = 6.74 συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τον ίδιο τύπο ιονισμού στα πεπτίδια -EVRHQK-, -ELAKHA-, -AKRHRK-, -TESHAK-, -TESAHK- με τιμές pK<sub>a</sub> 6.26, 6.42, 6.13, 6.27, 6.23 αντίστοιχα. [20-22],[29-30],[36,37] Επιπλέον, τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν την αύξηση της βασικότητας του ιμιδαζολικού δακτυλίου της His όταν η τελευταία βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της πεπτιδικής αλληλουχίας συγκριτικά με κάποια άλλη θέση πιο μακριά από τη C-τελική θέση. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι η τιμή pK<sub>a</sub> της His του τριπεπτιδίου GlyGlyHis είναι μεγαλύτερη (pK<sub>a</sub>=6.64) απ' αυτή της His του τριπεπτιδίου GlyHisGly (pK<sub>a</sub>=6.50). [38]

Σε περισσότερο αλκαλικά διαλύματα παρατηρείται η αποπρωτονίωση της ε-αμινομάδας της λυσίνης, με τιμή pK<sub>a</sub> = 10.25. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποδεικνύουν τις τιμές pK<sub>a</sub> 10.37, 10.37, 10.41 για την ε-αμινομάδα της λυσίνης στα πεπτίδια -ELAKHA-, -TESAHK-, -TESHAK- αντίστοιχα, οι οποίες συμφωνούν με τα πειραματικά μας δεδομένα. [20-22]

#### 7.2.1.2 Αλληλεπίδραση Cu(II) : πεπτιδίου Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub>

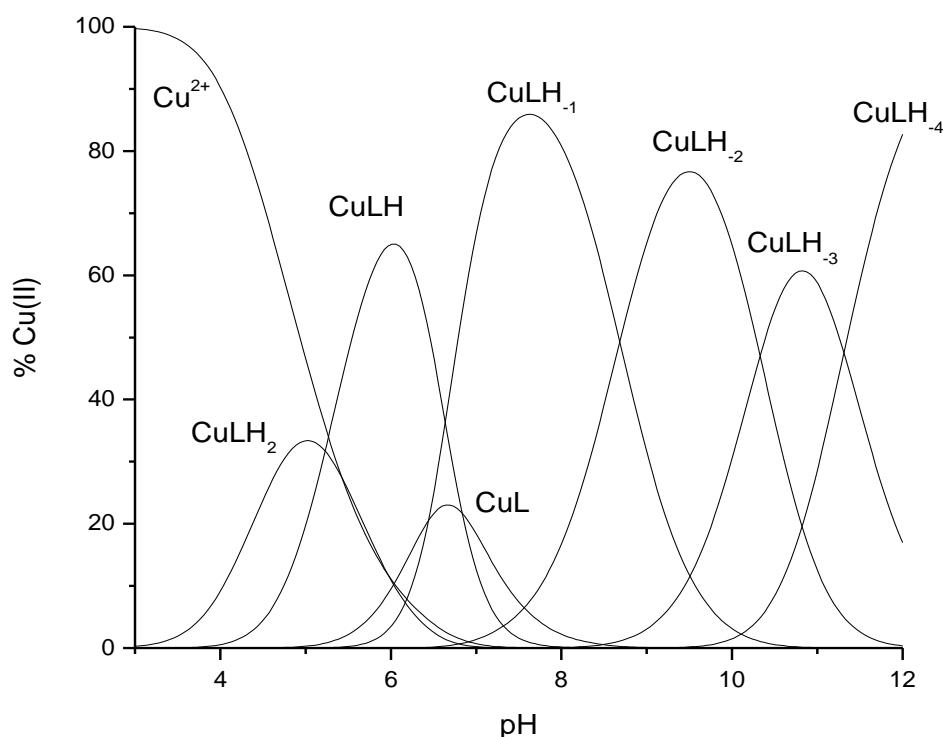
Για τη διευκρίνηση της στοιχειομετρίας και του τρόπου ένταξης του πεπτιδίου με ιόντα Cu(II) πραγματοποιήθηκαν ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις σε υδατικά διαλύματα Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O/πεπτιδίου. Τα ποτενσιομετρικά δεδομένα του συστήματος Cu(II):πεπτιδίου σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1.1, προσομοιώνονται καλύτερα θεωρώντας την ύπαρξη επτά διαφορετικών συμπλόκων (σωματιδίων), με στοιχειομετρία: CuLH<sub>2</sub>, CuLH, CuL, CuLH<sub>-1</sub>, CuLH<sub>-2</sub>, CuLH<sub>-3</sub>, CuLH<sub>-4</sub>. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται οι ολικές σταθερές σχηματισμού των σχηματιζόμενων συμπλόκων χαλκού με το συγκεκριμένο πεπτίδιο, ενώ στο σχήμα 15 παρατίθεται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων Cu(II), το οποίο σχεδιάζεται με τη βοήθεια των τιμών logβ (πίνακες 3,4).



**Πίνακας 4:** Ολικές σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων χαλκού με το πεπτίδιο Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub> (25°C, I=0.1M KNO<sub>3</sub>)

Σωματίδια	logβ (*)	pK <sub>a</sub> (**)
CuLH <sub>2</sub>	20.52(2)	-
CuLH	15.29(1)	5.23
CuL	8.45(1)	6.84
CuLH <sub>-1</sub>	2.01(1)	6.44
CuLH <sub>-2</sub>	-6.67(2)	8.68
CuLH <sub>-3</sub>	-17.00(2)	10.33
CuLH <sub>-4</sub>	-28.31(4)	11.31

\*Τυπική απόκλιση \*10<sup>-2</sup> \*\*Για την αντίδραση CuLH<sub>n</sub> ↔ CuLH<sub>n-1</sub> + H<sup>+</sup>



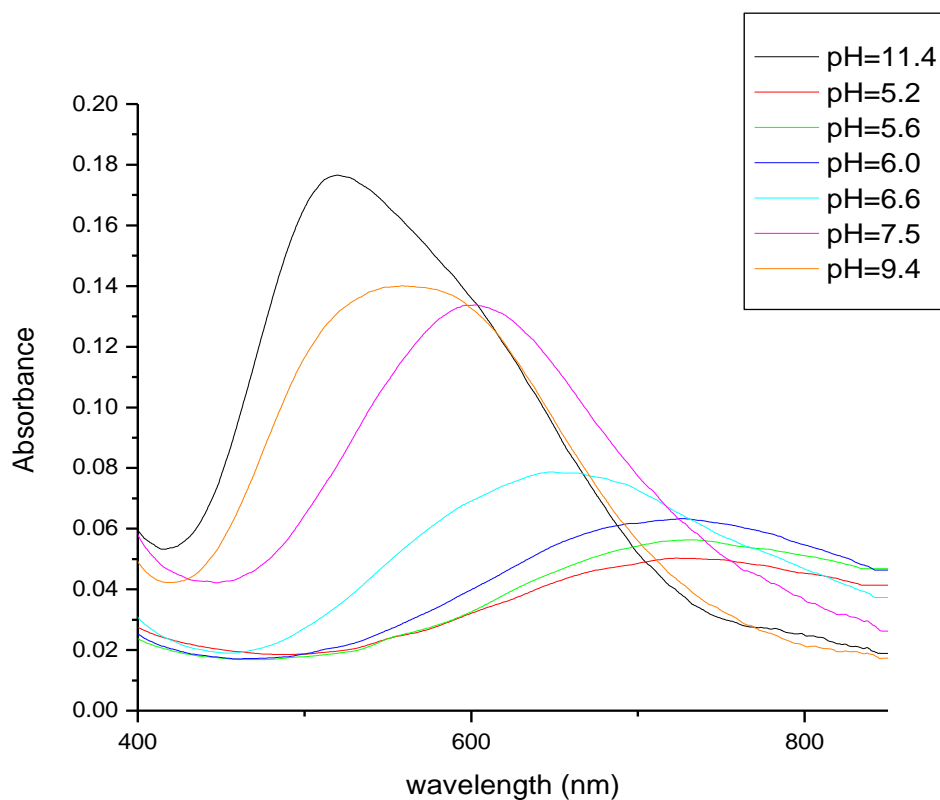
**Σχήμα 15:** Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του συστήματος Cu(II): Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub> σε αναλογία 1:1.1 [Cu<sup>2+</sup>]= 2.05 mM

Το προτεινόμενο μοντέλο περιλαμβάνει επτά σωματίδια στοιχειομετρίας 1:1.1. Όπως φαίνεται και από το σχήμα 15, η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με το χαλκό ξεκινάει από πολύ χαμηλές τιμές pH=3 και συνεχίζεται μέχρι pH=12.

## 7.3 Φασματοσκοπική μελέτη

### 7.3.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα ορατού του συστήματος Cu-πεπτιδίου σε αναλογία 1:1.1 (σχήμα 16) καταγράφηκαν σε κατάλληλες τιμές pH, οι οποίες αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής για κάθε σωματίδιο και προκύπτουν από την επεξεργασία των ποτενσιομετρικών δεδομένων. Οι υπολογιζόμενες τιμές  $\lambda_{\max}$  και  $\epsilon$  δίνονται στον πίνακα 5. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ενέργεια των d-d μεταπτώσεων των συμπλόκων Cu(II), εξαρτάται από το είδος των ατόμων δοτών που βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο. Η συνεισφορά των αμινο ή αμιδο ατόμων αζώτου είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των ατόμων οξυγόνου. Στα φάσματα ορατού παρατηρήθηκε μείωση του  $\lambda_{\max}$  – αύξηση του συντελεστή  $\epsilon$  με τη σταδιακή αύξηση του pH. Το γενικό συμπέρασμα που συνάγεται είναι ότι κατ' αυτή την πορεία επιτυγχάνεται διαδοχική αντικατάσταση των ατόμων οξυγόνου από άτομα αζώτου, στο ισημερινό επίπεδο των ιόντων Cu(II). Στην περίπτωση αντικατάστασης σε αξονική θέση, αναμένεται μικρή μεταβολή των τιμών  $\lambda_{\max}$ . [39]. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα θα συζητηθούν σε επόμενη ενότητα σε συνδυασμό και με τα αντίστοιχα θερμοδυναμικά.



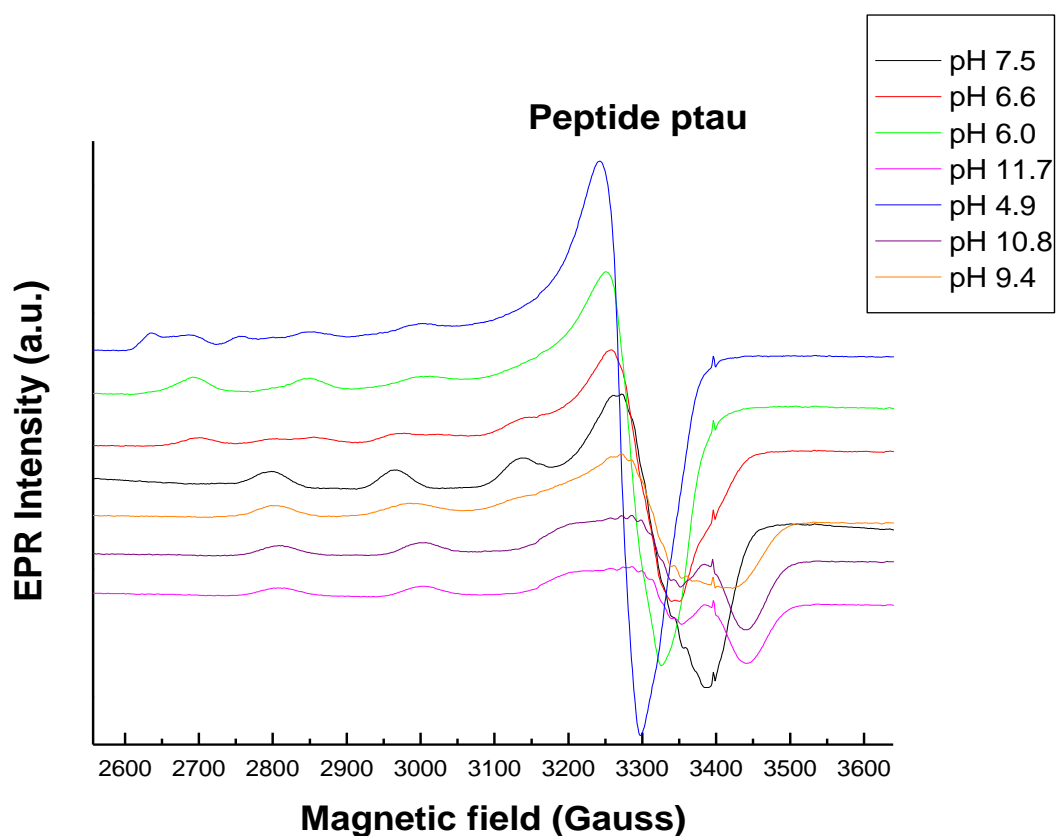
**Σχήμα 16:** Φάσματα UV-Vis υδατικού μίγματος  $\text{Cu(II)-Ac-GS(P)TENLKH-NH}_2$  (1:1.1) σε διάφορες τιμές pH ( $T=298\text{ K}$ ,  $I=0.1$  ( $\text{KNO}_3$ )).

**Πίνακας 5:** Φασματοσκοπικά δεδομένα ορατού ( $\lambda_{\text{max}}$ ,  $\epsilon$ ) του συστήματος  $\text{Cu(II)-Ac-GS(P)TENLKH-NH}_2$  (1:1.1)

pH	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$
<b>5.2</b>	732	30
<b>5.6</b>	732	35
<b>6.0</b>	728	41
<b>7.5</b>	602	97
<b>9.4</b>	558	109
<b>11.4</b>	520	149

### 7.3.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα EPR

Για το χαρακτηρισμό των σωματιδίων που σχηματίζονται καταγράφηκαν και φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού. Οι τιμές pH που επιλέχθηκαν αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής για κάθε σωματίδιο και προκύπτουν από την επεξεργασία των ποτενσιομετρικών δεδομένων. Τα φάσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 17, ενώ τα δεδομένα που προκύπτουν από την επεξεργασία τους παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Τα φάσματα EPR που παρατίθενται στο σχήμα, είναι τυπικά φάσματα με αξονική ανισοτροπία και χαρακτηρίζονται από τον παράγοντα  $g_{\parallel}$  και τη σταθερά υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης  $A_{\parallel}$  στην παράλληλη περιοχή, λόγω σύζευξης του ηλεκτρονικού spin με το πυρηνικό spin του  $\text{Cu}^{2+}$  ( $I=1/2$ ).



**Σχήμα 17:** Φάσματα EPR υδατικών διαλυμάτων  $\text{Cu(II)-Ac-GS(P)TENLKH-NH}_2$  (1:1.1) σε διάφορες τιμές pH ( $T=77\text{ K}$ ,  $I=0.1$  ( $\text{KNO}_3$ ), 10% v/v γλυκερίνη).

**Πίνακας 6:** Φασματοσκοπικά δεδομένα EPR ( $g_{\parallel}$ ,  $A_{\parallel}$ ) του συστήματος Cu(II)-Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub> (1:1.1)

<b>pH</b>	<b><math>g_{\parallel}</math></b>	<b><math>A_{\parallel}</math> (G)</b>
<b>Cu<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub></b>	2.41	122
<b>4.9</b>	a. 2.41	122
	b. 2.37	134
	c. 2.32	162
<b>6.0</b>	2.32	158
<b>7.5</b>	2.22	170
<b>9.5</b>	2.20	188
<b>10.5</b>	2.19	194
<b>11.4</b>	2.19	196

Στον πίνακα 6 παρατηρούμε ότι η τιμή του παράγοντα  $g_{\parallel}$  μειώνεται σταδιακά, ενώ αντίθετα η τιμή της σταθεράς υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης  $A_{\parallel}$  αυξάνεται. Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε αύξηση των ατόμων δοτών αζώτου στο ισημερινό επίπεδο [14]. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα θα συζητηθούν στην αμέσως επόμενη ενότητα σε συνδυασμό και με τα αντίστοιχα θερμοδυναμικά.

#### 7.4 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων

Σύμφωνα με το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (σχήμα 14, σελ 77) παρατηρείται ότι το πεπτίδιο αλληλεπιδρά με το χαλκό από πολύ χαμηλές τιμές pH. Το πρώτο σωματίδιο που σχηματίζεται για εύρος pH 3-7 είναι στοιχειομετρίας CuLH<sub>2</sub>. Για το σωματίδιο αυτό θα μπορούσε να προταθεί ότι σε τιμή pH ~ 5, όπου παρατηρείται το μέγιστο της κατανομής του, το μεταλλικό ιόν εντάσσεται με το ιμιδαζολικό άτομο αζώτου (N<sub>3</sub>) της His. Άλλωστε σε κάθε περίπτωση προστατευμένου στα τελικά άκρα πεπτιδίου που περιέχει His στην αλληλουχία του, η αρχική θέση ένταξης του χαλκού είναι το N<sub>3</sub> άτομο αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της His. [29, 31, 40] Αντίστοιχος τρόπος ένταξης παρατηρείται σε σύμπλοκα ίδιας στοιχειομετρίας (CuLH<sub>2</sub>) με τα πεπτίδια (Ac-TEAHHK-NH<sub>2</sub>, Ac-AKRHRK-NH<sub>2</sub>). [25, 36, 37]

Περαιτέρω αξίζει να αναφέρουμε ότι η τιμή  $\log K=3.53$  ( $\log K = \log \beta(\text{CuLH}_2) - \log \beta(\text{H}_2\text{L})$ ) για την αντίδραση  $\text{Cu}^{2+} + \text{LH}_2 \rightleftharpoons \text{CuLH}_2$  βρίσκεται σε καλή συμφωνία

με αντίστοιχες που χαρακτηρίζουν τις αντιδράσεις σχηματισμού συμπλόκων με αρχικό άτομο δότη το  $\{N_{im}\}$ . (π.χ συμπλόκων  $1N_{im}$  των συστημάτων Cu(II): -MKHM- (3.7), -FKHV- (3.6), -IKQHT- (3.82), -EVRHQK- (3.74), σε παρένθεση η αντίστοιχη τιμή  $\log K$ . [29, 30, 41]. Από την άλλη η τιμή  $\log K^*$  η οποία υπολογίστηκε για το σύμπλοκο  $CuLH_2$  (-2.12) είναι παραπλήσια με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για μονοδοντική ένταξη ( $1N_{im}$ ), όπως στις περιπτώσεις των πεπτιδίων  $H_2B_{32-62}$  (-2.66),  $H_2B_{63-93}$  (-1.58),  $H_2B_{94-125}$  (-1.94), -LAHYNK- (-2.73), -ELAKHA- (-2.13). [42]

Επιπλέον, η τιμή  $\lambda_{max} = 732$  nm, που προκύπτει από το φάσμα απορρόφησης στην ορατή περιοχή, επιβεβαιώνει το συγκεκριμένο τρόπο ένταξης. Η μετατόπιση της εν λόγω τιμής σε μικρότερο μήκος κύματος (blue shift), σε σχέση με αυτό που προβλέπεται από την εξίσωση των Sigel και Martin ( $\lambda_{max} = 760$  nm), θεωρώντας ότι το ισημερινό επίπεδο του συμπλόκου καταλαμβάνεται από το ιμιδαζολικό άζωτο και 3 μόρια νερού, αποτελεί ένδειξη της συμμετοχής της καρβοξυλικής ομάδας του Glu, στη σφαίρα ένταξης του χαλκού σχηματίζοντας έναν μακροχηλικό δακτύλιο. Η θεωρητικά αναμενόμενη τιμή  $\lambda_{max}$  στην περίπτωση ένταξης τύπου  $\{N_{im}, COO^-, 2 H_2O\}$  είναι 731 nm. [12]

Το φάσμα EPR σε τιμή  $pH \sim 4.9$  υποδεικνύει την παρουσία τριών συμπλόκων Cu(II) (a,b,c στον Πίνακα 6) όπως εξάλλου αναμένεται και από το διάγραμμα κατανομής (σχήμα 14, σελ 77). Εξ αυτών το (a) αποδίδεται στην παρουσία ελεύθερων ιόντων Cu(II) ( $A_{||} = 122$  G,  $g_{||} = 2.41$ ), το (b) σε σύμπλοκο ένταξης  $1N\{N_{im}\}$  ( $A_{||} = 134$  G,  $g_{||} = 2,37$ ) ενώ το (c) στο σύμπλοκο στοιχειομετρίας  $CuLH$  ( $A_{||} = 162$  G,  $g_{||} = 2,32$ ) το οποίο θα συζητηθεί αμέσως μετά και συνυπάρχει, στη συγκεκριμένη τιμή  $pH$ , με τα  $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$  και  $CuLH_2$  [33-45].

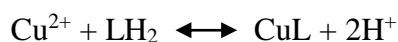
Η αύξηση του  $pH$  του διαλύματος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου  $CuLH$  σε περιοχή  $pH$  4-8. Η τιμή  $pK_a$  που συνοδεύει το σχηματισμό του (5.23) είναι αρκετά μικρή για να αποδοθεί σε ιονισμό και ένταξη αμιδικού ατόμου αζώτου, αφού σε πεπτίδια που περιέχουν το αμινοξύ ιστιδίνη η εν λόγω τιμή είναι μεγαλύτερη του 6.0 [29, 30], [41-45]. Από την άλλη και τα φασματοσκοπικά δεδομένα ορατού ( $\lambda_{max}=728$  nm με «ώμο» σε  $\lambda_{max}=705$  nm) δεν συνηγορούν υπέρ του συγκεκριμένου τρόπου ένταξης. Η μικρή μείωση του παράγοντα  $g$  και αύξηση του τελεστή  $A_{||}$  ( $A_{||} = 158$  G,  $g_{||} = 2.32$ ) θα μπορούσε να είναι συμβατή με επιπλέον ένταξη αμιδικού δότη, όμως λόγω της ασυμφωνίας με τα προαναφερθέντα δεδομένα θα πρέπει να αποκλειστεί.

Η μοναδική εξήγηση που απομένει είναι ότι το CuLH υιοθετεί παρόμοιο τρόπο ένταξης με το CuLH<sub>2</sub> {N<sub>im</sub>, COO<sup>-</sup>, 2 H<sub>2</sub>O} με ισχυροποίηση των δεσμών στο ισημερινό επίπεδο ως αποτέλεσμα κάποιου είδους σταθεροποίησης του συμπλόκου. Σε αυτή την περίπτωση, η τιμή pK<sub>a</sub> = 5.23 θα μπορούσε να αποδοθεί στον ιοντισμό της φωσφορικής ομάδας στο συμπλοκοποιημένο πεπτίδιο (pK<sub>a</sub> = 5.6 στο μη συμπλοκοποιημένο). Η επιπλέον θερμοδυναμική σταθερότητα που προσδίδεται στο σύστημα λόγω του παραπάνω ιοντισμού αντικατοπτρίζεται και στα θερμοδυναμικά δεδομένα για το CuLH. Συγκεκριμένα η τιμή logK=5.03 (logK = logβ(CuLH) - logβ(HL)) παρουσιάζεται σημαντικά αυξημένη (0.5-1 λογαριθμική μονάδα) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές συμπλόκων (4-4.5) που υιοθετούν σφαίρα ένταξης {N<sub>im</sub>, COO<sup>-</sup>, 2 H<sub>2</sub>O} [19-22]. Παράλληλα και η τιμή logK\* = -1.70 είναι σημαντικά μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη του CuLH<sub>2</sub> (-2.12) και πλησιάζει αντίστοιχες τιμές για τα 30πεπτίδια H<sub>2</sub>B<sub>63-93</sub> (-1.58), H<sub>2</sub>B<sub>94-125</sub> (-1.94) [42].

Η σταθερότητα του συγκεκριμένου συμπλόκου αντικατοπτρίζεται και στο διάγραμμα κατανομής (σχήμα 14, σελ 77) αφού σε τιμή pH~6 είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση του 65% της συνολικής συγκέντρωσης Cu(II). Το επόμενο ερώτημα που τίθεται είναι κατά πόσο αυτή η επιπλέον σταθεροποίηση οφείλεται σε ένταξη της φωσφορικής ομάδας. Όπως θα δούμε πιο κάτω κατά τη συζήτηση των πειραματικών δεδομένων για το μη φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο το τελευταίο υιοθετεί παρόμοιο τρόπο ένταξης με παραπλήσιες φασματοσκοπικές παραμέτρους (αλλά μικρότερες τιμές των logK και logK\*). Επομένως είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η φωσφορική ομάδα δεν συμμετέχει στη σφαίρα ένταξης και η επιπλέον σταθεροποίηση στο φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο θα πρέπει να οφείλεται σε κάποιου είδους ενδομοριακή αλληλεπίδραση ηλεκτροστατικής φύσης ή δεσμό υδρογόνου. Θα μπορούσε να προταθεί η αλληλεπίδραση της θετικά φορτισμένης ε-αμινομάδας της λυσίνης με την αρνητικά φορτισμένη φωσφορική ομάδα σχηματίζοντας ενός είδους «φράκτη» που προστατεύει εν μέρει το μεταλλικό κέντρο [46].

Σε λίγο υψηλότερες τιμές pH, αναμένεται η απροπρωτονίωση και συνακόλουθη ένταξη του πρώτου αμιδικού ατόμου αζώτου (τιμή pK<sub>a</sub> = 6.84) με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου CuL. Τόσο η μικρή του συγκέντρωση όσο και η επικάλυψή του με τα CuLH και CuLH<sub>-1</sub>, καθιστά αδύνατη τη μελέτη με φασματοσκοπικές τεχνικές. Η παραπάνω τιμή pK<sub>a</sub> που θα πρέπει να αντιστοιχεί στον ιοντισμό και ένταξη του πρώτου αμιδικού είναι αρκετά υψηλή σε σχέση με αντίστοιχες τιμές σε πεπτίδια ιστιδίνης (6-6.5) [29, 30] ,[41-45]. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει

για μια ακόμη φορά τη μεγάλη θερμοδυναμική σταθερότητα του CuLH που συζητήθηκε πιο πάνω. Προκειμένου να προτείνουμε την πιθανή σφαίρα ένταξης του ιόντος Cu(II) σε αυτό το σύμπλοκο πραγματοποιήθηκε σύγκριση των θερμοδυναμικών δεδομένων ( $\log K^*$ ) με αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές. Η τιμή  $\log K^* = -8.54$  του συστήματος μας που αφορά την αντίδραση:



είναι τυπική ένταξης τύπου  $2\text{N} \{ \text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-_{\text{amide}} \}$  οδηγώντας στο σχηματισμό ενός πενταμελούς χηλικού δακτυλίου [31,36].

Η επόμενη αντίδραση ιοντισμού που πραγματοποιείται (τιμή  $\text{pK}_a=6.44$ ) έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του συμπλόκου στοιχειομετρίας CuLH<sub>-1</sub>. Το συγκεκριμένο είναι το κύριο σχηματιζόμενο είδος σε φυσιολογικές τιμές pH, ευθύνεται για τη σύμπλεξη του 85 % της ολικής συγκέντρωσης χαλκού, ενώ η ύπαρξη του είναι εμφανής σε μία κλίμακα 5 πεχαμετρικών μονάδων (pH ~ 5.5-10.5). γεγονός που αντικατοπτρίζει τη μεγάλη θερμοδυναμική του σταθερότητα. Ενδεικτικό αυτής είναι επίσης τόσο η μικρή συγκέντρωση του CuL όσο και η μικρότερη τιμή  $\text{pK}_a$  (σε σχέση με την προηγούμενη -6,84-) ενδεικτική συνεργατικής αποπρωτονίωσης και ένταξης δυο αμιδικών ατόμων δοτών [29, 30], [41-45], [47]. Η τιμή  $\log K^* = -14.98$ , είναι συγκρίσιμη με αυτές αντίστοιχων συμπλόκων με πεπτίδια, όπου το ιόν  $\text{Cu}^{2+}$ , εντάσσεται με το ιμιδαζολικό άζωτο της His και 2 αμιδικά άζωτα του πεπτιδικού σκελετού (Ac-TRRSHTSEGTRSR-NH<sub>2</sub> [31],  $\log K^* = -13,91$ , Ac-NSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSRE-NH<sub>2</sub> [45],  $\log K^* = -14,09$ , Ac-TLEGTKKGHLHLDY-Am [47],  $\log K^* = -13,5$ ).

Παράλληλα, τόσο η αύξηση της τιμής της παραμέτρου  $A_{||}$ , όσο και η ταυτόχρονη μείωση των τιμών  $g_{||}$  και  $\lambda_{\text{max}}$  των φασμάτων σε φυσιολογική τιμή pH ~7.5 (τιμή pH μέγιστης συγκέντρωσης CuLH<sub>-1</sub>) επιβεβαιώνουν την αύξηση της ισχύος του πεδίου των υποκαταστατών στο ισημερινό επίπεδο του ιόντος Cu(II). Πιο συγκεκριμένα, στο φάσμα UV-Vis η τιμή  $\lambda_{\text{max}}$  που καταγράφηκε ισούται με 602 nm. Η τιμή αυτή είναι συγκρίσιμη με βιβλιογραφικές τιμές ( $\lambda_{\text{max}} = 560-610$  nm), οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για χρωμοφόρα τα οποία περιλαμβάνουν τρία άτομα αζώτου τύπου  $3\text{N} \{ \text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-_{\text{amide}} \}$ . [29] Πρόσθετη επιβεβαίωση της ένταξης  $\{ \text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-_{\text{amide}} \}$ , προκύπτει από το φάσμα EPR που καταγράφηκε σε pH 7.5. Η τιμή του παράγοντα  $g$  στην παράλληλη περιοχή του φάσματος ( $g_{||} = 2.22$ ) και του τελεστή υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης ( $A_{||} = 170$  G) είναι χαρακτηριστική για σύμπλοκα δισθενούς χαλκού με δότες τρία άτομα αζώτου κι ένα άτομο οξυγόνου. [23]. Η αξονική ένταξη είτε του



$\gamma$ -COO του καταλοίπου Glu είτε της φωσφορικής ομάδας (SerOP) δεν μπορεί να αποκλειστεί καθώς η πειραματική τιμή  $\lambda_{\max}$  (602 nm) παρουσιάζει ερυθρά μετατόπιση κατά περίπου 20 nm σε σχέση με τη θεωρητικά υπολογιζόμενη (Sigel-Martin) για ένταξη τύπου  $\{N_{Im}, 2N_{amide}^-, H_2O\}$  (583 nm). [12]

Σε πιο αλκαλικά διαλύματα παρατηρείται ο σχηματισμός του συμπλόκου  $CuLH_2$  (περιοχή pH 7-12) ως αποτέλεσμα της αποπρωτονίωσης και ένταξης ενός επιπλέον πεπτιδικού ατόμου αζώτου ( $pK_a=8.68$ ). Η τιμή  $\log K^* = -23.66$  που υπολογίστηκε για το συγκεκριμένο είναι παραπλήσια με τιμές ανάλογων συμπλόκων με πεπτίδια για τα οποία προτείνεται  $4N \{N_{Im}, 3N_{amide}^-\}$  τύπος ένταξης (π.χ  $H_2B_{32-62}$  (-24.44),  $H_2B_{63-93}$  (-22.37),  $H_2B_{94-125}$  (-23.11), -LAHYNK- (-23.65), -ELAKHA- (-21.69)) [31, 36, 42, 45, 47].

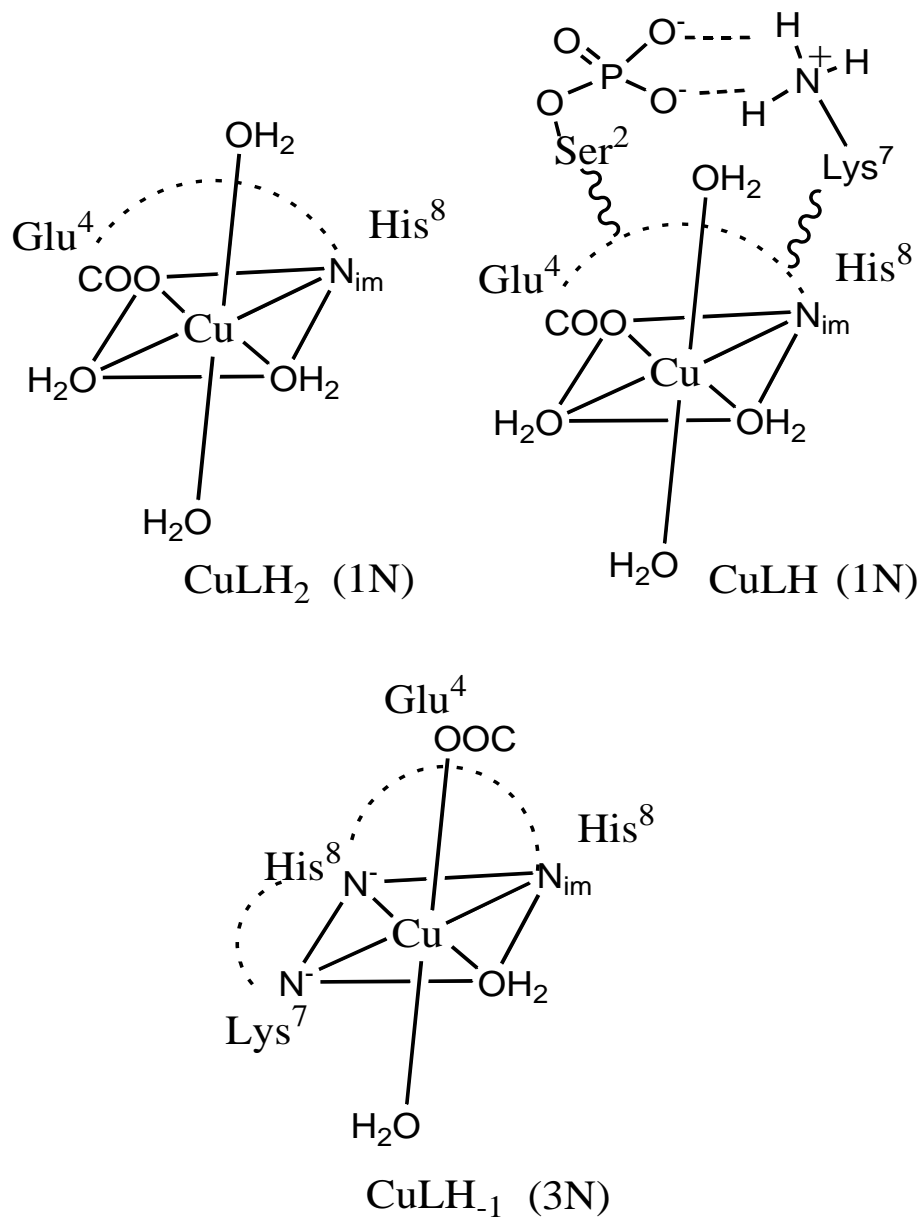
Η τιμή  $\lambda_{\max}$  του φάσματος ορατού εντοπίζεται στα 558 nm και η ταινία απορρόφησης είναι σημαντικά διευρυμένη. Η παραπάνω βρίσκεται σε συμφωνία με τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές (510-550 nm) που αντιστοιχούν σε χρωμοφόρα που περιέχουν τέσσερα άτομα αζώτου (4N). [40,48,49]. Χρησιμοποιώντας την εμπειρική εξίσωση των Sigel και Martin, η θεωρητική τιμή που αντιστοιχεί σε σφαίρα ένταξης  $\{N_{Im}, 3N_{amide}^-\}$  είναι  $\lambda_{\max} = 521$  nm. Η παρατηρούμενη απόκλιση κατά 37 nm προς το ερυθρό υποδεικνύει την πιθανή αξονική ένταξη των  $\gamma$ -COO<sup>-</sup> του καταλοίπου Glu ή της φωσφορικής ομάδας (SerOP). Η σημαντική διεύρυνση που παρατηρείται στην ταινία απορρόφησης θα μπορούσε να οφείλεται στην παρουσία ισομερών ένταξης. Το ένα εξ αυτών πιθανότητα υιοθετεί ένταξη τύπου  $\{N_{Im}, 3N_{amide}^-\}$ , ενώ το δεύτερο περιλαμβάνει και αξονική ένταξη ανιοντικού δότη οξυγόνου (όπως αναφέρθηκε πιο πάνω). Αν λάβουμε υπόψη μας τα φασματοσκοπικά δεδομένα για το αντίστοιχο σύμπλοκο με το μη φωσφορυλιωμένο (το οποίο περιλαμβάνει το κατάλοιπο Glu) και το φαινόμενο που περιγράψαμε (διεύρυνση) δεν παρατηρείται ακριβώς όπως στην υπό συζήτηση περίπτωση, θα μπορούσαμε να προτείνουμε με επιφύλαξη ότι ο αξονικός υποκαταστάτης είναι πιθανότατα η φωσφορική ομάδα της Ser.

Παράλληλα, η περαιτέρω αύξηση της τιμής της παραμέτρου  $A_{||}$  και η μείωση της τιμής  $g_{||}$  (EPR) είναι ενδεικτική της συμμετοχής ενός ακόμα αμιδικού δότη στο ισημερινό επίπεδο των ιόντων Cu(II). Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές  $g_{||} = 2.20$  και  $A_{||} = 188$  G που προκύπτουν από τα φάσματα EPR, συμφωνούν με τις τιμές των συμπλόκων χαλκού με τα πεπτίδια: GlyGlyGlyGlyHis ( $A_{||} = 199$ G,  $g_{||} = 2.20$ ) και Ac-ThrArgSerArgSerHisThrSerGluGlyThrArgSerArg-NH<sub>2</sub> ( $A_{||} = 196$ G,  $g_{||} = 2.20$ ), για τα οποία έχει προταθεί σφαίρα ένταξης  $4N \{N_{Im}, 3N_{amide}^-\}$ . Σημαντική διεύρυνση

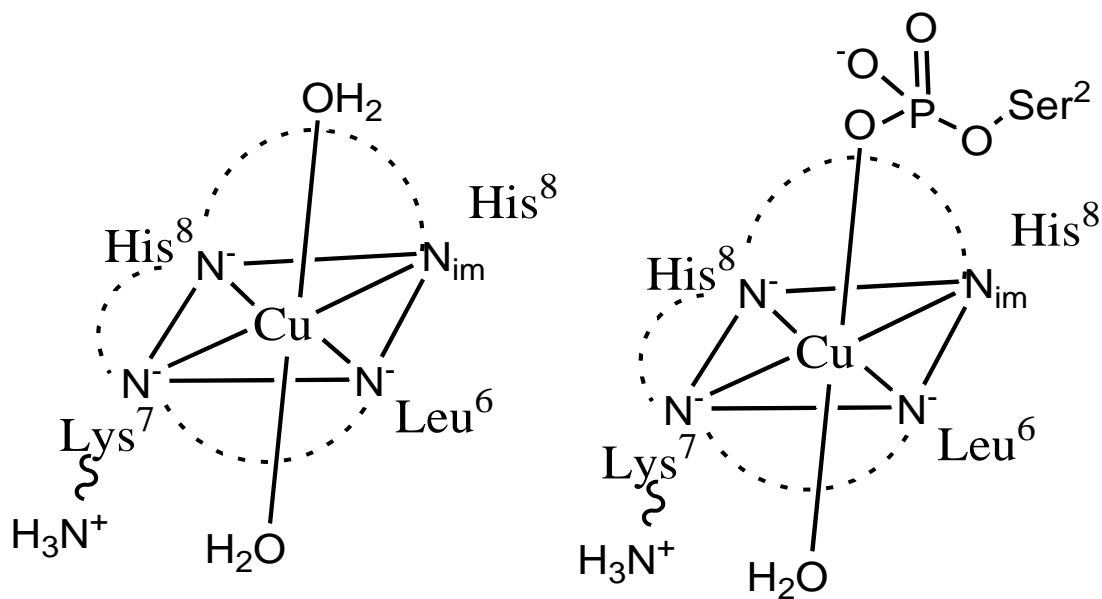
παρατηρείται και στο φάσμα EPR (τόσο στην παράλληλη όσο και στην κάθετη περιοχή) γεγονός που συμφωνεί με τις παραπάνω παρατηρήσεις (ύπαρξη ισομερών ένταξης). Πιθανότατα λοιπόν οι τιμές ( $A_{||}$ ,  $g_{||}$ ) που εξάγονται από τα φάσματα να αποτελούν το μέσο όρο των τιμών που αντιστοιχούν στα δυο ισομερή. [20, 21, 37, 48]

Τα επόμενα δυο σύμπλοκα  $\text{CuLH}_3$  και  $\text{CuLH}_4$  σχηματίζονται σε πολύ αλκαλικά διαλύματα. Οι φασματοσκοπικές τους παράμετροι (UV-Vis, EPR) είναι σχεδόν ίδιες (πίνακες 5, 6, σελ81, 83) ενώ διαφέρουν πολύ λίγο σε σχέση με τις αντίστοιχες του συμπλόκου  $\text{CuLH}_2$  γεγονός που υποδεικνύει ότι υιοθετούν ίδιο τρόπο ένταξης  $4N\{N_{\text{Im}}, 3N_{\text{amide}}\}$  με τη μόνη διαφορά ότι πλέον δεν πρέπει να υφίσταται αξονική αλληλεπίδραση. Από την άλλη, η τιμή  $pK_a$  που οδηγεί στον σχηματισμό του  $\text{CuLH}_3$  είναι  $pK_a = 10.33$  και θα πρέπει να αποδοθεί στον ιοντισμό (αλλά όχι ένταξη) της ε-αμινομάδας της Lys ( $pK_a = 10.25$  στο μη συμπλοκοποιημένο πεπτίδιο). Ακολούθως η τιμή  $pK_a$  που οδηγεί στον σχηματισμό του  $\text{CuLH}_4$  είναι  $pK_a = 11.31$ . Η παραπάνω θα μπορούσε να είναι συμβατή με τον ιονισμό ενός μορίου  $\text{H}_2\text{O}$  στην αξονική θέση (σχηματισμός υδροξυσυμπλόκου). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα όμως δεν συνηγορούν υπέρ αυτής της πρότασης. Η μοναδική εξήγηση που απομένει είναι η αποπρωτονίωση (χωρίς ένταξη) του πυρρολικού N(1) του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Είναι γνωστό [50] ότι η οξύτητα του πυρρολικού αζώτου αυξάνεται μετά από την ένταξη ενός μεταλλικού ιόντος στο N(3) άτομο αζώτου. Στην περίπτωση του Cu (II): GlyGlyHis, η αντίστοιχη τιμή  $pK_a$  υπολογίστηκε περίπου 10.7. [51] Ωστόσο, η δική μας τιμή 11.31 είναι συγκρίσιμη με αυτή που αντιστοιχεί σε ιονισμό του πυρρολικού N(1) (χωρίς ένταξη) στα συστήματα Cu(II) : His 1:2 και Cu(II)-LAHYNK- ( $pK_a = 11.7$ ). [52, 53]

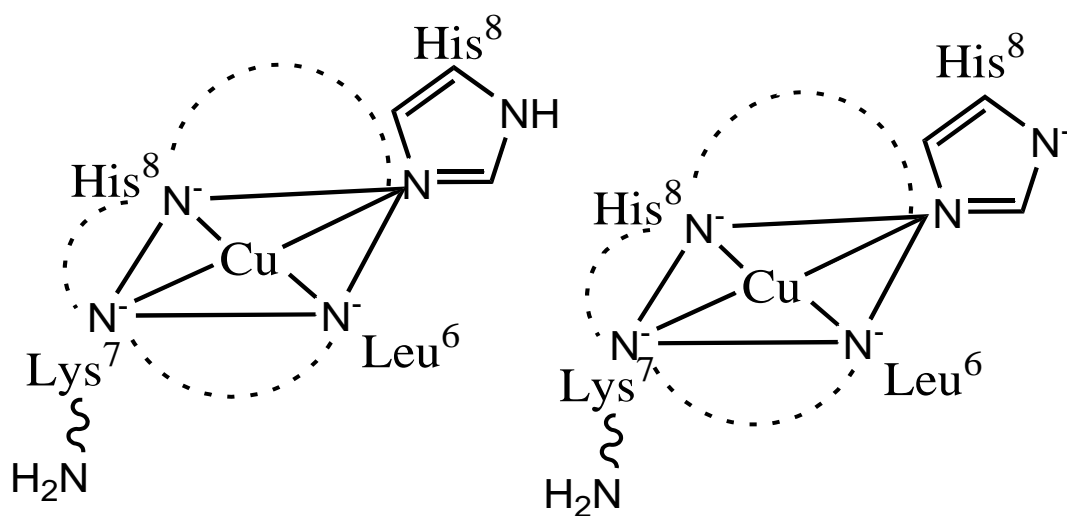
Στα παρακάτω σχήματα (σχήματα 18, 19) παρουσιάζονται σχηματικές αναπαραστάσεις της προτεινόμενης δομής των συμπλόκων που συζητήθηκαν.



**Σχήμα 18:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων CuLH<sub>2</sub>, CuLH και CuLH<sub>1</sub> που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub> με τα ιόντα Cu(II). Εμφανίζονται τα άτομα δότες και η πρέλευσή τους (αμινοξικά κατάλοιπα). Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν χηλικούς δακτυλίους (ένας εξαμελής για το ζεύγος N<sub>im</sub>, N<sup>-</sup> (His)) και οι υπόλοιποι πενταμελείς.



CuLH<sub>2</sub> (4N)



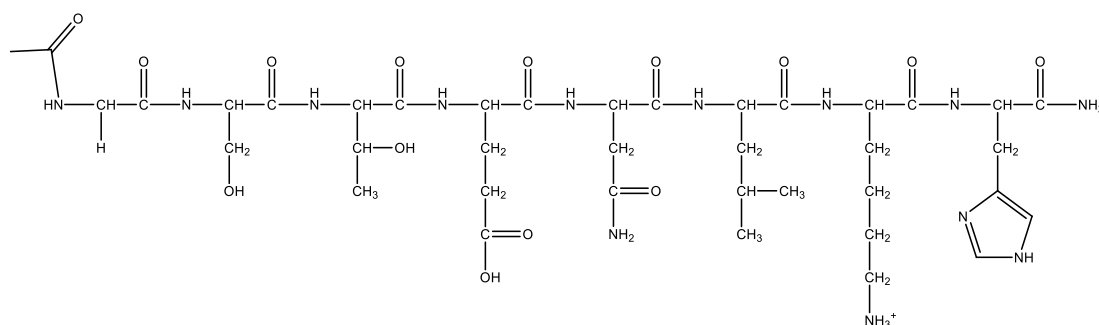
CuLH<sub>3</sub> (4N)

CuLH<sub>4</sub> (4N)

**Σχήμα 19:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων CuLH<sub>2</sub>, CuLH<sub>3</sub> και CuLH<sub>4</sub> που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου Ac-GS(P)TENLKH-NH<sub>2</sub> με τα ιόντα Cu(II). Εμφανίζονται τα άτομα δότες και η πρόλευσή τους (αμινοξικά κατάλοιπα). Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν χηλικούς δακτυλίους (ένας εξαμελής για το ζεύγος N<sub>im</sub>, N<sup>-</sup> (His)) και οι υπόλοιποι πενταμελείς.

## 7.5 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub>

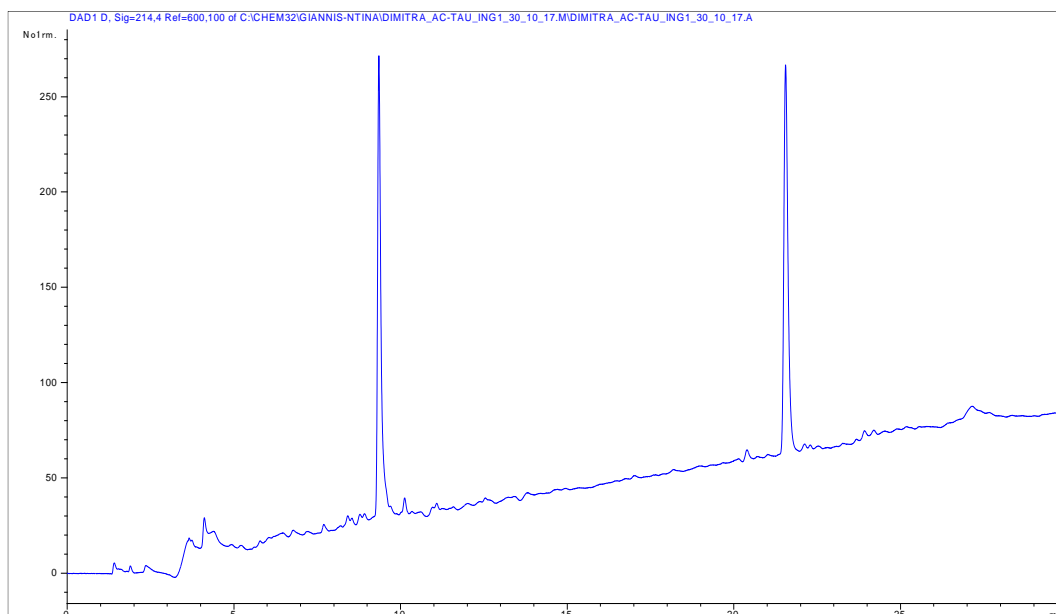
Για τη σύνθεση του πεπτιδίου Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub> (σχήμα 20) εφαρμόστηκε η μέθοδος της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield σύμφωνα με την Fmoc/tBu στρατηγική [1] και ταυτοποιήθηκε με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας (ESI-MS) καθώς και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).



**Σχήμα 20:** Το οκταπεπτίδιο Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-Lys-His-NH<sub>2</sub>

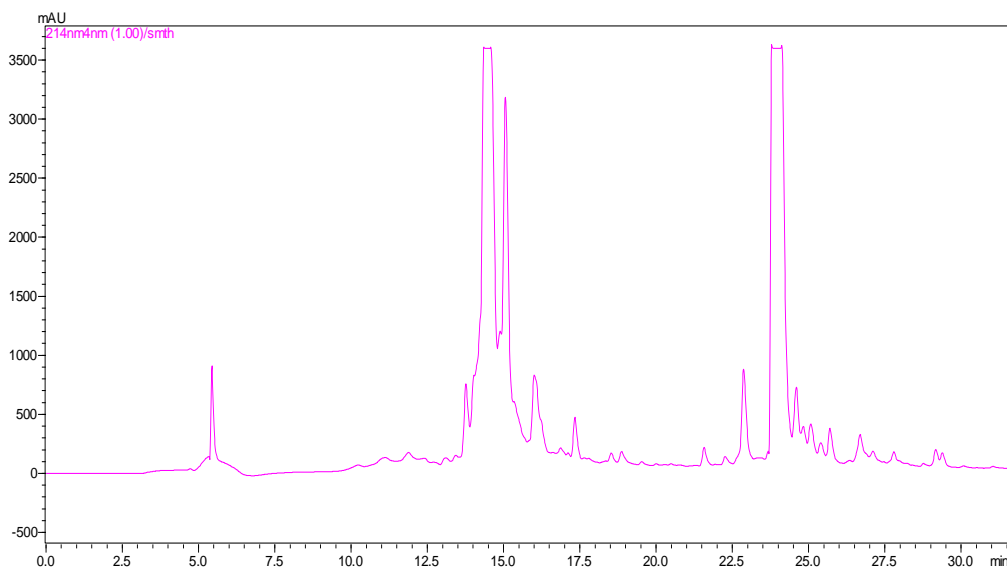
Το ποσό της πεπτιδορητίνης που συντέθηκε ήταν 0,94185g και η απόδοση σύνθεσης 92.5%. Στη συνέχεια, μετά την αποκοπή της ρητίνης και των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, ελήφθησαν 0.2774g πεπτιδίου με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 44.8%.

Στη συνέχεια, για τον προσδιορισμό του συστήματος έκλουσης πραγματοποιήθηκε αναλυτική RP-HPLC, με σύστημα έκλουσης: (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA από A/B: 100/0% σε A/B:50-50%



**Σχήμα 21:** Αναλυτική RP-HPLC, σύστημα έκλουσης: (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA από A/B: 100/0% σε A/B:50-50%

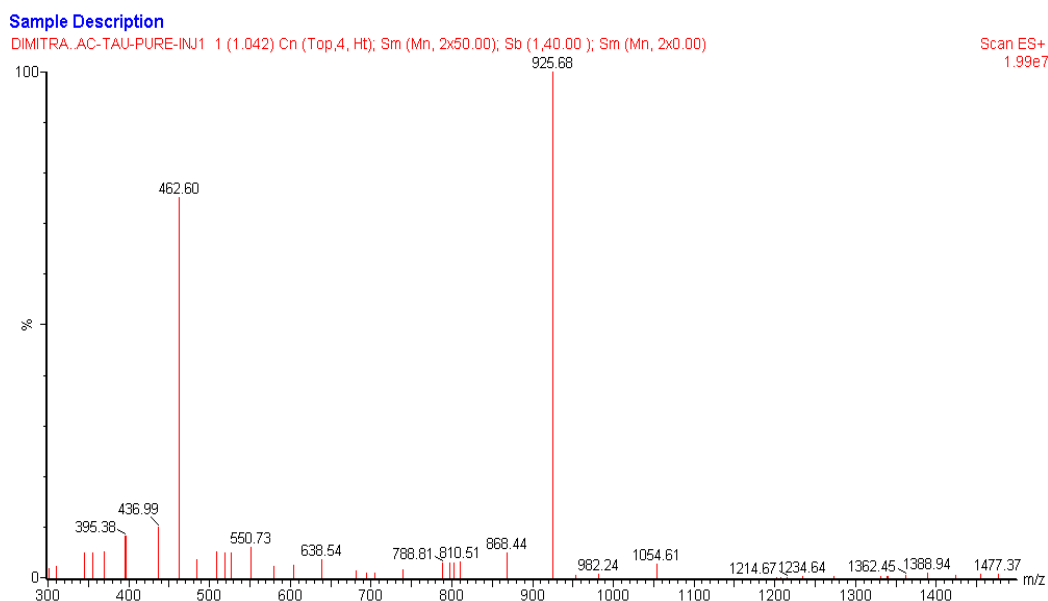
Ο καθαρισμός του ελεύθερου πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με παρασκευαστική RP-HPLC. Στο παρακάτω σχήμα παρατίθεται το χρωματογράφημα του πεπτιδίου.



**Σχήμα 22:** Παρασκευαστική RP-HPLC, σύστημα έκλουσης: (A) H<sub>2</sub>O/0.1% TFA, (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA από A/B: 100/0% σε A/B:50-50%

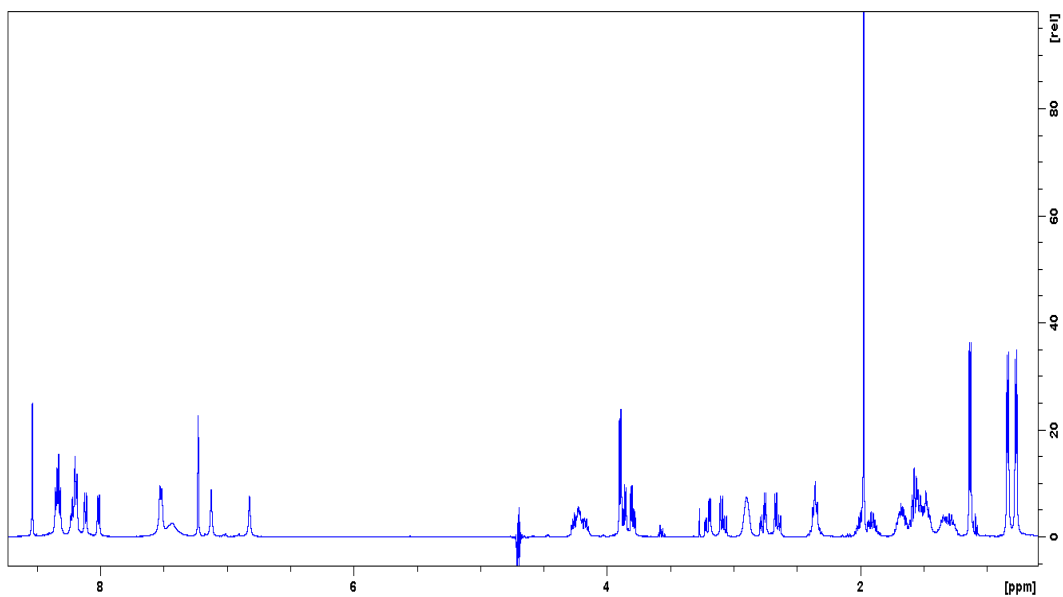
Η ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας ESI-MS. Το φασματογράφημα παρουσιάζεται στο σχήμα 23. Η κορυφή σε τιμή m/z = 925.58 amu αποδίδεται στο μοριακό ιόν [L+H<sup>+</sup>]<sup>+</sup> (θεωρητική

τιμή 926.5 amu), ενώ η κορυφή σε τιμή  $m/z = 462.609$  amu στο  $[L+2H^+]^{2+}$ . Μικρές αποκλίσεις μεταξύ των θεωρητικών-πειραματικών τιμών οφείλονται στον τρόπο βαθμονόμησης (mass calibration) του οργάνου.

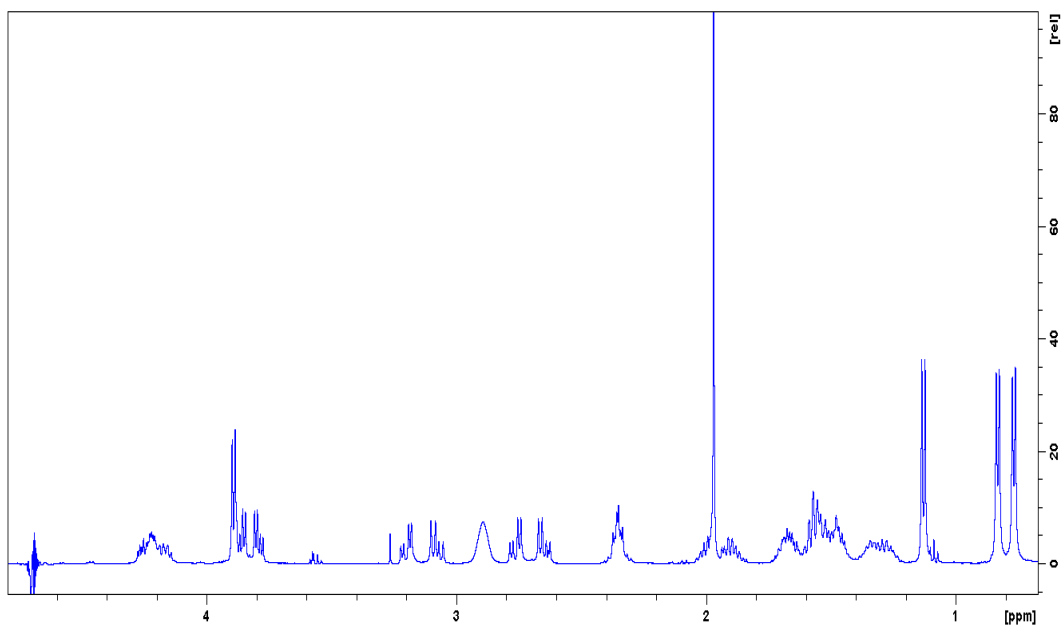


**Σχήμα 23:** Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub>

Προκειμένου να επιτευχθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός του πεπτιδίου καταγράφηκαν επιπρόσθετα τα φάσματα  $^1H$  (σχήματα 24,25,26),  $^1H - ^1H$  TOCSY (σχήμα 27),  $^1H - ^1H$  NOESY (σχήμα 28) σε διαλύτη H<sub>2</sub>O : D<sub>2</sub>O (9 :1 v/v), pH=2.4, T=298 K. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των φασμάτων συνοψίζονται στον πίνακα και βρίσκονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικές τιμές για παρόμοια πεπτίδια [19, 20].

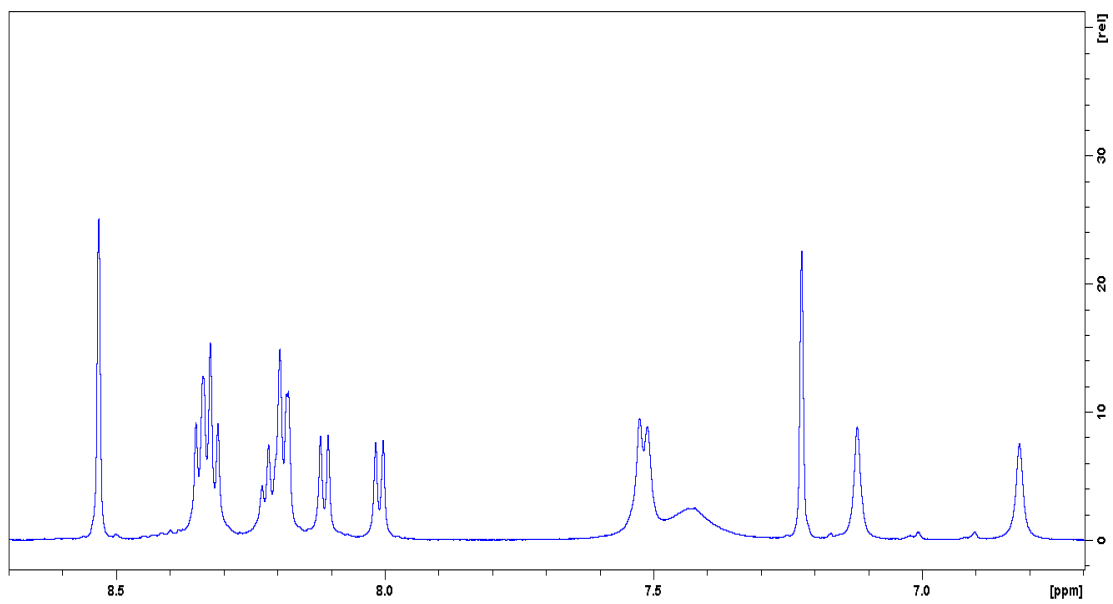


**Σχήμα 24:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του πεπτιδίου  $\text{Ac-GSTENLKH-NH}_2$  σε διάλυμα  $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$  9:1,  $\text{pH}=2.5$

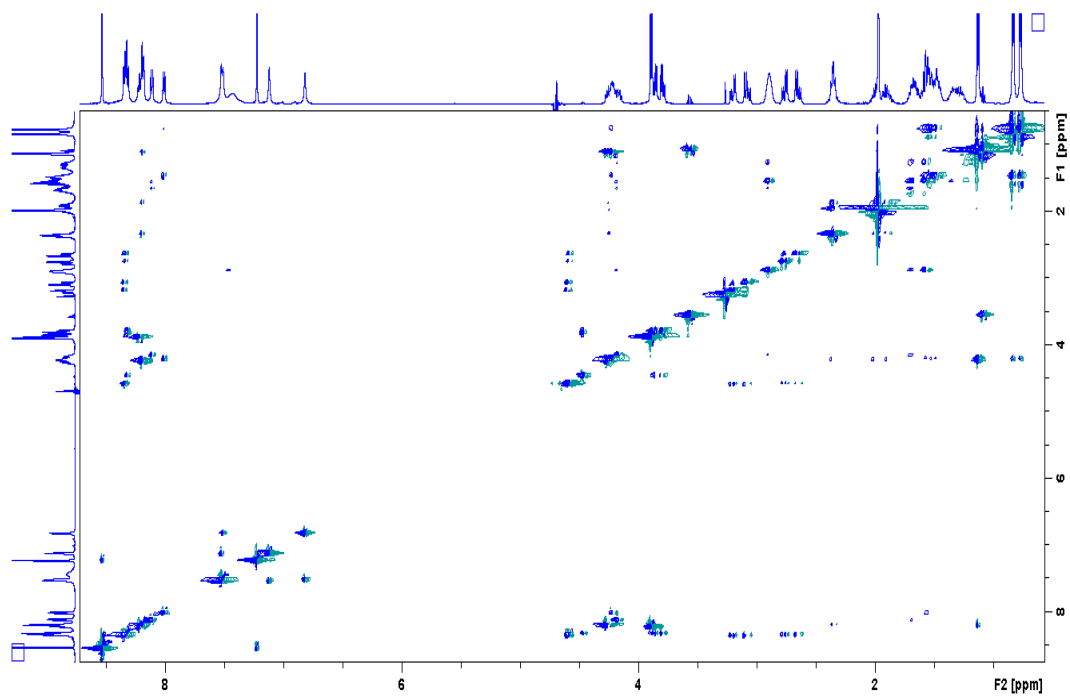


**Σχήμα 25:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του πεπτιδίου  $\text{Ac-GSTENLKH-NH}_2$  (0.5-5.0 ppm) σε διάλυμα  $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$  9:1,  $\text{pH}=2.5$

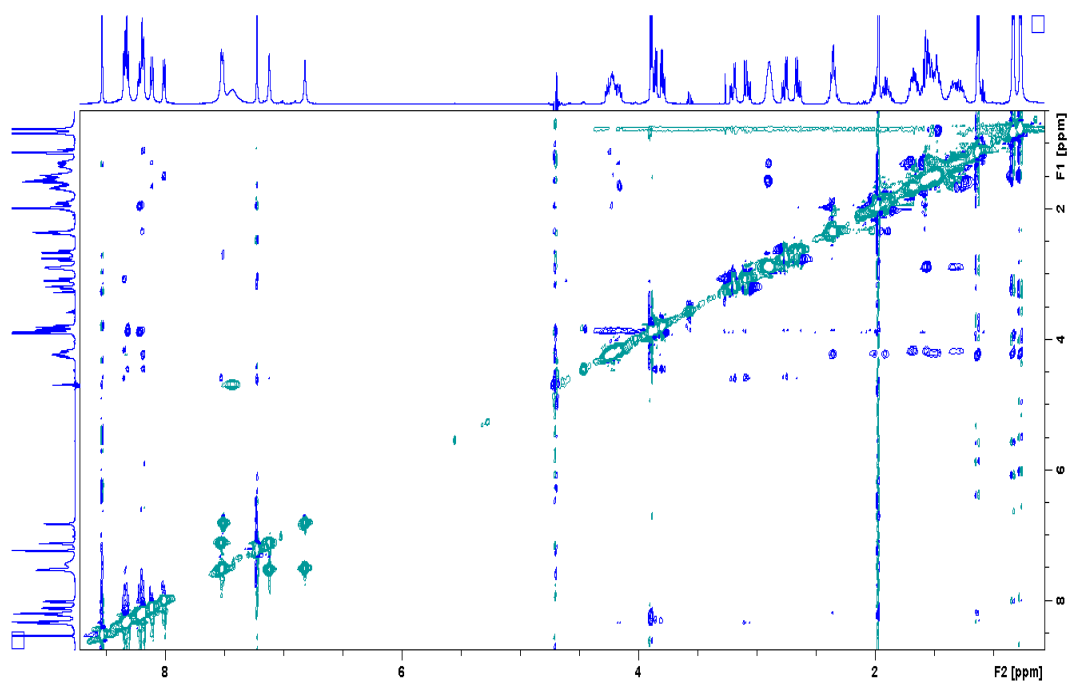




**Σχήμα 26:** Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του πεπτιδίου  $\text{Ac-GSTENLKH-NH}_2$  (6.5-8.7 ppm), σε διάλυμα  $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$  9:1,  $\text{pH}=2.5$



**Σχήμα 27:** Φάσμα  $^1\text{H-}^1\text{H-TOCSY NMR}$  του πεπτιδίου  $\text{Ac-GSTENLKH-NH}_2$  σε διάλυμα  $\text{H}_2\text{O:D}_2\text{O}$  9:1,  $\text{pH}=2.5$



**Σχήμα 28:** Φάσμα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY NMR του πεπτιδίου Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub> σε διάλυμα H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, pH=2.5, T=298 K

**Πίνακας 7:** Χημικές μετατοπίσεις (δ, ppm)  $^1\text{H}$  του πεπτιδίου Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub> (pH = 2.5, T = 298K)

	$\alpha\text{H}$	$\beta\text{H}$	$\gamma\text{H}$	$\gamma\text{CH}_2$	CONH <sub>2</sub>	$\delta\text{CH}_2$	$\delta\text{CH}_3$	$\epsilon\text{CH}_2$	$\epsilon\text{NH}_3^+$	C <sub>2</sub> H	C <sub>4</sub> H	NH
<b>Ac</b>	1.97											
<b>Gly</b>	3.92	---	---	---	----	----	---	---	---	---	---	8.23
<b>Ser</b>	4.48	3.85	---	---	---	---	---	---	---	---	---	8.31
<b>Thr</b>	4.27	4.22	1.13	---	---	---	---	---	---	---	---	8.19
<b>Glu</b>	4.21	1.90 2.00	2.35	---	---	---	---	---	---	---	---	8.18
<b>Asn</b>	4.61	3.09 3.20	---	---	7.52(trans) 7.12 (cis)	---	---	---	---	---	---	8.33
<b>Leu</b>	4.21	1.56	1.48	---	---	---	0.77 0.83	---	---	---	---	8.02
<b>Lys</b>	4.17	1.65	---	1.28	---	1.55	---	2.89	7.43	---	---	8.11
<b>His</b>	4.61	3.09 3.20	---	---	---	---	---	---	---	8.53	7.22	8.35
<b>CONH<sub>2</sub></b>	---	---	---	---	7.54(trans)	---	---	---	---	---	---	---
<b>His</b>					6.82 (cis)							

## 7.6 Αλληλεπίδραση ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub>

### 7.6.1 Ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις

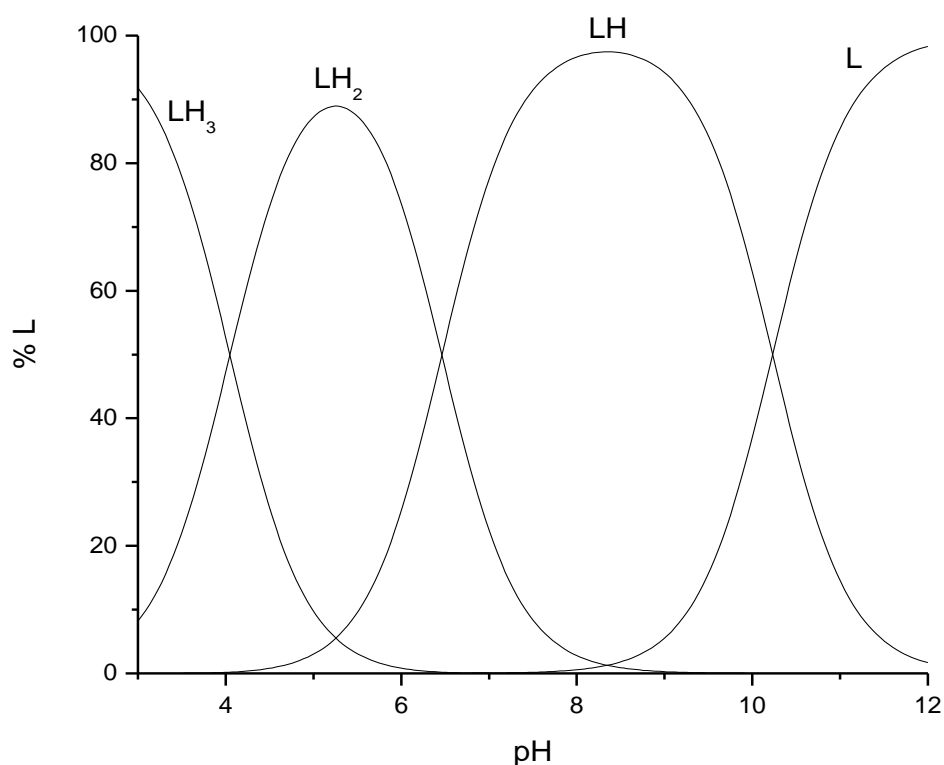
#### 7.6.1.1 Προσδιορισμός τιμών pK<sub>a</sub> του ελεύθερου πεπτιδίου

Το πεπτίδιο Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub> περιέχει τρεις ομάδες που είναι ικανές να ιονιστούν και συνεπώς να τιτλοδοτηθούν σε περιοχή pH 2-12. Αυτές, στο σύνολο τους, περιλαμβάνουν το άτομο αζώτου του μιδαζολικού δακτυλίου, την ε-αμινομάδα της λυσίνης και την γ-καρβοξυλομάδα του γλουταμικού οξέος. Στον πίνακα 8 που ακολουθεί δίνονται οι ολικές σταθερές πρωτονίωσης (logβ) καθώς και οι σταθερές ιονισμού (pK<sub>a</sub>) των παραπάνω ομάδων, ενώ στο σχήμα 29 παρουσιάζεται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων.

**Πίνακας 8:** Ολικές σταθερές πρωτονίωσης και τιμές pK<sub>a</sub> για το πεπτίδιο Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub> (T = 298K, I = 0.1M KNO<sub>3</sub>)

Σωματίδια	Logβ (*)	pK <sub>a</sub>	Χαρακτηριστική ομάδα
LH <sub>3</sub>	20.74(3)	4.05	Glu-γ-COOH
LH <sub>2</sub>	16.69(2)	6.46	His-Im
LH	10.23(1)	10.23	Lys-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>

Τυπική απόκλιση \*10<sup>-2</sup>



**Σχήμα 29:** Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του πεπτιδίου *Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub>* ( $C_{peptide} = 2.6 \text{ mM}$ )

Το πεπτίδιο *Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub>*, μπορεί να θεωρηθεί ως ένας υποκαταστάτης τύπου LH<sub>3</sub>, δεδομένου ότι περιέχει τρεις όξινες ομάδες που μπορούν να ιοντιστούν. Αύξηση του pH οδηγεί αρχικά στην αποπρωτονίωση της γ-καρβοξυλομάδας του γλουταμικού. Η τιμή  $pK_a = 4.05$  βρίσκεται σε συμφωνία με τις βιβλιογραφικές τιμές για τον ιονισμό της ίδιας ομάδας στα πεπτίδια -TESHAK-, -TESAHK-, -ELAKHA-, -EVRHQK-, -TRRSHTSEGTR- ( $pK_a$  Glu-γ-COOH 4.04, 4.04, 4.05, 4.04, 4.01 αντίστοιχα). [20-22], [29-31]

Περαιτέρω αύξηση του pH οδηγεί στην αποπρωτονίωση του ατόμου N<sub>3</sub> του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης. Η τιμή  $pK_a = 6.46$  που αποδίδεται στον ιονισμό της παραπάνω ομάδας, συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα που αντιστοιχούν στον ίδιο τύπο ιονισμού στα πεπτίδια -EVRHQK-, -ELAKHA-, -AKRHRK-, -TESHAK-, -TESAHK- (τιμές  $pK_a$  6.26, 6.42, 6.13, 6.27, 6.23 αντίστοιχα). [20-22], [29-30], [36,37]. Η τελική τιμή  $pK_a$  (10.23) αντιστοιχεί στην αποπρωτονίωση της ε-αμινομάδας της λυσίνης σε απόλυτη συμφωνία με αντίστοιχες τιμές που έχουν αναφερθεί και

αφορούν μικρά πεπτίδια που περιέχουν το αμινοξικό κατάλοιπο λυσίνης στην αλληλουχία τους [20-22]

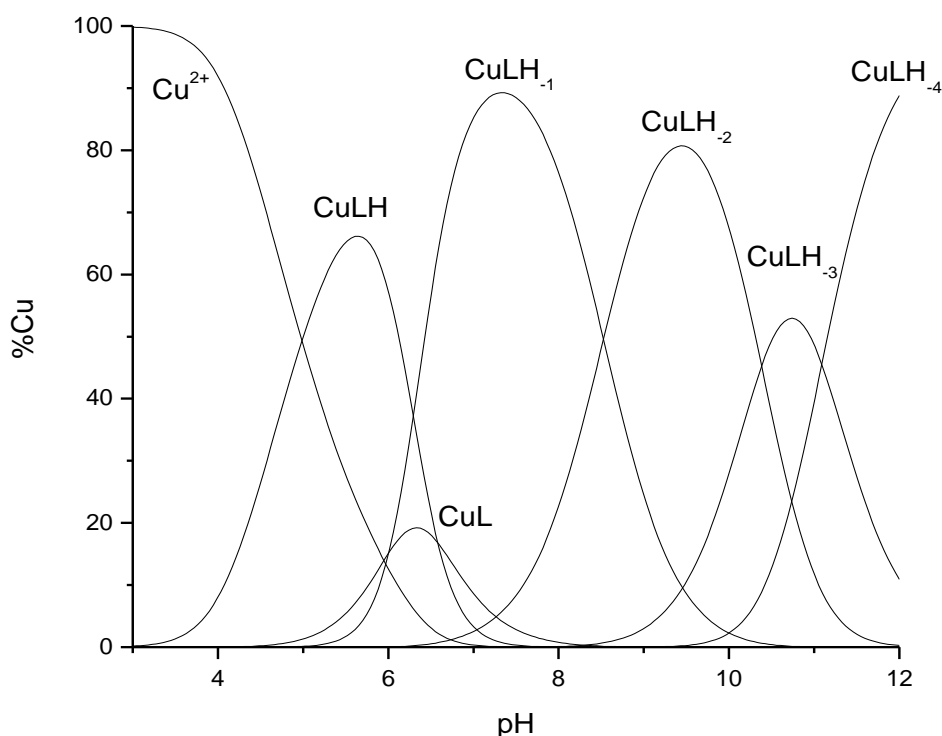
#### 7.6.1.2 Αλληλεπίδραση Cu(II) : πεπτιδίου Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub>

Τα ποτενσιομετρικά δεδομένα από την τιτλοδότηση διαλύματος του συστήματος Cu<sup>2+</sup>:πεπτιδίου με KOH σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1.3, προσομοιώνονται καλύτερα θεωρώντας την ύπαρξη έξι διαφορετικών συμπλόκων, με στοιχειομετρία : CuLH, CuL, CuLH<sub>-1</sub>, CuLH<sub>-2</sub>, CuLH<sub>-3</sub>, CuLH<sub>-4</sub>. Στον πίνακα 9 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι ολικές σταθερές σχηματισμού των σχηματιζόμενων συμπλόκων χαλκού με το συγκεκριμένο πεπτίδιο, ενώ στο σχήμα 30 παρατίθεται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (συμπλόκων) Cu(II), το οποίο προκύπτει με κατάλληλη επεξεργασία των θερμοδυναμικών δεδομένων (πίνακες 8, 9).

Πίνακας 9: Ολικές σταθερές σχηματισμού (logβ) και τιμές pK<sub>a</sub> των συμπλόκων χαλκού με το πεπτίδιο Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub> (25°C, I=0.1M KNO<sub>3</sub>)

Σωματίδια	logβ (*)	pK <sub>a</sub>
<b>CuLH</b>	14.57(3)	-
<b>CuL</b>	7.99(2)	6.58
<b>CuLH<sub>-1</sub></b>	1.99(3)	6.00
<b>CuLH<sub>-2</sub></b>	-6.54(5)	8.53
<b>CuLH<sub>-3</sub></b>	-16.92(7)	10.38
<b>CuLH<sub>-4</sub></b>	-28.01(7)	11.09

\*Τυπική απόκλιση \*10<sup>-2</sup> \*\*Για την αντίδραση CuLH<sub>n</sub> ↔ CuLH<sub>n-1</sub> + H<sup>+</sup>



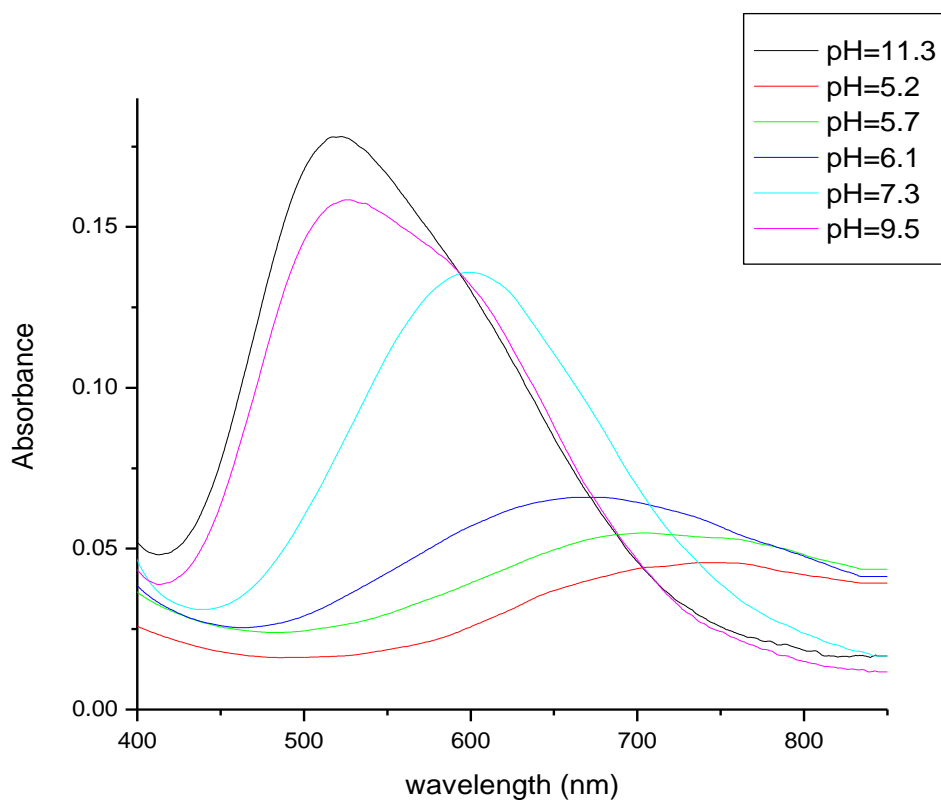
**Σχήμα 30:** Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του συστήματος  $Cu(II): Ac-GSTENLKH-NH_2$  σε αναλογία 1:1.3  $[Cu^{2+}] = 2.05 \text{ mM}$

Το μοντέλο που προτείνεται περιλαμβάνει έξι σωματίδια σε αναλογία 1:1.3. Όπως φαίνεται και από το σχήμα, η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με το χαλκό ξεκινάει από πολύ χαμηλές τιμές ( $pH \sim 3$ ) και συνεχίζεται μέχρι  $pH=12$ .

## 7.7 Φασματοσκοπική μελέτη

### 7.7.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

Για το χαρακτηρισμό των παραπάνω συμπλόκων χαλκού, καταγράφηκαν φάσματα ορατού (σχήμα 31), σε εύρος  $pH$  3-12 και γραμμομοριακή αναλογία 1:1.3. Οι τιμές  $pH$  αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής για κάθε σωματίδιο και προκύπτουν από την επεξεργασία των ποτενσιομετρικών δεδομένων. Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα δεδομένα που προκύπτουν μετά την επεξεργασία των φασμάτων.



**Σχήμα 31:** Φάσματα UV-Vis του συστήματος  $\text{Cu(II)-Ac-GSTENLKH-NH}_2$  (1:1.3) σε διάφορες τιμές pH ( $T=298\text{ K}$ ,  $I=0.1$  ( $\text{KNO}_3$ ))

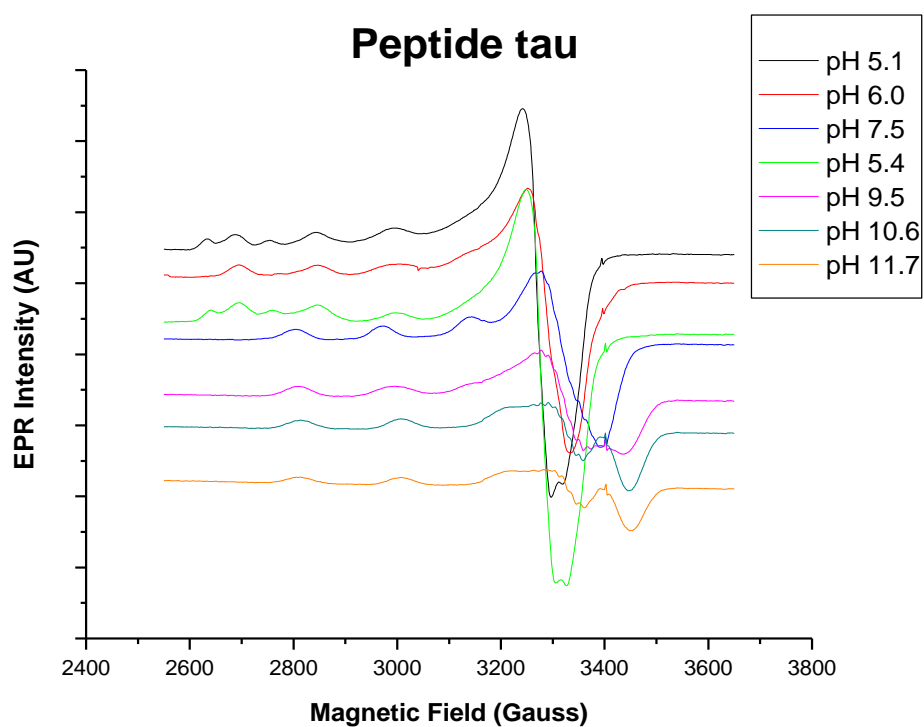
**Πίνακας 10:** φασματοσκοπικά δεδομένα ορατού ( $\lambda_{\text{max}}$ ,  $\epsilon$ ) του συστήματος  $\text{Cu(II)-Ac-GSTENLKH-NH}_2$  (1:1.3)

pH	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\epsilon$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )
5.2	746	26
5.7	705	33
6.1	672	41
7.3	599	99
9.5	a. 527	122
	b. 560(sh)	
11.3	520	140

Από τα παραπάνω δεδομένα καθίσταται εμφανής η μείωση της τιμής  $\lambda_{\text{max}}$  καθώς η τιμή pH αυξάνεται, ως αποτέλεσμα της σταδιακής προσθήκης ατόμων δοτών αζώτου του πεπτιδίου στη σφαίρα ένταξης των ιόντων  $\text{Cu(II)}$  (αύξηση  $\Delta\epsilon$ ).

### 7.7.2 Φασματοσκοπικά δεδομένα EPR

Παράλληλα, για το χαρακτηρισμό των συμπλόκων χαλκού που σχηματίζονται καταγράφηκαν και φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού, σε τιμές pH που αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής για κάθε σωματίδιο (σύμπλοκο). Τα φάσματα δίνονται στο σχήμα 32, ενώ τα δεδομένα που προκύπτουν από την επεξεργασία τους παρουσιάζονται στον πίνακα 11.



**Σχήμα 32:** Φάσματα EPR υδατικών διαλυμάτων  $\text{Cu(II)-Ac-GSTENLKH-NH}_2$  (1:1.3) σε διάφορες τιμές pH ( $T=77\text{ K}$ ,  $I=0.1$  ( $\text{KNO}_3$ ), 10% v/v γλυκερίνη)



**Πίνακας 11:** Φασματοσκοπικά δεδομένα EPR ( $g_{\parallel}$ ,  $A_{\parallel}$ ) του συστήματος Cu(II)-Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub> (1:1.3)

<b>pH</b>	<b><math>g_{\parallel}</math></b>	<b><math>A_{\parallel}</math> (G)</b>
<b>Cu<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub></b>	2.41	122
<b>5.4</b>	a. 2.41	120
	b. 2.33	152
<b>7.5</b>	2.22	168
<b>9.5</b>	2.20	188
<b>10.6</b>	2.19	196
<b>11.7</b>	2.18	200

Παρατηρούμε ότι η τιμή του παράγοντα  $g_{\parallel}$  μειώνεται σταδιακά, ενώ αντίθετα η τιμή της σταθεράς υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης  $A_{\parallel}$  αυξάνεται. Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε αύξηση του αριθμού των ατόμων δοτών αζώτου στο ισημερινό επίπεδο [14].

### 7.8 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων

Οι πειραματικές καμπύλες ογκομέτρησης προσομοιώνονται ικανοποιητικά δεχόμενοι την ύπαρξη πέντε μονοπυρηνικών σωματιδίων (συμπλόκων) στην κλίμακα pH 3-12 και συγκεκριμένα των CuLH, CuL, CuLH-1, CuLH-2, CuLH-3, CuLH-4.

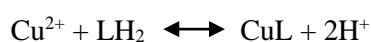
Όπως φαίνεται από τις αντίστοιχες καμπύλες κατανομής (σχήμα 30, σελ 100) η ένταξη των ιόντων Cu<sup>2+</sup> στο πεπτίδιο, ξεκινάει σε pH περίπου ίσο με 3, με το σχηματισμό του συμπλόκου CuLH, η συγκέντρωση του οποίου μεγιστοποιείται σε pH = 5.7. Η τιμή,  $\log K^* = -2.12$  είναι παραπλήσια με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για μονοδοντική ένταξη (1N) του ιόντος Cu<sup>2+</sup> στο ιμιδαζολικό άτομο αζώτου ενός καταλοίπου His (όπως στις περιπτώσεις των πεπτιδίων Ac-TRRSHTSEGTRSR-NH<sub>2</sub> ( $\log K^* = -2.09$ ) [31], Ac- EVRHQKLVFFAEDVGSNK-NH<sub>2</sub> ( $\log K^* = -1.95$ ) [49] και -ELAKHA- (-2.13) [42]), υποδηλώνοντας παρόμοιο τρόπο ένταξης.

Περαιτέρω, αξίζει να αναφέρουμε ότι η τιμή  $\log K = 4.34$  ( $\log K = \log \beta(\text{CuLH}) - \log \beta(\text{LH})$ ) για την αντίδραση  $\text{Cu}^{2+} + \text{LH} \rightleftharpoons \text{CuLH}$  βρίσκεται σε καλή συμφωνία με αντίστοιχες που χαρακτηρίζουν τις αντιδράσεις σχηματισμού συμπλόκων με σφαίρα

ένταξης  $\{N_{im}, COO^-\}$ . Η τιμή  $\log K=4.34$  του σωματιδίου που μελετάμε παρουσιάζεται ελαφρά αυξημένη σε σχέση με τις αντίστοιχες συμπλόκων 1N των συστημάτων Cu(II): -MKHM-(3.7), -FKHV-(3.6), -IKQHT-(3.82), -EVRHQK-(3.74), σε παρένθεση παρατίθεται η τιμή  $\log K$  για τα παραπάνω. [29, 30, 41]. Η αύξηση της τιμής  $\log K$  του υπό συζήτηση συμπλόκου σε σχέση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα μπορεί να ερμηνευτεί δεχόμενοι την πιθανή αλληλεπίδραση της  $\gamma$ -COOH του γλουταμικού οξέος στο ισημερινό επίπεδο της σφαίρας ένταξης του ιόντος.

Στο φάσμα EPR σε  $pH=5.4$  παρατηρείται η ύπαρξη δύο κέντρων Cu(II) (a,b στον πίνακα 11, σελ 103), όπως εξάλλου αναμένεται και από το διάγραμμα κατανομής. Πιο συγκεκριμένα, το (a) αντιστοιχεί σε ελεύθερα ιόντα χαλκού, ενώ το (b) στο σύμπλοκο τύπου ένταξης  $1N\{N_{im}\}$ . Οι τιμές της σταθεράς υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης και του παράγοντα  $g$  ( $A_{\parallel} = 152$  G,  $g_{\parallel} = 2.33$ ), είναι τυπικές για  $1N\{N_{im}\}$  ένταξη [43-45], όπως και η τιμή  $\lambda_{max} = 705$  nm, που εξάγεται από το φάσμα απορρόφησης στην ορατή περιοχή (οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές, ενδεικτικές  $1N$  ένταξης  $\{N_{im}, COO^-\}$  κυμαίνονται μεταξύ 700 – 740 nm. [12]). Η μετατόπιση της εν λόγω τιμής σε μικρότερο μήκος κύματος (κυανή μετατόπιση), σε σχέση με αυτή που προβλέπεται από την εξίσωση των Sigel και Martin ( $\lambda_{max} = 760$  nm), θεωρώντας ότι το ισημερινό επίπεδο του συμπλόκου καταλαμβάνεται από το ιμιδαζολικό άζωτο και 3 μόρια νερού, αποτελεί τη φασματοσκοπική ένδειξη της συμμετοχής της καρβοξυλικής ομάδας του Glu, στη σφαίρα ένταξης του χαλκού  $\{N_{im}, COO^-, 2 H_2O\}$ .

Η αύξηση του  $pH$  του διαλύματος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των σωματιδίων CuL σε περιοχή  $pH$  4.5-8. Η επικάλυψη των καμπυλών κατανομής του συγκεκριμένου συμπλόκου με τις αντίστοιχες των CuLH και CuLH<sub>-1</sub>, καθιστά αδύνατη τη μελέτη του με φασματοσκοπικές τεχνικές. Επομένως θα χαρακτηριστεί μόνο βάση της στοιχειομετρίας και της υπολογιζόμενης σταθεράς σχηματισμού του. Η τιμή  $pK_a = 6.58$  για την αντίδραση  $CuLH \leftrightarrow CuL + H^+$  είναι χαρακτηριστική ιοντισμού και ένταξης αμιδικού ατόμου αζώτου σε πεπτίδια που περιλαμβάνουν το αμινοξύ ιστιδίνη στο C-τελικό άκρο ή ενδιάμεσες θέσεις [29, 30, 41-45]. Από την άλλη η τιμή  $\log K^* = -8.70$  που αφορά την αντίδραση:



πλησιάζει τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές που αποδόθηκαν σε ένταξη τύπου  $2N\{N_{im}, N^{\text{-amide}}\}$  [31, 36]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα  $2N$  σύμπλοκα Cu(II) με τα πεπτίδια H<sub>2</sub>B<sub>94-125</sub> (-8.49) και -ELAKHA- (-8.88). [42]

Ο επόμενος ιοντισμός (αμιδικού ατόμου αζώτου) λαμβάνει χώρα με τιμή  $pK_a=6.00$  και οδηγεί στον σχηματισμό του συμπλόκου στοιχειομετρίας  $CuLH_{-1}$ . Το τελευταίο επικρατεί σε φυσιολογική τιμή pH ( $pH \sim 7.4$ ) και ευθύνεται για τη δέσμευση της αρχικής ποσότητας  $Cu(II)$  του διαλύματος σε ποσοστό περίπου 90%, γεγονός που υποδεικνύει τη μεγάλη θερμοδυναμική του σταθερότητα. Ως αποτέλεσμα αυτής (α) το  $CuLH_{-1}$  υφίσταται σε μία κλίμακα 5 πεχαμετρικών μονάδων ( $pH \sim 5.5-10.5$ ) (β) η συγκέντρωση του προηγούμενου συμπλόκου  $CuL$  είναι μικρή. Επιπλέον παρατηρείται ότι η παραπάνω τιμή  $pK_a=6.00$  είναι μικρότερη από την αντίστοιχη που αποδίδεται στον ιοντισμό του πρώτου αμιδικού ( $pK_a = 6.58$ ) γεγονός που σημαίνει ότι οι δυο αντιδράσεις ιοντισμού πραγματοποιούνται παράλληλα [23, 29, 30, 41-47]. Η τιμή  $\log K^* = -14.70$  είναι παραπλήσια με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για  $3N \{N_{Im}, 2N_{-amide}\}$  ένταξη, όπως στις περιπτώσεις των πεπτιδίων  $H_2B_{94-125}$  (-14.65) και -LAHYNK- (-14.22). [42]

Παράλληλα, και τα φασματοσκοπικά δεδομένα επιβεβαιώνουν την παραπάνω ερμηνεία. Συγκεκριμένα η τιμή  $\lambda_{max} = 599$  nm στο φάσμα ορατού πλησιάζει αρκετά τη θεωρητικά υπολογιζόμενη με την βοήθεια της εξίσωσης Sigel-Martin ( $\lambda_{max} = 583$  nm) για ένταξη του  $Cu^{2+}$ , με ένα σύνολο δοτών τύπου  $\{N_{Im}, 2N_{-amide}, H_2O\}$  [12] και βρίσκεται εντός της περιοχής τιμών  $\lambda_{max}$  (560-610 nm) που χαρακτηρίζουν χρωμοφόρα τύπου  $\{N_{Im}, 2N_{-amide}\}$ . [29] Η μικρή ερυθρή μετατόπιση (16 nm) θα μπορούσε να αποδοθεί σε ασθενή αξονική αλληλεπίδραση της ομάδας  $\gamma-COO^-$  του καταλοίπου γλουταμικού οξέος. Τέλος και οι τιμές των παραμέτρων  $g||, A||$  (2.22, 168 G) του φάσματος EPR που καταγράφηκε σε pH 7.5, είναι χαρακτηριστικές συμπλόκων  $Cu(II)$ -πεπτιδίων με δότες τρία άτομα αζώτου κι ένα άτομο οξυγόνου στο ισημερινό επίπεδο [23]. Η σχετική μικρή τιμή του τελεστή υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης  $A|| = 168$  G σε σχέση με τις αναμενόμενες για τον παραπάνω τύπο ένταξης τιμές (~180 G) παρέχει μια ακόμα επιβεβαίωση της τετραγωνικής παραμόρφωσης του συμπλόκου ως αποτέλεσμα της αξονικής αλληλεπίδρασης του  $\gamma-COO^-$ .

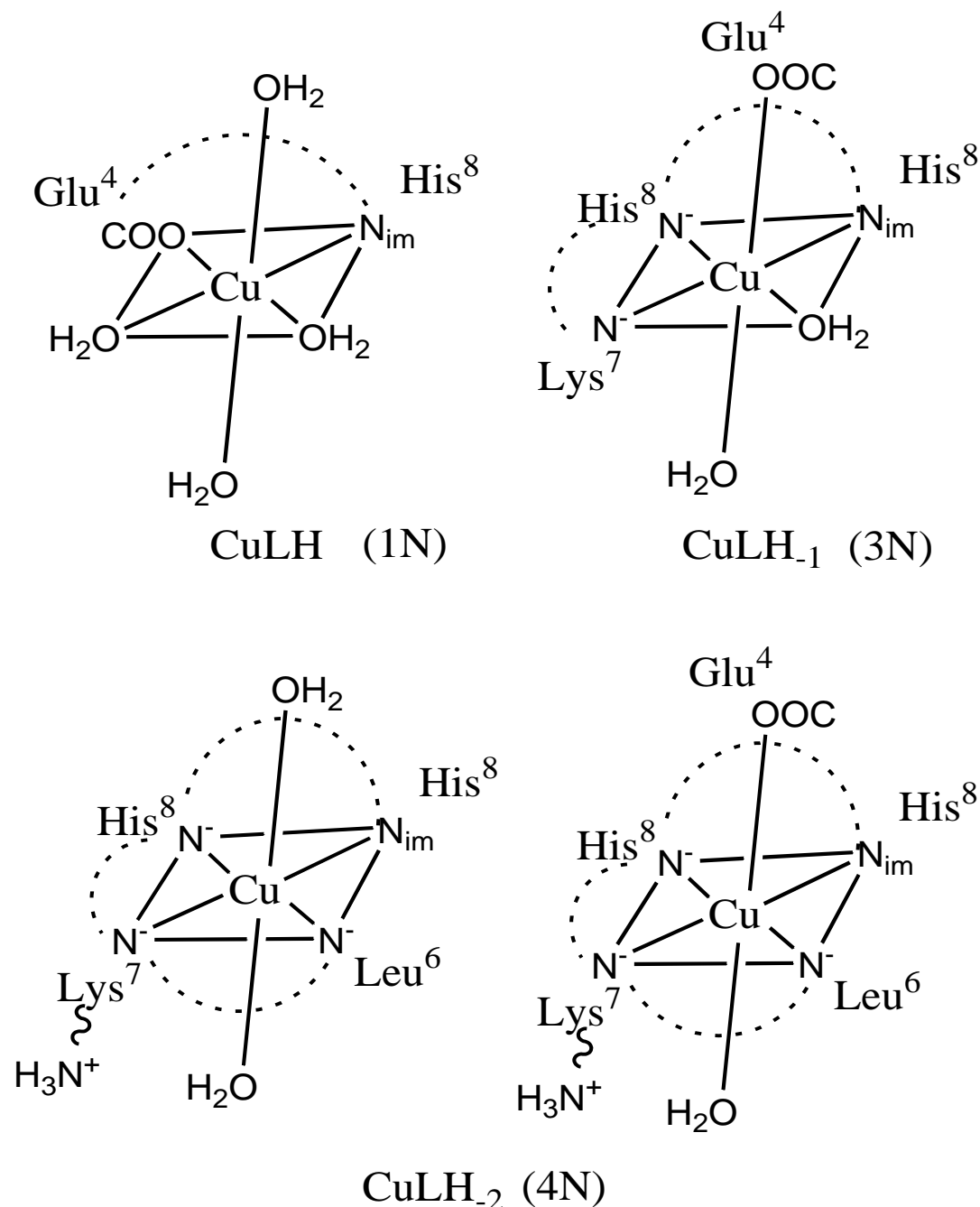
Σε πιο αλκαλικά διαλύματα σχηματίζεται το σωματίδιο (σύμπλοκο) στοιχειομετρίας  $CuLH_{-2}$  (περιοχή pH 6.5-12). Η τιμή  $pK_a=8.53$  αντιστοιχεί στην αποπρωτονίωση και ένταξη ενός επιπλέον πεπτιδικού ατόμου αζώτου, με τη συμμετοχή του οποίου συμπληρώνεται η σφαίρα ένταξης του  $Cu(II)$  στο ισημερινό επίπεδο. Η τιμή  $\log K^* = -23.23$ , είναι παραπλήσια με αντίστοιχες τιμές που χαρακτηρίζουν τύπο ένταξης  $4N \{N_{Im}, 3N_{-amide}\}$  σε σύμπλοκα  $Cu(II)$  με πεπτίδια όπως τα  $H_2B_{94-125}$  (-23.11) και -LAHYNK- (-23.65)) [31, 36, 42, 45, 47].

Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από τα διαθέσιμα φασματοσκοπικά δεδομένα και πιο συγκεκριμένα από την τιμή  $\lambda_{\max} = 527 \text{ nm}$  του φάσματος ορατού, η οποία πλησιάζει τη θεωρητικά προβλεπόμενη με βάση την εξίσωση των Sigel και Martin ( $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ ) για ένταξη τύπου  $4N \{N_{\text{Im}}, 3N_{\text{amide}}\}$  [12]. Η παρουσία ενός επιπλέον «ώμου» στο φάσμα ( $\lambda_{\max} = 560 \text{ nm}$ ) θα μπορούσε να ερμηνευθεί δεχόμενοι την παρουσία ενός ισομερούς ένταξης, όπου περιλαμβάνει επιπρόσθετα αζονική αλληλεπίδραση της ομάδας  $\gamma\text{-COO}^-$  του καταλοίπου γλουταμικού οξέος. Στο φάσμα EPR παρατηρείται (σε σχέση με το αντίστοιχο του  $\text{CuLH}_1$ ) μείωση του παράγοντα  $g_{\parallel}$  με ταυτόχρονη αύξηση του τελεστή υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης. Οι μεταβολές αυτές είναι χαρακτηριστικές της αύξησης της ισχύος του πεδίου των υποκαταστατών γύρω από το ιόν χαλκού στο ισημερινό επίπεδο. Ειδικότερα, οι τιμές  $g_{\parallel} = 2.20$  και  $A_{\parallel} = 188 \text{ G}$  που προκύπτουν από τα φάσματα EPR, βρίσκονται σε συμφωνία με αντίστοιχες, χαρακτηριστικές ένταξης τύπου  $\{N_{\text{Im}}, 3N_{\text{amide}}\}$  (π.χ συμπλόκων  $\text{Cu(II)}$  με τα πεπτίδια:  $\text{GlyGlyGlyGlyHis}$  ( $A_{\parallel} = 199 \text{ G}$ ,  $g_{\parallel} = 2.20$ ),  $\text{GlyGlyGlyHis}$  ( $A_{\parallel} = 200 \text{ G}$ ,  $g_{\parallel} = 2.20$ ) [48] και  $\text{Ac-AlaLysArgHisArgLys-NH}_2$  ( $A_{\parallel} = 204 \text{ G}$ ,  $g_{\parallel} = 2.19$ ) [37]. Η λίγο μικρότερη τιμή του τελεστή  $A_{\parallel}$  ( $188 \text{ G}$ ) (σε σχέση με τις βιβλιογραφικές τιμές που αναφέρθηκαν  $\sim 200 \text{ G}$ ) υποδεικνύει μεγαλύτερη απόκλιση από την επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία και ενισχύει την υπόθεσή μας σχετικά με την πιθανή ύπαρξη και ενός ισομερούς ένταξης με αζονική ένταξη κάρβοξυ- δότη.

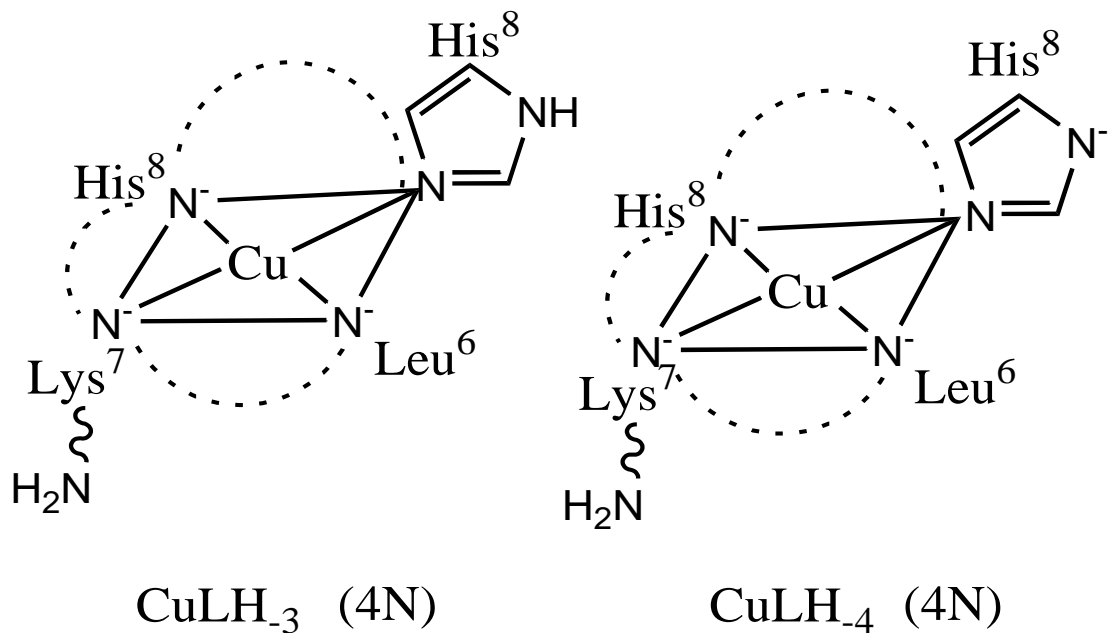
Οι δύο επόμενες διεργασίες αποπρωτονίωσης χαρακτηρίζονται από τιμές  $pK_a = 10.38$  και  $11.09$  και οδηγούν στο σχηματισμό των  $\text{CuLH}_3$  και  $\text{CuLH}_4$  αντίστοιχα. Ο έλεγχος των φασματοσκοπικών παραμέτρων (ορατό, EPR) αναδεικνύει μικρή ισχυροποίηση του πεδίου των υποκαταστατών και γεωμετρία που πλησιάζει περισσότερο την επίπεδη τετραγωνική. Λόγω του κορεσμού της σφαίρας ένταξης του ιόντος στο ισημερινό επίπεδο, η ένταξη επιπλέον ατόμων δοτών αζώτου δεν είναι δυνατή. Ως εκ τούτου τιμή  $pK_a = 10.38$  θα πρέπει να αποδοθεί στον ιοντισμό (χωρίς ένταξη) της  $\epsilon$ -αμινομάδας της Lys, η οποία εξάλλου πλησιάζει την αντίστοιχη ( $pK_a = 10.23$ ) στο μη συμπλοκοποιημένο πεπτίδιο. Από την άλλη όπως αναφέρθηκε και για το φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο, η τιμή  $pK_a = 11.09$  θα μπορούσε να αποδοθεί στον ιοντισμό (χωρίς ένταξη) του πυρρολικού ατόμου αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου [51-53]. Συνοψίζοντας τα εν λόγω σύμπλοκα υιοθετούν ένταξη τύπου  $\{N_{\text{Im}}, 3N_{\text{amide}}\}$  με αποπρωτονιωμένες και μη ενταγμένες τις ομάδες που αναφέρθηκαν. Χαρακτηριστικό των παραπάνω διεργασιών ιοντισμού είναι η μικρή ισχυροποίηση του πεδίου των υποκαταστατών και η μετάβαση σε γεωμετρία που πλησιάζει περισσότερο

την επίπεδη τετραγωνική. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι αξονικές αλληλεπιδράσεις πλέον δεν υφίστανται.

Στα παρακάτω σχήματα (σχήματα 33, 34) παρουσιάζονται σχηματικές αναπαραστάσεις της προτεινόμενης δομής των συμπλόκων που συζητήθηκαν.



**Σχήμα 33:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων CuLH, CuLH<sub>-1</sub> και CuLH<sub>-2</sub> που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου Ac-GSTENLKH-NH<sub>2</sub> με τα ιόντα Cu(II). Εμφανίζονται τα άτομα δότες και η πρόλευσή τους (αμινοξικά κατάλοιπα). Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν χηλικούς δακτυλίους (ένας εξαμελής για το ζεύγος N<sub>im</sub>, N<sup>-</sup> (His)) και οι υπόλοιποι πενταμελείς.



**Σχήμα 34:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων  $\text{CuLH}_3$  και  $\text{CuLH}_4$  που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου  $\text{Ac-GSTENLKH-NH}_2$  με τα ιόντα  $\text{Cu(II)}$ . Εμφανίζονται τα άτομα δότες και η πρόλευσή τους (αμινοξικά κατάλοιπα). Οι διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν χηλικούς δακτυλίους (ένας εξαμελής για το ζεύγος  $N_{im}, N^-$  ( $\text{His}$ )) και οι υπόλοιποι πενταμελείς.

## Κεφάλαιο 8

### Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των ιόντων Cu(II) με τα πεπτίδια Ac-Gly-Ser(P)-Thr-Glu-Asn-Leu-His-NH<sub>2</sub> (ptau ή L) και Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-His-NH<sub>2</sub> (tau ή L'), μοντέλα του τμήματος R1 της τ-πρωτεΐνης. Η παραπάνω αμινοξική αλληλουχία περιλαμβάνει (α) το αμινοξύ ιστιδίνη ο ιμιδαζολικός δακτύλιος του οποίου χρησιμεύει ως αρχική θέση ένταξης του Cu(II) (β) το αμινοξύ σερίνη (με δυνατότητα φωσφορυλίωσης), ενώ εντοπίζεται στο σημείο δέσμευσης της τ-πρωτεΐνης με τους μικροσωληνίσκους. Τα δυο πεπτίδια διαφέρουν μόνο ως προς την κατάσταση φωσφορυλίωσης του καταλοίπου σερίνης.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε σύνθεση, καθαρισμός και χαρακτηρισμός των δύο πεπτιδικών μοντέλων. Ακολούθησαν ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις απουσία και παρουσία ιόντων χαλκού. Η επεξεργασία των δεδομένων αποκάλυψε το πλήθος τη στοιχειομετρία και τη θερμοδυναμική σταθερότητα ( $\log\beta$ ,  $\log K$ ) των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Ο χαρακτηρισμός τους επιτεύχθηκε με με με τη βοήθεια φασματοσκοπικών τεχνικών (φασματοσκοπία ορατού και EPR).

Και τα δυο πεπτίδια αλληλεπιδρούν με τα ιόντα Cu(II) σε υδατικά διαλύματα αρκετά αποτελεσματικά, οδηγώντας στον σχηματισμό μιας σειράς μονοπυρηνικών σωματιδίων (συμπλόκων) στην κλίμακα pH (3-12). Η συμπεριφορά και των δυο όσον αφορά τη συμπλοκοποίηση ακολουθεί την γενική πορεία για πεπτίδια που περιλαμβάνουν την ιστιδίνη στη C-τελική θέση [54]. Όπως αναμένονταν η αρχική ένταξη του ιόντος Cu(II) πραγματοποιείται στο N(3) άτομο του ιμιδαζολικού δακτυλίου της His σε τιμή pH >3 (σύμπλοκα στοιχειομετρίας CuLH<sub>2</sub> και CuL'H για το φωσφορυλιωμένο και μη πεπτίδιο αντίστοιχα). Τα θερμοδυναμικά-φασματοσκοπικά δεδομένα υποδεικνύουν την πιθανή συμμετοχή και της γ-καρβοξυλικής ομάδας του Glu, στη σφαίρα ένταξης του χαλκού στο ισημερινό επίπεδο σχηματίζοντας ένα μακροχηλικό δακτύλιο.

Η πρώτη διαφορά (αφορά την πορεία συμπλοκοποίησης) μεταξύ των δυο πεπτιδίων εντοπίζεται στην πρώτη αντίδραση ιοντισμού στο φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο, η οποία οδηγεί στο σύμπλοκο στοιχειομετρίας CuLH με πηγή πρωτονίου τη φωσφορική ομάδα του καταλοίπου Ser. Για το υπό συζήτηση σύμπλοκο προτάθηκε σφαίρα ένταξης {N<sub>im</sub>, COO<sup>-</sup>, 2 H<sub>2</sub>O} ίδια με το CuL'H. Παρόλα αυτά τα δυο σύμπλοκα

διαφέρουν όσον αφορά τη θερμοδυναμική τους σταθερότητα καθώς η τιμή  $\log K^*$  που υπολογίστηκε για το  $\text{CuLH}$  (-1.70) είναι μεγαλύτερη της αντίστοιχης για το  $\text{CuL}'\text{H}$  (-2.12). Η αυξημένη θερμοδυναμική σταθερότητα του  $\text{CuLH}$  δεν μπορεί να αποδοθεί στην ένταξη της φωσφορικής ομάδας καθώς οι φασματοσκοπικές παράμετροι και των δυο ( $\text{CuLH}$  και  $\text{CuL}'\text{H}$ ) είναι οι ίδιες. Υποθέσαμε λοιπόν, σε συμφωνία και με βιβλιογραφικά δεδομένα [46], ότι η επιπλέον σταθεροποίηση στο φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο θα πρέπει να οφείλεται σε αλληλεπίδραση της θετικά φορτισμένης ε-αμινομάδας της λυσίνης με την αρνητικά φορτισμένη φωσφορική ομάδα σχηματίζοντας ενός είδους «φράκτη» που προστατεύει εν μέρει το μεταλλικό κέντρο (σχήμα 18, σελ 89).

Το παραπάνω φαινόμενο έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση ιοντισμού και ένταξης των δυο πρώτων αμιδικών πεπτιδικών ατόμων αζώτου που οδηγεί διαδοχικά στον σχηματισμό των  $\text{CuL}$  ( $\text{CuL}'$ ) και  $\text{CuLH}_{-1}$  ( $\text{CuL}'\text{H}_{-1}$ ) ( $pK_a = 6.84$  και  $6.44$  για το  $L$  έναντι  $6.58$  και  $6.00$  για το  $L'$ ). Αυτά υιοθετούν σφαίρα ένταξης τύπου  $2N$   $\{N_{im}, N^-\}$  και  $3N$   $\{N_{im}, 2N^-\}$  (με αξονική αλληλεπίδραση της ομάδας  $\text{Glu } \gamma\text{-COO}^-$ ) αντίστοιχα. Το τελευταίο και για τα δυο συστήματα είναι το κυρίαρχο σωματίδιο σε φυσιολογική τιμή  $pH$  ( $\sim 7.4$ ) και υπεύθυνο για τη δέσμευση ποσοστού  $85\text{-}90\%$  της αρχικής συγκέντρωσης ιόντων  $\text{Cu(II)}$ , γεγονός που αναδεικνύει τη μεγάλη θερμοδυναμική του σταθερότητα. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματά μας έρχονται σε αντίθεση με τα μέχρι σήμερα γνωστά βιβλιογραφικά δεδομένα [55] που υποστηρίζουν σφαίρα ένταξης  $2N$  σε φυσιολογική τιμή  $pH$ . Οι τιμές  $\log K^*$  για τα  $3N$  σύμπλοκά μας στα δυο πεπτίδια παρουσιάζουν μια μικρή διαφοροποίηση ( $-14.98$  ( $L$ ),  $-14.70$  ( $L'$ )). Η σειρά θερμοδυναμικής σταθερότητας έχει αντιστραφεί υπέρ του  $\text{CuL}'\text{H}_{-1}$  ( $\tau$ ) γεγονός που υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση  $\text{Ser}(\text{OP}(\text{O})\text{O}_2^{2-}) \text{Lys-}\epsilon\text{-NH}_3^+$  δεν υφίσταται.

Σε πιο αλκαλικές τιμές  $pH$  σχηματίζονται τα σύμπλοκα στοιχειομετρίας  $\text{CuLH}_{-2}$  ( $\text{CuL}'\text{H}_{-2}$ ) ως αποτέλεσμα του ιοντισμού ενός ακόμα αμιδικού πρωτονίου (τιμές  $pK_a = 8.68$  και  $8.53$ ) αντίστοιχα. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα είναι συμβατά με σφαίρα ένταξης τύπου  $4N$  ( $N_{im}, 3N^-$ ) και παρουσία ισομερών σύνδεσης. Σε αυτό το σημείο παρουσιάζεται άλλη μια (και τελευταία) διαφοροποίηση για τα πεπτίδια  $L$  και  $L'$  όσον αφορά τη φύση του αξονικά ενταγμένου υποκαταστάτη στο ιόν  $\text{Cu(II)}$ , αφού στο πρώτο προτείνεται η συμμετοχή της φωσφορικής ομάδας ενώ στο δεύτερο της ομάδας  $\text{Glu } \gamma\text{-COO}^-$ .

Τα δυο τελευταία σύμπλοκα που ανιχνεύθηκαν στοιχειομετρίας  $\text{CuLH}_{-3}$  ( $\text{CuL}'\text{H}_{-3}$ ) και  $\text{CuLH}_{-4}$  ( $\text{CuL}'\text{H}_{-4}$ ) υιοθετούν τύπο ένταξης  $4N$  ( $N_{im}, 3N^-$ ) και οι



αντιδράσεις ιοντισμού που οδηγούν στο σχηματισμό τους αποδίδονται στην αποπρωτονίωση (χωρίς ένταξη) της ε-αμινομάδας της Lys και του πυρρολικού ατόμου αζώτου του ιμιδαζολίου της His. Οι φασματοσκοπικές τους παράμετροι είναι παραπλήσιες και υποδηλώνουν απουσία αζονικών αλληλεπιδράσεων (επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση της δεσμευτικής (προς τα ιόντα Cu(II)) ικανότητας των δυο πεπτιδίων αφού μπορεί να αναδείξει το ρόλο της φωσφορικής ομάδας που είναι παρούσα μόνο στο ptau. Προς αυτή την κατεύθυνση παραθέτουμε τα δεδομένα log K\* που συζητήθηκαν πιο πάνω (πίνακας 12).

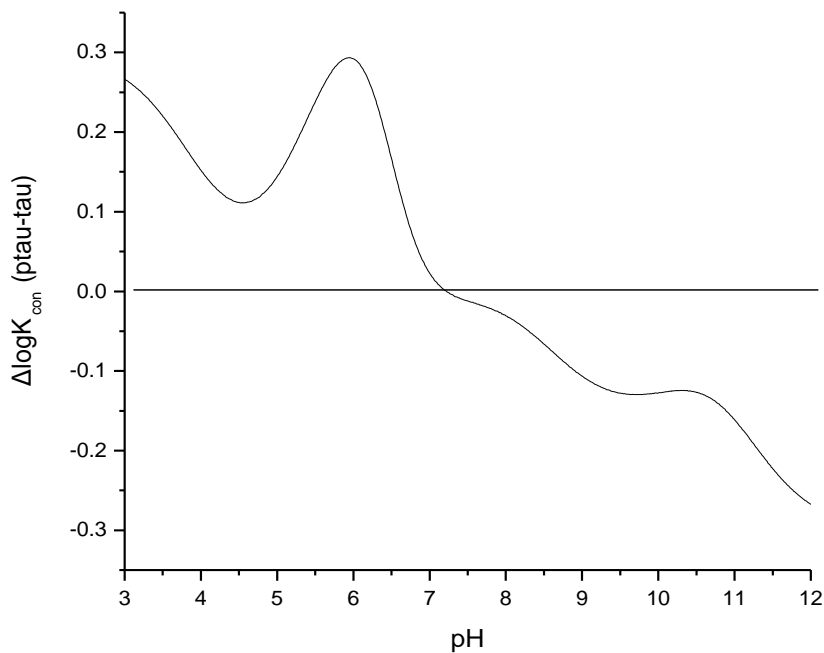
**Πίνακας 12:** Τιμές log K\* των σχηματιζόμενων συμπλόκων των δύο πεπτιδίων

log K*					
	1N{N <sub>Im</sub> }	1N{N <sub>Im</sub> }	2N{N <sub>Im</sub> , N <sup>-</sup> }	3N{N <sub>Im</sub> , 2N <sup>-</sup> }	4N{N <sub>Im</sub> , 3N <sup>-</sup> }
<b>-GS(P)TENLKH-</b>	-2.12	-1.70	-8.54	-14.98	-23.66
<b>-GSTENLKH-</b>	-2.12	-	-8.70	-14.70	-23.23

Επιπρόσθετα θα χρησιμοποιήσουμε την σταθερά συμπλοκοποίησης υπό δεδομένες συνθήκες pH (συμβολισμός K<sub>con</sub>, conditional constant) [56, 57], η οποία ορίζεται για την αντίδραση  $M + L \leftrightarrow ML$  σε οποιαδήποτε τιμή pH ως ο λόγος του αθροίσματος των συγκεντρώσεων όλων των σχηματιζόμενων συμπλόκων Cu(II) προς το γινόμενο της συγκέντρωσης του μη συμπλοκοποιημένου Cu(II) επί το άθροισμα των συγκεντρώσεων όλων των πρωτονιωμένων μορφών του υποκαταστάτη δηλαδή:

$$K_{con} = \frac{[MLH_2] + [MLH] + [MLH_{-1}] + [MLH_{-2}] + [MLH_{-3}] + [MLH_{-4}]}{[Cu(II)] * ([LH_4] + [LH_3] + [LH_2] + [LH] + [L])}$$

Ο υπολογισμός της για κάθε τιμή pH έγινε με την βοήθεια των καμπυλών κατανομής σωματιδίων και για τα δυο πεπτιδία (υπό τις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης και μοριακής αναλογίας Cu(II)-πεπτιδίων. Εν συνεχεία υπολογίστηκε η διαφορά  $\Delta \log K_{con} = \log K_{con}(L) - \log K_{con}(L')$  και σχεδιάστηκε το διάγραμμα  $\Delta \log K_{con}$  συναρτήσει της τιμής pH το οποίο και παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα (σχήμα 35).



**Σχήμα 35:** Γραφική παράσταση  $\Delta\log K_{con}$  συναρτήσει της τιμής pH διαλυμάτων Cu(II)-ptau ή tau υπό τις ίδιες συνθήκες συγκέντρωσης και μοριακής αναλογίας

Το πρώτο συμπέρασμα που εξάγεται τόσο με την βοήθεια των τιμών  $\log K^*$  (πίνακας 12) όσο και από το διάγραμμα του σχήματος 35 είναι ότι διαφορές υφίστανται αλλά είναι μικρές. ( $\pm 0.3$  λογαριθμικές μονάδες). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η δεσμευτική ικανότητα του φωσφορυλιωμένου πεπτιδίου (ptau) είναι μεγαλύτερη σε όξινες τιμές pH, όσο πλησιάζουμε στη φυσιολογική τιμή pH επέρχεται εξισορρόπηση και εν συνεχεία πιο αποτελεσματικό όσον αφορά τη δέσμευση Cu(II) είναι το μη φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο (tau). Μάλιστα στο παραπάνω σχήμα παρουσιάζεται ένα μέγιστο της τιμής  $\Delta\log K_{con}$  σε τιμή pH  $\sim 6$ . Αυτή η τιμή pH αντιστοιχεί στη μέγιστη συγκέντρωση του συμπλόκου CuLH (ptau). Θυμίζουμε ότι η επιπλέον σταθεροποίηση του αποδόθηκε στην αλληλεπίδραση της θετικά φορτισμένης ε-αμινομάδας της λυσίνης με την αρνητικά φορτισμένη φωσφορική ομάδα.

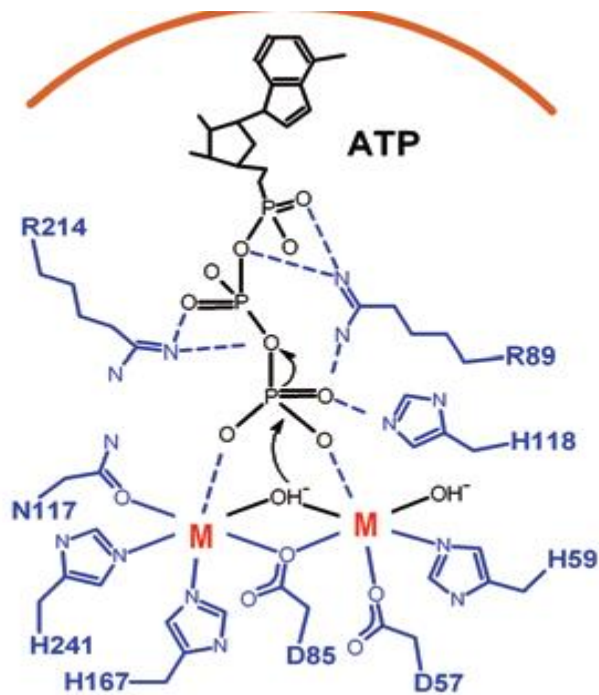
Από την άλλη, σε μέτρια αλκαλικές τιμές pH ( $\sim 9.5$ ) παρατηρείται ένα τοπικό ελάχιστο της τιμής  $\Delta\log K_{con}$  ( $-0.15$  λογαριθμικές μονάδες). Είναι η περιοχή pH στην οποία ανιχνεύθηκαν τα 4N ( $N_{im}$ ,  $3N^-$ ) σύμπλοκα στοιχειομετρίας CuLH<sub>2</sub> (CuL'H<sub>2</sub>) για τα οποία προτείναμε την ύπαρξη ισομερών ένταξης με την συμμετοχή της φωσφορικής ομάδας (αξονική ένταξη) στο ptau και της  $\gamma\text{-COO}^-$  του αμινοξέος Glu στο tau. Το συμπέρασμα σε αυτή την περίπτωση είναι ότι η πιθανή αξονική ένταξη της

φωσφορικής ομάδας έχει ως αποτέλεσμα μικρότερη δεσμευτική ικανότητα (Cu(II)) του ptau. Τέλος σε φυσιολογική τιμή pH (~7.4) δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των πεπτιδίων (διαθέτουν περίπου την ίδια δεσμευτική ισχύ ως προς το ιόν Cu(II)). Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι η παρουσία της φωσφορικής ομάδας έχει κάποια μικρή επίδραση όσον αφορά τη δέσμευση του ιόντος Cu(II).

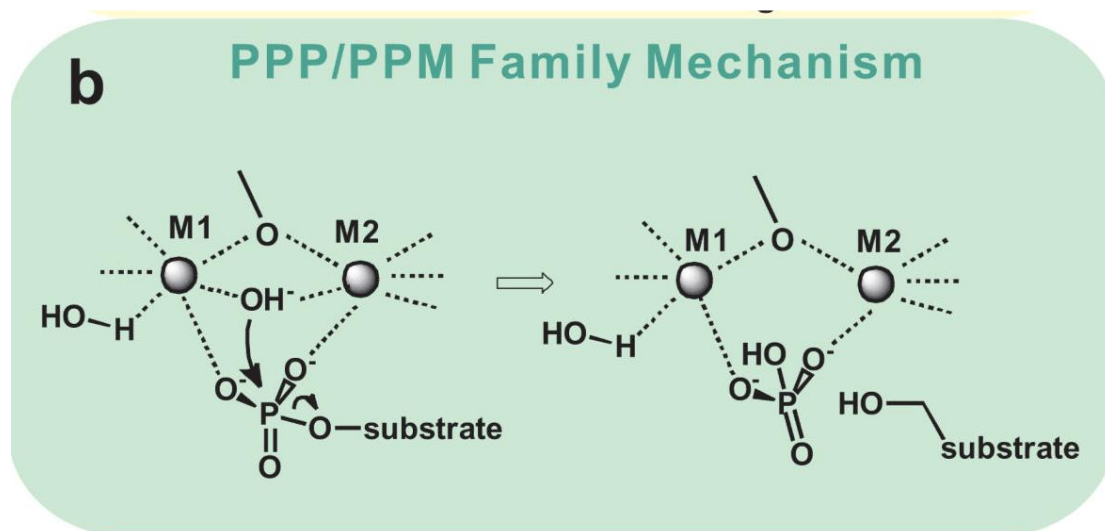
Θα μπορούσε η παραπάνω μελέτη να δώσει κάποιες απαντήσεις σχετικά με το ρόλο του ιόντος Cu(II) στη νόσο είτε (α) προάγοντας το σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου είτε (β) την πιθανή εμπλοκή του στο μηχανισμό που ρυθμίζει την ενζυμική δράση κινασών (π.χ GSK-3b) /φωσφατασών (π.χ PP2A) που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα την tau-πρωτεΐνη οδηγώντας σε υπερφωσφορυλίωση (π.χ ↑ δράσης GSK-3b, ↓δράσης PP2A ).

Όσον αφορά την περίπτωση (α) αν και δεν πραγματοποιήθηκε σχετική μελέτη της ικανότητας του 3N συμπλόκου που σχηματίζεται σε φυσιολογική τιμή pH (και για τα δυο πεπτιδία) ως προς την ικανότητα παραγωγής ROS, θα πρέπει να σημειωθεί για τα σύμπλοκα Cu(II)-πεπτιδίων τύπου 3N ( $N_{im}$ , 2N<sup>-</sup>) έχει αποδειχθεί ότι είναι οξειδοαναγωγικά ενεργά [58]. Η ανίχνευσή τους μάλιστα έρχεται σε αντίθεση με βιβλιογραφικά δεδομένα [55] με την βοήθεια των οποίων οι συγγραφείς υποστηρίζουν σφαίρα ένταξης 2N καθώς και τη μη μεταβολή της σφαίρας ένταξης του Cu(II) αυξανόμενης ή μειούμενης της αμινοξικής αλληλουχίας των μοντέλων που χρησιμοποίησαν. Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η συνέχιση της μελέτης προς αυτή την κατεύθυνση και αποτελεί έναν απ' τους μελλοντικούς στόχους μας.

Από την άλλη είναι γνωστό ότι η μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα της φωσφατάσης PP2A παρουσία ιόντων Cu(II) θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της τ-πρωτεΐνης με ότι αυτό βιολογικά συνεπάγεται. Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται τμήμα του ενεργού κέντρου της φωσφατάσης PP2A (παραουσία του υπόστρωματος ATP, σχήμα 36 [59]) και ο γενικός μηχανισμός υδρόλυσης του υποστρώματος (σχήμα 37) [60]. Όπως φαίνεται και στα σχήματα το φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα αλληλεπιδρά (μέσω των ατόμων O της γ-φωσφορικής ομάδας) με το διμεταλλικό κέντρο (πιθανότατα ιόντα  $Mn^{2+}$  [61]) έτσι ώστε να επιτευχθεί η γεινίαση του με το γεφυρωτικά ενταγμένο ιόν  $OH^-$  (παράγεται από αποπροτονίωση αρχικά ενταγμένου μορίου νερού με τη βοήθεια όξινου αμινοξικού καταλοίπου π.χ Asp, Glu) το οποίο με τη σειρά του προσβάλλει το άτομο P και οδηγεί στην υδρόλυση του υποστρώματος.



**Σχήμα 36:** Αλληλεπίδραση ATP με το ενεργό κέντρο της φωσφατάσης PP2A [59]



**Σχήμα 37:** Ο γενικός καταλυτικός μηχανισμός της φωσφατάσης PP2A [60]

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω καθώς και τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης του ιόντος Cu(II) με το φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε ότι οποιαδήποτε συμμετοχή της φωσφορικής ομάδας (όπως παρατηρήθηκε στο πεπτίδιο μας) είτε έμεσα (αλληλεπίδραση της θετικά φορτισμένης ε-αμινομάδας της λυσίνης με την αρνητικά φορτισμένη φωσφορική ομάδα, όπως

προτείνουμε) είτε άμεσα (ένταξη Cu(II)) θα μπορούσε να επιδράσει αρνητικά όσον αφορά τη δράση του ενζύμου. Η υπόθεση αυτή μένει να αποδειχθεί πραγματοποιώντας σχετικά πειράματα προσδιορισμού της ενζυμικής δράσης της PP2A χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το υπό μελέτη σύστημα. Προς την κατεύθυνση αυτή θα κινηθούμε επίσης μελλοντικά.

## Κεφάλαιο 9

### Περίληψη

Η νόσος Alzheimer (Alzheimer Disease, AD) είναι μια χρόνια νευροεκφυλιστική ασθένεια του εγκεφάλου και αποτελεί το συχνότερο αίτιο της άνοιας. Η υπερφωσφορυλίωση της tau-πρωτεΐνης οδηγεί στην αποσύνδεσή της απ' τους μικροσωληνίσκους καθώς και στη συσσωμάτωσή της στον ενδοκυττάριο χώρο με τη μορφή αποθέσεων γνωστών ως νευροινώδη συσσωματώματα (NFT's). Η παραπάνω διεργασία είναι ένα από τα χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer, που οδηγεί στον σταδιακό εκφυλισμό και τελικά στο θάνατο των νευρώνων.

Παράλληλα, ο ρόλος των μεταλλικών ιόντων και κυρίως του βιολογικά σημαντικού ιόντος Cu(II) (η ομοιόσταση του οποίου επηρεάζεται σημαντικά κατά τη νόσο Alzheimer) δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Οι γνώσεις μας είναι ιδιαίτερα φτωχές ειδικά όσον αφορά την εμπλοκή του ιόντος Cu(II) στο σχηματισμό των NFT's. Αυτές περιορίζονται στη διαπίστωση ότι ο Cu(II) μπορεί να αλληλεπιδράσει με ένα ιστιδινικό κατάλοιπο (ιμιδαζολικός δακτύλιος) και ένα αμιδικό (πεπτιδικό) άτομο αζώτου [55], ενώ απουσιάζουν θερμοδυναμικές μελέτες (σε αντίθεση με το Αβ αμυλοειδές) όπου θα μπορούσε να προσδιοριστεί η σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου Cu(II)-πεπτιδικού μοντέλου (άρα και η δεσμευτική ισχύς του πεπτιδίου).

Σε μια προσπάθεια να συνεισφέρουμε σε αυτό το πεδίο συνθέσαμε το φωσφορυλιωμένο (Ser) και μη πεπτίδιο Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-His-NH<sub>2</sub>, τμήμα (261-268) της μεγαλύτερου μήκους ισομορφής της τ-πρωτεΐνης, που εντοπίζεται στο σημείο δέσμευσης της τ-πρωτεΐνης με τους μικροσωληνίσκους και μελετήσαμε για πρώτη φορά ποτενσιομετρικά αλλά και φασματοσκοπικά (φασματοσκοπία ορατού και EPR) την αλληλεπίδρασή τους με τα ιόντα Cu(II).

Η πορεία συμπλοκοποίησης είναι η αναμενόμενη για πεπτίδια που περιέχουν το αμινοξύ ιστιδίνη στο C-τελικό άκρο [54] και περιλαμβάνει αρχική ένταξη μέσω του ατόμου αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου και την εν συνεχεία διαδοχική αποπρωτονίωση και ένταξη αμιδικών (πεπτιδικών) ατόμων δοτών. Η παρουσία της φωσφορικής ομάδας έχει ως αποτέλεσμα μια μικρή διαφοροποίηση της δεσμευτικής ισχύος των πεπτιδίων όσον αφορά τον ιόν Cu(II) αφού παρατηρήθηκε ότι σε όξινες τιμές pH είναι μεγαλύτερη για το φωσφορυλιωμένο ενώ σε αλκαλικές η τάση αντιστρέφεται. Ως κύριο αίτιο αυτής της διαφοροποίησης προτάθηκε ηλεκτροστατική

αλληλεπίδραση (ή δεσμοί υδρογόνου) τύπου Ser(OP(O)O<sub>2</sub><sup>2-</sup>)...Lys-ε-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> για την πρώτη περίπτωση (pH ~6) και αζονική ένταξη της φωσφορικής ομάδας για τη δεύτερη. Παράλληλα βρέθηκε ότι σε φυσιολογική τιμή pH (~7.4) και τα δυο πεπτίδια σχηματίζουν ένα θερμοδυναμικά πολύ σταθερό σύμπλοκο τύπου ένταξης 3N {N<sub>im</sub>, 2N<sup>-amide</sup>}, σε αντίθεση με βιβλιογραφικά δεδομένα [55] που υποστηρίζουν ένταξη 2N ανεξαρτήτως μήκους αμινοξικής αλληλουχίας.

Τόσο η ανίχνευσή των παραπάνω, πιθανότατα οξειδοαναγωγικά ενεργών συμπλόκων 3N [58] σε φυσιολογική τιμή pH, όσο και η έμμεση (ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις-δεσμοί υδρογόνου) ή άμεση (αζονική ένταξη με το ιόν Cu(II)) συμμετοχή της φωσφορικής ομάδας του καταλοίπου σερίνης στο φωσφορυλιωμένο πεπτίδιο, θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην πρώτη περίπτωση στην αύξηση της συγκέντρωσης ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και του οξειδωτικού stress, ενώ στη δεύτερη σε αδυναμία του ενζύμου φωσφατάση PP2A να επιτελέσει το βιολογικό του ρόλο, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης tau.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αναμένεται να συμβάλλουν στη διαλεύκανση του ρόλου της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ιόντος Cu(II) και της τ-πρωτεΐνης, έχοντας ως απώτερο στόχο την κατανόηση του μηχανισμού που οδηγεί στη νόσο Alzheimer.

## Summary

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative brain disease, the most common cause of dementia. Tau-protein microtubules (an important part of neuron cells skeleton) dissociation in consequence of the tau hyperphosphorylation, results in protein aggregation into the intracellular neurons space in the form of deposits known as neurofibrillary tangles (NFT's). The above process (one of the Alzheimer's disease findings) results in gradual neurons degeneration and death.

On the other hand, the role of metal ions, and in particular of the biologically significant Cu(II) ion (whose homeostasis is affected by the disease), has not been fully elucidated. In particular, despite the importance of tau-protein and its role in neurodegeneration, there is not yet a definite answer whether Cu(II) mediates the formation of NFT's. The most important finding so far is that Cu (II) may interact quite efficiently with a histidine residue (imidazole ring) and a backbone amide (peptide) nitrogen atom [55]. In addition, unlike the well documented Cu(II)-A $\beta$  system, thermodynamic (potentiometric) studies where the overall stability constants of Cu(II)-peptide models could be calculated don't exist. The determination of the stability constants which actually reflect the binding strength is a very important task because it might provide answers related to the Cu(II) distribution in different biological targets, especially in those who normally store and supply Cu(II).

In an attempt to contribute in this field, the phosphorylated (Ser) and non-phosphorylated peptide Ac-Gly-Ser-Thr-Glu-Asn-Leu-His-NH<sub>2</sub> (261-268 fragment of the longest tau isoform, located at the tau-microtubules binding site) were synthesized. Both potentiometric (for the first time) and spectroscopic (visible and EPR spectroscopy) techniques were used to study their interaction with the Cu(II) ions.

The ligands coordination trend towards Cu(II) is the expected one for peptides bearing a histidine residue at the C-terminus [54]. His imidazole nitrogen atom acts as initial anchor site followed by the subsequent deprotonation and coordination of the backbone amide donors. The presence of the phosphate group results in a slight differentiation of the Cu(II) binding affinity of the peptides. It has been observed that it is higher for the phosphorylated analogue at acidic pH values whereas the trend is reversed in alkaline medium. In the first case, the main cause of this differentiation was attributed to electrostatic interaction (or hydrogen bonding) (pH~6) of the Ser (OP(O)<sub>2</sub><sup>-</sup>) ... Lys- $\epsilon$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> groups, while in the second to the axial Cu(II) coordination of the



phosphate group. At the same time, it was found that at physiological pH (~ 7.4) both peptides form a thermodynamically very stable 3N {N<sub>im</sub>, 2N<sup>-</sup><sub>amide</sub>} complex, in contrast to literature data [55] supporting 2N species regardless of the peptide model sequence length.

Both the detection of the above-mentioned, possibly redox-active 3N [58] species at physiological pH, as well as the indirect (electrostatic interaction-hydrogen bonding) or direct (Cu (II)-phosphate axial coordination) interactions in the phosphorylated peptide, could lead (in the first case) to an increase in the concentration of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress, while in the second, diminished PP2A phosphatase activity, resulting in an increment of phosphorylated tau levels.

The results of this work are expected to shed more light towards the elucidation of the role of the interaction between Cu(II) and t-protein with the ultimate aim of understanding the mechanism leading to Alzheimer's disease.

## Συντομογραφίες

- AD : Alzheimer disease
- A $\beta$  : (amyloid  $\beta$ -peptide),  $\beta$  – αμυλοειδές πεπτίδιο,
- APP : (Amyloid- $\beta$  protein precursor), πρόδρομος πρωτεΐνη αμυλοειδούς
- A $_{||}$  : Παράγοντας υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης
- Ac : Ακέτυλο ομάδα
- Bzl : (Benzyl), βένζυλο
- DCM : Διχλωρομεθάνιο
- DIC : N, N'-διϊσοπρόπυλοκαρβοδιϊμίδιο
- DIEA: Διϊσοπρόπυλαιθυλαμίνη
- DMF : Διμέθυλοφορμαμίδιο
- D $_2$ O : Δευτεριωμένο νερό
- EPR : Electron Paramagnetic Resonance
- ESI-MS : Electrospray Ionization Mass Spectrometry
- Fmoc : 9-φλουορενυλομεθυλόξυκαρβόνυλο ομάδα
- g $_{||}$  : Παράγοντας g
- HOBt : 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο
- I : Πυρηνικό spin
- log  $\beta$  : Ολική σταθερά σχηματισμού
- MeOH : Μεθανόλη
- NFT : (neurofibrillary tangles), νευροϊνώδη συσσωματώματα
- NMR : Nuclear Magnetic Resonance
- NOE : Nuclear Overhauser Effect
- NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

- $N_{im}$  : Ιμιδαζολικό άζωτο
- $N^-$  : αμιδικό άτομο αζώτου
- 1N, 2N, 3N, 4N : Σύμπλοκα με 1,2,3,4 δεσμευμένα άτομα αζώτου αντίστοιχα
- OBu : Τριτοταγής βουτυλόξυ ομάδα
- PHFs : (paired helical filaments), ζεύγη ελικοειδών ινιδίων
- ROS : Reactive Oxygen Species
- RP-HPLC : Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
- tau : (tubulin-associated unit), τ-πρωτεΐνη
- tBu : Tert-βούτυλο ομάδα
- TFA : (Trifluoroacetic acid), Τριφθοροξικό οξύ
- TIS : Τριίσοπροπυλοσιλάνιο
- TOCSY : Total Correlation Spectroscopy
- Trt : Τρίτυλο ομάδα
- UV-Vis : Ultraviolet-Visual
- $\lambda_{max}$  : Μήκος κύματος στο οποίο παρατηρείται μέγιστη απορρόφηση
- Gly : Γλυκίνη
- Ser : Σερίνη
- Ser(P) : Φωσφορυλιωμένη Σερίνη
- Thr : Θρεονίνη
- Glu : Γλουταμικό οξύ
- Asn : Ασπαραγίνη
- Leu : Λευκίνη
- Lys : Λυσίνη
- His : Ιστιδίνη

## Βιβλιογραφία πειραματικού μέρους-αποτελεσμάτων

- [1]. Miklos Bodanszky, “*Peptide Chemistry*”, 2<sup>nd</sup> edition, Springer-Verlag, New York, **1993**
- [2]. Editorial, *J. Peptide Sci.*, (**2006**), 12, 1–12
- [3]. Raymond Behrendt, Peter White, John Offer, *J. Peptide Sci.*, (**2016**), 22, 4–27
- [4]. C. T. Mant, Y. Chen, Z. Yan, et al, *Methods Mol. Biol.*, (**2007**), 386, 3-55
- [5]. C. T. Mant, D. Cepeniene, R. S. Hodges, *J. Sep. Sci.*, (**2010**), 33, 3005-3021
- [6]. H. Kozlowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, (**1999**), 184, 319
- [7]. Sigel, H., Sigel, A., “Metal ions in biological systems”, Vol. 9, Marcel Dekker, **1976**
- [8]. Irving, H.M.N.H., M.G. Miles, L.D. Pettit, *Anal. Chim. Acta*, (**1967**), 38(4), 475-488.
- [9]. Sigel, H., A.D. Zuberbuehler, O. Yamauchi, *Anal. Chim. Acta*, (**1991**), 255(1), 63-72
- [10]. Mohamed M. Shahata, *American Journal of Chemistry and Application*, (**2015**), 2, 37-46
- [11]. P.Gans, A. Sadatini, A. Vacca, *Talanta*, (**1996**), 43, 1739
- [12]. H. Sigel, B. Martin, *Chemical Reviews*, (**1982**), 82, 385-426
- [13]. Αθ. Βαλαβανίδης, “*Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία*”, Αθήνα, **2006**
- [14]. Ν. Χατζηλιάδης, Φασματοχημικές, “*Φασματοσκοπικές και Βιοχημικές Μέθοδοι στη Βιοανόργανη Χημεία*”, Ιωάννινα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, **1999**
- [15]. F.A. Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillo, M. Bochmann, “*Advanced Inorganic Chemistry, 6<sup>th</sup> edition*”, J. Willey, **1999**.
- [16]. A.B.P. Lever, “*Inorganic Electronic Spectroscopy (second edition)*”, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, **1984**.
- [17]. Ι. Δεληγιαννάκης, Ι. Γεροθανάσης, Ν. Χατζηλιάδης, “*Μέθοδοι μαγνητικού συντονισμού*”, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, **1999**
- [18]. Α. Ζαρκάδης, Ν. Χατζηλιάδης, “*Εργαστήριο φασματοχημικών και φυσικοχημικών τεχνικών*”, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, **1999**

- [19]. M. E. Μυλωνάς, “Αλληλεπιδράσεις των μεταλλικών ιόντων Cu(II) και Ni(II) με πεπτιδικά μοντέλα ιστόνης και νουκλεοτίδια. Συνεισφορά στη μελέτη του μηχανισμού καρκινογένεσης από μεταλλικά ιόντα”, Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα, (2003)
- [20]. M. Mylonas, A. Krezel, J. C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, W. Bal, *Journal of Molec.Liq.*, (2005), 118, 119-129
- [21]. M. Mylonas, A. Krezel, J. C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, W. Bal, *Inorg. Chim. Acta*, (2002), 399, 60-70
- [22]. T. Karavelas, M. Mylonas, G. Malandrinos, J. C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, P. Mlynarz, H. Kozlowski, *Journal of Inorganic Biochemistry*, (2005), 99, 606-615
- [23]. Peisach, J., and Blumberg, W. E. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.*, 165, 691-708
- [24]. Kurt Wuthrich, “*Sequential Individual Resonance Assignments in the 1H-NMR Spectra of Polypeptides and Proteins*”, (1983), 22, 131-138
- [25]. Kurt Wüthrich, “*NMR of Proteins and Nucleic Acids*”, Willey, 1986
- [26]. G. C. K. Roberts, “*NMR of Macromolecules: A Practical Approach*”, Oxford University Press, 1993
- [27]. Kaptein, R., et al. “*Sequence-specific 1H NMR assignments and peptide backbone conformation in rat epidermal growth factor*”. *Biochem. J.*, (1989), 257, 197
- [28]. B. Domon, R. Aebersold, *Science*, (2006), 312, 212-217
- [29]. T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, (2000), 4511-4519
- [30]. T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta, K. Wisniewska, L. Lankiewicz, *Journal of Inorganic Biochemistry*, (2001), 86, 535-545
- [31]. M. A. Zoroddu, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozlowski, K. Salnikow, M. Costa, *Journal of Inorganic Biochemistry*, (2001), 85, 47-54
- [32]. Renata Jastrzab, *Journal of Inorganic Biochemistry*, (2009), 103, 766-773
- [33]. M. Mylonas, G. Malandrinos, J. Plakatouras, N. Hadjiliadis, K.S. Kasprzak, A. Krezel, W. Bal, *Chem.Res.Toxicol*, (2001), 14, 1177
- [34]. Bijun Liu, Yin Tian, Qianhong Yu, Qiang Li, Wanjun Mu, Zhaoyi Tan, Fengchang Wu, Dongqi Wang, Xingliang Li, *J Solution Chem*, (2017), 46, 2281-2292
- [35]. Renata Jastrzab, Lechoslaw Lomozik, *Journal of Coordination Chemistry*, (2009), 62, 710-720
- [36]. M. A. Zoroddu, P. Massimiliano, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozlowski, M. Costa, *Dalton Trans.*, (2002), 458-465

- [37]. M. A. Zoroddu, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, H. Molinari, K. Salnikow, L. Broday, M. Costa, *Biochimica et Biophysica Acta*, (2000), 1475, 163-168
- [38]. R. P. Bonomo, F. Bonsignore, E. Conte. G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, (1993), 1295
- [39]. A. B. P. Lever, “*Inorganic Eleectronic Spectroscopy*”, Second edition, Elsevier Science B. V., Amsterdam, Netherlands, 1984
- [40]. L.D. Pettit, S. Pyburn, W. Bal, H. Kozłowski, M. Bataille. *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, (1990), 3565
- [41]. V.Joszai, Z. Nagy, K. Osz, D. Sanna, G. Natale, D. Mendola, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sovago, *Journal of Inorganic Biochemistry*, (2006), 100, 1399
- [42]. G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, *Coordination Chemistry Reviews*, (2014), 262, 55-71
- [43]. Kowalik-Jankowska, T., Rajewska, A., Jankowska, E., and Grzonka, Z., (2006), *Dalton Trans*, 5068- 5076
- [44]. Orfei, M., Alcaro, M. C., Marcon, G., Chelli, M., Ginanneschi, M., Kozłowski, H., Brasun, J., and Messori, L., (2003), *J. Inorg. Biochem.*, 97, 299-307
- [45]. Zavitsanos, K., Nunes, A. M., Malandrinos, G., Kallay, C., Sovago, I., Magafa, V., Cordopatis, P., and Hadjiliadis, N., (2008), *Dalton Trans*, 6179-6187
- [46] O. Yamauchi, A. Odani and M. Takani, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (2002), 3411–3421
- [47]. Conato C., Kamysz W., Kozłowski H., Luczkowski M., Mackiewicz Z., Mlynarz P., Remelli M., Valensin D., Valensin G., (2002), *Dalton Trans*, 3939-3944
- [48]. K. Varnagy, J. Szado, I. Sovago, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera, *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, (2000), 467
- [49]. N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkar, *Can J. Chem*, (1976), 54, 1309
- [50]. R. B. Martin, “*Complexes of  $\alpha$ -amino acids with chelatable side chain donor atoms*,” *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 9, pp. 1–39, (1979)
- [51]. H. Aiba, A. Yokoyama, and H. Tanaka, “*Copper(II) complexes of glycyl-L-histidine, glycyl-L-histidylglycine, and glycylglycyl- L-histidine in aqueous solution*,” *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol. 47, no. 6, pp. 1437–1441, (1974)
- [52]. P. J. Morris and R. B. Martin, “*Tetrahedral complexes of cobalt(II) with L-histidine, histamine, imidazole, and N – Acetyl–L–histidine*,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 92, no. 6, pp. 1543–1546, (1970)

- [53]. Katerina Panagiotou, Maria Panagopoulou, Tilemachos Karavelas, Vassiliki Dokorou, Andrew Hagarman, Jonathan Soffer, Reinhard Schweitzer-Stenner, Gerasimos Malandrinos, Nick Hadjiliadis, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, (2008), 2008, 257038
- [54]. Imre Sovago, Katalin Osz, *Dalton Trans*, (2006), 32, 3841–3854
- [55]. Byong-kyu Shin and Sunil Saxena, *The Journal of Physical Chemistry B*, (2011), 115, 15067
- [56] A. Krężel, J. Wójcik, M. Maciejczyk, W. Bal, R. W. Jeanloz, D. Beyersmann, *Chem. Commun.* (2003), 95, 704–705
- [57] M. Jezowska-Bojczuk, P. Kaczmarek, W. Bal, K. S. Kasprzak, *J. Inorg. Biochem.* (2004), 98, 1770–7
- [58] K. Zavitsanos, A-M Nunes, G. Malandrinos and N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.* (2011), 105, 1329-1337
- [59] F Guo, V. Stanevich, N. Wlodarchak, R. Sengupta, Li Jiang, K.A Satyshur, Y. Xing, *Cell Research*, (2014), 24, 190-203
- [60] M. Zhang, S. D. Yogesha, J. E. Mayfield, G. N. Gill, and Y. Zhang, *FEBS J.* (2013), 280(19), 4739–4760
- [61] U-S. Cho, W. Xu, *Nature*, (2007), 445, 53-57