



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ $Ni(II)$ ΚΑΙ $Cu(II)$ ΜΕ
ΠΕΠΤΙΔΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ ΙΣΤΟΝΗΣ $H2B$**
*Μελέτη των Μηχανισμών Τοξικότητας και Καρκινογένεσης που
Προκαλούνται από Μεταλλικά Ιόντα*

ΚΙΜΩΝ Ξ. ΖΑΒΙΤΣΑΝΟΣ
Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009

Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του έργου ΠΕΝΕΔ 2003 της ΓΓΕΤ, το οποίο συνχρηματοδοτείται κατά 80% της δημόσιας δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση-Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο και κατά 20% από το Ελληνικό Δημόσιο-Υπουργείο Ανάπτυξης-Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και από τον Ιδιωτικό Τομέα, στο πλαίσιο του μέτρου 8,3 του Ε.Π Αναταγωνιστικότητα-Γ' Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης, με τίτλο «Μελέτη των Μηχανισμών Τοξικότητας και Καρκινογένεσης που Προκαλούνται από Μεταλλικά Ιόντα» και Επιστημονικό Υπεύθυνο τον Καθηγητή κ.Νικόλαο Χατζηλιάδη, στο Εργαστήριο Γενικής και Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Το θέμα της διατριβής, μου το ανέθεσε ο Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Νικόλαος Χατζηλιάδης, τον οποίον οφείλω να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, το συνεχές ενδιαφέρον και τις πολύτιμες συμβουλές του τόσο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, όσο και κατά την περίοδο συγγραφής.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Γεράσιμο Μαλανδρίνο για όλες τις συμβουλές και διευκολύνσεις που μου παρείχε σε προσωπικό και επιστημονικό επίπεδο.

Η συνεργασία στα πλαίσια του Προγράμματος ΠΕΝΕΔ, του εργαστηρίου μας με το εργαστήριο Φαρμακογνώσιας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Πανεπιστημίου Πατρών (Δ/ντής Καθηγητής κ. Π. Κορδοπάτης), το εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Debrecen της Ουγγαρίας (Δ/ντής Καθηγητής κ. I. Sovago), το Βιοχημικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (πρώην Δ/ντής Καθηγητής κ.Σεφεριάδης) και το Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, CERM στη Φλωρεντία της Ιταλίας (Δ/ντής Καθηγητής κ. I. Bertini), μου έδωσε τη δυνατότητα να τα επισκεφτώ ώστε να πραγματοποιήσω σχετικές αναγκαίες μετρήσεις της Διατριβής. Η συνεισφορά των ανωτέρω εργαστηρίων στην περάτωση της Διατριβής μου ήταν καθοριστική και οφείλω να ευχαριστήσω τους Διευθυντές τους, για όλες τις διευκολύνσεις που μου παρείχαν.

Έχω επίσης την υποχρέωση να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους μου, που εκπόνησαν τις διατριβές τους, κατά την ίδια χρονική περίοδο, όχι μόνο στο δικό μας εργαστήριο αλλά και στα συνεργαζόμενα εργαστήρια, με πολλούς εκ των οποίων ανέπτυξα σχέσεις φιλίας.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την συνάδελφο και συνεργάτη μου κ. Ana Monica Nunes για την άψογη συνεργασία, την επιστημονική, ηθική και πνευματική συμπαράσταση καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Κίμων Ξ. Ζαβιτσάνος

Ιωάννινα, Μαΐος 2009

Περιεχόμενα

Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1. Δομή και Ρόλος Των Ιστονών

1.1 Η Έννοια της Χρωματίνης.....	1
1.2 Πυρηνικές Ιστόνες.....	2
1,2,1 Γενικά.....	2
1,2,2 Δομικές Περιοχές Πυρηνικών Ιστονών.....	4
1,2,3 Ετεροδιμερικά Ζεύγη Πυρηνικών Ιστονών.....	4
1,2,4 Αλληλεπιδράσεις Πυρηνικών Ιστονών-DNA.....	5
1,3 Ιστόνη H1.....	7
1,4. Ο Δυναμικός Χαρακτήρας του Νουκλεοσώματος.....	7
1,5. Οι Τροποποιήσεις της Χρωματίνης και ο Ρόλος τους.....	8
1,5,1 Γενικά.....	8
1,5,2 Τροποποιήσεις των Ιστονών.....	8
1,5,3 Τύποι Τροποποιήσεων.....	9
1,5,3,1 Ακετυλίωση Καταλοίπων Λυσίνης.....	10
1,5,3,2 Μεθυλίωση Καταλοίπων Λυσίνης.....	12
1,5,3,3 Μεθυλίωση Καταλοίπων Αργινίνης.....	13
1,5,3,4 Κιτρουλινίωση.....	13
1,5,3,5 Ουβικιτίνωση.....	14
1,5,3,6 Σουμοϋλίωση.....	14
1,5,3,7 Φωσφορυλίωση Καταλοίπων Σερίνης και Θρεονίνης.....	14
1,5,3,8 Ισομερίωση Προλίνης.....	15
1,5,3,9 ADP-ριβουσύλιωση.....	16
1,5,4 Συνέργεια των Τροποποιήσεων και Ιστονικός Κώδικας	16
1,6. Αλληλεπίδραση ιστονών και μεταλλικών ιόντων.....	17

Κεφάλαιο 2. Βιοχημικός ρόλος Νικελίου και Χαλκού.....

Κεφάλαιο 3. Τοξικότητα και Καρκινογένεση

που προκαλείται από Νικέλιο και Χαλκό

3,1 Τοξικότητα του νικελίου στον άνθρωπο.....	23
3,1,1 Γενικά.....	23
3,1,2 Τρόποι έκθεσης, λήψη και απέκκριση.....	24

3,1,3 Οξεία και χρόνια έκθεση.....	25
3,2 Καρκινογένεση και Νικέλιο.....	27
3,2,1 Επιδημιολογικές Μελέτες.....	27
3,2,2 Μηχανισμοί Καρκινογένεσης που Προκαλείται από Νικέλιο.....	27
3,2,2,1 Γενοτοξική Δράση και Επιγενετικές Επιπτώσεις.....	27
3,2,2,2 Μεθυλίωση του DNA και Απενεργοποίηση Γονιδίων.....	28
3,2,2,3 Επίδραση στις Τροποποιήσεις Ιστονών.....	28
3,2,2,4 Εμπλοκή του Νικελίου στην Ομοιόσταση του Ασβεστίου.....	29
3,3 Χαλκός, Κυτταρική Βλάβη και Απόπτωση.....	30
3,3,1 Ομοιόσταση Του Χαλκού.....	30
3,3,2 Επίπτώσεις περίσσειας χαλκού στα κύτταρα.....	31
3,3,3 Χαλκός και Απόπτωση.....	31
3,3,4 Χαλκός, Μεταλλάξεις και ταστροφή του DNA.....	32
Κεφάλαιο 4. Μοριακοί Μηχανισμοί Τοξικότητας Μεταλλικών Ιόντων	
4,1 Δέσμευση σε Βιομόρια.....	33
4,1,1 Ρυθμιστικές και Δομικές Πρωτεΐνες.....	33
4,1,2 Ιστόνες και Προταμίνες.....	34
4,2 Επαγωγή Οξειδωτικής Καταστροφής.....	34
4,2,1 Οξειδωση Λιπιδίων.....	35
4,2,2 Οξειδωση Πρωτεϊνών.....	35
4,2,3 Οξειδωτική Καταστροφή του DNA.....	37
4,2,4 Επίδραση στο Ασκορβικό οξύ, Γλουταθειόνη κι άλλα Αντιοξειδωτικά.....	38
Κεφάλαιο 5. Σύμπλοκα ιόντων Ni^{2+} και Cu^{2+} με πεπτίδια-Πεπτιδικά μοντέλα ιστονών	
5,1 Εισαγωγή.....	41
5,2 Πεπτίδια που περιέχουν πλευρικές αλυσίδες με άτομα που δεν είναι δότες ηλεκτρονίων.....	42
5,3 Πεπτίδια που περιέχουν πλευρικές αλυσίδες με άτομα - δότες ηλεκτρονίων.....	43
5,4 Σύμπλοκα με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη.....	44
5,4,1 Πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στο N-τελικό άκρο.....	44
5,4,2 Πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στη θέση 2 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.....	45
5,4,3 Πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στη θέση 3 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.....	46
5,4,4 Πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στη θέση 4 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.....	48
5,5 Αλληλεπίδραση Ni^{2+} και Cu^{2+} με πεπτιδικά μοντέλα ιστονών.....	50

Κεφάλαιο 6. Σκοπός της Διατριβής.....	57
--	-----------

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 7. Σύνθεση, Καθαρισμός και Ταυτοποίηση Πεπτιδικών Προϊόντων

7,1 Πεπτιδική Σύνθεση με την Fmoc / ^t Bu μεθοδολογία.....	61
7,2. Καθαρισμός Πεπτιδικών Προϊόντων με Χρήση Χρωματογραφικών Τεχνικών.....	66
7,2,1 Χρωματογραφία πηκτής (gel filtration, size exclusion chromatography).....	66
7,2,1,1 Βασικές Αρχές.....	66
7,2,1,2 Πειραματική Πορεία.....	66
7,2,2 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC, Thin Layer Chromatography).....	67
7,2,2,1 Βασικές Αρχές.....	67
7,2,2,2 Πειραματική Πορεία.....	67
7,2,3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)	67
7,2,3,1 Βασικές Αρχές.....	67
7,2,3,2 Πειραματική Πορεία.....	68
7,3. Ταυτοποίηση με Φασματοσκοπία Μάζας, Electrospray Ionization (ESI-MS).....	69
7,3,1 Βασικές Αρχές.....	69
7,3,2 Πειραματική Πορεία.....	69
Κεφάλαιο 8. Χρησιμοποιούμενες Τεχνικές για τη Μελέτη της Σύμπλεξης των Πεπτιδίων με ιόντα Ni²⁺ και Cu²⁺	
8,1 Ποτενσιομετρία.....	71
8,1,1 Βασικές Αρχές.....	71
8,1,1,1 Σταθερές πρωτονίωσης και σταθερές σχηματισμού συμπλόκων.....	71
8,1,1,2 Ποτενσιομετρικές Τιτλοδοτήσεις.....	72
8,1,2 Μικρο και μακρο-σταθερές.....	73
8,1,3 Πειραματική πορεία	74
8,2 Φασματοσκοπικές Τεχνικές.....	74
8,2,1 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)	75
8,2,1,1 Βασικές Αρχές.....	75
8,2,1,2 Φάσματα Απορρόφησης Συμπλόκων Μεταλλικών Ιόντων με Πεπτίδια.....	75
8,2,1,3 Πειραματική πορεία.....	76
8,2,2 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD).....	76
8,2,2,1 Βασικές Αρχές.....	76

8,2,2,2 Πειραματική Πορεία.....	77
8,2,3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	77
8,2,3,1 Βασικές Αρχές.....	77
8,2,3,2 Χημική Μετατόπιση.....	78
8,2,3,3 Χρόνοι αποδιέγερσης T_1 και T_2	78
8,2,3,4 Φάσματα δύο διαστάσεων.....	79
8,2,3,4,1 Ομοπυρηνικά Φάσματα δύο διαστάσεων.....	80
8,2,3,4,2 Ετεροπυρηνικά Φάσματα δύο διαστάσεων.....	80
8,2,3,4,3 Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY).....	81
8,2,3,5 Υπολογισμός της Τρισδιάστατης Δομής.....	81
8,2,3,6 Chemical Shift Index (CSI).....	82
8,2,3,7 Πειραματική Πορεία.....	83
8,2,4 Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR).....	85
8,2,4,1 Βασικές Αρχές.....	85
8,2,4,2 Πειραματική πορεία	86

Κεφάλαιο 9. Χρησιμοποιούμενες Τεχνικές για την Μελέτη της

Υδρόλυσης και Οξειδωτικής Ικανότητας των Συμπλόκων Πεπτιδίων-Μετάλλων

9,1 Μελέτη της Υδρολυτικής Διάσπασης των

Συμπλόκων Πεπτιδίων-Μετάλλων με HPLC.....	87
---	----

9,2 Μελέτη της Επίδρασης των Συμπλόκων των Πεπτιδίων

με Ni^{2+} και Cu^{2+} στην Οξειδωτική Διάσπαση της Διπλής Έλικας του DNA.....	87
--	----

9,2,1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel electrophoresis).....	87
--	----

9,2,1,2 Βασικές Αρχές.....	87
----------------------------	----

9,2,1,3 Πειραματική πορεία.....	88
---------------------------------	----

9,2,1,3,1 Βακτηριακός Μετασχηματισμός (Transformation).....	88
---	----

9,2,1,3,2 Καθαρισμός του πλασμιδίου με χρήση του Qiagen Miniprep kit.....	89
---	----

9,2,1,3,3 Προπαρασκευή.....	90
-----------------------------	----

9,2,1,3,4 Ηλεκτροφόρηση.....	90
------------------------------	----

Κεφάλαιο 10. Αποτελέσματα και Συζήτηση

10,1 Ταυτοποίηση συντιθέμενων πεπτιδίων.....	95
--	----

10,2 Χαρακτηρισμός των ελεύθερων υποκαταστατών και προσδιορισμός των τιμών

pK_a των όξινων ομάδων τους.....	97
------------------------------------	----

10,3 Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίων με τα δισθενή μεταλλικά ιόντα $Ni(II)$ και $Cu(II)$	100
--	-----

10,3,1 Σύμπλοκα χαλκού-πεπτιδίου $H2B_{94-125}$	100
10,3,2 Σύμπλοκα χαλκού-πεπτιδίου $H2B_{32-62}$	111
10,3,3 Σύμπλοκα νικελίου-πεπτιδίου $H2B_{94-125}$	119
10,3,4 Σύμπλοκα νικελίου-πεπτιδίου $H2B_{32-62}$	144
10,4 Οξειδωτική διάσπαση της έλικας του DNA παρουσία συμπλόκων των πεπτιδίων.....	146
10,4,1 Επίδραση ιόντων Cu^{2+} στο πλασμιδιακό DNA.....	147
10,4,1,1 Επίδραση Συμπλόκων Cu^{2+} - $H2B_{32-62}$ στο πλασμιδιακό DNA.....	150
10,4,1,2 Επίδραση Συμπλόκων Cu^{2+} - $H2B_{94-125}$ στο πλασμιδιακό DNA.....	154
10,4,2 Επίδραση ιόντων Ni^{2+} στο πλασμιδιακό DNA.....	157
10,4,2,1 Επίδραση Συμπλόκων Ni^{2+} - $H2B_{32-62}$ στο πλασμιδιακό DNA.....	159
10,4,2,2 Επίδραση Συμπλόκων Ni^{2+} - $H2B_{94-125}$ στο πλασμιδιακό DNA.....	164
Κεφάλαιο 11. Συμπεράσματα	167
Περίληψη.....	175
Abstract.....	179
Παράρτημα.....	183
Βιβλιογραφία.....	207

Συντομογραφίες

1N, 2N, 3N, 4N	Σύμπλοκα με 1,2,3,4 δεσμευμένα άτομα αζώτου αντίστοιχα
Ac	Ακέτυλο ομάδα
ADP	Διφωσφορική Αδενοσίνη
Απ	Σταθερά Υπέρλεπτης Αλληλεπίδρασης
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
Boc	Tert-βουτυλόξυκαρβόνυλο ομάδα
CAT	Καταλάση
ccc	Supercoiled plasmid
CD	Κυκλικός Διχρωισμός
CHO	Chinese hamster ovary cell
COSY	Correlation Spectroscopy
CSI	Chemical Shift Index
DAN	Differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma
DBU	1,8-διαζαδίκυκλο {5,4,0} έντεκα-7-ένιο
DCC	N,N'-δικυκλοέξυλοκαρβοδιϊμίδιο
DCM	Διχλωρομεθάνιο
DIC	N, N'-διϊσοπρόπυλοκαρβοδιϊμίδιο
DIPEA	Διϊσοπρόπυλαιθυλαμίνη
DMF	Διμέθυλοφορμαμίδιο
EDT	1,2 αιθανοδιθειόλη
EDTA	Αιθυλενο διάμινο τετραοξικό οξύ
ENDOR	Electron Nuclear Double Resonance
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
EtBr	Βρωμιούχο αιθίδιο
FID	Free Induction Decay
Fmoc	9-φλουορένυλομεθυλόξυκαρβόνυλο ομάδα
gII	Παράγοντας g
GSH	Γλουταθειόνη
HBTU	Εξαφωσφορικό άλας της 2-(1H-βενζοτρίαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit
HOBt	1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
I	Πυρηνικό spin
IARC	International Agency for Research in Cancer
KHP	Όξινο φθαλικό κάλιο
Kw	Σταθερά Ιονισμού ύδατος
lin	Linearised plasmid
log β	Ολική σταθερά σχηματισμού
NAD	Νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OBu	Τριτοταγής βουτυλόξυ ομάδα
oc	Open-circular plasmid
Pbf	2,2,4,6,7-πενταμέθυλο-διυδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλομάδα
PBS	Phosphate buffer solution
pKa	Σταθερά Ιονισμού
ROESY	Rotating-Frame NOE Spectroscopy

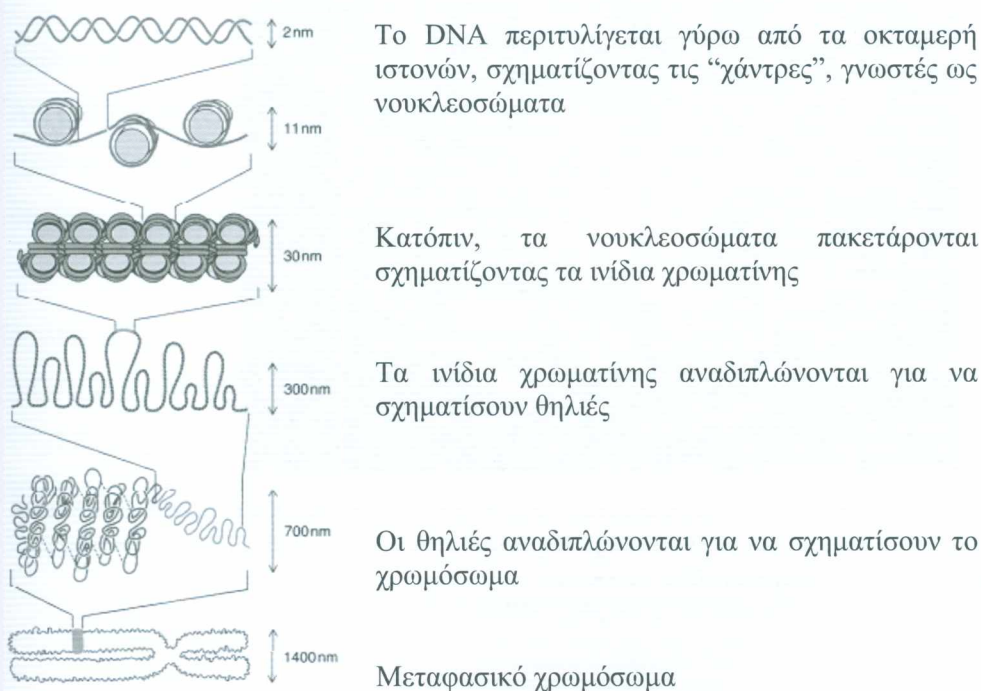
ROS	Reactive Oxygen Species
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
SOD	Σουπεροξειδική Δισμουτάση
SVCT	Sodium Ascorbate Co-transporter
TBE	Μίγμα από Tris-base (2-άμινο-2-(υδροξυμέθυλο)-1,3-προπανοδιόλη) / βορικό οξύ / EDTA / H ₂ O
tBu	Tert-βούτυλο ομάδα
TES	Τριαιθύλσιλάνιο
TLC	Thin Layer Chromatography
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Trt	Τρίτυλο ομάδα
UV-Vis	Ultraviolet-Visual
δ	Χημική μετατόπιση
λ _{max}	Μήκος κύματος στο οποίο παρατηρείται μέγιστη απορρόφηση
NIm	Ιμιδαζολικό άζωτο

Εισαγωγή

1. Δομή και Ρόλος των Ιστονών

1,1 Η Έννοια της Χρωματίνης

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν 10 εκατομμύρια με 100 δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων DNA, σε έναν πυρήνα διαμέτρου μόλις μερικών μικρονίων. Τα μόρια του DNA που περιέχουν το ανθρώπινο γονιδίωμα θα εκτείνονταν σε μήκος περίπου 2 μέτρων εάν τοποθετούνταν σε μία ευθεία διάταξη. Αυτή η τεράστια ποσότητα DNA «πακετάρεται» με τη βοήθεια συγκεκριμένων πρωτεϊνών, των ιστονών, σε μια καλά οργανωμένη δομή, την χρωματίνη. Το DNA στην χρωματίνη, συμπιέζεται περισσότερο από 10,000 φορές σε σύγκριση με τη γραμμική μορφή του. Ίσως περισσότερο σημαντικό να είναι το γεγονός, ότι η δομή της χρωματίνης, επιτρέπει την τοπική αποσυμπίεση και επαναπακετάρισμα του DNA, ώστε να διευκολύνει τις θεμελιώδεις λειτουργίες της μεταγραφής, αντιγραφής και επισκευής. Το νουκλεόσωμα αποτελεί τη βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης και περιέχει γύρω στα 150 ζεύγη βάσεων DNA, τυλιγμένα γύρω από έναν πρωτεϊνικό πυρήνα. Πρόσθετο πακετάρισμα των νουκλεοσωμάτων οδηγεί στο σχηματισμό των ινιδίων χρωματίνης, αναδίπλωση των οποίων έχει ως τελικό αποτέλεσμα το σχηματισμό των χρωμοσωμάτων (Σχήμα 1) (1).

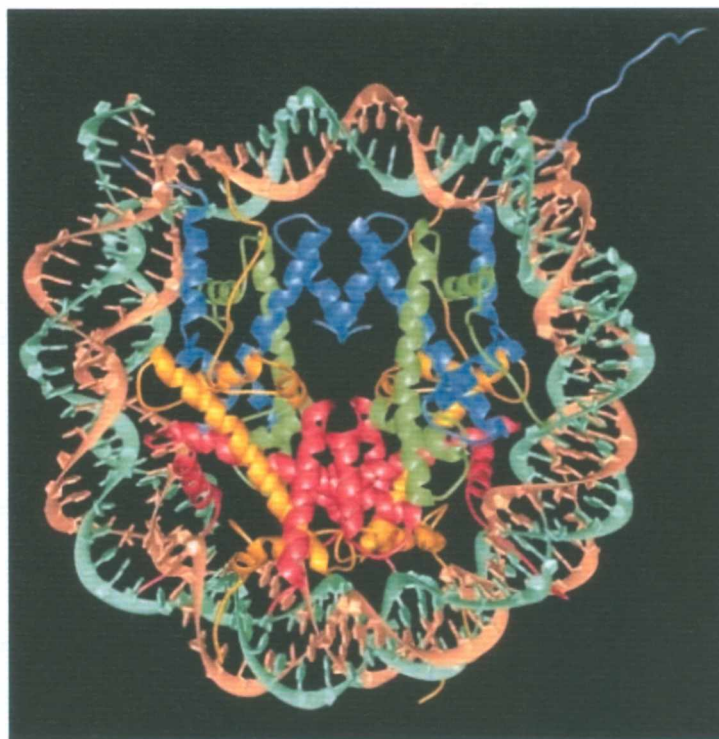


Σχήμα 1. Επίπεδα πακεταρίσματος του DNA σε μιτωτικό χρωμόσωμα

1,2 Πυρηνικές Ιστόνες

1,2,1 Γενικά

Υπάρχουν 5 διαφορετικοί τύποι ιστονών γνωστές ως H1, H2A, H2B, H3 και H4 (2). Οι 4 τελευταίοι τύποι αναφέρονται ως πυρηνικές ιστόνες δεδομένου ότι γύρω τους περιελίσσεται το μόριο του DNA, σχηματίζοντας το νουκλεοσωμικό πυρήνα της χρωματίνης κι έχουν μοριακή μάζα 10-14kDa (3, 4). Σε κάθε νουκλεόσωμα, 146 ζεύγη βάσεων DNA, τυλίγονται γύρω από τον πρωτεϊνικό πυρήνα. Αυτός αποτελείται από 2 ζεύγη κάθε μιας από τις πυρηνικές ιστόνες και συνιστά το ιστονικό οκταμερές (Σχήμα 2) (5). Γενετικά πειράματα σε ζυμομύκητες έχουν δείξει ότι και οι 4 τύποι των πυρηνικών ιστονών είναι απαραίτητοι για την βιωσιμότητα του κυττάρου (6). Η σχετική μοριακή στοιχειομετρία των πυρηνικών ιστονών είναι πάντοτε η ίδια, σε αντίθεση με την ιστόνη H1, η οποία απαντά στη μισή ποσότητα ενώ η πρωτοταγής δομή τους είναι εξελικτικά από τις πιο διατηρημένες (Σχήμα 3) (7).



Σχήμα 2. Μοντέλο της δομής του νουκλεοσώματος. Ο φωσφοδιεστερικός σκελετός του DNA που περιλαμβάνει 146 ζεύγη βάσεων (καφέ, τουρκουάζ), περιελίσσεται γύρω από το ιστονικό οκταμερές (H3: μπλε, H4: κόκκινο, H2A: κίτρινο, H2B: κόκκινο).

Ιστονή H1

¹SETAPAAPAAPAPAEKTPVKKKARKSAGAAKRKASGPPVSELITKAVAASK
⁵²ERSGVSLAALKKALAAAGYDVEKNNSRIKLGLKSLVSKGTVLQTKGTGASS
¹⁰⁴FKLNKKAASGEAKPKAKKAGAAKAKKPAGAAKKPKKATGAATPKKSAKT
¹⁵⁴PKKAKKPAAAAGAKKAKSPKKAKAAKPKKAPKSPAKAKAVKPKAAKPK
²⁰²TAKPKAAKPKKAAAKKK

Ιστονή H2A (τύπος H2A,1)

¹SGRGKQGGKAPAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYSERVGAGAPV
⁵⁰YLAADVLEYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNKLGRVTIA
¹⁰⁴QGGVLPNIQAVLLPKKTESHKAKGK

Ιστονή H2B (τύπος H2B,1(a))

¹PEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQVHP
⁵¹DTGISSKAMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLLP
¹⁰⁴GELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK

Ιστονή H3 (κύριος τύπος)

¹ARTKQTARKSTGGKAPRKOLATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGTVALRE
⁵¹IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVMALQEACEAYLVG
¹⁰³LFEDTNLCIAHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA

Ιστονή H4

¹SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVLRLDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLYE
¹⁵³ETRGVLKVFLENVIRDAVITYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTLYGFY
¹⁰²Υ

Σχήμα 3. Αλληλουχίες ανθρώπινων ιστονών

1,2,2 Δομικές Περιοχές Πυρηνικών Ιστονών

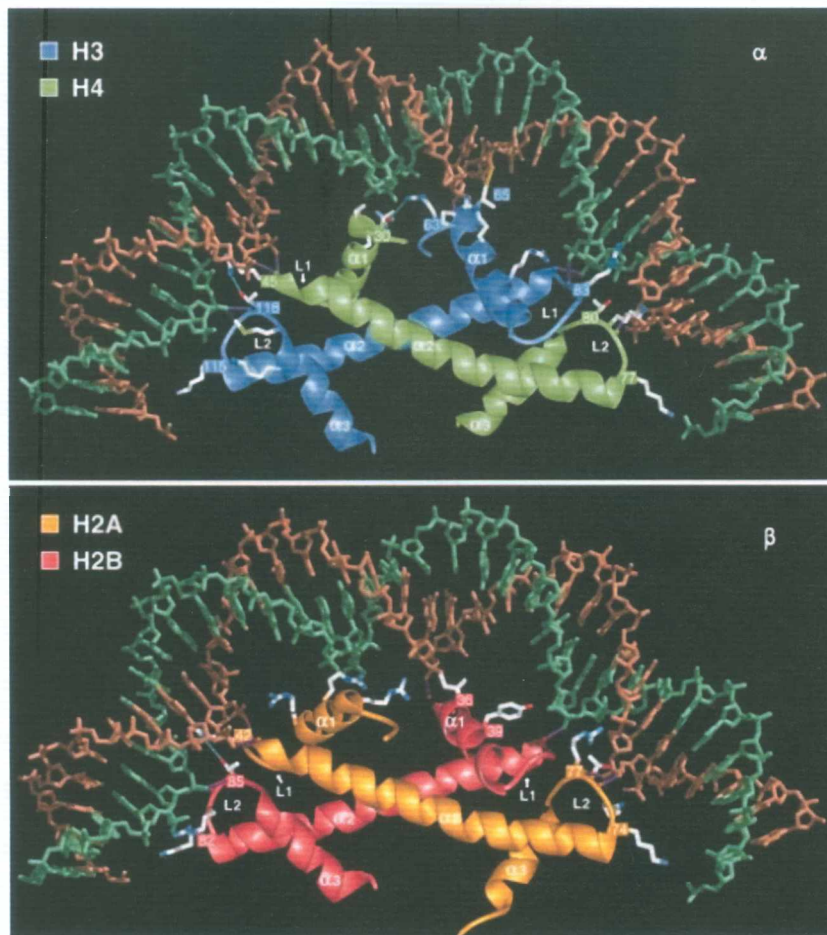
Οι πυρηνικές ιστόνες περιέχουν 3 διαφορετικούς τύπους δομικών περιοχών, ανάλογα με τα μοτίβα δευτεροταγούς δομής που υιοθετούν (8, 9). Έτσι κάθε μία από τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4 περιέχει:

- i) Μία κεντρική περιοχή περίπου 70 αμινοξέων, αποτελούμενη από 3 α-έλικες που συνδέονται με βραχείες θηλιές, γνωστή ως ιστονική πτύχωση (histone-fold). Αυτή η περιοχή συμβολίζεται ως α1-L1-α2-L2-α3 και περιλαμβάνει κατά σειρά, μία α-έλικα 10-14 αμινοξέων (α1), μία θηλιά 7-8 αμινοξέων (L1), μία α-έλικα 10-14 αμινοξέων (α2), μία θηλιά 6 αμινοξέων (L2) και μία μεγαλύτερη α-έλικα 28 αμινοξέων (α3).
- ii) Τις προεκτάσεις της ιστονικής πτύχωσης (histone-fold extensions). Αυτές είναι δομικές περιοχές, εξωτερικά της ιστονικής πτύχωσης και είναι υπεύθυνες για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις εντός του οκταμερούς, ενώ συνεισφέρουν και στη δέσμευση του DNA. Οι περιοχές αυτές εμπλέκονται στο σχηματισμό της διεπιφάνειας αλληλεπίδρασης του διμερούς H2A-H2B και του τετραμερούς (H3-H4)₂.
- iii) Τις «ουρές» (histone tails). Τα N-τελικά άκρα των πυρηνικών ιστονών είναι τυχαία περιελισσόμενες δομές (random coil), που χαρακτηρίζονται από μεγάλη ευκαμψία. Εξ' ορισμού οι ουρές των ιστονών δεν έρχονται σε επαφή με τις υπόλοιπες δύο δομικές περιοχές των υπολοίπων ιστονών, εντός του ίδιου νουκλεοσωμικού πυρήνα.

1,2,3 Ετεροδιμερικά Ζεύγη Πυρηνικών Ιστονών

Οι ιστονικές πτυχώσεις συνδιάζονται για να σχηματίσουν ετεροδιμερικά ζεύγη του τύπου : H2A/H2B και H3/H4 (10). Σε κάθε ζεύγος οι περιοχές α1-L1-α2-L2-α3 αλληλεπιδρούν με έναν αντιπαράλληλο προσανατολισμό, κυρίως μέσω υδροφοβικών επαφών των α1, α2 και α3 ελικών (Σχήμα 4) (9).

Η εκλεκτικότητα του διμερισμού είναι πολύ μεγάλη και συνδέεται με την ύπαρξη σημαντικών διαφορών στην διεπιφάνεια επαφής των πραγματικά σχηματιζόμενων ετεροδιμερών και άλλων εναλλακτικών μη υφιστάμενων ζευγών. Έτσι τα ζεύγη H3/H2B και H4/H2A παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες στην πρωτοταγή δομή τους με αποτέλεσμα οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν τα ζεύγη H2A/H2B και H3/H4 να μην υφίστανται. Σε πολλές περιπτώσεις οι προεκτάσεις των ιστονικών πτυχώσεων συνεισφέρουν σε περαιτέρω υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τις ιστονικές πτυχώσεις αυξάνοντας σε σημαντικό βαθμό την εκλεκτικότητα του διμερισμού (1).



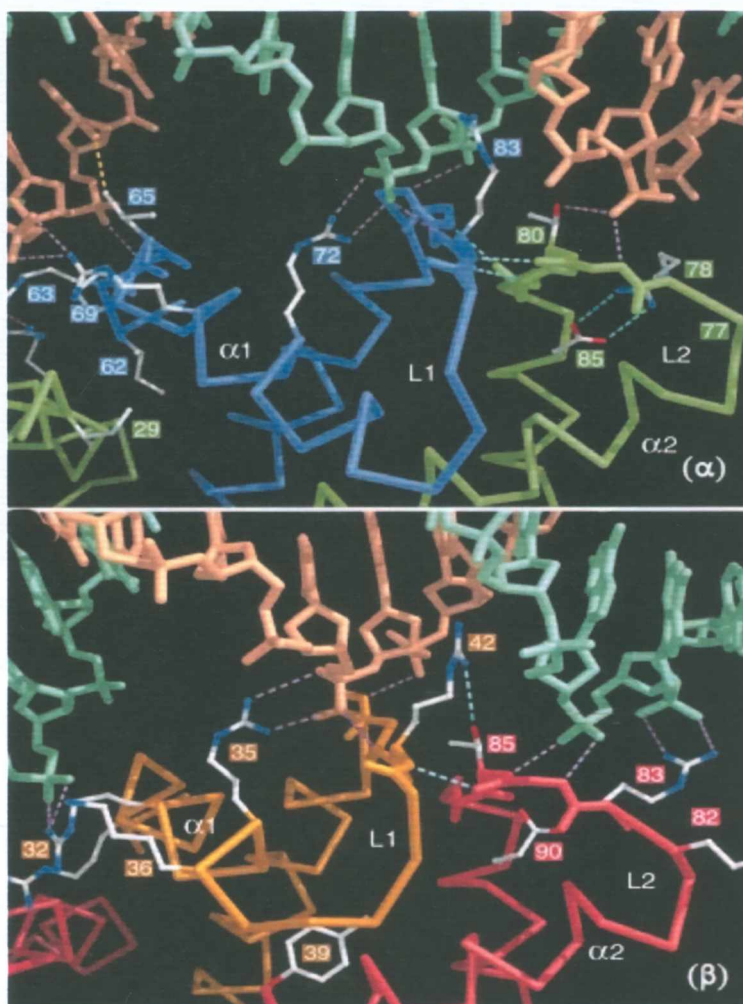
Σχήμα 4. Ετεροδιμερικά ζεύγη (α) H3-H4, (β) H2A-H2B, όπου φαίνονται τα δομικά στοιχεία α1-L1-α2-L2-α3.

1,2,4 Αλληλεπιδράσεις Πυρηνικών Ιστονών-DNA

Στις ιστονικές πτυχώσεις κάθε ετεροδιμερούς, υπάρχουν 2 είδη περιοχών όπου μπορεί να δεσμευτεί το DNA: i) Δύο περιοχές που οφείλονται στην αλληλεπίδραση της θηλιάς L1 του ενός μονομερούς και της θηλιάς L2 του άλλου (Σχήμα 5). ii) Μία περιοχή που δημιουργείται από την αλληλεπίδραση των δύο α1 ελικών των δύο μονομερών (9). Το DNA μπορεί να δεσμευτεί στις περιοχές αυτές με 3 τρόπους:

i) Μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ατόμων οξυγόνου των φωσφορικών ομάδων του DNA και των ατόμων αζώτου της αμινο και γουανιδικής ομάδας των καταλοίπων λυσίνης και αργινίνης, αντίστοιχα. Αυτός ο τύπος σύνδεσης μπορεί να λαμβάνει χώρα άμεσα ή έμμεσα μέσω ενός μορίου ύδατος και σχηματισμού δύο δεσμών υδρογόνου. Κατ' αυτόν τον τρόπο επέρχεται και αντιστάθμιση του αρνητικά φορτισμένου μορίου του DNA.

- ii) Μέσω αλληλεπιδράσεων των υδρόφοβων πλευρικών ομάδων των καταλοίπων θρεονίνης, προλίνης, βαλίνης και ισολευκίνης με την δεοξυριβόζη του DNA.
- iii) Μέσω δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των αμιδικών ατόμων υδρογόνου του πεπτιδικού σκελετού και των δύο ατόμων οξυγόνου του φωσφοδιεστερικού δεσμού του DNA.



Σχήμα 5. Περιοχές δέσμευσης του DNA που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση L1-L2 των ζευγών (α) H3-H4 (β) H2A-H2B (κωδικός χρωμάτων: H3: μπλε, H4: πράσινο, H2A: κίτρινο, H2B: κόκκινο)

1,3 Ιστόνη H1

Η ιστόνη H1 είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τις πυρηνικές ιστόνες με μάζα ίση με 21 kDa. Συνήθως αναφέρεται ως συνδετική ιστόνη επειδή σχετίζεται με εκείνο το τμήμα του DNA που ενώνει τα νουκλεοσώματα (11). Παρόλο που αρχικά ήταν αποδεκτό ότι ο σχηματισμός των ινιδίων χρωματίνης ήταν εξαρτημένος σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία της H1, διάφορα *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι αυτά μπορούν να σχηματιστούν ακόμα και όταν η ιστόνη αυτή είναι απύσχα (12). Σήμερα είναι γνωστό ότι η χρωματίνη μπορεί να μεταβεί στα ανώτερα επίπεδα οργάνωσης (ινίδια, χρωμόσωμα) απουσία της ιστόνης H1 (13, 14), ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κύτταρα ζυμομηκίτων, στα οποία λείπει το ομόλογο γονίδιο της H1, μπορούν να επιζήσουν (15, 16).

Τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο πρωταρχικός ρόλος της ιστόνης H1 είναι περισσότερο ρυθμιστικός παρά δομικός. Στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η ιστόνη H1 αποτελείται από μία κεντρική πτυχωτή περιοχή, περίπου 80 αμινοξέων, η οποία βρίσκεται μεταξύ μιας N-τελικής και μιας C-τελικής ουράς, περίπου 20 και 100 αμινοξέων αντίστοιχα. Η C-τελική ουρά είναι πλούσια σε θετικά φορτία και υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (post-translational modifications) (17).

1,4. Ο Δυναμικός Χαρακτήρας του Νουκλεοσώματος (Nucleosome Dynamics)

Τα νουκλεοσώματα είναι ισχυρά μη στατικές δομές και η δυναμική τους είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την λειτουργία τους. Δύο διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους η δυναμική των νουκλεοσωμάτων μπορεί να εκδηλωθεί είναι:

- i) Η τοπική έκθεση (site exposure), η οποία αναφέρεται στην μερική αποσυσπείρωση του νουκλεοσωμικού DNA, από το ιστονικό οκταμερές.
- ii) Η νουκλεοσωμική κινητικότητα (nucleosome mobility), η ικανότητα δηλαδή του ιστονικού οκταμερούς να μετακινείται διαμέσου του DNA, μέσω μιας σχετικά αργής διεργασίας.

Η τοπική έκθεση αρχικά είχε αναγνωριστεί ως μία διεργασία η οποία λάμβανε χώρα μόνο κοντά στα άκρα του νουκλεοσωμικού DNA. Εντούτοις, πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι μπορεί να συμβεί σε τμήματα που βρίσκονται σε όλο το μήκος του νουκλεοσώματος και ότι ευθύνεται για την εκλεκτική αλληλεπίδραση του DNA με διάφορες πρωτεΐνες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι έκθεση οποιουδήποτε τμήματος του DNA εντός του νουκλεοσώματος

συμβαίνει χωρίς τον πλήρη διαχωρισμό του DNA από το ιστονικό οκταμερές, ενώ έκθεση των εσωτερικών τμημάτων λαμβάνει χώρα προοδευτικά, ξεκινώντας από το ένα άκρο.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους πραγματοποιείται τόσο η έκθεση τμημάτων DNA όσο και η ολίσθηση του ίδιου του οκταμερούς διαμέσου του DNA είναι άγνωστοι. Δύο δυνατότητες που υπάρχουν είναι ότι είτε η ολίσθηση είναι ο μηχανισμός της έκθεσης, είτε ότι η έκθεση είναι ένα απαραίτητο πρώτο στάδιο του μηχανισμού της ολίσθησης.

1,5. Οι Τροποποιήσεις της Χρωματίνης και ο Ρόλος τους

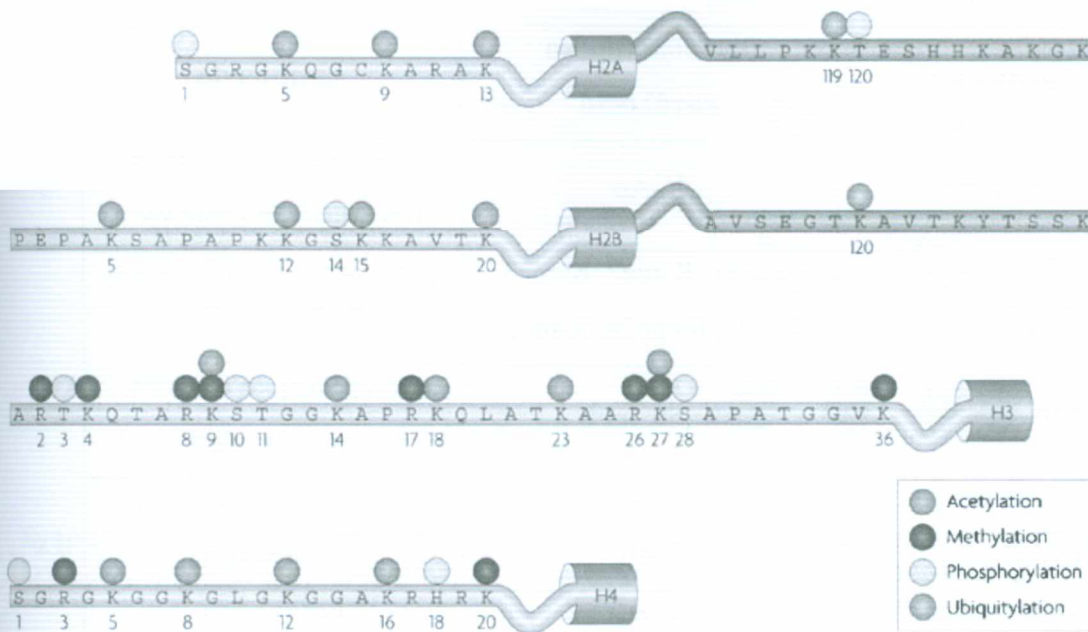
1,5,1 Γενικά

Η δυνατότητα ανίχνευσης και απόκρισης σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα είναι ζωτικής σημασίας για όλες τις κυτταρικές λειτουργίες. Η λήψη διαφόρων εξωτερικών σημάτων, οδηγεί στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων βιοχημικών οδών οι οποίες καταλήγουν στην έκφραση ή καταστολή καθορισμένων γονιδίων. Η τέλεια συγχρονισμένη μεταγωγή σημάτων έχει ως αποτέλεσμα την ρύθμιση του συνόλου των κυτταρικών διεργασιών, όπως του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης.

Η αναγνώριση μοριακών στόχων που συμμετέχουν στους μηχανισμούς μεταγωγής σημάτων, είναι ιδιαίτερα σημαντική. Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν στοιχεία ότι οι βιοχημικές οδοί, μέσω των οποίων η επαγωγή σημάτων μεταφράζεται σε έκφραση ή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων, διασταυρώνονται άμεσα με τα συστατικά της χρωματίνης και πιο συγκεκριμένα τις ιστόνες. Οι τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα στις ιστόνες, συνδέονται άμεσα ή έμμεσα με την διαχείριση της γενετικής πληροφορίας και συνιστούν τον λεγόμενο ιστονικό κώδικα.

1,5,2 Τροποποιήσεις των Ιστονών

Οι ιστόνες μπορούν να τροποποιηθούν σε πολλά σημεία. Υπάρχουν περισσότερα από 60 διαφορετικά κατάλοιπα στα οποία έχουν ανιχνευτεί τροποποιήσεις (Σχήμα 6). Ακόμα όμως και αυτός ο αριθμός είναι πολύ μικρός για να περιγράψει την πραγματική έκταση των λειτουργικών αποκρίσεων που μπορεί να λάβουν χώρα, δεδομένου ότι: (i) Η μεθυλίωση των καταλοίπων Lys και Arg, που συνιστούν σημαντικές τροποποιήσεις, μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά 3 (μόνο-, δι-, τριμεθυλίωση) και 2 (μόνο-, διμεθυλίωση) τρόπους αντίστοιχα. (ii) Οι τροποποιήσεις αυτές εμφανίζονται σε διαφορετικές ιστόνες σε διαφορετική χρονική στιγμή (18).



Σχήμα 6. Θέσεις αναγνωρισμένων τροποποιήσεων στις ουρές των πυρηνικών ιστονών

1,5,3 Τύποι Τροποποιήσεων

Υπάρχουν τουλάχιστον 8 διαφορετικοί τύποι τροποποιήσεων που μπορεί να λάβουν χώρα στις ιστόνες (Πίνακας 1). Αυτές είναι οι εξής: i) Ακετυλίωση ii) Μεθυλίωση iii) Φωσφορυλίωση iv) Ουβικιτίνωση v) Σουμοϋλίωση vi) ADP-ριβοσυλίωση vii) Κιτρουλινίωση viii) Ισομερίωση Προλίνης. Τα τελευταία 10 χρόνια έχει βρεθεί τουλάχιστον ένα ένζυμο που κατευθύνει κάθε μία από τις ανωτέρω τροποποιήσεις (18).

Οι περισσότερες τροποποιήσεις είναι δυναμικές, με ισχυρά αντιστρεπτό χαρακτήρα και ένζυμα τα οποία απομακρύνουν την τροποποίηση έχουν αναγνωριστεί. Η μοναδική εξαίρεση είναι η μεθυλίωση των καταλοίπων αργινίνης. Παρόλο που και αυτή η τροποποίηση, πιστεύεται ότι είναι αντιστρεπτή, ένας μηχανισμός απομεθυλίωσης δεν έχει προς το παρόν ανακαλυφθεί. Επιπλέον, η διεργασία της κιτρουλινίωσης έχει καταδειχτεί ότι συνδέεται με την εξαφάνιση μεθυλιωμένων καταλοίπων αργινίνης, κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι οι δύο αυτές τροποποιήσεις έχουν ανταγωνιστικό χαρακτήρα (18).

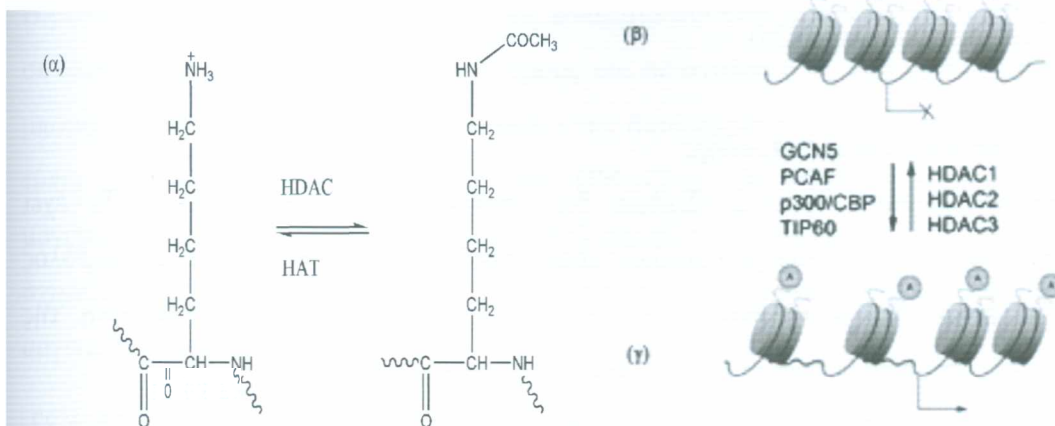
Πίνακας 1. Τύποι Τροποποιήσεων που λαμβάνουν χώρα στις ιστόνες

Τύπος Τροποποίησης	Τροποποιημένο κατάλοιπο	Λειτουργία
Ακετυλίωση	K-Ac	μεταγραφή, επιδιόρθωση, αντιγραφή, συμπύκνωση
Μεθυλίωση Lys	K-me1, K-me2, K-me3	μεταγραφή / επιδιόρθωση
Μεθυλίωση Arg	R-me1, R-me2a, R-me2s	μεταγραφή
Φωσφορυλίωση	S-ph, T-ph	μεταγραφή, αντιγραφή, συμπύκνωση
Ουβικιτίνωση	K-ub	μεταγραφή, αντιγραφή
Σουμοϋλίωση	K-su	μεταγραφή
ADP-ριβοσυλίωση	E-ar	μεταγραφή
Κιτρουλινίωση	R→Cit	μεταγραφή
Ισομερίωση Προλίνης	P _{cis} →P _{trans}	μεταγραφή

1,5,3,1 Ακετυλίωση Καταλοίπων Λυσίνης

Κατά τις διαδικασίες της ακετυλίωσης και αποακετυλίωσης των ιστονών, μία ακέτυλο ομάδα μεταφέρεται ή απομακρύνεται από την ε-αμινομάδα συγκεκριμένων καταλοίπων λυσίνης (Σχήμα 7α). Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από ειδικά ένζυμα ενώ η μεταφορά της ακέτυλο ομάδας πραγματοποιείται από ή προς το συνένζυμο A.

Απ' όλες τις γνωστές τροποποιήσεις, η ακετυλίωση ενδέχεται να έχει τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην αποσυμπίεση της χρωματίνης, δεδομένου ότι εξουδετερώνει τα θετικά φορτία των λυσινών και κατ' επέκταση την αλληλεπίδραση τους με τα αρνητικά φορτία του φωσφοδιεστερικού σκελετού του DNA. Κατ' αυτόν τον τρόπο η συμπιεσμένη χρωματίνη μετατρέπεται σε μια πιο "χαλαρή" μορφή η οποία συνδέεται με υψηλότερα επίπεδα μεταγραφής και αντιγραφής (Σχήμα 7β,γ). Η αντίληψη που υπάρχει είναι ότι με την ακετυλίωση διευκολύνεται η πρόσβαση των ενζύμων και συμπαραγόντων που καταλύουν τις παραπάνω διεργασίες. Εντούτοις, είναι πολύ πιθανό η ακετυλίωση να ενεργοποιεί την μεταγραφή και αντιγραφή, παρέχοντας το κατάλληλο περιβάλλον για την σύνδεση ρυθμιστικών πρωτεϊνών, δρώντας είτε μόνη της ή σε συνδιασμό με άλλες τροποποιήσεις (19).



Σχήμα 7 (α) Ακετυλίωση λυσίνης, καταλυόμενη από ακετυλοτρανσφεράσες (HAT) (β) Μη ακετυλιωμένη “ανενεργή” χρωματίνη (γ) Ακετυλιωμένη, “χαλαρή” μορφή χρωματίνης

Διάφορα *in vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι η ακετυλίωση της ιστόνης H4 στο κατάλοιπο K16 συνδέεται με την εμφάνιση της «χαλαρής» μορφής της χρωματίνης (20). Επιπροσθέτως, το ένζυμο SirT2 το οποίο παρουσιάζει εκλεκτικότητα για την άρση της ακετυλίωσης στο παραπάνω κατάλοιπο, είναι πιθανό να επιφέρει συμπίεση της χρωματίνης *in vivo* (21).

Η ακετυλίωση είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση της μεταγραφής του DNA. Οι ακετυλοτρανσφεράσες, τα ένζυμα που καταλύουν την ακετυλίωση των λυσινών, είναι ικανά να τροποποιήσουν περισσότερα από ένα κατάλοιπα λυσίνης. Πάντως κάποια περιορισμένη εκλεκτικότητα μπορεί να αποδοθεί σε μερικά απ' αυτά. Τα περισσότερα από τα σημεία ακετυλίωσης που έχουν χαρακτηριστεί μέχρι και σήμερα βρίσκονται στις N-τελικές ουρές των ιστονών, οι οποίες λόγω της ευκαμψίας τους είναι και πιο διαθέσιμες για τροποποιήσεις (22). Παρόλα αυτά, πρόσφατα βρέθηκε ότι μία λυσίνη (K56) εντός της ιστονικής πύκνωσης της ιστόνης H3, μπορεί να ακετυλιωθεί. Αυτή η λυσίνη αντικρύζει το DNA εντός του νουκλεοσώματος, με αποτέλεσμα η ακετυλίωση της να είναι σε θέση να επηρεάσει την αλληλεπίδραση της εν λόγω ιστόνης με το DNA (23). Η ακετυλίωση του συγκεκριμένου καταλοίπου είναι πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο και στην επιδιόρθωση του DNA. Μελέτες με κύτταρα ζύμης, έχουν δείξει ότι η τροποποίηση αυτή είναι παρούσα όταν υπάρχει κάποια βλάβη στο γενετικό υλικό (24, 25).

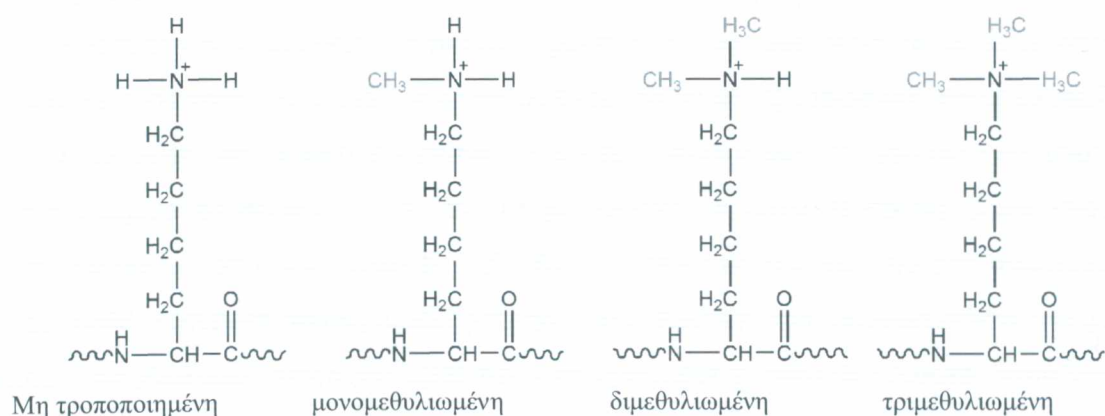
Διάφορες άλλες μελέτες έχουν αποδώσει στην ακετυλίωση κάποιο ρόλο στην διαδικασία της αντιγραφής του DNA. Πιο συγκεκριμένα, η μείωση της συγκέντρωσης της HB01 ακετυλοτρανσφεράσης, του ενζύμου που καταλύει την ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης

στις θέσεις K5, K8 και K12 της ιστόνης H4, προκαλεί μειωμένη σύνθεση του DNA, ενώ επηρεάζει την ομαλή μετάβαση στη φάση S, την περίοδο εκείνη του κυτταρικού κύκλου όπου διπλασιάζεται το γενετικό υλικό (26).

1,5,3,2 Μεθυλίωση Καταλοίπων Λυσίνης

Η μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης (Σχήμα 8), αποτελεί μία τροποποίηση που έχει συγκεντρώσει πάνω της το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων, δεδομένου ότι ο ρόλος της μπορεί να είναι είτε καταλυτικός είτε κατασταλτικός για την ενεργοποίηση της μεταγραφής, ανάλογα με τη θέση του τροποποιημένου καταλοίπου (27).

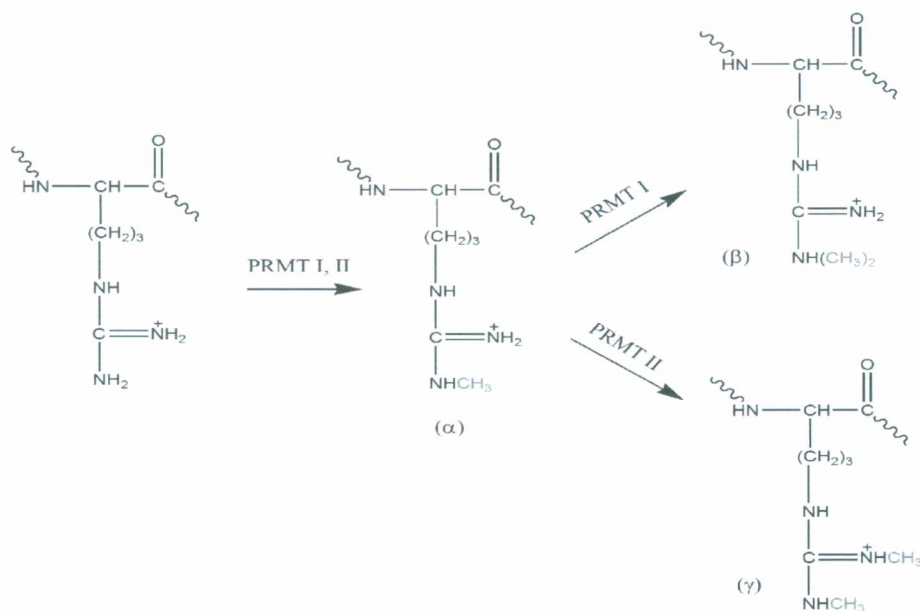
Η μεθυλίωση των καταλοίπων λυσίνης πραγματοποιείται στα κατάλοιπα K4, K9, K14, K27, K36 και K79 της ιστόνης H3 και στα κατάλοιπα K20 και K59 της ιστόνης H4 (28-32). Πολλά από τα ένζυμα που καταλύουν την μεθυλίωση των λυσινών έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί, ενώ κρυσταλλικές δομές έχουν επιλυθεί για ορισμένα απ' αυτά (33-39). Οι μεθυλοτρανσφεράσες της λυσίνης, παρουσιάζουν πολύ μεγάλη εκλεκτικότητα. Συνήθως μεθυλιώνουν μία λυσίνη σε μία ιστόνη και το αποτέλεσμα τους μπορεί να είναι είτε ενεργοποίηση είτε καταστολή της μεταγραφής του DNA (40). Τρία σημεία μεθυλίωσης στις ιστόνες συνδέονται με την ενεργοποίηση της μεταγραφής: H3K4, H3K36 και H3K79. Αντίστοιχα, τρία είναι και τα σημεία που εμπλέκονται στην καταστολή της μεταγραφής: H3K9, H3K27 και H4K20 (18).



Σχήμα 8. Τρόποι μεθυλίωσης Καταλοίπων Λυσίνης

1,5,3,3 Μεθυλίωση Καταλοίπων Αργινίνης

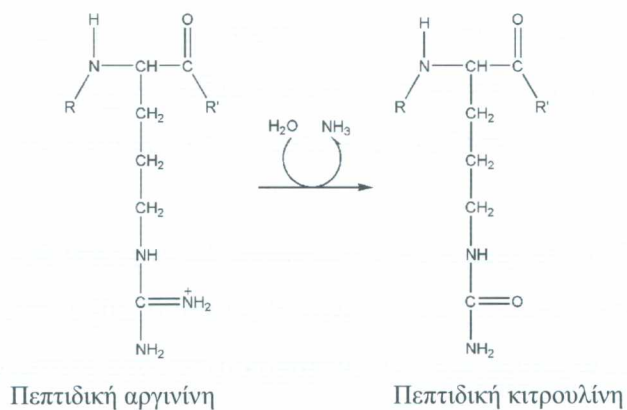
Η μεθυλίωση των καταλοίπων αργινίνης είναι μια συνήθης τροποποίηση που λαμβάνει χώρα σε όλους τους ευκαρυωτικούς μηχανισμούς και σε αναλογία με την μεθυλίωση των λυσινών μπορεί να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει την διαδικασία της μεταγραφής (41). Υπάρχουν 2 τύποι μεθυλοτρανσφερασών αργινίνης (PRMTs). Οι PRMTs τύπου I σχηματίζουν μονομέθυλ-αργινίνη και ασύμμετρη διμέθυλ-αργινίνη, ενώ τα ένζυμα τύπου II εκτός από το σχηματισμό μονομέθυλ-αργινίνης καταλύουν και την δημιουργία συμμετρικής διμέθυλ-αργινίνης (Σχήμα 9) (42, 43).



Σχήμα 9. Μεθυλίωση αργινίνης από τα ένζυμα PRMT τύπου I και II. (α) μονομέθυλ-αργινίνη (β) ασύμμετρη διμέθυλ-αργινίνη (γ) συμμετρική διμέθυλ-αργινίνη

1,5,3,4 Κιτρουλινίωση

Η διαδικασία αυτή αναφέρεται στην μετατροπή ενός καταλοίπου αργινίνης σε κιτρουλίνη (Σχήμα 10). Διάφορες αργινίνες στις ιστόνες H3 και H4 μπορεί να τροποποιηθούν κατ'αυτόν τον τρόπο από το ένζυμο PADI4. Η κιτρουλινίωση ανταγωνίζεται την μεθυλίωση, δεδομένου ότι η πεπτιδική κιτρουλίνη δεν μπορεί να μεθυλιωθεί (44).



Σχήμα 10. Κιτρουλινίωση αργινίνης

1,5,3,5 Ουβικιτίνωση

Γενικά, η ουβικιτίνωση, αναφέρεται στην σύνδεση ενός μορίου ουβικινόνης σε ένα άλλο πρωτεϊνικό μόριο. Η τροποποίηση αυτή διαφέρει από τις υπόλοιπες, δεδομένου ότι η ουβικινόνη, μια πρωτεΐνη 76 αμινοξικών καταλοίπων, είναι σημαντικά μεγαλύτερη από μία μικρή ακέτυλο ή μέθυλο ομάδα. Η δέσμευση της ουβικινόνης επιτυγχάνεται μέσω ενός ισοπεπτιδικού δεσμού, που δημιουργείται από την καρβοξυλομάδα της γλυκίνης του C-τελικού άκρου της και της πλευρικής αμινομάδας ενός καταλοίπου λυσίνης του πρωτεϊνικού μορίου-στόχου.

Αυτή η τροποποίηση έχει βρεθεί τόσο στην ιστόνη H2A (K119) όσο και στην ιστόνη H2B (K120 στον άνθρωπο, K123 στη ζύμη). Η ουβικιτίνωση της K119 στην ιστόνη H2A, συνδέεται με την καταστολή της μεταγραφής (45), ενώ αντίθετα η ίδια τροποποίηση στην K120 της ιστόνης H2B, ενεργοποιεί την ανωτέρω διαδικασία (46). Ο τρόπος με τον οποίον η ουβικιτίνωση λειτουργεί δεν είναι ακόμα γνωστός. Είναι πάντως πιθανό είτε να δρα συνεργιστικά, οδηγώντας δηλαδή στην ενεργοποίηση άλλων παραγόντων που μπορούν να δράσουν πάνω στη χρωματίνη, είτε να χρησιμεύει ως ένας τρόπος προκειμένου η χρωματίνη να παραμένει ανοιχτή (δεδομένου του μεγάλου μεγέθους της ουβικινόνης), διευκολύνοντας την πρόσβαση των παραγόντων που είναι απαραίτητοι για την μεταγραφή του DNA (18).

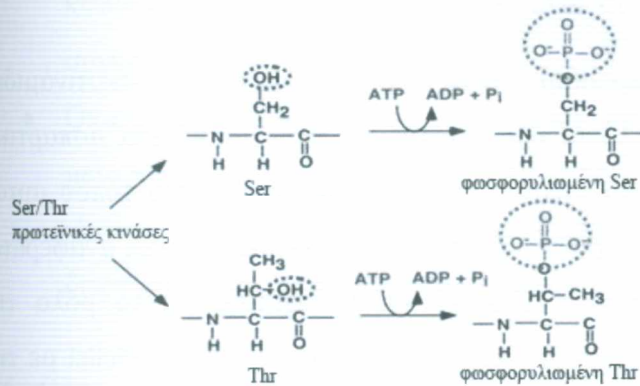
1,5,3,6 Σουμοϋλίωση

Οι πρωτεΐνες SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier proteins) είναι μια οικογένεια μικρών πρωτεϊνών που δεσμεύονται ομοιοπολικά κατά τον ίδιο τρόπο όπως η ουβικινόνη, σε άλλες πρωτεΐνες και τροποποιούν τη δράση τους. Σουμοϋλίωση πραγματοποιείται σε όλες τις πυρηνικές ιστόνες και μάλιστα μερικές από τις θέσεις στις οποίες η τροποποίηση αυτή λαμβάνει χώρα έχουν αναγνωριστεί στις ιστόνες H4, H2A και H2B. Η σουμοϋλίωση ανταγωνίζεται την ακετυλίωση και ουβικιτίνωση που μπορεί να πραγματοποιούνται στο ίδιο κατάλοιπο λυσίνης και ως εκ τούτου δρα κατασταλτικά για την μεταγραφή του DNA (47).

1,5,3,7 Φωσφορυλίωση Καταλοίπων Σερίνης και Θρεονίνης

Η φωσφορυλίωση παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην αποσυμπίεση της χρωματίνης. Δύο φωσφορυλιώσεις που πραγματοποιούνται στα κύτταρα θηλαστικών έχουν αναγνωριστεί ως απαραίτητες κατά την διάρκεια της μιτωτικής φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η πρώτη αφορά την φωσφορυλίωση της ιστόνης H3, στη θέση S10. Πρόσφατα δεδομένα συγκλίνουν στο γεγονός ότι η φωσφορυλίωση αυτή ενεργοποιεί την απομάκρυνση της πρωτεΐνης SP1 από την

μεθυλιωμένη λυσίνη K9 της ιστόνης H3, η οποία φυσιολογικά συμπιέζει την χρωματίνη (48). Η δεύτερη φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στην θρεονίνη T3 της ίδιας ιστόνης κι έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για την ομαλή μετάβαση στο στάδιο της μετάφασης κατά την μίτωση (49).



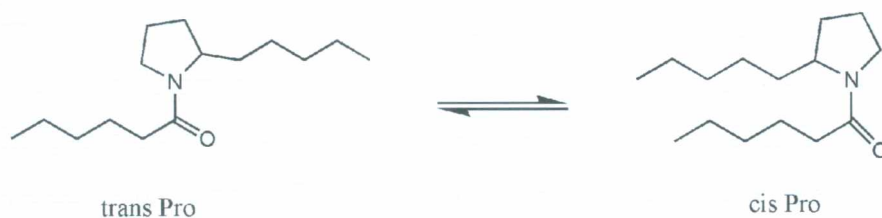
Σχήμα 11. Φωσφορυλίωση καταλοίπων Ser, Thr

Πρόσθετες θέσεις φωσφορυλίωσης έχουν αναγνωριστεί στη ζύμη. Έτσι φωσφορυλίωση της ιστόνης H4 στη θέση S1 ρυθμίζει την δημιουργία σπόρων (50), ενώ φωσφορυλίωση της σερίνης S10 στην ιστόνη H2B ελέγχει την απόπτωση που προκαλείται από οξειδωτικό stress (51). Αυτή η τελευταία τροποποίηση, πραγματοποιείται σε

ένα κατάλοιπο που δεν έχει διατηρηθεί μέσω της εξελικτικής πορείας στις ιστόνες των ανώτερων θηλαστικών. Παρόλα αυτά, πιστεύεται ότι η φωσφορυλίωση της σερίνης S14 στην ιστόνη H2B των θηλαστικών έχει παρόμοια λειτουργία.

Εν κατακλείδι, δύο φωσφορυλίωσεις στις θέσεις S129 και S1 των ιστονών H2A και H4, έχουν έναν ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA (52, 53), ενώ η φωσφορυλίωση της ιστόνης H3 στη θέση S10 συνδέεται με την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (54).

1,5,3,8 Ισομερίωση Προλίνης



Σχήμα 12. Ισομερίωση καταλοίπου Pro

Τα κατάλοιπα προλίνης μπορεί να υπάρξουν τόσο στη cis- όσο και στην trans-μορφή. Η εναλλαγή μεταξύ των δύο αυτών μορφών έχει ένα σημαντικό αντίκτυπο στη διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας μιας πρωτεΐνης (Σχήμα 12). Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ένα ένζυμο στη ζύμη, το οποίο μπορεί να ισομεριώσει την προλίνη P38 στην ιστόνη H3. Η ισομερίωση

αυτή συνδέεται με τα επίπεδα μεθυλίωσης της γειτονικής λυσίνης K36 της ίδιας ιστόνης. Είναι επομένως πολύ πιθανό, η παρουσία του κατάλληλου ισομερούς προλίνης να είναι απαραίτητη για την αναγνώριση και μεθυλίωση της K36 από την κατάλληλη μεθυλοτρανσφεράση (55, 56).

1,5,3,9 ADP-ριβοςυλίωση

Η τροποποίηση αυτή αναφέρεται στην προσθήκη μιας ADP-ριβόζης από το νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (NAD^+) σε κατάλοιπα όπως αργινίνες, γλουταμικά και ασπαρτικά οξέα (57). Υπάρχουν πολλές αναφορές για πιθανές θέσεις τροποποίησης του τύπου αυτού στις ιστόνες. Παρόλα αυτά, μία μόνο θέση ριβοςυλίωσης έχει αναγνωριστεί και αναφέρεται στο γλουταμικό κατάλοιπο E2 της ιστόνης H2B. Η γνώση σχετικά με το ρόλο της τροποποίησης αυτής είναι ιδιαίτερα περιορισμένη και μόνο πρόσφατα έχει συνδεθεί με την διαδικασία της μεταγραφής (58).

1,5,4 Συνέργεια των Τροποποιήσεων και Ιστονικός Κώδικας

Οι χημικές τροποποιήσεις των ιστονών, μέσω των οποίων δίνεται το έναυσμα για την έναρξη ή παύση των θεμελιωδών διεργασιών στις οποίες συμμετέχει το DNA, αποτελούν τον λεγόμενο ιστονικό κώδικα. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι μεταβολές αυτές δρουν σε πολλές περιπτώσεις συνεργιστικά. Η ταυτόχρονη εμφάνιση πολλαπλών τροποποιήσεων στις ουρές των ιστονών, είναι γνωστή εδώ και αρκετά χρόνια. Αυτές οι διαδοχικές τροποποιήσεις, οι οποίες αρχικά θεωρήθηκαν ότι συμβαίνουν μόνο στην ουρά της ίδιας ιστόνης, δίνουν το έναυσμα για την έναρξη διαφόρων διεργασιών και περιλαμβάνουν τα ζεύγη : φωσφορυλίωση/ακετυλίωση, ακετυλίωση/μεθυλίωση και φωσφορυλίωση / μεθυλίωση (30). Πιο πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι δύο άλλες τροποποιήσεις, η μεθυλίωση της Lys 4 της ιστόνης H3 και η ουβικιτίνωση της Lys 123 της ιστόνης H2B της ζύμης, έχουν συνεργικό χαρακτήρα (59). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, δεδομένου ότι οι ουρές των 2 αυτών ιστονών, βρίσκονται αρκετά μακριά η μία από την άλλη, στην κρυσταλλική δομή του νουκλεοσώματος (9). Το γεγονός ότι μετάλλαξη του καταλοίπου K123, στο οποίο πραγματοποιείται η ουβικιτίνωση, εξαλείφει την μεθυλίωση της K4, χωρίς όμως να συμβαίνει το αντίθετο, αποτελεί ένδειξη ότι η πρώτη τροποποίηση αποτελεί ένα απαραίτητο πρώτο στάδιο για την πραγματοποίηση της δεύτερης. Η μεθυλίωση της K4 της ιστόνης H3, έχει κάποιο ρόλο στην απενεργοποίηση γονιδίων που βρίσκονται εντός της ετεροχρωματίνης,

συνεπώς η μη φυσιολογική ουβικιτίνωση της K123 σε κάποια άλλη απομακρυσμένη ιστόνη, οδηγεί στην έκφραση τελομερικών γονιδίων (59).

Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι:

- Οι ιστόνες είναι ισχυρά δυναμικές μορφές και η λειτουργία τους διέπεται από έναν κώδικα, τα γράμματα του οποίου είναι οι τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε συγκεκριμένα κατάλοιπα.
- Οποιαδήποτε τροποποίηση του κώδικα, είτε λόγω κάποιας μετάλλαξης, είτε λόγω μεταβολής του φορτίου ή της δομής του οκταμερούς από σύμπλεξη μεταλλικών ιόντων, μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές στην ομαλότητα των θεμελιωδών διεργασιών της μεταγραφής, αντιγραφής και έκφρασης του DNA.

1.6. Αλληλεπίδραση ιστονών και μεταλλικών ιόντων

Η ύπαρξη ενός κώδικα που ελέγχεται από τις χημικές τροποποιήσεις των ιστονών, για τον έλεγχο των θεμελιωδών διεργασιών του DNA έχει συνδεθεί με την καρκινογένεση που προκαλείται από μεταλλικά ιόντα. Διάφορες *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι το νικέλιο οδηγεί στην απενεργοποίηση ή ενεργοποίηση γονιδίων, απορρυθμίζοντας τη φυσιολογική γενετική έκφραση. Η ύπαρξη χρωμοσωμικών μορφολογικών διαταραχών σε κύτταρα επεξεργασμένα με νικέλιο, όπως απώλεια γενετικού υλικού ή τοπική αποσυμπύκνωση, είναι ενδεικτική της αλληλεπίδρασης του μετάλλου με την χρωματίνη. Δεδομένου ότι η δέσμευση των ιόντων του μετάλλου στο DNA είναι ασθενής, ιδιαίτερα παρουσία των αντισταθμιστικών ιόντων Mg^{2+} και άλλων αμινοξικών υποκαταστατών, οι ιστόνες θεωρούνται οι επικρατέστεροι υποκαταστάτες για το μέταλλο εντός της πυρηνικής χρωματίνης. Άλλα μεταλλικά ιόντα όπως ο Cu^{2+} ή το Cd^{2+} μπορούν να συμπλεχθούν με τις ιστόνες.

Η σύμπλεξη μεταλλικών ιόντων σε τμήματα των πυρηνικών ιστονών μπορεί να εμπλακεί μεταξύ άλλων στις φυσιολογικές τροποποιήσεις αυτών, οδηγώντας σε απορύθμιση του ιστονικού κώδικα και ως εκ τούτου σε ανωμαλίες στη διαχείριση της γενετικής πληροφορίας. Επιπροσθέτως, η πιθανή υδρόλυση των σχηματιζόμενων συμπλόκων ιστόνης-μετάλλου μπορεί να οδηγήσει σε πρόωρη αποικοδόμηση πεπτιδικών τμημάτων γύρω από τα σημεία δέσμευσης, ενώ όταν τα σύμπλοκα αυτά παρουσιάζουν οξειδοαναγωγική ικανότητα, προάγουν την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου που προκαλούν αλλοίωση του γενετικού υλικού.

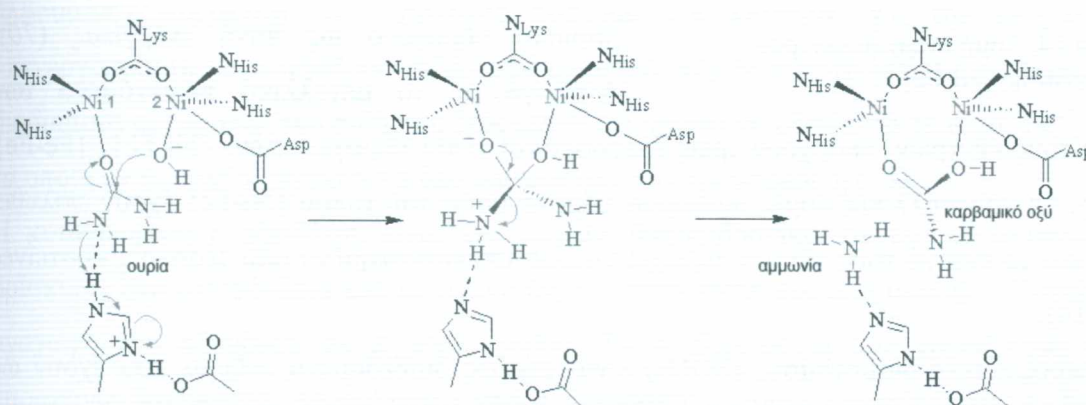
Οι παραπάνω υποθέσεις έχουν διερευνηθεί σε πολλές περιπτώσεις με την χρήση πεπτιδικών μοντέλων. Τα πεπτιδικά μοντέλα μιμούνται τις πιθανές περιοχές δέσμευσης των μετάλλων εντός του οκταμερούς. Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με την αλληλεπίδραση πεπτιδίων-μοντέλων διαφόρων ιστονών με μέταλλα. Η ικανότητα και ο τρόπος σύμπλεξης, η δομή των σχηματιζόμενων συμπλόκων και η τυχόν υδρόλυση τους όπως και η ικανότητα τους να προκαλούν οξειδωτική καταστροφή του DNA έχουν μελετηθεί σε πολλές περιπτώσεις και εξετάζονται εκτενώς στο Κεφάλαιο 5.

2. Βιοχημικός ρόλος Νικελίου και Χαλκού

Ο βιολογικός ρόλος του νικελίου στον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Παρόλο που μέχρι και σήμερα δεν έχει ανακαλυφθεί κάποιο ένζυμο στα ανώτερα θηλαστικά που να περιέχει νικέλιο στο ενεργό του κέντρο, το μέταλλο έχει προταθεί ότι παίζει κάποιον ρόλο στον μεταβολισμό και στις διαδικασίες αναπαραγωγής των θηλαστικών και πτηνών (60, 61).

Η βιολογία του νικελίου είναι περισσότερο κατανοητή στους μικροοργανισμούς όπου παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες διεργασίες, όπως στο μεταβολισμό του υδρογόνου και του μονοξειδίου του άνθρακα υπό αναερόβιες συνθήκες (62). Υπάρχει ένα πλήθος καλά χαρακτηρισμένων ενζύμων που απαντούν σε μικροοργανισμούς και φυτά και περιέχουν νικέλιο στο ενεργό τους κέντρο.

Η ουρεάση έχει βρεθεί στην άλγη, σε διάφορα φυτά, μύκητες και βακτήρια. Καταλύει την υδρόλυση της ουρίας σε αμμωνία και καρβαμικό οξύ (Σχήμα 13). Το τελευταίο μόριο υφίσταται αυθόρμητα περαιτέρω διάσπαση σε αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα (63).

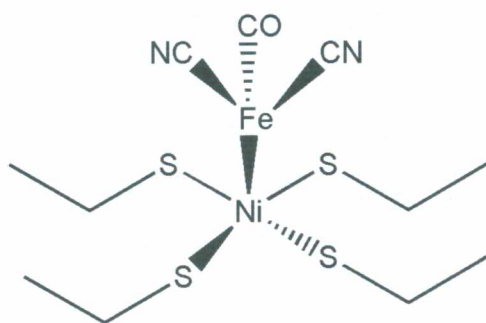


Σχήμα 13. Μηχανισμός δράσης ουρεάσης

Στα φυτά, ο πρωταρχικός ρόλος της ουρεάσης είναι η ανάκτηση του αζώτου από την παραγόμενη ουρία κατά την βλάστηση (64), ενώ παρουσιάζει και εντομοκτόνο δράση συμμετέχοντας στο αμυντικό σύστημα αυτών (65). Η ουρεάση είναι μολυσματικός παράγοντας για τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά, σε διάφορες λοιμώξεις του ουροποιητικού και γαστρεντερικού συστήματος και εμπλέκεται στη δημιουργία πέτρας στα νεφρά και σε διάφορα άλλα νοσήματα, όπως πυελονεφρίτιδα, αμμωνική εγκεφαλοπάθεια και ηπατικό

κόμα (66, 67). Σημαντικές ποσότητες ουρεάσης παράγονται επίσης από το βακτήριο *Helicobacter Pylori* το οποίο μπορεί να επιζήσει στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, εκμεταλλευόμενο την αύξηση του pH που προκαλείται από τη δράση του ενζύμου και είναι υπεύθυνο για πολλές παθολογίες, συμπεριλαμβανομένου και καρκίνου (68).

Η ουρεάση περιέχει δύο άτομα νικελίου σε απόσταση 3,5-3,7 Å, εκ των οποίων το πρώτο είναι τριϋποκατεστημένο και το δεύτερο πενταϋποκατεστημένο με τριγωνική διπυραμιδική γεωμετρία. Τα δύο άτομα νικελίου γεφυρώνονται μέσω των δύο ατόμων οξυγόνου του καρβαμικού οξέος της Lys₂₁₇ ενώ οι υπόλοιπες θέσεις ένταξης καταλαμβάνονται από τα ιμιδαζολικά άτομα αζώτου της His₂₄₆ και His₂₇₂ για το πρώτο άτομο νικελίου και της His₁₃₄, His₁₃₆ και καρβοξυλικού οξυγόνου του Asp₃₆₀ για το δεύτερο άτομο. Η πέμπτη θέση ένταξης του δεύτερου ατόμου νικελίου καταλαμβάνεται από ένα μόριο νερού (Σχήμα 13) (69).

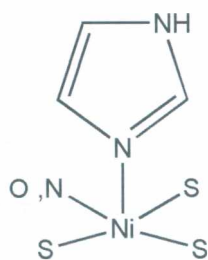


Σχήμα 14. Δομή ενεργού κέντρου υδρογενάσης {Ni-Fe}

Άλλη μια κατηγορία ενζύμων που περιέχουν νικέλιο στο ενεργό τους κέντρο είναι οι υδρογενάσες. Γενικά, τα ένζυμα αυτά καταλύουν την αντιστρεπτή οξείδωση του μοριακού υδρογόνου σε πρωτόνια και ηλεκτρόνια και παρέχουν έναν μηχανισμό για πολλούς μικροοργανισμούς, ώστε να χρησιμοποιούν μοριακό υδρογόνο ως πηγή ενέργειας (70).

Ανάλογα με το μεταλλικό περιεχόμενο των ενεργών τους κέντρων, υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι υδρογενασών: {Ni-Fe}, {Fe-Fe} και {Fe}. Οι κρυσταλλικές δομές διαφόρων υδρογενασών του τύπου {Ni-Fe} έχουν επιλυθεί (71-73) και το ενεργό τους κέντρο περιέχει νικέλιο υποκατεστημένο από τέσσερις κυστεΐνες (Σχήμα 14).

Οι σουπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs) είναι ευρέως διαδεδομένα ένζυμα που έχουν ως



Σχήμα 15. Δομή ενεργού κέντρου Ni-SOD

σκοπό την προστασία των βιολογικών μορίων από την οξειδωτική καταστροφή, καταλύοντας την μετατροπή του ανίοντος σουπεροξειδίου (O_2^-) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο. Ενώ είναι καλά χαρακτηρισμένες πολλές σουπεροξειδικές δισμουτάσες που περιέχουν Cu, Zn, Fe και Mn, πρόσφατες έρευνες έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη διαφόρων SODs που περιέχουν Ni στο ενεργό τους κέντρο, σε

πολλά είδη στρεπτομυκήτων και σε ορισμένα κυανοβακτήρια. Στα ένζυμα αυτά, το τρισθενές νικέλιο, υιοθετεί μια επίπεδη πυραμιδική γεωμετρία με το ιμιδαζολικό άτομο αζώτου σε αξονική θέση (Σχήμα 15). Ο αξονικός υποκαταστάτης χάνεται στην ανηγμένη μορφή και η δομή γίνεται επίπεδη τετραγωνική (74, 75).

Σε αντίθεση με το νικέλιο, ο χαλκός είναι γνωστό εδώ κι αρκετές δεκαετίες ότι αποτελεί απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τον άνθρωπο, όταν διάφορες έρευνες αποκάλυψαν την αναγκαιότητα του μετάλλου για παραγωγή ερυθροκυττάρων και ομαλή εμβρυική ανάπτυξη (76, 77). Σήμερα, είναι γνωστό ότι ο χαλκός συμμετέχει ως συμπράγοντας ενζύμων σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών που απαιτούν μεταφορά ηλεκτρονίων, όπως στη φωτοσύνθεση και αναπνοή, στον σχηματισμό του συνδετικού ιστού, στον μεταβολισμό του σιδήρου, στην εξόντωση των ελευθέρων ριζών και στην ομαλή νευρολογική λειτουργία (78, 79).

Στα θηλαστικά, οι κύριες πρωτεΐνες που δεσμεύουν χαλκό περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων, την σερουλοπλασμίνη, την κυτοχρωμική οξειδάση, την σουπεροξειδική δισμουτάση και κάποιες μεταλλοθειονίνες. Η σερουλοπλασμίνη συντίθεται στο ήπαρ και περιέχει 6 άτομα χαλκού στη δομή της (80). Εκτός του ότι χρησιμεύει για την μεταφορά του 90% της ολικής συγκέντρωσης χαλκού στο πλάσμα του αίματος (το υπόλοιπο 10% μεταφέρεται με την αλβουμίνη), συμμετέχει στο αμυντικό σύστημα του κυττάρου για την ανίχνευση και απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου (80, 81). Μία τρίτη λειτουργία έγκειται στην διαδικασία μεταφοράς του σιδήρου, δεδομένου ότι μπορεί να οξειδώσει τα ιόντα Fe^{2+} σε Fe^{3+} , τα οποία εν συνεχεία μπορούν να δεσμευτούν από την τρανσφερίνη (78).

Η κυτοχρωμική c οξειδάση, είναι ένα μεγάλο διαμεμβρανικό πρωτεϊνικό σύμπλοκο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και το τελικό ένζυμο στην αναπνευστική αλυσίδα. Καταλύει την αναγωγή του οξυγόνου σε 2 μόρια νερού. Τα 4 ηλεκτρόνια που χρειάζονται για την παραπάνω διαδικασία, λαμβάνονται από 4 διαφορετικά μόρια κυτοχρώματος c. Κατά την παραπάνω διαδικασία, η κυτοχρωμική οξειδάση λαμβάνει 4 πρωτόνια από την εσωτερική υδατική φάση, δημιουργώντας κατ' αυτόν τον τρόπο ένα διαμεμβρανικό δυναμικό, το οποίο εν συνεχεία χρησιμοποιείται για την σύνθεση ATP (80).

Οι λειτουργίες των 2 παραπάνω ενζύμων, καθιστούν σαφές το γεγονός ότι ο χαλκός αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για όλα τα βιολογικά είδη και ότι ζωή δεν μπορεί να υπάρξει, τουλάχιστον με τη μορφή που αντιλαμβανόμαστε, χωρίς αυτόν. Ο περισσότερος χαλκός εντός των έμβιων όντων είναι ενεργός κι ελάχιστες ποσότητες αποθηκεύονται υπό φυσιολογικές

συνθήκες. Στα περισσότερα θηλαστικά ο χαλκός απεκκρίνεται εύκολα και μάλιστα η ταχύτητα με την οποία απεκκρίνεται είναι θεμελιώδης για την διατήρηση της ομοιόστασης του (78).

3. Τοξικότητα και Καρκινογένεση που προκαλείται από Νικέλιο και Χαλκό

3,1 Τοξικότητα του νικελίου στον άνθρωπο

3,1,1 Γενικά

Το νικέλιο βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη σύγχρονη βιομηχανία. Κράματα μετάλλων με νικέλιο χρησιμοποιούνται για την παρασκευή νομισμάτων, κοσμημάτων και ανοξείδωτου ατσαλιού. Η χρήση του μετάλλου για την παρασκευή μπαταριών και ως καταλύτης σε διάφορα στάδια της βιομηχανικής παραγωγής είναι εδώ και πολλά χρόνια γνωστή. Τελευταία το νικέλιο έχει αποδειχθεί να είναι εξαιρετος καταλύτης για την παρασκευή νανοσωλήνων άνθρακα. Αυτή η νέα τεχνολογία αναμένεται να αυξήσει ακόμα περισσότερο την διάθεση, παραγωγή και απόρριψη του μετάλλου στο περιβάλλον (82).

Οι εργαζόμενοι στις βιομηχανίες που χρησιμοποιούν νικέλιο, έρχονται σε επαφή με το μέταλλο σε όλα τα στάδια της παραγωγής μέσω του νερού, του αέρα ή επαφών με το δέρμα. Η κύρια πάντως έκθεση στο μέταλλο, πραγματοποιείται μέσω του αναπνευστικού συστήματος. Η έκθεση σε αιωρούμενα σωματίδια που περιέχουν νικέλιο είναι γνωστό ότι μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρά αναπνευστικά προβλήματα. Αυτά ποικίλλουν, από ήπιους ερεθισμούς και φλεγμονές του αναπνευστικού συστήματος, έως βρογχίτιδα, άσθμα, πνευμονική ίνωση και οίδημα (83). Επιπροσθέτως, η έκθεση στο μέταλλο είναι δυνατόν να προκαλέσει καρδιαγγειακά προβλήματα, ασθένειες του ύπατος και αλλεργική δερματίτιδα.

Οι μεγαλύτερες όμως ανησυχίες γύρω από την αρνητική επίδραση του μετάλλου στον άνθρωπο, εγείρονται από την καρκινογόνο δράση του. Επιδημιολογικές έρευνες έχουν καταδείξει το μέταλλο ως καρκινογόνο για τον άνθρωπο, με τους εργαζόμενους στις βιομηχανίες νικελίου να αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα υψηλού κινδύνου (84). Αναθυμιάσεις από συγκολλητικές εργασίες οι οποίες περιέχουν σημαντικές ποσότητες νικελίου, συνδέονται άμεσα με πνευμονικά οιδήματα και φλεγμονές (85), ενώ η χρόνια έκθεση πειραματόζωων σε σύμπλοκα του μετάλλου έχει συνδεθεί άμεσα με την εμφάνιση όγκων (86). Επιπλέον, in vitro μελέτες έχουν αποδείξει την μεταλλαξιογόνο δράση των ανωτέρω συμπλόκων στα ανθρώπινα κύτταρα (87-90). Βασιζόμενος στις παραπάνω παρατηρήσεις, ο Διεθνής Οργανισμός IARC (International Agency for Research in Cancer) αποτίμησε την καρκινογόνο δράση του νικελίου το 1990 και συμπέρανε ότι όλα τα σύμπλοκα

κι ενώσεις του νικελίου με εξαίρεση το μεταλλικό νικέλιο, είναι καρκινογόνα για τον άνθρωπο (91).

3,1,2 Τρόποι έκθεσης, λήψη και απέκκριση

Στην μεταλλουργία του νικελίου και σχετικές βιομηχανίες, ο κύριος τρόπος εισαγωγής του μετάλλου στο σώμα είναι η αναπνευστική οδός. Οι εργαζόμενοι σε τέτοιες βιομηχανίες, εκτίθενται στο μέταλλο μέσω αερομεταφερόμενης σκόνης, που περιέχει μίγματα υδατοδιαλυτών (NiSO_4 , NiCl_2) και μη υδατοδιαλυτών (NiO , NiS , Ni_3S_2) συμπλόκων του μετάλλου, όπως και μικρών σωματιδίων, διαμέτρου μικρότερης των 15 μm (92-94). Οι όροι «υδατοδιαλυτά» και «μη υδατοδιαλυτά» σύμπλοκα του νικελίου, χρησιμοποιούνται μόνο για την διάκριση των ενώσεων του μετάλλου και μπορεί να μην ανταποκρίνονται στην πραγματική διαλυτότητα τους σε βιολογικά συστήματα, όπου η διάλυση και επακόλουθη βιοδιαθεσιμότητα ενός μη υδατοδιαλυτού σωματιδίου, μπορεί να επέλθει όταν αυτό εισέλθει στον οργανισμό, λόγω του πολύ μικρού μεγέθους του, όπως συμβαίνει με σκόνες μετάλλων και με μικροσκοπικά σωματίδια οξειδίων του νικελίου (95, 96). Η στοματική λήψη και δερματική απορρόφηση, παρόλο που είναι δευτερεύουσας σημασίας, είναι οι σημαντικότεροι τρόποι έκθεσης του γενικού πληθυσμού στο μέταλλο (91, 97, 98).

Όταν το νικέλιο εισπνέεται, υπό τη μορφή υδατοδιαλυτών συμπλόκων, απορροφάται από το αίμα, κατόπιν μεταφέρεται σε άλλους ιστούς και απεκκρίνεται από τα ούρα, με ένα χρόνο ημίσειας ζωής 17-39 ώρες (99). Ο αντίστοιχος χρόνος για τα μη υδατοδιαλυτά σύμπλοκα του νικελίου είναι 30-53 ώρες (100). Τα παραπάνω δεδομένα υπονοούν ότι το εισπνεόμενο νικέλιο, αποβάλλεται σχετικά γρήγορα από τον οργανισμό. Παρόλα αυτά, μικρές ποσότητες νικελίου παραμένουν για πολλούς μήνες ή ακόμα και χρόνια μετά την έκθεση, σε ορισμένους ιστούς. Σημαντικές ποσότητες του μετάλλου έχουν βρεθεί στα επιθηλιακά κύτταρα της ρινικής κοιλότητας, συνταξιοδοτημένων εργατών από βιομηχανίες νικελίου (100), ενώ πειράματα σε ζώα έχουν δείξει ότι το μέταλλο μπορεί να κατακρατηθεί από τα νεφρά και τους πνεύμονες (101-103).

Η εισπνοή του πτητικού τετρακαρβονυλικού νικελίου είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη εξαιτίας της εξαιρετικά υψηλής τοξικότητας του (104). Αυτό το μη ιονικό, λιποδιαλυτό σύμπλοκο, διαπερνάει εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και μεταβολίζεται γρήγορα σε υδατοδιαλυτό δισθενές νικέλιο με ταυτόχρονη παραγωγή μονοξειδίου και διοξειδίου του άνθρακα (105, 106).

Δυστυχώς, η γνώση γύρω από την κατανομή των τοξικών δόσεων του νικελίου στο ανθρώπινο σώμα, είναι περιορισμένη (107). Είναι πάντως γνωστό ότι το νικέλιο μεταφέρεται

στο αίμα μέσω των πρωτεϊνών του πλάσματος και κυρίως της αλβουμίνης και ότι τα οστά και οι πνεύμονες κατακρατούν το μέταλλο, περισσότερο απ' όσο άλλοι ιστοί. Τα νεφρά, ως το κύριο όργανο απέκκρισης, επηρεάζονται περισσότερο από την τοξικότητα του μετάλλου (108).

3,1,3 Οξεία και χρόνια έκθεση

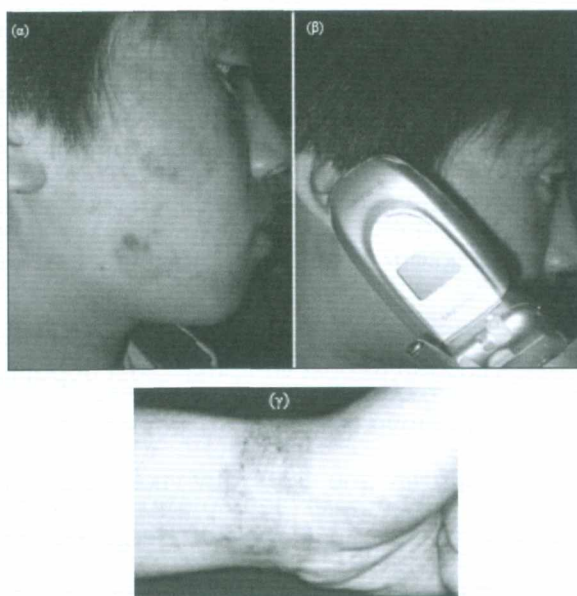
Με εξαίρεση το τετρακαρβονυλικό νικέλιο, η τοξικότητα των συμπλόκων του νικελίου δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Γι' αυτό το λόγο η οξεία δηλητηρίαση από το μέταλλο είναι σπάνια (109, 110). Δόσεις υδατοδιαλυτών αλάτων του νικελίου από το στόμα, μικρότερες του ενός γραμμαρίου μπορεί να προκαλέσουν ναυτία, αργό καρδιακό σφυγμό και να μειώσουν τη θερμοκρασία του σώματος. Υψηλότερες δόσεις, μπορεί να προκαλέσουν αιμορραγική γαστρίτιδα, πνευμονική συμφόρηση, ταχυκαρδία και καρδιακή προσβολή, ενώ μπορεί να αποβούν θανατηφόρες (111).

Το τετρακαρβονικό νικέλιο παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερη τοξικότητα από τα υπόλοιπα σύμπλοκα του νικελίου. Υπολογίζεται μάλιστα ότι η τοξικότητα του είναι εκατό φορές μεγαλύτερη από αυτή του μονοξειδίου του άνθρακα και συγκρίσιμη με την τοξικότητα που επιδεικνύει το υδροκυάνιο (104). Έκθεση για 30 λεπτά σε ατμοσφαιρική συγκέντρωση του εν λόγω συμπλόκου ίση με 30 ppm είναι θανατηφόρα για τον άνθρωπο (112). Τα αρχικά συμπτώματα περιλαμβάνουν ερεθισμό του αναπνευστικού, γαστρεντερικού και κεντρικού νευρικού συστήματος, ενώ ταχυκαρδία, μυικοί πόνοι, αδυναμία, κοιλιακοί πόνοι και διάρροια μπορεί να παρατηρηθούν 12-36 ώρες μετά την έκθεση (104). Σε ακραίες περιπτώσεις είναι δυνατόν να προκληθεί πνευμονίτιδα και εγκεφαλικό οίδημα που μπορεί να οδηγήσουν στο θάνατο (113).

Παρατεταμένη έκθεση σε μικρές δόσεις νικελίου μπορεί να προκαλέσει σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως δερματίτιδα, άσθμα, πνευμονική ίνωση και καρκίνο της αναπνευστικής οδού (104, 109, 113, 114). Εισπνοή αερολυμάτων που περιέχουν νικέλιο, μπορεί να οδηγήσει σε αναπνευστική ανεπάρκεια και πνευμονική ίνωση (115). Οι Berge και Skyberg σε μία σχετικά πρόσφατη μελέτη, διέγνωσαν πνευμονική ίνωση σε 47 από 1046 εργάτες μιας βιομηχανίας νικελίου. Σημαντική πιθανότητα να αναπτύξουν την ίνωση βρέθηκε για όλους τους εργάτες που ήταν έκτεθειμένοι τόσο σε υδατοδιαλυτά όσο και μη υδατοδιαλυτά σύμπλοκα του νικελίου, όχι όμως γι' αυτούς που κυρίως έρχονταν σε επαφή με το μεταλλικό νικέλιο (116).

Διάφορα άλλα χρόνια αναπνευστικά νοσήματα, όπως άσθμα, βρογχίτιδα, ιγμορίτιδα και αλλεργική ρινίτιδα, έχουν παρατηρηθεί σε εργαζόμενους σε βιομηχανίες νικελίου (117-119), ενώ η χρόνια εισπνοή του μετάλλου έχει συνδεθεί με την πιθανότητα ανάπτυξης συνδρόμου Loffler (120).

Η χρήση κραμάτων που περιέχουν νικέλιο για την κατασκευή εμφυτευμάτων και ορθοδοντικών συσκευών έχει συνδεθεί άμεσα με την εμφάνιση επιπεφυκίτιδας, στοματίτιδας και φλεγμονών γύρω από τα σημεία εισαγωγής (121, 122). Η σημαντικότερη, όμως τοξική επίδραση του μετάλλου στο δέρμα είναι η μέσω επαφής αλλεργική δερματίτιδα, που μπορεί να προκληθεί από τη χρήση κοσμημάτων, εξαρτημάτων ρουχισμού, προσθετικών μελών και χειρουργικών εργαλείων (104, 123). Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα θεωρείται η πρώτη περίπτωση που αναφέρεται στην διεθνή βιβλιογραφία για εμφάνιση δερματίτιδας, λόγω χρήσης κινητού τηλεφώνου, που περιέχει επινικελιωμένα εξαρτήματα (Σχήμα 16α, β) (124). Τα συμπτώματα μπορεί να επιμείνουν για αρκετούς μήνες μετά την επαφή, πιθανόν λόγω της ισχυρής δέσμευσης του μετάλλου από την κερατίνη του δέρματος (125).



Σχήμα 16. Αλλεργική Δερματίτιδα (α), (β) από τη χρήση κινητού τηλεφώνου (124), (γ) από επαφή με επινικελιωμένο μπρασελέ ρολογιού (126).

3,2 Καρκινογένεση και Νικέλιο

3,2,1 Επιδημιολογικές Μελέτες

Η έκθεση σε σύμπλοκα του νικελίου και η εμφάνιση καρκίνου συνδέθηκαν για πρώτη φορά το 1933 όταν ο Bridge διέγινε την εμφάνιση καρκίνων της ρινικής κοιλότητας σε εργάτες Βρετανικού διυλιστηρίου που έρχονταν σε καθημερινή επαφή με το μέταλλο. Από τότε ένας μεγάλος αριθμός επιδημιολογικών ερευνών σε ανθρώπους και ζώα έχει επιβεβαιώσει την καρκινογόνο δράση του μετάλλου (91, 97, 104, 127).

Για πολλά χρόνια η επικρατούσα άποψη ήταν ότι μόνο τα μη υδατοδιαλυτά άλατα του μετάλλου (Ni_3S_2 , NiO) παρουσιάζουν καρκινογόνο δράση. Εντούτοις, πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αερολύματα υδατοδιαλυτών συμπλόκων νικελίου είναι επίσης καρκινογόνα και μάλιστα υπάρχει ξεκάθαρη σχέση μεταξύ της δόσης και της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου (127).

3,2,2 Μηχανισμοί Καρκινογένεσης που Προκαλείται από Νικέλιο

3,2,2,1 Γενοτοξική Δράση και Επιγενετικές Επιπτώσεις

Σε αντίθεση με τις περισσότερες καρκινογόνες ουσίες, τα σύμπλοκα του νικελίου παρουσιάζουν σχετικά ασθενή μεταλλαξιογόνο δράση (128-131). Παρόλα αυτά η γενοτοξική δράση του μετάλλου είναι κυρίως κλαστογενετική, δηλαδή μπορεί να προκαλέσει χρωμοσωμική βλάβη. Τέτοιες βλάβες έχουν παρατηρηθεί στον ετεροχρωματικό μακρύ βραχίονα του Χ χρωμοσώματος, κυττάρων ωοθηκών Κινέζικου χάμστερ (CHO cells) και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων ανωμαλιών, τοπική αποσυμπύκνωση της χρωματίνης (αποδυνάμωση της σύνδεσης του DNA με τις ιστόνες) και διαγραφές (απώλεια γενετικού υλικού από το χρωμόσωμα) (132, 133).

Στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα το θειϊκό νικέλιο είναι δυνατόν να αυξήσει την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των αδελφών χρωματίδων κατά τη διάρκεια της μίτωσης (134). Η ανταλλαγή των αδελφών χρωματίδων είναι μια φυσιολογική διαδικασία, παρόλο που δεν έχει αποσαφηνιστεί ο ρόλος της. Συνήθως 4-5 ανταλλαγές είναι θεμιτές. Αύξηση των ανταλλαγών συνδέεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως νόσο του Behcet και εμφάνιση καρκίνου (135).

Με τον όρο “επιγενετική” περιγράφεται η αλλαγή στη δράση ενός γονιδίου, που εμφανίζεται χωρίς την ταυτόχρονη τροποποίηση στο DNA αυτού (136). Η επιγενετική τοξικότητα του νικελίου που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική μετάπλαση, κυρίως πραγματοποιείται μέσω

της απορύθμισης της γενετικής έκφρασης λόγω της εμπλοκής του στη μεθυλίωση του DNA, στις φυσιολογικές τροποποιήσεις των ιστονών και στην ομοιόσταση του ασβεστίου.

3,2,2,2 Μεθυλίωση του DNA και Απενεργοποίηση Γονιδίων

Στο DNA των ευκαρυωτικών οργανισμών, η μεθυλίωση των καταλοίπων κυτοσίνης σε δινουκλεοτίδια του τύπου CpG, είναι μια σημαντική τροποποίηση όσον αφορά τη ρύθμιση της γενετικής έκφρασης. Σε γενικές γραμμές, αυξημένη μεθυλίωση καταστέλλει την αντιγραφή του DNA (137). Η έκθεση σε σύμπλοκα του νικελίου, αυξάνει τη μεθυλίωση του DNA, οδηγώντας σε απενεργοποίηση του γονιδίου gpt. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, ενός ενζύμου που καταλύει την αλληλομετατροπή των αμινοξέων και των κετοξέων με μεταφορά αμινομάδων. Η θέση του γονιδίου αυτού στο χρωμόσωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία υπερμεθυλίωσης, καθώς έχει βρεθεί ότι αυτή πραγματοποιείται μόνο σε κύτταρα όπου το γονίδιο αυτό βρίσκεται κοντά στην ετεροχρωματίνη. Παρόλο που οι μηχανισμοί με τους οποίους το νικέλιο επιφέρει υπερμεθυλίωση του DNA είναι ακόμα άγνωστοι, μία πιθανή εξήγηση περιλαμβάνει την ικανότητα του μετάλλου να επιφέρει περαιτέρω συμύκνωση της χρωματίνης, δίνοντας το έναυσμα για de novo μεθυλίωση του DNA (138).

Διάφορα άλλα in vivo πειράματα έχουν συνδέσει την καρκινογόνο δράση του νικελίου με την ικανότητα του να απενεργοποιεί το γονίδιο TP53, το οποίο κωδικοποιεί την σύνθεση της πρωτεΐνης p53. Η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο, λειτουργώντας ως καταστολέας όγκων, εμποδίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την εμφάνιση καρκίνου (139). Η αναγνώριση άλλων γονιδίων-καταστολέων όγκων, που απενεργοποιούνται από την υπερμεθυλίωση του DNA αποτελεί ένα συνεχώς εξελισσόμενο ερευνητικό πεδίο.

3,2,2,3 Επίδραση στις Τροποποιήσεις των Ιστονών

Έρευνες με κύτταρα ζυμομηκύτων και θηλαστικών έχουν δείξει ότι το νικέλιο μπορεί να εμποδίσει την ακετυλίωση της ιστόνης H4 (140, 141). Μάλιστα, η ακετυλίωση της Lys₁₂ και Lys₁₆ φαίνεται ότι επηρεάζεται περισσότερο από τις ακετυλιώσεις των καταλοίπων Lys₅ και Lys₈. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι ο μηχανισμός γι' αυτήν την διαδικασία πρέπει να σχετίζεται με τον σχηματισμό ενός επίπεδου τετραγωνικού συμπλόκου του νικελίου του τύπου {N_{lm},3N⁻} με το τμήμα Lys₁₆Arg₁₇His₁₈ της εν λόγω ιστόνης, όπως άλλωστε έχει διαπιστωθεί από ποτενσιομετρικές και φασματοσκοπικές μελέτες (142, 143).

Η ακετυλίωση των N-τελικών περιοχών των ιστονών, έχει αναγνωριστεί τελευταία ως τμήμα ενός μηχανισμού για την ρύθμιση της λειτουργικότητας της χρωματίνης. Διάφορα βιοχημικά στοιχεία οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια στενή σχέση μεταξύ της ακετυλίωσης και μεθυλίωσης τμημάτων των ιστονών και της γονιδιακής έκφρασης. Τέτοιες τροποποιήσεις είναι πολύ πιθανόν να ρυθμίζουν την πρόσβαση διαφόρων πρωτεϊνών στην χρωματίνη που σχετίζονται με την αντιγραφή του DNA.

3,2,2,4 Εμπλοκή του Νικελίου στην Ομοιόσταση του Ασβεστίου

Η σχέση μεταξύ καρκινογένεσης και διαταραχών στην ομοιόσταση του ασβεστίου δεν είναι σαφής. Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν ελάχιστες αναφορές που συνδέουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου με ανωμαλίες στο μεταβολισμό του ασβεστίου (144). Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου έχει αποδειχθεί ότι σηματοδοτεί αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, οι οποίες σχετίζονται με την κυτταρική ανάπτυξη, εξειδίκευση και απόπτωση (145, 146). Επομένως, δεν μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός ότι η καρκινογένεση ή τοξικότητα που προκαλείται από το νικέλιο μπορεί να συνδέεται έμμεσα με αλλαγές στην ομοιόσταση του ασβεστίου. Έτσι, χορήγηση νικελίου σε επιμύες, έχει βρεθεί ότι προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο πάγκρεας, η οποία με τη σειρά της διεγείρει την παραγωγή θρυψινογόνου, της πρόδρομης μορφής της θρυψίνης, οδηγώντας στην πρόωρη αποικοδόμηση πολλών πρωτεϊνών (147).

Επιπροσθέτως, τα ιόντα νικελίου μπορούν να μπλοκάρουν τα ιοντικά κανάλια, που είναι υπεύθυνα για την μεταφορά του ασβεστίου εντός του κυττάρου κι έτσι να απορρυθμίσουν την ομοιόσταση του (148, 149). Αυτή η μεταβολή στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου, μπορεί να συνδέεται με την παρατήρηση ότι επεξεργασμένα με νικέλιο κύτταρα πολλαπλασιάζονται ταχύτατα σε θρεπτικό μέσο με χαμηλή συγκέντρωση σε ασβέστιο (150).

3,3 Χαλκός, Κυτταρική Βλάβη και Απόπτωση

3,3,1 Ομοιόσταση Του Χαλκού

Όταν ο χαλκός βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα απ' αυτή που χρειάζεται για να καλύψει τις κυτταρικές λειτουργίες, συνεργεί στον σχηματισμό ελευθέρων ριζών που μπορούν να οξειδώσουν τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA. Γι' αυτό το λόγο, η ισορροπία μεταξύ της ενδο- και εξωκυτταρικής συγκέντρωσης χαλκού είναι ζωτικής σημασίας και διατηρείται από περίπλοκα κυτταρικά συστήματα μεταφοράς που ρυθμίζουν την εισαγωγή, απέκκριση κι ενδοκυτταρική κατανομή του μετάλλου (151). Μεταξύ των παραγόντων που απαιτούνται για την επίτευξη της ομοιόστασης, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο έχουν οι μέταλλο-ρυθμιστικές πρωτεΐνες (metallochaperones), οι οποίες δεσμεύουν αντιστρεπτά τα μεταλλικά ιόντα και τα καθοδηγούν με ασφάλεια στους κατάλληλους πρωτεϊνικούς υποδοχείς (152).

Η απορρόφηση του χαλκού από το ανθρώπινο σώμα είναι μια περίπλοκη διεργασία. Το 40% του λαμβανόμενου μέσω της τροφής χαλκού, απορροφάται στο λεπτό έντερο ενώ απορρόφηση πολύ μικρών ποσοτήτων πραγματοποιείται στο στομάχι. Η απέκκριση του μετάλλου από τα περιττώματα είναι περίπου 3mg ημερησίως για τους ενήλικες. Μικρότερες απώλειες του μετάλλου πραγματοποιούνται μέσω του ιδρώτα ή των ούρων (153).

Ο χαλκός που απορροφάται από το λεπτό έντερο μεταφέρεται στο αίμα κυρίως μέσω της αλβουμίνης του ορού (154). Η ποσότητα που μεταφέρεται στο ήπαρ, μπορεί είτε να αποθηκευθεί, εφόσον συνδεθεί με συγκεκριμένες μεταλλοθειονίνες, είτε να εκκριθεί στο πλάσμα του αίματος ή τη χολή (152). Ο τελευταίος αντιπροσωπεύει και τον κύριο τρόπο απέκκρισης του μετάλλου που συγκεντρώνεται στο ήπαρ. Η εισαγωγή του χαλκού στη χολή εξαρτάται από την παρουσία ενός ATP-εξαρτώμενου πρωτεϊνικού μεταφορέα, με τη βοήθεια του οποίου, το μέταλλο εκκρίνεται εντός του trans-Golgi δικτύου, στα κύτταρα του ήπατος.

Δεδομένου ότι η μεγαλύτερη ποσότητα χαλκού απορροφάται στο λεπτό έντερο, η έκκριση της πλεονάζουσας ποσότητας του μετάλλου, μπορεί να γίνει άμεσα με την εισαγωγή του στη χολή. Στην περίπτωση όμως που η χολική απέκκριση δεν λειτουργεί σωστά όπως στην ασθένεια Wilson, ο χαλκός συσσωρεύεται στο ήπαρ και άλλους ιστούς προκαλώντας ίνωση και κυτταρική απόπτωση. Η μειωμένη απέκκριση του μετάλλου από πρόβατα και κύνους, ευθύνεται για την τάση των ειδών αυτών να συσσωρεύουν χαλκό, χωρίς όμως αυτό να συνδέεται με τα γενετικά αίτια της νόσου (155, 156).

3,3,2 Επίπτώσεις περίσσειας χαλκού στα κύτταρα

Έκθεση κυττάρων και ιστών σε υπερβολικές ποσότητες χαλκού, μπορεί να οδηγήσει σε οξεία καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και διαρροή των εσωτερικών ενζύμων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την φθορά της ακεραιότητας κι εν τέλει την απόπτωση του κυττάρου. Η χρόνια συσσώρευση χαλκού στο ήπαρ, τον εγκέφαλο κι άλλα όργανα, όπως συμβαίνει στην ασθένεια Wilson, προκαλεί κίρρωση του ήπατος και εκφυλιστικές μεταβολές σε πολλά όργανα του ενδοκρινικού συστήματος. Τέτοιες βλάβες στο ήπαρ όπως και στην ομαλή νευρική ή ενδοκρινική λειτουργία μπορεί να οδηγήσουν στο θάνατο. Μακροσκοπικά, το συκώτι χαρακτηρίζεται από παρείσφρυση συνδετικού ιστού που επιδρά στην αλλαγή της αρχιτεκτονικής του και απώλεια παρεγχυματικών κυττάρων (157).

Το αρχικό στάδιο της ασθένειας Wilson, χαρακτηρίζεται από συσσώρευση χαλκού στα μιτοχόνδρια των κυττάρων του ήπατος, η οποία συνοδεύεται από δραματικές μορφολογικές αλλαγές (158). Καθώς η κίρρωση εξαπλώνεται, οι μιτοχονδριακές αλλαγές υποτροπιάζουν και η περίσσεια του μετάλλου διαχέεται στο κυτταρόπλασμα, όπου συνδέεται με μεταλλοθειονίνες, ενώ σε επόμενα στάδια, ο πλεονάζων χαλκός ανιχνεύεται στα λυσοσώματα (158, 159).

3,3,3 Χαλκός και Απόπτωση

Μία από τις συνέπειες αυξημένων επιπέδων χαλκού είναι η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών που μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική καταστροφή. Η υπαγωγή σε οξειδωτικό stress, μπορεί να οδηγήσει σε διακοπή των λιπιδικών διπλοστοιβάδων, λόγω οξείδωσης και διάσπασης των ευπρόσβλητων ακόρεστων λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, αλλαγές στη φυσιολογική λειτουργία διαφόρων πρωτεϊνών, λόγω οξείδωσης των θειούχων και άμινο ομάδων και ίσως σε αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, μέσω οξείδωσης των νουκλεϊκών οξέων ή αλλαγών στη δραστηριότητα διαφόρων παραγόντων ανάπτυξης (157). Η πιθανότερη όμως συνέπεια είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση. Υπάρχουν πολυάριθμες αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία που έχουν συνδέσει το οξειδωτικό stress με την προαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης (160).

Ο χαλκός έχει βρεθεί ότι προάγει την απόπτωση σε θυμοκύτταρα και κύτταρα CHO, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (500μM) (161, 162). Σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις και αυξημένο χρόνο έκθεσης (3,2μM για 28 μέρες), το μέταλλο προάγει την απόπτωση και νέκρωση στα βράγχια των ψαριών (163). Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν τα ιόντα Cu^{2+}

χορηγούνται σε συνδιασμό με άλλες χημικές ουσίες, ιδιαίτερα λιπόφιλους, αρωματικούς υποκαταστάτες όπως 1,10-όρθοφαινανθρολίνη, η απόπτωση επιταχύνεται (164-166).

Εντούτοις, η περίσσεια ιόντων χαλκού δεν προάγει αναγκαστικά την απόπτωση σε όλα τα είδη κυττάρων. Για παράδειγμα, τα ιόντα Cu^{2+} σε συγκεντρώσεις 100-300 μM , δεν μπορούν να οδηγήσουν στην απόπτωση δένδριτικών κυττάρων, παρόλο που άλλα μέταλλα όπως το νικέλιο και το κοβάλτιο μπορούν (167). Εκτός αυτού, διάφορα χηλικά σύμπλοκα του χαλκού, μπορούν να εμποδίσουν την απόπτωση που προκαλείται από άλλους παράγοντες (168). Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι όταν τα ιόντα χαλκού βρίσκονται σε περίσσεια και ανάλογα με το είδος του κυττάρου ή την τυχόν παρουσία άλλων εξογενών συμπλεκτικών παραγόντων, μπορούν να προάγουν ή να εμποδίσουν τους μηχανισμούς που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο.

3,3,4 Χαλκός, Μεταλλάξεις και Καταστροφή του DNA

Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν ελάχιστες αναφορές που να συνδέουν τον χαλκό με τη δημιουργία μεταλλάξεων ή άλλων χρωμοσωμικών μεταβολών όπως και με την ομαλή μεθυλίωση του DNA, παρόλο που είναι γνωστό ότι το μέταλλο μπορεί να επιφέρει διάσπαση του DNA, ιδιαίτερα παρουσία λιπόφιλων αρωματικών υποκαταστατών (157).

Αντίθετα, υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι διάφορα σύμπλοκα του χαλκού μπορεί να αποτρέψουν την μεταλλαξιογένεση (169, 170). Επιπροσθέτως, η μειωμένη έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων που η δράση τους εξαρτάται από το μέταλλο, έχει συνδεθεί με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης μεταλλάξεων και καταστροφής του DNA (171). Έτσι, φαίνεται ότι ο ρόλος του χαλκού είναι πιο πολύ προστατευτικός παρά συνεργιστικός στο να επιφέρει αλλοίωση του γενετικού υλικού.

4. Μοριακοί Μηχανισμοί Τοξικότητας Μεταλλικών Ιόντων

4.1 Δέσμευση σε Βιομόρια

Σε φυσιολογικές τιμές pH, η ικανότητα των ιόντων Ni^{2+} και Cu^{2+} να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες εξαρτάται από το είδος των αμινοξέων, τη σχετική θέση τους και από το κατά πόσο αυτά είναι προσιτά εντός του πρωτεϊνικού μορίου. Αποπρωτονιωμένα πεπτιδικά άτομα αζώτου μπορεί επίσης να συμπλεχθούν με αυτά. Σε συμφωνία με την υψηλότερη σχετική συγγένεια του Ni^{2+} και του Cu^{2+} για το ιμιδαζολικό άτομο αζώτου της ιστιδίνης και της σουλφυδριλικής ομάδας της κυστεΐνης, τα 2 αυτά ιόντα συνδέονται ισχυρά με αυτά τα κατάλοιπα, σε πεπτίδια και πρωτεΐνες και κυρίως με το $\text{X}_{\text{aa}}\text{-Y}_{\text{aa}}\text{-His}$ μοτίβο στο N-τελικό άκρο (X_{aa} , Y_{aa} : οποιαδήποτε αμινοξέα). Η υψηλή συγγένεια του Ni^{2+} για την His, χρησιμοποιείται εκτεταμένα για τον καθαρισμό ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών με N-τελικά έξα-ιστιδινικά άκρα, σε αгарόζη που φέρει ακινητοποιημένα ιόντα Ni^{2+} . Είναι αξιοσημείωτο ότι η οικογένεια των μεταλλοθειονινών οι οποίες είναι πλούσιες σε κατάλοιπα κυστεΐνης πρωτεΐνες, δεν αποτελούν τον πρωταρχικό υποκαταστάτη για τα ιόντα Ni^{2+} (172).

4.1.1 Ρυθμιστικές και Δομικές Πρωτεΐνες

Η ικανότητα του Ni^{2+} να αλληλεπιδρά και να δημιουργεί σύμπλοκα με έναν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή των φυσιολογικών διαμορφώσεων αυτών και να προκαλέσει αλλαγές στη λειτουργία τους.

Η πρωτεΐνη DAN δεσμεύεται στο 5' άκρο του RNA και προκαλεί διάσπαση του εν λόγω μορίου. Η πρωτεΐνη αυτή διαθέτει το μοτίβο -PHSAHPHP- στο C-τελικό άκρο, το οποίο μπορεί να δεσμεύσει νικέλιο. Δεδομένου ότι η DAN πρωτεΐνη παρουσιάζει κατασταλτική δράση ως προς τη δημιουργία όγκων, η αλληλεπίδραση της με το νικέλιο είναι δυνατόν να εμπλακεί στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και να συνεισφέρει στην δημιουργία καρκίνου (173).

Το νικέλιο μπορεί επίσης να δεσμευτεί από την πρωτεΐνη cullin-2, η οποία αποτελεί συστατικό του συμπλόκου της E3-λιγάσης, σε τρεις ή περισσότερες θέσεις και να αποτρέψει την διαδικασία ουβικιτίνωσης της πρωτεΐνης HIF-1α, προκαλώντας υποξία (174). Επιπροσθέτως, οι πρωτεΐνες Lipovitellin 2β και importin α, είναι δυνατόν να δεσμεύσουν νικέλιο και να απορρυθμίσουν την φυσιολογική έκφραση διαφόρων γονιδίων (175, 176).

Παρόμοια δέσμευση νικελίου στην πρωτεΐνη peromedin C, μπορεί να επηρεάσει την ομαλή μεταφορά χαλκού στον εγκέφαλο (177).

4,1,2 Ιστόνες και Προταμίνες

Η δέσμευση των ιόντων Ni^{2+} στο DNA, είναι ασθενής, ιδιαίτερα παρουσία των αντισταθμιστικών ιόντων Mg^{2+} και αμινοξικών υποκαταστατών (178). Γι' αυτό το λόγο οι πιο πιθανοί υποκαταστάτες για το μέταλλο, εντός της πυρηνικής και σπερματικής χρωματίνης είναι οι ιστόνες και οι προταμίνες, αντίστοιχα. Μοτίβα στα οποία μπορεί να δεσμευτεί το νικέλιο, υπάρχουν σχεδόν σε όλους τους τύπους ιστονών και στην προταμίνη P2. Η ικανότητα και ο τρόπος σύμπλεξης, των ιόντων Ni^{2+} και Cu^{2+} σε πεπτιδικά μοντέλα ιστονών και προταμινών, όπως και η ικανότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων να καταλύουν την οξείδωση του DNA συζητάται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 5.

4,2 Επαγωγή Οξειδωτικής Καταστροφής

Είναι αδιαμφισβήτητο γεγονός ότι οι ενώσεις του νικελίου μπορεί να επάγουν την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) εντός του κυττάρου (179, 180). Η οξειδωτική ικανότητα των συμπλόκων του νικελίου, εξαρτάται από την ικανότητα αυτών να σχηματίσουν το οξειδοαναγωγικό ζεύγος $Ni(III)/Ni(II)$, σε φυσιολογικές τιμές pH. Αυτό είναι εφικτό μόνον όταν τα ιόντα Ni^{2+} είναι συμπλεγμένα με συγκεκριμένους υποκαταστάτες, συμπεριλαμβανομένων πεπτιδίων και πρωτεϊνών και ιδιαίτερα αυτών που μπορεί να σχηματίσουν επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα με το μέταλλο όπως τα πεπτίδια GGH και GGGG (181). Η αντίδραση τέτοιων συμπλόκων του νικελίου με ενδογενές O_2 ή H_2O_2 μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή όχι μόνο της δραστικής ρίζας υδροξυλίου ($\cdot OH$), αλλά και άλλων οξυγονούχων, ανθρακούχων ή θειούχων ριζών, προερχόμενων από τους υποκαταστάτες.

Δραστικά ενδιάμεσα προϊόντα, είναι δυνατόν να παραχθούν και κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής διαλυτοποίησης των θειούχων αλάτων του νικελίου Ni_3S_2 και NiS , εντός του κυττάρου. Οι δύο αυτές ενώσεις οξειδώνονται εύκολα από το ενδογενές οξυγόνο, καθώς αυτή η διαδικασία διευκολύνει την διαλυτοποίηση τους εντός των βιολογικών υγρών. Η οξείδωση του Ni_3S_2 λαμβάνει χώρα σε στάδια (αντιδράσεις 1,2) και οδηγεί στην παραγωγή συμπλόκων του νικελίου με υποκαταστάτες που βρίσκονται εκ φύσεως εντός του κυττάρου, όπως αμινοξέα και πρωτεΐνες (182), :



L= αμινοξύ ή πρωτεΐνη

Σε βιολογικά υγρά, οι παραπάνω αντιδράσεις είναι πιο περίπλοκες και προάγουν την παραγωγή δραστικών ενδιάμεσων, όπως H_2O_2 και θειούχων ριζών (183, 184).

Η οξειδωτική καταστροφή λόγω σχηματισμού δραστικών ειδών οξυγόνου, αποτελεί ένα από τα πιο διαδεδομένα μοντέλα και για την εξήγηση της τοξικότητας του χαλκού (153). Τα ιόντα Cu^{2+} και Cu^+ μπορούν να λάβουν μέρος σε μια πληθώρα οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Παρουσία βιολογικών αναγωγικών παραγόντων, όπως ασκορβικού οξέος ή γλουταθειόνης, τα ιόντα Cu^{2+} , μπορούν να αναχθούν σε Cu^+ . Τα τελευταία, είναι δυνατόν να καταλύσουν τον σχηματισμό ιδιαίτερα δραστικών υδρόξυλο ριζών ($\bullet\text{OH}$), κατά την αντίδραση τους με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), μέσω της ακόλουθης αντίδρασης Fenton (185):



4,2,1 Οξείδωση Λιπιδίων

Η οξείδωση των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών και η δημιουργία λιπιδικών υπεροξειδίων που μπορεί να προκληθεί από την επίδραση των ROS σωματιδίων στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των φωσfolιπιδίων, μπορεί να οδηγήσει στην απόπτωση του κυττάρου. Τα λιπιδικά υπεροξείδια αποσυντίθεται σε διάφορα προϊόντα όπως επόξυ λιπαρά οξέα, αλκάνια, αλκένια και αλδεϋδες, τα οποία μπορεί να αντιδράσουν περαιτέρω και να προκαλέσουν βλάβη σε άλλα βιομόρια (186, 187).

Το νικέλιο και ο χαλκός, προάγουν την παραπάνω διαδικασία, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Αυξημένη οξείδωση του λιπιδικού περιεχομένου κυττάρων διαφόρων ιστών, επεξεργασμένα με νικέλιο, έχει παρατηρηθεί σε πολλές μελέτες (188-193). Οξείδωση των λιπιδικών μεμβρανών, σε περιπτώσεις περίσσειας χαλκού συμβαίνει επίσης στα μιτοχόνδρια, στην εσωτερική μεμβράνη και λυσοσώματα των κυττάρων του ήπατος (194-196).

4,2,2 Οξείδωση Πρωτεϊνών

Το νικέλιο, όπως και πολλά άλλα μέταλλα μετάπτωσης, μπορεί να προάγει την οξειδωτική μετατροπή τόσο των ελευθέρων αμινοξέων, όσο και των αμινοξικών καταλοίπων σε πρωτεϊνικά μόρια. Στην τελευταία περίπτωση, οι κύριοι στόχοι είναι οι πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων κυστεΐνης, ιστιδίνης, αργινίνης, λυσίνης και προλίνης. Οι σουλφυδριλικές

ομάδες των κυστεϊνών συνήθως οξειδώνονται σε δισουλφίδια ή σε άλλα σουλφιδικά παράγωγα ενώ το ιμιδαζόλιο της ιστιδίνης μπορεί να οξειδωθεί σε ασπαρτικό οξύ, ασπαριγίνη ή 2'-OH-His. Η αργινίνη μπορεί να μετατραπεί σε γ-γλουταμική αλδεϋδη και η λυσίνη σε 2-άμινο-αδιπική-αλδεϋδη. Τέλος, οξείδωση του καταλοίπου προλίνης μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό γλουταμικού, πυρογλουταμικού, γ-αμινοβουτυρικού οξέος ή γ-γλουταμικής αλδεϋδης (97, 98, 197).

Δεδομένου ότι η σύμπλεξη του νικελίου σε πρωτεΐνες και πεπτίδια είναι τοποεκλεκτική, αναμένεται η παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου και η επερχόμενη οξειδωτική βλάβη στα αντίστοιχα μόρια να παρουσιάζει την ίδια τοποεκλεκτικότητα. Γι' αυτό το λόγο, κατάλοιπα τα οποία δεν συμμετέχουν στον σχηματισμό συμπλόκου με το μέταλλο, αλλά παρόλα αυτά είναι ευαίσθητα σε προσβολή από τα ROS σωματίδια, όπως θρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και μεθειονίνη, δεν αποτελούν πρωταρχικό στόχο μιας καταλυόμενης από το μέταλλο οξειδωτικής τροποποίησης (198). Παρόλα αυτά είναι δυνατόν να επηρεαστούν και εν τέλει να οξειδωθούν σε άλλα προϊόντα, εφόσον βρίσκονται κοντά στην περιοχή δέσμευσης (199). Παράδειγμα τέτοιας συμπεριφοράς αποτελεί η επαγόμενη από το νικέλιο, οξείδωση του δεκαπενταπεπτιδίου HP2₁₋₁₅ με πρωτοταγή δομή, RTHGQSHYRRRHCSR-NH₂, το οποίο είναι μοντέλο του N-τελικού άκρου της ανθρώπινης προταμίνης. Όταν το μέταλλο συμπλέκεται με το ανωτέρω πεπτίδιο, σχηματίζει ένα επίπεδο τετραγωνικό σύμπλοκο του τύπου {N_{Im},3N⁻} με το τμήμα -RTH-, το οποίο παρουσία H₂O₂ καταλύει την οξείδωση όχι μόνο της Arg₁ και His₃, αλλά και της Tyr₈. Ο λόγος είναι ότι το συμπλεγμένο πεπτίδιο υιοθετεί μία διαμόρφωση στην οποία η Tyr₈ έρχεται κοντά στο μέταλλο (199-201).

Η οξειδοαναγωγική ικανότητα διαφόρων συμπλόκων νικελίου είναι συνυφασμένη με τον τρόπο ένταξης του μετάλλου. Για παράδειγμα το νικέλιο σχηματίζει με το πεπτιδικό μοντέλο -TESHHK- του C-τελικού άκρου της ιστόνης H2A, ένα οκταεδρικό σύμπλοκο σε φυσιολογικές τιμές pH, το οποίο δεν παρουσιάζει καμμία οξειδωτική δράση (202, 203). Παρόλα αυτά η επερχόμενη υδρόλυση του δεσμού E-S, οδηγεί στο σχηματισμό του πεπτιδίου -SHHK-, το οποίο δεσμεύει ισχυρά νικέλιο σε ένα επίπεδο τετραγωνικό σύμπλοκο μέσω του μοτίβου -SHH-, το οποίο είναι οξειδοαναγωγικά ενεργό σε φυσιολογικό pH (204). Το σύμπλοκο αυτό είναι δυνατόν να προκαλέσει οξείδωση των καταλοίπων Ser και His του -TESHHK- και ταυτόχρονη οξείδωση του DNA εφόσον αυτό προστεθεί στο μίγμα αντίδρασης (202, 205, 206).

4,2,3 Οξειδωτική Καταστροφή του DNA

Η δέσμευση του νικελίου και του χαλκού, όπως και άλλων μετάλλων μετάπτωσης, στις πρωτεΐνες της χρωματίνης και ιδιαίτερα στις ιστόνες, μπορεί να καταλύσει την παραγωγή ROS σωματιδίων, τα οποία με τη σειρά τους μπορεί να προκαλέσουν οξειδωτική καταστροφή σε όλα τα συστατικά της χρωματίνης, συμπεριλαμβανομένου του DNA. Γενικά, η οξείδωση του DNA έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δεσμών σταυροσύνδεσης διαφόρων ειδών, διάσπαση της διπλής έλικας, αποπουρίνωση και τροποποιήσεις των βάσεων (98, 207-209).

Το πιο συνηθισμένο αποτέλεσμα του νικελίου και άλλων τοξικών μετάλλων στη χρωματίνη, είναι η σταυροσύνδεση πρωτεΐνης-DNA (98, 207-210). Γενικά, τα μεταλλικά ιόντα μπορεί να προκαλέσουν τη δημιουργία τέτοιων δεσμών με δύο τρόπους: (i) με το σχηματισμό μικτών συμπλόκων μετάλλου-πρωτεΐνης-DNA, (ii) υποβοηθώντας στη δημιουργία ισχυρών ομοιοπολικών δεσμών απευθείας μεταξύ DNA και πρωτεΐνης. Στην περίπτωση του νικελίου έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη σταυροδεσμών και των δύο τύπων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (211-213).

Η παρουσία τέτοιων σταυροδεσμών στη χρωματίνη, μπορεί να οδηγήσει σε μορφολογικές διαταραχές των χρωμοσωμάτων, όπως έχει παρατηρηθεί στα λεμφοκύτταρα εργατών εκτεθειμένων σε ενώσεις νικελίου (214).

Τα δραστικά είδη οξυγόνου μπορεί να προκαλέσουν και διάσπαση του μορίου του DNA. Διασπάσεις του μονόκλωνου DNA έχουν παρατηρηθεί στα νεφρά και πνεύμονες ποντικών έπειτα από χορήγηση χλωριούχου νικελίου (215), σε *in vitro* μελέτες με επεξεργασμένα με νικέλιο λεμφοκύτταρα (216), όπως και σε απομονωμένο DNA, παρουσία υδατοδιαλυτού νικελίου και H_2O_2 (209, 210). Σε πολλές μελέτες, διασπάσεις τόσο του μονόκλωνου όσο και δίκλωνου DNA φάνηκε να παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης, παρουσία πεπτιδίων που σχηματίζουν επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα με το νικέλιο (200, 201, 217). Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι η διάσπαση του DNA από το νικέλιο είναι τοποεκλεκτική, με τα κατάλοιπα κυτοσίνης, θυμίνης και γουανίνης να αποτελούν τις πιο ευπρόσβλητες βάσεις (218).

Πολλές τροποποιημένες βάσεις του DNA έχουν βρεθεί σε απομονωμένη χρωματίνη, εκτεθειμένη σε H_2O_2 και άλατα όχι μόνο νικελίου, αλλά και άλλων μετάλλων μετάπτωσης, όπως κοβαλτίου, χαλκού και σιδήρου. Η πιο συνήθης τροποποιημένη βάση είναι η 8-όξο-δέοξυγουανωσίνη. Διάφορα πειράματα έχουν δείξει ότι παρουσία ενδογενούς οξυγόνου, το νικέλιο μπορεί να καταλύσει τη δημιουργία τροποποιήσεων στις βάσεις του DNA στην

χρωματίνη, όχι όμως και σε απομονωμένο DNA, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι πρωτεΐνες της χρωματίνης και πιο συγκεκριμένα οι ιστόνες μπορεί να ενισχύσουν την οξειδοαναγωγική δράση του μετάλλου (219). Η επίδραση των δραστικών ειδών οξυγόνου στο DNA, μπορεί να πραγματοποιηθεί και έμμεσα, προκαλώντας τροποποιήσεις στις βάσεις των τριφωσφονουκλεοτιδίων, τα οποία με τη σειρά τους μπορεί να ενσωματωθούν στο DNA ή RNA κατά τη σύνθεση τους, οδηγώντας τελικά σε μεταλλάξεις (220).

Το νικέλιο, όπως κι άλλα μέταλλα μετάπτωσης, μπορεί να προκαλέσει και αποπουρινώσεις στο μόριο του DNA. Κατά την αποπουρίνωση, κάποια από τις πουρίνες (αδερίνη, θυμίνη) αντικαθίσταται από μία υδροξυλομάδα. Το νικέλιο, έχει βρεθεί ότι μπορεί να προκαλέσει την *in vitro* υδρόλυση της 2'-δεοξυγουανωσίνης στο μόριο του DNA, οδηγώντας σε αποπουρινώσεις (221, 222). Συνήθως, αποπουρινώσεις παρατηρούνται ταυτόχρονα με διάσπαση του μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA, ενώ και τα δύο είδη τροποποιήσεων μπορεί να επέλθουν από την επίδραση των δραστικών ειδών οξυγόνου στα σάκχαρα του DNA. Τροποποιημένα σάκχαρα έχουν βρεθεί στο DNA κυττάρων, επεξεργασμένων με διάφορα μέταλλα (221, 222).

4,2,4 Επίδραση στο Ασκορβικό οξύ, Γλουταθειόνη κι άλλα Αντιοξειδωτικά

Η οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από το νικέλιο, μπορεί να επιδεινωθεί από την ταυτόχρονη μείωση διαφόρων αντιοξειδωτικών ουσιών, που υπάρχουν φυσιολογικά εντός του κυττάρου όπως της γλουταθειόνης και του ασκορβικού οξέος, ή από την παρεμπόδιση δράσης διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων, παρουσία του μετάλλου.

Η συγγένεια του ασκορβικού οξέος για το νικέλιο είναι σχετικά χαμηλή (223). Παρόλα αυτά το νικέλιο μπορεί να μειώσει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση αυτού, είτε καταλύοντας την οξείδωση του (224, 225), είτε παρεμποδίζοντας την λειτουργία των ενζύμων SVCT1 και SVCT2, που είναι υπεύθυνα για την μεταφορά του ασκορβικού οξέος εντός του κυττάρου (226). Η μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης σε ασκορβικό οξύ, οδηγεί στην αναστολή δράσης διαφόρων κυτταρικών υδροξυλασών. Αυτό το γεγονός μπορεί να οδηγήσει σε υποξική αντίδραση, φθορά μιας πληθώρας πρωτεϊνών που έχουν δομικές περιοχές, παρόμοιες με αυτές του κολλαγόνου (περιέχουν δηλαδή κατάλοιπα υδροξυπρολίνης στην αλληλουχία τους) και στην αδρανοποίηση διαφόρων επισκευαστικών ως προς το DNA ενζύμων, όπου το ασκορβικό οξύ δρα ως συμπαράγοντας (225, 227).

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένας άλλος ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας που απαντά φυσιολογικά σε υψηλή συγκέντρωση εντός του κυττάρου. Δομικά, η GSH είναι ένα

τριπεπτίδιο, που αποτελείται από γλουταμικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη, και στο οποίο είναι παρών ένας ασυνήθιστος πεπτιδικός δεσμός μεταξύ της γ-καρβοξυλικής ομάδας του γλουταμικού καταλοίπου και της αμινομάδας της κυστεΐνης. Η GSH αντιδρά γρήγορα και απενεργοποιεί τις ελεύθερες ρίζες προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο, ενώ ταυτόχρονα η ρίζα που παράγεται GSH $\cdot$ αντιδρά πολύ γρήγορα με μία άλλη, σχηματίζοντας την οξειδωμένη μορφή GSSH, μέσω της δημιουργίας ενός δισουλφιδικού δεσμού. Η ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης, μπορεί να σχηματίσει διάφορα σύμπλοκα με το νικέλιο και κατ' αυτόν τον τρόπο να μειωθεί η συγκέντρωση της εντός του κυττάρου, συμβάλλοντας έμμεσα στην οξειδωτική καταστροφή αυτού (228-230).

Το νικέλιο μπορεί επίσης να επηρεάσει τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων που συμμετέχουν στο αμυντικό σύστημα του κυττάρου από τις ελεύθερες ρίζες. Σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, σε *in vitro* πειράματα, έχει βρεθεί ότι το μέταλλο μπορεί να παρεμποδίσει τη δράση της σουπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) (231), και της καταλάσης (CAT) (232). Η αναστολή της δράσης των παραπάνω ενζύμων μπορεί να αυξήσει την έκταση της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται από σύμπλοκα του μετάλλου. Δεδομένου ότι ο χαλκός αποτελεί δομική μονάδα βασικών αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η σουπεροξειδική δισμουτάση (Cu-SOD) και η σερουλοπλασμίνη, είναι λογικό να αναμένεται αύξηση της οξειδωτικής βλάβης και σε περιπτώσεις ανεπάρκειας του μετάλλου. Μειωμένες συγκεντρώσεις Cu-SOD κι αυξημένη οξειδωτική καταστροφή έχει παρατηρηθεί σε ερυθροκύτταρα ποντικών και κοτόπουλων που στερούνταν το μέταλλο από τη διαίτά τους (233, 234).

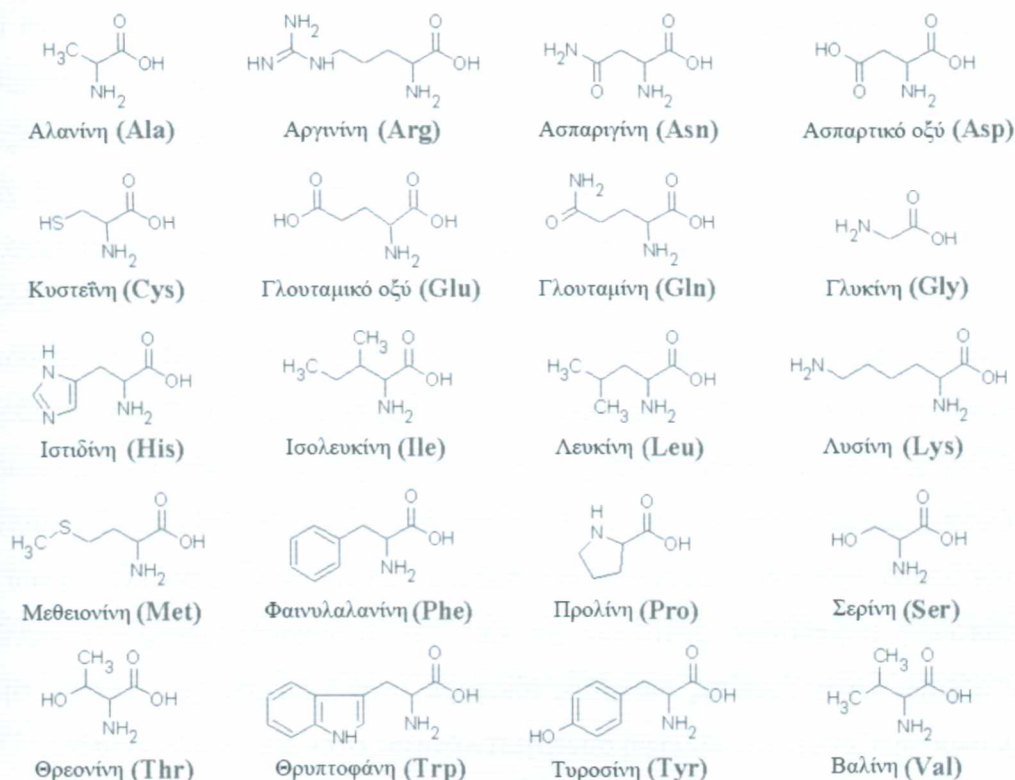
Τέλος, το νικέλιο μπορεί να διεγείρει την παραγωγή μυελοπεροξειδάσης από τα λεμφοκύτταρα κατά την αλλεργική δερματίτιδα που προκαλείται από την επαφή με το μέταλλο. Η μυελοπεροξειδάση είναι ένα ένζυμο που παράγεται από τα λευκά αιμοσφαίρια και συγκεκριμένα από τα ουδετερόφιλα και το οποίο καταλύει την παραγωγή υποχλωριώδους οξέος από H₂O₂ και Cl⁻ και τυροσινικής ρίζας από τυροσίνη. Ενώ τα δύο αυτά προϊόντα χρησιμοποιούνται φυσιολογικά από τα λευκοκύτταρα για την θανάτωση βακτηρίων κι άλλων παθογόνων, η αυξημένη παραγωγή τους κατά την αλλεργική δερματίτιδα μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη οξειδωτική καταστροφή του ίδιου του κυττάρου (235).

5. Σύμπλοκα ιόντων Ni^{2+} και Cu^{2+} με πεπτίδια-Πεπτιδικά μοντέλα ιστονών

5.1 Εισαγωγή

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. Η αλληλεπίδραση πεπτιδίων με Ni^{2+} και Cu^{2+} έχει μελετηθεί εκτενώς και τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα εμφανίζουν διάφορες γεωμετρίες και διαμορφώσεις (236). Τα δύο αυτά ιόντα συμπλέκονται ισχυρά με το πεπτιδικό μοτίβο Asp-Ala-His στο N-τελικό άκρο της αλβουμίνης του ορού του αίματος και μεταφέρονται κατ' αυτόν τον τρόπο στο ανθρώπινο σώμα (237-240).

Γενικά, ο τρόπος σύμπλεξης 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 σύμπλεξη, 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 συνδιασμούς των αμινοξέων που απεικονίζονται στο Σχήμα 17, αυτός ο



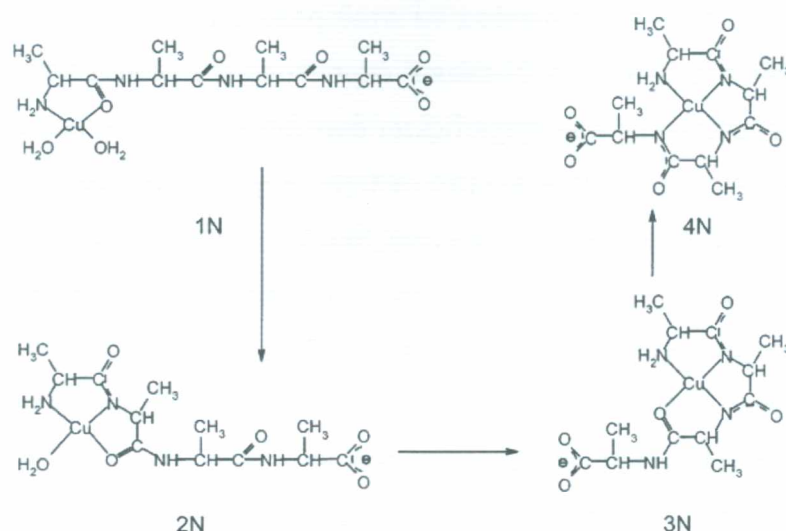
Σχήμα 17. Δομές φυσικών αμινοξέων

πρωταρχικός υποκαταστάτης μπορεί να είναι το άτομο αζώτου της N-τελικής αμινομάδας, το ιμιδαζολικό άζωτο ενός καταλοίπου ιστιδίνης ή το άτομο θείου μιας κυστεΐνης (241). Η τάση με την οποία διάφορα μεταλλικά ιόντα μπορούν να προκαλέσουν αποπρωτονίωση του αμιδικού αζώτου συνήθως είναι Pd^{2+} (2) > Cu^{2+} (4) > Ni^{2+} (8) > Co^{2+} (10) (Σε παρένθεση αναγράφεται μία ενδεικτική τιμή pK_a , με την οποία πραγματοποιείται η αποπρωτονίωση για μικρά πεπτίδια) (242).

5,2 Πεπτίδια που περιέχουν πλευρικές αλυσίδες με άτομα που δεν είναι δότες ηλεκτρονίων

Τα πεπτίδια που αποτελούνται από αμινοξέα με μη συμπλεκόμενες πλευρικές αλυσίδες όπως Gly ή Ala, περιέχουν άτομα αζώτου που προέρχονται από την N-τελική αμινομάδα και τον αμιδικό δεσμό, καρβονυλικά και καρβοξυλικά άτομα οξυγόνου, που μπορούν να δράσουν ως δότες ηλεκτρονίων και να συμπλεχθούν με μέταλλα. Απουσία His ή Cys, η πρωταρχική θέση δέσμευσης γι' αυτά είναι συνήθως το άτομο αζώτου στο N-τελικό άκρο που προέρχεται από την πρωτοταγή αμινομάδα (δευτεροταγή, όταν το N-τελικό αμινοξύ είναι προλίνη). Το άτομο οξυγόνου της C-τελικής καρβοξυλομάδας, όπως και τα καρβονυλικά άτομα οξυγόνου, είναι πιθανοί δότες και για τα δύο μέταλλα, παρόλο που συνήθως συμπλέκονται ασθενέστερα από τα άτομα αζώτου (242, 243).

Στην περίπτωση ενός απλού ολιγοπεπτιδίου, η σύμπλεξη με τα ιόντα Cu^{2+} ξεκινά από το άτομο αζώτου της αμινομάδας του N-τελικού άκρου οδηγώντας στο σχηματισμό τετραγωνικών 1N συμπλόκων (Σχήμα 18). Το γειτονικό καρβονυλικό άτομο οξυγόνου αποτελεί το δεύτερο δότη συμπληρώνοντας το σχηματισμό ενός πενταμελούς χηλικού δακτυλίου, ενώ οι υπόλοιπες θέσεις ένταξης καταλαμβάνονται από μόρια νερού (236, 242). Με την αύξηση του pH, τόσο τα ιόντα Cu^{2+} όσο και τα ιόντα Ni^{2+} προκαλούν αποπρωτονίωση διαδοχικών αμιδικών ατόμων αζώτου, σχηματίζοντας M - N⁻ δεσμούς. Το τελικό σύμπλοκο που σχηματίζεται σε τιμές pH 9-10, περιέχει 4 άτομα αζώτου συμπλεγμένα στο μεταλλικό ιόν. Ο σχηματισμός σταθερών πενταμελών χηλικών δακτυλίων από διαδοχικά άτομα αζώτου, αποτελεί τον κινητήριο μοχλό της διαδικασίας σύμπλεξης, δεδομένου ότι αυξάνει την βασικότητα του πρώτου αμιδικού αζώτου, διευκολύνοντας την ένταξή του (242). Στην περίπτωση συμπλόκων πεπτιδίων με Cu^{2+} , οι διαδοχικές αποπρωτονιώσεις των αμιδικών αζώτων είναι συνήθως διακριτές (διαφορά στην τιμή pK_a μεγαλύτερη της μιας μονάδας), υποστηρίζοντας την έλλειψη συνεργιστικότητας στην διαδικασία ένταξης.



Σχήμα 18. Τρόπος ένταξης των ιόντων Cu^{2+} σε τετραπεπτίδιο που δεν περιέχει πλευρικές αλυσίδες με άτομα δότες ηλεκτρονίων (Ala-Ala-Ala-Ala- NH_2)

Η ένταξη των ιόντων Ni^{2+} σε απλά τετραπεπτίδια ξεκινά κατά τον ίδιο τρόπο από την ελεύθερη αμινομάδα, το σύμπλοκο όμως που σχηματίζεται (1N) είναι οκταεδρικό. Η αποπρωτονίωση, ωστόσο, του γειτονικού αμιδικού αζώτου, λαμβάνει χώρα σε υψηλότερες τιμές pH σε σχέση με τα αντίστοιχα σύμπλοκα του Cu^{2+} και ο ιονισμός των δύο περαιτέρω αμιδικών αζώτων, λαμβάνει χώρα συνεργιστικά. Ως εκ τούτου, η διαδικασία ένταξης συνοδεύεται από την μετατροπή ενός οκταεδρικού συμπλόκου σε επίπεδο τετραγωνικό, κάτι το οποίο καθιστά την μετάβαση από 1N σε 4N σύμπλοκο σχετικά αργή (243).

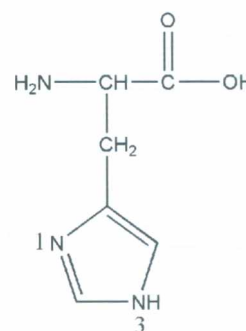
5,3 Πεπτίδια που περιέχουν πλευρικές αλυσίδες με άτομα - δότες ηλεκτρονίων

Εκτός από τα άτομα δότες του πεπτιδικού σκελετού, τα πεπτίδια μπορεί να περιέχουν αμινοξέα με πλευρικές αλυσίδες που περιέχουν άτομα δότες ηλεκτρονίων. Τα πιο σημαντικά εξ' αυτών είναι τα ιμιδαζολικά άτομα αζώτου της ιστιδίνης, το άτομο θείου της κυστεΐνης και ως κάποιο βαθμό η β-καρβοξυλική ομάδα του ασπαρτικού οξέος. Άλλα άτομα-δότες των πλευρικών αλυσίδων, όπως τα άτομα οξυγόνου της σερίνης, τα φαινολικά οξυγόνα της τυροσίνης, τα άτομα θείου της μεθειονίνης και τα άτομα αζώτου των αμινομάδων των λυσινών είναι μικρότερης σημασίας όσον αφορά την σύμπλεξή τους με το μέταλλο (Σχήμα 15) (244).

Η β-καρβοξυλική ομάδα του ασπαρτικού οξέος δεν αποτελεί πρωταρχικό υποκαταστάτη για τα ιόντα Ni^{2+} και Cu^{2+} , μπορεί ωστόσο να σταθεροποιήσει τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα, ειδικά όταν είναι παρούσα στο N-τελικό άκρο του πεπτιδίου (245). Στην τελευταία περίπτωση, το 1N σύμπλοκο που σχηματίζεται από τη σύνδεση του μετάλλου με το άζωτο της N-τελικής αμινομάδας σταθεροποιείται αισθητά, λόγω του σχηματισμού ενός σταθερού εξαμελούς δακτυλίου, απόρροια της σύνδεσης του νικελίου με το άτομο οξυγόνου της β-καρβοξυλικής ομάδας. Η γ-καρβοξυλική ομάδα του γλουταμικού οξέος, έχει πολύ μικρότερη επίδραση στην ικανότητα δέσμευσης του μετάλλου (241).

5,4 Σύμπλοκα με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη

Το ιμιδαζόλιο της ιστιδίνης αποτελεί μία από τις πιο αποτελεσματικές συμπλεκτικές ομάδες για τα ιόντα Ni^{2+} και Cu^{2+} , δεδομένου ότι προσφέρει δύο άτομα αζώτου ως δότες ηλεκτρονίων και την δυνατότητα σχηματισμού ενός σταθερού εξαμελούς χηλικού δακτυλίου. Η υψηλότερη θερμοδυναμική σταθερότητα των πενταμελών και εξαμελών δακτυλίων, σε σχέση με μεγαλύτερους, καθιστά το N(1) του ιμιδαζολικού δακτυλίου πρωταρχικό υποκαταστάτη, έναντι του N(3)



Σχήμα 19. Κατάλοιπο ιστιδίνης

(Σχήμα 19). Παρόλο που η σύμπλεξη μετάλλικων ιόντων με πεπτιδικούς υποκαταστάτες συνήθως ξεκινά μέσω του ατόμου αζώτου της N-τελικής αμινομάδας, η παρουσία ενός καταλοίπου ιστιδίνης στην πεπτιδική αλληλουχία μπορεί να οδηγήσει στην έναρξη της σύμπλεξης μέσω του ιμιδαζολικού ατόμου αζώτου. Ο ανταγωνισμός μεταξύ των 2 ανωτέρω ατόμων για τα ιόντα Ni^{2+} εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την θέση της ιστιδίνης στην πρωτοταγή δομή του πεπτιδίου (246, 247).

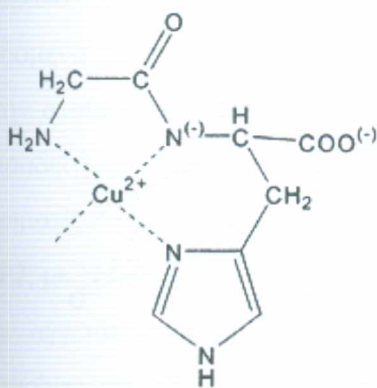
5,4,1 Πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στο N-τελικό άκρο

Απλά πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στο N-τελικό άκρο συμπλέκονται με το νικέλιο με διαφορετικό τρόπο σε σχέση με άλλα πεπτίδια. Ο χηλικός δακτύλιος τύπου ισταμίνης $\{NH_2, N_{Im}\}$ που σχηματίζεται είναι τόσο σταθερός και υπερτερεί έναντι του σχηματισμού δεσμού του Ni^{2+} με τα αμιδικά άτομα αζώτου, ώστε τα μόνα σύμπλοκα που σχηματίζονται να έχουν ψευδοοκταεδρική γεωμετρία (248-252).

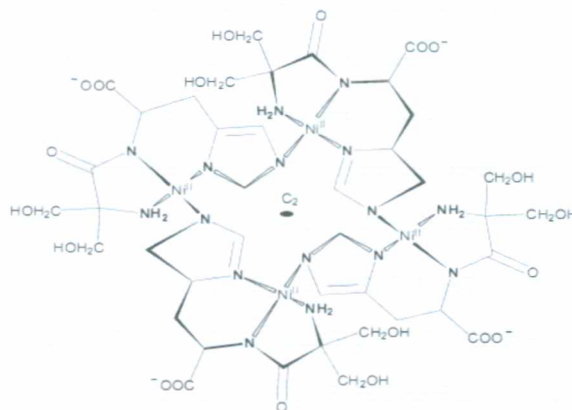
Όσον αφορά την σύμπλεξη με τα ιόντα Cu^{2+} , η παρουσία της His₁, εμποδίζει την αποπρωτονίωση του αμιδικού αζώτου, με αποτέλεσμα αυτή να πραγματοποιείται σε τιμές pH πάνω από 6, σε μικρά διπεπτίδια και τριπεπτίδια σε σχέση με την αποπρωτονίωση δι- και τριγλυκινών που λαμβάνει χώρα σε pH περίπου 5. Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται είναι 2N μέσω σχηματισμού χηλικού δακτυλίου τύπου ισταμίνης, ενώ έχουν ανιχνευτεί και άλλα μονομερή και διμερή σύμπλοκα που περιέχουν δεσμούς του ιόντος με αποπρωτονιωμένα πεπτιδικά άζωτα (249-253).

5,4,2 Πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στη θέση 2 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Η παρουσία μιας ιστιδίνης στη θέση 2 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας οδηγεί στην ταυτόχρονη σύμπλεξη του μετάλλου με την N-τελική αμινομάδα, το ιμιδαζολικό και αμιδικό άτομο αζώτου της ιστιδίνης (241). Το διπεπτίδιο Gly-His αποτελεί το απλούστερο παράδειγμα πεπτιδίων αυτής της κατηγορίας.



Σχήμα 20. Δομή του CuH_1L συμπλόκου, L = Gly-His



Σχήμα 21. Τετραμερές σύμπλοκο του τύπου $Ni_4H_8L_4$

Διάφορες μελέτες με απλά διπεπτίδια και τριπεπτίδια, έχουν δείξει ότι το κύριο σχηματιζόμενο σύμπλοκο με Cu^{2+} έχει στοιχειομετρία CuH_1L , σχηματίζεται σε πολύ χαμηλές τιμές pH (~ 4) και αποτελεί το κυρίαρχο είδος μέχρι pH 10 (Σχήμα 20) (254-256). Η υψηλή σταθερότητα των εν λόγω συμπλόκων, οφείλεται στη δημιουργία δύο σταθερών χηλικών δακτυλίων, ενός πενταμελούς $\{NH_2, N^-\}$ κι ενός εξαμελούς $\{N_{Im}, N^-\}$. Κατ' αυτόν τον τρόπο πληρώνονται οι 3 από τις 4 ισημερινές θέσεις ένταξης, γύρω από το ιόν Cu^{2+} . Η τέταρτη θέση μπορεί να καταληφθεί από ένα δεύτερο μόριο Gly-His, ή από κάποιον άλλον υποκαταστάτη. Σε υψηλές τιμές pH, η πλήρωση της τέταρτης ισημερινής θέσης μπορεί να επέλθει από τη σύμπλεξη του μετάλλου με το αποπρωτονιωμένο N(3) άζωτο μιας ιστιδίνης,

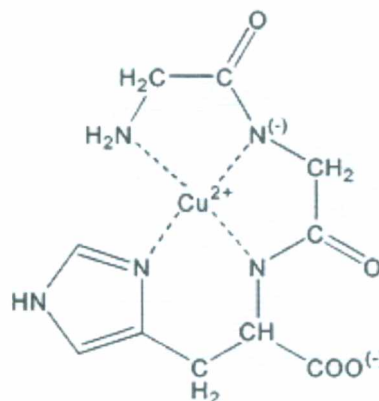
οδηγώντας στο σχηματισμό ενός τετραμερούς του τύπου $Cu_4H_8L_4$ ή $Ni_4H_8L_4$, όπου τα μεταλλικά ιόντα γεφυρώνονται μέσω ιμιδαζολικών δακτυλίων (Σχήμα 21) (255, 257).

Παρόμοια συμπεριφορά έχει διαπιστωθεί και για το σύμπλοκο του Cu^{2+} με το τριπεπτίδιο Gly-His-Lys (258-260). Το πεπτίδιο αυτό είναι ένας αυξητικός παράγοντας και η φυσιολογική του δράση απαιτεί σύμπλεξη με Cu^{2+} (261). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την υψηλή εκλεκτικότητα και βιολογική σημασία της τριδοντικής ένταξης του Cu^{2+} με το X_{aa} -His πεπτιδικό τμήμα (X_{aa} οποιοδήποτε αμινοξύ).

Η μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των ιόντων Ni^{2+} και Cu^{2+} έγκειται στην μικρότερη ικανότητα του νικελίου να προκαλεί αποπρωτονίωση του αμιδικού αζώτου. Ως εκ τούτου, το ανάλογο σύμπλοκο NiH_1L (3N), σχηματίζεται σε υψηλότερες τιμές pH (~6-7) και παρουσιάζει ψευδοοκταεδρική γεωμετρία (243).

5,4,3 Πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στη θέση 3 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Η σύμπλεξη του ιμιδαζολικού ατόμου αζώτου της ιστιδίνης με τα ιόντα Ni^{2+} και Cu^{2+} είναι περισσότερο αποτελεσματική όταν αυτή βρίσκεται στη θέση 3 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Αυτή η θέση επιτρέπει τον ταυτόχρονο σχηματισμό 3 χηλικών δακτυλίων (2 πενταμελών κι ενός εξαμελούς) και κορεσμό όλων των διαθέσιμων θέσεων δέσμευσης του επίπεδου τετραγωνικού ιόντος (Σχήμα 22).



Σχήμα 22. Δομή του 4N συμπλόκου του Cu^{2+} με το τριπεπτίδιο Gly-Gly-His

Η συμπλοκοποίηση των ιόντων Cu^{2+} , με το απλούστερο πεπτίδιο της κατηγορίας αυτής, το τριπεπτίδιο Gly-Gly-His, χαρακτηρίζεται από την συνεργιστική αποπρωτονίωση των 2 αμιδικών ατόμων αζώτου σε τιμές pH 4-5 (262-264). Τα διαθέσιμα ποτενσιομετρικά δεδομένα, δείχνουν ότι το ανωτέρω τριπεπτίδιο είναι 10 φορές περίπου πιο αποτελεσματικό στο να δεσμεύει τα ιόντα Cu^{2+} , σε σχέση με το διπεπτίδιο Gly-His και 200 φορές σε σύγκριση με το πενταπεπτίδιο -NSFRY-, ενός από τους ισχυρότερους υποκαταστάτες, μεταξύ των πεπτιδίων που δεν περιέχουν ιστιδίνη (249, 262, 265).

Το 4N σύμπλοκο που σχηματίζεται με το Ni^{2+} , μοιάζει κατά πολύ με τα ανάλογο σύμπλοκο με χαλκό και η αποπρωτονίωση των 2 αμιδικών πρωτονίων λαμβάνει χώρα επίσης συνεργιστικά. Η μοναδική διαφορά έγκειται στην δυνατότητα ανίχνευσης συμπλόκων

ενδιάμεσων στοιχειομετριών, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στην περίπτωση ένταξης του τριπεπτιδίου με χαλκό. Ο πιθανός λόγος γι' αυτήν την διαφορετική συμπεριφορά έγκειται στις διαφορετικές κινητικές ιδιότητες των 2 συμπλόκων. Πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα με χαλκό είναι ευκίνητα και οι διαδοχικές συμπλέξεις ταχύτατες. Αντίθετα, ο σχηματισμός ενός επίπεδου τετραγωνικού συμπλόκου, από ένα οκταεδρικό πρόδρομο σύμπλοκο, απαιτεί την επαναδιευθέτηση του ηλεκτρονιακού περιβάλλοντος γύρω από το νικέλιο, γεγονός το οποίο καθιστά την διεργασία αυτή αργή (266). Κατ' αυτόν τον τρόπο δίνεται το χρονικό περιθώριο που απαιτείται για την συσσώρευση ανιχνεύσιμων ποσοτήτων οκταεδρικών συμπλόκων του νικελίου.

Ο τρόπος σύμπλεξης της πεπτιδικής αλληλουχίας τύπου αλβουμίνης, $X_{aa}^{(1)}-Y_{aa}^{(2)}-His^{(3)}$ (X_{aa} , Y_{aa} : οποιαδήποτε αμινοξέα), με ιόντα Ni^{2+} και Cu^{2+} έχει επιβεβαιωθεί από την επίλυση των κρυσταλλικών δομών αναλόγων συμπλόκων με υποκαταστάτες όπως το Gly-Gly-His-N-μεθυλαμίδιο(267) και η Gly-Gly-α-ύδροξυ-D, L-ισταμίνη (268).

Παρόλο που τα μικρά πεπτίδια δεν αποτελούν άκρως αξιόπιστα μοντέλα, τα διαθέσιμα δεδομένα επιτρέπουν την αξιολόγηση της επίδρασης της διπεπτιδικής αλληλουχίας $X_{aa}-Y_{aa}$ στην σταθερότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων με το $X_{aa}-Y_{aa}-His$ N-τελικό άκρο. Δύο παραδείγματα σχέσης δευτεροταγούς δομής-σταθερότητας, αποτελούν τα σύμπλοκα που σχηματίζονται από πεπτιδικά μοντέλα της αγγειοτενσίνης I και της ανθρώπινης προταμίνης HP2, με Ni^{2+} .

Το αγγειοτενσινογόνο είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη η οποία απαντά στο αίμα σε συγκέντρωση 15nM. Η μείωση της αρτηριακής πίεσης προκαλεί απελευθέρωση ρενίνης από τα νεφρά, η οποία αποκόπτει το N-τελικό δεκαπεπτίδιο, γνωστό ως αγγειοτενσίνη I, από το ανενεργό αγγειοτενσινογόνο. Με τη βοήθεια του μετατρεπτικού ενζύμου η αγγειοτενσίνη I μετατρέπεται σε αγγειοτενσίνη II η οποία επιδρά στα νεφρά, στο αγγειακό σύστημα και στα επινεφρίδια, προκαλώντας με διάφορους μηχανισμούς την αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Η πρωτεΐνη που απομένει από την δράση της ρενίνης στο αγγειοτενσινογόνο, εμφανίζει την N-τελική αλληλουχία τύπου αλβουμίνης Val-Ile-His-Asn-.

Τα ποτενσιομετρικά δεδομένα έχουν δείξει ότι το σύμπλοκο του νικελίου με το παραπάνω πεπτιδικό τμήμα είναι τουλάχιστον 2 φορές περισσότερο σταθερό από το αντίστοιχο σύμπλοκο με το τριπεπτίδιο Gly-Gly-His. Η δομή του σχηματιζόμενου συμπλόκου, όπως προκύπτει από πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό ενός υδρόφοβου «φράχτη», που σχηματίζεται από τη διευθέτηση των υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Val και Ile ακριβώς πάνω από το ένα

επίπεδο του συμπλόκου. Αυτή η διαμόρφωση προστατεύει την μία πλευρά του συμπλόκου από το διάλυμα. Η σταθερότητα του σχηματιζόμενου συμπλόκου εξαρτάται από την ταχύτητα με την οποία λαμβάνει χώρα η διάσπαση του, η οποία στην προκειμένη περίπτωση απαιτεί την προσβολή του συμπλεγμένου αμιδικού αζώτου από πρωτόνια ή μόρια νερού του διαλύματος. Έτσι, η προστασία της μιας πλευράς του συμπλόκου από τις υδρόφοβες αλυσίδες, παρεμποδίζει την διάσπαση και αυξάνει την σταθερότητα του (269).

Η ασυνήθιστα υψηλή συμπλεκτική ικανότητα των πεπτιδίων τύπου αλβουμίνης, μπορεί να είναι σημαντική και στην σύμπλεξη μεγαλύτερων πεπτιδικών τμημάτων με το νικέλιο. Η ανθρώπινη προταμίνη HP2 είναι μια μικρή, πλούσια σε κατάλοιπα αργινίνης πυρηνική πρωτεΐνη, η οποία αντικαθιστά τις ιστόνες κατά τα τελικά στάδια της σπερματογένεσης και είναι απαραίτητη για την συμύκνωση και σταθεροποίηση του DNA. Η HP2 παρουσιάζει στο N-τελικό άκρο την αλληλουχία τύπου αλβουμίνης Arg-Thr-His-, η οποία συμπλέκεται με το νικέλιο πολύ πιο αποτελεσματικά, σε σχέση με απλά πεπτίδια τύπου αλβουμίνης. Πειράματα NMR έχουν δείξει ότι η σύμπλεξη του νικελίου με το N-τελικό τριπεπτιδικό τμήμα, προσδίδει μια πολύ ειδική διαμόρφωση σε ολόκληρη την N-τελική ουρά της πρωτεΐνης, η οποία περιλαμβάνει το σχηματισμό μιας διπλής θηλιάς και την διευθέτηση του τυροσυλικού δακτυλίου (Tyr_8) ακριβώς κάτω από το επίπεδο του σχηματιζόμενου συμπλόκου. Η υιοθέτηση της νέας διαμόρφωσης, εκτός του ότι αυξάνει τη σταθερότητα του σχηματιζόμενου συμπλόκου, μπορεί να επιδρά αρνητικά στην διατήρηση μιας πιθανής φυσιολογικής δράσης του N-τελικού τμήματος (201).

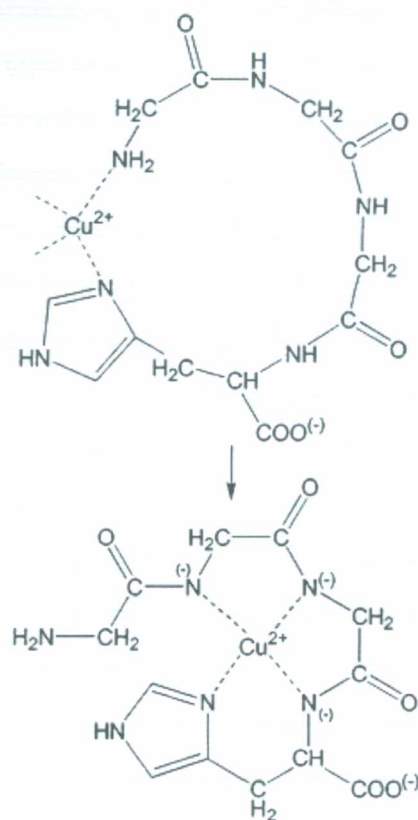
5,4,4 Πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στη θέση 4 της πολυπεπτιδικής αλυσίδας

Όταν η ιστιδίνη βρίσκεται στη θέση 4 ή και πιο μακριά από το N-τελικό άκρο, υπάρχουν το λιγότερο 5 άτομα αζώτου που μπορούν να δράσουν ως δότες ηλεκτρονίων (το άζωτο της N-τελικής αμινομάδας, του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης και 3 ή περισσότερα αμιδικά άτομα αζώτου). Έτσι είναι δυνατόν να σχηματιστούν περισσότερα από ένα είδη συμπλόκων. Πάντως, η συμπλεκτική ικανότητα είναι συνήθως μικρότερη σε σχέση με τα πεπτιδικά τμήματα τύπου αλβουμίνης (243).

Η αλληλεπίδραση των τετραπεπτιδίων Gly-Gly-Gly-His, Ala-Gly-Gly-His και αναλόγων τους με Cu^{2+} , δείχνει ότι το ιμιδαζολικό άτομο αζώτου της ιστιδίνης, δρα ως πρωταρχικός υποκαταστάτης. Ωστόσο, το αμέσως επόμενο σχηματιζόμενο σύμπλοκο, περιέχει έναν δεκαπενταμελή μακροχηλικό δακτύλιο, λόγω της ένταξης και του αζώτου της N-τελικής αμινομάδας (Σχήμα 23). Σε υψηλότερες τιμές pH, το μέταλλο αποπρωτονώνει διαδοχικά αμιδικά άτομα αζώτου, σχηματίζοντας 3N $\{N_{Im}, 2N_{am}\}$ και 4N $\{N_{Im}, 3N_{am}\}$ σύμπλοκα, όπου το άζωτο της N-τελικής αμινομάδας παραμένει ελεύθερο (270). Παρόμοια συμπεριφορά, δηλαδή επιλεκτική πρωταρχική δέσμευση στην ιστιδίνη, σχηματισμό ενός ενδιάμεσου μακροκυκλικού δακτυλίου και τελικό σχηματισμό ενός επίπεδου

τετραγωνικού συμπλόκου, χωρίς τη συμμετοχή της N-τελικής αμινομάδας, βρέθηκε και για την αλληλεπίδραση του τετραπεπτιδίου Ala-Gly-Gly-His με ιόντα Ni^{2+} (247).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η αγγειοτενσίνη II (AT2), είναι μια μικρή ανθρώπινη ορμόνη που εμπλέκεται στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Όπως προκύπτει από την πρωτοταγή δομή της, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, η AT2 διαθέτει ένα κατάλοιπο ιστιδίνης το οποίο διαχωρίζεται από τη N-τελική αμινομάδα από 4 αμινοξικά κατάλοιπα. Το κύριο σύμπλοκο που σχηματίζεται κατά την αλληλεπίδραση της AT2 με Cu^{2+} σε φυσιολογικές τιμές pH, είναι του τύπου $\{N_{Im}, 2N_{am}\}$ και αναφέρεται στη σύμπλεξη του ιόντος με το ιμιδαζολικό και αμιδικά άζωτα των καταλοίπων ιστιδίνης και ισολευκίνης. Το γεγονός ότι το 4N σύμπλοκο δεν σχηματίζεται, οφείλεται στην ογκώδη πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου τυροσίνης. Μάλιστα, σε βασικές τιμές pH, τα ιόντα Cu^{2+} μεταφέρονται στο N-τελικό άκρο και το 4N σύμπλοκο με το τμήμα Asp-Arg-Val-Tyr-, αποτελεί το κυρίαρχο είδος (271). Το παραπάνω αποτελεί ένα εξαιρετικό παράδειγμα για το πως μια μη συμπλεκόμενη πλευρική αλυσίδα μπορεί να συναινέσει σε μια πλήρη μεταβολή στον τρόπο σύμπλεξης.



Σχήμα 23. Μετάβαση από 2N σε 4N σύμπλοκο του τετραπεπτιδίου Gly-Gly-Gly-His με Cu^{2+}

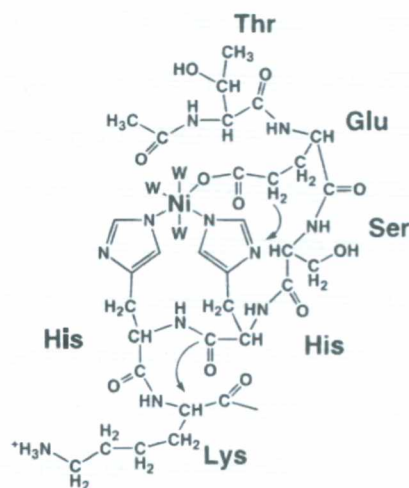
5,5 Αλληλεπίδραση Ni^{2+} και Cu^{2+} με πεπτιδικά μοντέλα ιστονών

Πεπτιδικές αλληλουχίες ιστονών που περιέχουν ένα ή περισσότερα κατάλοιπα ιστιδίνης είναι πιθανοί υποκαταστάτες για μεταλλικά ιόντα. Η συνδετική ιστόνη H1 δεν περιέχει κατάλοιπα ιστιδίνης ή κυστεΐνης, συνεπώς το ενδιαφέρον ως προς τις πιθανές θέσεις δέσμησης ιόντων Ni^{2+} και Cu^{2+} εστιάζεται στις πυρηνικές ιστόνες. Η κρυσταλλική δομή του ιστονικού οκταμερούς, αποκαλύπτει ότι τα κατάλοιπα ιστιδίνης που είναι παρόντα σε όλους τους τύπους των ιστονών όπως και τα κατάλοιπα κυστεΐνης (παρόντα μόνο στην ιστόνη H3), είναι απομονωμένα στο χώρο. Έτσι λοιπόν, με εξαίρεση τα μοτίβα –ESHH- και –CAIH-, που αντιστοιχούν στα κατάλοιπα 121-124 της ιστόνης H2A και 110-113 της ιστόνης H3 αντίστοιχα, οι υπόλοιπες πιθανές θέσεις δέσμησης μεταλλικών ιόντων εντός του οκταμερούς, θα παρέχονται από μικρά πεπτιδικά τμήματα, που περιέχουν ιστιδίνη ως μοναδικό πρωταρχικό υποκαταστάτη.

Η ιστόνη H2A περιέχει το μοτίβο - ESHH- και δύο απομονωμένα κατάλοιπα ιστιδίνης (His_{31} , His_{82}). Γενικά, η παρουσία πολλών καταλοίπων ιστιδίνης στην πεπτιδική αλληλουχία, επηρεάζει σημαντικά τον τρόπο ένταξης και το είδος των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Εντούτοις, η υψηλότερη σταθερότητα των συμπλόκων του μετάλλου με πεπτιδικές αλληλουχίες τύπου αλβουμίνης, καθιστά το ιμιδαζολικό άτομο της His_3 πρωταρχικό υποκαταστάτη, ακόμα και παρουσία περισσότερων καταλοίπων ιστιδίνης.

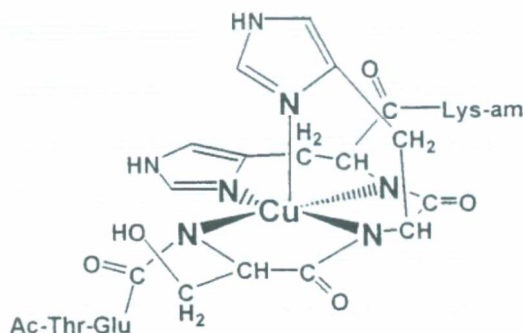
Ποτενσιομετρικές και φασματοσκοπικές μελέτες των σχηματιζόμενων συμπλόκων των

ιόντων Ni^{2+} με το πεπτιδικό μοντέλο $CH_3CO-Thr-Glu-Ser-His-His-Lys-NH_2$, αποκάλυψαν το σχηματισμό ενός ψευδο-οκταεδρικού συμπλόκου του τύπου $NiHL$, σε ασθενώς όξινα και ουδέτερα διαλύματα (Σχήμα 24). Το νικέλιο συνδέεται με τα ιμιδαζολικά άτομα αζώτου των 2 καταλοίπων ιστιδίνης και με το καρβοξυλικό άτομο οξυγόνου της πλευρικής αλυσίδας του γλουταμικού οξέος. Οι υπόλοιπες 3 θέσεις ένταξης καταλαμβάνονται από ίσο αριθμό μορίων νερού (203).



Σχήμα 24. Δομή σχηματιζόμενου συμπλόκου Ni^{2+} με το μοτίβο –ESHH–

Η σύμπλεξη του ανωτέρω πεπτιδικού τμήματος με Cu^{2+} , οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπλόκου του τύπου $CuHL$ σε pH γύρω στο 5, όπου ο χαλκός εντάσσεται με πανομοιότυπο ως προς τα ιόντα νικελίου τρόπο. Ωστόσο, το κυρίαρχο σύμπλοκο σε φυσιολογικές τιμές pH, (CuH_1L) χαρακτηρίζεται από παραμορφωμένη τετραγωνική γεωμετρία όπου οι ισημερινές θέσεις ένταξης καταλαμβάνονται από το ιμιδαζολικό και



Σχήμα 25. Δομή του CuH_2L συμπλόκου, $L = \text{Ac-TESHHK-NH}_2$

αμιδικά άζωτα των καταλοίπων Ser_3 και His_4 , ενώ το ιμιδαζολικό άζωτο της His_5 σε αξονική θέση, συμπληρώνει τη σφαίρα ένταξης του ιόντος. Περαιτέρω αύξηση του pH, επιφέρει σύμπλεξη και του αποπρωτονιωμένου αμιδικού αζώτου της His_5 με ταυτόχρονη διατήρηση της αξονικής υποκατάστασης, οδηγώντας στο σχηματισμό του πενταϋποκατεστημένου CuH_2L συμπλόκου (Σχήμα 25). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το σύμπλοκο CuH_1L μπορεί να αντιδράσει με H_2O_2 , και να οξειδώσει αποτελεσματικά την 2'-δεοξυγουανωσίνη, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει το σχηματισμό Cu^{3+} και μιας δραστικής μεταλλοϋποκατεστημένης υδροξύλο ρίζας ($Cu^{III}H_1L \cdot OH$) (205).

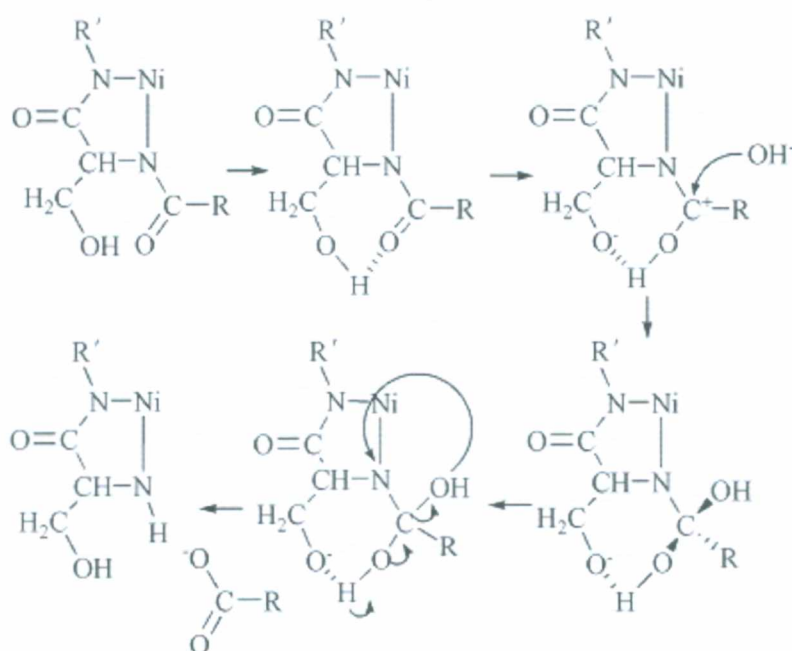
Αντίθετα, το σύμπλοκο $NiHL$, δεν καταλύει την οξείδωση της 2'-δεοξυγουανωσίνης, μπορεί όμως να προκαλέσει την εκλεκτική υδρόλυση του E-S πεπτιδικού δεσμού με ταυτόχρονο σχηματισμό του επίπεδου τετραγωνικού συμπλόκου με το μοτίβο S-H-H-K. Το τελευταίο σύμπλοκο παρουσιάζει αυξημένη οξειδοαναγωγική ισχύ, παρουσία H_2O_2 και ο τρόπος ένταξης είναι όμοιος με σύμπλοκα πεπτιδίων τύπου αλβουμίνης (202, 203, 206).

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του Ni^{2+} με τα ανάλογα εξαπεπτίδια -TASHHK-, -TEAHHK-, -TESAHK- και -TESHAK-, στα οποία ένα κατάλοιπο Ala, αντικαθιστά στην πραγματική πεπτιδική αλληλουχία ένα εκ των Glu_2 , Ser_3 , His_4 ή His_5 καταλοίπων, οδηγεί στον προτεινόμενο μηχανισμό της υδρόλυσης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 26 (206). Τα σύμπλοκα του Ni^{2+} με τα ανάλογα -TEAHHK- και -TESHAK- δεν παρουσιάζουν υδρολυτική διάσπαση σε αντίθεση με τα ανάλογα -TASHHK- και -TESAHK-, γεγονός που υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο των καταλοίπων Ser_3 και His_5 στην ανωτέρω διαδικασία (206). Ο προτεινόμενος μηχανισμός περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της υδροξυλικής ομάδας της Ser και του καρβονυλικού οξυγόνου των καταλοίπων Glu ή Ala. Η παρουσία της His_5 θεωρείται απαραίτητη για την δημιουργία του πεπτιδικού

τμήματος τύπου αλβουμίνης που προσδίδει σταθερότητα στο προϊόν υδρόλυσης. Πρόσθετη σταθερότητα του Ni^{2+} -SHHK προϊόντος, προέρχεται από την παρουσία του ελεύθερου ιμιδαζολικού δακτυλίου της His₄ πάνω από το επίπεδο σύμπλεξης (272).

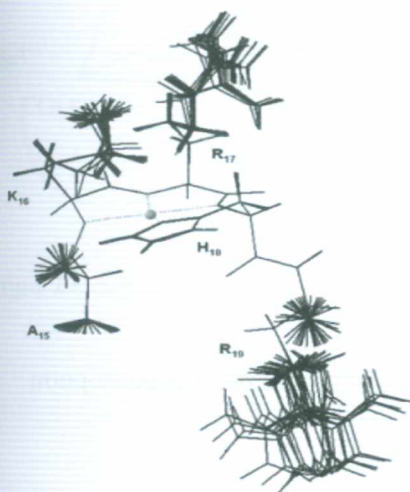
Πάντως, η παρουσία του δεύτερου καταλοίπου ιστιδίνης δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την υδρολυτική διάσπαση πεπτιδίων. Μία εκτενής μελέτη αποκάλυψε ότι αλληλουχίες του τύπου Xaa-Ser-His και Xaa-Thr-His (Xaa : οποιοδήποτε αμινοξύ), είναι ιδιαίτερα επιδεκτικές σε υδρόλυση, όταν συμπλέκονται με Cu^{2+} σε αλκαλικό pH. Η παρουσία του καταλοίπου Ser ή Thr είναι απαραίτητη για την δημιουργία του ενδιαμέσου συμπλόκου ενώ το σχηματιζόμενο προϊόν υδρόλυσης χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα (273).

Παρόμοια υδρολυτική διάσπαση του δεσμού Tyr-Thr παρατηρήθηκε και για το 4N σύμπλοκο του νικελίου με το πεπτίδιο Ac-TYTEHA-NH₂, που μιμείται το πιθανό μοτίβο δέσμευσης μεταλλοϊόντων στο C-τελικό άκρο της ιστόνης H4 (274). Η υδρόλυση του εν λόγω συμπλόκου υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο ενός καταλοίπου Thr και σε αλληλουχίες του τύπου X_{aa}-Thr-Y_{aa}-His, όσον αφορά μια πιθανή μηχανιστική οδό.



Σχήμα 26. Πιθανός μηχανισμός υδρόλυσης των συμπλόκων του εξαπεπτιδίου TESHHK και αναλόγων του με Ni^{2+} . Χάριν απλότητας απεικονίζεται μόνο το τμήμα του μορίου που συμμετέχει στην αντίδραση. R = Ac-Thr-Glu- ή Ac-Thr-Ala- και R = -His-HisLys-am ή -Ala-His-Lys-am.

Η N-τελική ουρά της ιστόνης H4 που περιέχει την αλληλουχία –Ala₁₅-Lys₁₆-Arg₁₇-His₁₈-, έχει προταθεί ως πιθανός στόχος υποκατάστασης για το νικέλιο, μέσω της His₁₈, κυρίως λόγω της ανασταλτικής δράσης που παρουσιάζει το μέταλλο ως προς την ακετυλίωση των κοντινών καταλοίπων λυσίνης (K₁₆ και K₁₂) (140, 141). Επιπροσθέτως, η σχετική θέση της His₁₈ στην κρυσταλλική δομή του νουκλεοσώματος την καθιστά προσβάσιμη για σύμπλεξη (9). Όταν η N-τελική αμινομάδα είναι προστατευμένη, το ιμιδαζολικό άζωτο της His₁₈ είναι ο μοναδικός πρωταρχικός υποκαταστάτης και τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα είναι σχετικά σταθερά. Η μελέτη πεπτιδικών μοντέλων διαφόρων μεγεθών μέσω ποτενσιομετρικών και φασματοσκοπικών μεθόδων, υποστηρίζει το σχηματισμό ενός επίπεδου τετραγωνικού συμπλόκου του νικελίου σε pH>8. Ο σχηματισμός 2 σταθερών πενταμελών δακτυλίων λόγω



Σχήμα 27. Δομές των 20 ενεργειακά χαμηλότερων δομών του συμπλόκου –AKRH- με Ni^{2+}

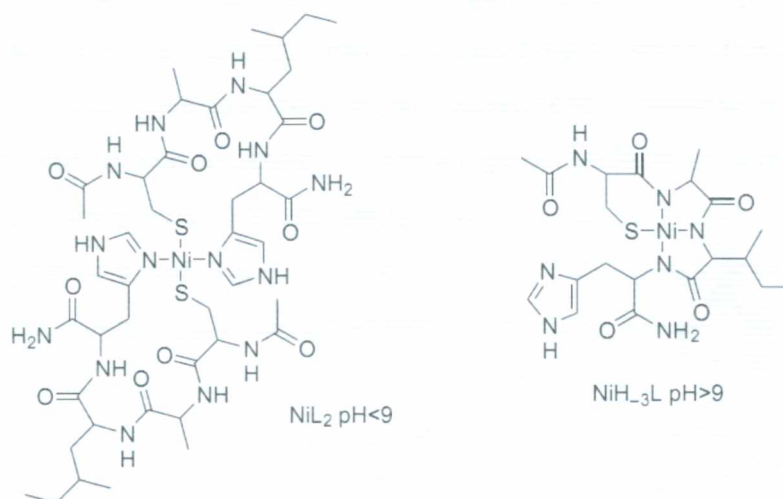
της σύμπλεξης των διαδοχικών αμιδικών αζώτων της Lys₁₆ και Arg₁₇ είναι ο κινητήριος μοχλός της διαδικασίας σύμπλεξης (Σχήμα 27) (142, 143, 275, 276).

Η μελέτη της δομής του εν λόγω συμπλόκου με NMR, δείχνει μια δομική ανασυγκρότηση, η οποία χαρακτηρίζεται από το μπλοκάρισμα της πλευρικής αλυσίδας της Lys₁₆, πάνω από το επίπεδο του συμπλόκου (Σχήμα 27) (143). Τέτοιες δομικές αλλαγές μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικές όσον αφορά την διαδικασία αναγνώρισης και ακετυλίωσης της Lys₁₆ από την κατάλληλη ακετυλοτρανσφεράση. Παρόλο που το σύμπλοκο

αυτό σχηματίζεται σε μη φυσιολογικές τιμές pH, είναι δυνατόν ο σχηματισμός του επίπεδου τετραγωνικού συμπλόκου να ευνοείται παρουσία ολόκληρης της πρωτεΐνης, λόγω παρουσίας πολλαπλών μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων που μπορούν να αυξήσουν την ικανότητα σύμπλεξης μεταλλικών ιόντων (143).

Το γεγονός ότι το εξαπεπτίδιο AKRHRK, ενισχύει την οξειδωτική καταστροφή του DNA σε σχέση με αυτήν που παρατηρείται παρουσία μόνο ιόντων Cu^{2+} , υποδηλώνει ότι η N-τελική ουρά της ιστόνης H4, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο και στην τοξικότητα ή/και καρκινογένεση που προκαλείται από τα ιόντα Cu^{2+} , μέσω ενός μηχανισμού επιβολής αυξημένου οξειδωτικού stress (277).

Πιο αποτελεσματική σύμπλεξη του ιόντος Ni^{2+} συμβαίνει με το πεπτιδικό τμήμα –Cys-Ala-Ile-His-, της ιστόνης H3. Η παρουσία δύο ισχυρών ομάδων που μπορούν να προσφέρουν ηλεκτρόνια (Cys και His), οδηγεί στο σχηματισμό ενός επίπεδου συμπλόκου σε φυσιολογικές τιμές pH, με τη συμμετοχή τόσο του ατόμου θείου της κυστεΐνης, όσο και του ιμιδαζολικού αζώτου της ιστοιδίνης. Οι προτεινόμενες δομές των σχηματιζόμενων συμπλόκων σε διαφορετικές τιμές pH, απεικονίζονται στο Σχήμα 28 (278).

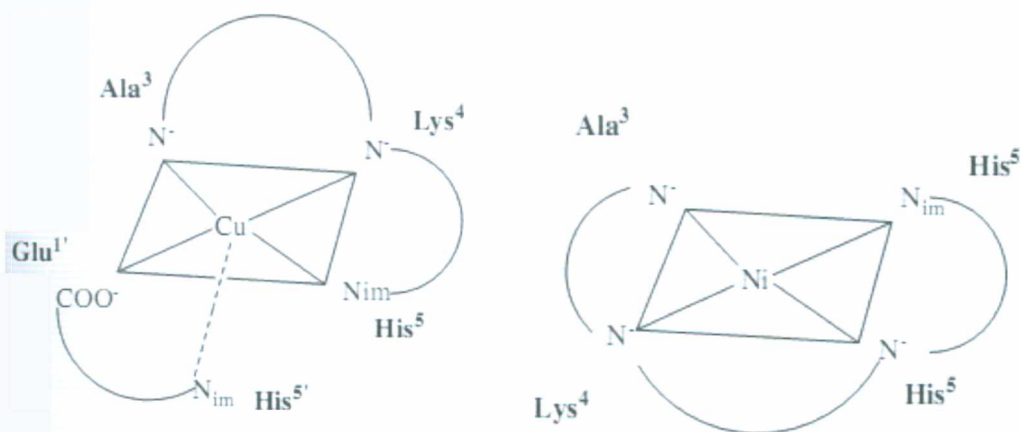


Σχήμα 28. Προτεινόμενες δομές συμπλόκων που σχηματίζονται από την αλληλεπίδραση Ni^{2+} με το πεπτιδικό μοντέλο –CAIH–

Το πεπτιδικό τμήμα –CAIH– βρίσκεται πολύ κοντά στον C2 άξονα συμμετρίας του οκταμερούς και η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων θείου από δύο διαφορετικές H3 ιστόνες είναι τόσο μικρή ώστε να μπορούν εύκολα να σχηματίσουν μια δισουλφιδική γέφυρα (9). Το παραπάνω γεγονός ενισχύει την πιθανότητα σύμπλεξης του μετάλλου με δύο άτομα θείου και εντός του νουκλεοσώματος. Σύμπλοκα με δομές όπως αυτές του Σχήματος 28 έχει βρεθεί ότι σχηματίζονται και κατά την αλληλεπίδραση του τετραμερούς $(H3-H4)_4$ με Ni^{2+} in vitro και διευκολύνουν την οξείδωση της 2'-δεοξυγουανωσίνης, παρουσία H_2O_2 (279, 280).

Η ιστόνη H2B, περιέχει 3 κατάλοιπα ιστοιδίνης τα οποία μπορεί να δράσουν ως δότες ηλεκτρονίων. Από τις πιθανές θέσεις δέσμησης Ni^{2+} και Cu^{2+} , η αλληλουχία –ELAKHA–, έχει θεωρηθεί ως πιθανότερη για σύμπλεξη, λόγω της ευκαμψίας των C-τελικών ουρών των ιστονών, που τις καθιστούν προσβάσιμες από μεταλλικά ιόντα. Η αλληλεπίδραση του εξαπεπτιδίου με Ni^{2+} , αρχίζει με τον σχηματισμό ενός παραμορφωμένου οκταεδρικού συμπλόκου μέσω υποκατάστασης του ιμιδαζολικού αζώτου της ιστοιδίνης σε όξινες και

φυσιολογικές τιμές pH, ενώ σε $pH > 8$, σχηματίζεται το επίπεδο τετραγωνικό 4N σύμπλοκο. Η αλληλεπίδραση με ιόντα Cu^{2+} , χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό συμπλόκων με στοιχειομετρία CuL_2 σε φυσιολογικές τιμές pH, όπου η σφαίρα ένταξης του μεταλλικού ιόντος καλύπτεται από το ιμιδαζολικό άζωτο της ιστιδίνης, 2 αποπρωτονιωμένα πεπτιδικά άζωτα και πιθανόν από την γ-καρβοξυλική ομάδα του Glu, ενώ το ιμιδαζόλιο του δεύτερου πεπτιδίου καταλαμβάνει αξονική θέση (Σχήμα 29) (281).



Σχήμα 29. Δομές συμπλόκων του εξαπεπτιδίου –ELAKHA-, με χαλκό και νικέλιο

6. Σκοπός της Διατριβής

Η τοξικότητα και/ή καρκινογένεση που προκαλούν μεταλλικά ιόντα, όπως το Ni^{2+} και ο Cu^{2+} , μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην αλληλεπίδραση τους με τα συστατικά της χρωματίνης και πιο συγκεκριμένα τις ιστόνες. Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που συνηγορούν στο γεγονός ότι το νικέλιο μπορεί να εμπλακεί στις χημικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα φυσιολογικά στις ιστόνες και κατ' αυτόν τον τρόπο να απορρυθμίσει την διαχείριση της γενετικής πληροφορίας (140, 143, 282). Επιπροσθέτως, η δημιουργία συμπλόκων του μετάλλου με τμήματα ιστονών που παρουσιάζουν αυξημένη οξειδοαναγωγική ικανότητα, μπορεί να προκαλέσει αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου που δρουν απευθείας πάνω στο DNA (279, 280).

Ο χαλκός, δεδομένου ότι παρουσιάζει πιο πλούσια οξειδοαναγωγική χημεία από το νικέλιο, μπορεί να οδηγήσει άμεσα σε αυξημένη παραγωγή τέτοιων επιβλαβών προϊόντων, όταν βρίσκεται σε περίσσεια εντός του οργανισμού. Πάντως, όταν συμπλέκεται με ιστόνες ή προταμίνες μπορεί είτε να καταλύσει την δημιουργία τέτοιων ειδών (277), υποβοηθώντας την καταστροφή του DNA, είτε να δράσει προστατευτικά και να μειώσει την έκταση της οξειδωτικής βλάβης (217).

Προκειμένου να εξετάσουμε τις παραπάνω υποθέσεις, αλλά και να διερευνήσουμε το ρόλο της ιστόνης H2B στους μηχανισμούς τοξικότητας και καρκινογένεσης που προκαλείται από μεταλλικά ιόντα, συνθέσαμε τα ακόλουθα πεπτιδικά μοντέλα και μελετήσαμε την αλληλεπίδραση τους με ιόντα νικελίου και χαλκού.

πεπτίδιο 1 (H2B_{32-62}) : SRKQSYSVYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIM

πεπτίδιο 2 (H2B_{94-125}) : IQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK

Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν πολλές μελέτες αλληλεπίδρασης πεπτιδικών μοντέλων των ιστονών H3, H4 και H2A, με Ni^{2+} και Cu^{2+} (Κεφάλαιο 4). Αντίθετα, η ιστόνη H2B, δεν έχει μελετηθεί όσο θα περίμενε κάποιος, παρόλο που πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το νικέλιο μπορεί να επιδράσει όχι μόνο στις χημικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε αυτή αλλά και να προκαλέσει οξείδωση σε διάφορα αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης (282, 283).

Το πεπτίδιο 1, περιλαμβάνει την πρωτεϊνική αλληλουχία 32-62 της ιστόνης H2B και αντιστοιχεί σε πεπτιδικό μοντέλο της ιστονικής πύχωσης, δεδομένου ότι περιέχει τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής $\alpha 1$ και L1, όπως κι ένα κομμάτι της $\alpha 2$ έλικας. Η παρουσία ενός

καταλοίπου ιστιδίνης (H_{48}), αποτελεί το αναμενόμενο σημείο σύμπλεξης για μεταλλικά ιόντα, όπως Ni^{2+} και Cu^{2+} . Το συγκεκριμένο κατάλοιπο περιλαμβάνεται στη θηλιά L1 και ως εκ τούτου βρίσκεται κοντά στο σημείο σύνδεσης του DNA. Το γεγονός αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η σύμπλεξη σε αυτό το σημείο μπορεί να έχει ένα διττό αποτέλεσμα: (i) την άμεση οξειδωτική καταστροφή του DNA, (ii) την αποδυνάμωση της σύνδεσης του οκταμερούς με το DNA. Η κρυσταλλική δομή του νουκλεοσώματος, υποδηλώνει ότι η H_{48} δεν είναι τόσο προσβάσιμη για σύμπλεξη. Ωστόσο, αυτό μπορεί να είναι δευτερεύουσας σημασίας, αν αναλογιστεί κάποιος τον δυναμικό χαρακτήρα του νουκλεοσώματος και τους τρόπους με τους οποίους αυτός εκδηλώνεται (τοπική έκθεση και ολίσθηση).

Το πεπτίδιο 2 αποτελεί πεπτιδικό μοντέλο της C-τελικής ουράς της ιστόνης H2B. Περιλαμβάνει την πεπτιδική αλληλουχία –ELAKHA-, η οποία προσφέρει ένα κατάλοιπο ιστιδίνης, μέσω του οποίου μπορεί να αρχίσει η σύμπλεξη και την λυσίνη K120, η οποία υπόκειται σε ουβικιτίνωση. Η ευκαμψία της C-τελικής ουράς, καθιστά το εν λόγω πεπτιδικό τμήμα ως έναν από τους πιθανότερους υποκαταστάτες, εντός της ιστόνης H2B, για σύμπλεξη με μεταλλικά ιόντα.

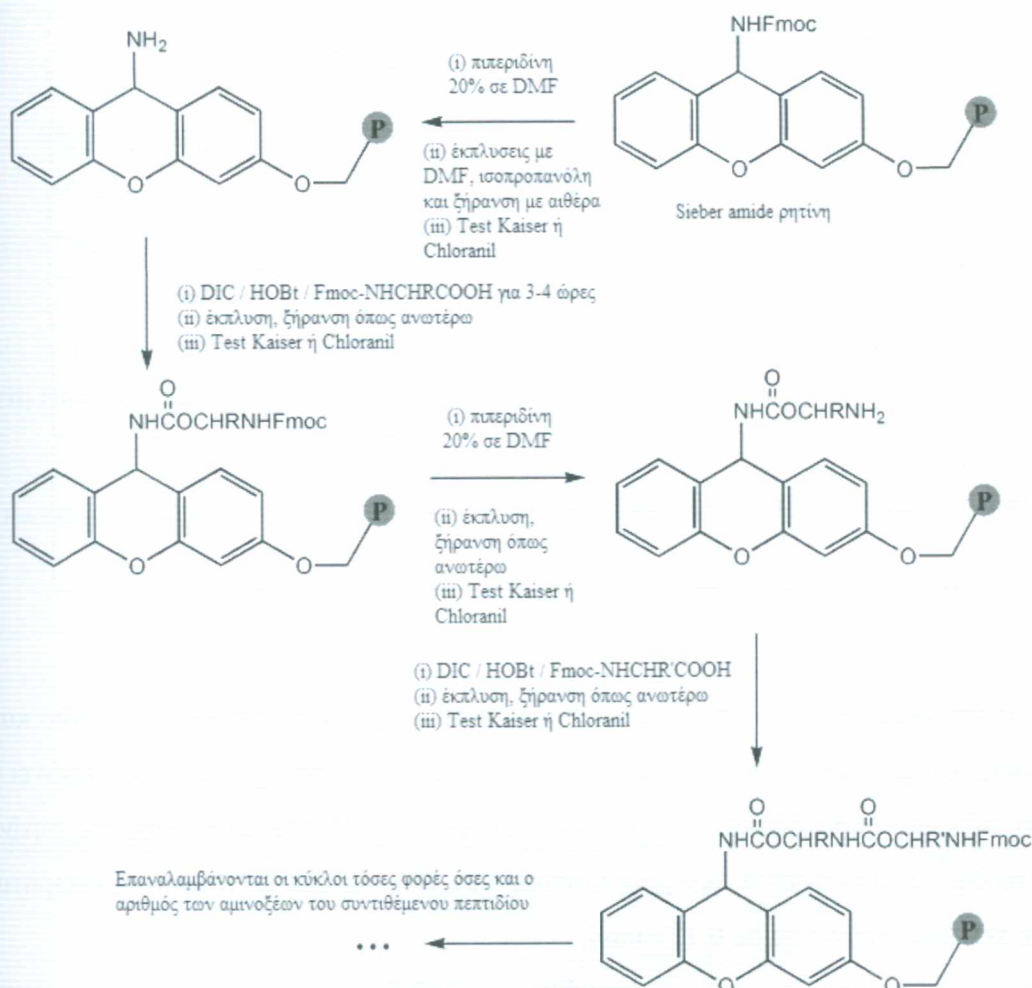
Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των παραπάνω πεπτιδικών τμημάτων, με νικέλιο και χαλκό, είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η εξακρίβωση του είδους και της δομής των σχηματιζόμενων συμπλόκων, η υδρολυτική συμπεριφορά τους, όπως και η ικανότητα τους να καταλύουν την οξείδωση του DNA, αναμένεται να συνεισφέρουν στην κατανόηση των μηχανισμών τοξικότητας και καρκινογένεσης που προκαλείται από μεταλλικά ιόντα.

Πειραματικό Μέρος

7. Σύνθεση, Καθαρισμός και Ταυτοποίηση Πεπτιδικών Προϊόντων

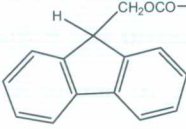
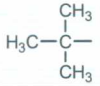
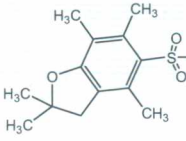
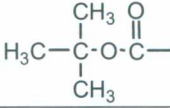
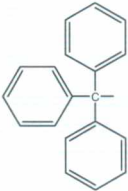
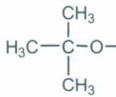
7,1 Πεπτιδική Σύνθεση με την Fmoc / ^tBu μεθοδολογία

Η σύνθεση των πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε με την Fmoc / 'Bu μεθοδολογία (Σχήμα 30) (284). Αυτή βασίζεται στη χρήση της 9-φλουορένυλομεθυλοξυκαρβονύλο (Fmoc) ομάδας για την προσωρινή προστασία της α-αμινο ομάδας, σε συνδυασμό με προστατευτικές ομάδες για τις πλευρικές αλυσίδες οι οποίες δεν επηρεάζονται κατά την απομάκρυνση της Fmoc. Οι προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν για τις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων όπως Ser, Thr, Lys, Arg, Tyr, His, Glu, Asp, Gln και Asn δίνονται στον Πίνακα 2 και αποσπώνται υπό όξινες συνθήκες στο τέλος της σύνθεσης, παράλληλα με το “κόψιμο” του πεπτιδίου από τη ρητίνη. Αντίθετα, οι ομάδες αυτές είναι σταθερές στις βασικές συνθήκες που απαιτούνται για την απομάκρυνση της F-moc ομάδας.



Σχήμα 30. Στρατηγική της Fmoc / tBu μεθοδολογίας που χρησιμοποιήσαμε.

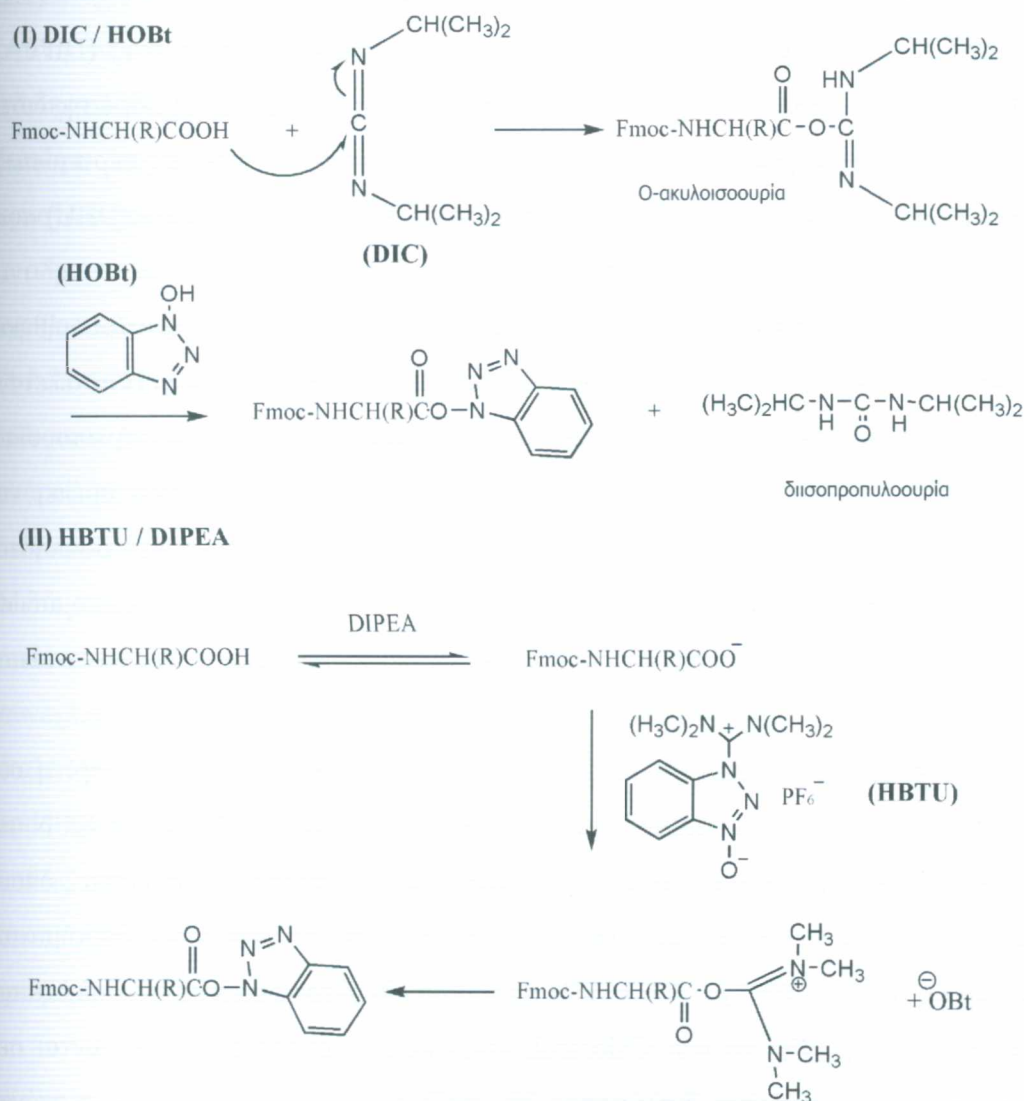
Πίνακας 2. Προστατευτικές ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πεπτιδική σύνθεση

Λειτουργική ομάδα Αμινοξέος	Προστατευτική ομάδα	Δομή	Συνθήκες απόσπασης
α-αμινομάδα	9-φλουορένυλομεθυλόξυκαρβόνυλο ομάδα (Fmoc)		20% πιπεριδίνη σε DMF
Υδροξυλομάδα Ser, Thr, Tyr	Tert-βούτυλο ομάδα (tBu)		90% TFA, 30 min
Γουανιδική ομάδα Arg	2,2,4,6,7-πενταμέθυλο-διυδροβενζοφουρανο-5-σουλφονυλομάδα (Pbf)		95% TFA, 30 min
ε-αμινομάδα Lys	Tert-βουτυλόξυκαρβόνυλο ομάδα (Boc)		90% TFA, 30 min
Καρβοξαμίδιο Asn και ιμιδαζολίου His	Τρίτυλο ομάδα (Trt)		(i) 50% TFA σε DCM, 30 min για την His (ii) 90% TFA, 30-60 min για την Asn
Πλευρική καρβοξυλομάδα Asp και Glu	Τριτοταγής βουτυλόξυ ομάδα (tBu)		90% TFA, 30 min

Ως στερεό υπόστρωμα επιλέξαμε την Sieber amide ρητίνη, η οποία δίνει καρβοξαμίδιο κατά το στάδιο διαχωρισμού του πεπτιδίου από αυτή (cleavage). Η ρητίνη αυτή ελευθερώνει το πεπτιδικό προϊόν υπό ήπιες όξινες συνθήκες (1% TFA) (285). Η υποκατάσταση της ρητίνης ήταν 0,6 mmol/g και η ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε 200 mg. Ως εκ τούτου, η θεωρητική απόδοση σε πεπτίδιο ανέρχεται σε 0,12 mmol.

Για την ενεργοποίηση του Fmoc-προστατευμένου καρβοξυλο συστατικού χρησιμοποιήσαμε το N, N'-διϊσοπρόπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) και το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt) ως

βοηθητικό πυρηνόφιλο, σε αναλογία $\text{Fmoc-NH(R)COOH} : \text{DIC} : \text{HOBt} = 1 : 1,1 : 1,5$. Η αντίδραση οδηγεί στο σχηματισμό του αντίστοιχου OBt ενεργού εστέρα, ο οποίος είναι αρκετά δραστικό ακυλιωτικό μέσο ενώ μειώνει τον κίνδυνο ρακεμίσωσης και πιθανόν παράπλευρων αντιδράσεων. Η αντίδραση είναι ταχύτερη σε μη πολικούς διαλύτες όπως διχλωρομεθάνιο (DCM), αλλά μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) με την προϋπόθεση ότι το μίγμα της αντίδρασης προενεργοποιηθεί πριν προστεθεί στη ρητίνη. Το DIC προτιμάται έναντι του N,N' -δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδίου (DCC), διότι η σχηματιζόμενη ουρία είναι ευδιάλυτη σε DMF (286). Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα δίνονται στο Σχήμα 31 (I).



Σχήμα 31. Ενεργοποίηση του Fmoc-προστατευμένου καρβόξυλο συστατικού με χρήση μίγματος (I) DIC / HOBt (II) HBTU / DIPEA

Μετά το τέλος κάθε σύζευξης η περίσσεια των αντιδραστηρίων απομακρύνεται με διήθηση υπό κενό και ακολουθεί έκπλυση της ρητίνης με DMF και ισοπροπανόλη. Στη συνέχεια η ρητίνη ξηραίνεται με αιθέρα και μικρή ποσότητα μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα προκειμένου να εκτιμηθεί η πληρότητα της αντίδρασης σύζευξης με test Kaiser ή Chloranil.

Με την αύξηση του μεγέθους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας πάνω στη ρητίνη, αυξάνεται η πιθανότητα τα συντιθέμενα πεπτίδια να αποκτήσουν δευτεροταγής δομή ή/και να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους σχηματίζοντας συσσωματώματα. Το φαινόμενο αυτό που οφείλεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δεσμούς υδρογόνου, ονομάζεται aggregation και οδηγεί σε μειωμένη διείσδυση των αντιδραστηρίων σύζευξης και αποπροστασίας (286). Σε ορισμένες “δύσκολες” αλληλουχίες πραγματοποιήθηκε *in situ* ενεργοποίηση του Fmoc καρβόξυλο συστατικού με τη χρήση μίγματος εξαφωσφορικού άλατος της 2-(1H-βενζοτρίαζολυλ)-1,1,3,3-τετραμεθυλουρίας (HBTU) και διϊσοπρόπυλαιθυλαμίνης (DIPEA) (Σχήμα 31 (II)) (287, 288). Η οργανική βάση DIPEA προστίθεται στο μίγμα αντίδρασης διότι το HBTU αντιδρά μόνο με καρβοξυλικά ανιόντα. Η αποπροστασία, σε αυτές τις περιπτώσεις έλαβε χώρα με τη χρήση διαλύματος 1,8-διαζαδίκυκλου {5,4,0} έντεκα-7-ένιου (DBU) που είναι πιο ισχυρή βάση από την πιπεριδίνη (289).

Ο έλεγχος της πληρότητας των αντιδράσεων σύζευξης και αποπροστασίας πραγματοποιήθηκε με τα test Kaiser ή Chloranil. Το test νινυδρίνης, που επινοήθηκε από τον Kaiser, αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ποσοτικό test για την ανίχνευση της παρουσίας ή απουσίας ελεύθερων αμινομάδων (290). Το test είναι απλό και γρήγορο, παρόλο που πρέπει να σημειωθεί ότι κάποια αποπροστατευμένα αμινοξέα, όπως Ser, Asn και Asp, δεν δίνουν το αναμενόμενο μπλε χρώμα, χαρακτηριστικό της ύπαρξης ελεύθερων πρωτοταγών αμινομάδων και ότι η Pro, όντας δευτεροταγή αμίνη, δεν δίνει θετική αντίδραση. Για την Pro, συνιστάται το test Chloranil (291).

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται για το test Kaiser είναι: (i) 5% (w/v) νινυδρίνη σε αιθανόλη (ii) 80% (w/v) φαινόλη σε αιθανόλη (iii) KCN σε πυριδίνη (2 ml 0,001M KCN σε 98 ml πυριδίνης). Η αντίδραση πραγματοποιείται σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου τοποθετούνται λίγοι κόκκοι της ρητίνης και 2 σταγόνες από τα ανωτέρω διαλύματα. Ακολουθεί θέρμανση στους 120°C για 4 λεπτά. Η παρουσία ελεύθερης αμίνης υποδηλώνεται από μπλε κόκκους ρητίνης. Για το test Chloranil, λίγοι κόκκοι ρητίνης τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα με 1 σταγόνα διαλύματος 2% p-Chloranil σε DMF και 1 σταγόνα διαλύματος 2% ακεταλδεΰδης σε DMF. Ο μπλε χρωματισμός της ρητίνης είναι ενδεικτικός της ύπαρξης ελεύθερης αμίνης.

Η ακετυλίωση του N-τελικού άκρου, πραγματοποιήθηκε στο τελικό στάδιο της σύνθεσης με χρήση διαλύματος οξικού ανυδρίτη και DIPEA σε DMF. Η πληρότητα της ακετυλίωσης και σε αυτήν την περίπτωση ελέγχθηκε με τη χρήση του test Kaiser. Για την αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη χρησιμοποιήσαμε, διάλυμα αποτελούμενο από 90% TFA / 4% ανισόλη / 3% τριαιθύλσιλάνιο (TES) / 3% H₂O για το πεπτίδιο H2B₉₄₋₁₂₅ και διάλυμα 90% TFA / 3% ανισόλη / 3% 1,2 αιθανοδιθειόλη (EDT) / 2% TES / 2% H₂O για το πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂. Η επίδραση των ανωτέρω διαλυμάτων (cleavage mixtures) στην πεπτιδορητίνη πραγματοποιήθηκε σε σφαιρική φιάλη υπό συνεχή ανάδευση για 3 και 4 ώρες αντίστοιχα.

Υπό αυτές τις συνθήκες πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη και απομάκρυνση των πλευρικών προστατευτικών ομάδων. Κατά την ανωτέρω διαδικασία, σχηματίζονται δραστικά κατιονικά είδη από τις προστατευτικές ομάδες και την ρητίνη, τα οποία εάν δεν δεσμευτούν, μπορούν να αντιδράσουν και να προκαλέσουν βλάβη στα πεπτίδια, μετατρέποντας αμινοξέα, όπως Tyr, Trp, Met και Cys. Γι' αυτόν τον λόγο διάφορα πυρηνόφιλα αντιδραστήρια, γνωστά ως δεσμευτές κατιόντων (scavengers), προστίθενται στο διάλυμα του TFA. Το νερό αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο αυτής της κατηγορίας και είναι αρκετά αποτελεσματικό στο να δεσμεύει τα tert-βούτυλο κατιόντα και τα προϊόντα διάσπασης των άρυλοσουλφόνυλο ομάδων, όπως της Pbf. Το EDT, είναι το καλύτερο αντιδραστήριο για τη δέσμευση των tert-βούτυλο κατιόντων, ενώ καταστέλλει και την οξείδωση των καταλοίπων μεθειονίνης (286). Το τριαιθυλσιλάνιο μπορεί να είναι το ίδιο αποτελεσματικό με την EDT, ενώ παράλληλα είναι ικανό στο να δεσμεύει κατιόντα που προέρχονται από τη διάσπαση της Trt ομάδας (292).

Μετά την αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη και την απομάκρυνση των πλευρικών προστατευτικών ομάδων, πραγματοποιείται διήθηση του πεπτιδικού προϊόντος και εν συνεχεία εξάτμιση σε περιστροφικό συμπυκνωτή για την απομάκρυνση των πτητικών διαλυτών και των δεσμευτών κατιόντων. Η καταβύθιση του πεπτιδίου γίνεται με την προσθήκη διαιθυλαιθέρα. Το προϊόν που καταβυθίζεται, περιέχει το επιθυμητό πεπτίδιο καθώς και άλλα πεπτίδια, λόγω της μη πληρότητας των αντιδράσεων σύζευξης και αποπροστασίας, χαρακτηρίζεται ως crude και υπόκειται σε καθαρισμό μέσω χρωματογραφικών τεχνικών.

7.2. Καθαρισμός Πεπτιδικών Προϊόντων με Χρήση Χρωματογραφικών Τεχνικών

7.2,1 Χρωματογραφία πηκτής (gel filtration, size exclusion chromatography)

7.2,1,1 Βασικές Αρχές

Με τη χρωματογραφία πηκτής διαχωρίζονται συστατικά ενός μίγματος, βάση διαφορών που παρουσιάζουν στο μέγεθος τους. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται λόγω της διαφορετικής κινητικότητας που παρουσιάζουν μόρια διαφορετικού μοριακού βάρους κατά την διέλευσή τους, μέσω μιας στήλης η οποία πληρούται από πορώδες υλικό. Το υλικό αυτό πρέπει να μην αντιδρά με τα προς διαχωρισμό μόρια και να χαρακτηρίζεται από φυσική και χημική σταθερότητα. Συνήθως, ως υλικά πληρώσεως χρησιμοποιούνται υλικά της σειράς Sephadex G. Αυτά παρασκευάζονται από δεξτράνη, όπου τα πολυσακχαριτικά μόρια συνδέονται με δεσμούς διασταύρωσης, μέσω επιχλωριδίνης. Ανάλογα με το μέγεθος των πόρων του υλικού, παρασκευάζονται διάφορα είδη Sephadex (G-10, G-15, G-25 κ.ο.κ), κατάλληλα για καθαρισμό μορίων με διαφορετικό εύρος μοριακών βαρών. Κατά την διέλευση του προς διαχωρισμού μίγματος από την στήλη, τα μεγαλύτερα μόρια είτε δεν εισέρχονται καθόλου στους πόρους του υλικού πληρώσεως, είτε εισέρχονται σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα μικρότερα. Κατά συνέπεια, τα μεγαλύτερα μόρια εκλούνται πρώτα και ακολουθούν τα υπόλοιπα κατά σειρά μειούμενου μοριακού μεγέθους (293).

7.2,1,2 Πειραματική Πορεία

Για τον καθαρισμό του crude πεπτιδικού προϊόντος, χρησιμοποιήσαμε υλικό πληρώσεως Sephadex G-25, το οποίο είναι κατάλληλο για διαχωρισμό μορίων με εύρος μοριακών βαρών 1000-5000. Ως εκλούτης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού οξέος 15%, η ροή του οποίου ρυθμίστηκε με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας Pharmacia LKB-Pump P-1, ενώ η συλλογή των κλασμάτων πραγματοποιήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες, με χρήση αυτόματου συλλέκτη Pharmacia Biotech Frac 200.

Η ύπαρξη πεπτιδικού προϊόντος στα διάφορα κλάσματα ελέγχθηκε με τη χρήση test νινυδρίνης. Τα κλάσματα που περιέχουν πεπτίδιο συλλέγονται και μικρή ποσότητα από αυτά υπόκειται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, προκειμένου να ελεγχθεί η ομοιότητα των πεπτιδικών προϊόντων ανά κλάσμα.

7,2,2 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC, Thin Layer Chromatography)

7,2,2,1 Βασικές Αρχές

Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, μία μικρή ποσότητα διαλύματος του δείγματος σε έναν πτητικό διαλύτη, τοποθετείται με τη βοήθεια μιας γυάλινης πιπέτας στο κάτω άκρο μιας πλάκας που περιέχει ακινητοποιημένο αδρανές υλικό προσρόφησης όπως γέλη πυριτίας (silica gel), οξείδιο του αργιλίου ή κυτταρίνη. Όταν η κηλίδα του διαλύματος ξηρανθεί, η πλάκα τοποθετείται κάθετα σε δοχείο που περιέχει τον κατάλληλο διαλύτη ανάπτυξης. Ο διαλύτης μετακινείται δια μέσου της στατικής φάσης, λόγω τριχοειδούς δράσης και τα συστατικά του δείγματος αναλύονται σε διακριτές κηλίδες. Οι κηλίδες ανιχνεύονται είτε με φυσικές (οπτική εξέταση, φθορισμός) είτε με χημικές μεθόδους (αντιδρώντας με ένα συγκεκριμένο αντιδραστήριο) (294).

7,2,2,2 Πειραματική Πορεία

Μικρή ποσότητα των κλασμάτων που περιέχουν πεπτίδιο υπόκειται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη ανάπτυξης το σύστημα: βουτανόλη / οξικό οξύ / πυριδίνη / νερό (4: 1: 1: 2, v/v). Η εμφάνιση των κηλίδων πραγματοποιείται όπως και πριν με test νινυδρίνης. Τα κλάσματα που εμφανίζουν το ίδιο R_f (R_f = απόσταση που διανύεται από διαλυμένη ουσία / απόσταση που διανύεται από τον διαλύτη) ενοποιούνται και λυοφιλοποιούνται έως ότου ληφθεί στερεό πεπτιδικό προϊόν. Τα κλάσματα που λαμβάνονται κατ' αυτόν τον τρόπο, υπόκεινται σε περαιτέρω καθαρισμό μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

7,2,3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

7,2,3,1 Βασικές Αρχές

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελεί ένα βελτιστοποιημένο είδος χρωματογραφίας στήλης. Σε αντίθεση με τις κλασσικές χρωματογραφικές τεχνικές, ο διαλύτης εκλούεται διαμέσου της στήλης υπό υψηλή πίεση επιταχύνοντας τη διαδικασία διαχωρισμού. Πρόσθετο πλεονέκτημα της μεθόδου προέρχεται από το γεγονός ότι τα υλικά πληρώσεως της στήλης αποτελούνται από σωματίδια πολύ μικρότερου μεγέθους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης της κινητής και στατικής φάσης και συνεπώς καλύτερο διαχωρισμό του προς ανάλυση δείγματος. Ανάλογα με τη σχετική πολικότητα της κινητής και στατικής φάσης, διακρίνονται 2 είδη χρωματογραφίας υψηλής

απόδοσης. Όταν η στατική φάση είναι πολική και η κινητή φάση άπολη (π.χ εξάνιο), η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως χρωματογραφία κανονικής φάσης. Στην αντίθετη περίπτωση που το υλικό πληρώσεως της στήλης έχει τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε να είναι μη πολικό π.χ με σύνδεση πάνω στο διοξείδιο του πυριτίου, μακρών υδρογονοανθρακικών αλυσίδων (τυπικά αποτελούμενων από 8 έως 18 άτομα άνθρακα) και η κινητή φάση είναι πολική, η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) που είναι και η πιο διαδεδομένη (294).

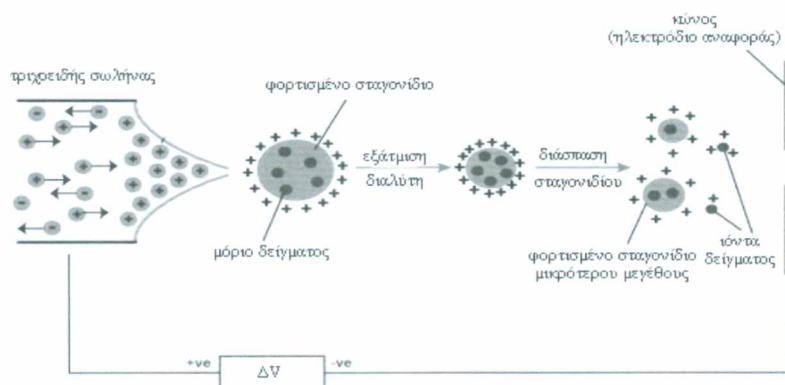
7,2,3,2 Πειραματική Πορεία

Ο τελικός καθαρισμός των πεπτιδικών προϊόντων επιτεύχθηκε με υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η AKTA purifier 10 του οίκου Amersham Pharmacia Biotech, (Piscataway, USA), εφοδιασμένη με ημιπαρασκευαστική στήλη ανάστροφης φάσης Lichrosorb RP18 7 μ m (250 mm x 4,6 mm). Τα διαλύματα έκλουσης ήταν ακετονιτρίλιο / H₂O, γραμμικά μεταβαλλόμενης σύστασης, οξιניσμένα με 0,1 % TFA. Η ταχύτητα ροής στην ημιπαρασκευαστική κλίμακα ήταν 1,5 mL/min ενώ η ανίχνευση των προϊόντων πραγματοποιήθηκε με UV-ανιχνευτή σε 3 μήκη κύματος (256, 220 και 230 nm). Τα λαμβανόμενα κατ' αυτόν τον τρόπο κλάσματα μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα φιαλίδια και υποβλήθηκαν σε λυοφιλοποίηση. Η καθαρότητα του τελικού προϊόντος επιβεβαιώθηκε με αναλυτική HPLC, χρησιμοποιώντας στήλη Nucleosil 100 C₁₈ 5 μ m (250 mm x 4,6 mm).

7.3. Ταυτοποίηση με Φασματοσκοπία Μάζας, Electrospray Ionization (ESI-MS)

7.3.1 Βασικές Αρχές

Κατά τον ιονισμό electrospray, ένα πολύ αραιό διάλυμα του δείγματος σε έναν πτητικό διαλύτη, εισάγεται σε έναν τριχοειδή σωλήνα (capillary) ο οποίος καταλήγει σε ένα πολύ λεπτό άκρο. Σε αυτό εφαρμόζεται μια πολύ υψηλή διαφορά δυναμικού (τυπικά 2,5 με 4kV), η οποία έχει ως τελικό αποτέλεσμα τον ψεκασμό φορτισμένων σταγονιδίων από το ακροφύσιο. Τα σταγονίδια απωθούνται από τον σωλήνα προς την πλευρά του κώνου, πριν το ηλεκτρόδιο αναφοράς όπως φαίνεται στο Σχήμα 32. Καθώς τα σταγονίδια διασχίζουν το διάστημα από το ακροφύσιο έως τον κώνο, πραγματοποιείται εξάτμιση του διαλύτη και το φορτίο της σταγόνας κατανέμεται σε μικρότερη επιφάνεια, έως ότου η επιφανειακή τάση να μην μπορεί πλέον να διατηρήσει το φορτίο της σταγόνας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μικρότερων σταγονιδίων και η διαδικασία αυτή συνεχίζεται έως ότου σχηματιστούν τα ιόντα της προς ανάλυση ουσίας, τα οποία τελικά εισέρχονται στον αναλυτή μάζας (295).



Σχήμα 32. Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας ιόντων κατά τον ιονισμό electrospray

7.3.2 Πειραματική Πορεία

Η επιβεβαίωση της σύνθεσης των επιθυμητών πεπτιδίων, όπως και ο έλεγχος της καθαρότητας τους, πραγματοποιήθηκε με ESI-MS φασματοσκοπία μάζας. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν δείγματα συγκέντρωσης 0,1 mM, οξιניσμένα με 0,1 % TFA. Τα φάσματα καταγράφηκαν σε ένα Micromass-Platform LC αναλυτή μάζας.

8. Χρησιμοποιούμενες Τεχνικές για τη Μελέτη της Σύμπλεξης των Πεπτιδίων με ιόντα Ni^{2+} και Cu^{2+}

8,1 Ποτενσιομετρία

8,1,1 Βασικές Αρχές

8,1,1,1 Σταθερές πρωτονίωσης και σταθερές σχηματισμού συμπλόκων

Αν θεωρήσουμε έναν υποκαταστάτη που περιέχει n όξινες ομάδες (H_nL), υπάρχουν $n+1$ μορφές με τις οποίες αυτός μπορεί να βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα (H_nL , $H_{n-1}L$, $H_{n-2}L$, ..., L_n^-). Οι ισορροπίες που λαμβάνουν χώρα χαρακτηρίζονται από τις διαδοχικές (K_1^H , K_2^H , K_3^H , ... K_n^H), ή ολικές (β_{HL} , β_{H_2L} , β_{H_3L} , ..., β_{H_nL}) σταθερές πρωτονίωσης, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με τις εξής σχέσεις: $\beta_{HL} = K_1^H$, $\beta_{H_2L} = K_1^H K_2^H$, $\beta_{H_3L} = K_1^H K_2^H K_3^H$ κ.ο.κ.

$$H^+ + L^{n-} \rightleftharpoons HL^{1-n}, \quad K_1^H = \frac{[HL^{1-n}]}{[H^+][L^{n-}]}, \quad H^+ + L^{n-} \rightleftharpoons HL^{1-n}, \quad \beta_{HL} = \frac{[HL^{1-n}]}{[H^+][L^{n-}]} \quad (1)$$

$$H^+ + HL^{1-n} \rightleftharpoons H_2L^{2-n}, \quad K_2^H = \frac{[H_2L^{2-n}]}{[H^+][HL^{1-n}]}, \quad 2H^+ + L^{n-} \rightleftharpoons H_2L^{2-n}, \quad \beta_{H_2L} = \frac{[H_2L^{2-n}]}{[H^+]^2[L^{n-}]} \quad (2)$$

$$H^+ + H_2L^{2-n} \rightleftharpoons H_3L^{3-n}, \quad K_3^H = \frac{[H_3L^{3-n}]}{[H^+][H_2L^{2-n}]}, \quad 3H^+ + L^{n-} \rightleftharpoons H_3L^{3-n}, \quad \beta_{H_3L} = \frac{[H_3L^{3-n}]}{[H^+]^3[L^{n-}]} \quad (3)$$

...

$$H^+ + H_{n-1}L^{-1} \rightleftharpoons H_nL, \quad K_n^H = \frac{[H_nL]}{[H^+][H_{n-1}L^{-1}]}, \quad nH^+ + L^{n-} \rightleftharpoons H_nL, \quad \beta_{H_nL} = \frac{[H_nL]}{[H^+]^n[L^{n-}]} \quad (4)$$

Όταν στο διάλυμα υπάρχει και κάποιο μέταλλο (M^{m+}) το οποίο μπορεί να αντιδράσει με τον υποκαταστάτη, τότε λαμβάνουν χώρα και άλλες ισορροπίες και παρόμοιες εκφράσεις για τις σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων μπορούν να εξαχθούν. Στην γενική περίπτωση όπου ένα σύμπλοκο περιέχει i μεταλλικά ιόντα, j υδρογονοκατιόντα και k μόρια υποκαταστάτη, η ολική σταθερά σχηματισμού β_{ijk} δίνεται από την παρακάτω εξίσωση (243, 296):

$$\beta_{ijk} = \frac{[M_i H_j L_k]}{[M^{m+}]^i [H^+]^j [L]^k} \quad (5)$$

Η αντίδραση ενός μεταλλικού ιόντος με έναν υποκαταστάτη μπορεί να θεωρηθεί ότι ανταγωνίζεται την πρωτονίωση του. Η σταθερά ισορροπίας για τέτοιες αντιδράσεις υποδηλώνεται με το σύμβολο K^* και οι τιμές τους μπορούν εύκολα να εξαχθούν από τις σταθερές σχηματισμού και πρωτονίωσης ($\log K^* = \log \beta(MH_jL) - \log \beta(H_nL)$ (6)). Οι τιμές αυτές είναι χρήσιμες όταν θέλουμε να συγκρίνουμε την ικανότητα διαφόρων υποκαταστατών στο να συνδέονται με ένα μεταλλικό ιόν (243).

8,1,1,2 Ποτενσιομετρικές Τιτλοδοτήσεις

Η ποτενσιομετρία είναι μία από τις απλούστερες και πιο επιτυχημένες τεχνικές που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των σταθερών σχηματισμού συμπλόκων μετάλλων με διάφορους υποκαταστάτες. Σε μία ποτενσιομετρική τιτλοδότηση μετράται η συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου κατά την προσθήκη γνωστών ποσοτήτων διαλύματος βάσεως γνωστής συγκέντρωσης, σε ένα καλά χαρακτηρισμένο όξινο διάλυμα του υποκαταστάτη, απουσία και παρουσία γνωστής ολικής συγκέντρωσης του μεταλλικού ιόντος. Για την μέτρηση του pH, συνήθως χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο υάλου (296).

Η εισαγωγή των υπολογιστών για την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων, όπως και η δημιουργία ειδικών υπολογιστικών προγραμμάτων που χρησιμοποιούν εξεζητημένους αλγόριθμους, έχει καταστήσει δυνατό τον υπολογισμό των σταθερών σχηματισμού και πρωτονίωσης, όταν οι αρχικές συγκεντρώσεις του υποκαταστάτη, του μετάλλου και των πρωτονίων είναι γνωστές σε συνδιασμό με την εισαγωγή ενός μοντέλου, που περιλαμβάνει τα είδη των συμπλόκων που μπορεί να είναι παρόντα στην ισορροπία.

Τα πεπτίδια περιέχουν ένα πλήθος ομάδων που μπορούν να ιονιστούν, όπως οι πλευρικές καρβοξυλικές ομάδες του Asp και Glu, το ιμιδαζολικό άζωτο της His, το φαινολικό υδροξύλιο της Tyr, η ε-αμινομάδα της Lys και η τελική καρβοξυλική ομάδα του πεπτιδικού σκελετού. Ο μεγάλος αριθμός ομάδων που μπορούν να συμπλεχθούν με μεταλλικά ιόντα σε ένα πολυπεπτίδιο, όπως και η υιοθέτηση πιθανόν δευτεροταγών δομών, καθιστούν την εκτίμηση των ποτενσιομετρικών δεδομένων δύσκολη. Έτσι, ο καθορισμός των δραστικών ομάδων που συμμετέχουν στις διαδοχικές ισορροπίες με τη χρήση μόνο ποτενσιομετρικών τεχνικών, είναι αβέβαιος και ο συνδιασμός άλλων τεχνικών (κυρίως φασματοσκοπικών), για την μελέτη της σύμπλεξης μακρομορίων με μεταλλικά ιόντα, κρίνεται απαραίτητος (297).

8.1,2 Μίκρο και μάκρο σταθερές

Γενικά, οι σταθερές πρωτονίωσης όπως και οι σταθερές σχηματισμού συμπλόκων που υπολογίζονται από ποτενσιομετρικά δεδομένα, είναι μακροσταθερές (macroconstants), δεδομένου ότι οι πραγματικές θέσεις πρωτονίωσης δεν είναι προσδιορισμένες με ακρίβεια κι άρα μπορεί να μην είναι μοναδικές. Αυτό σημαίνει ότι μια ισορροπία που περιέχει ένα είδος, έστω HL, μπορεί στην πραγματικότητα να αποτελείται από πολλά είδη HL, όπου σε κάθε ένα από αυτά, το πρωτόνιο είναι εντοπισμένο σε διαφορετική βασική ομάδα. Σε υδατικά διαλύματα, οι ισορροπίες μεταξύ των διαφορετικών ειδών, παρόμοιας στοιχειομετρίας, αποκαθίστανται ταχύτατα με αποτέλεσμα όλα τα είδη που διαφέρουν μόνο ως προς το που εντοπίζεται το πρωτόνιο, να συμπεριφέρονται ως ένα και μοναδικό σύμπλοκο. Οι μικροσταθερές (microconstants), αναφέρονται σε συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες που εμπλέκονται στα φαινόμενα πρωτονίωσης και θεωρητικά το άθροισμα τους δίνει την μακροσκοπική σταθερά. Ο προσδιορισμός των μικροσταθερών, μπορεί να γίνει με τη χρήση μεθόδων που στοχεύουν σε ιδιότητες συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων (UV-Vis, NMR κλπ) (296).

Τα φάσματα απορρόφησης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της αποπρωτονίωσης του φαινολικού υδροξυλίου, δεδομένου ότι η φαινολική ομάδα απορροφά κοντά στα 250 nm, ενώ το φαινολικό ιόν γύρω στα 300 nm. Η μικρο σταθερά για την αποπρωτονίωση του φαινολικού υδροξυλίου, εξαρτάται από τη μοριακή απορροφητικότητα των δύο μορφών $\varepsilon(HL)$ και $\varepsilon(L)$ (πρωτονιωμένης και μη, HL και L, αντίστοιχα). Εάν $x(HL)$ και $x(L)$ είναι τα γραμμομοριακά κλάσματα της πρωτονιωμένης και αποπρωτονιωμένης Tyr, οι ακόλουθες σχέσεις μπορούν να γραφτούν:

$$x(L) = \frac{[L]}{[HL] + [L]} \quad (7) \quad x(HL) = \frac{[HL]}{[HL] + [L]} \quad (8) \quad x(L) + x(HL) = 1 \quad (9)$$

Χρησιμοποιώντας τις παραπάνω 3 εξισώσεις, μπορούμε να γράψουμε για την μικροσταθερά k_a , που αναφέρεται στον ιονισμό της Tyr:

$$k_a = \frac{[L][H]}{[HL]} = \frac{\frac{[L]}{[HL] + [L]}[H]}{\frac{[HL]}{[HL] + [L]}} = \frac{x(L)[H]}{x(HL)} = \frac{x(L)[H]}{1 - x(L)} \Rightarrow x(L) = \frac{1}{1 + \frac{[H]}{k_a}} \quad (10)$$

Δεδομένου ότι η μοριακή απορροφητικότητα (ε) είναι προσθετική ιδιότητα, ισχύει :

$$\varepsilon = x(L)\varepsilon(L) + x(HL)\varepsilon(HL) \quad (11)$$

Από τις παραπάνω σχέσεις είναι εμφανές ότι η μικροσταθερά για τον ιονισμό του φαινολικού υδροξυλίου, μπορεί να υπολογισθεί από τα φάσματα υπεριώδους του υποκαταστάτη σε διάφορες τιμές pH.

8,1,3 Πειραματική πορεία

Οι σταθερές πρωτονίωσης των πεπτιδίων και σχηματισμού των αντίστοιχων συμπλόκων με $Ni(II)$ και $Cu(II)$, υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες καμπύλες ογκομέτρησης στους $25^\circ C$. Ο ολικός όγκος των τιτλοδοτούμενων διαλυμάτων ήταν 3 cm^3 ενώ ως τιτλοδότης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα KOH $0,2027M$. Η συγκέντρωση της βάσης υπολογίστηκε με ακρίβεια από την τιτλοδότηση πρότυπου διαλύματος όξινου φθαλικού καλίου (KHP) ενώ η σταθερά διάστασης του ύδατος (K_w) και ο παράγοντας Irwing με τον οποίον διορθώθηκαν οι πειραματικά μετρούμενες τιμές pH, υπολογίστηκαν από την τιτλοδότηση διαλύματος HCl . Ως πηγή ιόντων μετάλλου χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα $CuCl_2$ και $NiCl_2$. Οι πεχαμετρικές τιτλοδοτήσεις πραγματοποιήθηκαν σε αδρανή ατμόσφαιρα αργού σε διαλύματα σταθερής ιοντικής ισχύος ($[KCl]=0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) σε ένα MOLSPIN πεχαμετρικό σύστημα εφοδιασμένο με ηλεκτρόδιο υάλου, χρησιμοποιώντας 1: 1,1 αναλογία μετάλλου προς υποκαταστάτη η συγκέντρωση του οποίου ήταν $5,0 \times 10^{-4} M$. Η επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων και ο υπολογισμός των σταθερών πρωτονίωσης και σχηματισμού έγιναν με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος HYPERQUAD (298).

8,2 Φασματοσκοπικές Τεχνικές

Η χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών για την εξακρίβωση του είδους των συμπλόκων που σχηματίζονται από την ένταξη των ιόντων Ni^{2+} και Cu^{2+} στα μελετούμενα πεπτίδια, 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 κυκλικού διχρωισμού (CD) (iii) Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) (iv) Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR).

8,2,1 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

8,2,1,1 Βασικές Αρχές

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. Η απορρόφηση υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας, συνοδεύεται από επαναδιευθέτηση των ηλεκτρονίων στα τροχιακά του μετάλλου και των υποκαταστατών. Οι συχνότερα παρατηρούμενες ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις, είναι d-d μεταπτώσεις, $\pi-\pi^*$ μεταπτώσεις μεταξύ των υποκαταστατών και ταινίες μεταφοράς φορτίου από το μέταλλο στον υποκαταστάτη και αντίστροφα. Η απορρόφηση σε ένα μήκος κύματος λ (A_λ) είναι μέτρο της σχετικής έντασης μιας δέσμης φωτός πριν (I_λ^0) και αφότου (I_λ) περάσει διαμέσου ενός διαλύματος, που περιέχει την ουσία που απορροφά, και δίνεται από τον νόμο Lambert-Beer: $A_\lambda = \log(I_\lambda^0/I_\lambda) = \epsilon_\lambda c l$, (12) όπου c είναι η συγκέντρωση (M), l είναι το μήκος της διανυθείσας διαδρομής (cm) και ϵ_λ η μοριακή απορροφητικότητα ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$). Οι μοριακές απορροφητικότητες είναι σταθερές που αντανakλούν την εγγενή απορρόφηση ενός δείγματος σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος λ και είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για συγκριτικούς σκοπούς δεδομένου ότι δεν εξαρτώνται από την ποσότητα του δείγματος (299, 300).

Οι κανόνες επιλογής είναι ένας απλουστευμένος παράγοντας για την ερμηνεία των φασματοσκοπικών δεδομένων και υποδηλώνουν ότι δεν είναι όλες οι μεταπτώσεις μεταξύ ενεργειακών σταθμών, επιτρεπτές. Γενικά, οι ταινίες μεταφοράς φορτίου από τον υποκαταστάτη στο μέταλλο, ή από το μέταλλο στον υποκαταστάτη, όπως και η $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεις του υποκαταστάτη, είναι υψηλής ενέργειας, επιτρεπόμενες μεταπτώσεις και παρατηρούνται στο υπεριώδες ή στην μπλε περιοχή του ορατού ($\epsilon > 1000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Αντίθετα, οι d-d μεταπτώσεις των οκταεδρικών συμπλόκων είναι απαγορευμένες (κανόνες Laporte), αλλά μπορούν να παρατηρηθούν όταν υπάρχει ένας μηχανισμός που διαταρράσει την οκταεδρική συμμετρία (π.χ οι δονήσεις των δεσμών μετάλλου-υποκαταστάτη μπορούν να παραμορφώσουν το σύμπλοκο και να αφαιρέσουν την οκταεδρική συμμετρία). Ως εκ τούτου, εμφανίζονται με πολύ μικρότερη ένταση και η απορρόφηση είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτεί (299, 301).

8,2,1,2 Φάσματα Απορρόφησης Συμπλόκων Μεταλλικών Ιόντων με Πεπτίδια

Η απορρόφηση της αμιδικής ομάδας είναι κοντά στα 220 nm και οφείλεται σε μετάπτωση από ένα μη δεσμικό (n) σε ένα αντιδεσμικό (π^*) τροχιακό. Σύμπλοκα ιόντων Ni^{2+} και Cu^{2+} με αποπρωτονιωμένα αμιδικά άτομα αζώτου πεπτιδίων, δίνουν έντονες ταινίες μεταφοράς

φορτίου γύρω στα 250 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος απορροφούν και οι αρωματικές πλευρικές αλυσίδες αμινοξικών καταλοίπων (302).

Οι d-d μεταπτώσεις, εμφανίζονται σε πολύ υψηλότερο μήκος κύματος. Έτσι, για κίτρινα τετραγωνικά σύμπλοκα πεπτιδίων με ιόντα Ni^{2+} , εμφανίζονται στα 410-450 nm, ενώ για μωβ ή μπλε σύμπλοκα χαλκού στα 520-650 nm (303). Αυτές οι ταινίες απορρόφησης, παρέχουν τις πιο χρήσιμες διαγνωστικές πληροφορίες για την δομή των συμπλόκων των ανωτέρω μετάλλων με πεπτιδικούς υποκαταστάτες. Αντικατάσταση ισημερινών μορίων ύδατος από άτομα οξυγόνου ή αζώτου, από τη σφαίρα ένταξης ιόντων Cu^{2+} , μετακινεί το μήκος κύματος όπου παρατηρείται μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}) σε μικρότερες τιμές, με τα άτομα αζώτου να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη επίδραση. Η εξέταση μεγάλου αριθμού φασμάτων ορατού ιόντων Cu^{2+} με πεπτιδικούς υποκαταστάτες έχει οδηγήσει στην εμπειρική εξίσωση, για την πρόβλεψη του λ_{max} των αντίστοιχων συμπλόκων (242) :

$$\lambda_{max} = 10^3 / [0,294 (C=O / H_2O)] + 0,346 (COO^-) + 0,434 (Im) + 0,460 (NH_2) + 0,494 (N=)] \quad (13)$$

όπου οι όροι εντός της παρενθέσεως αναφέρονται στους υποκαταστάτες που συνδέονται με το κεντρικό ιόν και αντιστοιχούν σε :

C=O / H_2O : καρβονυλικό οξύ, μόριο ύδατος ή υδροξύλιο, COO^- : καρβοξυλικό οξύ, Im: ιμιδαζολικό άζωτο, NH_2 : άζωτο αμινομάδας, N=: αποπρωτονιωμένο πεπτιδικό άζωτο

8,2,1,3 Πειραματική πορεία

Η καταγραφή των φασμάτων υπεριώδους-ορατού πραγματοποιήθηκε σε ένα Perkin-Elmer Lambda 25 φωτόμετρο στους 25°C σε διάφορες τιμές pH, σε διαλύματα παρόμοιας συγκέντρωσης με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τις ποτενσιομετρικές μετρήσεις. Τα φάσματα καταγράφηκαν στην περιοχή 250 - 800 nm, ενώ η ρύθμιση του pH επιτεύχθηκε με τη χρήση μικρών ποσοτήτων διαλυμάτων 0,2M KOH και 0,2M HCl.

8,2,2 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)

8,2,2,1 Βασικές Αρχές

Όταν ένα μόριο περιέχει ασύμμετρο άτομο άνθρακα, λέμε ότι παρουσιάζει χειρικότητα ή αλλιώς μοριακή ασυμμετρία. Τέτοια μόρια αλληλεπιδρούν διαφορετικά με τις 2 μορφές (αριστερά και δεξιά) του κυκλικού πολωμένου φωτός. Η διαφορετική απορρόφηση που παρουσιάζουν δισύμμετρα μόρια με τα αριστερά και δεξιά κυκλικά πολωμένα κύματα του φωτός, ορίζεται ως κυκλικός διχρωισμός (circular dichroism, CD). Τα CD φάσματα εκφράζονται ως η διαφορά στις μοριακές απορροφητικότητες $\Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$, συναρτήσεως του

μήκους κύματος. Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια αποτελούνται από δομικές μονάδες που περιέχουν ασύμμετρα άτομα άνθρακα κι επομένως μπορούν να υιοθετήσουν μία ολική ασύμμετρη δομή, δεν είναι έκπληξη ότι τα μεταλλικά σύμπλοκα αυτών εμφανίζουν κυκλικό διχρωισμό (299, 304).

8,2,2,2 Πειραματική πορεία

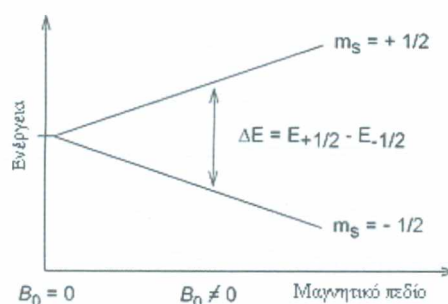
Η καταγραφή των CD φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε ένα φασματοπολωσίμετρο JASCO J-810 στους 25°C σε διάφορες τιμές pH, σε διαλύματα παρόμοιας συγκέντρωσης με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τις ποτενσιομετρικές μετρήσεις. Τα φάσματα καταγράφηκαν στην περιοχή 200 – 800 nm ενώ η ρύθμιση του pH επιτεύχθηκε με τη χρήση μικρών ποσοτήτων διαλυμάτων 0,2M KOH και 0,2M HCl. Όλα τα CD-φάσματα αναφέρονται ως η διαφορά στην μοριακή απορροφητικότητα $\Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$.

8,2,3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

8,2,3,1 Βασικές Αρχές

Από όλες τις φασματοσκοπικές τεχνικές, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, βρίσκει την πιο ευρεία εφαρμογή, δεδομένου ότι μπορεί να δώσει ένα πλήθος πληροφοριών όχι μόνο για την διαδικασία ένταξης μεταλλικών ιόντων σε πλήθος υποκαταστατών αλλά και για την ίδια τη δομή των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Μέρος της χρησιμότητας της μεθόδου προέρχεται από

την επιλεκτική εφαρμογή της σε συγκεκριμένους πυρήνες. Όταν ένας πυρήνας διαθέτει πυρηνικό spin $I \neq 0$, μπορεί να αλληλεπιδράσει με ένα εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο και να υιοθετήσει διάφορους μη εκφυλισμένους προσανατολισμούς, ο αριθμός των οποίων εξαρτάται από το μέγεθος του I . Το



Σχήμα 33. Ενεργειακό διάγραμμα για έναν πυρήνα ($I=1/2$) εντός μαγνητικού πεδίου

απλούστερο σύστημα, όπου $I = 1/2$, απεικονίζεται στο Σχήμα 33. Σε αντίθεση με το EPR, όπου η μετάβαση από μία κατάσταση χαμηλότερης σε μία άλλη υψηλότερης ενέργειας, ανιχνεύεται με την απορρόφηση ενέργειας, στο πείραμα NMR καταγράφεται η αποδιέγερση των μορίων από τη διεγερμένη στη θεμελιώδη ενεργειακή στάθμη. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος για την λήψη ενός NMR φάσματος, είναι η εφαρμογή ενός χρονικού παλμού ραδιοσυχνοτήτων,

ακολουθούμενη από την άφεση του συστήματος να επανέλθει στην αρχική ισορροπία. Η χρονική εξάρτηση της επαναφοράς στην ισορροπία (FID, Free Induction Decay), μπορεί να μετατραπεί μέσω ενός μετασχηματισμού Fourier, από ένα χρονικά εξαρτώμενο σήμα σε ένα φάσμα συχνοτήτων (305, 306).

Για ένα συγκεκριμένο σήμα στο NMR, 4 διαφορετικοί παράμετροι μπορούν να εξαχθούν : (i) χημική μετατόπιση (δ) (ii) ένταση του σήματος (I), (iii) χρόνοι αποκατάστασης (relaxation times, T_1 και T_2) (iv) σταθερά σύζευξης (J).

8,2,3,2 Χημική Μετατόπιση

Η μεγάλη χρησιμότητα του NMR προέρχεται από την αλληλεπίδραση των υπό μελέτη πυρήνων με τα ηλεκτρόνια κι άλλους πυρήνες που βρίσκονται στο άμεσο περιβάλλον τους. Το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο δεν αλληλεπιδρά μόνο με το πυρηνικό spin αλλά επάγει μαγνητική ροπή και στα ηλεκτρόνια, η οποία συνήθως αντιτίθεται σε αυτό. Κατά συνέπεια, το μαγνητικό πεδίο που ουσιαστικά «αισθάνεται» ένας πυρήνας είναι συνήθως μικρότερο από το εξωτερικό. Αυτό το προστατευτικό αποτέλεσμα (shielding effect), του άμεσου ηλεκτρονιακού περιβάλλοντος, αντικατοπτρίζεται στην παρακάτω εξίσωση, η οποία δίνει την ένταση του μαγνητικού πεδίου σε έναν πυρήνα (H), εντός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, έντασης H_0 : $\mathbf{H} = \mathbf{H}_0(1-\sigma)$, (14) όπου σ είναι η σταθερά προστασίας (shielding constant) και μπορεί να είναι θετική ή αρνητική, ανάλογα με το αν το μαγνητικό πεδίο των ηλεκτρονίων αντιτίθεται ή παραλληλίζεται με το H_0 . Συνεπώς κάθε πυρήνας που έχει διαφορετικό χημικό περιβάλλον συντονίζεται σε διαφορετική συχνότητα. Ο συντονισμός ενός συγκεκριμένου πυρήνα, εκφράζεται από τη χημική μετατόπιση (δ), η οποία είναι μέτρο της συχνότητας του συντονισμού (ν_{obs}) σε σχέση με την συχνότητα μιας πρότυπης ουσίας (ν_{ref}): $\delta = 10^6 (\nu_{obs} - \nu_{ref}) / \nu_{spec}$, (15) όπου ν_{spec} είναι η συχνότητα λειτουργίας του φασματοφωτομέτρου (305, 307).

8,2,3,3 Χρόνοι αποδιέγερσης T_1 και T_2

Κατά την εφαρμογή ενός παλμού ραδιοσυχνοτήτων, τα πυρηνικά spins μεταπίπτουν στην υψηλότερη ενεργειακή στάθμη που είναι παράλληλη ως προς το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Μετά την απομάκρυνση του παλμού, οι πυρήνες τείνουν να επανέλθουν στην αρχική κατάσταση θερμικής ισορροπίας. Υπάρχουν 2 μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να επέλθει αποδιέγερση εντός μαγνητικού πεδίου, η διάρκεια των οποίων χαρακτηρίζεται από τους αντίστοιχους χρόνους αποδιέγερσης. Κατά την πρώτη διεργασία η

αποβολή της ενέργειας γίνεται με την αλληλεπίδραση των πυρήνων με ταλαντευόμενα τοπικά μαγνητικά πεδία, που δημιουργούνται από το ατομικό και ηλεκτρονιακό περιβάλλον τους (πλέγμα), είναι γνωστή ως αποδιέγερση spin-πλέγματος και χαρακτηρίζεται από το χρόνο T_1 . Κατά τη δεύτερη διεργασία, η ανταλλαγή ενέργειας γίνεται μεταξύ των διεγερμένων πυρήνων και άλλων πυρήνων που βρίσκονται στη βασική κατάσταση. Αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός ως αποδιέγερση spin-spin και χαρακτηρίζεται από τον αντίστοιχο χρόνο T_2 (305, 307).

8,2,3,4 Φάσματα NMR δύο διαστάσεων

Η φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης, έχει αποδειχθεί πολύτιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό της δομής μικρών μορίων. Εντούτοις, όταν μελετάμε ένα μεγάλο σύστημα, όπως ένα πολυπεπτίδιο ή μια πρωτεΐνη με NMR, υπάρχει ένα πλήθος κορυφών που χαρακτηρίζονται από πολύ μικρή διαφορά στην χημική μετατόπιση. Ως εκ τούτου, η αλληλεπικάλυψη σημάτων και η επαγόμενη απώλεια πληροφορίας, είναι αναπόφευκτη ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται όργανα με μεγάλη διακριτική ικανότητα. Το τελευταίο πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί με την επέκταση των πειραμάτων σε μία δεύτερη διάσταση. Η βασική αρχή της φασματοσκοπίας NMR πολλαπλών διαστάσεων, είναι η εύρεση κορυφών διασταύρωσης (cross-peaks), οι οποίες είναι ενδεικτικές της ύπαρξης αλληλεπίδρασης μεταξύ 2 πυρήνων. Η σύνδεση αυτή, μπορεί να πραγματοποιείται είτε μέσω χώρου, είτε μέσω ενός μικρού αριθμού χημικών δεσμών και η εύρεση τους επιτρέπει τον καθορισμό της χωρικής σχέσης των εν λόγω πυρήνων.

Τα πειράματα δύο διαστάσεων συνίστανται από 4 διαφορετικά στάδια, τα οποία αποτελούν μία παλμική ακολουθία. Κατά το αρχικό στάδιο της προετοιμασίας (preparation), ένας παλμός ραδιοσυχνότητας εφαρμόζεται στο δείγμα. Ακολουθεί μία φάση ανάπτυξης (evolution) διάρκειας t_1 κι εν συνεχεία μία περίοδος ανάμιξης (mixing), όπου μαγνήτιση μεταφέρεται από τον έναν πυρήνα στον άλλον και τελειώνει με έναν δεύτερο παλμό. Τελικά, μία ελεύθερη επαγόμενη απόσβεση της μαγνήτισης πραγματοποιείται για χρόνο t_2 κατά το στάδιο της ανίχνευσης και καταγραφής του σήματος (data acquisition). Στο πραγματικό πείραμα οι τιμές t_1 μεταβάλλονται αυξητικά και κάθε φορά μία ελεύθερη επαγόμενη απόσβεση για χρόνο t_2 καταγράφεται και αποθηκεύεται ξεχωριστά. Κατ' αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μια μήτρα δεδομένων $S(t_1, t_2)$, ο μετασχηματισμός Fourier της οποίας παράγει το επιθυμητό φάσμα συχνοτήτων $S(\omega_1, \omega_2)$ (305).

Σε ένα φάσμα δύο διαστάσεων, οι κορυφές που βρίσκονται πάνω στην διαγώνιο, έχουν την ίδια συχνότητα και στις 2 διαστάσεις και αντιστοιχούν στο φάσμα μιας διάστασης. Αντίθετα, κορυφές (cross-peaks) που βρίσκονται εκτός της διαγωνίου, αναπαριστούν περιπτώσεις όπου διαφορετικοί πυρήνες αλληλεπιδρούν κατά την περίοδο ανάμιξης. Τα πυρηνικά spins που αλληλεπιδρούν μπορεί να είναι είτε του ίδιου τύπου (ομοπυρηνικά), είτε διαφορετικού (ετεροπυρηνικά), ανάλογα με το είδος της χρησιμοποιούμενης παλμικής ακολουθίας.

8,2,3,4,1 Ομοπυρηνικά Φάσματα δύο διαστάσεων

Σε ομοπυρηνικά πειράματα συσχέτισης (Correlation Spectroscopy, COSY (308) και Total Correlation Spectroscopy, TOCSY (309, 310)), οι κορυφές διασταύρωσης προκύπτουν από τη συσχέτιση πυρήνων, μέσω δεσμών. Το COSY αποτελεί το κλασσικό πείραμα 2 διαστάσεων και χρησιμοποιείται για την συσχέτιση πυρήνων που βρίσκονται αρκετά κοντά στη δομή του μορίου, ώστε να προκαλούν σύζευξη κι επομένως χωρίζονται το πολύ από 3 ομοιοπολικούς δεσμούς. Το TOCSY πείραμα έχει την ίδια εμφάνιση με το COSY, αλλά ξεπερνάει τον περιορισμό του τελευταίου, δεδομένου ότι μπορεί να μεταβιβάζει μαγνήτιση, μεταξύ πυρήνων που δεν συζεύγνυνται άμεσα, αλλά ανήκουν στο ίδιο σύστημα spin. Γι' αυτό το λόγο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την ανάλυση πεπτιδίων που αποτελούνται από διακεκριμένα συστήματα spin (αμινοξέα).

8,2,3,4,2 Ετεροπυρηνικά Φάσματα δύο διαστάσεων

Ένα από τα πιο χρήσιμα 2D πειράματα, είναι το HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) (307). Το ^{15}N -HSQC, επιλεκτικά ανιχνεύει ζεύγη N-H που συνδέονται μέσω ομοιοπολικού δεσμού. Κάθε κορυφή στο φάσμα, αντιπροσωπεύει ένα τέτοιο ζεύγος, όπου η συχνότητα στον οριζόντιο άξονα είναι η συχνότητα συντονισμού των πρωτονίων, ενώ στον κάθετο η συχνότητα συντονισμού του ομοιοπολικά συνδεδεμένου ατόμου αζώτου. Κάθε αμινοξικό κατάλοιπο, σε μια πρωτεΐνη ή πεπτίδιο (εκτός της Pro), περιέχει μια αμιδική ομάδα και συνεπώς σε ένα ^{15}N -HSQC φάσμα εμφανίζεται μία κορυφή για κάθε αμινοξύ. Αμιδικές ομάδες, των πλευρικών αλυσίδων όπως της Lys και της Arg δίνουν πρόσθετες κορυφές. Ανάλογο είναι το πείραμα ^{13}C -HSQC, με τη διαφορά ότι οι κορυφές οφείλονται σε ομοιοπολικά συνδεδεμένα ζεύγη C-H.

- (i) Ταυτοποίηση (assignment) των παρατηρούμενων κορυφών διασταύρωσης από τη συνδιασμένη ανάλυση των διαθέσιμων φασμάτων (TOCSY, ^{15}N -HSQC, ^{13}C -HSQC στη δικιά μας περίπτωση). Ειδικότερα, ταυτοποιούνται οι ενδομοριακές συζεύξεις κάθε αμινοξέως, οι οποίες είναι μια χαρακτηριστική και αναγνωρίσιμη ομάδα σημάτων στα φάσματα TOCSY (spin pattern).
- (ii) Ταυτοποίηση των σημάτων σε συγκεκριμένους πυρήνες εντός της δομής. Αυτό πραγματοποιείται με την μεταφορά των δεδομένων από τα πειράματα TOCSY, στα φάσματα NOESY και ανάλυση των NOE σημάτων, ώστε να αποδοθούν τα spin patterns σε συγκεκριμένα κατάλοιπα εντός της αμινοξικής αλληλουχίας. Στη συνέχεια εξάγονται όσες γεωμετρικές πληροφορίες μπορούν να εξαχθούν από τα NOESY φάσματα και οι οποίες περιλαμβάνουν τις ακολουθιακές συζεύξεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, τις συζεύξεις μέσης απόστασης και όσες συζεύξεις μακράς απόστασης μπορούν να ταυτοποιηθούν.
- (iii) Μετατροπή της έντασης των NOE σημάτων σε απόσταση, υπό τη μορφή ανώτατων ορίων διατομικών αποστάσεων και εισαγωγή σε κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα υπολογισμού της δομής. Ο υπολογισμός της δομής γίνεται με τη χρήση του πρωτοκόλλου ανόπτησης (simulated annealing). Σύμφωνα με αυτό, μία αρχική δομή θερμαίνεται σε υψηλή θερμοκρασία, ακολουθούμενη από ψήξη. Κατά τα στάδια ψήξης του συστήματος, η αρχική δομή μπορεί να αναπτυχθεί προς μία ενεργειακά προτιμητέα διαμόρφωση, η οποία ικανοποιεί τους πειραματικά εισαγόμενους περιορισμούς. Μετά το πέρας των υπολογισμών, εξάγεται ένας συγκεκριμένος αριθμός δομών. Αυτές αποτελούν μία οικογένεια και συγκλίνουν προς μία διαμόρφωση.
- (iv) Βελτιστοποίηση της δομής μέσω ελαχιστοποίησης της ενέργειάς του συστήματος (energy minimization) χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής μηχανικής, και πιο συγκεκριμένα το πεδίο δυνάμεων AMBER.

8,2,3,6 Chemical Shift Index (CSI)

Οι χημικές μετατοπίσεις, μπορούν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για την δευτεροταγή δομή μιας πρωτεΐνης. Η CSI είναι μια απλή, ποσοτική και ακριβής εμπειρική μέθοδος για τον προσδιορισμό στοιχείων δευτεροταγούς δομής. Αυτή, βασίζεται στην παρατήρηση ότι οι χημικές μετατοπίσεις διαφόρων πυρήνων των αμινοξέων, υφίστανται μετατόπιση σε υψηλότερο ή χαμηλότερο πεδίο (upfield, downfield shift), σε σχέση με τις συνήθεις τιμές που

λαμβάνουν στην τυχαία περιελισσόμενη δομή (random coil configuration), όταν βρίσκονται σε δομικές περιοχές α-έλικας ή β-φύλλου. Πιο συγκεκριμένα, οι πυρήνες των α-πρωτονίων (H_α) και β-ατόμων άνθρακα (C_β), μετατοπίζονται σε υψηλότερο πεδίο σε έλικες και σε χαμηλότερο πεδίο σε β-φύλλα. Το αντίθετο συμβαίνει για τους πυρήνες των α-ατόμων άνθρακα (C_α) και καρβονυλικών ατόμων άνθρακα (CO) του πεπτιδικού δεσμού. Στο αρχικό στάδιο του αλγορίθμου της CSI ανάλυσης, οι πειραματικές χημικές μετατοπίσεις συγκρίνονται με τις random coil χημικές μετατοπίσεις και μία τιμή -1, 0 ή 1 δίνεται σε κάθε μία από αυτές, ανάλογα με το αν είναι χαμηλότερη, ίση ή μεγαλύτερη. Όταν οι χημικές μετατοπίσεις για τουλάχιστον τριών εκ των τεσσάρων προαναφερθέντων πυρήνων είναι γνωστές, ο αλγόριθμος επιτρέπει μία συναινετική πρόβλεψη (consensus), η οποία βασίζεται στη δομή που παράγεται μέσω δύο εκ των τριών, ή τριών εκ των τεσσάρων πυρηνικών συγκρίσεων (311-314).

8,2,3,7 Πειραματική Πορεία

Τα πειράματα NMR, καταγράφηκαν σε διαλύματα πεπτιδίων συγκέντρωσης 1 mM, 99% D_2O , σε pH 8,6 και 10,3, για τα πεπτίδια 1 και 2 αντίστοιχα, απουσία και παρουσία ιόντων Ni^{2+} . Ειδικότερα για το πεπτίδιο 2, καταγράφηκε μία πρόσθετη σειρά φασμάτων σε pH 2,5, σε διαλύματα συγκέντρωσης 10 mM, 10% D_2O , απουσία του μεταλλικού ιόντος. Το pH των διαλυμάτων ρυθμίστηκε με την προσθήκη μικρών ποσοτήτων διαλύματος KOH. Η τιτλοδότηση του διαλύματος πεπτιδίου με ιόντα Ni^{2+} , πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαλύματος $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, συγκέντρωσης 0,13M.

Η καταγραφή των φασμάτων, πραγματοποιήθηκε σε Bruker Avance φασματογράφους 400, 500, 600 και 700 MHz, στους 298 K. Ο κορεσμός του σήματος του νερού επιτεύχθηκε με χρήση της παλμικής ακολουθίας 'presaturation' ή 'pulse gradient'. Τα TOCSY φάσματα καταγράφηκαν με χρήση της MLEV-17 spin-lock παλμικής ακολουθίας με χρόνους μίξης 60 και 100 ms. Τα NOESY φάσματα καταγράφηκαν με χρόνους μίξης 100 και 500 ms ενώ για τα ROESY πειράματα ο αντίστοιχος χρόνος ήταν 110 ms. Όλα τα NMR πειράματα επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το TOPSPIN λογισμικό της Bruker, και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CARRA. Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

Ο υπολογισμός της τριτοταγούς δομής του επίπεδου τετραγωνικού συμπλόκου του νικελίου με το πεπτίδιο 2, πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα CYANA (version 2,1) (315), χρησιμοποιώντας το e-NMR infrastructure, για online υπολογισμούς (316). Η εισαγωγή του

μεταλλικού ιόντος στην αμινοξική αλληλουχία επιτεύχθηκε μέσω ενός συνδετικού μέσου (linker), αποτελούμενο από ψευδοάτομα. Η γεωμετρία του συμπλόκου, διατηρήθηκε ίδια με τη δομή του αναλόγου συμπλόκου $[Ni^{II}(\text{Gly-Gly-}\alpha\text{-υδροξύλ-D,L-ισταμίνη})]\cdot 3H_2O$, η κρυσταλλική δομή του οποίου είναι γνωστή (268). Για το σκοπό αυτό, η απόσταση του μεταλλικού ιόντος από τα συμπλεγμένα άτομα αζώτου, περιορίστηκε από 1,8 έως 2,2 Å και οι γωνίες μεταξύ του μετάλλου και των ατόμων αζώτου τέθηκαν στις τιμές του αναλόγου, ώστε να διατηρηθεί η επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Τα 20 διαμορφομερή με τη χαμηλότερη ενέργεια αποτελούν την τελική οικογένεια δομών. Η μέση δομή η οποία παράχθηκε με το πρόγραμμα MOLMOL (317), βελτιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων AMBER του προγράμματος Hyperchem, μέσω ελαχιστοποίησης της ενέργειας του συστήματος υπό κενό, με τη μέθοδο βαθμίδωσης της ενέργειας και χρήσης του αλγορίθμου Polak-Ribiere (318).

Πίνακας 3. Παράμετροι καταγραφής των NMR πειραμάτων

Πειράματα	Αριθμός δεδομένων (πυρήνας) (data points)			spectral width (ppm)		
	t_3	t_2	t_1	F_3	F_2	F_1
Πεπτίδιο1						
$[^1H\text{-}^1H]\text{-TOCSY}^{\alpha}$	-	2048 (1H)	512 (1H)	-	10 (1H)	10 (1H)
$[^1H\text{-}^1H]\text{-NOESY}^{\alpha}$	-	2048 (1H)	512 (1H)	-	10 (1H)	10 (1H)
$[^1H]\text{-}^{13}C\text{-HSQC}^{\alpha}$	-	1024 (1H)	512 (1H)	-	11 (1H)	80 (1H)
Πεπτίδιο2						
$[^1H\text{-}^1H]\text{-TOCSY}^{\beta}$	-	2048 (1H)	512 (1H)	-	10 (1H)	10 (1H)
$[^1H\text{-}^1H]\text{-NOESY}^{\beta}$	-	2048 (1H)	576 (1H)	-	10 (1H)	10 (1H)
$[^1H\text{-}^1H]\text{-NOESY}^{\beta}$	-	2048 (1H)	576 (1H)	-	10 (1H)	10 (1H)
$[^1H]\text{-}^{13}C\text{-HSQC}^{\beta}$	-	2048 (1H)	384 (1H)	-	10 (1H)	80 (1H)
$[^1H]\text{-}^{15}N\text{-HSQC}^{\gamma}$	-	1024 (1H)	512 (^{15}N)	-	12 (1H)	40 (^{15}N)
$[^1H\text{-}^1H\text{-}^{15}N]\text{-NHHA}^{\gamma}$	1024 (1H)	128 (1H)	16 (^{15}N)	13 (1H)	13 (1H)	37 (^{15}N)

$^{\alpha}$ καταγραφή σε φασματογράφο 600 MHz

$^{\beta}$ καταγραφή σε φασματογράφο 700 ή 600 MHz

$^{\gamma}$ καταγραφή σε φασματογράφο 700 MHz

8,2,4 Φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR)

8,2,4,1 Βασικές Αρχές

Ο ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός (EPR), είναι μια ιδιαίτερα αποτελεσματική τεχνική για την μελέτη μορίων που περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι βασικές αρχές είναι παρόμοιες με αυτές του NMR, με την διαφορά ότι οι μαγνητικές ροπές επάγονται από το ηλεκτρονικό spin και συνεπώς οι συχνότητες συντονισμού βρίσκονται στην περιοχή των μικροκυμάτων. Σε σύμπλοκα μετάλλων στοιχείων μετάπτωσης, η ηλεκτρονική πυκνότητα του ασύζευκτου ηλεκτρονίου δεν είναι εντοπισμένη σε συμμετρικά s τροχιακά, όπως στις ελεύθερες ρίζες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανισοτροπία των μετρήσεων, δεδομένου ότι οι άξονες x, y και z μπορεί να μην είναι ισοδύναμοι. Έτσι ένα φάσμα EPR μπορεί να είναι ισοτροπικό, αξονικό ή ρομβικό (299).

Σε ένα φάσμα EPR, η παράμετρος g είναι το ανάλογο της χημικής μετατόπισης στο NMR, και δίνεται από τη σχέση: $g = h\nu/\beta_e H_0$ (17), όπου ν είναι η συχνότητα των μικροκυμάτων ($\nu \sim 9\text{GHz}$ για X-band φασματοφωτόμετρα) που εφαρμόζεται κάθετα στο εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο H_0 ($H_0 \sim 0,3\text{-}1,2\text{ T}$), β_e η μαγνητόνη του Bohr ($0,92 \times 10^{-23}\text{ J}\cdot\text{T}$) και h η σταθερά του Planck ($6,636 \times 10^{-34}\text{ J}\cdot\text{s}$).

Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τροχιακή κινητική στροφορμή λόγω της κίνησης του στο χώρο και κινητική στροφορμή του spin, λόγω της περιστροφής γύρω από τον άξονα του. Η αλληλεπίδραση των 2 κινητικών στροφορμών, καλείται σύζευξη τροχιακού-spin (spin-orbit coupling) και εξαρτάται από το ηλεκτρονικό περιβάλλον. Έτσι οι παράμετροι g πραγματικών παραμαγνητικών ειδών, διαφέρουν από την τιμή g του ελεύθερου ηλεκτρονίου ($g_e=2,0023$) (299, 305, 319).

Οι πυρήνες των μετάλλων στοιχείων μετάπτωσης, διαθέτουν επίσης πυρηνικό spin (I) (π.χ 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 σύζευξη πυρηνικού και ηλεκτρονιακού spin είναι γνωστή ως υπέρλεπτη σύζευξη (hyperfine splitting) και η απόσταση μεταξύ των διαδοχικών φασματικών γραμμών ονομάζεται σταθερά υπέρλεπτης σύζευξης (hyperfine coupling constant). Τέλος, όταν υποκαταστάτες που συνδέονται με το μεταλλικό ιόν, έχουν μη μηδενικό πυρηνικό spin (π.χ N, $I=1$), μπορεί να επέλθει σύζευξη αυτού με το spin του ασύζευκτου ηλεκτρονίου και περαιτέρω κατάτμηση των φασματικών γραμμών μπορεί να παρατηρηθεί, γνωστή ως super-hyperfine splitting. Ο αριθμός των γραμμών που παράγονται σε αυτήν την περίπτωση δίνεται

από τη σχέση $2nI + 1$, όπου n είναι ο αριθμός των ισοδύναμων πυρήνων με spin I , που συνδέονται με το μεταλλικό ιόν (299, 305, 319).

8,2,4,2 Πειραματική πορεία

Τα EPR φάσματα για τα σύμπλοκα του χαλκού με τα πεπτίδια 1 και 2 καταγράφηκαν σε διάφορες τιμές pH, σε διαλύματα συγκέντρωσης 1 mM και αναλογία μετάλλου : υποκαταστάτη 1:1. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός Bruker ER200D φασματογράφου, εφοδιασμένου με έναν Agilent 5310A μετρητή συχνότητας, στους 77 K. Ως διαλύτη χρησιμοποιήσαμε μίγμα γλυκερόλης:H₂O σε αναλογία 1:4, ώστε να διατηρηθεί η ομοιογένεια των παγωμένων δειγμάτων.

9. Χρησιμοποιούμενες Τεχνικές για την Μελέτη της Υδρολύσης και Οξειδωτικής Ικανότητας των Συμπλόκων Πεπτιδίων-Μετάλλων

9,1 Μελέτη της Υδρολυτικής Διάσπασης των Συμπλόκων Πεπτιδίων-Μετάλλων με HPLC

Οι βασικές αρχές της χρωματογραφίας HPLC, έχουν ήδη περιγραφεί στην παράγραφο 7,2,3,1. Προκειμένου να μελετήσουμε την τυχόν υδρολυτική διάσπαση των συμπλόκων νικελίου και χαλκού με τα πεπτίδια 1 και 2, παρασκευάσαμε διαλύματα 0,3 mM, απουσία και παρουσία των μεταλλικών ιόντων Ni^{2+} και Cu^{2+} (σε αναλογία 1:1), σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, ($\text{pH} = 7,4$, $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 0,15M NaCl). Τα διαλύματα επωάστηκαν στους 37°C για χρονικό διάστημα 5 ημερών. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, απομακρύνουμε μικρή ποσότητα των διαλυμάτων (25μl) την οποίαν και αναλύσαμε σε ένα σύστημα HPLC P580 του οίκου Dionex, εφοδιασμένο με αναλυτική στήλη Nucleosil 100 C_{18} 5 μm (250 mm x 4,6 mm).

9,2 Μελέτη της Επίδρασης των Συμπλόκων των Πεπτιδίων με Ni^{2+} και Cu^{2+} στην Οξειδωτική Διάσπαση της Διπλής Έλικας του DNA

9,2,1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (agarose gel electrophoresis)

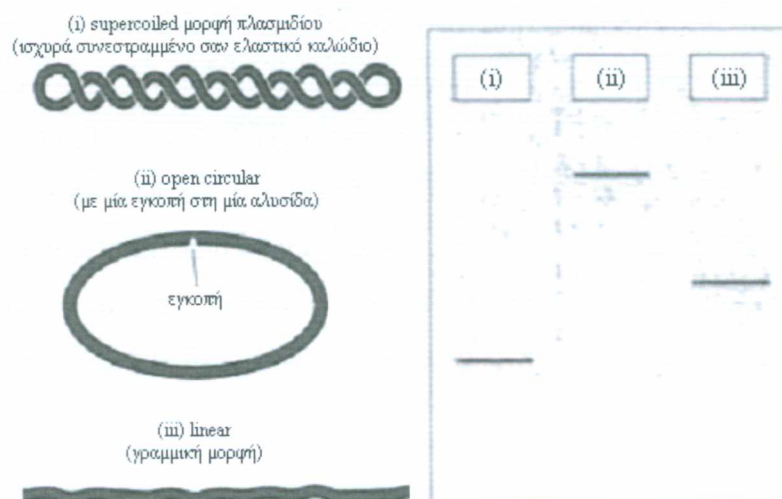
9,2,1,2 Βασικές Αρχές

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης είναι μια συνήθης διαδικασία που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό θραυσματοποιημένων μορίων DNA, που διαφέρουν σε μέγεθος. Η ταχύτητα με την οποία τα διάφορα θραύσματα του DNA μετακινούνται εντός του gel αγαρόζης, εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος τους. Πιο συγκεκριμένα, η ταχύτητα είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μεγέθους των μορίων. Εκτός από το μέγεθος, άλλοι παράγοντες όπως οι ιδιότητες του χρησιμοποιούμενου διαλύτη, η συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη, η ένταση του χρησιμοποιούμενου ρεύματος, όπως και η διαμόρφωση των μορίων του DNA, επηρεάζουν την ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια εντός του gel (320).

Το πλασμιδιακό DNA μπορεί να βρίσκεται σε 3 διαφορετικές διαμορφώσεις:

- (i) ως ομοιοπολικά κλειστό, υπερσπειρωμένο κυκλικό πλασμίδιο (supercoiled)
- (ii) ως ανοιχτό κυκλικό μόριο που περιέχει εγκοπές στη μία αλυσίδα (nicked-open circular)
- (iii) ως γραμμικό, που περιέχει ελεύθερα άκρα (linear).

Εντός των βακτηρίων το πλασμίδιο, εμφανίζεται στην supercoiled μορφή. Από τη στιγμή όμως που θα απομονωθεί μπορεί να βρίσκεται και στις 3 διαμορφώσεις, οι οποίες παρόλο που έχουν το ίδιο μέγεθος, θα παρουσιάζουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα, λόγω διαφοράς στο σχήμα τους (321).



Σχήμα 34. Διαμορφώσεις πλασμιδιακού DNA και διάγραμμα μιας τυπικής ηλεκτροφόρησης σε αгарόζη, που δείχνει την σχετική κινητικότητα των μορφών

Το γεγονός ότι οι 3 μορφές του πλασμιδίου διαχωρίζονται σε μία ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη (Σχήμα 34), μπορεί να εκμεταλλευτεί ώστε να μελετήσουμε την επίδραση των μεταλλικών ιόντων Ni^{2+} και Cu^{2+} , όπως και των συμπλόκων τους με τα πεπτίδια 1 και 2, στην οξειδωτική διάσπαση της διπλής ή μονής έλικας του DNA.

9,2,1,3 Πειραματική πορεία

Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήσαμε ήταν το pUC19 (Sigma Aldrich), το οποίο είναι διαθέσιμο σε πολύ μικρές ποσότητες (υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 453μg/ml, συνολικού όγκου 23μL). Οι παρακάτω διαδικασίες επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό της συγκέντρωσης του και κρίνονται απαραίτητες.

9,2,1,3,1 Βακτηριακός Μετασχηματισμός (Transformation)

Ο βακτηριακός μετασχηματισμός είναι μια διαδικασία κατά την οποία DNA (συνήθως με τη μορφή πλασμιδίου), μεταφέρεται σε ένα βακτηριακό κύτταρο. Γενικά, η διαδικασία αυτή συμβαίνει φυσιολογικά και πολλά βακτήρια δέχονται πλασμίδια από άλλα βακτηριακά

κύτταρα. Σε εργαστηριακό περιβάλλον, τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να γίνουν ικανά στο να δεχτούν ένα ξένο πλασμίδιο με ψήξη στους 0°C , παρουσία CaCl_2 . Αυτό το βήμα, καθιστά το κυτταρικό περίβλημα πιο διαπερατό. Στη συνέχεια τα κύτταρα υφίστανται ένα θερμικό κλονισμό (heat shock) με απότομη θέρμανση στους 42°C και επακόλουθη ψήξη πάλι στους 0°C . Αυτό υποθετικά μεταβάλλει το κυτταρικό περίβλημα, επιτρέποντας στο πλασμίδιο να εισέλθει εντός του βακτηρίου κι εν συνεχεία, κλείνει πάλι την κυτταρική μεμβράνη. Το επόμενο βήμα είναι ένα βήμα ανάκαμψης των κυττάρων από τους προαναφερθέντες εργαστηριακούς χειρισμούς, που συνίσταται από μια βραχεία περίοδο επώασης των κυττάρων με Luria-Bertani (LB) ζωμό, ένα πλήρες θρεπτικό μέσο που περιέχει βιταμίνες, πεπτίδια, ιχνοστοιχεία και μεταλλικά στοιχεία (321).

Η πορεία που ακολουθήσαμε ήταν η εξής: Μεταφέρουμε 200 μL κυττάρων *E. coli* DH10R από τους -80°C σε πάγο (0°C). Αναμιγνύουμε 100 μL από το κυτταρικό αιώρημα με 1 μL από το διάλυμα του πλασμιδίου και επωάζουμε για 20 λεπτά σε πάγο. Θερμαίνουμε στους 42°C για 4 λεπτά, μεταφέρουμε ξανά στον πάγο και κατόπιν προσθέτουμε 1 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου LB. Το διάλυμα αναταρράσσεται για 30 λεπτά στους 37°C , οπότε και 100 μL μεταφέρονται σε τρυβλίο που περιέχει αμπικιλίνη ως αντιβιοτικό και αποθηκεύεται στους -80°C , ώστε να χρησιμοποιηθεί για μελλοντικούς μετασχηματισμούς. Μόνο τα βακτήρια που περιέχουν το πλασμίδιο (που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό) επιζούν και αναπτύσσονται. Η υπόλοιπη ποσότητα, φυγοκεντρείται στις 1000 στροφές ανά λεπτό, για 5 λεπτά και επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο LB. Τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας.

9,2,1,3,2 Καθαρισμός του πλασμιδίου με χρήση του Qiagen Miniprep kit

Η απομόνωση του πλασμιδίου, από τα βακτηριακά κύτταρα έγινε με τη χρήση του QIAprep 8 miniprep kit της Qiagen, ακολουθώντας το αντίστοιχο πρωτόκολλο. Η όλη διαδικασία βασίζεται στην αλκαλική λύση των κυττάρων, ακολουθούμενη από απορρόφηση του DNA σε σίλικα, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης άλατος και συνίσταται από 3 στάδια: (i) Λύση των κυττάρων (ii) Απορρόφηση του DNA στην μεμβράνη QIAprep (iii) καθαρισμός και έκπλυση του πλασμιδιακού DNA. Μετά την απομόνωση του πλασμιδίου, ακολουθεί διάλυση του σε αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό και φωτομέτρηση του διαλύματος στα 260 nm για τον υπολογισμό της συγκέντρωσής του.

9,2,1,3,3 Προπαρασκευή

Για την παρασκευή των διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης, παρασκευάστηκαν stock διαλύματα των πεπτιδίων ($C = 8,0 \times 10^{-5} \text{ M}$), μεταλλικών ιόντων ($C = 2,0\text{--}8,0 \times 10^{-5} \text{ M}$) και H_2O_2 ($C = 10^{-2} \text{ M}$). Τα stock διαλύματα του πλασμιδίου pUC19 που χρησιμοποιήσαμε ($C = 1,2 \text{ μg/μL}$ και $1,6 \text{ μg/μL}$), ελήφθησαν έπειτα από μετασχηματισμό του εμπορικώς διαθέσιμου πλασμιδίου σε βακτηριακά κύτταρα και καθαρισμό με το Qiagen Miniprep kit, όπως περιγράφεται παραπάνω. Λόγω της πολύ μικρής συγκέντρωσης των διαλυμάτων σε μεταλλικό ιόν και πεπτίδιο, όλα τα stock διαλύματα καθαρίστηκαν με τη ρητίνη Chelex 100 sodium form, ώστε να μειωθούν οι φυσιολογικά ενυπάρχουσες ιχνοποσότητες μετάλλων μετάπτωσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, παρασκευάστηκε με δις απεσταγμένο νερό, καθαρίστηκε με την ανωτέρω ρητίνη και αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο για 1 ώρα. Όλα τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν (tips, eppendorfs κλπ), αποστειρώθηκαν με πλύση με αιθυλική αλκοόλη.

Το ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο ελήφθη έπειτα από επίδραση του περιοριστικού ενζύμου pstI, στο supercoiled πλασμίδιο. Συγκεκριμένα, 5 mg pUC19, επώαστηκαν με 3 mg pstI, σε pH 7,5, στους 37°C για 4 ώρες, σε 100mL διαλύματος που περιείχε 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 και 10 mM διθειοερυθριτόλη. Η πληρότητα της αντίδρασης, εκτιμήθηκε με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος και εμφάνιση μιας μπάντας, μεγέθους 2,7 kb. Μετά την πλήρη μετατροπή, το pstI ένζυμο, αδρανοποιήθηκε με θέρμανση του δείγματος στους 65°C για 10 λεπτά, ακολουθούμενη από ψήξη σε πάγο.

9,2,1,3,4 Ηλεκτροφόρηση

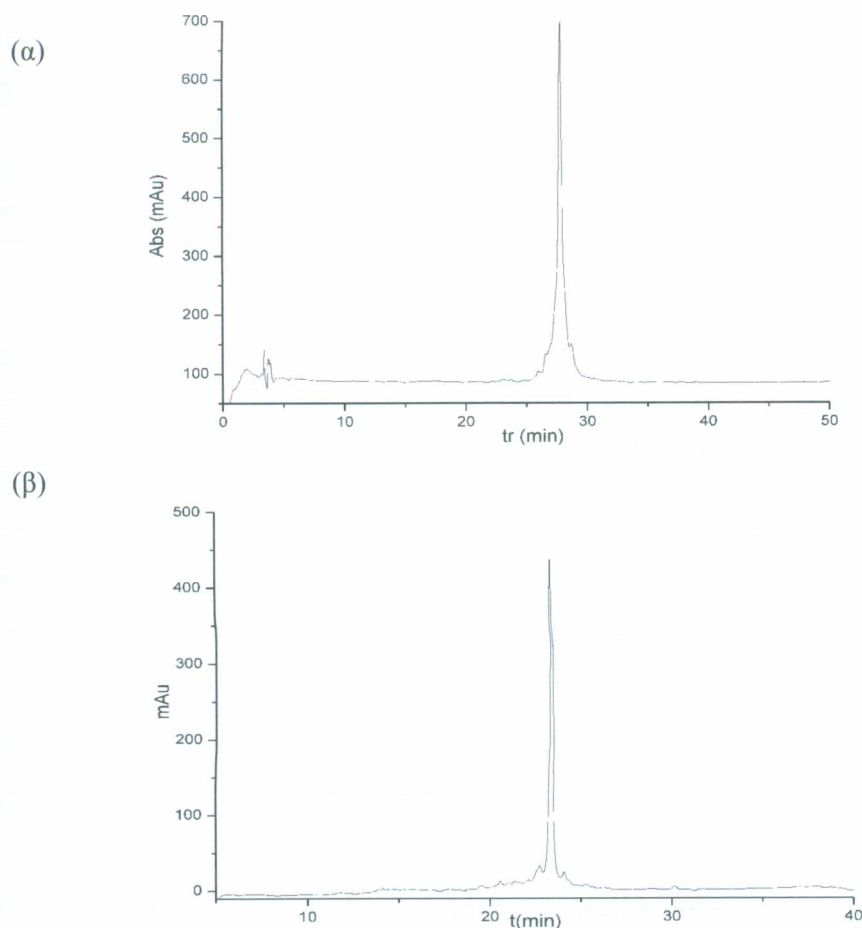
Όλα τα διαλύματα που παρασκευάσαμε περιείχαν πλασμίδιο σε συγκεντρώσεις 0,06-0,08 μg/μL , σε διαλύτη PBS (pH 7,4) και/ή πεπτίδιο ($C=8\text{μM}$) και/ή μέταλλο ($C=8\text{μM}$), και/ή H_2O_2 ($C=1\text{mM}$), ώστε να καλυφθούν όλοι οι δυνατοί συνδιασμοί. Ο τελικός όγκος των διαλυμάτων ήταν 10 μL και η παρασκευή τους πραγματοποιήθηκε με προσθήκη των συστατικών πάντοτε κατά την ίδια σειρά (πρώτα το πλασμίδιο στο PBS, ακολουθούμενο από προσθήκη κατά σειρά του πεπτιδίου, του διαλύματος των μεταλλικών ιόντων και του H_2O_2). Για την μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του μεταλλικού ιόντος στην οξειδωτική διάσπαση του DNA χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις ιόντων από 2-64 μM . Μετά την παρασκευή τους, όλα τα διαλύματα επώαστηκαν στους 37°C στο σκοτάδι, για χρονικό διάστημα από 1-16 ώρες σε ένα PTC-100 Thermal Controller, του οίκου MJ Research, Inc.

Μετά το τέλος της επώασης, τα διαλύματα αναμίχθηκαν με 2 μL χρωστικής (loading dye solution) και υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση, για 1-3 ώρες στα 60-100 Volts, σε πηκτική αгарόζης 1%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο, (10-20 μL EtBr /100 mL TBE) χρησιμοποιώντας διαλύτη TBE (Tris-base (2-άμινο-2-(υδροξυμέθυλο)-1,3-προπανοδιόλη) / βορικό οξύ / EDTA / H_2O). Το ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο pUC19 που παράχθηκε από την επίδραση του περιοριστικού ενζύμου pstI, χρησιμοποιήθηκε ως μπάντα αναφοράς για την διάσπαση της διπλής έλικας του DNA. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, τα gels ακτινοβολήθηκαν στο υπεριώδες (UV-transilluminator, Herolab UVT-20M), φωτογραφήθηκαν με τη χρήση κάμερας Kodac Digital Science και αναλύθηκαν με το ImageQuant TL (v. 2005) λογισμικό.

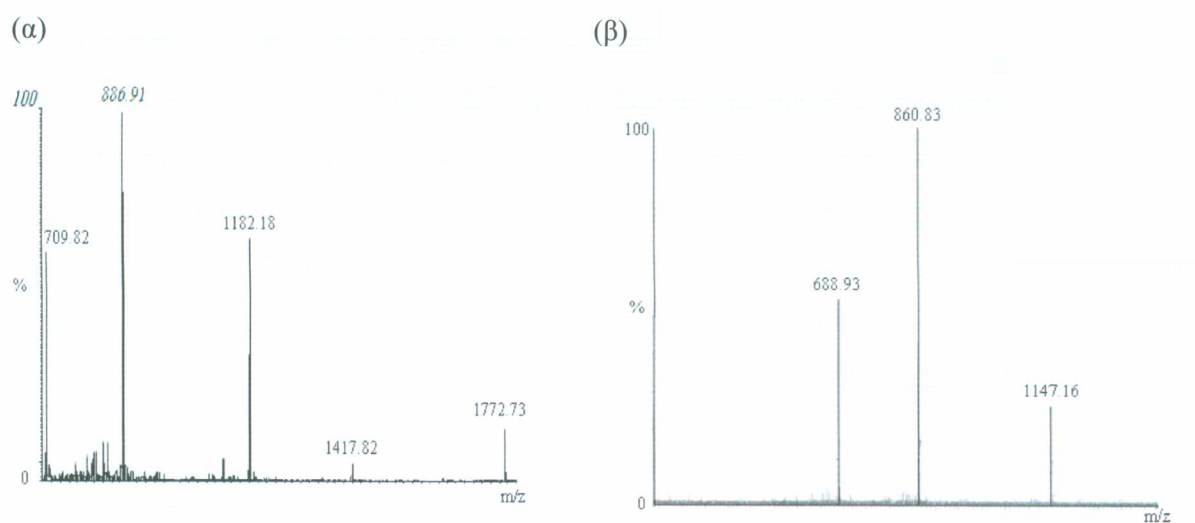
Αποτελέσματα και Συζήτηση

10,1 Ταυτοποίηση συντιθέμενων πεπτιδίων

Στο Σχήμα 35, παρατίθενται τα αναλυτικά χρωματογραφήματα των πεπτιδίων, έπειτα από καθαρισμό τους με χρωματογραφία πηκτής και ημιπαρασκευαστική HPLC, ανάλυση των οποίων δείχνει ότι τα συντιθέμενα πεπτίδια είναι υψηλής καθαρότητας (>98%). Τα ESI-MS φάσματα των πεπτιδίων δίνονται στο Σχήμα 36. Οι κορυφές m/z , που παρατηρούνται βρίσκονται πολύ κοντά στις θεωρητικά αναμενόμενες. Παρόμοια συμπεράσματα σχετικά με την καθαρότητα και ταυτοποίηση των πεπτιδίων μπορούν να εξαχθούν από τα NMR φάσματα αυτών. Οι χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ταυτοποιήθηκαν, έπειτα από συνδιασμένη ανάλυση των φασμάτων TOCSY, ^{13}C -HSQC, ^{15}N -HSQC, 3D-HNHA και αποδόθηκαν σε συγκεκριμένους πυρήνες εντός της αμινοξικής ακολουθίας με την βοήθεια πειραμάτων NOESY και ROESY (Πίνακες 20, 21, 23 παραρτήματος).



Σχήμα 35. Αναλυτικά χρωματογραφήματα σε σύστημα ακετονιτρίλιο – H_2O των πεπτιδίων (α) H2B_{32-62} και (β) H2B_{94-125} , έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία πηκτής και ημιπαρασκευαστική HPLC



(γ)

πεπτίδιο	Θραύσμα	m/z θεωρητικό	m/z πειραματικό
1 H2B ₃₂₋₆₂	$[M + 2H]^{2+}$	1773	1772.73
	$[M + 3H]^{3+}$	1182.3	1182.18
	$[M + 4H]^{4+}$	887	886.91
	$[M + 5H]^{5+}$	709.8	709.82
2 H2B ₉₄₋₁₂₅	$[M + 3H]^{3+}$	1147	1147.16
	$[M + 4H]^{4+}$	860.5	860.83
	$[M + 5H]^{5+}$	688.6	688.93

Σχήμα 36. ESI (+) - MS φάσματα πεπτιδίου (α) H2B₃₂₋₆₂ (β) H2B₉₄₋₁₂₅
(γ) θεωρητικές και πειραματικές τιμές m/z θραυσματοποιημένων ιόντων

10,2 Χαρακτηρισμός των ελεύθερων υποκαταστατών και προσδιορισμός των τιμών pK_a των όξινων ομάδων τους.

Οι σταθερές πρωτονίωσης ($\log \beta$) και οι τιμές pK_a των όξινων ομάδων των ελεύθερων πεπτιδίων προσδιορίστηκαν από την ποτενσιομετρική τιτλοδότηση τους και δίνονται στον Πίνακα 5. Πρέπει να σημειώσουμε ότι οι υπολογιζόμενες τιμές είναι σε συμφωνία με τις αντίστοιχες τιμές πεπτιδίων που περιέχουν Glu, Lys, Asp και His στην πρωτοταγή δομή τους (276, 322).

Πίνακας 5. Σταθερές πρωτονίωσης και pK τιμές των όξινων ομάδων των πεπτιδίων σε θερμοκρασία $T = 298\text{ K}$ ($I = 0.2\text{ M KCl}$)

	Σταθερές πρωτονίωσης (log β)								
	HL	H ₂ L	H ₃ L	H ₄ L	H ₅ L	H ₆ L	H ₇ L	H ₈ L	
H2B ₃₂₋₆₂	6.26(6)	10.60(8)	14.21(9)	-	-	-	-		
H2B ₉₄₋₁₂₅	11.65(9)	22.30(5)	32.59(8)	42.51(7)	51.65(7)	57.96(7)	62.32(7)	66,00(7)	
	Τιμές pK _a								
	pK _{Asp}	pK _{Glu} ¹	pK _{Glu} ²	pK _{His}	pK _{Tyr/Lys}	pK _{Tyr/Lys}	pK _{Tyr/Lys}	pK _{Tyr/Lys}	pK _{Tyr/Lys}
H2B ₃₂₋₆₂	3.61	4.34	-	6.26	*	*	*	*	*
H2B ₉₄₋₁₂₅	-	3.68	4.36	6.31	9.14	9.92	10.29	10.65	11.65

* Δεν κατέστη εφικτός ο υπολογισμός των τιμών για τα 3 κατάλοιπα Tyr και τα 4 κατάλοιπα Lys λόγω καταβύθισης του ελεύθερου πεπτιδίου σε $pH > 7,8$.

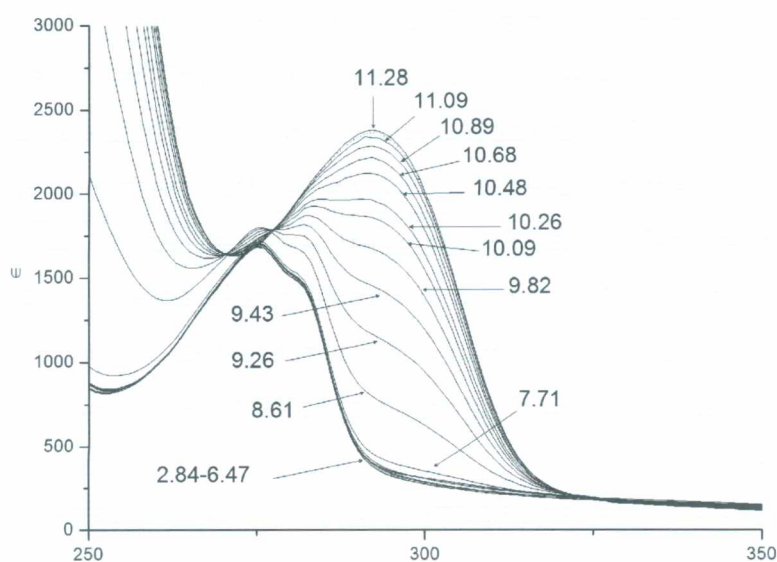
(Οι τυπικές αποκλίσεις του τελευταίου ψηφίου δίνονται σε παρένθεση)

Το πεπτίδιο 1 (H2B₃₂₋₆₂): SRKESYSVYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIM, μπορεί να θεωρηθεί ως ένας υποκαταστάτης του τύπου H₁₀L, δεδομένου ότι περιέχει 10 όξινες ομάδες που μπορούν να ιονιστούν. Αυτές είναι οι ε-αμινομάδες των 4 καταλοίπων Lys, τα φαινολικά υδροξύλια των 3 καταλοίπων Tyr, οι καρβοξυλικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Glu και Asp και το ιμιδαζολικό άζωτο της His. Δυστυχώς, η αναπάντεχη καταβύθιση πεπτιδίου σε $pH > 7,8$ δεν επέτρεψε την ενσωμάτωση των αντίστοιχων πειραματικών σημείων στην επεξεργασία των ποτενσιομετρικών δεδομένων. Ως εκ τούτου, το πεπτίδιο 1 θεωρήθηκε ως ένα τριπρωτικό οξύ του τύπου H₃L και ο υπολογισμός των αντιστοιχών τιμών pK_a κατέστη εφικτός μονάχα για τις διαδοχικές αποπρωτονιώσεις των καταλοίπων Asp, Glu και His.

Το πεπτίδιο 2 (H2B₉₄₋₁₂₅): IQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK, είναι ένας υποκαταστάτης του τύπου H₈L, λόγω της παρουσίας μιας ιστιδίνης, 2 γλουταμικών οξέων, μιας τυροσίνης και 4 καταλοίπων Lys στην πρωτοταγή δομή του. Οι τιμές pK_a για τον

ιονισμό των πλευρικών αλυσίδων των ελεύθερων αμινοξέων Lys και Tyr, είναι παραπλήσιες κι ως εκ τούτου οι τιμές $\log\beta$, που υπολογίσαμε από τα ποτενσιομετρικά δεδομένα δεν μπορούν να αποδοθούν ξεκάθαρα σε ιονισμό κάποιου από τα πέντε συγκεκριμένα κατάλοιπα. Παρόλα αυτά, κάποιες θεωρητικές εκτιμήσεις μπορούν να γίνουν από τα φάσματα απορρόφησης του υποκαταστάτη σε μεταβαλλόμενες τιμές pH. Η μικρο-σταθερά, $pK_a = 9,38$, για την αποπρωτονίωση του φαινολικού υδροξυλίου που υπολογίστηκε από τη μοριακή απορροφητικότητα στα 300 nm, δεν μπορεί να είναι χαμηλότερη από την μακρο-σταθερά, δεδομένου ότι όλα τα είδη παρόμοιας στοιχειομετρίας αλλά διαφορετικής θέσης εντοπισμού του πρωτονίου, συνεισφέρουν στην αποπρωτονίωση. Εξάλλου, η μακρο-σταθερά θεωρητικά προκύπτει από το άθροισμα των μικρο-σταθερών όλων των μικρο ειδών που συμμετέχουν στην ισορροπία. Με βάση τα παραπάνω, από τις 5 τιμές pK_a που δίνονται στον Πίνακα 5 και αναφέρονται στην αποπρωτονίωση των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Lys και Tyr, μονάχα η τιμή 9,14 είναι μικρότερη από την τιμή 9,38 και συνεπώς είναι αυτή που εκφράζει κυρίως την αποπρωτονίωση του φαινολικού υδροξυλίου. Έτσι, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι σε $pH = 9,14$, η συγκέντρωση πεπτιδίου με αποπρωτονιωμένη Tyr, είναι μεγαλύτερη από την συγκέντρωση πεπτιδικού υποκαταστάτη, με πρωτονιωμένη Tyr και αποπρωτονιωμένη πλευρική αλυσίδα κάποιας εκ των 4 λυσινών.

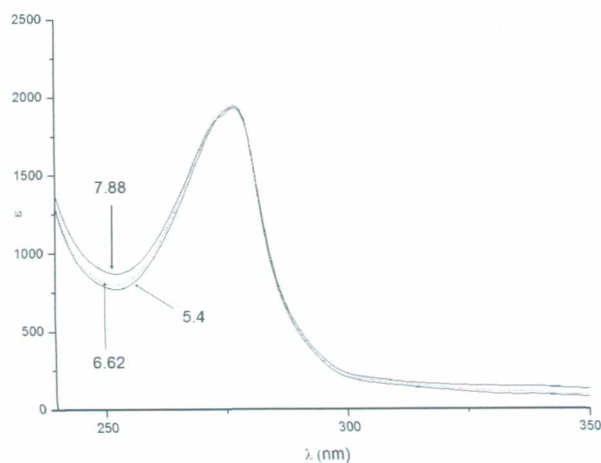
Στο Σχήμα 37, παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅, σε μεταβαλλόμενες τιμές pH. Όπως γίνεται αντιληπτό, η απορρόφηση κοντά στην περιοχή του υπεριώδους αλλάζει δραματικά, όταν το pH μεταβάλλεται από 7,71 σε 11,28. Συγκεκριμένα,



Σχήμα 37. Φάσματα απορρόφησης του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅, σε μεταβαλλόμενες τιμές pH

παρατηρείται μια αύξηση στη μοριακή απορροφητικότητα στην περιοχή κοντά στα 250 nm, ενώ το μήκος κύματος στο οποίο έχουμε μέγιστη απορρόφηση ($\lambda_{\max}$), μετατοπίζεται από τα 275 στα 293 nm. Αυτές οι μεταβολές οφείλονται στον ιονισμό του φαινολικού υδροξυλίου της πλευρικής ομάδας της Tyr. Για τα φάσματα στη βασική περιοχή (από pH 8,61 κι άνω) δύο ισοβεστικά σημεία, μπορούν να παρατηρηθούν στα 271 και 277 nm, υποδηλώνοντας την παρουσία περισσότερων του ενός σωματιδίων στην ισορροπία. Αντίθετα, τα φάσματα που καταγράφηκαν στην περιοχή pH 2,84-7,71, δεν εμφανίζουν μετατόπιση του $\lambda_{\max}$, δείχνοντας ότι σε αυτήν την περιοχή, υπάρχει μόνο η πρωτονιωμένη μορφή της Tyr.

Στο Σχήμα 38 παρατίθενται τα φάσματα απορρόφησης του πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂ σε τιμές pH, όπου δεν παρατηρείται καταβύθιση του. Το πεπτίδιο αυτό, περιέχει 3 κατάλοιπα Tyr, τα οποία εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος, $\lambda_{\max}$ = 276 nm. Το γεγονός ότι δεν παρατηρείται καμμία μετατόπιση του $\lambda_{\max}$, σε περιοχές κοντά στα 300 nm, όπου το φαινολικό ιόν απορροφά, υποδηλώνει ότι τουλάχιστον σε αυτές τις περιοχές pH, δεν πραγματοποιείται αποπρωτονίωση κανενός καταλοίπου Tyr.



Σχήμα 38. Φάσματα απορρόφησης του πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂ σε μεταβαλλόμενες τιμές pH

10,3 Αλληλεπιδράσεις πεπτιδίων με τα δισθενή μεταλλικά ιόντα Ni(II) και Cu(II)**10,3,1 Σύμπλοκα χαλκού-πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅**

Τα ποτενσιομετρικά δεδομένα από την τιτλοδότηση διαλύματος του συστήματος H2B₉₄₋₁₂₅/Cu²⁺ με NaOH, προσαρμόζονται καλύτερα θεωρώντας την ύπαρξη 9 διαφορετικών συμπλόκων, με στοιχειομετρία : CuLH₅, CuLH₄, CuLH₃, CuLH₂, CuLH, CuL, CuLH₁, CuLH₂, CuLH₃.

Οι σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων αυτών, όπως υπολογίστηκαν από την προσομοίωση της καμπύλης τιτλοδότησης με τη βοήθεια του προγράμματος Hyperquad, δίνονται στον Πίνακα 6. Στον ίδιο Πίνακα δίνονται και οι σταθερές ιονισμού, log K*, για τα αντίστοιχα σύμπλοκα που σχηματίζονται από την ένταξη των ιόντων Cu²⁺ με το μικρότερο τμήμα –ELAKHA-, ώστε να επιχειρηθεί μια σύγκριση της σταθερότητας των σχηματιζόμενων συμπλόκων και να διερευνηθεί ο ρόλος του αυξανόμενου μεγέθους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στην διαδικασία σύμπλεξης.

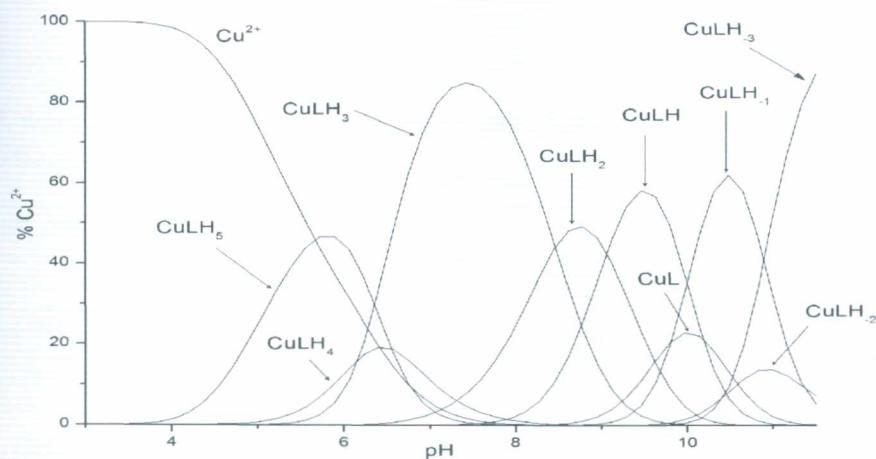
Πίνακας 6. Σταθερές σχηματισμού συμπλόκων Cu²⁺ με το πεπτίδιο H2B₉₄₋₁₂₅, T = 298 K, I = 0.2 M (KC

Σταθερές σχηματισμού συμπλόκων Cu(II) (log β)^a									
	CuLH ₅	CuLH ₄	CuLH ₃	CuLH ₂	CuLH	CuL	CuLH ₁	CuLH ₂	CuLH ₃
H2B ₉₄₋₁₂₅	56,02(4)	49,47(7)	43,31(3)	34,85(5)	25,79(4)	15,61(7)	5,80(4)	5,56(7)	15,98(4)
Διαδοχικές σταθερές ιονισμού (pK_a)									
H2B ₉₄₋₁₂₅	CuLH ₅ CuLH ₄	CuLH ₄ CuLH ₃	CuLH ₃ CuLH ₂	CuLH ₂ CuLH	CuLH CuL	CuL CuLH ₁	CuLH ₁ CuLH ₂	CuLH ₂ CuLH ₃	
	6.55	6.16	8.46	9,06	10.18	9.81	11.36	10.42	
log K*^b									
	1N {N _{Im} }		2N {N _{Im} , N _{amide} ⁻ }		3N {N _{Im} , 2N _{amide} ⁻ }		4N {N _{Im} , 3N _{amide} ⁻ }		
H2B ₉₄₋₁₂₅	-1.94		-8.49		-14.65		-23.11		
ELAKHA	-2.13		-8.88		-		-21.69		

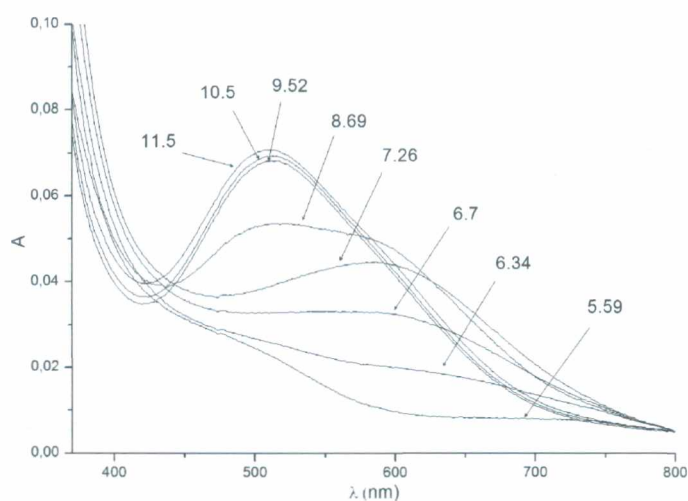
$$^a \beta_j = [\text{MH}_j\text{L}] / [\text{M}] [\text{H}^+]^j [\text{L}]$$

$$^b \log K^* = \log \beta (\text{MLH}_i) - \log \beta (\text{H}_6\text{L})$$

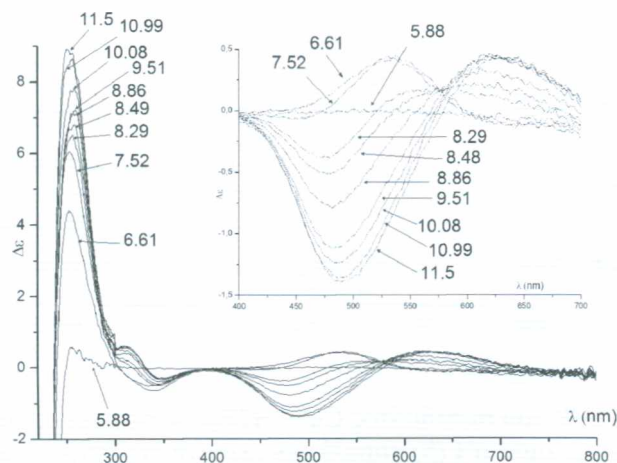
Στο Σχήμα 39, δίνεται το διάγραμμα κατανομής των σχηματιζόμενων συμπλόκων σε διάφορες τιμές pH. Τα φάσματα απορρόφησης (UV-Vis), κυκλικού διχρωισμού (CD) και ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR), τα οποία ελήφθησαν κατά το δυνατό, σε τιμές pH όπου η συγκέντρωση καθενός εκ των σχηματιζόμενων συμπλόκων, φτάνει στη μέγιστη τιμή του, δίνονται στα σχήματα 40, 41 και 42 αντίστοιχα, ενώ οι φασματοσκοπικές παράμετροι που εξάγονται από αυτά και αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο είδος συμπλόκου, συγκεντρώνονται στον Πίνακα 7.



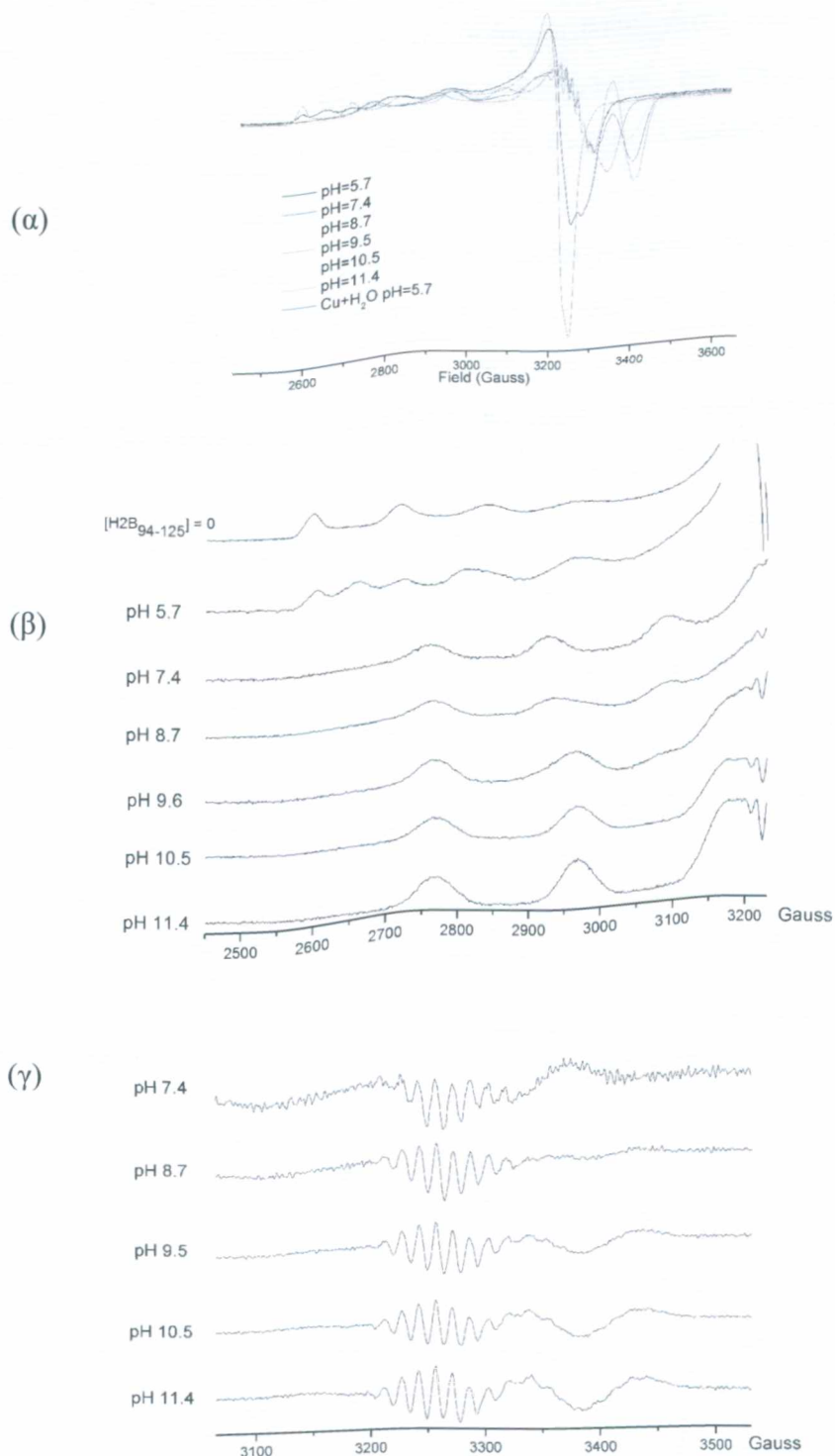
Σχήμα 39. Διάγραμμα κατανομής σχηματιζόμενων συμπλόκων για το σύστημα $\text{Cu}^{2+}/\text{H2B}_{94-125}$ σε μοριακή αναλογία $\text{Cu}^{2+}:\text{H2B}_{94-125}$ 1:1,1 ($C = 0,5 \text{ mM}$)



Σχήμα 40. Φάσματα απορρόφησης του συστήματος $\text{Cu}^{2+}/\text{H2B}_{94-125}$ σε μοριακή αναλογία $\text{Cu}^{2+}:\text{H2B}_{94-125}$ 1:1,1, σε μεταβαλλόμενες τιμές pH



Σχήμα 41. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού του συστήματος $\text{Cu}^{2+}/\text{H2B}_{94-125}$ σε μοριακή αναλογία $\text{Cu}^{2+}:\text{H2B}_{94-125}$ 1:1,1, σε μεταβαλλόμενες τιμές pH



Σχήμα 42. (α) Φάσματα EPR του συστήματος $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ σε μοριακή αναλογία $\text{Cu}^{2+}:\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ 1:1.1, σε μεταβαλλόμενες τιμές pH (β) παράλληλη περιοχή (γ) δεύτερη παράγωγος της κάθετης περιοχής

Πίνακας 7. Φασματοσκοπικοί παράμετροι για σχηματιζόμενα σύμπλοκα ιόντων Cu^{2+} με το πεπτίδιο H2B_{94-125} , στους 298 K

Είδος συμπλόκου	UV-Vis		CD		EPR	
	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{max} (nm)	$\Delta\epsilon$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$g_{\square}$	$A_{\square}$
CuLH_5 (1N)	727	15			2.338	153
CuLH_4 (2N)*						
CuLH_3 (3N)	587	86	340 ^a	-0.64	2.245	165
			534 ^b	+0.42		
CuLH_2 (4N)	515	107	310 ^c	+0.42		
			349 ^a	-0.40		
			482 ^b	-0.79		
			613 ^b	+0.33		
CuLH (4N)	513	132	310 ^c	+0.61	2.204	197
			350 ^a	-0.34		
			485 ^b	-1.11		
			615 ^b	+0.45		
CuL (4N)*						
CuLH_{-1} (4N)	513	134	312 ^c	+0.61	2.200	198
			351 ^a	-0.31		
			486 ^b	-1.24		
			619 ^b	+0.46		
CuLH_2 (4N)*						
CuLH_{-3} (4N)	512	136	313 ^c	+0.48	2.201	198
			352 ^a	-0.32		
			489 ^b	-1.39		
			626 ^b	+0.42		

^a ταινία μεταφοράς φορτίου $\text{N}_{\text{Imidazole}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$

^b d-d μετάπτωση

^c ταινία μεταφοράς φορτίου $\text{N}_{\text{amide}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$

* δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση τους λόγω χαμηλής συγκέντρωσης και/ή επικάλυψης με άλλα είδη

Τα φάσματα EPR που παρατίθενται στο Σχήμα 42(α), είναι τυπικά φάσματα με αξονική ανισοτροπία και χαρακτηρίζονται από τον παράγοντα $g_{\parallel}$ και τη σταθερά υπέρλεπτης σύζευξης $A_{\square}$ στην παράλληλη περιοχή, λόγω σύζευξης του ηλεκτρονικού spin με το πυρηνικό spin του Cu^{2+} ($I=1/2$). Σε αυτήν την περιοχή (Σχήμα 42(β)) παρατηρούνται 3 φασματικές γραμμές. Η 4^η αναμενόμενη αποκρύπτεται από το εύρος της $g_{x,y}$ περιοχής. Σε αυτήν την περιοχή (κάθετη), τα φάσματα που αντιστοιχούν σε τιμές pH 7,4-11,4 εμφανίζουν υπέρ-υπέρλεπτη αλληλεπίδραση, λόγω σύζευξης του ηλεκτρονικού spin με το πυρηνικό spin των υποκαταστατών, η επίλυση της οποίας είναι ευκολότερη στα φάσματα που προκύπτουν από αριθμητική παραγωγή (Σχήμα 42(γ)).

Όπως φαίνεται από την αντίστοιχη καμπύλη κατανομής (Σχήμα 39) η ένταξη των ιόντων Cu^{2+} στο πεπτίδιο H2B_{94-125} , ξεκινάει σε pH περίπου ίσο με 4, με το σχηματισμό του συμπλόκου CuLH_5 , του οποίου η συγκέντρωση μεγιστοποιείται σε pH = 5,9. Η τιμή, $\log K^* = -1,94$ είναι παραπλήσια με αυτές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για μονοδοντική σύμπλεξη (1N) του ιόντος Cu^{2+} στο ιμιδαζολικό άζωτο ενός καταλοίπου His (όπως στις περιπτώσεις των πεπτιδίων Ac-TRSRSHTSEGTRSR-Am ($\log K^* = -2,09$) (323) και Ac-EVRHQKL VFFAEDVGSNK-Am ($\log K^* = -1,95$) (324)), υποδηλώνοντας παρόμοιο τρόπο σύμπλεξης. Αυτός επιβεβαιώνεται από το φάσμα EPR σε pH=5,7 και πιο συγκεκριμένα από τις τιμές της σταθεράς υπέρλεπτης σύζευξης και του παράγοντα g ($A_{\parallel} = 153$, $g_{\parallel} = 2,338$) οι οποίες είναι τυπικές για 1N{ N_{Im} } σύμπλεξη (325-327), όπως και από την τιμή $\lambda_{\text{max}} = 727$ nm, που προκύπτει από το φάσμα απορρόφησης στην ορατή περιοχή. 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 ($\lambda_{\text{max}} = 760$ nm), θεωρώντας ότι το ισημερινό επίπεδο του συμπλόκου καταλαμβάνεται από το ιμιδαζολικό άζωτο και 3 μόρια νερού, αποτελεί ένδειξη της συμμετοχής της καρβοξυλικής ομάδας ενός εκ των δύο καταλοίπων Glu, στη σφαίρα ένταξης του χαλκού (242).

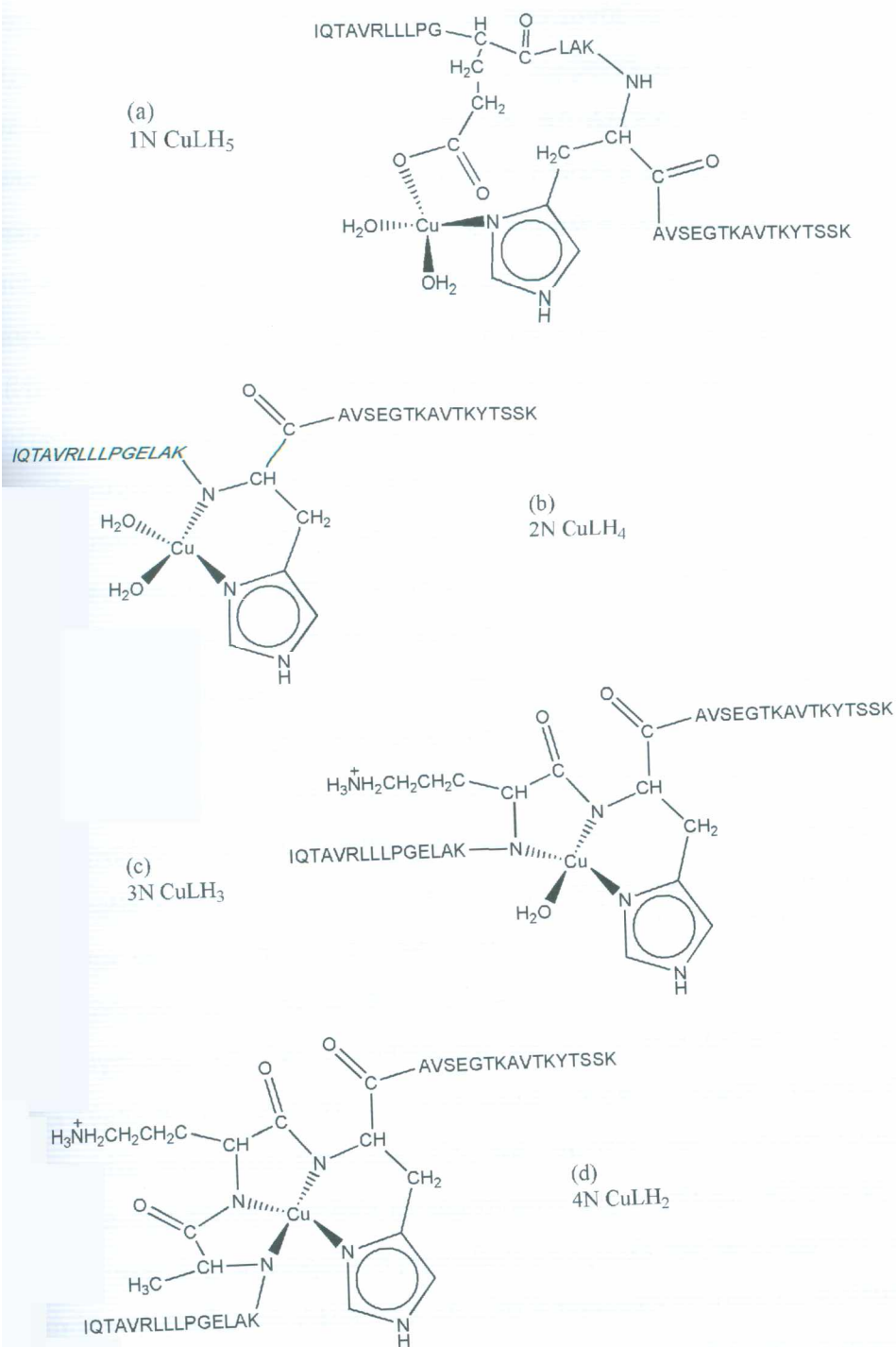
Σε υψηλότερες τιμές pH, πραγματοποιείται σύμπλεξη ενός αμιδικού αζώτου και το σύμπλοκο CuLH_4 , σχηματίζεται. Η επικάλυψη του με τα είδη CuLH_5 και CuLH_3 , καθιστά αδύνατη τη μελέτη του με φασματοσκοπικές τεχνικές και μπορεί να χαρακτηριστεί μόνο βάση της στοιχειομετρίας του και της υπολογιζόμενης σταθεράς σχηματισμού του. Η τιμή $\log K^* = -8,49$, είναι τυπική για 2N, { N_{Im} , N_{amide} } σύμπλεξη (276, 323). Λόγω θερμοδυναμικών προτιμήσεων, το αμιδικό άζωτο που συμπλέκεται προέρχεται από το κατάλοιπο His, καθώς κατ' αυτόν τον τρόπο σχηματίζεται ένας σταθερός εξαμελής δακτύλιος.

Σε φυσιολογικές τιμές pH, το σύμπλοκο CuLH_4 , απελευθερώνει ένα πρωτόνιο με μία τιμή $\text{pK}_a = 6,16$, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του είδους CuLH_3 . Αυτό το σύμπλοκο 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 ($\text{pH} \sim 5-10$). Η τιμή $\log K^* = -14,65$, είναι συγκρίσιμη με αυτές αντίστοιχων συμπλόκων με πεπτίδια, όπου το ιόν Cu^{2+} , συμπλέκεται με το ιμιδαζολικό άζωτο της His και 2 αμιδικά άζωτα του πεπτιδικού σκελετού (Ac-TRSRSHTSEGTRSR-Am (323), $\log K^* = -13,91$, Ac-NSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSRE-Am (327), $\log K^* = -14,09$, Ac-TLEGTKKGHLHLDY-Am (328), $\log K^* = -13,5$). Αυτός ο τύπος σύμπλεξης επιβεβαιώνεται από την παρουσία της χαρακτηριστικής ταινίας μεταφοράς φορτίου $\text{N}_{\text{Im}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ στα 340 nm, στο καταγεγραμμένο σε $\text{pH} \sim 7,5$ CD φάσμα (Σχήμα 41, Πίνακας 7) και περαιτέρω, από την εμφάνιση μέγιστης απορρόφησης σε μήκος κύματος ίσο με 587 nm, το οποίο είναι παρόμοιο με αυτό που προβλέπεται θεωρητικά για σύμπλεξη του Cu^{2+} , με ένα σύνολο δοτών του τύπου $\{\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}_{\text{amide}}^-, \text{H}_2\text{O}\}$ (242). Πρόσθετη επιβεβαίωση του τύπου σύμπλεξης $\{\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}_{\text{amide}}^-\}$, προκύπτει από το EPR φάσμα που καταγράψαμε σε $\text{pH} 7,4$. Η τιμή του παράγοντα g στην παράλληλη περιοχή του φάσματος ($g_{\parallel} = 2,245$), είναι χαρακτηριστική για σύμπλοκα δισθενούς χαλκού με δότες τρία άτομα αζώτου κι ένα άτομο οξυγόνου (329). Η σχετικά χαμηλή τιμή της σταθεράς υπέρλεπτης σύζευξης ($A_{\parallel} = 165$), έχει παρατηρηθεί σε πολλά ανάλογα 3N σύμπλοκα πεπτιδίων με ιόντα Cu^{2+} και μπορεί να αποδοθεί σε μια παραμόρφωση της τετραγωνικής γεωμετρίας (275, 276, 323-325, 330). Αυτό μπορεί περαιτέρω να υποστηριχθεί από το γεγονός ότι στην κάθετη περιοχή του αντιστοίχου φάσματος, (Σχήμα 42(γ), $\text{pH} \sim 7,4$) παρατηρούνται περισσότερες από τις 7 φασματικές γραμμές που θεωρητικά προβλέπονται από την σύζευξη του ηλεκτρονικού spin με 3 ισοδύναμους πυρήνες ^{14}N ($I=1$). Μπορούμε λοιπόν να ισχυριστούμε ότι η παραμόρφωση διαταράσσει την ισοτροπία στην κάθετη περιοχή, οδηγώντας σε έναν μικρό διαχωρισμό μεταξύ των παραγόντων g_x και g_y και υπέρ-υπέρλεπτες αλληλεπιδράσεις μπορεί να παρατηρηθούν για κάθε έναν εξ' αυτών. Παρόλα αυτά, μπορεί εύκολα να εξαχθεί η ισοτροπική συνιστώσα της αντίστοιχης σταθεράς σύζευξης στην κάθετη περιοχή, από την απόσταση των φασματικών γραμμών. Η τιμή $A(^{14}\text{N}) = 15,3$ G που υπολογίσαμε είναι χαρακτηριστική για άτομα αζώτου, άμεσα συνδεδεμένα με το ιόν Cu^{2+} , όπως έχει βρεθεί σε ανάλογες περιπτώσεις, όπου η σταθερά $A(^{14}\text{N})$ έχει υπολογιστεί από τα φάσματα πρώτης (331, 332) ή δεύτερης παραγωγού (333), ή έχει μετρηθεί με φασματοσκοπία ENDOR (334).

Σε τιμές $\text{pH} > 7$, το σύμπλοκο CuLH_3 , απελευθερώνει ένα επιπλέον πρωτόνιο με μια τιμή $\text{pK}_a = 8,46$ (Πίνακας 6), η οποία είναι σε συμφωνία με τις τιμές που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία για την αποπρωτονίωση του τρίτου αμιδικού πρωτονίου. Η τιμή $\log K^* = -23,11$, είναι παραπλήσια με τιμές ανάλογων συμπλόκων με πεπτίδια, υποστηρίζοντας έναν $4\text{N} \{ \text{N}_{\text{Im}}, 3\text{N}_{\text{amide}}^- \}$ τρόπο σύμπλεξης (276, 323, 327, 328). Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από τα διαθέσιμα φασματοσκοπικά δεδομένα και πιο συγκεκριμένα από την παρουσία των ταινιών μεταφοράς φορτίου $\text{N}_{\text{amide}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ και $\text{N}_{\text{Imidazole}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ στο CD φάσμα, στα 310 και 349 nm, αντίστοιχα, όπως και από την τιμή του μήκους κύματος, στο οποίο λαμβάνει χώρα μέγιστη απορρόφηση, $\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$, η οποία είναι παραπλήσια με την θεωρητικά προβλεπόμενη ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$) για $4\text{N} \{ \text{N}_{\text{Im}}, 3\text{N}_{\text{amide}}^- \}$ σύμπλεξη (242).

Τα υπόλοιπα σύμπλοκα που σχηματίζονται διαδοχικά στην κλίμακα pH , 8 - 11,5 (CuLH , CuL , CuLH_{-1} , CuLH_2 και CuLH_3), διαφέρουν μόνο ως προς την κατάσταση πρωτονίωσης των πλευρικών αλυσίδων Lys και Tyr, δεδομένου ότι χαρακτηρίζονται από διαδοχικές σταθερές ιονισμού, οι οποίες δεν διαφέρουν πολύ από αυτές που υπολογίστηκαν για την αποπρωτονίωση των πλευρικών αλυσίδων των συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων του ελεύθερου υποκαταστάτη (Πίνακας 5 και 6). Επιπλέον, τα φασματοσκοπικά δεδομένα (Πίνακας 7) που υπολογίστηκαν για αυτά, είναι πανομοιότυπα, υποδηλώνοντας ότι η σφαίρα ένταξης και η γεωμετρία του μετάλλου δεν μεταβάλλεται. Οι τιμές $A_{\parallel}$ και $g_{\parallel}$ που δίνονται στον Πίνακα 7, είναι χαρακτηριστικές για σύμπλοκα χαλκού με πεπτίδια του τύπου $\{ \text{N}_{\text{Im}}, 3\text{N}^- \}$ (276, 325, 327). Όπως και στην περίπτωση του 3N συμπλόκου, η υπέρ-υπέρλεπτη δομή των φασμάτων EPR (Σχήμα 42(γ)), υποδηλώνει ότι η γεωμετρία των 4N συμπλόκων είναι παραμορφωμένη τετραγωνική.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι ο ιονισμός του πρώτου αμιδικού αζώτου λαμβάνει χώρα με μία τιμή pK_a (6,55) η οποία είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή pK_a (6,16) με την οποίαν πραγματοποιείται ο ιονισμός του δεύτερου. Αυτό υποδηλώνει ότι ο σχηματισμός του $3\text{N} \{ \text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}_{\text{amide}}^- \}$ συμπλόκου λαμβάνει χώρα συνεργιστικά (242) και εξηγεί το γεγονός ότι το 2N σύμπλοκο σχηματίζεται σε πολύ μικρό ποσοστό και δεν ανιχνεύεται φασματοσκοπικά. Στο Σχήμα 43, παρατίθενται οι προτεινόμενες δομές των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Ο διαδοχικός σχηματισμός πενταμελών δακτυλίων, από την αποπρωτονίωση και επακόλουθη ένταξη αμιδικών ατόμων αζώτου, είναι ο κινητήριος μοχλός της διαδικασίας σύμπλεξης.

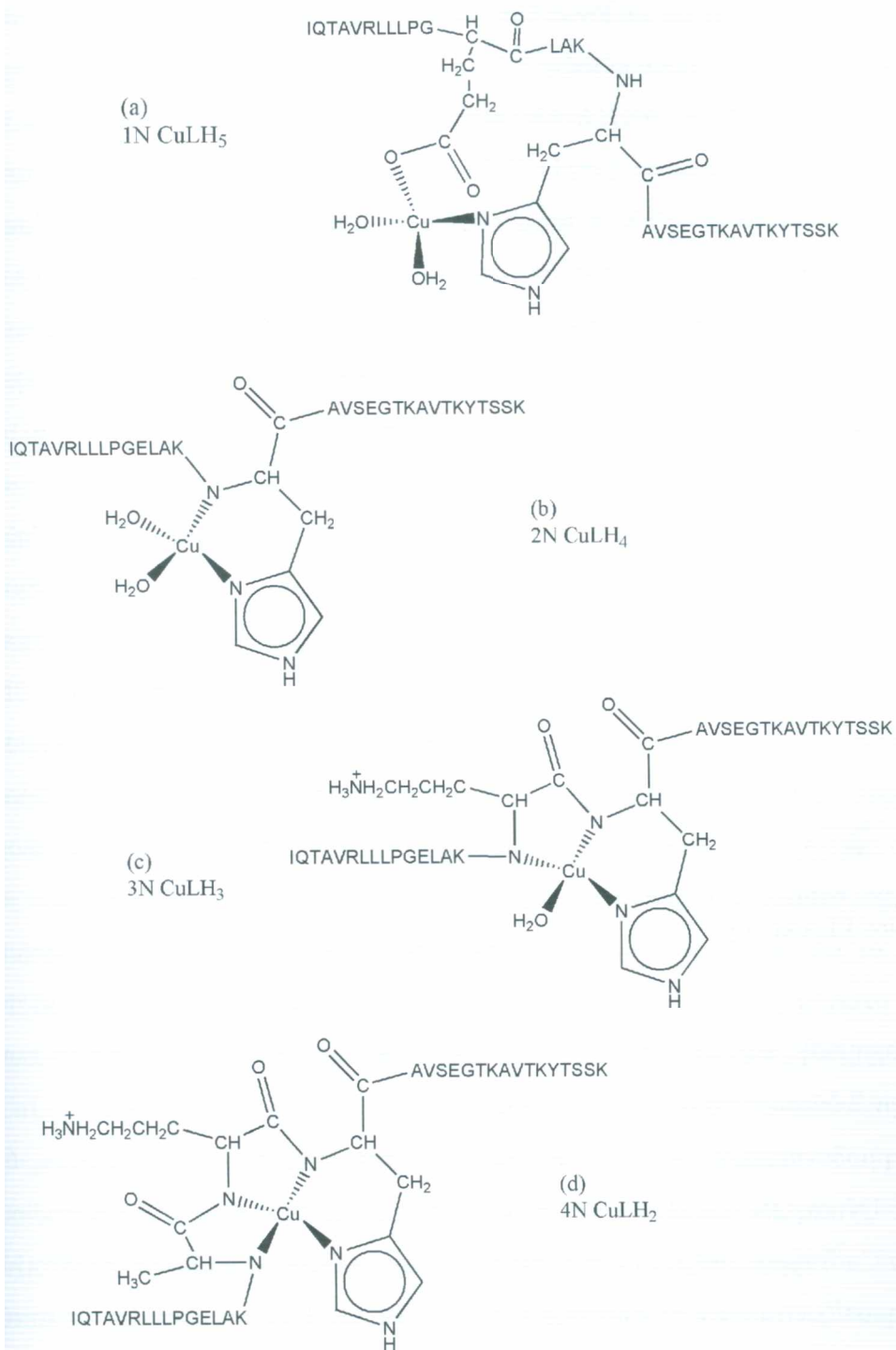


Σχήμα 43. Προτεινόμενες δομές σχηματιζόμενων συμπλόκων Cu²⁺ με το πεπτίδιο H2B₉₄₋₁₂₅

Σε τιμές $pH > 7$, το σύμπλοκο $CuLH_3$, απελευθερώνει ένα επιπλέον πρωτόνιο με μια τιμή $pK_a = 8,46$ (Πίνακας 6), η οποία είναι σε συμφωνία με τις τιμές που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία για την αποπρωτονίωση του τρίτου αμιδικού πρωτονίου. Η τιμή $\log K^* = -23,11$, είναι παραπλήσια με τιμές ανάλογων συμπλόκων με πεπτίδια, υποστηρίζοντας έναν $4N \{N_{Im}, 3N^-_{amide}\}$ τρόπο σύμπλεξης (276, 323, 327, 328). Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται από τα διαθέσιμα φασματοσκοπικά δεδομένα και πιο συγκεκριμένα από την παρουσία των ταινιών μεταφοράς φορτίου $N_{amide} \rightarrow Cu^{2+}$ και $N_{Imidazole} \rightarrow Cu^{2+}$ στο CD φάσμα, στα 310 και 349 nm, αντίστοιχα, όπως και από την τιμή του μήκους κύματος, στο οποίο λαμβάνει χώρα μέγιστη απορρόφηση, $\lambda_{max} = 515$ nm, η οποία είναι παραπλήσια με την θεωρητικά προβλεπόμενη ($\lambda_{max} = 522$ nm) για $4N \{N_{Im}, 3N^-_{amide}\}$ σύμπλεξη (242).

Τα υπόλοιπα σύμπλοκα που σχηματίζονται διαδοχικά στην κλίμακα pH, 8 - 11,5 ($CuLH$, CuL , $CuLH_{-1}$, $CuLH_{-2}$ και $CuLH_{-3}$), διαφέρουν μόνο ως προς την κατάσταση πρωτονίωσης των πλευρικών αλυσίδων Lys και Tyr, δεδομένου ότι χαρακτηρίζονται από διαδοχικές σταθερές ιονισμού, οι οποίες δεν διαφέρουν πολύ από αυτές που υπολογίστηκαν για την αποπρωτονίωση των πλευρικών αλυσίδων των συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων του ελεύθερου υποκαταστάτη (Πίνακας 5 και 6). Επιπλέον, τα φασματοσκοπικά δεδομένα (Πίνακας 7) που υπολογίστηκαν γι αυτά, είναι πανομοιότυπα, υποδηλώνοντας ότι η σφαίρα ένταξης και η γεωμετρία του μετάλλου δεν μεταβάλλεται. Οι τιμές $A_{||}$ και $g_{||}$ που δίνονται στον Πίνακα 7, είναι χαρακτηριστικές για σύμπλοκα χαλκού με πεπτίδια του τύπου $\{N_{Im}, 3N^-\}$ (276, 325, 327). Όπως και στην περίπτωση του $3N$ συμπλόκου, η υπέρ-υπέρλεπτη δομή των φασμάτων EPR (Σχήμα 42(γ)), υποδηλώνει ότι η γεωμετρία των $4N$ συμπλόκων είναι παραμορφωμένη τετραγωνική.

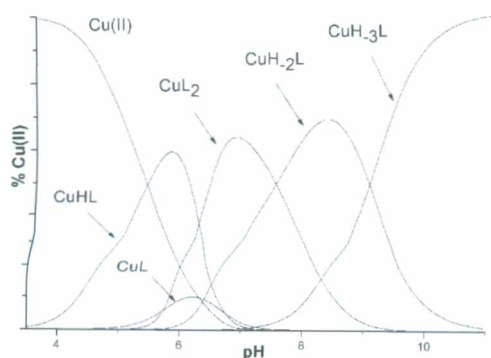
Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι ο ιονισμός του πρώτου αμιδικού αζώτου λαμβάνει χώρα με μία τιμή pK_a (6,55) η οποία είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή pK_a (6,16) με την οποίαν πραγματοποιείται ο ιονισμός του δεύτερου. Αυτό υποδηλώνει ότι ο σχηματισμός του $3N \{N_{Im}, 2N^-_{amide}\}$ συμπλόκου λαμβάνει χώρα συνεργιστικά (242) και εξηγεί το γεγονός ότι το $2N$ σύμπλοκο σχηματίζεται σε πολύ μικρό ποσοστό και δεν ανιχνεύεται φασματοσκοπικά. Στο Σχήμα 43, παρατίθενται οι προτεινόμενες δομές των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Ο διαδοχικός σχηματισμός πενταμελών δακτυλίων, από την αποπρωτονίωση και επακόλουθη ένταξη αμιδικών ατόμων αζώτου, είναι ο κινητήριο μοχλός της διαδικασίας σύμπλεξης.



Σχήμα 43. Προτεινόμενες δομές σχηματιζόμενων συμπλόκων Cu²⁺ με το πεπτίδιο H2B₉₄₋₁₂₅

Η σύγκριση του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ με το μικρότερο τμήμα Ac-ELAKHA-Am, ως προς την ικανότητα τους να συμπλέκονται με τα ιόντα Cu²⁺, αποκαλύπτει ότι τα δύο αυτά τμήματα εμφανίζουν εντελώς διαφορετικό τρόπο ένταξης.

Εν συντομία, η ένταξη του Ac-ELAKHA-Am πεπτιδίου στα ιόντα Cu²⁺, ξεκινάει με το σχηματισμό ενός συμπλόκου με στοιχειομετρία CuHL, το οποίο αναφέρεται σε μονοδοντική σύμπλεξη του μετάλλου με το ιμιδαζολικό άτομο αζώτου της His, με τις υπόλοιπες θέσεις ένταξης να καταλαμβάνονται από μόρια H₂O και πιθανόν από το καρβοξυλικό οξύ του Glu₁. Με την αύξηση του pH, διαδοχικές αποπρωτονιώσεις αμιδικών αζώτων λαμβάνουν χώρα και μια πληθώρα συμπλόκων ανιχνεύονται: CuL (2N), CuL₂ (4N), CuH₂L (4N), CuH₃L (4N) (Σχήμα 44). Το κύριο χαρακτηριστικό της σύμπλεξης του ανωτέρω πεπτιδίου με



Σχήμα 44. Διάγραμμα κατανομής σχηματιζόμενων σωματιδίων πεπτιδίου ELAKHA με ιόντα Cu²⁺

τα ιόντα Cu²⁺ είναι ο σχηματισμός, σε φυσιολογικές τιμές pH του CuL₂ συμπλόκου, όπου 2 μόρια πεπτιδίου εντάσσονται γύρω από το κεντρικό ιόν, όπως και ο μη σχηματισμός του 3N συμπλόκου, το οποίο στην περίπτωση μας αποτελεί το κύριο σχηματιζόμενο είδος (274). Στην περίπτωση ενός μεγάλου πεπτιδίου, όπως του H2B₉₄₋₁₂₅, ο σχηματισμός ενός συμπλόκου του τύπου CuL₂ δεν είναι πολύ πιθανός, δεδομένου

της υψηλής στερεοχημικής παρεμπόδισης, που θα προκαλούνταν από την προσέγγιση των πλευρικών αλυσίδων 2 διαφορετικών πεπτιδικών μορίων.

Σύγκριση των θερμοδυναμικών παραμέτρων, log K* που δίνονται στον Πίνακα 6, υποδηλώνει ότι τα 1N και 2N σύμπλοκα που σχηματίζονται από την ένταξη του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ στα ιόντα Cu²⁺ παρουσιάζουν ελαφρώς μεγαλύτερη σταθερότητα από τα αντίστοιχα σύμπλοκα που σχηματίζονται από το σύστημα Cu²⁺: Ac-ELAKHA-Am. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε μια πιθανή δευτεροταγή δομή που υιοθετεί το πεπτίδιο H2B₉₄₋₁₂₅ κατά την ένταξη του στο ιόν.

Τα 1N σύμπλοκα που σχηματίζονται από την ένταξη και των δύο πεπτιδίων στα ιόντα Cu²⁺, χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας καρβοξυλικής ομάδας στη σφαίρα ένταξης του ιόντος, η οποία επιφέρει το σχηματισμό ενός μακροχηλικού δακτυλίου και προσδίδει αυξημένη σταθερότητα. Το γεγονός ότι το 1N σύμπλοκο του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ είναι

σταθερότερο από το αντίστοιχο σύμπλοκο που σχηματίζεται με το Ac-ELAKHA-Am, μπορεί να οφείλεται, είτε στην σύμπλεξη του επιπλέον Glu καταλοίπου, είτε στο γεγονός ότι ο σχηματισμός ενός και μόνου μακροχηλικού δακτυλίου ευνοείται περισσότερο απ' ότι στο Ac-ELAKHA-Am, λόγω της υιοθέτησης μιας δευτεροταγούς δομής. Το δεύτερο ενδεχόμενο φαντάζει περισσότερο δυνατό, δεδομένου ότι το $\lambda_{\max}$ του 1N συμπλόκου (727 nm), έχει παραπλήσια τιμή με το θεωρητικά προβλεπόμενο για ένα σύνολο δοτών του τύπου $\{N_{Im}, 2H_2O, COO^-\}$ (242). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η σταθερότητα των συμπλόκων πεπτιδίων – μετάλλων, εξαρτάται από την απο-μετάλλωση που προκαλείται κυρίως από την αζονική πυρηνόφιλη προσβολή μορίων H_2O ή πρωτονίων στα συμπλεγμένα αμιδικά άζωτα (262, 335). Η υιοθέτηση, όμως μιας δομής όπου οι θέσεις πάνω και κάτω από το επίπεδο του συμπλόκου, προστατεύονται από τις πλευρικές αλυσίδες αμινοξικών καταλοίπων, μπορεί να περιορίσει την προσβολή και να αυξήσει την σταθερότητα των εν λόγω συμπλόκων. Τέτοιες δομές που επιφέρουν σταθερότητα έχουν προταθεί σε πολλές περιπτώσεις συμπλόκων πεπτιδίων με μέταλλα (269, 336), όπως και στο σύμπλοκο του εν λόγω πεπτιδίου με νικέλιο και λεπτομερής ανάλυση της δίνεται σε άλλο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής.

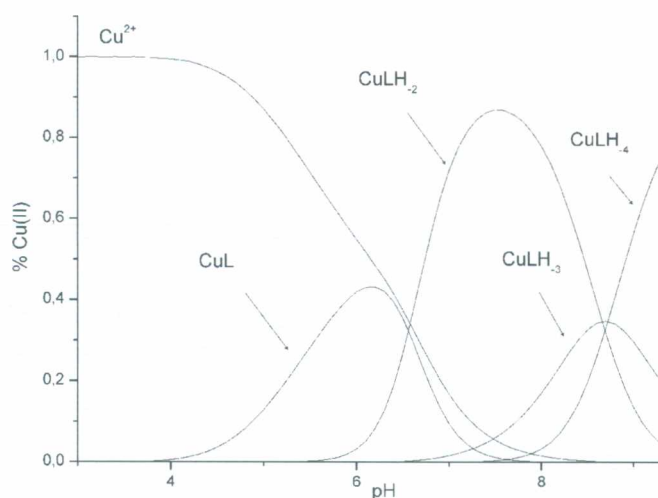
Η σύγκριση των θερμοδυναμικών παραμέτρων $\log K^*$ που παρατίθενται στον Πίνακα 6, υποδηλώνει ότι το 4N σύμπλοκο του Ac-ELAKHA-Am, είναι σταθερότερο από το αντίστοιχο σύμπλοκο του H_2B_{94-125} . Η διαφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα 4N σύμπλοκα σχηματίζονται από διαφορετικά σε κάθε περίπτωση, πρόδρομα μόρια. Το διάγραμμα κατανομής που παρουσιάζεται στο Σχήμα 39, δείχνει ότι το 3N συμπλόκο του H_2B_{94-125} ανιχνεύεται σε μια ευρεία κλίμακα pH (5-10), ενώ η μέγιστη συγκέντρωση του αντιστοιχεί στην σύμπλεξη του 85 % της ολικής αρχικής συγκέντρωσης χαλκού. Αντίθετα, το CuL_2 σύμπλοκο που σχηματίζεται αντί του 3N συμπλόκου στην περίπτωση του εξαπεπτιδίου, ανιχνεύεται σε ελαφρά μικρότερη κλίμακα pH, ενώ όταν φτάνει στη μέγιστη συγκέντρωση του, ευθύνεται για τη σύμπλεξη μόλις του 60% της ολικής συγκέντρωσης ιόντων Cu^{2+} (Σχήμα 44). Τα παραπάνω δεδομένα, υποδηλώνουν ότι ο σχηματισμός του 3N συμπλόκου του πεπτιδίου H_2B_{94-125} , ευνοείται θερμοδυναμικά περισσότερο από ότι ο σχηματισμός του CuL_2 συμπλόκου του ELAKHA. Είναι επομένως λογικό να υποθέσουμε ότι η μετάπτωση από το είδος CuL_2 στο 4N σύμπλοκο του ELAKHA, να ευνοείται θερμοδυναμικά περισσότερο απ' ότι η μετατροπή του 3N σε 4N σύμπλοκο του πεπτιδίου H_2B_{94-125} . Αυτή η θερμοδυναμική προτίμηση είναι υπεύθυνη για την υψηλότερη σταθερότητα του 4N συμπλόκου του εξαπεπτιδίου, έναντι του αντιστοίχου συμπλόκου του H_2B_{94-125} και αντικατοπτρίζεται στις τιμές $\log K^*$.

Από τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι το μέγεθος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι ιδιαίτερα σημαντικό και επηρεάζει όχι μόνο τη σταθερότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων, αλλά και τον τρόπο ένταξης. Παρόμοια συμπεράσματα έχουν εξαχθεί και για τα σύμπλοκα χαλκού που σχηματίζονται με τα πεπτίδια H2B₆₃₋₉₃ και Ac-LAHYNK-Am (327, 336), και καταδεικνύουν την μεγάλη σημασία των έμμεσων αλληλεπιδράσεων των πλευρικών αλυσίδων στον τρόπο ένταξης πεπτιδίων σε μεταλλικά ιόντα.

10,3,2 Σύμπλοκα χαλκού-πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η καταβύθιση ελεύθερου υποκαταστάτη H2B₃₂₋₆₂, σε τιμές pH > 7,8, δεν επέτρεψε τον υπολογισμό των σταθερών ιονισμού των πλευρικών ομάδων Lys και Tyr. Εντούτοις, η προσθήκη ιόντων Cu²⁺, στο τιτλοδοτούμενο διάλυμα, απομακρύνει την καταβύθιση, μέχρι pH ~ 10,5. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτο και από μόνο του αποτελεί απόδειξη, ότι όταν το πεπτίδιο συμπλέκεται με τα ιόντα Cu²⁺, υιοθετείται μια νέα, ευδιάλυτη διαμόρφωση.

Η προσομοίωση της καμπύλης τιτλοδότησης του συστήματος πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂/Cu²⁺ με πρότυπο διάλυμα NaOH, κατέστη δυνατή, χρησιμοποιώντας τα ποτενσιομετρικά δεδομένα που ελήφθησαν μέχρι pH 9,3, θεωρώντας την ύπαρξη 4 συμπλόκων με στοιχειομετρία : CuL, CuLH₋₂, CuLH₋₃ και CuLH₋₄. Πρέπει να τονιστεί ότι οι παραπάνω στοιχειομετρικοί τύποι, αντιστοιχούν στα σύμπλοκα χαλκού, με την προϋπόθεση ότι ο ελεύθερος υποκαταστάτης είναι ένα πολυπρωτικό οξύ του τύπου H₃L. Οι σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων αυτών (log β), όπως και οι διαδοχικές σταθερές ιονισμού (pK_a), δίνονται στον Πίνακα 8. Στον Πίνακα 9, δίνονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των συμπλόκων, που προέκυψαν από την ανάλυση των φασμάτων απορρόφησης (UV-Vis), κυκλικού διχρωϊσμού (CD) και ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR), σε τιμές pH, όπου ο πληθυσμός δεδομένου συμπλόκου, πλησιάζει την μέγιστη τιμή του, όπως εκτιμήθηκε από το διάγραμμα κατανομής (Σχήμα 45).



Σχήμα 45. Διάγραμμα κατανομής σχηματιζόμενων συμπλόκων για το σύστημα Cu²⁺/H2B₃₂₋₆₂ σε μοριακή αναλογία Cu²⁺:H2B₃₂₋₆₂ 1:1.1 (C = 0.5 mM)

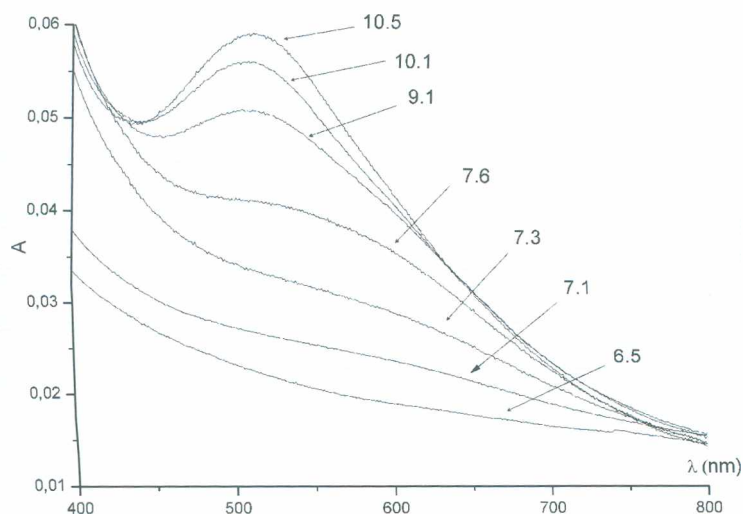
Πίνακας 8. Σταθερές σχηματισμού συμπλόκων Cu^{2+} με το πεπτίδιο H2B_{32-62} , $T = 298 \text{ K}$, $I = 0.2 \text{ M}$ (KCl)

Σταθερές σχηματισμού συμπλόκων Cu(II) ($\log \beta$) ^a				
	CuL	CuLH_2	CuLH_3	CuLH_4
H2B_{32-62}	3.60(1)	-9.52(5)	-18.18(9)	-26.90(1)
Διαδοχικές σταθερές ιονισμού (pK_a)				
H2B_{32-62}	CuL/CuLH_2	$\text{CuLH}_2/\text{CuLH}_3$	$\text{CuLH}_3/\text{CuLH}_4$	
	6.56 ^b	8.66	8.72	
$\log K^*$ ^c				
	1N {N _{Im} }	2N {N _{Im} , N _{amide} ⁻ }	3N {N _{Im} , 2N _{amide} ⁻ }	4N {N _{Im} , 3N _{amide} ⁻ }
	-2.66	-	-15.78	-24.44

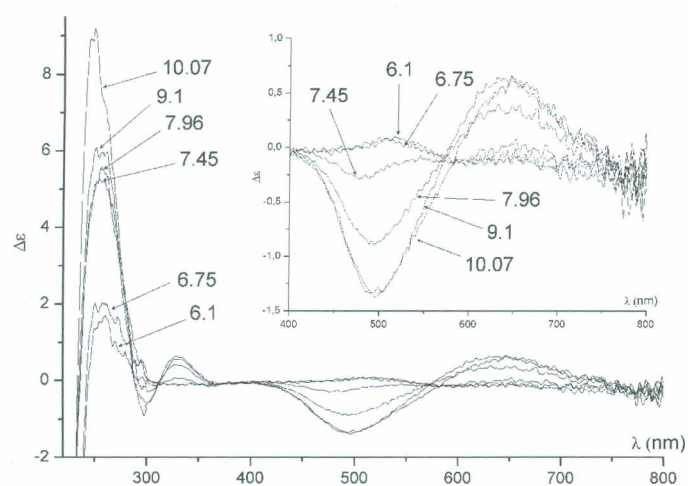
^a $\beta_j = [\text{MH}_j\text{L}] / [\text{M}] [\text{H}^+]^j [\text{L}]$ ^b Μέση τιμή pK_a για απελευθέρωση 2 πρωτονίων^c $\log K^* = \log \beta (\text{MLH}_j) - \log \beta (\text{HL})$ **Πίνακας 9.** Φασματοσκοπικές παράμετροι για σχηματιζόμενα σύμπλοκα ιόντων Cu^{2+} με το πεπτίδιο H2B_{32-62} , στους 298 K

Είδος συμπλόκου	UV-Vis		CD		EPR	
	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{max} (nm)	$\Delta\epsilon$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$g_{\square}$	$A_{\square}$
CuL (1N)	739	31	346 ^a 517 ^b 600 ^b	-0.11 +0.09 -0.13	2.328	159
CuLH_2 (3N)	550-600	-	309 ^c 360 ^a 484 ^b	-0.13 -0.16 -0.25	2.250 2.247	180 161
CuLH_3 (4N) [*]						
CuLH_4 (4N)	513	102	298 ^c 330 ^a 498 ^b 645 ^b	-0.92 +0.63 -1.36 +0.60	2.204	192

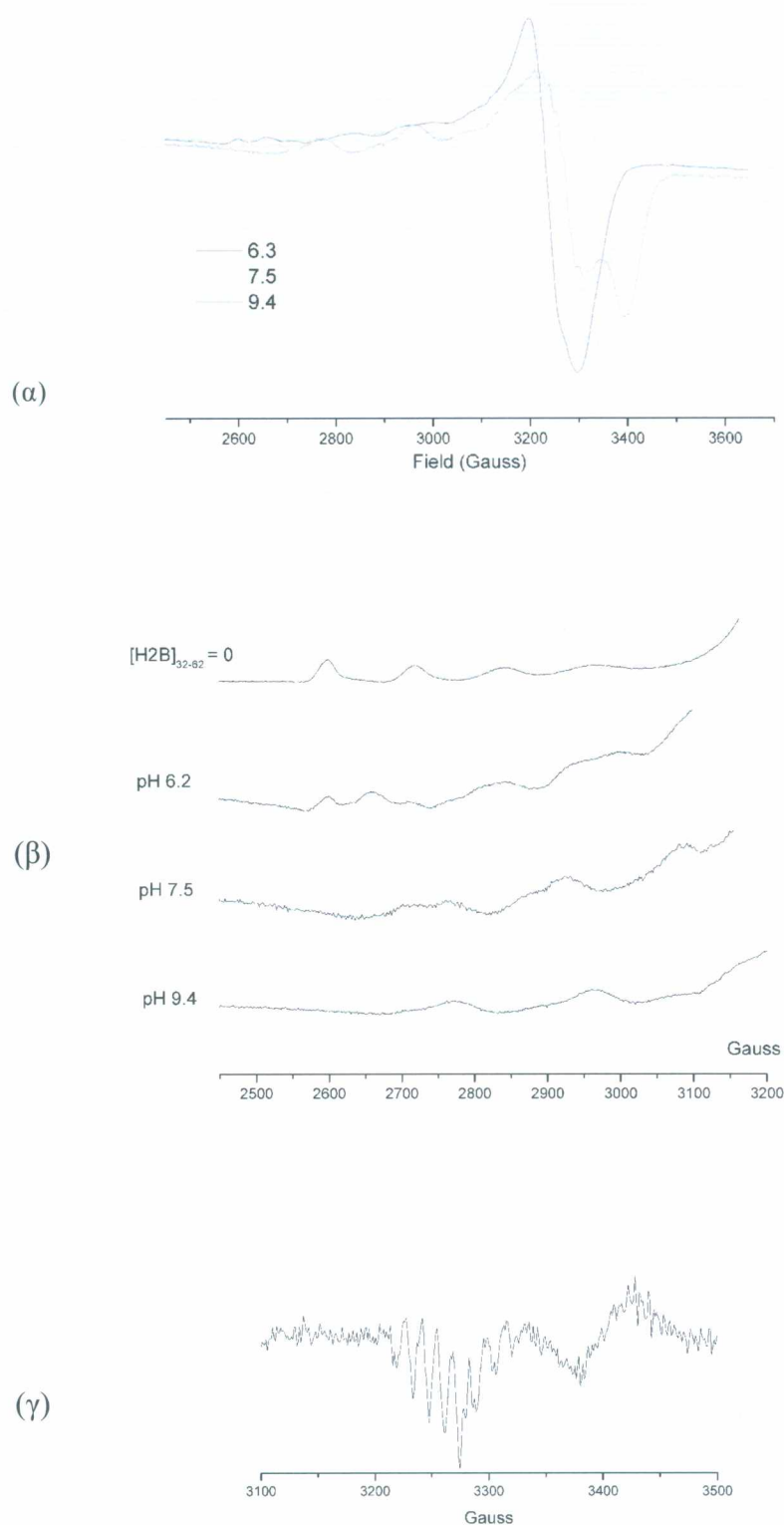
^a ταινία μεταφοράς φορτίου $\text{N}_{\text{Imidazole}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ ^b d-d μετάπτωση^c ταινία μεταφοράς φορτίου $\text{N}_{\text{amide}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ ^{*} δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση τους λόγω χαμηλής συγκέντρωσης και/ή επικάλυψης με άλλα είδη



Σχήμα 46. Φάσματα απορρόφησης του συστήματος $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{B}_{32-62}$ σε μοριακή αναλογία $\text{Cu}^{2+}:\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ 1:1.1, σε μεταβαλλόμενες τιμές pH



Σχήμα 47. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού του συστήματος $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{B}_{32-62}$ σε μοριακή αναλογία $\text{Cu}^{2+}:\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ 1:1.1, σε μεταβαλλόμενες τιμές pH



Σχήμα 48. (α) Φάσματα EPR του συστήματος $\text{Cu}^{2+}/\text{H2B}_{32-62}$ σε μοριακή αναλογία $\text{Cu}^{2+}:\text{H2B}_{94-125}$ 1:1, σε μεταβαλλόμενες τιμές pH (β) παράλληλη περιοχή (γ) δεύτερη παράγωγος της κάθετης περιοχής του φάσματος σε pH 9.4

Η σύμπλεξη του πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂ με τα ιόντα Cu²⁺, ξεκινάει σε pH περίπου ίσο με 4, με το σχηματισμό του σωματιδίου CuL, του οποίου η συγκέντρωση φτάνει τη μέγιστη τιμή της σε pH 6,3. Η τιμή $\log K^* = -2,66$, είναι παραπλήσια με αυτήν του πεπτιδίου Ac-MDGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVA-Am ($\log K^* = -2,91$), όταν συμπλέκεται μονοδοντικά με τα ιόντα Cu²⁺, μέσω του ιμιδαζολικού αζώτου της His, υποδηλώνοντας παρόμοιο τρόπο ένταξης (325). Η υψηλότερη σταθερότητα του 1N συμπλόκου του πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂, μπορεί να οφείλεται στην σύμπλεξη της καρβοξυλικής ομάδας του Asp₂₀, που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μακροχηλικού δακτυλίου. Η ένταξη του ανωτέρου καταλοίπου, φαντάζει πιθανή, λόγω της παρουσίας του καταλοίπου Pro₁₉ στην πρωτοταγή δομή του πεπτιδίου, το οποίο μπορεί να κάμψει τον πεπτιδικό σκελετό και να οδηγήσει σε μία διαμόρφωση όπου η καρβοξυλική ομάδα, βρίσκεται κοντά στο κεντρικό ιόν.

Αυτός ο τρόπος σύμπλεξης επιβεβαιώνεται περαιτέρω από τα φασματοσκοπικά δεδομένα (Πίνακας 9) και πιο συγκεκριμένα από την τιμή $\lambda_{\max}=739$ nm από το φάσμα απορρόφησης, η οποία είναι πολύ κοντά στη θεωρητικά προβλεπόμενη (242), την τιμή $g_{\parallel} = 2,328$, η οποία είναι τυπική για Cu²⁺ ενταγμένο με 1 άτομο αζώτου και 3 άτομα οξυγόνου, (329) καθώς και από την χαρακτηριστική ταινία μεταφοράς φορτίου $N_{\text{lm}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ στα 346 nm, που εμφανίζεται στο φάσμα κυκλικού διχρωισμού.

Με την αύξηση του pH, πραγματοποιείται ταυτόχρονη αποπρωτονίωση δύο αμιδικών ατόμων αζώτου και σχηματίζεται το 3N {N_{lm}, 2N⁻} σύμπλοκο, με στοιχειομετρία CuLH₂. Το σύμπλοκο αυτό αποτελεί το κύριο σχηματιζόμενο είδος σε φυσιολογικές τιμές pH. Η τιμή $\log K^* = -15,78$ είναι παρόμοια με αυτή που δίνεται στη βιβλιογραφία για το 3N σύμπλοκο του χαλκού με το πεπτίδιο Ac-MDGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVA-Am ($\log K^* = -16,16$) (325) και σχεδόν ίδια με αυτή του 3N συμπλόκου του χαλκού με το μικρότερο πεπτίδιο Boc-AGGH ($\log K^* = -15,68$) (270). Η σύμπλεξη αμιδικών ατόμων αζώτου, επιβεβαιώνεται από την παρουσία της χαρακτηριστικής $N_{\text{amide}} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ ταινίας μεταφοράς φορτίου στα 309 nm, στο φάσμα κυκλικού διχρωισμού που καταγράψαμε σε pH 7,45 (Πίνακας 9, Σχήμα 47). Η προσεκτική ανάλυση του φάσματος ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (Σχήμα 48), αποκαλύπτει την ύπαρξη δύο διαφορετικών κέντρων χαλκού (σωματιδίων) σε φυσιολογικές τιμές pH. Επιπροσθέτως, το φάσμα απορρόφησης σε pH = 7,6 (Σχήμα 46) παρουσιάζει μια ευρεία κορυφή στην περιοχή 550-600 nm, η οποία αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης 2 σωματιδίων. Το διάγραμμα κατανομής δείχνει ότι σε αυτό το pH, υπάρχει μόνο ένα σωματίδιο με στοιχειομετρία CuLH₂. Αυτά τα αντίθετα συμπεράσματα

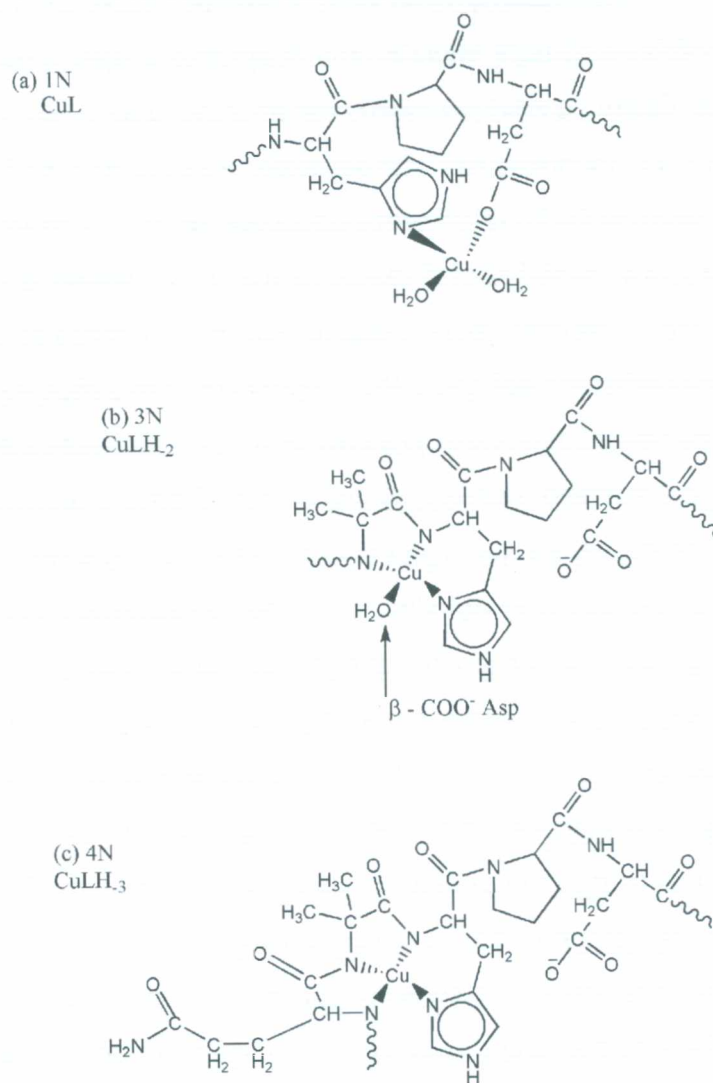
μπορούν να εξηγηθούν από την παρουσία δύο ισομερών, τα οποία θα εμφανίζουν τον ίδιο στοιχειομετρικό τύπο, αλλά διαφορετική γεωμετρία. Οι παράμετροι που εξάγονται από το EPR φάσμα σε pH 7,5, δείχνουν ότι τα 2 ισομερή σύμπλοκα παρουσιάζουν 3N τρόπο σύμπλεξης, με τη διαφορά ότι το ένα εκ των δύο χαρακτηρίζεται από μεγάλη παραμόρφωση ($A_{||} = 161$, $g_{||} = 2,247$) από την επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Αν αναλογιστούμε ότι οι πιο ισχυροί υποκαταστάτες (αμιδικά άζωτα και ιμιδαζολικό άζωτο) συμπλέκονται στις διαθέσιμες ισημερινές θέσεις του Cu^{2+} (242), αυτή η παραμόρφωση μπορεί να εξηγηθεί από την σύμπλεξη της καρβοξυλικής ομάδας του Asp_{20} σε αξονική θέση.

Με την αύξηση του pH, το σύμπλοκο CuLH_2 απελευθερώνει ένα επιπλέον πρωτόνιο με μία τιμή $\text{pK}_a = 8,66$ και σχηματίζεται το σύμπλοκο CuLH_3 . Όπως φαίνεται από το διάγραμμα κατανομής, το σύμπλοκο αυτό σχηματίζεται σε πολύ μικρό ποσοστό, ενώ ο φασματοσκοπικός προσδιορισμός του είναι αδύνατος λόγω της επικάλυψης του με τα είδη CuLH_2 και CuLH_4 . Η θερμοδυναμική παράμετρος $\log K^* = -24,44$ είναι χαρακτηριστική για ένταξη του χαλκού με ένα σύνολο δοτών του τύπου $\{\text{N}_{\text{Im}}, 3\text{N}_{\text{amide}}^-\}$ ($\log K^* = -22,37$ για το πεπτίδιο H2B_{63-93}) (327) και σχεδόν πανομοιότυπη με αυτήν του ανάλογου συμπλόκου με το πεπτίδιο $\text{Ac-MDGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVA-Am}$ ($\log K^* = -24,69$) (325)). Η τιμή $\text{pK}_a = 8,72$ με την οποίαν πραγματοποιείται ιονισμός ενός επιπλέον πρωτονίου από το σύμπλοκο αυτό, είναι πολύ κοντά στην τιμή $\text{pK}_a = 8,66$ και το γεγονός αυτό εξηγεί την μικρή συγκέντρωση του CuLH_3 . Το επιπλέον πρωτόνιο που τιτλοδοτείται και οδηγεί στο σχηματισμό του CuLH_4 συμπλόκου, πιθανόν να προέρχεται από την πλευρική αλυσίδα κάποιων εκ των καταλοίπων Lys και Tyr. Δεδομένου όμως ότι οι τιμές των σταθερών ιονισμού των ανωτέρω καταλοίπων στον ελεύθερο υποκαταστάτη δεν είναι γνωστές (θυμίζουμε ότι το πεπτίδιο H2B_{32-62} έχει θεωρηθεί ως ένας υποκαταστάτης του τύπου H_3L), δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ιονισμού του πυρολικού N1 πρωτονίου της His. Ιονισμός του N1 πρωτονίου έχει παρατηρηθεί σε αλκαλικά διαλύματα συμπλόκων χαλκού διαφόρων υποκαταστατών που περιέχουν His, με τιμές pK_a που ποικίλλουν από 8 έως 12, οδηγώντας σε πολλές περιπτώσεις στην δημιουργία πολυπυρηνικών δομών (256, 337-339). Πάντως, ο κορεσμός της σφαίρας ένταξης που έχει ήδη επέλθει στην περίπτωση μας, αποκλείει το σχηματισμό πολυπυρηνικών συμπλόκων.

Οι παράμετροι ($A_{||} = 192$ και $g_{||} = 2,204$) που εξάγονται από την ανάλυση του EPR φάσματος που καταγράψαμε σε pH 9,4, είναι τυπικοί για σύμπλεξη του ιόντος Cu^{2+} με ένα σύνολο δοτών του τύπου $\{\text{N}_{\text{Im}}, 3\text{N}_{\text{amide}}^-\}$ (274, 281, 327), υποδηλώνοντας τον ίδιο τρόπο ένταξης. Η τιμή $\lambda_{\text{max}} = 513 \text{ nm}$, που υπολογίζεται από το φάσμα απορρόφησης και η οποία είναι εντός

των ορίων του πειραματικού σφάλματος, παρόμοια με αυτή που εξάγεται από την εξίσωση των Sigel και Martin, θεωρώντας σύμπλεξη με 1 ιμιδαζολικό και 3 αμιδικά άζωτα (242), υποδηλώνει ότι η αζονική υποκατάσταση της καρβοξυλικής ομάδας του Asp, πλέον δεν υφίσταται. Το φάσμα EPR σε pH 9,4, εμφανίζει υπέρ-υπέρλεπτη αλληλεπίδραση (Σχήμα 48(α)) η οποία όμως επιλύεται καλύτερα στο φάσμα δευτέρας παραγώγου (Σχήμα 48(γ)). Η παρατήρηση περισσότερων από τις 9 κορυφές που θεωρητικά προβλέπονται για ένταξη του Cu^{2+} με 4 ισοδύναμα άζωτα, μπορεί να οφείλεται στην παραμόρφωση της τετραγωνικής γεωμετρίας, η οποία μπορεί να διαταράξει την ισοτροπία στο επίπεδο x, y (276).

Σε υψηλότερες τιμές pH (έως 10,5), τα φάσματα απορρόφησης δίνουν το ίδιο μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης και το φάσμα κυκλικού διχρωισμού εμφανίζει την ίδια μορφή, υποδηλώνοντας ότι εάν λαμβάνει χώρα κάποια επιπλέον αποπρωτονίωση, αυτή δεν μεταβάλλει τον τρόπο ένταξης του $4\text{N} \{ \text{N}_{\text{Im}}, 3\text{N}^- \}$ συμπλόκου. Στο Σχήμα 49, παρατίθενται οι προτεινόμενες δομές των συμπλόκων που σχηματίζουν τα ιόντα Cu^{2+} με το πεπτίδιο H2B_{32-62} . Ανακεφαλαιώνοντας, το πεπτίδιο H2B_{32-62} , συμπλέκεται ιδιαίτερα αποτελεσματικά με τα ιόντα Cu^{2+} . Μάλιστα, τα σύμπλοκα που σχηματίζονται, υιοθετούν μία τρισδιάστατη δομή σε διάλυμα, η οποία απομακρύνει την καταβύθιση του ίδιου του πεπτιδίου που παρατηρείται σε $\text{pH} > 7$. Η μοναδική εξήγηση που μπορούμε να δώσουμε για την καταβύθιση του πεπτιδίου, έγκειται στην υιοθέτηση μιας τρισδιάστατης δομής η οποία μπορεί να ευνοήσει, είτε την αλληλεπίδραση των πλευρικών δραστικών ομάδων των υδρόφιλων καταλοίπων (R, K, D, E, S και Q) οδηγώντας σε εξουδετέρωση των φορτίων τους, είτε στην παγίδευση κάποιων εξ' αυτών σε υδρόφοβες κοιλοότητες του μορίου. Η σύμπλεξη με τα ιόντα Cu^{2+} , εκτός του ότι προσφέρει δύο επιπλέον φορτία στο σύνολο του μορίου, μπορεί να οδηγήσει σε επαναδιευθέτηση των υδρόφιλων πλευρικών αλυσίδων, είτε να διακόψει πιθανές αλληλεπιδράσεις αυτών, είτε στο σχηματισμό υδρόξο συμπλόκων, οδηγώντας σε αύξηση της διαλυτότητας. Από όσο γνωρίζουμε η παράξενη αυτή συμπεριφορά του υποκαταστάτη H2B_{32-62} , δεν έχει παρατηρηθεί ποτέ σε μελέτες σύμπλεξης πεπτιδίων με μέταλλα.



Σχήμα 49. Προτεινόμενες δομές σχηματιζόμενων συμπλόκων Cu^{2+} με το πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂

10,3,3 Σύμπλοκα νικελίου-πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅

Τα ποτενσιομετρικά δεδομένα από την τιτλοδότηση του συστήματος H2B₉₄₋₁₂₅/Ni²⁺ με πρότυπο διάλυμα NaOH, προσομοιώνονται καλύτερα θεωρώντας τον σχηματισμό 9 σωματιδίων με στοιχειομετρία : NiLH₅, NiLH₄, NiLH₃, NiLH₂, NiLH, NiL, NiLH₋₁, NiLH₋₂ και NiLH₋₃. Στον Πίνακα 10, δίνονται οι σταθερές σχηματισμού (log β) και οι διαδοχικές σταθερές ιονισμού (pK_a) των σχηματιζόμενων συμπλόκων, ενώ στον Πίνακα 11, παρατίθενται οι φασματοσκοπικοί παράμετροι αυτών, όπως προέκυψαν από την ανάλυση των φασμάτων ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και κυκλικού διχρωισμού (Σχήματα 50 και 51 αντίστοιχα). Η καταγραφή των φασμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε κατά το δυνατό, σε τιμές pH, όπου η συγκέντρωση διακεκριμένου είδους συμπλόκου πλησιάζει τη μέγιστη τιμή της, όπως εκτιμήθηκε από το διάγραμμα κατανομής (Σχήμα 52).

Πίνακας 10. Σταθερές σχηματισμού συμπλόκων Ni²⁺ με το πεπτίδιο H2B₉₄₋₁₂₅, T = 298 K, I = 0.2 M (KCl)

Σταθερές σχηματισμού συμπλόκων Ni(II) (log β) ^a									
	NiLH ₅	NiLH ₄	NiLH ₃	NiLH ₂	NiLH	NiL	NiLH ₋₁	NiLH ₋₂	NiLH ₋₃
H2B ₉₄₋₁₂₅	54.10(1)	46.21(8)	37.20(2)	29.13(3)	19.82(2)	10.05(2)	-0.28(2)	-10.92(2)	-22.14(2)
Διαδοχικές σταθερές ιονισμού (pK _a)									
H2B ₉₄₋₁₂₅	NiLH ₅ NiLH ₄	NiLH ₄ NiLH ₃	NiLH ₃ NiLH ₂	NiLH ₂ NiLH	NiLH NiL	NiL NiLH ₋₁	NiLH ₋₁ NiLH ₋₂	NiLH ₋₂ NiLH ₋₃	
	7.89	9.01	8.07	9.31	9.77	10.33	10.64	11.22	
log K* ^b									
	1N {N _{lm} }		2N {N _{lm} , N _{amide} ⁻ }		3N {N _{lm} , 2N _{amide} ⁻ }		4N {N _{lm} , 3N _{amide} ⁻ }		
H2B ₉₄₋₁₂₅	-3.86		-11.75		-20.76		-28.83		
ELAKHA	-3.55		-11.75		-		-28.87		

$$^a \beta_j = [\text{MH}_j\text{L}] / [\text{M}] [\text{H}^+]^j [\text{L}]$$

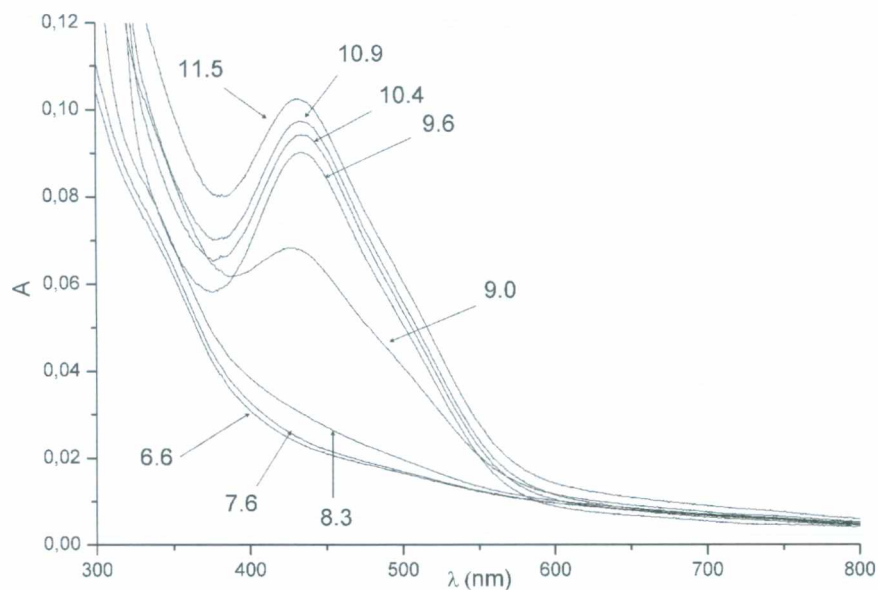
$$^b \log K^* = \log \beta (\text{MLH}_j) - \log \beta (\text{H}_6\text{L})$$

Πίνακας 11. Φασματοσκοπικές παράμετροι για σχηματιζόμενα σύμπλοκα ιόντων Ni^{2+} με το πεπτίδιο H2B_{94-125} , στους 298 K

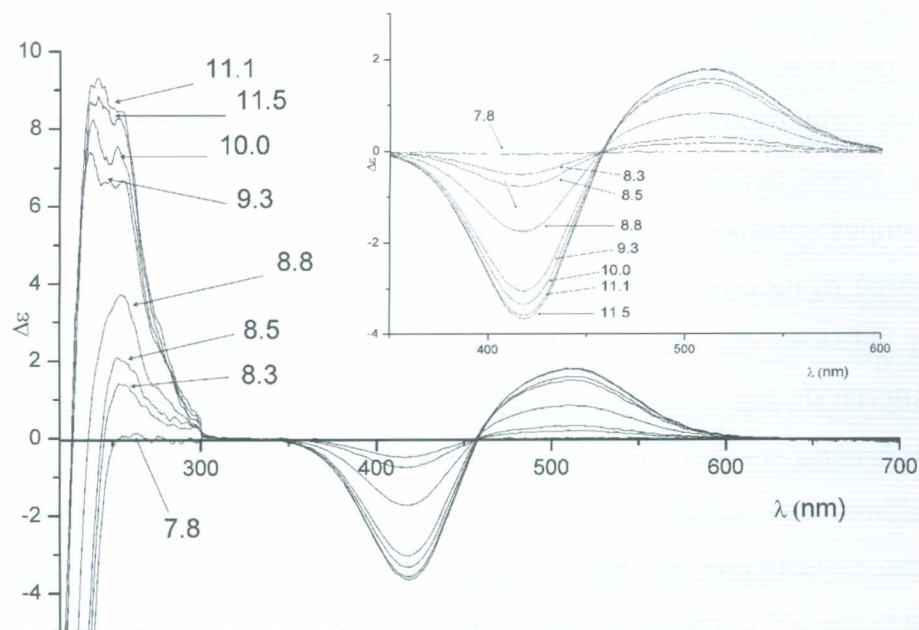
Είδος συμπλόκου	UV-Vis		CD	
	λ_{max} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{max} (nm)	$\Delta\epsilon$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
NiLH_5 (1N) *	-	-	-	-
NiLH_4 (2N)	-	-	255 ^a	+1.40
			269 ^c	+0.30
			416 ^b	-0.51
			513 ^b	+0.17
NiLH_3 (3N) *	-	-	-	-
NiLH_2 (4N)	428	134	255 ^a	+3.70
			274 ^c	+1.34
			417 ^b	-1.75
			510 ^b	+0.84
NiLH (4N)	433	177	256 ^a	+6.65
			274 ^c	+2.53
			418	-3,05
			514	+1.48
NiL (4N)	-	-	252 ^a	+7.54
			273 ^c	+2.84
			418 ^d	-3.34
			514 ^d	+1.57
NiLH_1 (4N)	433	185	-	-
NiLH_2 (4N)	433	191	254 ^a	+8.46
			276 ^c	+3,01
			418 ^d	-3.59
			514 ^d	+1.76
NiLH_3 (4N)	433	200	253 ^a	+8.26
			274 ^c	+2.98
			418 ^d	-3.67
			514 ^d	+1.79

^a ταινία μεταφοράς φορτίου $\text{N}_{\text{Imidazole}} \rightarrow \text{Ni}^{2+}$ ^b d-d μετάπτωση^c ταινία μεταφοράς φορτίου $\text{N}_{\text{amide}} \rightarrow \text{Ni}^{2+}$

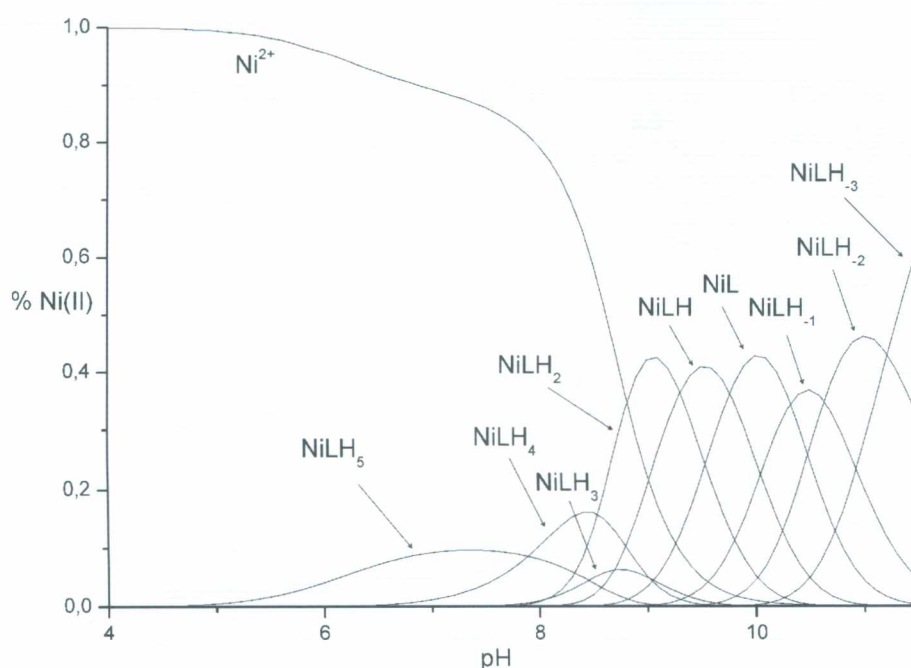
* δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση τους λόγω χαμηλής συγκέντρωσης και/ή επικάλυψης με άλλα είδη



Σχήμα 50. Φάσματα απορρόφησης του συστήματος $\text{Ni}^{2+}/\text{H2B}_{94-125}$ σε μοριακή αναλογία $\text{Ni}^{2+}:\text{H2B}_{94-125}$ 1:1.1, σε μεταβαλλόμενες τιμές pH



Σχήμα 51. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού του συστήματος $\text{Ni}^{2+}/\text{H2B}_{94-125}$ σε μοριακή αναλογία $\text{Ni}^{2+}:\text{H2B}_{94-125}$ 1:1.1, σε μεταβαλλόμενες τιμές pH



Σχήμα 52. Διάγραμμα κατανομής σχηματιζόμενων συμπλόκων για το σύστημα $\text{Ni}^{2+} / \text{H2B}_{94-125}$ σε μοριακή αναλογία $\text{Ni}^{2+} : \text{H2B}_{32-62}$ 1:1.1 ($C = 0.5 \text{ mM}$)

Η σύμπλεξη των ιόντων Ni^{2+} με το πεπτίδιο H2B_{94-125} , ξεκινάει σε pH περίπου ίσο με 5, με το σχηματισμό του σωματιδίου NiLH_5 . Όπως φαίνεται από το διάγραμμα κατανομής, το σύμπλοκο αυτό σχηματίζεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση (είναι υπεύθυνο για τη σύμπλεξη του 10% της ολικής συγκέντρωσης Ni^{2+} σε $\text{pH} = 7,4$), με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ανιχνευθεί φασματοσκοπικά. Εντούτοις, μπορεί να χαρακτηριστεί από την στοιχειομετρία του και την σταθερά σχηματισμού του. Η τιμή $\log K^* = -3,86$ είναι συγκρίσιμη με αυτήν που δίνεται στη βιβλιογραφία για το 1N σύμπλοκο του νικελίου με τα πεπτίδια Ac-TRSRSHTSEGTRSR-Am, ($\log K^* = -3,62$) (323) και Ac-AKRHRK-Am, ($\log K^* = -4,02$), (275) υποδηλώνοντας τον ίδιο τρόπο ένταξης. Το κατάλοιπο ιστιδίνης His_{16} , προσφέρει μέσω του N(3) αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου την πιο αποτελεσματική θέση ένταξης, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός παραμορφωμένου οκταεδρικού συμπλόκου $\{\text{N}_{\text{Im}}\}$.

Με την αύξηση του pH το σύμπλοκο NiLH_5 απελευθερώνει ένα πρωτόνιο με μία τιμή $\text{pK}_a = 7,89$ και σχηματίζεται το σωματίδιο με στοιχειομετρία NiLH_4 . Η θερμοδυναμική παράμετρος $\log K^* = -11,75$, είναι τυπική για σχηματισμό ενός 2N $\{\text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-\}$ συμπλόκου (274-276). Πρόσθετη ένδειξη του ανωτέρω τρόπου σύμπλεξης αποτελεί η παρουσία στο

καταγεγραμμένο σε $\text{pH} \sim 8,3$ CD-φάσμα, του μεγίστου σε θετικές τιμές $\Delta\epsilon$, ($\lambda_{\text{max}} = 513 \text{ nm}$), το οποίο είναι χαρακτηριστικό της συμμετοχής ενός καταλοίπου His στη δημιουργία ενός χηλικού δακτυλίου (340). Η ταινία μεταφοράς φορτίου στα 255 nm , μπορεί να αποδοθεί στην μετάπτωση $\text{N}_{\text{Im}} \rightarrow \text{Ni}^{2+}$, ενώ μία επιπλέον ταινία στα 269 nm , είναι πιθανόν να οφείλεται στην μετάπτωση $\text{N}_{\text{amide}} \rightarrow \text{Ni}^{2+}$ (278).

Το επόμενο σχηματιζόμενο σύμπλοκο, NiLH_3 , του οποίου ο σχηματισμός ξεκινάει σε pH περίπου ίσο με 8, δεν μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοσκοπικές μεθόδους, λόγω της πολύ μικρής συγκεντρώσης του και επικάλυψης με τα σωματίδια NiLH_4 και NiLH_2 . Εντούτοις, η ποτενσιομετρία ανιχνεύει την ύπαρξη του σε ένα εύρος τιμών $\text{pH} 7,8 - 9,6$. Οι θερμοδυναμικές παράμετροι που δίνονται στον Πίνακα 10 είναι χαρακτηριστικές για την αποπρωτονίωση ενός επιπλέον αμιδικού αζώτου και την σύμπλεξη του μετάλλου με ένα σύνολο δοτών του τύπου $\{ \text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^- \}$. Από τις τιμές των διαδοχικών σταθερών ιονισμού που δίνονται στον ίδιο Πίνακα προκύπτει ότι η αποπρωτονίωση του τρίτου αμιδικού αζώτου που οδηγεί στο σχηματισμό του επόμενου 4N συμπλόκου (NiLH_2), λαμβάνει χώρα με μία τιμή $\text{pK}_a = 8,07$ η οποία είναι μικρότερη από αυτήν που υπολογίζεται για τον ιονισμό του δεύτερου ($\text{pK}_a = 9,01$). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τον συνεργιστικό χαρακτήρα των παραπάνω ιονισμών κι εξηγεί την πολύ μικρή συγκέντρωση του συμπλόκου NiLH_3 .

Η τιμή $\lambda_{\text{max}} = 428 \text{ nm}$, που εξάγεται από το φάσμα απορρόφησης, όπως και οι φασματοσκοπικές παράμετροι που εξάγονται από το φάσμα κυκλικού διχρωισμού, ενισχύουν την άποψη ότι το σωματίδιο NiLH_2 είναι ένα χαμηλού spin, επίπεδο τετραγωνικό σύμπλοκο, όπου το κεντρικό ιόν συμπλέκεται με το πεπτιδίο μέσω του ιμιδαζολικού και 3 αποπρωτονιωμένων αμιδικών αζώτων. Οι τιμές pK_a που δίνονται στον Πίνακα 10 για τις περαιτέρω αποπρωτονιώσεις που λαμβάνουν χώρα, είναι παραπλήσιες με αυτές που δίνονται στον Πίνακα 5 και αναφέρονται στον ιονισμό των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Lys και Tyr του ελεύθερου υποκαταστάτη. Το γεγονός αυτό, σε συνδιασμό με την παρατήρηση ότι τα φάσματα απορρόφησης και κυκλικού διχρωισμού για τιμές $\text{pH} > 9$ εμφανίζουν την ίδια μορφή, υποδηλώνει ότι η γεωμετρία και ο τρόπος ένταξης των συμπλόκων NiLH_2 , NiLH , NiL , NiLH_{-1} , NiLH_2 και NiLH_3 δεν μεταβάλλεται.

Ο σχηματισμός του επίπεδου τετραγωνικού διαμαγνητικού συμπλόκου του πεπτιδίου $\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ με Ni^{2+} , μελετήθηκε περαιτέρω με πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα κατανομής (Σχήμα 52), η επιλογή του pH για την καταγραφή των φασμάτων δεν είναι εύκολη υπόθεση. Η παρουσία 4 καταλοίπων Lys και 1 καταλοίπου Tyr, που χαρακτηρίζονται από παραπλήσιες τιμές pK_a των όξινων ομάδων τους, έχει ως

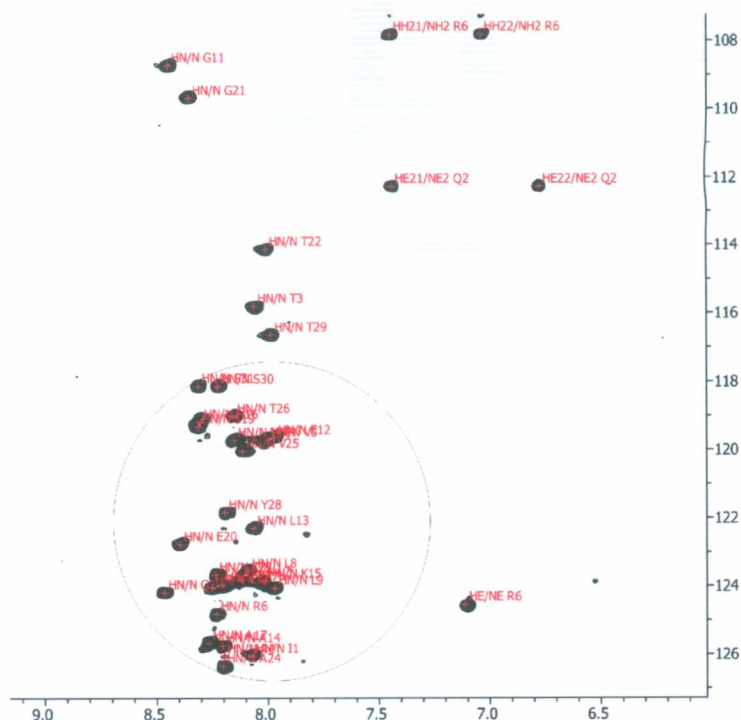
αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας πληθώρας συμπλόκων στην pH-μετρική κλίμακα 10-11,5 κι έτσι από το διάγραμμα κατανομής, δεν μπορεί να επιλεγεί μία διακεκριμένη τιμή pH, στην οποία να δεσπόζει ένα μοναδικό σύμπλοκο. Η επιλογή περιορίζεται ακόμα περισσότερο από το γεγονός ότι στις ισχυρά αλκαλικές τιμές pH, η διαλυτότητα μειώνεται και μπορούν να εμφανιστούν προβλήματα καταβύθισης.

Παρόλα αυτά, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η γεωμετρία και ο τρόπος ένταξης των επίπεδων τετραγωνικών συμπλόκων του νικελίου (NiLH_2 , NiLH , NiL , NiLH_{-1} , NiLH_{-2} και NiLH_{-3}) δεν μεταβάλλεται. Βασισμένοι σε αυτήν την παρατήρηση, αποφασίσαμε να καταγράψουμε τα NMR φάσματα παρουσία ιόντων Ni^{2+} , σε pH = 10,3. Επιπροσθέτως, σε αυτήν την τιμή pH, δεν υπάρχει ελεύθερο παραμαγνητικό Ni^{2+} που θα μπορούσε να προκαλέσει διεύρυνση των κορυφών και μείωση της ποιότητας των καταγεγραμμένων φασμάτων.

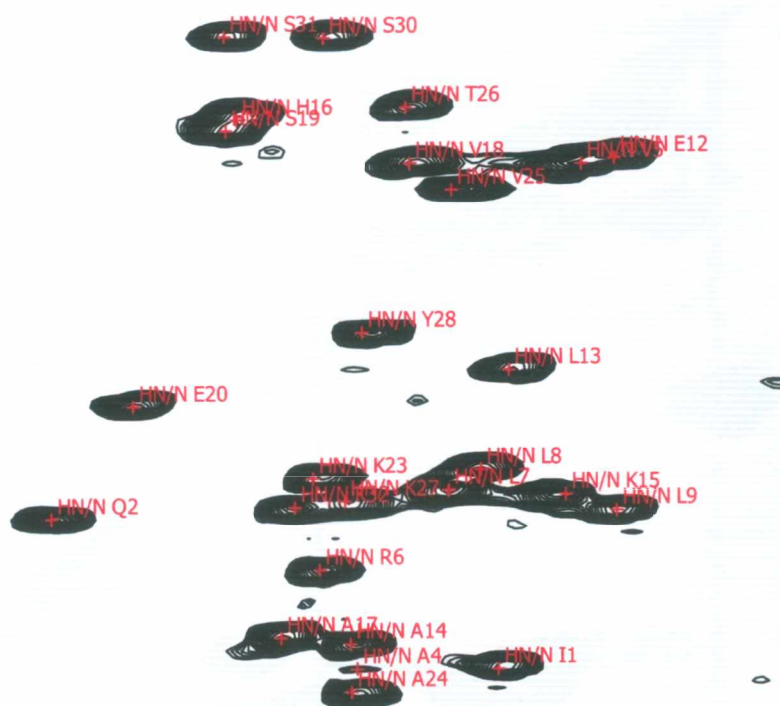
Η ταυτοποίηση των σημάτων συντονισμού των πυρήνων ^1H και ^{13}C , πραγματοποιήθηκε μέσω της συνδιασμένης ανάλυσης των δισδιάστατων πειραμάτων TOCSY, ^{13}C -HSQC, NOESY και ROESY που καταγράψαμε για το ελεύθερο και συμπλεγμένο πεπτίδιο σε pH 10,3. Προκειμένου να διευκολύνουμε την διαδικασία ταυτοποίησης των σημάτων στο αλκαλικό pH, καταγράψαμε μία επιπλέον σειρά φασμάτων για το ελεύθερο πεπτίδιο H2B_{94-125} σε pH 2,5 και διαλύτη 10% D_2O , 90% H_2O , όπου η μικρή ταχύτητα ανταλλαγής των αμιδικών πρωτονίων με πρωτόνια του διαλύτη, επιτρέπει την παρατήρηση των σημάτων συντονισμού τους. Τα φάσματα ^{15}N -HSQC, ^{13}C -HSQC, TOCSY και NOESY που καταγράψαμε σε pH 2,5 παρουσιάζονται στα Σχήματα 53, 54, 55 και 56 αντίστοιχα.

Η ανάλυση μέσω του Chemical Shift Index, υποδεικνύει ότι το πεπτίδιο δεν περιέχει στοιχεία δευτεροταγούς δομής α-έλικας ή β-φύλλου, αλλά πρόκειται για μία τυχαία περιελισσόμενη δομή (random coil), τόσο σε pH 2,5, όσο και σε pH 10,3. Τα CSI διαγράμματα που προέκυψαν από τις χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων H_α , C_α και C_β δίνονται στο Σχήμα 57.

(α)

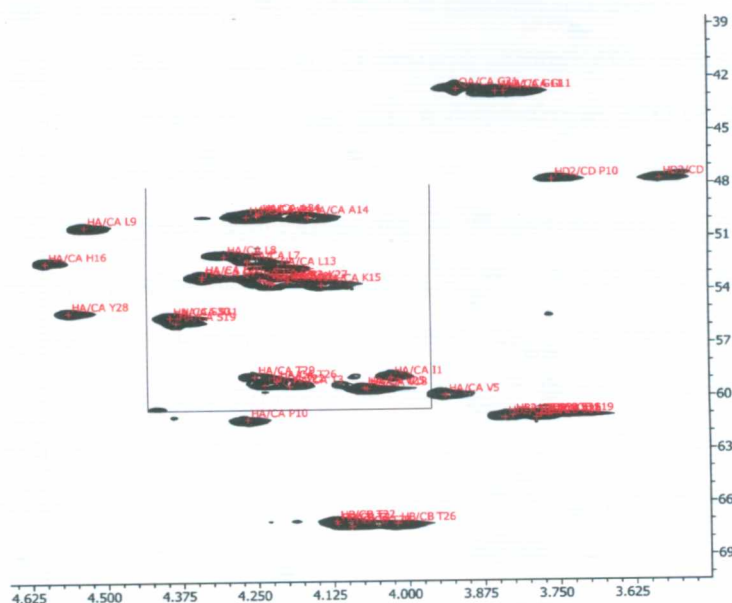
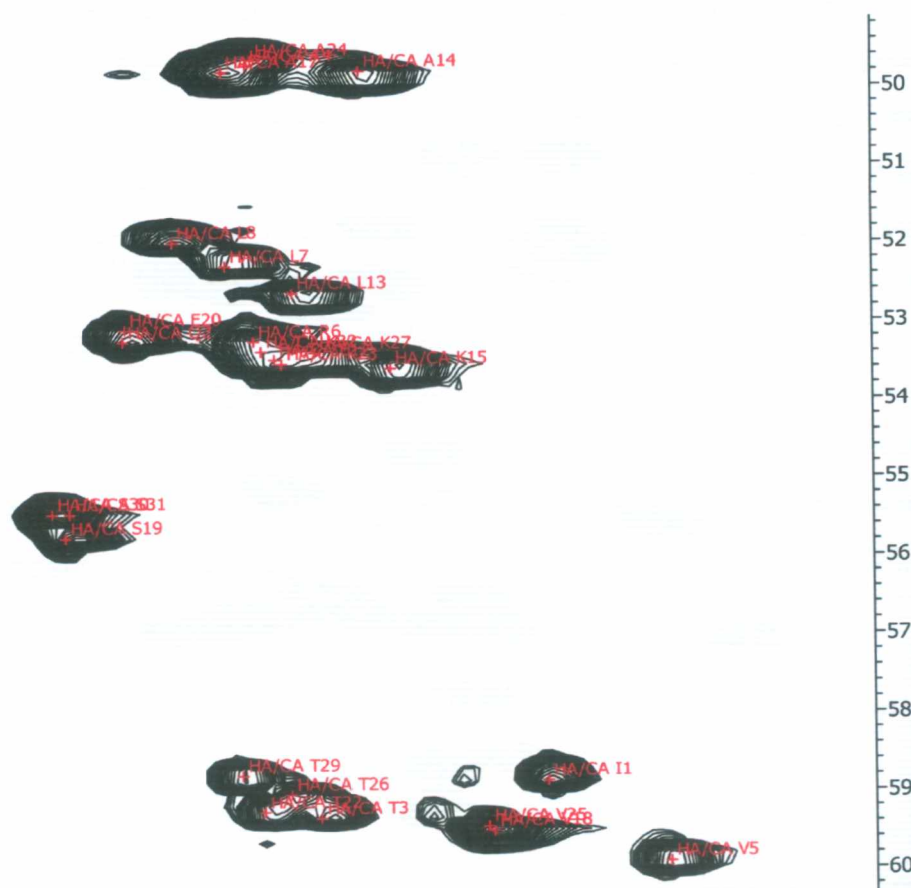


(β)

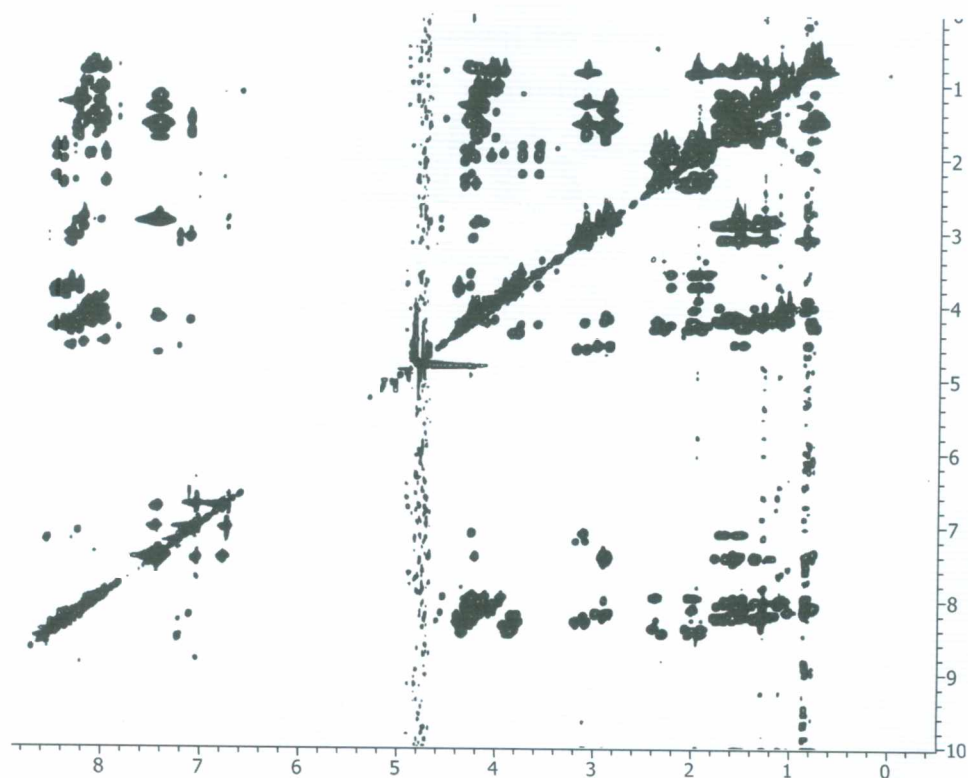


Σχήμα 53. (α) ^{15}N -HSQC φάσμα του πεπτιδίου H28_{94-125} σε pH 2,5 (β) Μεγέθυνση της κυκλωμένης περιοχής του α φάσματος. Οι ταυτοποιήσεις των πυρήνων N και αμιδικού H σε συγκεκριμένο κατάλογο σημειώνονται με κόκκινο χρώμα

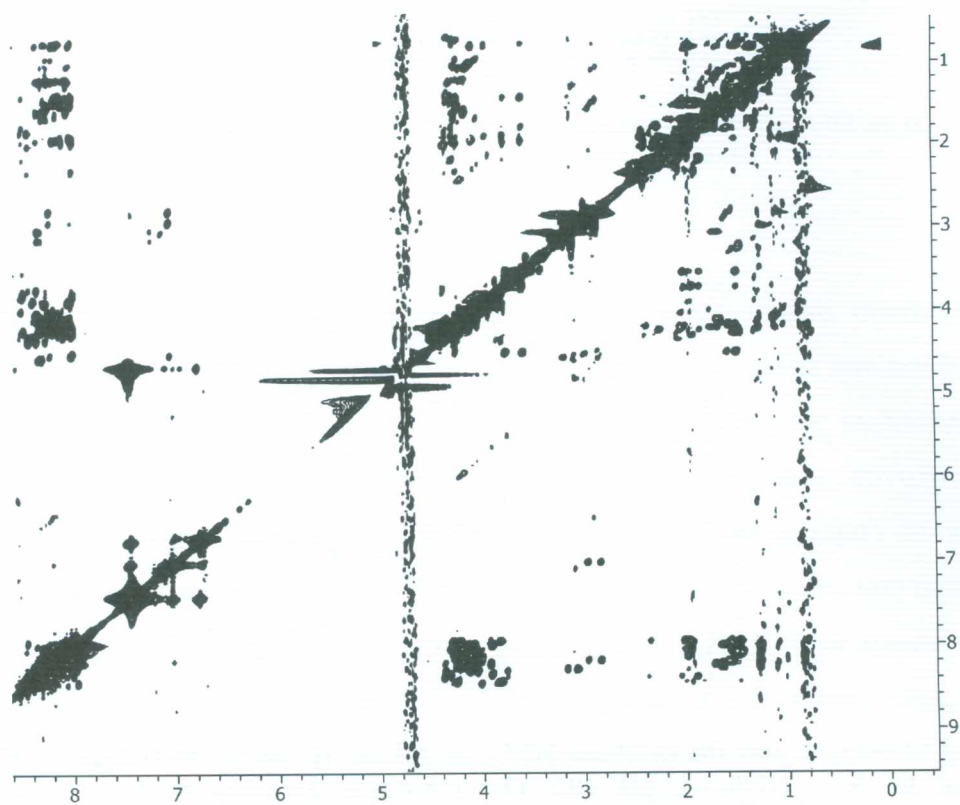
(a)

 (β) 

Σχήμα 54. (α) H_α - C_α περιοχή του ^{13}C -HSQC φάσματος του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ σε pH 2,5 (β) Μεγέθυνση της επισημασμένης περιοχής του α φάσματος. Οι H_α , C_α ταυτοποιήσεις δίνονται με κόκκινο χρώμα

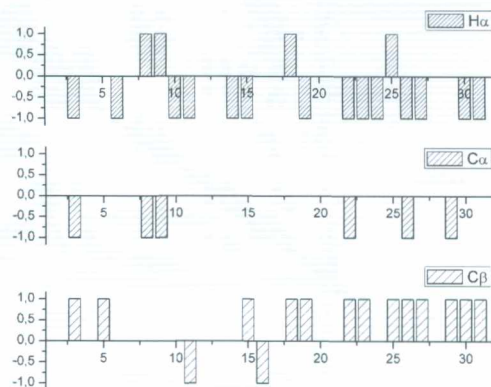


Σχήμα 55. TOCSY φάσμα του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ σε pH 2,5 (Ταυτοποίηση των κορυφών διασταύρωσης δίνεται στο Παράρτημα)

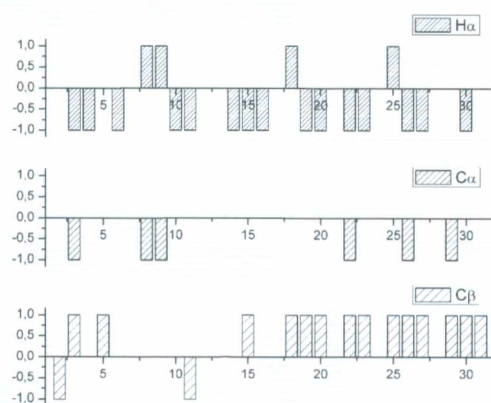


Σχήμα 56. NOESY φάσμα του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ σε pH 2,5

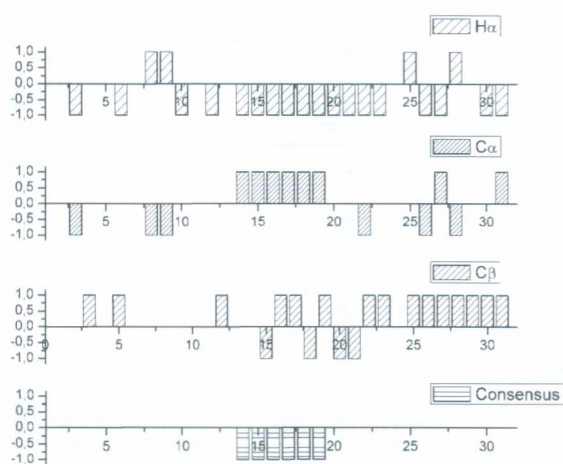
(α)



(β)

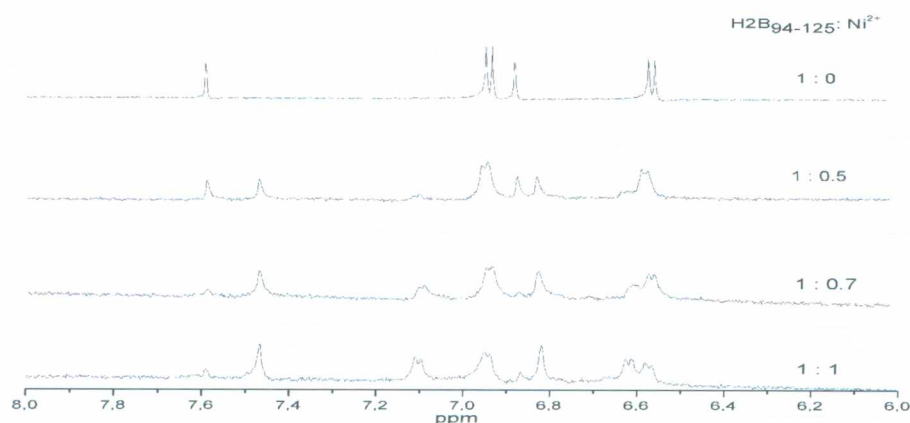


(γ)



Σχήμα 57. CSI διαγράμματα (α) ελεύθερο H2B₉₄₋₁₂₅, pH 2,5 (β) ελεύθερο H2B₉₄₋₁₂₅, pH 10,3 (γ) συμπλεγμένο με Ni²⁺, H2B₉₄₋₁₂₅, pH 10,3 (Τα consensus διαγράμματα για τα (α) και (β) παραλείπονται, διότι όλες οι τιμές είναι ίσες με μηδέν.)

Ο προοδευτικός κορεσμός της θέσης δέσμευσης των ιόντων Ni^{2+} , παρακολουθήθηκε από τα σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων του καταλοίπου His_{16} , κατά την τιτλοδότηση του πεπτιδίου H2B_{94-125} με ιόντα Ni^{2+} (Σχήμα 58), σε pH 10,3. Το αλκαλικό pH που απαιτείται για τον σχηματισμό του $4\text{N } \{\text{N}_{\text{Im}}, 3\text{N}^-\}$ συμπλόκου, προκαλεί αύξηση της ταχύτητας ανταλλαγής των ευκίνητων αμιδικών πρωτονίων με τα πρωτόνια του διαλύτη και ως εκ τούτου απώλεια των σημάτων συντονισμού τους. Λόγω της αναπόφευκτης απώλειας των σημάτων αυτών, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε ως διαλύτη δευτεριωμένο νερό, προκειμένου να επιτύγχουμε καλύτερα την καταστολή του σήματος του νερού.



Σχήμα 58. Αρωματική περιοχή ^1H NMR φάσματος, καταγεγραμμένου στα 600 MHz, 298 K και pH 10.3 του πεπτιδίου H2B_{94-125} , με αυξανόμενη συγκέντρωση ιόντων Ni^{2+}

Με βάση τα παραπάνω, απουσία ιόντων Ni^{2+} , τα μοναδικά σήματα συντονισμού που παρατηρούνται στο ^1H NMR φάσμα, στην περιοχή 6-8 ppm, είναι αυτά που οφείλονται στα αρωματικά πρωτόνια των καταλοίπων His και Tyr. Με την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ni^{2+} , παρατηρείται προοδευτική μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των ιμιδαζολικών πρωτονίων. Συγκεκριμένα, η ένταση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων $\text{H}_{\delta 1}$ και $\text{H}_{\delta 2}$ στα 7,591 και 6,864 ppm, αντίστοιχα, προοδευτικά μειώνεται, ενώ ταυτόχρονα 2 νέα σήματα στα 7,467 και 6,817 ppm, που αντιστοιχούν στα ιμιδαζολικά πρωτόνια στο νέο περιβάλλον του συμπλόκου εμφανίζονται, με σταδιακή αύξηση της έντασης τους. Κατά την τιτλοδότηση, παρατηρείται μετατόπιση των σημάτων συντονισμού και των αρωματικών πρωτονίων της Tyr_{28} , γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου επηρεάζεται κατά κάποιον τρόπο και αυτό το κατάλοιπο.

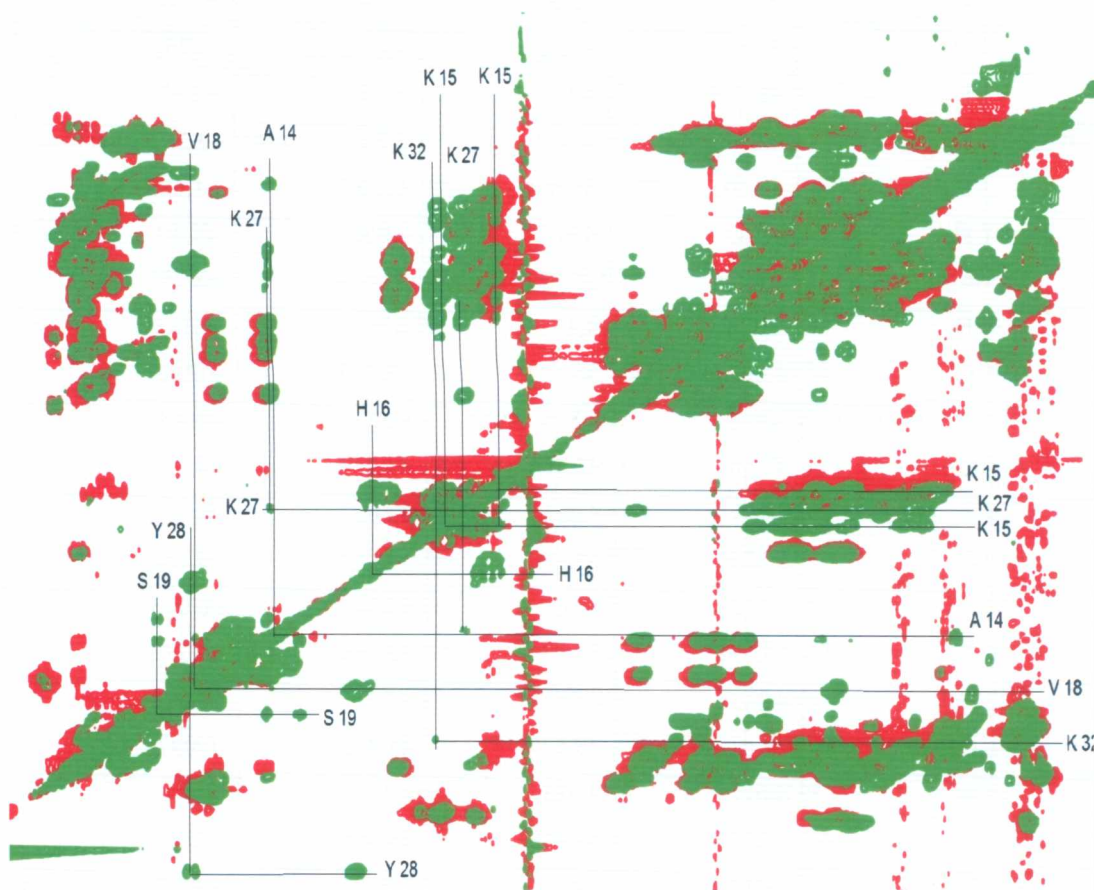
Η ταυτοποίηση των σημάτων συντονισμού στα φάσματα που ελήφθησαν έπειτα από προσθήκη ιόντων Ni^{2+} , πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας με τα αντίστοιχα φάσματα του ελεύθερου υποκαταστάτη. Οι νέες κορυφές που παρατηρήθηκαν, αποδόθηκαν στο σύμπλοκο $\text{Ni(II)-H}_2\text{B}_{94-125}$. Στον Πίνακα 12, δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις των α -ατόμων υδρογόνου και άνθρακα και των αρωματικών πρωτονίων, για το ελεύθερο και συμπλεγμένο πεπτίδιο $\text{H}_2\text{B}_{94-125}$. Οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πυρήνων υδρογόνου και άνθρακα, δίνονται στους Πίνακες 20, 21 και 22 στο Παράρτημα, στο τέλος του Κεφαλαίου.

Πίνακας 12. Χημικές μετατοπίσεις αρωματικών πρωτονίων, α -ατόμων H και C, ελεύθερου και συμπλεγμένου $\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ (ppm σε σχέση με TMS)

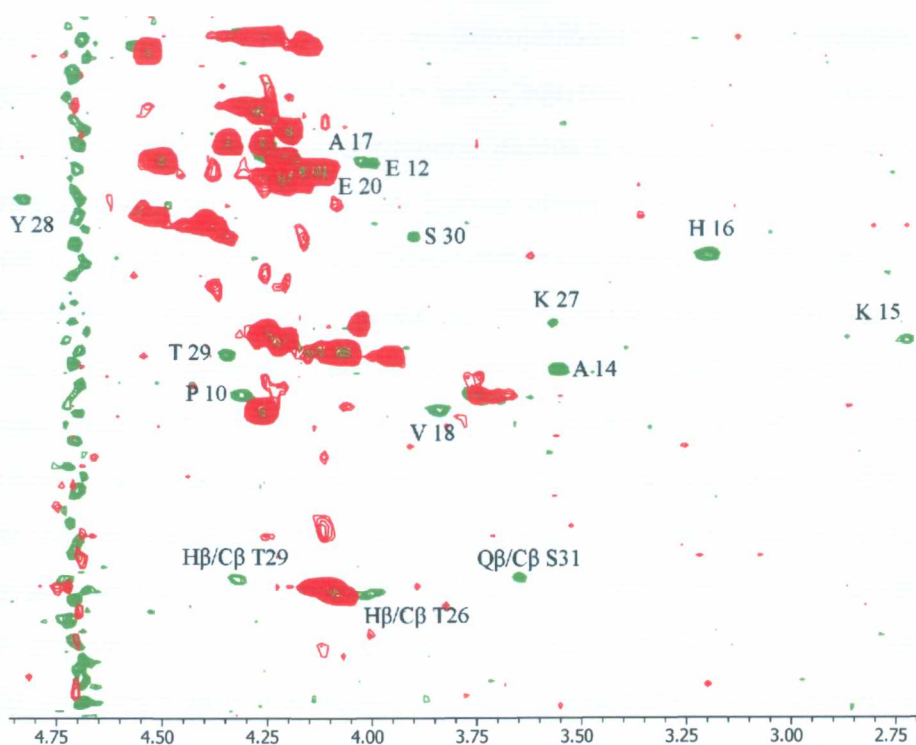
κατάλοιπο	άτομο	$\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ pH=2,5 (ppm)	$\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ pH=10,3 (ppm)	$\text{Ni(II)-H}_2\text{B}_{94-125}$ pH=10,3 (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
Ile ₁	H _{α}	4,027	4,035	4,029	-0,006
	C _{α}	58,864	58,677	58,721	+0,044
Gln ₂	H _{α}	4,339	4,350	4,347	-0,003
	C _{α}	53,232	53,025	53,032	+0,007
Thr ₃	H _{α}	4,195	4,207	4,204	-0,003
	C _{α}	59,339	59,013	59,031	+0,018
Ala ₄	H _{α}	4,247	4,242	4,259	+0,017
	C _{α}	49,704	49,597	49,632	+0,035
Val ₅	H _{α}	3,937	3,957	3,948	-0,009
	C _{α}	59,906	59,613	59,657	+0,044
Arg ₆	H _{α}	4,242	4,266	4,264	-0,002
	C _{α}	53,240	53,029	52,920	-0,109
Leu ₇	H _{α}	4,263	4,262	4,279	+0,017
	C _{α}	52,280	52,087	51,806	-0,281
Leu ₈	H _{α}	4,302	4,305	4,329	+0,024
	C _{α}	51,976	51,773	52,909	+1,136
Leu ₉	H _{α}	4,534	4,534	4,554	+0,02
	C _{α}	50,270	50,184	49,940	-0,244
Pro ₁₀	H _{α}	4,266	4,262	4,317	+0,055
	C _{α}	61,216	61,382	60,823	-0,559
Gly ₁₁	H _{$\alpha 1$} , H _{$\alpha 2$} (Q _{α})	3,837, 3,851	3,798, 3,775	3,887	+0,101
	C _{α}	42,740	42,688	42,429	-0,259
Glu ₁₂	H _{α}	4,227	4,222	4,016	-0,206
	C _{α}	53,474	53,968	53,431	-0,537

Leu ₁₃	H _α	4,213	4,207	4,261	+0,054
	C _α	52,625	52,400	53,171	+0,771
Ala ₁₄	H _α	4,163	4,165	3,563	-0,602
	C _α	49,782	49,890	59,987	+10,097
Lys ₁₅	H _α	4,141	4,121	2,732	-1,389
	C _α	53,594	53,815	59,126	+5,311
His ₁₆	H _α	4,599	4,501	3,194	-1,307
	H _{δ2}	7,216	6,864	6,817	-0,047
	H _{ε1}	8,535	7,591	7,467	-0,124
	C _α	52,289	53,337	56,428	+3,091
Ala ₁₇	H _α	4,265	4,263	4,011	-0,252
	C _α	49,779	49,577	53,556	+3,979
Val ₁₈	H _α	4,067	4,057	3,838	-0,219
	C _α	59,505	59,604	61,260	+1,656
Ser ₁₉	H _α	4,383	4,367	3,976	-0,391
	C _α	55,728	55,831	59,628	+3,797
Glu ₂₀	H _α	4,338	4,171	4,006	-0,165
	C _α	53,077	53,672	53,509	-0,163
Gly ₂₁	H _{α1} , H _{α2} (Q _α)	3,916	3,876, 3,912	3,853	-0,041
	C _α	42,583	42,356	42,578	+0,222
Thr ₂₂	H _α	4,237	4,235	4,205	-0,03
	C _α	59,259	58,990	59,152	+0,162
Lys ₂₃	H _α	4,222	4,209	4,224	+0,015
	C _α	53,531	53,336	53,394	+0,771
Ala ₂₄	H _α	4,243	4,253	4,331	+0,078
	C _α	49,632	49,575	49,478	-0,097
Val ₂₅	H _α	4,071	4,085	4,115	+0,03
	C _α	59,447	59,448	59,508	+0,06
Thr ₂₆	H _α	4,217	4,227	4,210	-0,017
	C _α	59,028	59,306	59,056	-0,25
Lys ₂₇	H _α	4,197	4,170	3,565	-0,605
	C _α	53,390	53,964	58,557	+4,593
Tyr ₂₈	H _α	4,561	4,515	4,831	+0,316
	H _{δ1} , H _{δ2} (Q _δ)	7,035	6,955, 6,935	7,106, 7,096	+0,151, +0,161
	H _{ε1} , H _{ε2} (Q _ε)	6,733	6,583, 6,565	6,618	+0,044
	C _α	55,111	55,227	54,690	-0,537
Thr ₂₉	H _α	4,253	4,257	4,352	+0,095
	C _α	58,786	58,807	59,514	+0,707

Ser ₃₀	H _α	4,393	4,391	3,912	-0,479
	C _α	55,421	55,522	55,841	+0,319
Ser ₃₁	H _α	4,380	4,403	3,704	-0,699
	C _α	55,424	55,280	60,922	+5,642
Lys ₃₂	H _α	4,237	4,231	4,111	-0,12
	C _α	53,370	53,351	59,493	+6,142



Σχήμα 59. Επικαλυπτόμενη αλειφατική περιοχή των TOCSY φασμάτων του ελεύθερου πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ (κόκκινο) και συμπλεγμένου με νικέλιο (πράσινο). Έχουν σημειωθεί μερικές από τις καινούριες κορυφές λόγω της σύμπλεξης.



Σχήμα 60. Επικαλυπτόμενη H_α - C_α περιοχή των ^{13}C -HSQC φασμάτων του ελεύθερου πεπτιδίου H2B_{94-125} (κόκκινο) και συμπλεγμένου με νικέλιο (πράσινο). Έχουν σημειωθεί οι καινούριες κορυφές λόγω της σύμπλεξης.

Η προσθήκη ιόντων Ni^{2+} , προκαλεί αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων ^1H και ^{13}C διαφόρων καταλοίπων (Πίνακας 12, Σχήμα 59, 60). Οι μεγαλύτερες διαφορές παρατηρούνται ως μετατοπίσεις υψηλού πεδίου (upfield) των α -πρωτονίων των καταλοίπων His_{16} , Lys_{15} και Ala_{14} , υποδεικνύοντας ότι αυτό το τμήμα του μορίου, εμπλέκεται στην σύμπλεξη με το μέταλλο. Μικρότερες διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις παρατηρούνται και για τα γειτονικά κατάλοιπα, Gly_{11} , Glu_{12} , Leu_{13} , Ala_{17} , Val_{18} , Ser_{19} και Glu_{20} , υποδηλώνοντας ότι το μαγνητικό τους περιβάλλον μεταβάλλεται κατά την σύμπλεξη με το νικέλιο. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σημαντικές διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων H_α και C_α , παρατηρούνται και για τα κατάλοιπα του C-τελικού άκρου του πεπτιδίου και συγκεκριμένα για τα αμινοξέα του τμήματος Lys_{27} - Tyr_{28} - Thr_{29} - Ser_{30} - Ser_{31} - Lys_{32} .

Η ανάλυση μέσω του Chemical Shift Index για το συμπλεγμένο πεπτίδιο, υποδηλώνει μία δομική αναμόρφωση του πεπτιδίου για το τμήμα Ala_{14} - Lys_{15} - His_{16} - Ala_{17} - Val_{18} - Ser_{19} . Το υψηλό pH (10,3) είναι γεγονός ότι μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία της μεθόδου. Επιπροσθέτως, είναι αυτονόητο ότι η σύμπλεξη με το νικέλιο μπορεί να προκαλέσει μία γενική τάση στις χημικές μετατοπίσεις, με αποτέλεσμα οι συγκρίσεις αυτών με τις random coil τιμές να μην ανταποκρίνονται στην πραγματικότητα και να μην μπορούν να εξαχθούν

στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Παρόλα αυτά, το ολικό διάγραμμα (consensus plot) που παρουσιάζεται στο Σχήμα 57(γ) υποστηρίζει ότι το πεπτίδιο υιοθετεί στην περιοχή Ala₁₄-Lys₁₅-His₁₆-Ala₁₇-Val₁₈-Ser₁₉ μία μοναδική γεωμετρία, η οποία πιθανόν να οφείλεται στη σύμπλεξη με τα ιόντα Ni²⁺ (και η οποία φυσικά δεν είναι α-έλικα όπως εξάγεται από το διάγραμμα), ενώ το υπόλοιπο τμήμα παραμένει χωρίς στοιχεία δευτεροταγούς δομής.

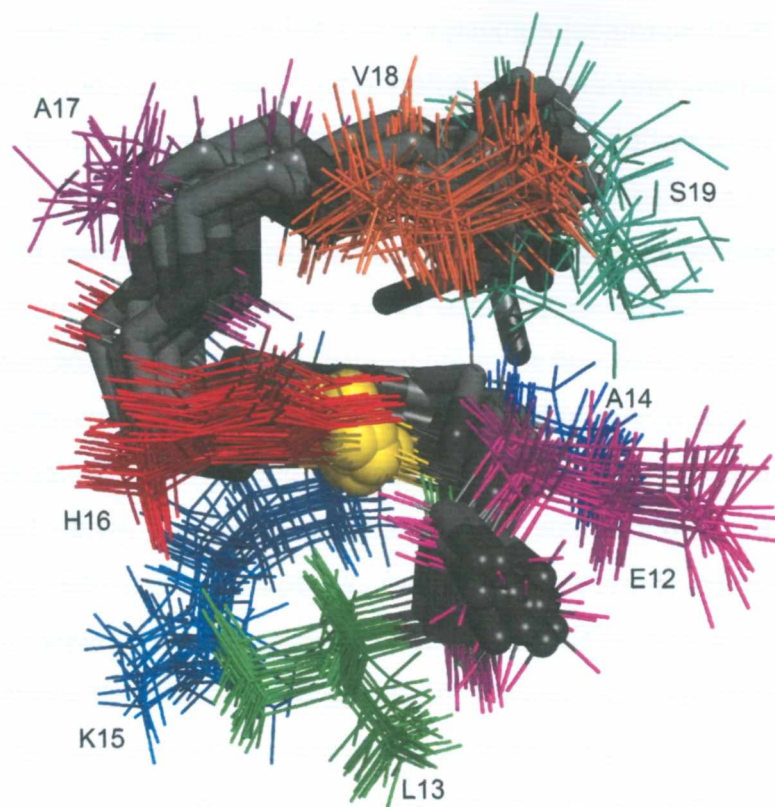
Με βάση τα δεδομένα που παρουσιάζονται παραπάνω, είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η σύμπλεξη του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ με τα ιόντα Ni²⁺, μπορεί να είναι υπεύθυνη με 2 τρόπους στην παρατηρούμενη δομική διαφοροποίηση μεταξύ ελεύθερου και συμπλεγμένου πεπτιδίου: (i) Με την επιβολή μιας δομικής μετάπτωσης, από μια τυχαία περιελισσόμενη δομή στο ελεύθερο H2B₉₄₋₁₂₅, σε μια καλά καθορισμένη αλλά στερούμενη από δομικά στοιχεία α-έλικας ή β-φύλλου στο συμπλεγμένο πεπτίδιο. (ii) Με την ελάττωση της ελευθερίας κίνησης του πεπτιδικού μορίου, οδηγούμαστε σε μια δομή όπου τα αμινοξικά κατάλοιπα προσαρμόζονται στην θερμοδυναμικά περισσότερο ευνοούμενη, γεωμετρία ένταξης.

Η His₁₆, παρουσιάζει σημαντική μετατόπιση της συχνότητας συντονισμού του α-πρωτονίου της (>1 ppm). Μετατοπίσεις σε υψηλότερο πεδίο, παρατηρούνται τόσο για τα β-πρωτόνια, όσο και για τα αρωματικά πρωτόνια του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι σε συμφωνία με το σημαντικό ρόλο του ιμιδαζολικού αζώτου ως πρωταρχικού υποκαταστάτη για μεταλλικά ιόντα, σε N- και C-τελικά προστατευμένα πεπτίδια που περιέχουν ένα κατάλοιπο His στην πρωτοταγή δομή τους (143, 336). Όπως διακρίνεται από τον Πίνακα 12, μεγαλύτερη μετατόπιση συχνότητας συντονισμού α-πρωτονίου, παρατηρείται μονάχα για την Lys₁₅ ($\Delta\delta = -1,389$). Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι τα σήματα των β και δ πρωτονίων του συγκεκριμένου καταλοίπου, εμφανίζονται διαχωρισμένα σε σχέση με το ελεύθερο πεπτίδιο. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από απώλεια της ελευθερίας κίνησης των πρωτονίων αυτών, στη νέα διαμόρφωση που επιβάλλεται από τη δέσμευση του μετάλλου. Το α-πρωτόνιο της Ala₁₄, εμφανίζει επίσης σημαντική μετατόπιση της συχνότητας συντονισμού του. Η τιμή $\Delta\delta = -0,602$ (Πίνακας 12) είναι συγκρίσιμη με την μετατόπιση των α-πρωτονίων της Lys₂₇ ($\Delta\delta = -0,605$) και Ser₃₁ ($\Delta\delta = -0,699$), αλλά η μετακίνηση σε χαμηλότερο πεδίο (downfield) του σήματος του α-άνθρακα είναι η μεγαλύτερη παρατηρούμενη μεταξύ όλων των ατόμων C _{α} , υποδηλώνοντας ότι το χημικό και μαγνητικό περιβάλλον του καταλοίπου αυτού αλλάζει δραματικά.

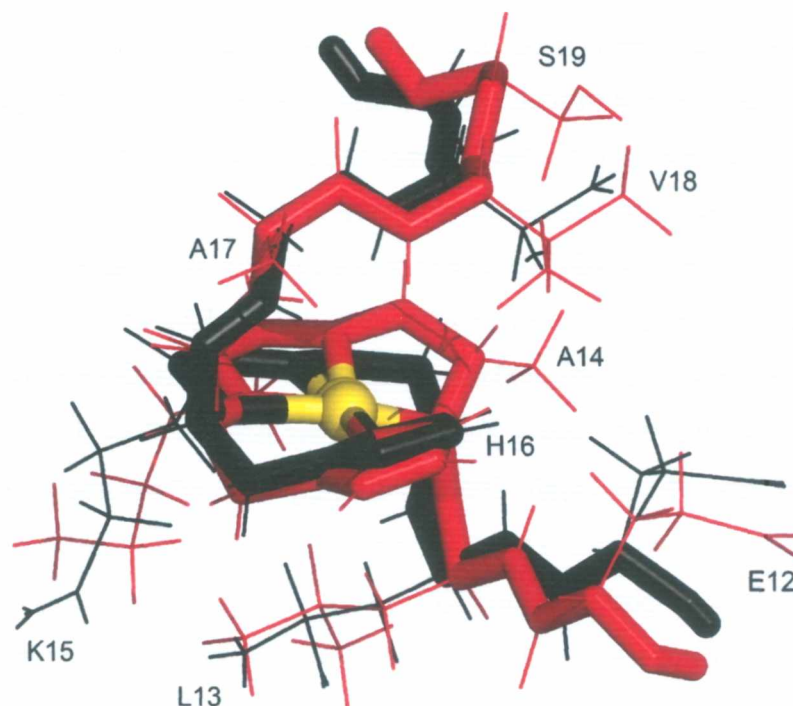
Οι παραπάνω διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις, εξηγούνται από την ένταξη του ιόντος Ni²⁺ με τα κατάλοιπα Ala₁₄, Lys₁₅ και His₁₆ και επαληθεύουν τα ποτενσιομετρικά και φασματοσκοπικά δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση των UV-Vis και CD-

φασμάτων. Οι ποτενσιομετρικές μετρήσεις και τα μοναδικά χαρακτηριστικά των UV-Vis και CD-φασμάτων υποδεικνύουν ένα σύνολο δοτών του τύπου $\{N_{Im}, 3N^-\}$. Η φασματοσκοπία NMR, υποδεικνύει ότι τα συμπλεγμένα αμιδικά άζωτα προέρχονται από τα κατάλοιπα His₁₆, Lys₁₅ και Ala₁₄.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απώλεια των σημάτων συντονισμού των αμιδικών πρωτονίων στα καταγεγραμμένα φάσματα κι ως εκ τούτου η απουσία σημαντικών NOE κορυφών, καθιστά τον υπολογισμό της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου Ni(II)-H₂B₉₄₋₁₂₅, αν όχι αδύνατο, τουλάχιστον πολύ δύσκολο. Παρόλα αυτά, στηριζόμενοι στις NOE συζεύξεις μεταξύ ατόμων των πλευρικών αλυσίδων, κατέστη δυνατό να προσδιορίσουμε μία καλά καθορισμένη δομή του συμπλόκου με το οκταπεπτιδικό τμήμα –Glu₁₂-Leu₁₃-Ala₁₄-Lys₁₅-His₁₆-Ala₁₇-Val₁₈-Ser₁₉-. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε υπό μορφή ανώτατων διατομικών αποστάσεων, 61 NOEs, τα οποία προέρχονται από 25 ένδο-αμινοξικές (intra-residue), 15 ακολουθιακές (sequential), 20 μέσης (medium) και 1 μακράς (long range) απόστασης συζεύξεις (Πίνακας 13), σε συνδυασμό με τους γεωμετρικούς περιορισμούς για το ιόν του νικελίου, οι οποίοι εξάχθηκαν από την κρυσταλλική δομή του αναλόγου συμπλόκου $[Ni^{II}(\text{Gly-Gly-}\alpha\text{-υδροξύλ-D,L-ισταμίνη})]\cdot 3H_2O$ (143, 268, 336). Για το ανωτέρω πεπτιδικό τμήμα (H₂B₁₀₅₋₁₁₂) επιτεύχθηκε ταυτοποίηση του 86,5% του συνόλου των ατόμων του. Η δυναμική ενέργεια του συστήματος και η συμφωνία μεταξύ των πειραματικών και λαμβανόμενων διατομικών αποστάσεων, αποδίδεται μέσω της τιμής του target function, ενώ η ακρίβεια των υπολογιζόμενων δομών χαρακτηρίζεται από τη μέση απόκλιση των συντεταγμένων κάθε μέλους της οικογένειας από τη μέση δομή και εκφράζεται από τις τιμές RMSD. Η οικογένεια των τελικών 20 δομών που υπολογίστηκε, χαρακτηρίζεται από μέση τιμή target function ίση με $0,19 \pm 0,0025 \text{ \AA}^2$, ενώ εμφανίζει $RMSD = 0,15 \pm 0,03 \text{ \AA}$ για τα άτομα του πεπτιδικού σκελετού και $RMSD = 0,31 \pm 0,07 \text{ \AA}$ για τα βαρέα άτομα. Στο Σχήμα 61, δίνονται οι 20 δομές της τελικής οικογένειας και στον Πίνακα 13 οι συζεύξεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή τους, υπό τη μορφή ανώτατων ορίων διατομικών αποστάσεων.



Σχήμα 61. Επικάλυψη των δομών των 20 χαμηλότερων ενεργειακά συμπλόκων του νικελίου με το πεπτίδιο H2B₁₀₅₋₁₁₂

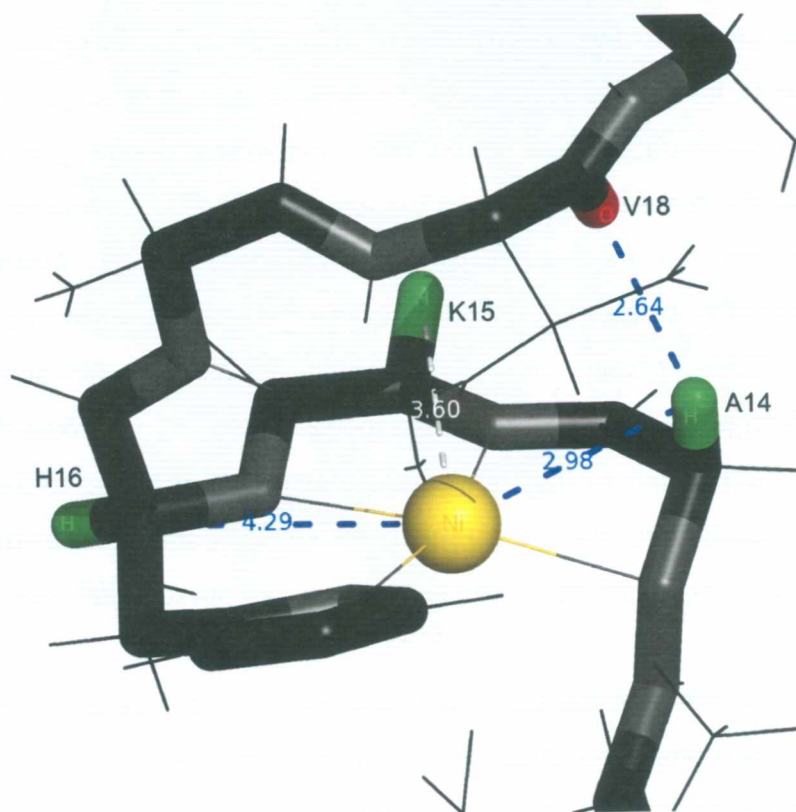


Σχήμα 62. Επικαλυπτόμενη μέση (μαύρη, $E = 9460,38 \text{ kcal/mol}$ / $\text{gradient} = 957,7 \text{ kcal/mol \AA}$) και γεωμετρικά βελτιστοποιημένη (κόκκινη, $E = 168,56 \text{ kcal/mol}$ / $\text{gradient} = 0,091 \text{ kcal/mol \AA}$) δομή.

Η εξέταση της δομής του συμπλόκου αποκαλύπτει ότι ο πεπτιδικός σκελετός των καταλοίπων Ala₁₇, Val₁₈ και Ser₁₉ είναι τοποθετημένος ακριβώς πάνω από το επίπεδο του συμπλόκου (Σχήμα 62). Αυτό το γεγονός εξηγεί την μετακίνηση σε υψηλότερο πεδίο, των χημικών μετατοπίσεων των α-πρωτονίων των ανωτέρω καταλοίπων, δεδομένου ότι προστατεύονται περισσότερο από το ηλεκτρονικό περιβάλλον του μετάλλου, σε σχέση με την random coil διαμόρφωση στο ελεύθερο πεπτίδιο. Μάλιστα, η τοποθέτηση των υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Ala₁₇ και Val₁₈ πάνω από το επίπεδο του συμπλόκου, προστατεύει το σύμπλοκο από την αξονική πυρηνόφιλη προσβολή μορίων ύδατος. Αντίστοιχα, το κάτω επίπεδο του συμπλόκου καλύπτεται από την ογκώδη πλευρική αλυσίδα της Leu₁₃, η οποία περιορίζει την αλληλεπίδραση των αμιδικών ατόμων αζώτου με μόρια νερού που προέρχονται από τη μάζα του διαλύματος. Επιπροσθέτως, το H_α πρωτόνιο του καταλοίπου αυτού βρίσκεται μακριά από το μέταλλο, ενώ προσανατολίζεται προς το διάλυμα. Έτσι, η πιθανότητα αλληλεπίδρασης του με το ηλεκτρονικά πλούσιο επίπεδο του συμπλόκου, καθίσταται μικρότερη κι εξηγεί την μικρή μετατόπιση του συντονισμού του σε χαμηλότερο πεδίο (downfield).

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 12, οι διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις (Δδ) των α-πρωτονίων των καταλοίπων που συμπλέκονται με το μέταλλο, σε σχέση με το ελεύθερο πεπτίδιο, ακολουθούν τη σειρά: H_α(Lys₁₅) > H_α(His₁₆) > H_α(Ala₁₄). Η εξέταση των 20 δομών, αποκαλύπτει ότι η απόσταση των πρωτονίων αυτών από το μεταλλικό ιόν είναι: H_α(Lys₁₅) – Ni²⁺ (3,61-3,62 Å), H_α(His₁₆) – Ni²⁺ (4,30-4,31 Å) και H_α(Ala₁₄) – Ni²⁺ (2,98-3,00 Å). Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να εξηγήσουμε την μεγάλη μετατόπιση του H_α πρωτονίου της Lys₁₅ σε σχέση με αυτή της His₁₆, δεδομένου ότι προστατεύεται περισσότερο από το ηλεκτρονικό περιβάλλον του μετάλλου. Το γεγονός ότι το H_α πρωτόνιο της Ala₁₄ παρουσιάζει μικρότερη μετατόπιση, ενώ βρίσκεται πολύ κοντά στο μέταλλο μπορεί να εξηγηθεί από ένα δομικό χαρακτηριστικό που θα επιφέρει κάποιου είδους αποπροστασία. Η προσεκτική ανάλυση της δομής υποδηλώνει μία πιθανή αλληλεπίδραση με το οξυγόνο της καρβονυλικής ομάδας της Val₁₈ (Σχήμα 63), το οποίο σε 12 από τις 20 δομές βρίσκεται σε απόσταση που δεν ξεπερνάει τα 2,35 Å. Επιπλέον, το οξυγόνο της Val₁₈ προσανατολίζεται ακριβώς προς το α-πρωτόνιο της Ala₁₄. Τα δύο αυτά άτομα δεν βρίσκονται αρκετά κοντά ώστε να σχηματίσουν έναν δεσμό υδρογόνου, όμως η αυξημένη συχνότητα επαφής τους, μπορεί να οδηγήσει σε μερική αποπροστασία του πρωτονίου, με αποτέλεσμα η συχνότητα συντονισμού του να μετατοπίζεται σε κάπως χαμηλότερο πεδίο απ' αυτό που αναμένεται. Αντίθετα, τα H_α

πρωτόνια της Lys₁₅ και His₁₆, δεν βρίσκονται σε τόσο κοντινή απόσταση με κανένα καρβονυλικό οξυγόνο, ενισχύοντας περαιτέρω αυτήν την άποψη.



Σχήμα 63. Μεγέθυνση της θέσης δέσμευσης του ιόντος νικελίου στη μέση δομή. Οι αποστάσεις που αναφέρονται δίνονται σε Angstroms. (κωδικός χρωμάτων, Ni²⁺ : κίτρινο, H_a His₁₆, Lys₁₅, Ala₁₄ : πράσινο, καρβονυλικό οξυγόνο Val₁₈ : κόκκινο)

Πίνακας 13. Συζεύξεις, υπό τη μορφή ανώτατων ορίων απόστασης, με τις οποίες επιτεύχθηκε ο υπολογισμός της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου $\text{Ni}^{2+}\text{-H2B}_{105-112}$

Κατάλοιπο 1	Πρωτόνιο 1	Κατάλοιπο 2	Πρωτόνιο 2	Ανώτατο όριο απόστασης (Å)
Glu ₁₂	Q _β	Glu ₁₂	H _{γ3}	2,52
Ala ₁₇	Q _β	Val ₁₈	Q _γ	3,87
Lys ₁₅	H _{δ2}	His ₁₆	H _{β2}	5,25
Leu ₁₃	Q _{δ1}	Lys ₁₅	Q _γ	4,54
Val ₁₈	H _α	Ser ₁₉	H _{β2}	4,81
Val ₁₈	H _β	Ser ₁₉	H _{β2}	4,22
Leu ₁₃	H _γ	His ₁₆	H _{ε1}	5,76
Glu ₁₂	H _{γ3}	Ala ₁₄	H _α	4,89
Glu ₁₂	Q _β	Ala ₁₄	H _α	4,84
Ala ₁₇	H _α	Val ₁₈	H _α	4,74
Ala ₁₇	H _α	Val ₁₈	Q _γ	4,43
Glu ₁₂	H _{γ2}	Leu ₁₃	H _α	4,65
Lys ₁₅	H _{β2}	Lys ₁₅	H _{δ2}	3,82
Leu ₁₃	H _{β3}	Leu ₁₃	H _γ	3,00
Leu ₁₃	H _γ	Lys ₁₅	Q _γ	4,62
Glu ₁₂	Q _β	Leu ₁₃	H _α	4,71
Ala ₁₄	H _α	Val ₁₈	H _β	3,99
Lys ₁₅	Q _γ	Lys ₁₅	H _{δ2}	2,78
Lys ₁₅	H _{δ2}	His ₁₆	H _{β3}	3,63
Leu ₁₃	H _{β3}	Leu ₁₃	Q _{δ1}	4,02
Leu ₁₃	H _α	Leu ₁₃	Q _{δ1}	3,05
Lys ₁₅	H _{δ3}	His ₁₆	H _α	4,26
His ₁₆	H _α	His ₁₆	H _{β2}	2,86
Leu ₁₃	Q _{δ1}	Lys ₁₅	H _{β2}	4,33
Lys ₁₅	H _{β2}	Lys ₁₅	H _{δ3}	3,41
Leu ₁₃	Q _{δ2}	Lys ₁₅	H _{δ2}	2,88
Leu ₁₃	H _{β3}	Leu ₁₃	Q _{δ2}	2,64
Leu ₁₃	H _{β2}	Leu ₁₃	Q _{δ1}	3,30
Leu ₁₃	H _{β2}	Leu ₁₃	Q _{δ2}	2,70
Leu ₁₃	H _{β2}	His ₁₆	H _{β3}	3,46
Glu ₁₂	H _{γ2}	Ala ₁₄	H _α	4,05
Glu ₁₂	H _{γ2}	Ala ₁₄	Q _β	4,35
Lys ₁₅	H _{δ3}	His ₁₆	H _{β3}	3,15
Leu ₁₃	H _α	Leu ₁₃	H _{β3}	2,77

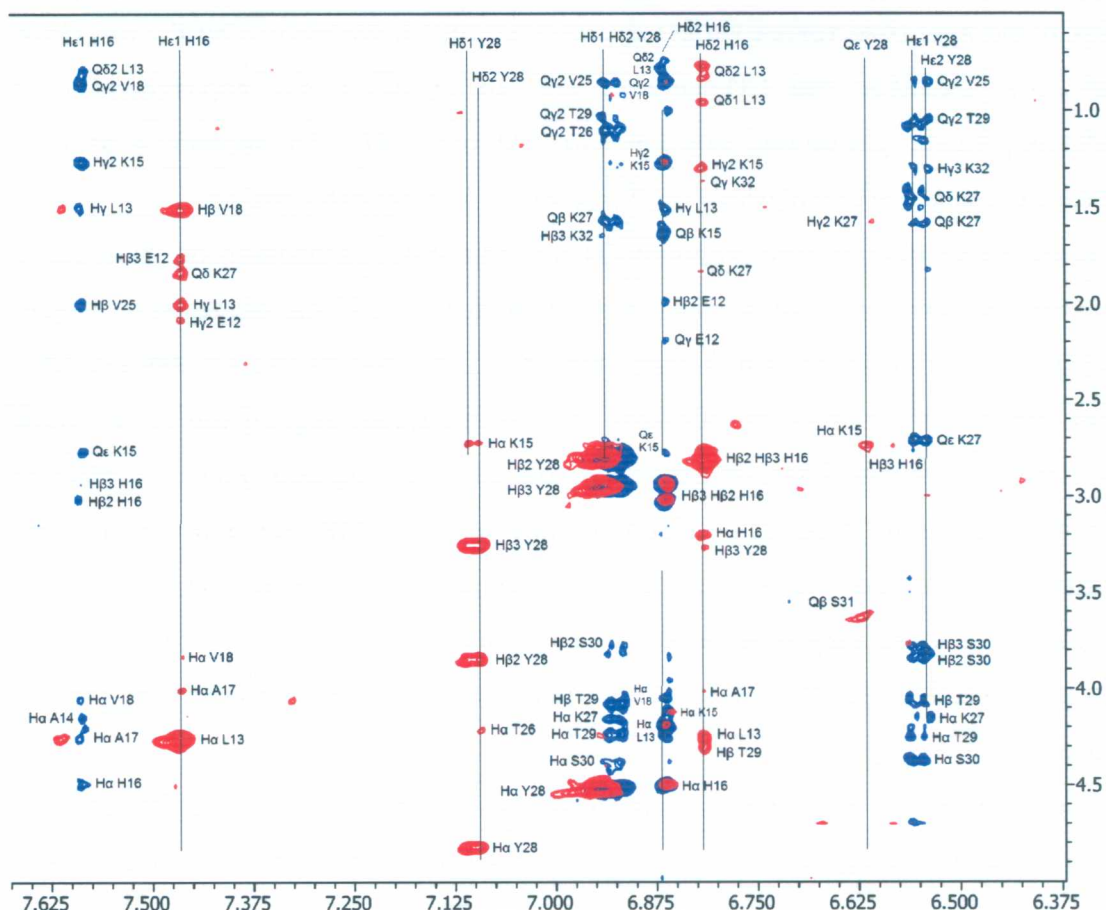
Val ₁₈	H _α	Val ₁₈	H _β	2,96
Val ₁₈	H _α	Val ₁₈	Q _γ	3,61
His ₁₆	H _{ε1}	Val ₁₈	H _α	4,98
His ₁₆	H _{β3}	His ₁₆	H _{δ2}	3,67
His ₁₆	H _{β2}	His ₁₆	H _{δ2}	3,13
Lys ₁₅	H _{δ2}	Lys ₁₅	Q _ε	3,00
Lys ₁₅	H _{β2}	Lys ₁₅	Q _ε	4,03
Lys ₁₅	Q _γ	Lys ₁₅	Q _ε	4,00
Glu ₁₂	Q _β	Val ₁₈	H _β	3,32
Leu ₁₃	H _α	Ala ₁₄	Q _β	3,95
Leu ₁₃	Q _{δ1}	Lys ₁₅	H _{δ3}	4,08
Leu ₁₃	Q _{δ2}	Lys ₁₅	H _{δ3}	2,90
Lys ₁₅	H _{β3}	Lys ₁₅	H _{δ3}	3,61
His ₁₆	H _{β2}	Ala ₁₇	Q _β	4,07
Leu ₁₃	H _α	Leu ₁₃	Q _{δ2}	3,79
Val ₁₈	Q _γ	Ser ₁₉	H _α	3,81
Leu ₁₃	Q _{δ2}	His ₁₆	H _{β2}	4,21
Lys ₁₅	H _α	Lys ₁₅	H _{δ2}	4,47
Leu ₁₃	H _α	Leu ₁₃	H _γ	3,78
Ser ₁₉	H _α	Ser ₁₉	H _{β3}	2,89
His ₁₆	H _{ε1}	Val ₁₈	H _β	3,62
Glu ₁₂	H _{γ2}	His ₁₆	H _{ε1}	4,33
Glu ₁₂	Q _β	His ₁₆	H _{ε1}	4,29
Glu ₁₂	H _{γ3}	His ₁₆	H _{ε1}	4,26
Glu ₁₂	H _{γ3}	Ala ₁₄	Q _β	4,13
Glu ₁₂	H _{γ3}	Leu ₁₃	H _α	3,30
Glu ₁₂	H _α	Glu ₁₂	H _{γ3}	3,62

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η C-τελική ουρά του πεπτιδίου και συγκεκριμένα τα κατάλοιπα Lys₂₇, Tyr₂₈, Thr₂₉, Ser₃₀, Ser₃₁ και Lys₃₂, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων υδρογόνου και άνθρακα, σε σχέση με τις συχνότητες συντονισμού που εμφανίζουν στο ελεύθερο πεπτίδιο. Τα ποτενσιομετρικά δεδομένα που αναφέρθηκαν πιο πριν είναι τυπικά για ένταξη του νικελίου με ένα σύνολο δοτών του τύπου {N_{lm}, 3N⁻_{amide}}. Επιπλέον στα CD-φάσματα που καταγράψαμε δεν παρατηρήσαμε τη χαρακτηριστική ταινία μεταφοράς φορτίου στα 420 nm (341). Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι το φαινολικό οξυγόνο της Tyr₂₈ δεν εντάσσεται στο μέταλλο.

Παρόλα αυτά, το κατάλοιπο αυτό, παρουσιάζει μια σημαντική μετατόπιση σε χαμηλότερο πεδίο των συχνοτήτων συντονισμού όλων των πρωτονίων του. Η πιο αξιοπρόσεκτη όμως αλλαγή έγκειται στην ιδιαίτερα υψηλή μετατόπιση των β-πρωτονίων ($\Delta\delta = 0,889$ και $\Delta\delta = 0,449$ ppm, αντίστοιχα), η οποία συνοδεύεται από μια σημαντική αύξηση του διαχωρισμού τους. Αυτό, υποδηλώνει μια ελάττωση στην ελευθερία κίνησης τους, που έχει ως αποτέλεσμα τον ευκρινή διαχωρισμό τους στην κλίμακα χρόνου των NMR πειραμάτων. Το ίδιο συμπέρασμα μπορεί να προκύψει και από τους συντονισμούς των γ-πρωτονίων της Lys₂₇, τα οποία κατόπιν σύμπλεξης, εμφανίζονται καλά διαχωρισμένα. Είναι επομένως εμφανές ότι η σύμπλεξη με το νικέλιο οδηγεί στην υιοθέτηση μιας πιο οργανωμένης δομής τόσο για την Lys₂₇ όσο και την Tyr₂₈.

Η πιθανότερη εξήγηση είναι ότι η σύμπλεξη με το νικέλιο, επιβάλλει μία νέα διαμόρφωση στο σύνολο του μορίου, οδηγώντας στην προσέγγιση καταλοίπων που απουσία του μετάλλου βρίσκονται μακριά στο χώρο. Το φαινολικό οξυγόνο της Tyr₂₈ διαθέτει ένα αρνητικό φορτίο το οποίο μπορεί να αλληλεπιδράσει με το θετικό τμήμα του ηλεκτροστατικού δυναμικού που παράγεται από το σύμπλοκο του νικελίου. Τέτοιου είδους αλληλεπίδραση, η οποία μπορεί να ερμηνευθεί σαν ένα είδος γέφυρας άλατος, έχει παρατηρηθεί σε μελέτες αλληλεπίδρασης μικρών πεπτιδίων με Cu(II) και Pd(II) (236, 342-346), όπως και κατά την αλληλεπίδραση του πεπτιδικού μοντέλου της ανθρώπινης προταμίνης με Ni²⁺, όπου η Tyr διαχωρίζεται από την His (μέσω της οποίας ξεκινάει η σύμπλεξη), από 5 παρεμβαλλόμενα κατάλοιπα (199). Στη δική μας περίπτωση μπορεί τα κατάλοιπα His και Tyr να βρίσκονται ακόμα πιο μακριά στην πρωτοταγή δομή (διαχωρίζονται από 11 αμινοξικά κατάλοιπα), η παρουσία όμως των συζεύξεων H_{ε1} His₁₆/Q_δ Lys₂₇, H_{δ1} Tyr₂₈/H_α Lys₁₅, H_{δ2} Tyr₂₈/H_α Lys₁₅, H_{δ2} His₁₆/Q_γ Lys₃₂, H_{δ2} His₁₆/H_{β3} Tyr₂₈, H_{δ2} His₁₆/H_β Thr₂₉, Q_ε Tyr₂₈/H_α Lys₁₅ (Σχήμα 64) στο ROESY φάσμα, όπως και των H_{β3} His₁₆/H_{β3} Tyr₂₈, H_{δ2} His₁₆/H_{β3} Tyr₂₈, Q_ε Lys₂₇/H_{γ3} Lys₁₅, H_α Ser₃₀/Q_γ Val₁₈, H_α His₁₆/Q_β Ser₃₀, H_α Lys₃₂/H_{γ3} Lys₁₅, Q_β Lys₃₂/H_{γ2} Glu₁₂, Q_β Lys₃₂/H_{γ2} Lys₁₅, Q_δ Lys₃₂/

H_α Ser₁₉ στα ROESY και NOESY φάσματα του συμπλεγμένου πεπτιδίου, αποτελούν πρόσθετη ένδειξη της αλληλεπίδρασης της C-τελικής ουράς του πεπτιδίου με το τμήμα σύνδεσης του μετάλλου.



Σχήμα 64. Επικαλυπτόμενη αρωματική περιοχή των ROESY φασμάτων του ελεύθερου πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ (μπλε) και συμπλεγμένου με νικέλιο (κόκκινο)

Για την Lys₂₇, εκτός του ότι το α-πρωτόνιο εμφανίζει μια σημαντική μετατόπιση σε υψηλότερο πεδίο, παρατηρείται μία downfield μετατόπιση όλων των αλειφατικών της πρωτονίων, με μία τιμή Δδ η οποία μειώνεται κατά την σειρά β > γ > δ > ε. Αυτό το γεγονός σε συνδιασμό με τις NOE συζεύξεις που αναφέρονται παραπάνω, μπορεί να σημαίνει ότι το κατάλοιπο αυτό, προσεγγίζει το τμήμα σύνδεσης του μετάλλου ενώ η πλευρική του αλυσίδα εκτείνεται κάτω από το επίπεδο του συμπλόκου. Τα κατάλοιπα Ser₃₀, Ser₃₁ και Lys₃₂, πρέπει να προσεγγίζουν το σύμπλοκο σε τέτοιο βαθμό ώστε να παρατηρείται μία σημαντική upfield μετατόπιση των α-πρωτονίων τους, το γεγονός όμως ότι οι συντονισμοί των β-πρωτονίων της Ser₃₀, όπως και των β και γ-πρωτονίων της Lys₃₂ εμφανίζονται εκφυλισμένοι κατόπιν

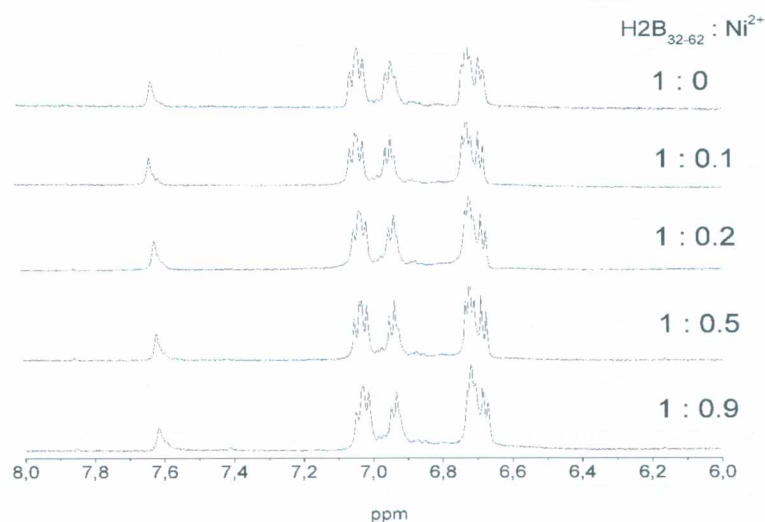
σύμπλεξης, σε αντίθεση με το ελεύθερο πεπτίδιο όπου είναι καλά διαχωρισμένοι, αντικατοπτρίζει μία αύξηση στην ελευθερία κίνησής τους, η οποία μπορεί να οφείλεται στον προσανατολισμό των πλευρικών τους αλυσίδων προς τη μάζα του διαλύματος.

Δυστυχώς, η απουσία σημαντικού αριθμού NOE συζεύξεων, δεν μας επιτρέπει να καθορίσουμε την ακριβή δομή της C-τελικής ουράς. Εντούτοις, τα στοιχεία που αναφέρθηκαν παραπάνω, υποδεικνύουν μια μετατόπιση του C-τελικού τμήματος, προς το τμήμα σύνδεσης του μετάλλου. Αν μία τέτοια δομική μεταβολή, υφίσταται υπό φυσιολογικές συνθήκες είναι πιθανό να εμπλακεί στην διαδικασία ουβικιτίνωσης που λαμβάνει χώρα στην λυσίνη K27. Η τροποποίηση αυτή είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί την μεταγραφή του DNA, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι αποτελεί ένα απαραίτητο πρώτο στάδιο για την μεθυλίωση που λαμβάνει χώρα στην Lys₄ της ιστόνης H3 (18, 59). Η τελευταία τροποποίηση είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής και απενεργοποίηση γονιδίων που βρίσκονται εντός της ετεροχρωματίνης. Συνεπώς, η μη φυσιολογική ουβικιτίνωση της Lys₂₇ του πεπτιδικού τμήματος H2B₉₄₋₁₂₅, μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση τελομερικών γονιδίων και καταστολή της διαδικασίας της μεταγραφής. Τα παραπάνω γεγονότα μπορεί να συνδέονται άμεσα με την καρκινογένεση που προκαλείται από το νικέλιο.

Παρόλο που η σύμπλεξη του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ με το νικέλιο, υπό τις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήσαμε, δεν είναι πολύ αποτελεσματική (ο σχηματισμός του επίπεδου τετραγωνικού συμπλόκου ξεκινάει σε pH περίπου ίσο με 8), είναι πιθανόν το περιβάλλον σε ολόκληρη την πρωτεΐνη να ενισχύσει την αποδοτικότητα της σύμπλεξης, είτε λόγω μιας υψηλότερης εκλεκτικότητας του νικελίου στην παραγωγή μιας συγκεκριμένης διαμόρφωσης του πεπτιδίου (243), είτε λόγω παρουσίας μιας πληθώρας μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων στο πρωτεϊνικό μόριο (269, 347, 348), είτε λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας που υφίσταται υπό φυσιολογικές συνθήκες.

10,3,4 Σύμπλοκα νικελίου-πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂

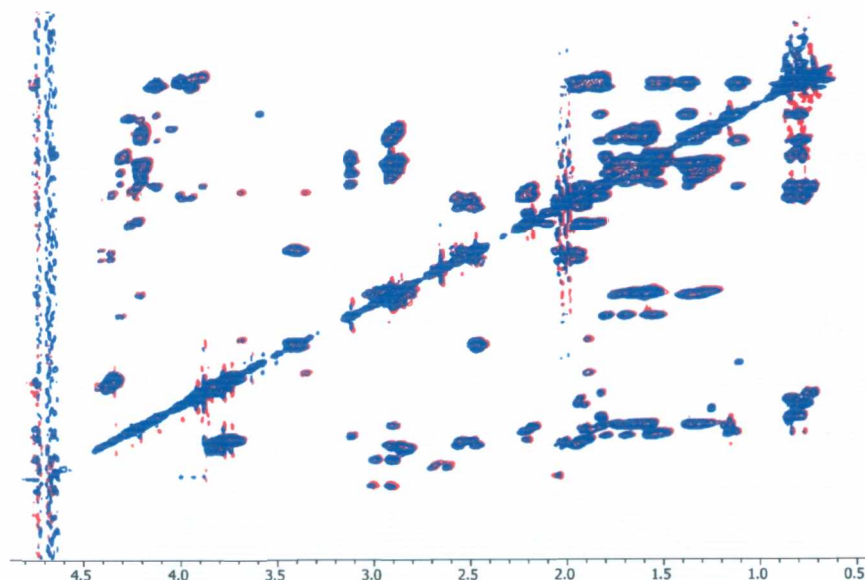
Όπως προαναφέρθηκε το ελεύθερο πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂ παρουσιάζει καταβύθιση σε pH > 7,8, η οποία απομακρύνεται κατά τη σύμπλεξη του με τα ιόντα Cu²⁺. Αντίθετα, η σύμπλεξη με τα ιόντα Ni²⁺ δεν είναι το ίδιο αποτελεσματική. Η καταβύθιση που παρατηρήθηκε στο ελεύθερο πεπτίδιο είναι εμφανής και στα διαλύματα που περιέχουν Ni²⁺. Το γεγονός αυτό δεν επέτρεψε την διεξαγωγή ποτενσιομετρικών τιτλοδοτήσεων, όπως και λήψη φασμάτων υπεριώδους-ορατού και κυκλικού διχρωισμού. Παρόλα αυτά, καταγράψαμε μια σειρά 2D-NMR φασμάτων σε pH 8,6, όπου η καταβύθιση ήταν λιγότερο εμφανής, απουσία και παρουσία ιόντων Ni²⁺. Πριν την καταγραφή κάθε φάσματος, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του ιζήματος. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να μην γνωρίζουμε με ακρίβεια την συγκέντρωση πεπτιδίου και μετάλλου στα υπό μελέτη δείγματα.



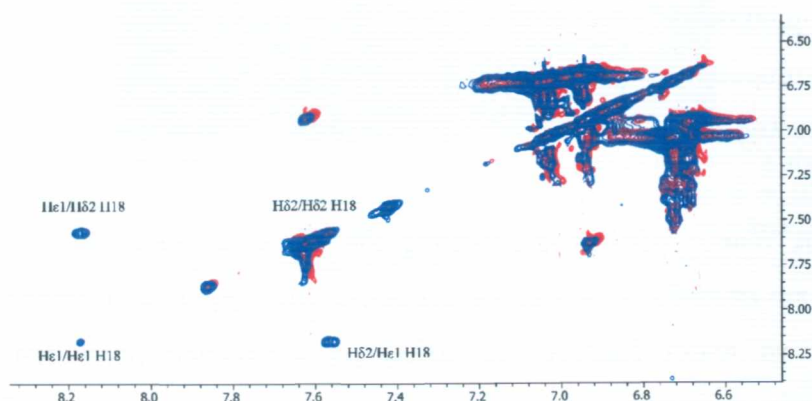
Σχήμα 65. Αρωματική περιοχή 1H NMR φάσματος, καταγεγραμμένου στα 600 MHz, 298 K και pH 8,6 του πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂, με αυξανόμενη συγκέντρωση ιόντων Ni²⁺

Η τιτλοδότηση του πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂, με ιόντα Ni²⁺ σε pH 8,6 (Σχήμα 65), αποκαλύπτει ότι το πεπτίδιο δεν συμπλέκεται με το νικέλιο. Το γεγονός ότι δεν παρατηρείται διεύρυνση των κορυφών σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις νικελίου, υποδεικνύει ότι η καταβύθιση προέρχεται τόσο από τον ελεύθερο υποκαταστάτη όσο και από το ελεύθερο παραμαγνητικό ιόν Ni²⁺. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα αρωματικά πρωτόνια της ιστιδίνης δεν μετατοπίζονται, είναι φανερό ότι δεν σχηματίζεται κανένα νέο διαμαγνητικό είδος. Η σύγκριση των δισδιάστατων πειραμάτων TOCSY και ¹³C-HSQC, απουσία και παρουσία νικελίου, υποστηρίζει περαιτέρω την παραπάνω άποψη, δεδομένου ότι δεν παρατηρήσαμε τον σχηματισμό κανενός καινούριου συστήματος spin (Σχήμα 66). Στην πραγματικότητα, η μοναδική διαφορά μεταξύ των

φασμάτων, έγκειται στην αρωματική περιοχή του TOCSY (Σχήμα 67), όπου 2 νέα αρωματικά πρωτόνια κάνουν την εμφάνισή τους. Αυτό, μπορεί να σημαίνει ότι κάποια μικρή ποσότητα του μετάλλου που παραμένει στο διάλυμα, συμπλέκεται με την His₁₈ μέσω του ιμιδαζολικού δακτυλίου, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός παραμορφωμένου οκταεδρικού συμπλόκου. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι η κορυφή που αντιστοιχεί στο ζεύγος Hβ-Cβ της His₁₈ δεν παρατηρείται στο ¹³C-HSQC φάσμα του συμπλεγμένου με νικέλιο πεπτιδίου.



Σχήμα 66. Επικαλυπτόμενη αλειφατική περιοχή των TOCSY φασμάτων ελεύθερου πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂ (κόκκινο) και συμπλεγμένου με νικέλιο (μπλε).



Σχήμα 67. Επικαλυπτόμενη αρωματική περιοχή των TOCSY φασμάτων ελεύθερου πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂ (κόκκινο) και συμπλεγμένου με νικέλιο (μπλε), όπου σημειώνονται τα νέα αρωματικά πρωτόνια.

10,4 Οξειδωτική διάσπαση της έλικας του DNA παρουσία συμπλόκων των πεπτιδίων

Η οξειδωτική καταστροφή του DNA, εμπλέκεται στη μεταλλαξιογένεση, καρκινογένεση και γήρανση. Είναι ευρέως γνωστό ότι οι οξυγονούχες ελεύθερες ρίζες, όπως η υδρόξυλο-ρίζα ($\cdot\text{OH}$), δημιουργούν μια πληθώρα τροποποιήσεων στο DNA, που περιλαμβάνουν τροποποιήσεις των βάσεων και των σακχάρων, διάσπαση της έλικας και σχηματισμό δεσμών διασταύρωσης μεταξύ DNA και πρωτεϊνών (349).

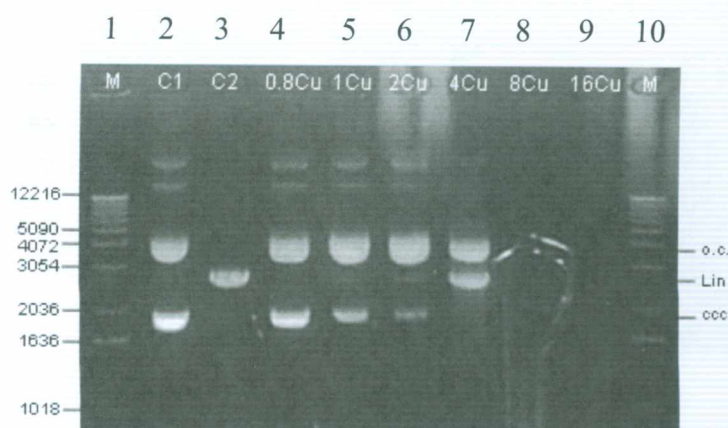
Δεδομένου ότι ο χρόνος ζωής των ελευθέρων ριζών είναι πολύ μικρός, απαραίτητη προϋπόθεση για την οξειδωτική καταστροφή του DNA, είναι η δημιουργία μιας υδρόξυλο-ρίζας πλησίον του μορίου. Γι' αυτό το λόγο, ο τρόπος αλληλεπίδρασης μετάλλου – DNA, είναι καθοριστικός όσον αφορά την οξειδωτική καταστροφή που παράγεται μέσω μιας αναγωγής τύπου Fenton. Διάφορες μελέτες *in vitro*, έχουν δείξει ότι μεταξύ των πιθανών οξειδωτικών παραγόντων, τα μεταλλικά ιόντα των στοιχείων μεταπτώσεως, όπως τα ιόντα Cu^{2+} , είναι υπεύθυνα για την μεγαλύτερη έκταση στην καταστροφή του πλασμιδιακού DNA, ενώ παράλληλα είναι και αυτά που παράγουν την υψηλότερη απόδοση σε 8-ύδροξυ-δέοξυγουανοσίνη (350, 351). Ο σχηματισμός αυτής της τροποποιημένης βάσης έχει άμεσα συσχετισθεί με την διάσπαση της διπλής έλικας του DNA (350). Οι Chevion και Lloyd et al, έχουν προτείνει ότι ορισμένοι τύποι οξειδωτικής καταστροφής του DNA, δημιουργούνται μέσω ενός τοποεκλεκτικού μηχανισμού, κατά τον οποίον η σύνδεση ενός μετάλλου με το μόριο του DNA, παράγει μέσω της αντίδρασης του με H_2O_2 , ενεργά είδη οξυγόνου, ακριβώς δίπλα στην διπλή έλικα του DNA. Έτσι, ενώ η διάσπαση του μονόκλωνου DNA, έχει προταθεί ότι δημιουργείται λόγω σχηματισμού δραστικών ειδών οξυγόνου στον όγκο του διαλύματος, η σταυροσύνδεση DNA-πρωτεΐνης, ο σχηματισμός 8-ύδροξυ-γουανοσίνης και η διάσπαση της διπλής έλικας του DNA, παράγονται μέσω του τοποεκλεκτικού μηχανισμού (352, 353).

Από όλους τους τύπους οξειδωτικής βλάβης του DNA, η διάσπαση της διπλής έλικας θεωρείται ως η πιο επικίνδυνη, δεδομένου ότι οδηγεί στο σχηματισμό ασύνδετων άκρων, τα οποία μπορούν να ανασυνδιαστούν με άλλα, μη κατάλληλα μέρη του γονιδιώματος. Επιπροσθέτως, νέα αυξανόμενα στοιχεία συγκλίνουν στο γεγονός ότι οι διασπάσεις της διπλής έλικας δεν επιδιορθώνονται πάντοτε με ακρίβεια και αποτελεσματικότητα, αποκτώντας τοιουτοτρόπως έναν ρόλο κλειδί στην διαδικασία της ογκογένεσης (354). Οι διασπάσεις της διπλής έλικας, κόβουν τα χρωμοσώματα και είναι θανατηφόρες εκτός και αν επισκευαστούν (355).

10,4,1 Επίδραση ιόντων Cu^{2+} στο πλασμιδιακό DNA

Προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση των συμπλόκων πεπτιδίου – Cu^{2+} στην διάσπαση της έλικας του DNA, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε την επίδραση του ιόντος στο πλασμίδιο, απουσία του πεπτιδίου, υπό τις ίδιες ακριβώς πειραματικές συνθήκες.

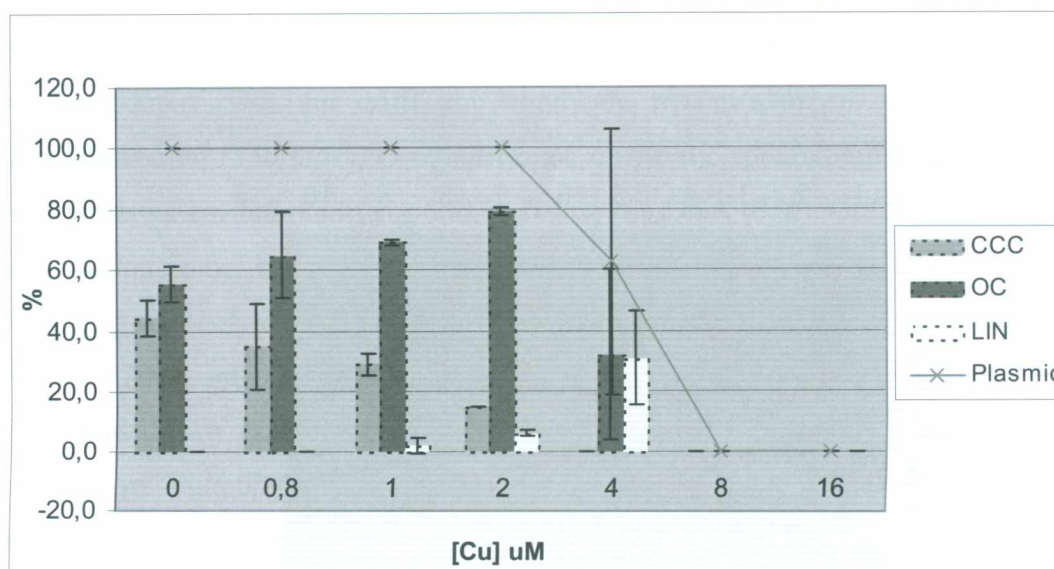
Στο Σχήμα 68, δίνεται μια ενδεικτική φωτογραφία ενός gel αγαρόζης, έπειτα από ηλεκτροφόρηση διάρκειας 1½ ώρας στα 100 Volts, διαλυμάτων που επώαστηκαν για 1 ώρα στους 37°C και περιείχαν, πλασμίδιο pUC19 (0,8 μg), H_2O_2 (1 mM) και ιόντα Cu^{2+} σε διάφορες συγκεντρώσεις (από 0,8 έως 16 μM). Στον Πίνακα 13, δίνονται τα ποσοστά κάθε μορφής έπειτα από ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού κάθε μπάντας με το ImageQuant λογισμικό. Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης δίνονται σχηματικά στο Σχήμα 69.



Σχήμα 68. Φωτογραφία πηκτής αγαρόζης, έπειτα από ηλεκτροφόρηση για 1½ ώρα, διαλυμάτων που περιείχαν πλασμίδιο pUC19, Cu^{2+} και H_2O_2 . Η συγκέντρωση του χαλκού σε μM, δίνεται στην κορυφή κάθε λωρίδας. M = molecular weight marker, C1 = control 1 (περιέχει μόνο πλασμίδιο) C2 = control 2 (περιέχει μόνο ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο που ελήφθηκε από επίδραση του περιοριστικού ενζύμου pstI)

Πίνακας 13. Ποσοστά supercoiled, open-circular και linear πλασμιδίου έπειτα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις χαλκού (μέσος όρος 2 πειραμάτων)

[Cu ²⁺] (μM)	Κυκλικό (supercoiled) (%)	Ανοιχτό κυκλικό (open circular) (%)	Γραμμικό (linear) (%)	Ολικό (%)
0	44.2	55.8	0	100
0.8	35,0	65,0	0	100
1	29.2	69.2	1.7	100
2	15,0	79.2	5.8	100
4	0	31.7	30.8	62.5
8	0	0	0	0
16	0	0	0	0

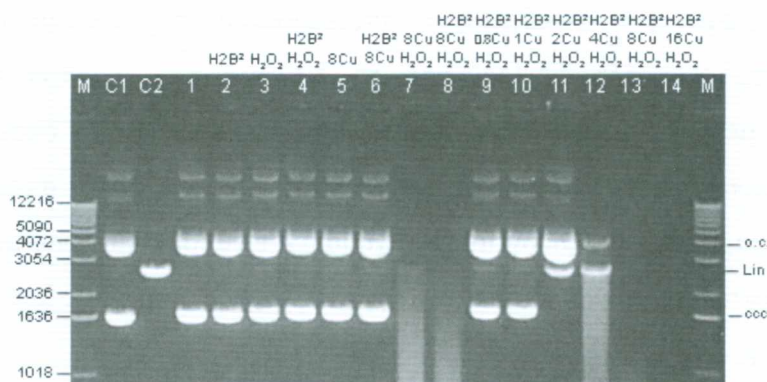
**Σχήμα 69.** Ποσοστά supercoiled, open-circular και linear πλασμιδίου έπειτα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις χαλκού (μέσος όρος 2 πειραμάτων)

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 68, το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε στα ανωτέρω πειράματα, περιέχει κυρίως την κυκλική (ccc, supercoiled) και ανοιχτή κυκλική (oc, open circular) μορφή (Λωρίδα 2). Η απουσία της γραμμικής μορφής του πλασμιδίου γίνεται εμφανής αν συγκρίνουμε την λωρίδα 2 με την 3 που περιέχει μόνο την γραμμική μορφή και η οποία ελήφθηκε έπειτα από επίδραση του περιοριστικού ενζύμου *pstI* στο κυκλικό μόριο. Η προσθήκη ιόντων Cu²⁺ στο μίγμα της αντίδρασης, έχει ως αποτέλεσμα την κατανάλωση της κυκλικής μορφής του pUC19 και την μετατροπή της σε open-circular και linear, τα ποσοστά

των οποίων αυξάνονται με την συγκέντρωση των ιόντων Cu^{2+} στο διάλυμα (Λωρίδες 4-7). Όταν η συγκέντρωση του ιόντος είναι ίση με 4 μM , όλη η κυκλική μορφή του πλασμιδίου έχει καταναλωθεί (Λωρίδα 7). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (8 και 16 μM), πραγματοποιείται ολική αποικοδόμηση του πλασμιδίου σε μικρότερα, υψηλής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας τμήματα, τα οποία διαφεύγουν από την πηκτική αгарόζης (Λωρίδες 8, 9). Στην πραγματικότητα, η αποικοδόμηση του πλασμιδιακού DNA σε μικρότερα τμήματα έχει ήδη αρχίσει από το διάλυμα που περιέχει ιόντα Cu^{2+} σε συγκέντρωση ίση με 4 μM . Αυτό είναι εμφανές από τον Πίνακα 13, όπου το 37,5% της ολικής αρχικής ποσότητας πλασμιδίου ανεξαρτήτου μορφής, έχει αποικοδομηθεί. Τα παραπάνω ευρήματα, όπως συνοψίζονται στο Σχήμα 69, είναι σε συμφωνία με το γεγονός ότι τα ιόντα Cu^{2+} προκαλούν κυρίως διάσπαση της μιας έλικας του DNA και σε χαμηλότερο βαθμό διάσπαση της διπλής έλικας (350, 353, 356).

10,4,1,1 Επίδραση Συμπλόκων Cu^{2+} - H2B_{32-62} στο πλασμιδιακό DNA

Στο Σχήμα 70, παρατίθεται μία ενδεικτική φωτογραφία ενός gel αгарόζης, που τραβήχτηκε έπειτα από την ηλεκτροφόρηση διαλυμάτων που περιείχαν πλασμίδιο pUC19 (0,8 μg), ιόντα Cu^{2+} σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-16 μM), πεπτίδιο H2B_{32-62} (8 μM) και H_2O_2 (1 mM).



Σχήμα 70. Φωτογραφία πηκτής αгарόζης, έπειτα από ηλεκτροφόρηση για 1½ ώρα, διαλυμάτων που περιείχαν πλασμίδιο pUC19, Cu^{2+} , H2B_{32-62} (8 μM) και H_2O_2 (1 mM). Η συγκέντρωση του χαλκού σε μM , δίνεται στην κορυφή κάθε λωρίδας. M = molecular weight marker, C1 = control 1 (περιέχει μόνο πλασμίδιο) C2 = control 2 (περιέχει μόνο ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο που ελήφθηκε από επίδραση του περιοριστικού ενζύμου pstI)

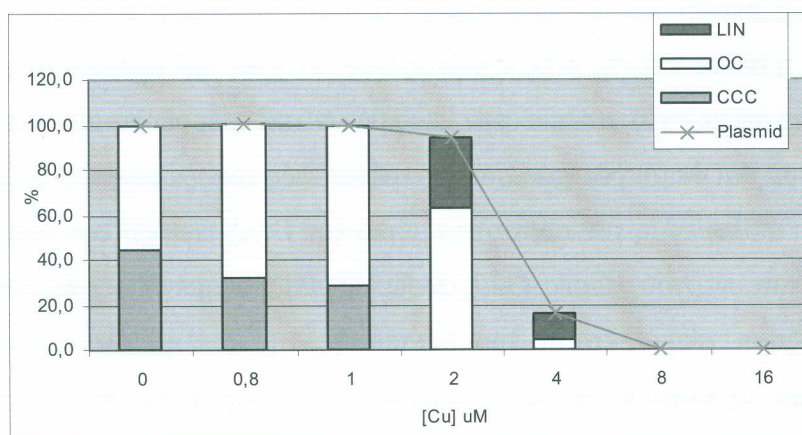
Το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε στο παραπάνω πείραμα αποτελείται από supercoiled και open-circular (Λωρίδα C1), τα σχετικά ποσοστά των οποίων δεν μεταβάλλονται από επώαση στους 37 °C (Σύγκρινε C1 και λωρίδα 1). Καμμία διαφορά δεν παρατηρείται επίσης κατά την επώαση του πλασμιδίου με ιόντα Cu^{2+} , ή H_2O_2 , ή πεπτίδιο H2B_{32-62} , όπως και με συνδιασμούς του πεπτιδίου με H_2O_2 ή ιόντα Cu^{2+} (Σύγκρινε λωρίδες 2, 3, 4, 5 και 6 με λωρίδα 1). Διαφορές στα ποσοστά των πλασμιδιακών μορφών και δημιουργία της γραμμικής μορφής, παρατηρούνται μόνο για τα διαλύματα που περιέχουν Cu^{2+} και H_2O_2 , υποδηλώνοντας ότι η αντίδραση Fenton είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση του μονόκλωνου και δίκλωνου DNA.

Στον Πίνακα 14, δίνονται τα σχετικά ποσοστά κάθε πλασμιδιακής μορφής, έπειτα από την επίδραση ιόντων Cu^{2+} σε διάφορες συγκεντρώσεις και H_2O_2 (1 mM), παρουσία πεπτιδίου H2B_{32-62} σε συγκέντρωση ίση με 8 μM . Τα αποτελέσματα αποδίδονται σχηματικά στο Σχήμα 71. Συγκρίνοντας τους Πίνακες 13 και 14, 2 σπουδαία συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν σε σχέση με την έκταση και το είδος της παρατηρούμενης οξειδωτικής καταστροφής: (i) Η παρουσία του πεπτιδίου, οδηγεί σε αυξημένη οξειδωτική καταστροφή, σε σχέση με αυτή που

παρατηρείται απουσία του. (ii) Όταν το πεπτιδίο ενυπάρχει στο μίγμα της αντίδρασης, παρατηρείται αυξημένη διάσπαση της διπλής έλικας του DNA.

Πίνακας 14. Ποσοστά supercoiled, open-circular και linear πλασμιδίου έπειτα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις χαλκού, H₂O₂ (1 mM) και H₂B₃₂₋₆₂ (8 μM) (μέσος όρος 2 πειραμάτων)

[Cu ²⁺] (μM)	Κυκλικό (supercoiled) (%)	Ανοιχτό κυκλικό (open circular) (%)	Γραμμικό (linear) (%)	Ολικό (%)
0	44.2	55.8	0	100
0.8	31.7	68.3	0	100
1	28.3	71.7	0	100
2	0	63.3	30.8	94.2
4	0	4.2	11.7	15.8
8	0	0	0	0
16	0	0	0	0



Σχήμα 71. Ποσοστά supercoiled, open-circular και linear πλασμιδίου έπειτα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις χαλκού, H₂O₂ (1 mM) και H₂B₃₂₋₆₂ (8 μM) (μέσος όρος 2 πειραμάτων)

Όπως γίνεται αντιληπτό, όταν η συγκέντρωση των ιόντων Cu²⁺ είναι ίση με 0,8 και 1 μM παρατηρείται μετατροπή της κυκλικής μορφής του πλασμιδίου σε open-circular, με ελαφρά μεγαλύτερη απόδοση, σε σχέση με αυτήν που παρατηρείται απουσία του πεπτιδίου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε συγκέντρωση ιόντων Cu²⁺ ίση με 1 μM παρουσία του

πεπτιδίου, δεν παρατηρείται διάσπαση της διπλής έλικας του DNA, σε αντίθεση με τα πειράματα απουσία του, όπου η παρουσία της γραμμικής μορφής είναι εμφανής σε μικρό ποσοστό (1,7 %) (Πίνακας 13). Παρόλα αυτά, αποικοδόμηση του πλασμιδιακού DNA σε μικρά, υψηλής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας τμήματα, παρουσία του πεπτιδίου, παρατηρείται ήδη από τα διαλύματα που περιέχουν Cu^{2+} σε συγκέντρωση ίση με 2 μM , όπως φαίνεται από τον Πίνακα 14, 5,8 % της ολικής αρχικής ποσότητας DNA έχει αποικοδομηθεί. Στα αντίστοιχα πειράματα απουσία του πεπτιδίου, αποικοδόμηση του πλασμιδιακού DNA παρατηρείται σε διαλύματα συγκεντρώσεως ιόντων $\text{Cu}^{2+} \geq 4 \mu\text{M}$ (Πίνακας 13). Τα παραπάνω ευρήματα, υποδεικνύουν ότι παρουσία του πεπτιδίου, η έκταση της οξειδωτικής καταστροφής είναι μεγαλύτερη.

Το πιο σημαντικό όμως εύρημα, ανάγεται στο παρατηρούμενο είδος οξειδωτικής καταστροφής. Εάν συγκρίνουμε τα ποσοστά κάθε πλασμιδιακής μορφής, απουσία και παρουσία του πεπτιδίου όταν η συγκέντρωση των ιόντων Cu^{2+} είναι ίση με 2 μM , παρατηρείται μια σημαντική αύξηση στο ποσοστό της γραμμικής μορφής (30,8 % παρουσία πεπτιδίου έναντι 5,8 % απουσία πεπτιδίου), υποδεικνύοντας ότι παρουσία του πεπτιδίου H2B_{32-62} , αυξάνεται το ποσοστό της διάσπασης της διπλής έλικας του DNA.

Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την ικανότητα των ιόντων Cu^{2+} να προκαλούν διάσπαση του μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA, έχουν διεξαχθεί από τον Lloyd, ο οποίος έχει προτείνει ότι η διάσπαση της μιας έλικας, προέρχεται από την παραγωγή υδρόξυλο-ριζών στη μάζα του διαλύματος, ενώ η διάσπαση της διπλής έλικας οφείλεται ως επί το πλείστον, σε διασπάσεις της μονής έλικας σε κοντινά σημεία των 2 κλώνων από υδρόξυλο-ρίζες που παράγονται τυχαία στο διάλυμα και σε μικρότερο ποσοστό, μέσω ενός τοποεκλεκτικού μηχανισμού, στον οποίον απαιτείται η δέσμευση του ιόντος στο μόριο του DNA, προτού αντιδράσει με το H_2O_2 προς παραγωγή του ενεργού είδους (350, 353, 356). Η αυξημένη οξειδωτική καταστροφή όπως και η αύξηση στην έκταση της διάσπασης της διπλής έλικας του DNA, που παρατηρείται όταν το πεπτίδιο H2B_{32-62} , προστεθεί στο μίγμα της αντίδρασης, μπορεί να εξηγηθεί μέσω ενός ανάλογου τοποεκλεκτικού μηχανισμού, εάν λάβουμε υπόψη την σύμπλεξη του πεπτιδίου με τα ιόντα Cu^{2+} , όπως και την αλληλεπίδραση του με το μόριο του DNA.

Η μελέτη της σύμπλεξης του εν λόγω πεπτιδίου με τα ιόντα Cu^{2+} που παρουσιάστηκε προηγουμένως, δείχνει ότι σε φυσιολογικές τιμές pH, σχεδόν όλη η ποσότητα των ιόντων Cu^{2+} είναι συμπλοκοποιημένη (Σχήμα 45), ενώ το κύρια σχηματιζόμενο είδος είναι ένα $3\text{N} \{ \text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^- \}$ σύμπλοκο (Σχήμα 49(β)). Επιπλέον τα ιόντα Cu^{2+} μπορούν να αλληλεπιδράσουν

με τις βάσεις του μορίου του DNA και να προκαλέσουν «ξετύλιγμα» της διπλής έλικας (357). Επομένως, όταν στο μίγμα της αντίδρασης συνυπάρχουν ιόντα Cu^{2+} , πεπτίδιο και DNA, τα 2 τελευταία ανταγωνίζονται ως προς την υποκατάσταση των μεταλλικών ιόντων.

Επιπροσθέτως, το ίδιο το πεπτίδιο δεδομένου ότι είναι μοντέλο της ιστονικής πτύχωσης της ιστόνης H2B αναμένεται να αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA. Η παρουσία 4 καταλοίπων Lys κι ενός καταλοίπου Arg στην πρωτοταγή δομή του, εξασφαλίζει τον σχηματισμό ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των ανωτέρω καταλοίπων και των αρνητικά φορτισμένων οξυγόνων των φωσφορικών ομάδων του φωσφοδιεστερικού σκελετού του DNA (358). Επιπλέον, τα κατάλοιπα Thr, Val, Pro και Ile που συνιστούν το 26 % του συνόλου της πρωτοταγής δομής του πεπτιδίου, είναι πιθανό να εμπλέκονται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα σάκχαρα δέοξυ-ριβόζης του μορίου του DNA (9).

Με βάση τα παραπάνω, είναι πιθανόν οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις να οδηγούν στην τοποθέτηση του συμπλόκου ακριβώς δίπλα στο μόριο του DNA. Πρόσθετη σταθεροποίηση του συμπλόκου Cu^{2+} - πεπτίδιο – DNA, θα μπορούσε να προκύψει και από την πλήρωση της 4^{ης} θέσης ένταξης του μετάλλου στο ισημερινό επίπεδο, από το άζωτο κάποιων εκ των κοντινών βάσεων. Με όποιον τρόπο κι αν επέρχεται η γειτνίαση του ιόντος στο μόριο του DNA, η παγίδευση του σε αυτήν την θέση, θα επέτρεπε στα ιόντα Cu^{2+} να αντιδράσουν με το H_2O_2 και να σχηματίσουν υδρόξυλο-ρίζες, ακριβώς δίπλα στο πλασμίδιο, προκαλώντας τοιουτοτρόπως, αυξημένη διάσπαση της διπλής έλικας. Τα παραπάνω είναι σε συμφωνία με την άποψη ότι η διάσπαση της διπλής έλικας, παρουσία μεταλλικών ιόντων και H_2O_2 , πραγματοποιείται μέσω ενός τοποεκλεκτικού μηχανισμού, όπου ο σχηματισμός ενός ενδιάμεσου είδους που σχηματίζεται λόγω της σύνδεσης του μετάλλου στο μόριο του DNA είναι απαραίτητος, πριν την επακόλουθη αντίδραση με το H_2O_2 .

10,4,1,2 Επίδραση Συμπλόκων Cu^{2+} - H2B_{94-125} στο πλασμιδιακό DNA

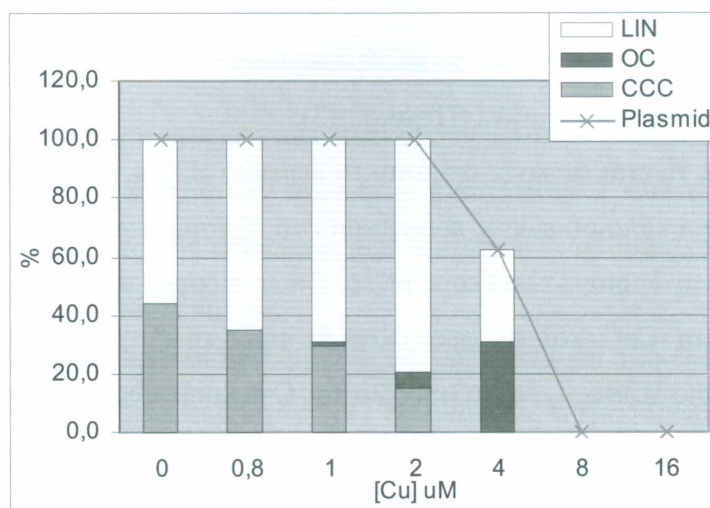
Στο Σχήμα 72, δίνεται μία ενδεικτική φωτογραφία ενός gel αгарόζης, που ελήφθηκε έπειτα από επώαση στους 37°C για 1 ώρα, διαλυμάτων που περιείχαν πλασμίδιο pUC19, ιόντα Cu^{2+} σε διάφορες συγκεντρώσεις, πεπτίδιο H2B_{94-125} (8 μM) και H_2O_2 (1 mM).



Σχήμα 72. Φωτογραφία πηκτής αгарόζης, έπειτα από ηλεκτροφόρηση για $1\frac{1}{2}$ ώρα, διαλυμάτων που περιείχαν πλασμίδιο pUC19, Cu^{2+} , H2B_{94-125} (8 μM) και H_2O_2 (1 mM). Η συγκέντρωση του χαλκού σε μM , δίνεται στην κορυφή κάθε λωρίδας. M = molecular weight marker, C1 = control 1 (περιέχει μόνο πλασμίδιο) C2 = control 2 (περιέχει μόνο ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο που ελήφθηκε από επίδραση του περιοριστικού ενζύμου pstI)

Πίνακας 15. Ποσοστά supercoiled, open-circular και linear πλασμιδίου έπειτα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις χαλκού, H_2O_2 (1 mM) και H2B_{94-125} (8 μM) (μέσος όρος 2 πειραμάτων)

$[\text{Cu}^{2+}]$ (μM)	Κυκλικό (supercoiled)	Ανοιχτό κυκλικό (open circular)	Γραμμικό (linear)	Ολικό (%)
0	43.3	56.7	0	100
0.8	33.3	66.7	0	100
1	23.3	71.7	5,0	100
2	20,0	70,0	10,0	100
4	0	50,0	46.7	96.7
8	0	1.7	5,0	6.7
16	0	1.7	1.7	3.4



Σχήμα 73. Ποσοστά supercoiled, open-circular και linear πλασμιδίου έπειτα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις χαλκού, H_2O_2 (1 mM) και $\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ (8 μM) (μέσος όρος 2 πειραμάτων)

Από τον Πίνακα 15, προκύπτει ότι η επώαση του πλασμιδίου με το πεπτιδίο $\text{H}_2\text{B}_{94-125}$, H_2O_2 και ιόντα Cu^{2+} σε διάφορες συγκεντρώσεις, έχει ως αποτέλεσμα την κατανάλωση του κυκλικού μορίου, με ταυτόχρονη αύξηση των ποσοστών των open-circular και linear μορφών, υποδηλώνοντας την δημιουργία διασπάσεων τόσο στη μονή όσο και στην διπλή έλικα του DNA. Η σύγκριση των διαλυμάτων που περιέχουν Cu^{2+} και πεπτιδίο $\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ με αυτά που περιέχουν μόνο Cu^{2+} , σε συγκέντρωση 0,8, 1 και 2 μM (στα οποία δεν παρατηρείται αποικοδόμηση του DNA σε μικρά, υψηλής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας τμήματα παρά μόνο αλληλομετατροπή των 3 μορφών), δείχνει ότι η έκταση της οξειδωτικής καταστροφής είναι συγκρίσιμη, με μια μικρή μόνο αύξηση στα ποσοστά της γραμμικής μορφής έναντι της open-circular.

Παρόλα αυτά, το πιο σημαντικό συμπέρασμα έγκειται στην παρατήρηση ότι παρουσία του πεπτιδίου $\text{H}_2\text{B}_{94-125}$, μειώνεται η έκταση της κατακερμάτισης του πλασμιδιακού DNA σε μικρά τμήματα. Έτσι, όταν η συγκέντρωση των ιόντων Cu^{2+} είναι ίση με 4 μM , το 96,7 % της ολικής αρχικής ποσότητας πλασμιδιακού DNA ανιχνεύεται, το οποίο κατανέμεται σχεδόν ισόποσα μεταξύ της open-circular και linear μορφής, με το υπόλοιπο 3,3 % να αντιστοιχεί στο DNA, που έχει υποστεί αποικοδόμηση σε μικρά τμήματα που διατρέχουν το gel με υψηλή ταχύτητα και δεν μπορούν να ανιχνευτούν (Πίνακας 15). Όταν το πεπτιδίο δεν είναι παρών στο μίγμα της αντίδρασης, το ανιχνεύσιμο ποσοστό ολικής αρχικής ποσότητας DNA, είναι μόλις 62,5 %. Μάλιστα, σε συγκεντρώσεις ιόντων Cu^{2+} ίσες με 8 και 16 μM , παρουσία του πεπτιδίου, ανιχνεύεται κάποια μικρή ποσότητα DNA σε ποσοστά 6,7 και 3,4 %

αντίστοιχα. Απουσία του πεπτιδίου, σε παρόμοιες συγκεντρώσεις ιόντων Cu^{2+} , όλη η αρχική ποσότητα DNA, έχει αποικοδομηθεί (Πίνακας 13).

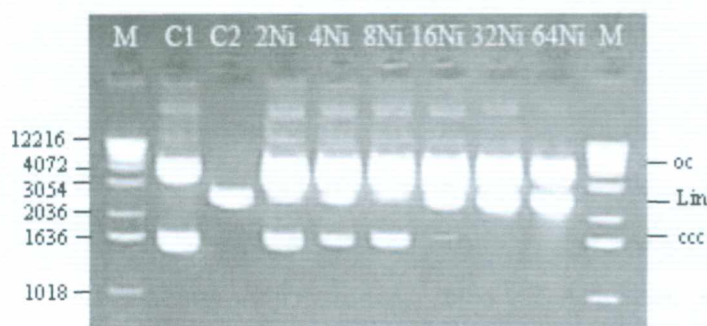
Από τα παραπάνω, γίνεται εμφανές ότι όταν το πεπτίδιο H2B_{94-125} , προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης, παρέχει κάποιου είδους προστασία στο πλασμιδιακό DNA, από τις παραγόμενες κατά την αντίδραση Fenton, ελεύθερες ρίζες. Όπως είδαμε, το πεπτίδιο αυτό συμπλέκεται ισχυρά με τα ιόντα Cu^{2+} και σε φυσιολογικές τιμές pH, σχηματίζει ένα 3N σύμπλοκο. Επιπλέον το πεπτίδιο H2B_{94-125} , είναι μοντέλο της C-τελικής ουράς της ιστόνης H2B και στην χρωματίνη δεν αναμένεται να αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA. Η εξέταση της πρωτοταγής δομής του πεπτιδίου, υποδεικνύει ότι τα κατάλοιπα που μπορούν να αλληλεπιδράσουν ισχυρά με το DNA (θετικά φορτισμένα κατάλοιπα Arg και Lys που μπορούν να εμπλακούν σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τον φωσφοδιεστερικό σκελετό του DNA, όπως και κατάλοιπα Ile, Thr, Val και Pro που μπορούν να σχηματίσουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα σάκχαρα του DNA), κατανέμονται σε όλο το μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Επιπλέον, η παρουσία των αρνητικά φορτισμένων καρβοξυλικών ομάδων των καταλοίπων Glu₁₂ και Glu₂₀, ακριβώς στη μέση μιας random-coil διαμόρφωσης, ενισχύουν την άποψη ότι το πεπτίδιο αυτό δεν πρέπει να αλληλεπιδρά ισχυρά με το πλασμιδιακό DNA.

Με βάση τα παραπάνω είναι πιθανόν, η σύμπλεξη των ιόντων Cu^{2+} με το πεπτίδιο H2B_{94-125} , να απομακρύνει τα μεταλλικά ιόντα από μία κοντινή θέση ως προς το μόριο του DNA, κατανέμοντας τα κατ' αυτόν τον τρόπο, στη μάζα του διαλύματος. Δεν είναι ξεκάθαρο εάν το σύμπλοκο αυτό διατηρεί κάποια οξειδοαναγωγική ικανότητα ή εάν η παρατηρούμενη οξειδωτική καταστροφή οφείλεται σε κάποια ποσότητα ιόντων Cu^{2+} που συνδέονται απευθείας με τις βάσεις του μορίου του DNA. Πάντως, εάν το σύμπλοκο είναι οξειδοαναγωγικά ενεργό, η παρατηρούμενη ελάττωση στην έκταση της οξειδοαναγωγικής καταστροφής, συνιστά την ύπαρξη μιας μηχανιστικής οδού, όπου οι ελεύθερες ρίζες θα έπληταν πρώτα το πεπτίδιο κι ακολούθως το πλασμιδιακό DNA. Παρόμοια προστατευτική δράση έναντι των ελευθέρων ριζών που παράγονται από την αντίδραση Fenton, μεταξύ Cu^{2+} και H_2O_2 , έχει παρατηρηθεί και για το δεκαπενταπεπτιδικό μοντέλο της ανθρώπινης προταμίνης (217).

10,4,2 Επίδραση ιόντων Ni^{2+} στο πλασμιδιακό DNA

Η μελέτη της επίδρασης των συμπλόκων των πεπτιδικών μοντέλων $H2B_{32-62}$ και $H2B_{94-125}$ με τα ιόντα Ni^{2+} στην δημιουργία σχάσεων στον έναν ή και στους 2 κλώνους του μορίου του DNA, προϋποθέτει την μελέτη της επίδρασης του ιόντος Ni^{2+} , απουσία των πεπτιδίων, υπό τις ίδιες ακριβώς πειραματικές συνθήκες.

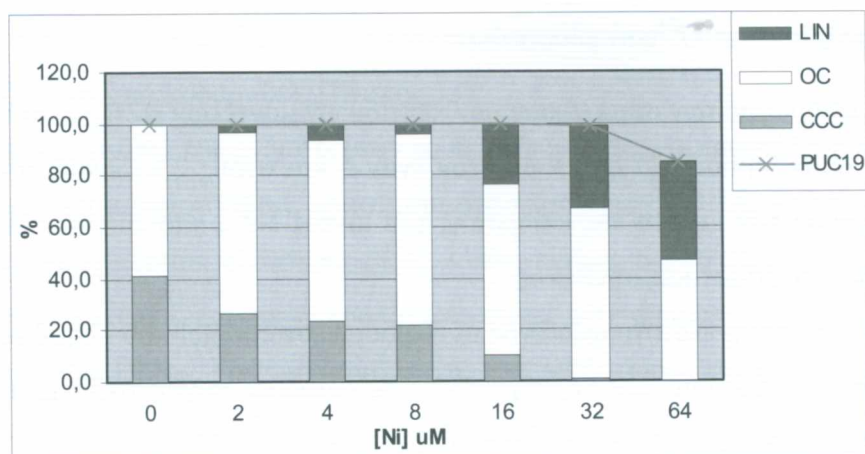
Στο Σχήμα 74, δίνεται η φωτογραφία ενός αντιπροσωπευτικού gel που ελήφθηκε έπειτα από ηλεκτροφόρηση διαλυμάτων που περιείχαν Ni^{2+} σε διάφορες συγκεντρώσεις, H_2O_2 (1 mM) και πλασμίδιο pUC19 (0,6 μ g) και επώστηκαν στους 37°C για 16 ώρες.



Σχήμα 74. Φωτογραφία πηκτής αгарόζης, έπειτα από ηλεκτροφόρηση για 1½ ώρα, διαλυμάτων που περιείχαν πλασμίδιο pUC19, Ni^{2+} και H_2O_2 . Η συγκέντρωση του νικελίου σε μ M, δίνεται στην κορυφή κάθε λωρίδας. M = molecular weight marker, C1 = control 1 (περιέχει μόνο πλασμίδιο) C2 = control 2 (περιέχει μόνο ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο που ελήφθηκε από επίδραση του περιοριστικού ενζύμου pstI)

Πίνακας 16. Ποσοστά supercoiled, open-circular και linear πλασμιδίου έπειτα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις νικελίου και H_2O_2 (1 mM) (μέσος όρος 2 πειραμάτων)

$[Ni^{2+}]$ (μ M)	Κυκλικό (supercoiled)	Ανοιχτό κυκλικό (open circular)	Γραμμικό (linear)	Ολικό (%)
0	41.7	58.3	0	100
2	26.7	70,0	3.3	100
4	23.3	70,0	6.7	100
8	21.7	74.2	4.2	100
16	10,0	66.7	23.3	100
32	0.8	65.8	32.5	99.2
64	0	46.7	38.3	85,0



Σχήμα 75. Ποσοστά supercoiled, open-circular και linear πλασμιδίου έπειτα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις νικελίου και H_2O_2 (1 mM) (μέσος όρος 2 πειραμάτων)

Τα ιόντα Ni^{2+} είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν διάσπαση της διπλής έλικας, παρά μόνο διάσπαση του ενός κλώνου. Επιπλέον τα στοιχεία που υπάρχουν συνηγορούν στο ότι η σύμπλεξη του ιόντος στο DNA δεν είναι απαραίτητη για την εμφάνιση σχάσεων της έλικας, υποδηλώνοντας ότι αυτή πραγματοποιείται μέσω ελευθέρων ριζών που παράγονται στη μάζα του διαλύματος (350, 353). Συνεπώς, η γραμμική μορφή που ανιχνεύεται στα ανωτέρω πειράματα, οφείλεται σε μονές διασπάσεις της open-circular μορφής του πλασμιδίου και τα ποσοστά που εμφανίζονται στον Πίνακα 16, εξηγούνται λόγω σχάσεων της μιας έλικας που οδηγεί σε μεταπτώσεις του τύπου: supercoiled $\rightarrow$ open-circular και open-circular $\rightarrow$ linear.

Το πείραμα που εικονίζεται στο Σχήμα 76, περιέχει πλασμίδιο τόσο στην κυκλική όσο και στην open-circular μορφή. Η επώαση του πλασμιδίου για 16 ώρες στους 37 °C (Λωρίδα 1) δεν προκαλεί καμμία μεταβολή μεταξύ των ποσοστών των 2 μορφών (Σύγκρινε Λωρίδες C2 και 1). Καμμία μεταβολή δεν παρατηρείται επίσης, όταν το πλασμίδιο επωάζεται με πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂ ή H₂O₂ ή ιόντα Ni²⁺, όπως επίσης και όταν στο μίγμα της αντίδρασης συνυπάρχουν πεπτίδιο και H₂O₂ ή πεπτίδιο και Ni²⁺ (Λωρίδες 2-6). Μεταβολή των ποσοστών των πλασμιδιακών μορφών, όπως επίσης και σχηματισμός της γραμμικής μορφής, παρατηρείται μόνο στα διαλύματα που περιέχουν Ni²⁺ και H₂O₂, υποδηλώνοντας ότι η μεταξύ τους αντίδραση Fenton ευθύνεται για την δημιουργία σχάσεων στη μονή και/ή διπλή έλικα του DNA.

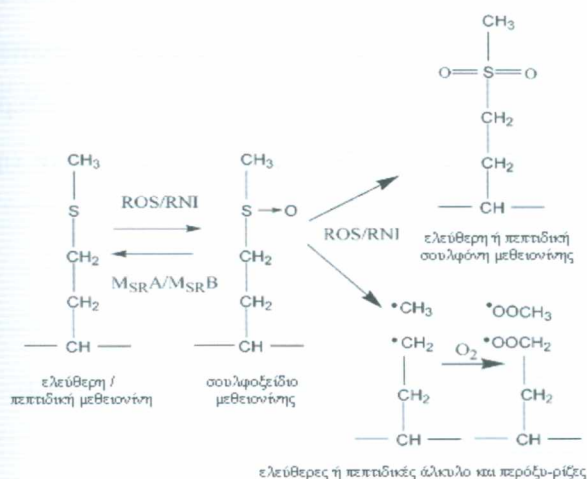
Όταν το πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂, προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης, η αποικοδόμηση του DNA σε μικρά, υψηλής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας τμήματα, (η οποία ανιχνεύεται έμμεσα από την μικρότερη τιμή από 100 % της ολικής ποσότητας DNA), επιβραδύνεται. Αυτό γίνεται εμφανές από την σύγκριση των Πινάκων 16 και 17. Απουσία πεπτιδίου, η αποικοδόμηση ξεκινάει από τα δείγματα όπου η συγκέντρωση του νικελίου είναι ίση με 32 μM, ενώ όταν η συγκέντρωση του ιόντος αυξάνει σε 64 μM το 15 % του πλασμιδιακού DNA έχει αποικοδομηθεί (Πίνακας 16). Αντίθετα, παρουσία του πεπτιδίου σχεδόν όλη η αρχική ποσότητα DNA, ανιχνεύεται ακόμα και σε συγκέντρωση ιόντων Ni²⁺ ίση με 64 μM.

Οι μελέτες αλληλεπίδρασης του ιόντος Ni²⁺ με το πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂, που παρουσιάστηκαν προηγουμένως, υποδεικνύουν ότι είτε το πεπτίδιο δεν συμπλέκεται με το νικέλιο, είτε ότι σχηματίζεται με μια πολύ αργή κινητική, ένα μόνο σύμπλοκο με παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία, μέσω μιας μονοδοντικής σύμπλεξης με το ιμιδαζολικό άζωτο της His₁₈. Η ελάττωση στην οξειδωτική καταστροφή του DNA, που παρατηρείται παρουσία του πεπτιδίου, μπορεί να εξηγηθεί με δύο τρόπους.

Είναι γνωστό ότι τα ιόντα Ni²⁺ προτιμούν να συνδέονται με το DNA, μέσω των φωσφορικών ομάδων του φωσφοδιεστερικού σκελετού (357). Επιπροσθέτως, τα δεδομένα που παρουσιάσαμε παραπάνω συγκλίνουν στο γεγονός ότι το πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂, αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA, μέσω ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Είναι επομένως πιθανόν, μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων, το πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂, να λειτουργεί σαν ένα εξωτερικό προστατευτικό στρώμα ως προς το μόριο του DNA. Αν αυτό είναι αληθές, τότε το πεπτίδιο θα είναι αυτό που θα δεχτεί κατά πρώτο λόγο, την επίθεση από τις υδρόξυλο-ρίζες που παράγονται κατά την αντίδραση των ιόντων Ni²⁺ με το H₂O₂, μειώνοντας σημαντικά την έκταση στην καταστροφή του DNA.

Μία δεύτερη εξήγηση, μπορεί να πηγάζει από την ένταξη του ιόντος με το πεπτίδιο, προς σχηματισμό ενός οξειδοαναγωγικά ανενεργού, οκταεδρικού συμπλόκου. Τα διαθέσιμα δεδομένα στην διεθνή βιβλιογραφία συγκλίνουν στο γεγονός ότι η οξειδωτική δράση των συμπλόκων του νικελίου με πεπτίδια είναι συνυφασμένη με τον τρόπο ένταξης, συνηγορώντας στο γεγονός ότι μόνο τα επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα εμφανίζουν αυξημένη οξειδοαναγωγική ισχύ (82). Δεδομένου ότι ο σχηματισμός ενός επίπεδου τετραγωνικού συμπλόκου είναι απίθανος στην περίπτωση του πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂, ο σχηματισμός ενός 1N συμπλόκου, μέσω του ιμιδαζολικού αζώτου της His₁₈, θα ελάττωνε σημαντικά την ενεργή συγκέντρωση των ιόντων Ni²⁺ στο διάλυμα και κατ' επέκταση την παραγωγή υδρόξυλο-ριζών που θα μπορούσαν να πλήξουν το DNA.

Παρόλα αυτά, η σύγκριση των Πινάκων 16 και 17, υποδεικνύει ότι όταν το πεπτίδιο προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης, παρατηρείται ελάττωση της supercoiled μορφής με ταυτόχρονη αύξηση της γραμμικής, υποδηλώνοντας ότι λαμβάνει χώρα διάσπαση της διπλής έλικας του DNA σε υψηλότερο ποσοστό. Τα ιόντα Ni²⁺ είναι γνωστό ότι προκαλούν σχάσεις μόνο στον έναν κλώνο (350, 353, 356). Η μοναδική εξήγηση που μπορούμε να δώσουμε είναι ότι η διάσπαση της διπλής έλικας μπορεί να προέχεται από δραστικές ρίζες, που παράγονται από την δράση των παραγόμενων κατά την αντίδραση του ιόντος Ni²⁺ με H₂O₂ ελευθέρων ριζών, στο πεπτίδιο.



Σχήμα 77. Οξείδωση πεπτιδικής μεθειονίνης

77) (360), οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν σχάση στη διπλή έλικα του DNA.

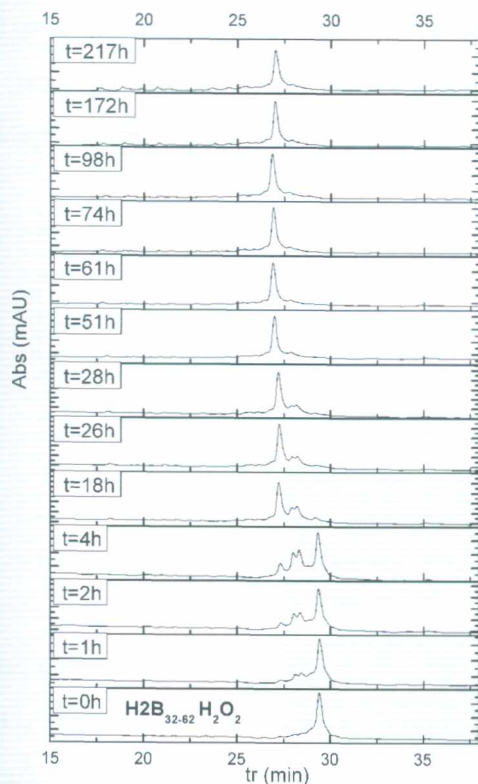
Απόδειξη του σχηματισμού σουλφοξείδιων κατά την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂ με ιόντα Ni²⁺ και H₂O₂, προκύπτει από τα φάσματα μάζας διαλυμάτων που περιείχαν πεπτίδιο (0,3 mM), Ni²⁺ (0,3 mM) και H₂O₂ (1 mM) ή πεπτίδιο και H₂O₂ και επωάστηκαν στους

Η παρουσία 2 καταλοίπων μεθειονίνης στην πρωτοταγή δομή του πεπτιδίου στις θέσεις Met₂₈ και Met₃₁ μπορεί να είναι ιδιαίτερης σημασίας όσον αφορά την παραγωγή άλλων δραστικών ριζών. Το πρώτο σταθερό προϊόν της οξείδωσης ενός καταλοίπου μεθειονίνης (ελεύθερου ή πεπτιδικού) είναι ένα σουλφοξείδιο (359) το οποίο όμως μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω και να σχηματίσει ενδιάμεσες ελεύθερες άλκυλο ή περόξυ-ρίζες (Σχήμα

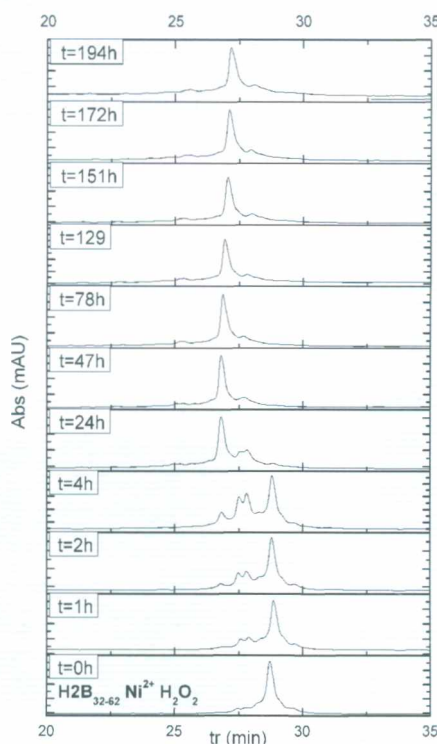
37°C. Στο Σχήμα 78, δίνονται τα αναλυτικά χρωματογραφήματα των ανωτέρω διαλυμάτων που ελήφθησαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Όπως γίνεται αντιληπτό, τόσο απουσία ή παρουσία ιόντων Ni^{2+} η κύρια κορυφή που αποδίδεται στο πεπτίδιο, διασπάται σε 3 επιπλέον κορυφές. Έπειτα από 24 ώρες, παρατηρείται μόνο μία κορυφή, τα θραύσματα m/z της οποίας, όπως ελήφθησαν από τα αντίστοιχα ESI-MS φάσματα, είναι σε συμφωνία με τον σχηματισμό ενός πεπτιδικού προϊόντος στο οποίο και τα 2 κατάλοιπα μεθειονίνης έχουν οξειδωθεί σε σουλφοξείδια (Πίνακας 18). Η μετατροπή αυτή είναι δύσκολο να κατανοηθεί στα διαλύματα που δεν περιέχουν ιόντα Ni^{2+} , δεδομένου ότι όλα τα stock διαλύματα είχαν καθαριστεί με την ρητίνη Chelex-100, προκειμένου να απομακρύνουμε ίχνη μετάλλων μεταπτώσεως που φυσιολογικά ενυπάρχουν στα αντιδραστήρια και στο νερό που χρησιμοποιήσαμε για την παρασκευή των διαλυμάτων. Είτε όμως πρόκειται για ένα τεχνητό προϊόν, λόγω της παρουσίας κάποιας μικρής ποσότητας οξειδωτικών προσμίξεων στο διάλυμα, είτε για μια καθαρή μεταβολή, το οξειδωμένο πεπτίδιο είναι πολύ σταθερό, δεδομένου ότι είναι το μοναδικό ανιχνεύσιμο προϊόν, ακόμα και μετά από 200 ώρες επώασης.

Η παρουσία ειδικών ενζύμων (ρεδουκτάσες σουλφοξειδίων μεθειονίνης (Msr)) που καταλύουν την αναγωγή των σουλφοξειδίων μεθειονίνης σε μεθειονίνη είναι γνωστή (359, 361-365). Επομένως, σε φυσιολογικές συνθήκες ο παραπάνω μηχανισμός δημιουργίας σχάσεων της διπλής έλικας, είναι απίθανο να λάβει χώρα. Εντούτοις, τα πειραματικά μας δεδομένα υποδεικνύουν ότι παρουσία H_2O_2 και πεπτιδίου $\text{H}_2\text{B}_{32-62}$, τα ιόντα Ni^{2+} μπορούν να προκαλέσουν διάσπαση της διπλής έλικας του DNA, μέσω ενός μηχανισμού που δεν απαιτεί την σύμπλεξη του πεπτιδίου με το μέταλλο. Αυτό το γεγονός μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε περιπτώσεις μειωμένης έκφρασης ή δράσης των Msr, όπως συμβαίνει κατά την γήρανση (366).

(α)



(β)



Σχήμα 78. Αναλυτικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, διαλυμάτων (α) H2B_{32-62} (0,3 mM), H_2O_2 (1 mM) σε PBS και (β) H2B_{32-62} (0,3 mM), Ni^{2+} (0,3 mM), H_2O_2 (1 mM) σε PBS

Πίνακας 18. Χαρακτηρισμός της νέας σχηματιζόμενης κορυφής κατά την επίδραση H_2O_2 ή μίγματος Ni^{2+} και H_2O_2 στο πεπτίδιο H2B_{32-62}

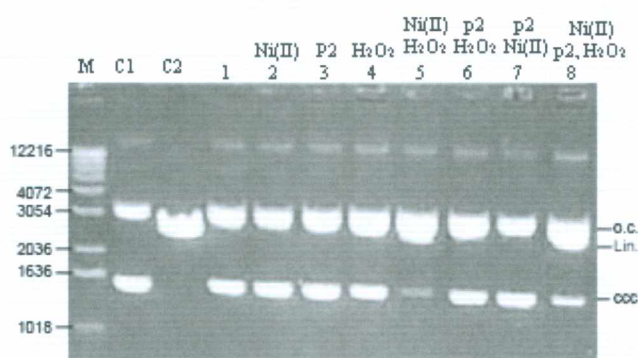
Σύνθεση Διαλύματος	RP/HPLC Retention Time (min)	ESI/MS (m/z) θεωρητικό/υπολογιζόμενο
H2B_{32-62} , H_2O_2 σε PBS	27.1	1789/1789 ^a
		1193/1193 ^b
		895/895 ^c
		716/716 ^d
H2B_{32-62} , Ni^{2+} , H_2O_2 σε PBS	27.1	1789/1789 ^a
		1193/1193 ^b
		895/895 ^c
		716/716 ^d

^a $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, ^b $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, ^c $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$, ^d $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$, όπου το M αναφέρεται στο μοριακό βάρος του πεπτιδίου όπου οι Met έχουν οξειδωθεί σε σουλφοξείδια ($\text{M} = 3576 \text{ g/mol}$)

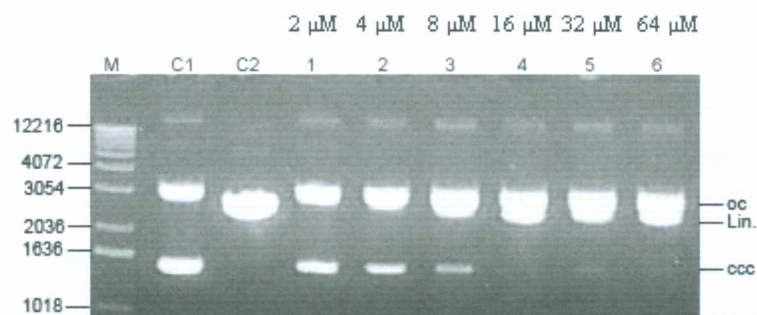
10,4,2,2 Επίδραση Συμπλόκων Ni^{2+} – $H2B_{94-125}$ στο πλασμιδιακό DNA

Στο Σχήμα 79, δίνεται η φωτογραφία ενός χαρακτηριστικού gel αгарόζης που τραβήχτηκε έπειτα από ηλεκτροφόρηση διαλυμάτων που επωάστηκαν στους 37°C για 16 ώρες και περιείχαν pUC19 (0,6 μg), πεπτίδιο $H2B_{94-125}$ (8 μM), ιόντα Ni^{2+} σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-64 μM) και H_2O_2 (1 mM).

(α)



(β)



Σχήμα 79. Φωτογραφία πηκτής αгарόζης, έπειτα από ηλεκτροφόρηση για 1½ ώρα, διαλυμάτων που (α) περιείχαν πλασμίδιο pUC19, Ni^{2+} (8 μM), πεπτίδιο $H2B_{94-125}$ (8μM) και H_2O_2 (β) περιείχαν πλασμίδιο pUC19, Ni^{2+} (2-64 μM), πεπτίδιο $H2B_{94-125}$ (8μM) και H_2O_2 . Η συγκέντρωση του νικελίου σε μM, δίνεται στην κορυφή κάθε λωρίδας. M = molecular weight marker, C1 = control 1 (περιέχει μόνο πλασμίδιο), C2 = control 2 (περιέχει μόνο ευθυγραμμισμένο πλασμίδιο που ελήφθηκε από επίδραση του περιοριστικού ενζύμου pstI)

Πίνακας 19. Ποσοστά supercoiled, open-circular και linear πλασμιδίου έπειτα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις νικελίου, πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ (8 μM) και H₂O₂ (1 mM) (μέσος όρος 2 πειραμάτων)

[Ni ²⁺] (μM)	Κυκλικό (supercoiled)	Ανοιχτό κυκλικό (open circular)	Γραμμικό (linear)	Ολικό (%)
0	51.7	48.3	0	100
2	36.7	63.3	0	100
4	30,0	70,0	0	100
8	15,0	85,0	0	100
16	3.3	75,0	21.7	100
32	1.7	35,0	63.3	100
64	0	38.3	58.3	96.7

Όπως και στα προηγούμενα πειράματα, η επώαση του πλασμιδιακού DNA για 16 ώρες στους 37°C, μόνο του ή παρουσία Ni²⁺ ή H₂O₂ ή πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅ δεν προκαλεί καμία μεταβολή μεταξύ των ποσοστών των πλασμιδιακών μορφών. Μετατροπή μεταξύ των πλασμιδιακών μορφών, παρατηρείται μόνο σε διαλύματα τα οποία περιέχουν Ni²⁺ και H₂O₂ (Λωρίδες 5 και 8 σχήματος 78(α) και 78(β)).

Εάν συγκρίνουμε τις λωρίδες 5 και 8 του σχήματος 79(α), προκύπτει ότι η παρουσία του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅, στο μίγμα της αντίδρασης ελαττώνει την κατανάλωση της κυκλικής μορφής του πλασμιδίου. Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν και από την σύγκριση των Πινάκων 16 και 19, όπου φαίνεται ότι η παρουσία του πεπτιδίου να δρα προστατευτικά ως προς το πλασμίδιο ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις νικελίου (32, 64 μM).

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, το πεπτίδιο αυτό δεν αναμένεται να αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA. Παρόλα αυτά, οι μελέτες του τρόπου ένταξης του με τα ιόντα Ni²⁺ δείχνουν ότι σε φυσιολογικές τιμές pH σχηματίζεται ένα οκταεδρικό σύμπλοκο μέσω του ιμιδαζολικού αζώτου της His₁₆. Το διάγραμμα κατανομής που παρουσιάστηκε στο Σχήμα 51, δείχνει ότι το εν λόγω σύμπλοκο σχηματίζεται σε πολύ μικρό ποσοστό και η πλεινότητα του μετάλλου παραμένει αδέσμευτη στο διάλυμα. Παρόλα αυτά, η αυξημένη θερμοκρασία των διαλυμάτων που επώαστηκαν, προτού ηλεκτροφορηθούν (37°C, έναντι 25°C που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες σύμπλεξης), αναμένεται να αυξήσει το ποσοστό των ιόντων που δεσμεύονται από το πεπτίδιο. Απουσία του πεπτιδίου τα ιόντα Ni²⁺ κατανέμονται μεταξύ αυτών που βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα και αυτών που συνδέονται με τις φωσφορικές

ομάδες του DNA. Όταν ο πεπτιδικός υποκαταστάτης προστεθεί στο μίγμα της αντίδρασης, κάποια ποσότητα από τα ελεύθερα ιόντα Ni^{2+} θα συμπλεχθεί με αυτόν. Το οκταεδρικό σύμπλοκο που πιθανόν σχηματίζεται, δεν αναμένεται να παρουσιάζει οξειδοαναγωγική δράση (82). Αντίθετα, ο σχηματισμός του οδηγεί σε ελάττωση της ενεργού συγκέντρωσης ιόντων Ni^{2+} στο διάλυμα και συνεπώς σε ελάττωση της παραγωγής δραστικών οξυγονούχων ριζών που θα μπορούσαν να βλάψουν το DNA.

Συμπεράσματα

Προκειμένου να διερευνήσουμε την υπόθεση ότι η καρκινογένεση και τοξικότητα που προκαλείται από μεταλλικά ιόντα, οφείλεται στην αλληλεπίδραση τους με τις ιστόνες, προχωρήσαμε στην σύνθεση των πεπτιδίων 1 και 2, τα οποία αποτελούν μοντέλα της ιστονικής πύκωσης και C-τελικής ουράς της ιστόνης H2B, αντίστοιχα:

πεπτίδιο 1, (H2B₃₂₋₆₂): SRKESYSVYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIM

πεπτίδιο 2, (H2B₉₄₋₁₂₅): IQTAVRLLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK

Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με την Fmoc/t-Bu μεθοδολογία σε στερεή φάση. Ο καθαρισμός των πεπτιδικών προϊόντων επιτεύχθηκε με την χρήση χρωματογραφικών τεχνικών (gel filtration και RP-HPLC) και η ταυτοποίηση τους με ESI-MS και 2D-NMR. Τα κυριότερα συμπεράσματα της μελέτης σύμπλεξης και οξειδωτικής συμπεριφοράς των σχηματιζόμενων συμπλόκων συνοψίζονται ως εξής:

Σύμπλοκα Cu^{2+} - H2B₃₂₋₆₂

- * Το πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂, απουσία μεταλλικών ιόντων καταβυθίζεται σε pH >7,8. Εντούτοις, η σύμπλεξη του με τα ιόντα Cu^{2+} , οδηγεί σε μια δομική αναμόρφωση και στον σχηματισμό ευδιάλυτων συμπλόκων στην pH-μετρική κλίμακα 4-10,5.
- * Η ποτενσιομετρία ανιχνεύει την ύπαρξη 4 συμπλόκων στην κλίμακα pH 4-9,3, με στοιχειομετρία CuL , CuLH_2 , CuLH_3 και CuLH_4 . (Οι στοιχειομετρικοί τύποι προκύπτουν, θεωρώντας τον υποκαταστάτη H2B₃₂₋₆₂ ως ένα τριπρωτικό οξύ του τύπου H_3L).
- * Το σύμπλοκο CuLH_2 , αποτελεί το κύρια σχηματιζόμενο είδος σε φυσιολογικές τιμές pH και είναι υπεύθυνο για την ένταξη του 85 % της ολικής συγκέντρωσης ιόντων Cu^{2+} . Η συνδιασμένη ανάλυση των θερμοδυναμικών παραμέτρων και UV-Vis, CD και EPR φασμάτων, υποδεικνύει ένα σύνολο δοτών του τύπου $\{\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-\}$, όπου το κεντρικό ιόν εντάσσεται μέσω του ιμιδαζολικού αζώτου της His₁₈ και 2 αποπρωτονιωμένων αμιδικών ατόμων αζώτου του πεπτιδικού σκελετού.
- * Τα UV-Vis και EPR φάσματα, υποδεικνύουν την ύπαρξη 2 διαφορετικών ειδών που αντιστοιχούν στον ίδιο στοιχειομετρικό τύπο CuLH_2 , υποδηλώνοντας την παρουσία 2 ισομερών ένταξης. Οι τιμές $A_{\parallel}$ και $g_{\parallel}$ υποδεικνύουν ότι και τα 2 σύμπλοκα έχουν 3N γεωμετρία, με τη διαφορά ότι το ένα εκ των δύο χαρακτηρίζεται από μεγάλη παραμόρφωση. Προτείνουμε ότι η παραμόρφωση προέρχεται από την σύμπλεξη της καρβοξυλικής ομάδας του Asp₂₀ σε αξονική θέση, δεδομένου ότι η παρουσία του καταλοίπου Pro₁₉ μπορεί να κάμψει τον πεπτιδικό σκελετό και να διευκολύνει την ένταξη της εν λόγω καρβοξυλο ομάδας.

- * Το σύμπλοκο που σχηματίζεται σε φυσιολογικές τιμές pH είναι οξειδοαναγωγικά ενεργό και παρουσία H_2O_2 , προκαλεί αύξηση της συχνότητας εμφάνισης διασπάσεων στην διπλή έλικα του DNA.

Σύμπλοκα Ni^{2+} - $H2B_{32-62}$

- * Το πεπτίδιο $H2B_{32-62}$ δεν εντάσσεται αποτελεσματικά με τα ιόντα Ni^{2+} , δεδομένου ότι η καταβύθιση που παρατηρείται απουσία του ιόντος, είναι εμφανής και κατά την προσθήκη ιόντων Ni^{2+} στο διάλυμα.
- * Η απουσία νέων συστημάτων spin στα καταγεγραμμένα σε pH 8,6 2D-NMR φάσματα, υποδηλώνει ότι δεν σχηματίζεται κανένα διαμαγνητικό σύμπλοκο μεταξύ του πεπτιδίου και των ιόντων Ni^{2+} . Το γεγονός ότι δεν παρατηρείται διεύρυνση των κορυφών, υποδεικνύει ότι η καταβύθιση προέρχεται τόσο από τον ελεύθερο υποκαταστάτη, όσο και από το παραμαγνητικό ιόν Ni^{2+} .
- * Παρουσία του πεπτιδίου, παρατηρείται ελάττωση στην αποικοδόμηση του DNA, λόγω ελευθέρων ριζών που παράγονται κατά την αντίδραση Fenton μεταξύ Ni^{2+} και H_2O_2 , υποδεικνύοντας ότι το πεπτίδιο προστατεύει το πλασμιδιακό DNA. Παρόλα αυτά, παρατηρείται αυξημένη εμφάνιση διασπάσεων στην διπλή έλικα του DNA, η οποία μπορεί να οφείλεται στην δημιουργία άλκυλο και περόξυ-ριζών, από την περαιτέρω οξείδωση των σουλφοξειδίων μεθειονίνης του πεπτιδίου.

Σύμπλοκα Cu^{2+} - $H2B_{94-125}$

- * Το πεπτίδιο $H2B_{94-125}$, εντάσσεται ιδιαίτερα αποτελεσματικά με τα ιόντα Cu^{2+} . Η ποτενσιομετρία ανιχνεύει την ύπαρξη 9 διαφορετικών συμπλόκων, με στοιχειομετρία $CuLH_5$, $CuLH_4$, $CuLH_3$, $CuLH_2$, $CuLH$, CuL , $CuLH_{-1}$, $CuLH_{-2}$ και $CuLH_{-3}$.
- * Το κύριο σχηματιζόμενο είδος σε φυσιολογικές τιμές pH, αντιστοιχεί στο στοιχειομετρικό τύπο $CuLH_3$ και οι φασματοσκοπικοί παράμετροι αντιστοιχούν σε ένα σύνολο δοτών του τύπου $\{N_{lm}, 2N^-\}$, με παραμορφωμένη τετραγωνική γεωμετρία.
- * Η σύγκριση του τρόπου ένταξης του εν λόγω πεπτιδίου με το εξαπεπτίδιο –ELAKHA-, δείχνει ότι οι δύο αυτοί υποκαταστάτες, εμφανίζουν εντελώς διαφορετικό τρόπο ένταξης, παρόλο που περιέχουν την ίδια πρωτοταγή δομή στη θέση δέσμευσης του ιόντος. Η λεπτομερής σύγκριση των ιδιοτήτων των σχηματιζόμενων συμπλόκων του χαλκού με τα πεπτίδια $H2B_{94-125}$ και –ELAKHA-, υποδεικνύει την τεράστια σημασία του μεγέθους της

πολυπεπτιδικής αλυσίδας και πιθανών δευτεροταγών δομών που επάγονται από την ένταξη του ιόντος, στον τρόπο σύμπλεξης μεταλλικών ιόντων με πεπτιδικούς υποκαταστάτες.

- * Όταν το πεπτίδιο H2B₉₄₋₁₂₅ ενυπάρχει στα μίγματα αντίδρασης πλασμιδιακού DNA, ιόντων Cu²⁺ και H₂O₂, περιορίζει την καταστροφή του DNA και την διάσπαση της διπλής έλικας, λειτουργώντας προστατευτικά ως προς το πλασμίδιο.

Σύμπλοκα Ni²⁺ - H2B₉₄₋₁₂₅

- * Το πεπτίδιο H2B₉₄₋₁₂₅, αλληλεπιδρά με τα ιόντα Ni²⁺, οδηγώντας στο σχηματισμό 9 σωματιδίων με στοιχειομετρία, NiLH₅, NiLH₄, NiLH₃, NiLH₂, NiLH, NiL, NiLH₁, NiLH₂ και NiLH₃, στην pH-μετρική κλίμακα 5-11,5. Το σύμπλοκο NiLH₅ είναι το κύριο σχηματιζόμενο είδος σε φυσιολογικές τιμές pH, ευθύνεται όμως για τη σύμπλεξη μολις του 10% της ολικής συγκέντρωσης νικελίου.
- * Ο σχηματισμός των 4N συμπλόκων του νικελίου, ξεκινάει σε pH περίπου ίσο με 8 με το σχηματισμό του είδους NiLH₂, ενώ τα υπόλοιπα είδη που σχηματίζονται σε υψηλότερες τιμές pH (NiLH, NiL, NiLH₁, NiLH₂ και NiLH₃), διαφέρουν μόνο ως προς την κατάσταση πρωτονίωσης των καταλοίπων Tyr και Lys.
- * Η μελέτη του 4N συμπλόκου με φασματοσκοπία NMR, υποδεικνύει ότι η σύμπλεξη πραγματοποιείται μέσω του ιμιδαζολικού αζώτου της His₁₆ και 3 αποπρωτονιωμένων αμιδικών ατόμων αζώτου που προέρχονται από τα κατάλοιπα Ala₁₄, Lys₁₅ και His₁₆.
- * Η σύμπλεξη με το νικέλιο, οδηγεί σε μία μετάπτωση από μία random coil διαμόρφωση στο ελεύθερο πεπτίδιο σε μία καλά καθορισμένη δομή στην περιοχή κοντά στη θέση ένταξης, ο υπολογισμός της οποίας κατέστη δυνατός για το οκταπεπτιδικό τμήμα Glu₁₂-Leu₁₃-Ala₁₄-Lys₁₅-His₁₆-Ala₁₇-Val₁₈-Ser₁₉.
- * Τα NOESY και ROESY φάσματα του συμπλεγμένου πεπτιδίου παρέχουν ενδείξεις ότι η σύμπλεξη, οδηγεί σε μια δομική αναμόρφωση και της C-τελικής ουράς του πεπτιδίου, από μία random coil διαμόρφωση στο ελεύθερο πεπτίδιο σε μια πιο οργανωμένη δομή στο 4N είδος (στερούμενη πάντως από στοιχεία α-έλικας ή β- φύλλου), η οποία φαίνεται να προσεγγίζει το επίπεδο του συμπλόκου.
- * Υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρουσία του πεπτιδίου, η οξειδωτική καταστροφή που προκαλείται στο πλασμιδιακό DNA, από τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες κατά την αντίδραση Fenton μεταξύ Ni²⁺ και H₂O₂, περιορίζεται σημαντικά ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων Ni²⁺.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παραπάνω μπορεί να συνδέονται άμεσα με την καρκινογένεση και/ή τοξικότητα που προκαλείται από τα ιόντα Ni^{2+} και Cu^{2+} . Τα πεπτιδικά μοντέλα H2B_{32-62} και H2B_{94-125} εντάσσονται ιδιαίτερα αποτελεσματικά με τα ιόντα Cu^{2+} και σχηματίζουν σε φυσιολογικές τιμές pH 3N σύμπλοκα, μέσω των ιμιδαζολικών ατόμων αζώτου των καταλοίπων ιστιδίνης που περιέχουν. Η σύμπλεξη από μόνη της είναι ένα φαινόμενο που μπορεί να πυροδοτήσει μια σειρά γεγονότων, τα οποία με τη σειρά τους, μπορούν να εμπλακούν στις διαδικασίες καρκινογένεσης. Οι δομικές μεταβολές που μπορούν να πραγματοποιηθούν ακόμα και σε απομακρυσμένες, από τη θέση δέσμευσης του ιόντος, περιοχές του πρωτεϊνικού μορίου, μπορεί να εμπλακούν στις τροποποιήσεις που φυσιολογικά συμβαίνουν στις ιστόνες και να απορρυθμίσουν την διαχείριση της γενετικής πληροφορίας. Το πεπτιδικό μοντέλο H2B_{94-125} , περιέχει το κατάλοιπο Lys_{120} , του οποίου η ουβικιτίνωση πιστεύεται ότι ενεργοποιεί την μεταγραφή. Μία δομική μεταβολή στην διαμόρφωση της Lys_{120} , προερχόμενη από σύμπλεξη του ιόντος στην His_{109} , μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική στην διαδικασία αναγνώρισης του εν λόγω καταλοίπου από το κατάλληλο ένζυμο. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου αυτού με τα ιόντα Ni^{2+} , υποδηλώνει ότι μία τέτοια δομική μεταβολή είναι πιθανή. Εάν αυτή συμβαίνει λόγω της αλληλεπίδρασης του αρνητικά φορτισμένου φαινολικού οξυγόνου της γειτονικής Tyr_{121} με το ηλεκτροστατικό δυναμικό που παράγεται από το σύμπλοκο, είναι μάλλον δύσκολο να πραγματοποιηθεί υπό φυσιολογικές συνθήκες, δεδομένου ότι σε pH 7,4 η πλευρική αλυσίδα του εν λόγω καταλοίπου είναι πρωτονιωμένη. Εάν όμως οφείλεται σε μια δομική προτίμηση προς ένα θερμοδυναμικά σταθερότερο σύμπλοκο, είναι πιθανόν να λάβει χώρα ακόμα και *in vivo*. Όσον αφορά την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου αυτού με τα ιόντα Ni^{2+} , μπορεί το επίπεδο τετραγωνικό σύμπλοκο να σχηματίζεται σε pH > 8, πιστεύεται όμως πως οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις σε ολόκληρη την πρωτεΐνη μπορούν να ευνοήσουν την διαδικασία σχηματισμού ενός 4N συμπλόκου από ένα 1N πρόδρομο μόριο, ακόμα και σε φυσιολογικές τιμές pH.

Δεδομένου ότι το πεπτιδικό μοντέλο H2B_{32-62} δεν περιέχει κατάλοιπα στα οποία πραγματοποιούνται τροποποιήσεις των ιστονών, η σύνδεση του με φαινόμενα τοξικότητας και καρκινογένεσης, λόγω της αλληλεπίδρασης του με τα ιόντα Ni^{2+} και Cu^{2+} , είναι περισσότερο πιθανή μέσω ενός μηχανισμού που θα επιφέρει αύξηση του οξειδωτικού stress που «αισθάνεται» το κύτταρο. Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν παραπάνω, υποδηλώνουν ότι το πεπτίδιο αυτό δεν συμπλέκεται με το νικέλιο. Εντούτοις, τα πειράματα οξειδωτικής καταστροφής του πλασμιδιακού DNA, υποδεικνύουν μία αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης

διασπάσεων στη διπλή έλικα του DNA, όταν αυτό είναι παρών στο μίγμα της αντίδρασης. Προτείνουμε ότι αυτή η αύξηση προέρχεται από την περαιτέρω οξείδωση των πεπτιδικών σουλφοξειδίων μεθειονίνης σε άλκυλο και περόξυ ρίζες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, αυτή η αυξημένη τάση για διάσπαση της διπλής έλικας, μπορεί να συνδέεται με τους μηχανισμούς καρκινογένεσης, σε περιπτώσεις μειωμένης έκφρασης και δραστηριότητας των ειδικών ενζύμων που καταλύουν την αναγωγή των σουλφοξειδίων μεθειονίνης σε μεθειονίνη. Πάντως, όταν αυτό το πεπτιδικό μοντέλο, συμπλέκεται με τα ιόντα Cu^{2+} , φαίνεται να ενισχύεται η οξειδωτική καταστροφή του DNA. Η υψηλή συγγένεια του πεπτιδίου αυτού για τα ιόντα Cu^{2+} είναι εμφανής από το γεγονός ότι παρουσία ιόντων Cu^{2+} , η καταβύθιση του ελεύθερου υποκαταστάτη εξαφανίζεται. Με βάση τα παραπάνω, το πεπτιδικό μοντέλο H2B₃₂₋₆₂ είναι ένας πιθανός στόχος για τα φαινόμενα τοξικότητας και/ή καρκινογένεσης που λαμβάνουν χώρα όταν η ομοιόσταση του εν λόγω ιόντος διαταραχτεί.

Πιστεύουμε ότι τα στοιχεία που παρουσιάζονται στην εν λόγω διατριβή, προσφέρουν μια πιο βαθιά κατανόηση στον πιθανό ρόλο της ιστόνης H2B, σε φαινόμενα τοξικότητας και καρκινογένεσης.

Περίληψη

Είναι ευρέως τεκμηριωμένο ότι πολλά μεταλλικά ιόντα των στοιχείων μετάπτωσης, όπως το νικέλιο και ο χαλκός, είναι καρκινογόνα για τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά. Οι μοριακοί μηχανισμοί, με τους οποίους επιτυγχάνεται η καρκινογένεση από μεταλλικά ιόντα δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Παρόλα αυτά, πιστεύεται ότι σχετίζεται με καταστροφή του DNA και/ή επιγενετικές μεταβολές που πηγάζουν από την δέσμευση των ιόντων στον πυρήνα του κυττάρου.

Είναι γνωστό ότι τα ιόντα Ni(II), δεσμεύονται ασθενώς από τις φωσφορικές ομάδες του DNA και τα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών. Για το λόγο αυτό, οι πυρηνικές πρωτεΐνες και πιο συγκεκριμένα οι ιστόνες, που απαντούν σε υψηλότερη συγκέντρωση εντός του πυρήνα, είναι οι κύριοι υποψήφιοι υποκαταστάτες για δέσμευση του μετάλλου. Αντίθετα, τα ιόντα Cu²⁺, δεσμεύονται ισχυρά τόσο με τις βάσεις του DNA, όσο και με πεπτιδικά μοντέλα ιστονών. Εντός του πυρήνα του κυττάρου, τα 2 αυτά συστατικά ανταγωνίζονται ως προς τη δέσμευση του μετάλλου.

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που συνηγορούν στο γεγονός ότι το νικέλιο μπορεί να εμπλακεί στις χημικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα φυσιολογικά στις ιστόνες και κατ' αυτόν τον τρόπο να απορρυθμίσει την διαχείριση της γενετικής πληροφορίας. Επιπροσθέτως, η δημιουργία συμπλόκων του μετάλλου με τμήματα ιστονών που παρουσιάζουν αυξημένη οξειδοαναγωγική ικανότητα, μπορεί να προκαλέσει αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου που δρουν απευθείας πάνω στο DNA. Ο χαλκός, δεδομένου ότι παρουσιάζει πιο πλούσια οξειδοαναγωγική χημεία από το νικέλιο, μπορεί να οδηγήσει άμεσα σε αυξημένη παραγωγή τέτοιων επιβλαβών προϊόντων, όταν βρίσκεται σε περίσσεια εντός του οργανισμού. Πάντως, όταν συμπλέκεται με ιστόνες ή προταμίνες μπορεί είτε να καταλύσει την δημιουργία τέτοιων ειδών, υποβοηθώντας την καταστροφή του DNA, είτε να δράσει προστατευτικά και να μειώσει την έκταση της οξειδωτικής βλάβης.

Στη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχουν πολλές μελέτες αλληλεπίδρασης πεπτιδικών μοντέλων των πυρηνικών ιστονών H3, H4 και H2A, με Ni²⁺ και Cu²⁺. Αντίθετα, η ιστόνη H2B, δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά, παρόλο που πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το νικέλιο μπορεί να επιδράσει όχι μόνο στις χημικές τροποποιήσεις που λαμβάνουν χώρα σε αυτή, αλλά και να προκαλέσει οξείδωση σε διάφορα αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Προκειμένου να διερευνήσουμε τον ρόλο της ιστόνης H2B, στην τοξικότητα και καρκινογένεση που προκαλείται από Ni(II) και Cu(II), συνθέσαμε τα πεπτίδια H2B₃₂₋₆₂ (SRKQSYSVYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIM) και H2B₉₄₋₁₂₅

(IQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK), τα οποία αποτελούν μοντέλα της ιστονικής πτύχωσης και C-τελικής ουράς της ιστόνης H2B, αντίστοιχα, και μελετήσαμε την αλληλεπίδραση τους με Ni(II) και Cu(II).

Η πεπτιδική σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε στερεή φάση με την Fmoc / ^tBu μεθοδολογία. Ο καθαρισμός των επιθυμητών πεπτιδικών προϊόντων, επιτεύχθηκε με χρωματογραφικές τεχνικές (gel filtration, RP-HPLC) και η ταυτοποίηση τους έγινε με φασματοσκοπία μάζας (ESI-MS) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με Ni(II) και Cu(II), μελετήθηκε με ποτενσιομετρικές τιτλοδοτήσεις και διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές (UV-Vis, CD, EPR, NMR), ενώ η μελέτη της επίδρασης των συμπλόκων στην διάσπαση της διπλής έλικας του DNA, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη, χρησιμοποιώντας ως στόχο το πλασμίδιο pUC19.

Η αναπάντεχη καταβύθιση του ελεύθερου πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂, σε pH > 7,8 δεν επέτρεψε τον υπολογισμό των σταθερών ιονισμού των καταλοίπων Lys και Tyr. Η καταβύθιση ήταν εμφανής και στα διαλύματα που περιείχαν Ni(II), υποδηλώνοντας ότι το πεπτίδιο αυτό δεν συμπλέκεται αποτελεσματικά με τα ιόντα Ni(II). Εντούτοις, η μελέτη της οξειδωτικής συμπεριφοράς του συστήματος H2B₃₂₋₆₂/Ni(II)/H₂O₂ είναι αρκετά διαφορετική από αυτή του συστήματος Ni(II)/H₂O₂, όσον αφορά την ικανότητα τους να προάγουν διάσπαση της διπλής έλικας και αποικοδόμηση του πλασμιδίου pUC19. Συγκεκριμένα, παρουσία του πεπτιδίου, παρατηρήθηκε ελάττωση στην αποικοδόμηση του πλασμιδιακού DNA σε μικρά τμήματα, με ταυτόχρονη όμως αύξηση στην συχνότητα διάσπασης της διπλής έλικας. Τα δύο αυτά φαινόμενα, αποδίδονται στην ισχυρή σύμπλεξη του πεπτιδίου με το πλασμιδιακό DNA, η οποία δημιουργεί ένα προστατευτικό στρώμα γύρω από αυτό. Όσον αφορά την αύξηση της συχνότητας εμφάνισης σχάσεων στην διπλή έλικα, αυτή αποδίδεται σε άλκυλο και περόξυ-ρίζες που δημιουργούνται από την περαιτέρω οξείδωση των σουλφοξειδίων μεθειονίνης του πεπτιδίου, δεδομένου ότι από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το Ni(II) προκαλεί διάσπαση μόνο της μιας έλικας.

Σε αντίθεση με το Ni(II) η σύμπλεξη με τα ιόντα Cu(II) είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική. Η καταβύθιση που παρατηρήθηκε στα διαλύματα του ελεύθερου υποκαταστάτη απομακρύνεται και μια σειρά ευδιάλυτων συμπλόκων του εν λόγω πεπτιδίου με Cu(II), ανιχνεύονται στην pH-μετρική κλίμακα 4-10,5. Σε φυσιολογικές τιμές pH, τα κύρια σχηματιζόμενα είδη είναι δύο 3N σύμπλοκα, που χαρακτηρίζονται από έναν τρόπο ένταξης του τύπου {N_{Im}, 2N'} και διαφέρουν μόνο ως προς την επιπλέον σύμπλεξη της καρβοξυλομάδας του Asp₂₀ σε αζονική

θέση. Τα σύμπλοκα αυτά είναι οξειδοαναγωγικά ενεργά, δεδομένου ότι ενισχύουν την οξειδωτική διάσπαση του πλασμιδιακού DNA και την αύξηση στη συχνότητα σχάσης της διπλής έλικας. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην εν λόγω διατριβή, υποδεικνύουν ότι η σύμπλεξη του Cu(II) με το πεπτίδιο H2B₃₂₋₆₂, μπορεί να συνδέεται άμεσα με την καρκινογένεση που προκαλείται από την οξείδωση του DNA, μέσω ελευθέρων ριζών.

Η σύμπλεξη του πεπτιδικού μοντέλου H2B₉₄₋₁₂₅ με Ni(II), ξεκινάει σε pH περίπου ίσο με 5 με το σχηματισμό ενός παραμορφωμένου οκταεδρικού συμπλόκου του τύπου {N_{Im}}. Ο σχηματισμός των επίπεδων τετραγωνικών συμπλόκων του Ni(II) ξεκινάει σε pH > 8 ενώ η πλήρης συμπλοκοποίηση του ελεύθερου Ni(II), επέρχεται σε pH περίπου ίσο με 10. Ο σχηματισμός του επίπεδου τετραγωνικού συμπλόκου, μελετήθηκε με φασματοσκοπία NMR και η επίλυση της δομής του με το οκταπεπτιδικό τμήμα –Glu₁₂-Leu₁₃-Ala₁₄-Lys₁₅-His₁₆-Ala₁₇-Val₁₈-Ser₁₉-, κατέστη δυνατή από τις παρατηρούμενες NOE συζεύξεις. Δυστυχώς, η έλλειψη σημαντικού αριθμού NOE συζεύξεων δεν επέτρεψε τον υπολογισμό της δομής όλου του πεπτιδικού τμήματος, υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι κατά την σύμπλεξη επηρεάζεται και το C-τελικό τμήμα του πεπτιδίου, το οποίο τείνει να προσεγγίσει το επίπεδο του συμπλόκου. Μία τέτοια δομική μεταβολή, εάν συμβεί υπό φυσιολογικές συνθήκες μπορεί να εμπλακεί με την διαδικασία ουβικιτίνωσης του καταλοίπου Lys₁₂₀. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το νικέλιο επηρεάζει την ουβικιτίνωση της εν λόγω Lys σε κύτταρα, χωρίς όμως να έχει προταθεί κάποιος μηχανισμός για την ανωτέρω διαδικασία. Τα πειραματικά μας δεδομένα, μας επιτρέπουν να υποδείξουμε έναν μηχανισμό, όπου η ουβικιτίνωση επηρεάζεται λόγω της σύμπλεξης του μετάλλου στην His₁₆ του πεπτιδίου H2B₉₄₋₁₂₅. Το γεγονός ότι παρουσία του πεπτιδίου, η οξειδωτική καταστροφή που πραγματοποιείται στο πλασμιδιακό DNA, από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την αντίδραση Fenton μεταξύ Ni(II) και H₂O₂, είναι μικρότερη, υποδηλώνει ότι εάν το εν λόγω πεπτιδικό τμήμα εμπλέκεται στη διαδικασία καρκινογένεσης, ο μηχανισμός πρέπει να οφείλεται σε επιγενετικές μεταβολές και όχι σε καταστροφή του DNA λόγω αυξημένης παραγωγής ROS σωματιδίων.

Το πεπτίδιο H2B₉₄₋₁₂₅ αλληλεπιδρά ιδιαίτερα αποτελεσματικά με τα ιόντα Cu(II). Η ποτενσιομετρία ανιχνεύει μια σειρά συμπλόκων στην pH-μετρική κλίμακα 4-11,5. Σε φυσιολογικές τιμές pH, το κύριο σχηματιζόμενο είδος είναι ένα 3N σύμπλοκο με τρόπο ένταξης {N_{Im}, 2N⁻}, το οποίο όμως σε αντίθεση με το αντίστοιχο σύμπλοκο του πεπτιδίου H2B₃₂₋₆₂ δεν καταλύει την αποικοδόμηση του πλασμιδιακού DNA, αλλά δρα προστατευτικά ως προς αυτό. Παρόλα αυτά, είναι πιθανό το σύμπλοκο του χαλκού να επιφέρει την ίδια

δομική μεταβολή στην C-τελική ουρά του πεπτιδίου, που παρατηρήσαμε για το 4N σύμπλοκο του νικελίου και να εμπλακεί, μέσω του ίδιου μηχανισμού, με την ουβικιτίνωση της Lys₁₂₀.

Πιστεύουμε ότι τα στοιχεία που παρουσιάζονται στην εν λόγω διατριβή, μπορούν να βοηθήσουν σε μια βαθύτερη κατανόηση στον ρόλο της ιστόνης H2B, στους μηχανισμούς τοξικότητας και/ή καρκινογένεσης που προκαλούνται από μεταλλικά ιόντα.

Abstract

It has been widely established that several transition metals, such as copper and nickel, are carcinogenic to humans and/or animals. The molecular mechanism by which metal carcinogenicity is exerted is not fully understood. However, it is believed to involve DNA damage and epigenetic effects in chromatin, resulting from metal binding to the cell nucleus.

It is known that Ni(II) can bind DNA through its phosphate groups and phospholipids of cellular membranes, only weakly. Therefore, the nucleus proteins, and in particular the most abundant among them, the histones, are the major candidates for metal binding. On the contrary, Cu(II) ions interact quite efficiently with DNA bases and several histone peptide models. Consequently, within the cell nucleus, those two components, compete for copper binding.

There is plenty of data in the literature, suggesting that Ni(II) affects post translational modifications, occurring naturally in histones, leading in gene silencing or over express. Additionally, formation of redox active Ni(II) complexes with parts of the protein, is able to produce ROS species that may damage DNA. On the other hand, since Cu(II) presents a richer redox chemistry than Ni(II), is able to produce ROS species in much higher quantity, when is in excess inside cells. However, when Cu(II) is bounded to peptide models of protamines and/or histones, may either have a protective effect, limiting the observed DNA damage, or enhance the formation of oxygen radicals, that could extensively harm DNA, protein and lipid molecules.

In previous years, several studies have shown that H2A, H3 and H4 histones, may serve as efficient binding sites for metal ions, such as Cu(II) and Ni(II). On the contrary, histone H2B has not been extensively studied. However, there is evidence that Ni(II) ions may affect ubiquitination of histone H2B and promote oxidation in several parts of the protein molecule. In an attempt to investigate the role of metal binding on histone H2B, in the mechanisms of metal induced toxicity and/or carcinogenicity, we synthesized the peptides H2B₃₂₋₆₂ and H2B₉₄₋₁₂₅, that mimic the histone-fold domain and C-terminal of histone H2B protein, respectively, and studied their interaction with Ni(II) and Cu(II) ions.

The peptides were synthesized on a Sieber amide resin, using Fmoc/t-Bu chemistry, the standard method for solid-phase peptide synthesis. The crude peptides were purified by gel filtration chromatography and semi-preparative high performance liquid chromatography on a reversed-phase support. The purity and identity was confirmed by means of ESI-MS and NMR. The interaction of the peptides with Ni(II) and Cu(II) ions was studied by means of

potentiometric titrations and several spectroscopic techniques (UV-Vis, CD, EPR, NMR). The ability of the peptide metal complexes in inducing DNA double-strand breaks was studied with agarose gel electrophoresis, using the plasmid pUC19 as a target molecule.

Due to the unexpected precipitation of the free ligand H2B₃₂₋₆₂ over pH 7,8, we were not able to calculate the ionization constants of the Lys and Tyr residues. Precipitation was obvious, in all samples containing Ni(II) ions, suggesting that their interaction is not efficient. However, the oxidative behaviour of the systems H2B₃₂₋₆₂/Ni(II)/H₂O₂ and Ni(II)/H₂O₂, concerning their ability in inducing DNA double strand breaks and plasmid degradation, is quite different. In the presence of the peptide H2B₃₂₋₆₂ in the reaction mixtures, a decrease in the plasmid degradation with a concomitant increase in the appearance of double strand breaks, was evident. These facts can be explained due to the high affinity of this peptide for plasmid DNA, that may function as a protective layer on the plasmid. The increased incidence of double strand breaks may be explained by further oxidation of the peptide's methionine sulfoxides to alkyl and peroxy-radicals. This proposal is in accordance with the fact that Ni(II) ions generate only single strand breaks.

The complexation of the H2B₃₂₋₆₂ peptide with Cu(II) ions is quite efficient. The precipitation that was observed in the free ligand solutions, was dissolved and several soluble Cu(II) complexes were detected in the pH range 4-10,5. At physiological pH, two major complexes are formed, where Cu(II) binds to the peptide in a 3N {N_{Im}, 2N⁻} mode. The only difference between them, is that in one of them, the carboxylate group of the Asp₂₀ binds in an axial position. Those complexes are redox active, since in their presence, degradation of the plasmid and increased incidence of double strand breaks was evident. The data presented in this thesis, suggest that binding of Cu(II) to this peptide sequence, might be involved in a carcinogenicity mechanism, arising from increased radical formation.

Complexation of the peptide model H2B₉₄₋₁₂₅ with Ni(II) ions starts at pH around 5, where a distorted octahedral complex is being formed. The formation of square planar complexes, starts at pH over 8, while complete consumption of free Ni(II) ions in solution is observed at pH 10. The formation of the square planar complex was further studied by means of NMR spectroscopy and a solution structure for the Ni(II) complex with the fragment –Glu₁₂-Leu₁₃-Ala₁₄-Lys₁₅-His₁₆-Ala₁₇-Val₁₈-Ser₁₉- was elucidated from the NOE cross-correlations, observed in the 2D-NOESY spectrum. Unfortunately, the lack of meaningful NOE's did not allow us to calculate the structure of the complex with the whole peptide sequence. However, there is evidence, that complexation affects the C-terminal of the peptide, as well, leading to a

structure where this fragment approaches the coordination plane. If such a structural alteration is able to occur under physiological conditions, it is highly possible to interfere with the ubiquitination process of Lys₁₂₀. Previous studies in cell cultures, have demonstrated that Ni(II) affects ubiquitination of this particular residue, but a mechanism for this process was not proposed. Our experimental data, allow us to propose a mechanism where ubiquitination is affected, due to a structural alteration, resulting from Ni(II) binding to His₂₀ of peptide H2B₉₄₋₁₂₅. Moreover, the fact that oxidative plasmid degradation is reduced upon addition of peptide H2B₉₄₋₁₂₅ in the reaction mixtures, points out to the proposal that if this fragment of histone H2B is related to the process of carcinogenesis, the mechanism involved, should be through an epigenetic alteration, rather than increased oxidative stress.

The peptide H2B₉₄₋₁₂₅ interacts efficiently with Cu(II) ions. Potentiometry detects the formation of several species in the pH range 4-11,5. At physiological pH the major species is a 3N complex where Cu(II) ions bind through a {N_{Im}, 2N⁻} mode. Contrary to the analogue Cu(II) complex of H2B₃₂₋₆₂, this species does not enhance plasmid degradation. Despite this, it is possible that its formation may induce the same structural alteration, observed for the 4N nickel complex, hence interfering with ubiquitination of Lys₁₂₀.

We believe that the data presented in this thesis will assist in a better understanding of the role of histone H2B in the mechanisms of metal induced toxicity and carcinogenesis.

Παράρτημα

Πίνακας 20. Χημικές μετατοπίσεις πυρήνων ^1H , ^{13}C και ^{15}N , πεπτιδίου H2B_{94-125} σε pH 2,5

Ile ₁	H _N	8,073	Arg ₆	H α	4,242	Leu ₉	N	124,054	
	H α	4,027		H β 2	1,722		Pro ₁₀	H α	4,266
	H β	1,747		H β 3	1,657			H β 2	2,231
	H γ 12	1,386		Q γ	1,541			H β 3	1,844
	H γ 13	1,116		Q δ	3,107			H γ 2	2,007
	Q γ 2	0,821		H ϵ	7,11			H γ 3	1,954
	Q δ 1	0,784		H _{H22}	7,036			H δ 2	3,759
	C α	58,864		H _{H21}	7,447			H δ 3	3,581
	C β	36,003		C α	53,24			C α	61,216
	C γ 1	24,572		C β	28,031			C β	29,041
	C γ 2	14,706		C γ	23,006			C γ	24,74
	C δ 1	10,17		C δ	40,547			C δ	47,739
	N	126,056		N	124,811		Gly ₁₁	H _N	8,447
	Gln ₂	H _N		8,464	N ϵ			124,536	H α 1
H α		4,339	N _{H2}	107,822	H α 2	3,851			
H β 2		2,038	Leu ₇	H _N	8,116	C α		42,74	
H β 3		1,906		H α	4,263	N	108,732		
Q γ		2,295		Q β	1,525	Glu ₁₂	H _N	7,969	
H ϵ 21		7,432		H γ	1,496		H α	4,227	
H ϵ 22		6,767		Q δ 1	0,83		H β 2	2,049	
C α		53,232		Q δ 2	0,776		H β 3	1,989	
C β		26,488		C α	52,28		Q γ	2,37	
C γ		30,997		C β	39,611		C α	53,474	
N		124,179		C γ	24,108		C β	26,161	
N ϵ 2		112,275		C δ 1	21,606		C γ	30,526	
Thr ₃		H _N		8,059	C δ 2	20,662		N	119,645
		H α		4,195	Leu ₈	N	123,811	Leu ₁₃	H _N
	H β	4,118		H _N		8,088	H α		4,213
	Q γ 2	1,115		H α		4,302	Q β		1,482
	C α	59,339	Q β	1,46		H γ	1,55		
	C β	67,159	H γ	1,521			Q δ 1	0,835	
	C γ 2	18,788	Q δ 1	0,813			Q δ 2	0,784	
	N	115,798	Q δ 2	0,746			C α	52,625	
	Ala ₄	H _N	8,198	C α		51,976		C β	39,611
		H α	4,247	C β		39,609		C γ	24,164
		Q β	1,271	C γ		24,265		C δ 1	22,073
		C α	49,704	C δ 1		22,073		C δ 2	20,686
		C β	16,314	C δ 2		20,668		N	122,301
		N	126,06	N		123,553	Ala ₁₄	H _N	8,203
Val ₅		H _N	7,998	Leu ₉		H _N		7,968	H α
		H α	3,937		H α	4,534		Q β	1,269
		H β	1,958		Q β	1,485		C α	49,782
		Q γ 1	0,865		H γ	1,58	C β	16,282	
		Q γ 2	0,834		Q δ 1	0,847		N	125,744
		C α	59,906		Q δ 2	0,827	Lys ₁₅	H _N	8,013
		C β	29,9		C α	50,27		H α	4,141
		C γ 1	17,974		C β	38,666		Q β	1,652
	C γ 2	18,317	C γ		24,257	H γ 2		1,345	
	N	119,716	C δ 1		22,388		H γ 3	1,269	
	Arg ₆	H _N	8,23		C δ 2	20,346		Q δ	1,573

Lys ₁₅	Qε	2,895	Thr ₂₂	H _N	8,006	Lys ₂₇	Ca	53,39
	Qz	7,454		Ha	4,237		Cβ	30,37
	Ca	53,594		Hβ	4,12		Cγ	21,763
	Cβ	30,215		Qγ2	1,103		Cδ	26,299
	Cγ	22,061		Ca	59,259		Cε	39,298
	Cδ	26,147		Cβ	67,008		N	123,95
	Cε	39,296		Cγ2	18,69	Tyr ₂₈	H _N	8,191
	N	123,858		N	114,137		Ha	4,561
His ₁₆	H _N	8,301	Lys ₂₃	H _N	8,235		Hβ2	2,98
	Ha	4,599		Ha	4,222		Hβ3	2,854
	Hβ2	3,182		Hβ2	1,767		Qδ	7,035
	Hβ3	3,088		Hβ3	1,659		Qε	6,733
	Hδ2	7,216		Qγ	1,359		Ca	55,111
	Hε1	8,535		Qδ	1,578		Cβ	36,118
	Ca	52,289		Qε	2,9		N	121,836
	Cβ	26,297		Ca	53,531	Thr ₂₉	H _N	7,984
Ala ₁₇	N	119,178		Cβ	30,154		Ha	4,253
	H _N	8,264		Cγ	21,916		Hβ	4,095
	Ha	4,265		Cδ	26,303		Qγ2	1,087
	Qβ	1,29		Cε	39,385		Ca	58,786
	Ca	49,779		N	123,671		Cβ	67,319
	Cβ	16,437	Ala ₂₄	H _N	8,202		Cγ2	18,627
	N	125,668		Ha	4,243		N	116,641
Val ₁₈	H _N	8,148		Qβ	1,279	Ser ₃₀	H _N	8,224
	Ha	4,067		Ca	49,632		Ha	4,393
	Hβ	2,003		Cβ	16,362		Hβ2	3,839
	Qγ	0,861		N	126,35		Hβ3	3,788
	Ca	59,505	Val ₂₅	H _N	8,111		Ca	55,421
	Cβ	30,204		Ha	4,071		Cβ	61,192
	Cγ1	18,318		Hβ	1,993		N	118,15
	Cγ2	17,668		Qγ	0,842	Ser ₃₁	H _N	8,312
Ala ₁₉	N	119,715		Ca	59,447		Ha	4,38
	H _N	8,31		Cβ	30,057		Qβ	3,78
	Ha	4,383		Cγ1	19,015		Ca	55,424
	Hβ2	3,826		Cγ2	18,313		Cβ	61,06
	Hβ3	3,767		N	120,043		N	118,134
	Ca	55,728	Thr ₂₆	H _N	8,152	Lys ₃₂	H _N	8,251
	Cβ	61,062		Ha	4,217		Ha	4,237
	N	119,315		Hβ	4,02		Hβ2	1,747
Glu ₂₀	H _N	8,393		Qγ2	1,022		Hβ3	1,664
	Ha	4,338		Ca	59,028		Qγ	1,334
	Hβ2	2,067		Cβ	67,168		Qδ	1,582
	Hβ3	1,903		Cγ2	18,632		Qε	2,902
	Qγ	2,39		N	119,018		Qz	7,427
	Ca	53,077	Lys ₂₇	H _N	8,207		Ca	53,37
	Cβ	26,301		Ha	4,197		Cβ	30,219
	Cγ	30,056		Qβ	1,594		Cγ	21,917
Gly ₂₁	N	122,769		Hγ2	1,212		Cδ	26,149
	H _N	8,353		Hγ3	1,177		Cε	39,476
	Qα	3,916		Qδ	1,538		N	124,027
	Ca	42,583		Qε	2,853			
	N	109,698		Qz	7,426			

Πίνακας 21. Χημικές μετατοπίσεις πυρήνων ^1H και ^{13}C , πεπτιδίου H2B_{94-125} σε pH 10,3

Ile ₁	Ha	4,035	Leu ₇	Qδ2	0,771		Qδ1	0,831
	Hβ	1,745		Ca	52,087		Qδ2	0,785
	Hγ12	1,39		Cβ	39,534		Ca	52,4
	Hγ13	1,116		Cγ	24,156		Cβ	39,518
	Qγ2	0,826		Cδ1	21,772		Cγ	24,153
	Qδ1	0,777		Cδ2	20,686		Cδ1	21,965
	Ca	58,677		Leu ₈	Ha	4,305	Cδ2	20,44
	Cβ	35,764		Qβ	1,444	Ala ₁₄	Ha	4,165
Gln ₂	Cγ1	24,469	Leu ₈	Hγ	1,538		Qβ	1,267
	Cγ2	14,426		Qδ1	0,799		Ca	49,89
	Cδ1	10,024		Qδ2	0,732		Cβ	15,998
	Ha	4,35		Ca	51,773	Lys ₁₅	Ha	4,121
	Hβ2	2,024		Cβ	39,521		Qβ	1,644
	Hβ3	1,913		Cγ	24,147		Hγ2	1,275
	Qγ	2,298		Cδ1	22,089		Hγ3	1,226
	Ca	53,025		Cδ2	20,423		Qδ	1,5
Thr ₃	Cβ	26,358	Leu ₉	Ha	4,534	His ₁₆	Qε	2,774
	Cγ	30,749		Qβ	1,506		Ca	53,815
	Ha	4,207		Hγ	1,617		Cβ	30,117
	Hβ	4,115		Qδ1	0,848		Cγ	21,64
	Qγ2	1,118		Qδ2	0,822		Cδ	27,631
	Ca	59,013		Ca	50,184		Cε	39,3
	Cβ	66,846		Cβ	38,28		Ha	4,501
	Cγ2	18,505		Cγ	24,15		Hβ2	3,033
Ala ₄	Ha	4,242	Pro ₁₀	Cδ1	22,259	Ala ₁₇	Hβ3	2,945
	Qβ	1,28		Cδ2	20,061		Hε1	7,591
	Ca	49,597		Ha	4,262		Hδ2	6,864
	Cβ	16,168		Hβ2	2,238		Ca	53,337
Val ₅	Ha	3,957		Hβ3	1,844		Cβ	28,387
	Hβ	1,954		Hγ2	2,027		Ha	4,263
	Qγ1	0,861		Hγ3	1,949		Qβ	1,29
	Qγ2	0,834		Hδ2	3,77		Ca	49,577
	Ca	59,613		Hδ3	3,589	Val ₁₈	Cβ	16,3
	Cβ	29,799		Ca	61,382		Ha	4,057
	Cγ1	17,589		Cβ	28,853		Hβ	2,019
	Cγ2	18,187		Cγ	24,741		Qγ1	0,881
Arg ₆	Ha	4,266	Gly ₁₁	Cδ	47,748		Qγ2	0,859
	Hβ2	1,704		Ha1	3,798	Ser ₁₉	Ca	59,604
	Hβ3	1,656		Ha2	3,775		Cβ	29,936
	Hγ2	1,512		Ca	42,668		Cγ1	19,472
	Hγ3	1,475	Glu ₁₂	Ha	4,222		Cγ2	17,56
	Qδ	3,096		Hβ2	2,004		Ha	4,367
	Ca	53,029		Hβ3	1,887		Hβ2	3,831
	Cβ	27,922		Qγ	2,189		Hβ3	3,784
Leu ₇	Cγ	27,399	Leu ₁₃	Ca	53,968	Glu ₂₀	Ca	55,831
	Cδ	40,474		Cβ	27,295		Cβ	61,788
	Ha	4,262		Cγ	33,268		Ha	4,171
	Qβ	1,525		Ha	4,207		Qβ	1,985
	Hγ	1,465		Qβ	1,544		Hγ2	2,127
	Qδ1	0,832		Hγ	1,503		Hγ3	2,2

Glu ₂₀	Cα	53,672	Lys ₂₇	Cδ	27,589
	Cβ	27,61		Cε	39,213
	Cγ	33,591	Tyr ₂₈	Hα	4,515
Gly ₂₁	Hα1	3,876		Hβ2	2,814
	Hα2	3,912		Hβ3	2,951
	Cα	42,356		Hε1	6,583
Thr ₂₂	Hα	4,235		Hε2	6,565
	Hβ	4,117		Hδ1	6,955
	Qγ2	1,1		Hδ2	6,935
	Cα	58,99		Cα	55,227
	Cβ	66,955		Cβ	35,763
	Cγ2	18,523	Thr ₂₉	Hα	4,257
Lys ₂₃	Hα	4,209		Hβ	4,08
	Hβ2	1,771		Qγ2	1,069
	Hβ3	1,65		Cα	58,807
	Hγ2	1,352		Cβ	67,149
	Hγ3	1,3		Cγ2	18,501
	Qδ	1,509	Ser ₃₀	Hα	4,391
	Qε	2,769		Hβ2	3,832
	Cα	53,336		Hβ3	3,787
	Cβ	30,117		Cα	55,522
	Cγ	21,957		Cβ	61,524
	Cδ	27,289	Ser ₃₁	Hα	4,403
	Cε	39,217		Qβ	3,78
Ala ₂₄	Hα	4,253		Cα	55,28
	Qβ	1,284		Cβ	61,57
	Cα	49,575	Lys ₃₂	Hα	4,231
	Cβ	16,306		Hβ2	1,753
Val ₂₅	Hα	4,085		Hβ3	1,659
	Hβ	2,014		Hγ2	1,362
	Qγ1	0,868		Hγ3	1,301
	Qγ2	0,849		Qδ	1,512
	Cα	59,448		Qε	2,77
	Cβ	29,799		Cα	53,351
	Cγ1	19,59		Cβ	30,118
	Cγ2	18,196		Cγ	21,945
Thr ₂₆	Hα	4,227		Cδ	27,298
	Hβ	4,122		Cε	39,297
	Qγ2	1,115			
	Cα	59,306			
	Cβ	66,834			
	Cγ2	18,503			
Lys ₂₇	Hα	4,17			
	Qβ	1,589			
	Qγ	1,144			
	Qγ	1,448			
	Qε	2,713			
	Cα	53,964			
	Cβ	30,117			
	Cγ	21,638			

Πίνακας 22. Χημικές μετατοπίσεις πυρήνων ^1H και ^{13}C , συμπλεγμένου με Ni(II) πεπτιδίου $\text{H}_2\text{B}_{94-125}$ σε pH 10,3

Ile ₁	Ha	4,029	Leu ₇	Cδ2	20,655	Leu ₁₃	Cδ2	21,433			
	Hβ	1,746		Leu ₈	Ha		4,329	Ala ₁₄	Ha	3,563	
	Hγ12	1,388			Qβ		1,371		Qβ	1,087	
	Hγ13	1,119			Hγ		1,353		Cα	59,987	
	Qγ2	0,822			Qδ		0,891		Cβ	16,727	
	Qδ1	0,778			Cα		52,909	Lys ₁₅	Ha	2,732	
	Cα	58,721			Cβ		39,589			Hβ2	1,821
	Cβ	35,944			Cγ		21,89			Hβ3	1,702
	Cγ1	24,5		Leu ₉	Ha		4,554			Hγ2	1,283
	Cγ2	14,636					Hβ2		1,571		Hγ3
Cδ1	10,104		Hβ3		1,465		Hδ2	1,469			
Gln ₂	Ha	4,347			Hγ	1,418		Hδ3	1,602		
	Hβ2	2,041			Qδ1	0,825		Qε	2,948		
	Hβ3	1,915		Qδ2	0,809		Cα	59,126			
	Qγ	2,29		Cα	49,94		Cγ	21,767			
	Cα	53,032		Cβ	38,488		Cδ	27,241			
	Cγ	30,99		Cγ	24,263		Cε	39,506			
	Thr ₃	Ha	4,204		Cδ1	22,382	His ₁₆	Ha	3,194		
		Hβ	4,114		Cδ2	20,187			Hβ2	2,827	
		Qγ2	1,114	Pro ₁₀	Ha	4,317			Hβ3	2,761	
		Cα	59,031			Hβ2		2,215		Hδ2	6,817
Cβ	66,882		Hβ3		1,856		Hε1	7,467			
Cγ2	18,622		Hγ2		2,008		Cα	56,428			
Ala ₄	Ha	4,259		Hγ3	1,955	Ala ₁₇	Cβ	29,832			
	Qβ	1,286		Hδ2	3,751			Ha	4,011		
	Cα	49,632		Hδ3	3,576			Qβ	1,229		
	Cβ	16,271		Cα	60,823			Cα	53,556		
Val ₅	Ha	3,948		Cβ	29,01	Val ₁₈	Cβ	19,883			
	Hβ	1,954		Cγ	25,037			Ha	3,838		
	Qγ	0,839		Cδ	47,754			Hβ	1,515		
	Cα	59,657	Gly ₁₁	Qα	3,887			Qγ	1,024		
	Cβ	29,898			Cα		42,429		Cα	61,26	
	Cγ1	17,682	Glu ₁₂	Ha	4,016			Cβ	27,099		
	Cγ2	18,307			Hβ2		1,832		Cγ1	18,641	
Arg ₆	Ha	4,264		Hβ3	1,763	Ser ₁₉	Cγ2	18,012			
	Hβ2	1,72		Hγ2	2,06			Ha	3,976		
	Hβ3	1,658		Hγ3	2,013			Hβ2	3,461		
	Qγ	1,503		Cα	53,431			Hβ3	3,583		
	Qδ	3,098		Cβ	27,859			Cα	59,628		
	Cα	52,92		Cγ	33,953		Cβ	62,668			
	Cβ	28,001	Leu ₁₃	Ha	4,261	Glu ₂₀	Ha	4,006			
	Cγ	27,078			Hβ2		1,551		Qβ	1,853	
	Cδ	40,396			Hβ3		1,471		Hγ2	2,086	
	Leu ₇	Ha		4,279			Hγ	1,995		Hγ3	2,024
Qβ		1,304			Qδ1		0,962		Cα	53,509	
Hγ		1,521		Qδ2	0,829		Cβ	24,922			
Qδ		0,768		Cα	53,171		Cγ	33,804			
Cα		51,806		Cβ	38,39	Gly ₂₁	Qα	3,853			
Cγ		23,012		Cγ	29,985			Cα	42,578		
Cδ1		21,775		Cδ1	22,239		Thr ₂₂	Ha	4,205		

Thr ₂₂	Hβ	3,988	Tyr ₂₈	Cβ	37,407
	Qγ2	1,005	Thr ₂₉	Hα	4,352
	Cα	59,152		Hβ	4,315
	Cβ	67,018		Qγ2	1,168
	Cγ2	18,619		Cα	59,514
Lys ₂₃	Hα	4,224		Cβ	66,7
	Qβ	1,667		Cγ2	18,938
	Qγ	1,337	Ser ₃₀	Hα	3,912
	Qδ	1,547		Qβ	3,758
	Qε	2,826		Cα	55,841
	Cα	53,394		Cβ	60,924
	Cβ	30,21	Ser ₃₁	Hα	3,704
	Cγ	21,911		Qβ	3,651
	Cδ	26,918		Cα	60,922
	Cε	39,297		Cβ	66,54
Ala ₂₄	Hα	4,331	Lys ₃₂	Hα	4,111
	Qβ	1,367		Qβ	1,633
	Cα	49,478		Qγ	1,364
	Cβ	16,58		Qδ	1,524
Val ₂₅	Hα	4,115		Qε	2,966
	Hβ	2,096		Cα	59,493
	Qγ	0,856		Cβ	30,058
	Cα	59,508		Cγ	24,548
	Cβ	29,758		Cδ	27,071
	Cγ1	19,865			
	Cγ2	18,308			
Thr ₂₆	Hα	4,21			
	Hβ	4,005			
	Qγ2	1,01			
	Cα	59,056			
	Cβ	67,145			
	Cγ2	18,701			
Lys ₂₇	Hα	3,565			
	Qβ	2,231			
	Hγ2	1,567			
	Hγ3	1,441			
	Qδ	1,832			
	Qε	2,865			
	Cα	58,557			
	Cβ	33,382			
	Cγ	24,254			
	Cδ	25,01			
	Cε	39,291			
Tyr ₂₈	Hα	4,831			
	Hβ2	3,84			
	Hβ3	3,263			
	Hδ1	7,106			
	Hδ2	7,096			
	Qε	6,618			
	Cα	54,69			

Πίνακας 23. Χημικές μετατοπίσεις πυρήνων ^1H και ^{13}C , πεπτιδίου H2B_{32-62} σε pH 8,6

Ser ₁	Ha	4,342	Val ₈	Qγ2	0,753	Leu ₁₄	Hγ	1,342
	Hβ2	3,874		Qγ1	0,793		Qδ1	0,764
	Hβ3	3,745		Cα	59,841		Qδ2	0,822
	Cα	55,614		Cβ	29,943		Cα	52,323
Arg ₂	Ha	4,296	Tyr ₉	Cγ1	17,704	Lys ₁₅	Cβ	39,732
	Hβ2	1,787		Cγ2	18,337		Cδ1	20,791
	Hβ3	1,683		Ha	4,43		Cδ2	22,079
	Hγ2	1,549		Qβ	2,819		Ha	4,179
Lys ₃	Hγ3	1,506	Val ₁₀	Qε	6,68	Gln ₁₆	Qβ	1,638
	Qδ	3,105		Hδ1	6,945		Hγ2	1,283
	Cα	53,335		Hδ2	6,931		Hγ3	1,216
	Cβ	28,066		Cα	55,5		Qδ	1,547
Glu ₄	Cγ	24,22	Tyr ₁₁	Cβ	36,11	Val ₁₇	Qε	2,864
	Cδ	40,55		Ha	3,868		Cα	53,946
	Ha	4,213		Hβ	1,81		Cβ	30,318
	Hβ2	1,725		Qγ1	0,746		Cγ	22,02
Ser ₅	Hβ3	1,651	Lys ₁₂	Qγ2	0,712	His ₁₈	Cδ	26,587
	Qγ	1,264		Cα	59,598		Cε	39,362
	Qδ	1,587		Cβ	30,179		Ha	4,244
	Qε	2,884		Cγ1	17,891		Hβ2	1,911
Tyr ₆	Cα	53,897	Val ₁₃	Cγ2	18,217	Pro ₁₉	Hβ3	1,856
	Cβ	30,24		Ha	4,537		Qγ	2,198
	Cγ	21,946		Hβ2	2,975		Cα	52,956
	Cδ	26,469		Hβ3	2,894		Cβ	26,9
Ser ₇	Cε	39,413	Leu ₁₄	Qε	6,715	Asp ₂₀	Cγ	31,064
	Ha	4,206		Hδ1	7,026		Ha	3,995
	Hβ2	1,895		Hδ2	7,011		Hβ	1,896
	Hβ3	1,806		Cα	55,265		Qγ	0,767
Val ₈	Qγ	2,167	Val ₁₃	Cβ	36,051	Asp ₂₀	Cα	59,497
	Cα	53,39		Ha	4,196		Cβ	30,194
	Cβ	27,453		Qβ	1,718		Cγ1	17,587
	Cγ	33,397		Qγ	1,33		Cγ2	18,208
Val ₈	Ha	4,335	Val ₁₃	Qδ	1,587	Asp ₂₀	Ha	4,785
	Hβ2	3,874		Qε	2,899		Hβ2	3,001
	Hβ3	3,696		Cα	53,813		Hβ3	2,904
	Cα	55,73		Cβ	30,273		Hε1	7,612
Val ₈	Ha	4,394	Val ₁₃	Cγ	22,025	Asp ₂₀	Hδ1	6,919
	Hβ2	2,905		Cδ	26,394		Cβ	28,406
	Hβ3	2,859		Cε	39,332		Ha	4,33
	Hδ1	7,046		Ha	3,926		Qβ	2,193
Val ₈	Hδ2	7,032	Val ₁₃	Hβ	1,915	Asp ₂₀	Qγ	1,881
	Qε	6,729		Qγ1	0,835		Hδ2	3,677
	Cα	55,371		Qγ2	0,818		Hδ3	3,34
	Cβ	36,044		Cα	59,753		Cα	60,767
Val ₈	Ha	4,324	Val ₁₃	Cβ	30,01	Asp ₂₀	Cβ	30,954
	Hβ2	3,78		Cγ1	18,069		Cγ	24,589
	Hβ3	3,727		Cγ2	18,374		Ha	4,618
	Cα	55,689		Ha	4,264		Hβ2	2,686
Val ₈	Ha	3,975	Val ₁₃	Hβ2	1,537	Asp ₂₀	Hβ3	2,596
	Hβ	1,927		Hβ3	1,488		Cβ	36,58

Thr ₂₁	Hα	4,242	Gly ₂₉	Hα2	4,074
	Hβ	4,19	Ile ₃₀	Hα	4,124
	Qγ2	1,139		Hβ	1,806
	Cα	59,562		Hγ12	1,354
	Cβ	67,202		Hγ13	1,13
	Cγ2	18,84		Qγ2	0,832
Gly ₂₂	Hα1	4,137		Qδ1	0,807
	Hα2	4,088		Cα	58,752
Ile ₂₃	Hα	4,117		Cβ	35,98
	Hβ	1,797		Cγ1	24,471
	Hγ12	1,369		Cγ2	14,81
	Hγ13	1,111		Cδ1	10,179
	Qγ2	0,819	Met ₃₁	Hα	4,397
	Qδ1	0,773		Hβ2	2,04
	Cα	58,654		Hβ3	1,945
	Cβ	36,072		Hγ2	2,558
	Cγ1	24,511		Hγ3	2,453
	Cγ2	14,709		Cα	52,445
	Cδ1	10,194		Cβ	30,107
Ser ₂₄	Hα	4,366		Cγ	29,362
	Hβ2	3,832			
	Hβ3	3,787			
	Cα	55,89			
Ser ₂₅	Hα	4,382			
	Hβ2	3,856			
	Hβ3	3,797			
	Cα	55,935			
Lys ₂₆	Hα	4,168			
	Hβ2	1,734			
	Hβ3	1,643			
	Qγ	1,261			
	Qδ	1,549			
	Qε	2,874			
	Cα	53,501			
	Cβ	30,271			
	Cγ	21,973			
	Cδ	26,518			
	Cε	39,346			
Ala ₂₇	Hα	4,025			
	Qβ	1,241			
	Cβ	20,09			
Met ₂₈	Hα	4,35			
	Hβ2	2,01			
	Hβ3	1,888			
	Hγ2	2,547			
	Hγ3	2,473			
	Cα	53,134			
	Cβ	30,26			
	Cγ	29,343			
Gly ₂₉	Hα1	4,095			

Βιβλιογραφία

1. Elgin, S. C. R., and Workman, J. L. (2000) *Chromatin Structure and Gene Expression*, 2nd ed., Oxford University Press, New York.
2. Johns, E. W. (1967) The electrophoresis of histones in polyacrylamide gel and their quantitative determination, *The Biochemical journal* 104, 78-82.
3. Shaw, B. R., Herman, T. M., Kovacic, R. T., Beaudreau, G. S., and Van Holde, K. E. (1976) Analysis of subunit organization in chicken erythrocyte chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 505-509.
4. Noll, M., and Kornberg, R. D. (1977) Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1, *Journal of molecular biology* 109, 393-404.
5. Finch, J. T., Lutter, L. C., Rhodes, D., Brown, R. S., Rushton, B., Levitt, M., and Klug, A. (1977) Structure of nucleosome core particles of chromatin, *Nature* 269, 29-36.
6. Kim, U. J., Han, M., Kayne, P., and Grunstein, M. (1988) Effects of histone H4 depletion on the cell cycle and transcription of *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.* 7, 2211-2219.
7. Hayashi, K., Hofstaetter, T., and Yakuwa, N. (1978) Asymmetry of chromatin subunits probed with histone H1 in an H1-DNA complex, *Biochemistry* 17, 1880-1883.
8. Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3,1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 10148-10152.
9. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution, *Nature* 389, 251-260.
10. Kornberg, R. D., and Thomas, J. O. (1974) Chromatin structure; oligomers of the histones, *Science (New York, N.Y)* 184, 865-868.
11. Allan, J., Hartman, P. G., Crane-Robinson, C., and Aviles, F. X. (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin, *Nature* 288, 675-679.
12. Moggs, J. G., and Almouzni, G. (1999) Chromatin rearrangements during nucleotide excision repair, *Biochimie* 81, 45-52.
13. Smith, P. A., Jackson, V., and Chalkley, R. (1984) Two-stage maturation process for newly replicated chromatin, *Biochemistry* 23, 1576-1581.
14. Hansen, J. C., Van Holde, K. E., and Lohr, D. (1991) The mechanism of nucleosome assembly onto oligomers of the sea urchin 5 S DNA positioning sequence, *J. Biol. Chem.* 266, 4276-4282.
15. Ruiz-Carrillo, A., Jorcano, J. L., Eder, G., and Lurz, R. (1979) In vitro core particle and nucleosome assembly at physiological ionic strength, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3284-3288.
16. Worcel, A., Han, S., and Wong, M. L. (1978) Assembly of newly replicated chromatin, *Cell* 15, 969-977.
17. Wu, M., Allis, C. D., Richman, R., Cook, R. G., and Gorovsky, M. A. (1986) An intervening sequence in an unusual histone H1 gene of *Tetrahymena thermophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8674-8678.
18. Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function, *Cell* 128, 693-705.

19. Shukla, V., Vaissiere, T., and Herceg, Z. (2008) Histone acetylation and chromatin signature in stem cell identity and cancer, *Mutat. Res.* 637, 1-15.
20. Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M. J., Davie, J. R., and Peterson, C. L. (2006) Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions, *Science (New York, N.Y)* 311, 844-847.
21. Vaquero, A., Scher, M. B., Lee, D. H., Sutton, A., Cheng, H.-L., Alt, F. W., Serrano, L., Sternglanz, R., and Reinberg, D. (2006) SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis, *Genes Dev.* 20, 1256-1261.
22. Sterner, D. E., and Berger, S. L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 435-459.
23. Xu, F., Zhang, K., and Grunstein, M. (2005) Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast, *Cell* 121, 375-385.
24. Maas, N. L., Miller, K. M., DeFazio, L. G., and Toczyski, D. P. (2006) Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4, *Mol. Cell* 23, 109-119.
25. Celic, I., Masumoto, H., Griffith, W. P., Meluh, P., Cotter, R. J., Boeke, J. D., and Verreault, A. (2006) The sirtuins Hst3 and Hst4p preserve genome integrity by controlling histone H3 lysine 56 deacetylation, *Curr. Biol.* 16, 1280-1289.
26. Doyon, Y., Cayrou, C., Ullah, M., Landry, A.-J., Cote, V., Selleck, W., Lane, W. S., Tan, S., Yang, X.-J., and Cote, J. (2006) ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation, *Mol. Cell* 21, 51-64.
27. Kouzarides, T. (2002) Histone methylation in transcriptional control, *Curr Opin Genet Dev* 12, 198-209.
28. Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000) The language of covalent histone modifications, *Nature* 403, 41-45.
29. Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001) *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*, Vol. 15.
30. Berger, S. L. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 142-148.
31. Zhang, L., Eugeni, E. E., Parthun, M. R., and Freitas, M. A. (2003) Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting, *Chromosoma* 112, 77-86.
32. Zhang, K., Tang, H., Huang, L., Blankenship James, W., Jones Patrick, R., Xiang, F., Yau Peter, M., and Burlingame Alma, L. (2002) Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 306, 259-269.
33. Zhang, X., Tamaru, H., Khan Seema, I., Horton John, R., Keefe Lisa, J., Selker Eric, U., and Cheng, X. (2002) Structure of the Neurospora SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase, *Cell* 111, 117-127.
34. Wilson, J. R., Jing, C., Walker, P. A., Martin, S. R., Howell, S. A., Blackburn, G. M., Gamblin, S. J., and Xiao, B. (2002) Crystal structure and functional analysis of the histone methyltransferase SET7/9, *Cell* 111, 105-115.
35. Trievel, R. C., Beach, B. M., Dirk, L. M. A., Houtz, R. L., and Hurley, J. H. (2002) Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase, *Cell* 111, 91-103.

36. Zhang, X., Yang, Z., Khan, S. I., Horton, J. R., Tamaru, H., Selker, E. U., and Cheng, X. (2003) Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases, *Mol. Cell* 12, 177-185.
37. Xiao, B., Jing, C., Wilson, J. R., Walker, P. A., Vasisht, N., Kelly, G., Howell, S., Taylor, I. A., Blackburn, G. M., and Gamblin, S. J. (2003) Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9, *Nature* 421, 652-656.
38. Min, J., Zhang, X., Cheng, X., Grewal, S. I. S., and Xu, R.-M. (2002) Structure of the SET domain histone lysine methyltransferase Ctr4, *Nat. Struct. Biol.* 9, 828-832.
39. Kwon, T., Chang, J. H., Kwak, E., Lee, C. W., Joachimiak, A., Kim, Y. C., Lee, J., and Cho, Y. (2003) Mechanism of histone lysine methyl transfer revealed by the structure of SET7/9-AdoMet, *EMBO J.* 22, 292-303.
40. Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2005) Reversing histone methylation, *Nature* 436, 1103-1106.
41. Lee, D. Y., Teyssier, C., Strahl, B. D., and Stallcup, M. R. (2005) Role of protein methylation in regulation of transcription, *Endocr. Rev.* 26, 147-170.
42. Gary, J. D., and Clarke, S. (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61, 65-131.
43. McBride, A. E., and Silver, P. A. (2001) State of the arg: protein methylation at arginine comes of age, *Cell* 106, 5-8.
44. Cuthbert Graeme, L., Daujat, S., Snowden Andrew, W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory Philip, D., Tempst, P., Bannister Andrew, J., and Kouzarides, T. (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation, *Cell* 118, 545-553.
45. Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.-Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006) Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage, *Mol. Cell* 22, 383-394.
46. Zhu, B., Zheng, Y., Pham, A.-D., Mandal, S. S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2005) Monoubiquitination of human histone H2B: The factors involved and their Roles in HOX gene regulation, *Mol. Cell* 20, 601-611.
47. Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D. E., Bylebyl, G. R., Dokmanovic, M., Dorsey, J. A., Whelan, K. A., Krsmanovic, M., Lane, W. S., Meluh, P. B., Johnson, E. S., and Berger, S. L. (2006) Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications, *Genes Dev.* 20, 966-976.
48. Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H., and Allis, C. D. (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation, *Nature* 438, 1116-1122.
49. Dai, J., Sultan, S., Taylor, S. S., and Higgins, J. M. G. (2005) The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment, *Genes Dev.* 19, 472-488.
50. Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W. L., Dorsey, J., Schindler, K., Winter, E., Allis, C. D., Guacci, V., Khochbin, S., Fuller, M. T., and Berger, S. L. (2006) Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis, *Genes Dev.* 20, 2580-2592.
51. Ahn, S.-H., Cheung, W. L., Hsu, J.-Y., Diaz, R. L., Smith, M. M., and Allis, C. D. (2005) Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*, *Cell* 120, 25-36.

52. Cheung, W. L., Turner, F. B., Krishnamoorthy, T., Wolner, B., Ahn, S.-H., Foley, M., Dorsey, J. A., Peterson, C. L., Berger, S. L., and Allis, C. D. (2005) Phosphorylation of Histone H4 Serine 1 during DNA Damage Requires Casein Kinase II in *S. cerevisiae*, *Curr. Biol.* 15, 656-660.
53. Downs, J. A., Lowndes, N. F., and Jackson, S. P. (2000) A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair, *Nature* 408, 1001-1004.
54. Macdonald, N., Welburn, J. P. I., Noble, M. E. M., Nguyen, A., Yaffe, M. B., Clynes, D., Moggs, J. G., Orphanides, G., Thomson, S., Edmunds, J. W., Clayton, A. L., Endicott, J. A., and Mahadevan, L. C. (2005) Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone H3 by 14-3-3, *Mol. Cell* 20, 199-211.
55. Nelson, C. J., Santos-Rosa, H., and Kouzarides, T. (2006) Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression, *Cell* 126, 905-916.
56. Chen, H., Ke, Q., Kluz, T., Yan, Y., and Costa, M. (2006) Nickel ions increase histone H3 lysine 9 dimethylation and induce transgene silencing, *Mol. Cell. Biol.* 26, 3728-3737.
57. Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M., and Hottiger, M. O. (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?, *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 789-829.
58. Ju, B. G., Lunyak, V. V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2006) A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription, *Science (New York, N.Y.)* 312, 1798-1802.
59. Sun, Z.-W., and Allis, C. D. (2002) Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast, *Nature* 418, 104-108.
60. Anke, M., Groppel, B., Kronemann, H., and Gruen, M. (1984) Nickel - an essential element, *IARC Scientific Publications* 53, 339-365.
61. Uthus, E. O., and Poellot, R. A. (1996) Dietary folate affects the response of rats to nickel deprivation, *Biol Trace Elem Res* 52, 23-35.
62. Mulrooney, S. B., and Hausinger, R. P. (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms, *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 239-261.
63. Hausinger, R. P. (1993) *Biochemistry of Nickel*, Plenum Press, New York.
64. Zonia, L. E., Stebbins, N. E., and Polacco, J. C. (1995) Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds, *Plant Physiol.* 107, 1097-1103.
65. Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G. E., Olivera-Severo, D., and Carlini, C. R. (2004) Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases. Biological effects unrelated to ureolytic activity, *Eur. J. Biochem.* 271, 1357-1363.
66. Mobley, H. L., and Hausinger, R. P. (1989) Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiol. Rev.* 53, 85-108.
67. Mobley, H. L. T., Island, M. D., and Hausinger, R. P. (1995) Molecular biology of microbial ureases, *Microbiol. Rev.* 59, 451-480.
68. Montecucco, C., and Rappuoli, R. (2001) Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 457-466.
69. Jabri, E., Carr, M. B., Hausinger, R. P., and Karplus, P. A. (1995) The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*, *Science (New York, N.Y.)* 268, 998-1004.
70. Vignais, P. M., and Colbeau, A. (2004) Molecular biology of microbial hydrogenases, *Curr Issues Mol Biol* 6, 159-188.
71. Volbeda, A., Charon, M. H., Piras, C., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *Nature* 373, 580-587.

72. Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Volbeda, A., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1999) The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center, *Structure (London)* 7, 557-566.
73. Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., de Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Frey, M., and Fontecilla-Camps, J. C. (1996) Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: Evidence for biologically uncommon Fe ligands, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 12989-12996.
74. Wuerges, J., Lee, J.-W., Yim, Y.-I., Yim, H.-S., Kang, S.-O., and Carugo, K. D. (2004) Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8569-8574.
75. Barondeau David, P., Kassmann Carey, J., Bruns Cami, K., Tainer John, A., and Getzoff Elizabeth, D. (2004) Nickel superoxide dismutase structure and mechanism, *Biochemistry* 43, 8038-8047.
76. Hart, E. B., Steenbock, H., Waddell, J., and Elvehjem, C. A. (1928) Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat, *J. Biol. Chem.* 77, 797-812.
77. Gambling, L., and McArdle, H. J. (2004) Iron, copper and fetal development, *Proc Nutr Soc* 63, 553-562.
78. Linder, M. C., and Hazegh-Azam, M. (1996) Copper biochemistry and molecular biology, *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 797S-811S.
79. Kuo, Y. M., Zhou, B., Cosco, D., and Gitschier, J. (2001) The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6836-6841.
80. Linder, M. (1991) *The Biochemistry of copper*, Plenum, New York.
81. Miura, T., Muraoka, S., and Ogiso, T. (1993) Adriamycin-induced lipid peroxidation of erythrocyte membranes in the presence of ferritin and the inhibitory effect of ceruloplasmin, *Biol. Pharm. Bull.* 16, 664-667.
82. (2007) *Nickel and its surprising impact in nature*, Vol. 2, Astrid Sigel, Helmut Sigel, Roland K. O. Sigel ed., Wiley, Chichester.
83. Morgan, L. G., and Usher, V. (1994) Health problems associated with nickel refining and use, *Ann Occup Hyg* 38, 189-198.
84. Doll, R., Morgan, L. G., and Speizer, F. E. (1970) Cancers of the lung and nasal sinuses in nickel workers, *Br. J. Cancer* 24, 623-632.
85. Antonini, J., Taylor, M., Zimmer, A., and Roberts, J. (2004) Pulmonary Responses to Welding Fumes: Role of Metal Constituents, *J Toxicol Environ Health, Part A* 67, 233-249.
86. Kasprzak, K. S., Sunderman, F. W., and Salnikow, K. (2003) Nickel carcinogenesis, *Mutat. Res.* 533, 67-97.
87. Biedermann, K. A., and Landolph, J. R. (1987) Induction of anchorage independence in human diploid foreskin fibroblasts by carcinogenic metal salts, *Cancer Res.* 47, 3815-3823.
88. Patierno, S. R., Dirscherl, L. A., and Xu, J. (1993) Transformation of rat tracheal epithelial cells to immortal growth variants by particulate and soluble nickel compounds, *Mutat. Res.* 300, 179-193.
89. Tveito, G., Hansteen, I. L., Dalen, H., and Haugen, A. (1989) immortalization of normal human kidney epithelial cells by nickel(II), *Cancer Res.* 49, 1829-1835.
90. Rani, A. S., Qu, D. Q., Sidhu, M. K., Panagakos, F., Shah, V., Klein, K. M., Brown, N., Pathak, S., and Kumar, S. (1993) Transformation of immortal, non-tumorigenic

- osteoblast-like human osteosarcoma cells to the tumorigenic phenotype by nickel sulfate, *Carcinogenesis* 14, 947-953.
91. IARC (1990) *Monographs on the Evaluation and Carcinogenic Risks to Humans. Chromium, Nickel and Welding*, Vol. 49, Lyon.
92. Oller, A. R., Costa, M., and Oberdorster, G. (1997) Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143, 152-166.
93. Seilkop, S. K., and Oller, A. R. (2003) Respiratory cancer risks associated with low-level nickel exposure: an integrated assessment based on animal, epidemiological, and mechanistic data, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 37, 173-190.
94. Fuchtjohann, L., Jakubowski, N., Glatke, D., Barnowski, C., Klockow, D., and Broekaert, J. A. C. (2000) Determination of soluble and insoluble nickel compounds in airborne particulate matter by graphite furnace atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 366, 142-145.
95. Roels, H., Van de Voorde, R., Vargas, V. M., and Lauwerys, R. (1993) Relationship between atmospheric and urinary nickel in workers manufacturing electrical resistances using nickel oxide: role of the bioavailability of nickel, *Occup Med (Lond)* 43, 95-104.
96. Ebdon, L. (2001) *Trace element speciation for environment, food and health*, Royal Society of Chemistry.
97. Denkhaus, E., and Salnikow, K. (2002) Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity, *Crit Rev Oncol Hematol* 42, 35-56.
98. Coogan, T. P., Latta, D. M., Snow, E. T., and Costa, M. (1989) Toxicity and carcinogenicity of nickel compounds, *Crit. Rev. Toxicol.* 19, 341-384.
99. Tossavainen, A., Nurminen, M., Mutanen, P., and Tola, S. (1980) Application of mathematical modelling for assessing the biological half-times of chromium and nickel in field studies, *Br J Ind Med* 37, 285-291.
100. F.W. Sunderman, J. (1992) *Nickel and Human Health: Current Perspectives*, John Wiley & Sons, New York.
101. Oskarsson, A., and Tjalve, H. (1979) An autoradiographic study on the distribution of nickel-63 dichloride in mice, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 9, 47-59.
102. Oskarsson, A., and Tjalve, H. (1979) Binding of ⁶³Ni by cellular constituents in some tissues of mice after the administration of ⁶³NiCl₂ and ⁶³Ni(CO)₄, *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 45, 306-314.
103. Oskarsson, A., and Tjaelve, H. (1979) The distribution and metabolism of nickel carbonyl in mice, *Br J Ind Med* 36, 326-335.
104. F.W. Sunderman, J., F. Coulston, G.L. Eichhorn, J.A. Fellows, E. Mastromatteo, H.T. Reno, M.H. Samitz, B.A. Curtis, B.L. Vallee, P.W. West, J.C. McEwan, S.I. Shibko, and T.D. Boaz, Jr. (1975) Nickel, p 277, National Academy of Sciences, Washington.
105. Sunderman, F. W., Jr., and Selin, C. E. (1968) The metabolism of nickel-63 carbonyl, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 12, 207-218.
106. Kasprzak, K. S., and Sunderman, F. W., Jr. (1969) The metabolism of nickel carbonyl-¹⁴C, *Toxicology and applied pharmacology* 15, 295-303.
107. E. Nieboer, W. E. S., and B.C. Stace (1992) *Nickel and Human Health: Current Perspectives*, John Wiley & Sons, Inc., New York.
108. Sunderman, F. W., Jr., Costa, E. R., Fraser, C., Hui, G., Levine, J. J., and Tse, T. P. H. (1981) Nickel-63 constituents in renal cytosol of rats after injection of nickel-63 chloride, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 11, 488-496.

109. Raithel, H. J., and Schaller, K. H. (1981) Toxicity and carcinogenicity of nickel and its compounds. A review of the current status, *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* 173, 63-91.
110. Sunderman, F. W., Jr., Dingle, B., Hopfer, S. M., and Swift, T. (1988) Acute nickel toxicity in electroplating workers who accidentally ingested a solution of nickel sulfate and nickel chloride, *Am J Ind Med* 14, 257-266.
111. Daldrup, T., Haarhoff, K., and Szathmary, S. C. (1983) Fatal nickel sulfate poisoning, pp 141-144, Austria.
112. Kincaid, J. F., Stanley, E. L., Beckworth, C. H., and Sunderman, F. W. (1956) Nickel poisoning. III. Procedures for detection, prevention, and treatment of nickel carbonyl exposure including a method for the determination of nickel in biologic materials, *Am. J. Clin. Pathol.* 26, 107-119.
113. Barceloux, D. G. (1999) Nickel, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37, 239-258.
114. Bencko, V. (1983) Nickel: a review of its occupational and environmental toxicology, *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 27, 237-247.
115. F.W. Sunderman, J. (1988) *Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*, Marcel Dekker, New York.
116. Berge, S. R., and Skyberg, K. (2003) Radiographic evidence of pulmonary fibrosis and possible etiologic factors at a nickel refinery in Norway, *J Environ Monit* 5, 681-688.
117. Sunderman, F. W., Jr. (2001) Nasal toxicity, carcinogenicity, and olfactory uptake of metals, *Ann Clin Lab Sci* 31, 3-24.
118. Malo, J. L., Cartier, A., Doepner, M., Nieboer, E., Evans, S., and Dolovich, J. (1982) Occupational asthma caused by nickel sulfate, pp 55-59, United States.
119. Ruegger, M. (1995) Lung disorders due to metals, *Schweiz Med Wochenschr* 125, 467-474.
120. Toyoshima, M., Sato, A., Taniguchi, M., Imokawa, S., Nakazawa, K., Hayakawa, H., and Chida, K. (1994) A case of eosinophilic pneumonia caused by inhalation of nickel dusts, pp 480-484, Department of Respiratory Medicine, Fujieda Shida Municipal Hospital, Fijieda, Japan, Japan.
121. Sunderman, F. W., Jr. (1989) Carcinogenicity of metal alloys in orthopedic prostheses: clinical and experimental studies, *Fundam Appl Toxicol* 13, 205-216.
122. Genelhu Marisa Cristina Leite, S., Marigo, M., Alves-Oliveira Lucia, F., Malaquias Luiz Cosme, C., and Gomez Ricardo, S. (2005) Characterization of nickel-induced allergic contact stomatitis associated with fixed orthodontic appliances, *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 128, 378-381.
123. Garner Lisa, A. (2004) Contact dermatitis to metals, *Dermatol Ther* 17, 321-327.
124. Luo, J., and Bercovitch, L. (2008) Cellphone contact dermatitis with nickel allergy, *Cmaj* 178, 23-24.
125. Kalimo, K., Lammintausta, K., Maki, J., Teuho, J., and Jansen, C. T. (1985) Nickel penetration in allergic individuals: bioavailability versus X-ray microanalysis detection, *Contact Dermatitis* 12, 255-257.
126. Molinari, J. A. (1998) Allergic reactions: increasing immunological problems for health care providers and patients, *Journal of the California Dental Association* 26, 273-279.
127. Grimsrud Tom, K., Berge Steinar, R., Martinsen Jan, I., and Andersen, A. (2003) Lung cancer incidence among Norwegian nickel-refinery workers 1953-2000, *J Environ Monit* 5, 190-197.

128. Nishioka, H. (1975) Mutagenic activities of metal compounds in bacteria, *Mutat. Res.* 31, 185-189.
129. Miyaki, M., Akamatsu, N., Ono, T., and Koyama, H. (1979) Mutagenicity of metal cations in cultured cells from Chinese hamster, *Mutat. Res.* 68, 259-263.
130. Tso, W. W., and Fung, W. P. (1981) Mutagenicity of metallic cations, *Toxicol. Lett.* 8, 195-200.
131. Biggart, N. W., and Costa, M. (1986) Assessment of the uptake and mutagenicity of nickel chloride in salmonella tester strains, *Mutat. Res.* 175, 209-215.
132. Sen, P., Conway, K., and Costa, M. (1987) Comparison of the localization of chromosome damage induced by calcium chromate and nickel compounds, *Cancer Res.* 47, 2142-2147.
133. Sen, P., and Costa, M. (1985) Induction of chromosomal damage in Chinese hamster ovary cells by soluble and particulate nickel compounds: preferential fragmentation of the heterochromatic long arm of the X-chromosome by carcinogenic crystalline NiS particles, *Cancer Res.* 45, 2320-2325.
134. Sahu, R. K., Katsifis, S. P., Kinney, P. L., and Christie, N. T. (1989) Effects of nickel sulfate, lead sulfate, and sodium arsenite alone and with UV light on sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes, *Molecular toxicology* 2, 129-136.
135. Ikbal, M., Atasoy, M., Pirim, I., Aliagaoglu, C., Karatay, S., and Erdem, T. (2006) The alteration of sister chromatid exchange frequencies in Behcet's disease with and without HLA-B51, *J Eur Acad Dermatol Venereol* 20, 149-152.
136. Jaenisch, R., and Bird, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nat. Genet.* 33 Suppl, 245-254.
137. Lande-Diner, L., Zhang, J., Hashimshony, T., Goren, A., Keshet, I., and Cedar, H. (2004) Gene repression paradigms in animal cells, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 69, 131-138.
138. Lee, Y. W., Klein, C. B., Kargacin, B., Salnikow, K., Kitahara, J., Dowjat, K., Zhitkovich, A., Christie, N. T., and Costa, M. (1995) Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: A new model for epigenetic carcinogens, *Mol. Cell. Biol.* 15, 2547-2557.
139. Govindarajan, B., Klafter, R., Miller Mark, S., Mansur, C., Mizesko, M., Bai, X., LaMontagne, K., Jr., and Arbiser Jack, L. (2002) Reactive oxygen-induced carcinogenesis causes hypermethylation of p16(Ink4a) and activation of MAP kinase, *Mol Med* 8, 1-8.
140. Broday, L., Peng, W., Kuo, M. H., Salnikow, K., Zoroddu, M., and Costa, M. (2000) Nickel compounds are novel inhibitors of histone H4 acetylation, *Cancer Res.* 60, 238-241.
141. Golebiowski, F., and Kasprzak, K. S. (2005) Inhibition of core histones acetylation by carcinogenic nickel(II), *Mol. Cell. Biochem.* 279, 133-139.
142. Zoroddu, M. A., Schinocca, L., Kowalik-Jankowska, T., Kozlowski, H., Salnikow, K., and Costa, M. (2002) Molecular mechanisms in nickel carcinogenesis: modeling Ni(II) binding site in histone H4, *Environ. Health Perspect.* 110, 719-723.
143. Zoroddu, M. A., Peana, M., and Medici, S. (2007) Multidimensional NMR spectroscopy for the study of histone H4-Ni(II) interaction, *Dalton Trans*, 379-384.
144. Jaffe, L. F. (2005) A calcium-based theory of carcinogenesis, *Adv. Cancer Res.* 94, 231-263.
145. Rosen, L. B., Ginty, D. D., and Greenberg, M. E. (1995) Calcium regulation of gene expression, *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 30, 225-253.

146. Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003) Calcium: Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 552-565.
147. Funakoshi, T., Kuromatsu, K., and Kojima, S. (1996) Effect of nickel on enzymatic activities in the mouse pancreas, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 92, 245-252.
148. Zamponi, G. W., Bourinet, E., and Snutch, T. P. (1996) Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites, *J. Membr. Biol.* 151, 77-90.
149. Salnikow, K., Kluz, T., and Costa, M. (1999) Role of Ca²⁺ in the Regulation of Nickel-Inducible Cap43 Gene Expression, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160, 127-132.
150. Swierenga, S. H. H., Whitfield, J. F., and Gillan, D. J. (1976) Alteration by malignant transformation of the calcium requirements for cell proliferation in vitro, *J. Natl. Cancer Inst.* 57, 125-129.
151. Harris, E. D. (1991) Copper transport: an overview, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196, 130-140.
152. Valko, M., Morris, H., and Cronin, M. T. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress, *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-1208.
153. Gaetke, L. M., and Chow, C. K. (2003) Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients, *Toxicology* 189, 147-163.
154. Valko, M., Morris, H., Mazur, M., Telser, J., McInnes, E. J. L., and Mabbs, F. E. (1999) High-Affinity Binding Site for Copper(II) in Human and Dog Serum Albumins (an EPR Study), *J. Phys. Chem. B* 103, 5591-5597.
155. Dagenais, S. L., Guevara-Fujita, M., Loechel, R., Burgess, A. C., Miller, D. E., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Brewer, G. J., and Glover, T. W. (1999) The canine copper toxicosis locus is not syntenic with ATP7B or ATX1 and maps to a region showing homology to human 2p21, *Mamm. Genome* 10, 753-756.
156. Van de Sluis, B. J. A., Breen, M., Nanji, M., Van Wolferen, M., De Jong, P., Binns, M. M., Pearson, P. L., Kuipers, E., Rothuizen, J., Cox, D. W., Wijmenga, C., and Van Oost, B. A. (1999) Genetic mapping of the copper toxicosis locus in bedlington terriers to dog chromosome 10, in a region syntenic to human chromosome region 2p13-p16, *Hum. Mol. Genet.* 8, 501-507.
157. Linder, M. C. (2001) Copper and genomic stability in mammals, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 475, 141-152.
158. Goldfischer, S., Popper, H., and Sternlieb, I. (1980) The significance of variations in the distribution of copper in liver disease, *Am. J. Pathol.* 99, 715-729.
159. Sternlieb, I., Van den Hamer, C. J., Morell, A. G., Alpert, S., Gregoriadis, G., and Scheinberg, I. H. (1973) Lysosomal defect of hepatic copper excretion in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration), *Gastroenterology* 64, 99-105.
160. Buttke, T. M., and Sandstrom, P. A. (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis, *Immunol Today* 15, 7-10.
161. Deng, D. X., Cai, L., Chakrabarti, S., and Cherian, M. G. (1999) Increased radiation-induced apoptosis in mouse thymus in the absence of metallothionein, *Toxicology* 134, 39-49.
162. Hiromatsu, T. (1999) Cobalt chloride induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells and zinc chloride protects against cobalt-induced apoptosis, *Kyushu Shika Gakkai Zasshi* 53, 13-28.
163. Li, J., Quabius, E. S., Wendelaar Bonga, S. E., Flik, G., and Lock, R. A. C. (1998) Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na⁺/K⁺-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*), *Aquat. Toxicol.* 43, 1-11.

164. Sigman, D. S., Graham, D. R., D'Aurora, V., and Stern, A. M. (1979) Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline-cuprous complex. Inhibition of E. coli DNA polymerase I, *J. Biol. Chem.* 254, 12269-12272.
165. Satoh, K., Kadofuku, T., and Sakagami, H. (1997) Copper, but not iron, enhances apoptosis-inducing activity of antioxidants, *Anticancer Res.* 17, 2487-2490.
166. Burkitt, M. J., Milne, L., Nicotera, P., and Orrenius, S. (1996) 1,10-Phenanthroline stimulates internucleosomal DNA fragmentation in isolated rat liver nuclei by promoting the redox activity of endogenous copper ions, *Biochem. J.* 313, 163-169.
167. Manome, H., Aiba, S., and Tagami, H. (1999) Simple chemicals can induce maturation and apoptosis of dendritic cells, *Immunology* 98, 481-490.
168. Miyamoto, D., Kusagaya, Y., Enodo, N., Sometani, A., Takeo, S., Suzuki, T., Arima, Y., Nakajima, K., and Suzuki, Y. (1998) Thujaplicin-copper chelates inhibit replication of human influenza viruses, *Antiviral Res.* 39, 89-100.
169. Mikulasova, M., Szabova, E., and Melnik, M. (1998) Antimutagenic effect of copper (II) complexes, *Biologia (Bratislava)* 53, 719-726.
170. Huang, J., Fan, Y., and Zhang, M. (1998) Study on the antimutagenesis of bis(3,5-diisopropyl salicylato) copper(II), *Zhongguo Gonggong Weisheng Xuebao* 17, 163-165.
171. Lu, C.-Y., Lee, H.-C., Fahn, H.-J., and Wei, Y.-H. (1999) Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 423, 11-21.
172. Bauman, J. W., Liu, J., and Klaassen, C. D. (1993) Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals, *Fundam Appl Toxicol* 21, 15-22.
173. Ozaki, T., Nakamura, Y., Enomoto, H., Hirose, M., and Sakiyama, S. (1995) Overexpression of DAN gene product in normal rat fibroblasts causes a retardation of the entry into the S phase, *Cancer Res.* 55, 895-900.
174. Kanaya, K., Tsai, A.-L., and Kamitani, T. (2002) Cobalt- and Nickel-Binding Property of Cullin-2, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 294-299.
175. Grbac-Ivankovic, S., Antonijczuk, K., Varghese, A. H., Plowman, M. C., Antonijczuk, A., Korza, G., Ozols, J., and Sunderman, F. W., Jr. (1994) Lipovitellin 2 beta is the 31 kD Ni(2+)-binding protein (pNiXb) in Xenopus oocytes and embryos, *Mol Reprod Dev* 38, 256-263.
176. Gorlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A., and Hartmann, E. (1994) Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import, *Cell* 79, 767-778.
177. Harford, C., and Sarkar, B. (1995) Neuromedin C binds Cu(II) and Ni(II) via the ATCUN motif: implications for the CNS and cancer growth, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 877-882. **Res.**
178. Kasprzak, K. S., Waalkes, M. P., and Poirier, L. A. (1986) Antagonism by essential divalent metals and amino acids of nickel(II)-DNA binding in vitro, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82, 336-343.
179. Huang, X., Klein, C. B., and Costa, M. (1994) Crystalline Ni3S2 specifically enhances the formation of oxidants in the nuclei of CHO cells as detected by dichlorofluorescein, *Carcinogenesis* 15, 545-548.
180. Salnikow, K., Gao, M., Voitekun, V., Huang, X., and Costa, M. (1994) Altered oxidative stress responses in nickel-resistant mammalian cells, *Cancer Res.* 54, 6407-6412.
181. Bal, W., Kozlowski, H., and Kasprzak, K. S. (2000) Molecular models in nickel carcinogenesis, *J. Inorg. Biochem.* 79, 213-218.

182. Kasprzak, K. S., and Sunderman, F. W., Jr. (1977) Mechanisms of dissolution of nickel subsulfide in rat serum, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 16, 95-108.
183. Costa, D., Guignard, J., and Pezerat, H. (1989) Production of free radicals arising from the surface activity of minerals and oxygen. Part II. Arsenides, sulfides, and sulfoarsenides of iron, nickel, and copper, *Toxicology and industrial health* 5, 1079-1097.
184. Lee, J. E., Ciccarelli, R. B., and Jennette, K. W. (1982) Solubilization of the carcinogen nickel subsulfide and its interaction with deoxyribonucleic acid and protein, *Biochemistry* 21, 771-778.
185. Lloyd, R. V., Hanna, P. M., and Mason, R. P. (1997) The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction, *Free Radical Biol. Med.* 22, 885-888.
186. Sunderman, F. W., Jr. (1986) Metals and lipid peroxidation, *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 59, 248-255.
187. Valko, M., Morris, H., and Cronin, M. T. D. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress, *Curr Med Chem FIELD Full Journal Title:Current medicinal chemistry* 12, 1161-1208.
188. Rodriguez, R. E., Misra, M., North, S. L., and Kasprzak, K. S. (1991) Nickel-induced lipid peroxidation in the liver of different strains of mice and its relation to nickel effects on antioxidant systems, *Toxicol. Lett.* 57, 269-281.
189. Hasan, M., and Ali, S. F. (1981) Effects of thallium, nickel, and cobalt administration of the lipid peroxidation in different regions of the rat brain, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 57, 8-13.
190. Sunderman, F. W., Jr., Marzouk, A., Hopfer, S. M., Zaharia, O., and Reid, M. C. (1985) Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 15, 229-236.
191. Misra, M., Rodriguez, R. E., North, S. L., and Kasprzak, K. (1991) Nickel-induced renal lipid peroxidation in different strains of mice: concurrence with nickel effect on antioxidant defense systems, *Toxicol. Lett.* 58, 121-133.
192. Chen, C.-Y., Wang, Y.-F., Huang, W.-R., and Huang, Y.-T. (2003) Nickel induces oxidative stress and genotoxicity in human lymphocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 153-159.
193. Srivastava, R. C., Kumar, A., Srivastava, S. K., Gupta, S., Hasan, S. K., and Athar, M. (1990) Nickel-mediated inhibition in the glutathione-dependent protection against lipid peroxidation, *Biochem. Int.* 20, 495-501.
194. Britton, R. S. (1996) Metal-induced hepatotoxicity, *Semin Liver Dis* 16, 3-12.
195. Bremner, I. (1998) Manifestations of copper excess, *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1069S-1073S.
196. Sokol, R. J., Devereaux, M., Mierau, G. W., Hambidge, K. M., and Shikes, R. H. (1990) Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. Modification by vitamin E deficiency, *Gastroenterology* 99, 1061-1071.
197. Ragsdale, S. W. (1998) Nickel biochemistry, *Curr Opin Chem Biol* 2, 208-215.
198. Stadtman, E. R. (1993) Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions, *Annu. Rev. Biochem.* 62, 797-821.
199. Bal, W., Wojcik, J., Maciejczyk, M., Grochowski, P., and Kasprzak, K. S. (2000) Induction of a Secondary Structure in the N-Terminal Pentadecapeptide of Human Protamine HP2 through Ni(II) Coordination. An NMR Study, *Chem. Res. Toxicol.* 13, 823-830.

200. Bal, W., Lukszo, J., and Kasprzak, K. S. (1997) Mediation of Oxidative DNA Damage by Nickel(II) and Copper(II) Complexes with the N-Terminal Sequence of Human Protamine HP2, *Chem. Res. Toxicol.* 10, 915-921.
201. Bal, W., Jezowska-Bojczuk, M.-I., and Kasprzak, K. S. (1997) Binding of Nickel(II) and Copper(II) to the N-Terminal Sequence of Human Protamine HP2, *Chem. Res. Toxicol.* 10, 906-914.
202. Bal, W., Liang, R., Lukszo, J., Lee, S. H., Dizdaroglu, M., and Kasprzak, K. S. (2000) Ni(II) specifically cleaves the C-terminal tail of the major variant of histone H2A and forms an oxidative damage-mediating complex with the cleaved-off octapeptide, *Chem. Res. Toxicol.* 13, 616-624.
203. Bal, W., Lukszo, J., Bialkowski, K., and Kasprzak, K. S. (1998) Interactions of Nickel(II) with histones: interactions of Nickel(II) with CH₃CO-Thr-Glu-Ser-His-His-Lys-NH₂, a peptide modeling the potential metal binding site in the "C-Tail" region of histone H2A, *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1014-1023.
204. Mylonas, M., Plakatouras, J. C., Hadjiliadis, N., Papavasileiou, K. D., and Melissas, V. S. (2005) An extremely stable Ni(II) complex derived from the hydrolytic cleavage of the C-terminal tail of histone H2A, *J. Inorg. Biochem.* 99, 637-643.
205. Mylonas, M., Malandrinou, G., Plakatouras, J., Hadjiliadis, N., Kasprzak, K. S., Krezel, A., and Bal, W. (2001) Stray Cu(II) May Cause Oxidative Damage When Coordinated to the -TESHHK- Sequence Derived from the C-Terminal Tail of Histone H2A, *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1177-1183.
206. Mylonas, M., Plakatouras, J. C., and Hadjiliadis, N. (2004) Interactions of Ni(II) and Cu(II) ions with the hydrolysis products of the C-terminal -ESHH- motif of histone H2A model peptides. Association of the stability of the complexes formed with the cleavage of the -E-S- bond, *Dalton Trans.* 4152-4160.
207. Kasprzak, K. S., and Poirier, L. A. (1985) Effects of calcium(II) and magnesium(II) on nickel(II) uptake and stimulation of thymidine incorporation into DNA in the lungs of strain A mice, *Carcinogenesis* 6, 1819-1821.
208. Peskin, A. V., and Shlyahova, L. (1986) Cell nuclei generate DNA-nicking superoxide radicals, *FEBS Lett.* 194, 317-321.
209. Klein, C. B., Frenkel, K., and Costa, M. (1991) The role of oxidative processes in metal carcinogenesis, *Chem. Res. Toxicol.* 4, 592-604.
210. Standeven, A. M., and Wetterhahn, K. E. (1991) Is there a role for reactive oxygen species in the mechanism of chromium(VI) carcinogenesis?, *Chem. Res. Toxicol.* 4, 616-625.
211. Lee, J. E., Ciccarelli, R. B., and Jennette, K. W. (1982) Solubilization of the carcinogen nickel subsulfide and its interaction with DNA and protein, *Biochemistry* 21, 771-778.
212. Kasprzak, K. S., and Bare, R. M. (1989) In vitro polymerization of histones by carcinogenic nickel compounds, *Carcinogenesis* 10, 621-624.
213. Misra, M., Olinski, R., Dizdaroglu, M., and Kasprzak, K. S. (1993) Enhancement by L-histidine of nickel(II)-induced DNA-protein cross-linking and oxidative DNA base damage in the rat kidney, *Chem. Res. Toxicol.* 6, 33-37.
214. Kasprzak, K. S. (2000) *Molecular Biology and Toxicology of Metals*, Taylor & Francis, London.
215. Saplakoglu, U., Iscan, M., and Iscan, M. (1997) DNA single-strand breakage in rat lung, liver and kidney after single and combined treatments of nickel and cadmium, *Mutat. Res.* 394, 133-140.

216. Wozniak, K., and Blasiak, J. (2002) Free radicals-mediated induction of oxidized DNA bases and DNA-protein cross-links by nickel chloride, *Mutat. Res.* 514, 233-243.
217. Liang, R., Senturker, S., Shi, X., Bal, W., Dizdaroglu, M., and Kasprzak, K. S. (1999) Effects of Ni(II) and Cu(II) on DNA interaction with the N-terminal sequence of human protamine P2: enhancement of binding and mediation of oxidative DNA strand scission and base damage, *Carcinogenesis* 20, 893-898.
218. Kawanishi, S., Inoue, S., and Yamamoto, K. (1989) Site-specific DNA damage induced by nickel(II) ion in the presence of hydrogen peroxide, *Carcinogenesis* 10, 2231-2235.
219. Nackerdien, Z., Kasprzak, K. S., Rao, G., Halliwell, B., and Dizdaroglu, M. (1991) Nickel(II)- and cobalt(II)-dependent damage by hydrogen peroxide to the DNA bases in isolated human chromatin, *Cancer Res.* 51, 5837-5842.
220. Grollman, A. P., and Moriya, M. (1993) Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within, *Trends Genet.* 9, 246-249.
221. Kasprzak, K. S., and Hernandez, L. (1989) Enhancement of hydroxylation and deglycosylation of 2'-deoxyguanosine by carcinogenic nickel compounds, *Cancer Res.* 49, 5964-5968.
222. Schaaper, R. M., Koplitz, R. M., Tkeshelashvili, L. K., and Loeb, L. A. (1987) Metal-induced lethality and mutagenesis: possible role of apurinic intermediates, *Mutat. Res.* 177, 179-188.
223. Benetis, N., Holmen, K., Kowalewski, J., Nordenskioeld, L., and Wahlberg, O. (1981) Investigation of nickel(II)-ascorbic acid complex formation in aqueous solution using potentiometric measurements, optical spectroscopy and carbon-13 NMR spectroscopy, *Acta Chem Scand A* A35, 513-520.
224. Bragagnolo, G. (1949) Ascorbic acid and oxidation catalysts (metallic ions). II, *Annali di Chimica Applicata* 39, 87-92.
225. Salnikow, K., and Kasprzak, K. S. (2005) Ascorbate depletion: A critical step in nickel carcinogenesis?, *Environ. Health Perspect.* 113, 577-584.
226. Takanaga, H., Mackenzie, B., and Hediger Matthias, A. (2004) Sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23, *Pflugers Arch* 447, 677-682.
227. Salnikow, K., Donald Steven, P., Bruick Richard, K., Zhitkovich, A., Phang James, M., and Kasprzak Kazimierz, S. (2004) Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress, *J Biol Chem* 279, 40337-40344.
228. Krezel, A., Szczepanik, W., Sokolowska, M., Jezowska-Bojczuk, M., and Bal, W. (2003) Correlations between Complexation Modes and Redox Activities of Ni(II)-GSH Complexes, *Chem. Res. Toxicol.* 16, 855-864.
229. Krezel, A., and Bal, W. (2003) Structure-function relationships in glutathione and its analogs, *Org. Biomol. Chem.* 1, 3885-3890.
230. Joshi, S., Husain, M. M., Chandra, R., Hasan, S. K., and Srivastava, R. C. (2005) Hydroxyl radical formation resulting from the interaction of nickel complexes of L-histidine, glutathione or L-cysteine and hydrogen peroxide, *Hum Exp Toxicol* 24, 13-17.
231. Shainkin-Kestenbaum, R., Caruso, C., and Berlyne, G. M. (1991) Effect of nickel on oxygen free radical metabolism: inhibition of superoxide dismutase and enhancement of hydroxydopamine autoxidation, *Biol Trace Elem Res* 28, 213-221.
232. Rodriguez, R. E., Misra, M., and Kasprzak, K. S. (1990) Effects of nickel on catalase activity in vitro and in vivo, *Toxicology* 63, 45-52.

233. Sukalski, K. A., LaBerge, T. P., and Johnson, W. T. (1997) In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency, *Free Radical Biol. Med.* 22, 835-842.
234. Bozkaya, L. A., Ozturk-Urek, R., Aydemir, T., and Tarhan, L. (2001) Effects of Se, Cu and Se + vitamin E deficiency on the activities of CuZnSOD, GSH-Px, CAT and LPO levels in chicken erythrocytes, *Cell Biochem. Funct.* 19, 153-157.
235. Testa, A., Serrone, M., Foti, C., Assennato, G., Jirillo, E., and Antonaci, S. (1996) Neutrophil activation in nickel-sensitized subjects, *Cytobios* 86, 193-200.
236. Bal, W., Dyba, M., and Kozlowski, H. (1997) The impact of the amino-acid sequence on the specificity of copper(II) interactions with peptides having nonco-ordinating side-chains, *Acta Biochim. Pol.* 44, 467-476.
237. Bradshaw, R. A., Shearer, W. T., and Gurd, F. R. N. (1968) Sites of binding of copper(II) ion by peptide (1-24) of bovine serum albumin, *J. Biol. Chem.* 243, 3817-3825.
238. Glennon, J. D., and Sarkar, B. (1982) Nickel(II) transport in human blood serum. Studies of nickel(II) binding to human albumin and to native-sequence peptide, and ternary-complex formation with L-histidine, *Biochem. J.* 203, 15-23.
239. Sadler, P. J., Tucker, A., and Viles, J. H. (1994) Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins. Comparison with Co²⁺, Cd²⁺ and Al³⁺, *Eur. J. Biochem.* 220, 193-200.
240. Patel, S. U., Sadler, P. J., Tucker, A., and Viles, J. H. (1993) Direct detection of albumin in human blood plasma by proton NMR spectroscopy. Complexation of nickel²⁺, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 9285-9286.
241. Fenton, D. E. (2003) *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Vol. 6, Elsevier, Sheffield, UK.
242. Sigel, H., and Martin, R. B. (1982) Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands, *Chem. Rev.* 82, 385-426.
243. Kozlowski, H., Bal, W., Dyba, M., and Kowalik-Jankowska, T. (1999) Specific structure-stability relations in metallopeptides, *Coord Chem Rev* 184, 319-346.
244. Varnagy, K., Boka, B., Sovago, I., Sanna, D., Marras, P., and Micera, G. (1998) Potentiometric and spectroscopic studies on the copper(II) and nickel(II) complexes of tripeptides of methionine, *Inorganica Chim Acta* 275-276, 440-446.
245. Kozlowski, H., Lebkiri, A., Onindo, C. O., Pettit, L. D., and Galey, J. F. (1995) The influence of aspartic or glutamic acid residues in tetrapeptides on the formation of complexes with nickel(II) and zinc(II), *Polyhedron* 14, 211-218.
246. Pettit, L. D., Pyburn, S., Kozlowski, H., Decock-Le Reverend, B., and Liman, F. (1989) Coordination of nickel(II) ions by angiotensin II and its peptide fragments. A potentiometric, proton nuclear magnetic resonance and circular dichroism spectroscopic study, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1471-1475.
247. Bal, W., Kozlowski, H., Robbins, R., and Pettit, L. D. (1995) Competition between the terminal amino and imidazole nitrogen donors for coordination to Ni(II) ions in oligopeptides, *Inorganica Chim Acta* 231, 7-12.
248. Farkas, E., Sovago, I., and Gergely, A. (1983) Studies on transition metal-peptide complexes. Part 8. Parent and mixed-ligand complexes of histidine-containing dipeptides, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1545-1551.
249. Brookes, G., and Pettit, L. D. (1975) Thermodynamics of formation of complexes of copper(II) and nickel(II) ions with glycylhistidine, b-alanylhistidine, and histidylglycine, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2112-2117.

250. Yokoyama, A., Aiba, H., and Tanaka, H. (1974) Acid dissociation constants of some histidine-containing peptides and formation constants of their metal complexes, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 47, 112-117.
251. Sovago, I., and Petocz, G. (1987) Studies on transition-metal-peptide complexes. Part 13. Copper(II) and nickel(II) complexes of amino acids and peptides containing a thioether group, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1717-1720.
252. Agarwal, R. P., and Perrin, D. D. (1975) Stability constants of complexes of copper(II) ions with histidine peptides, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 268-272.
253. Daniele, P. G., Zerbinati, O., Aruga, R., and Ostacoli, G. (1988) Thermodynamic and spectrophotometric study of copper(II) and cadmium(II) homo- and hetero-nuclear complexes with L-histidylglycine in aqueous medium, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1115-1120.
254. Brookes, G., and Pettit, L. D. (1975) Thermodynamics of formation of complexes of copper(II) and nickel(II) ions with glycylhistidine, b-alanylhistidine, and histidylglycine, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions: Inorganic Chemistry (1972-1999)*, 2112-2117.
255. Daniele, P. G., Zerbinati, O., Zelano, V., and Ostacoli, G. (1991) Thermodynamic and spectroscopic study of copper(II)-glycyl-L-histidylglycine complexes in aqueous solution, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions: Inorganic Chemistry (1972-1999)*, 2711-2715.
256. Morris, P. J., and Martin, R. B. (1971) Tetramer formation in tetragonal transition metal ion complexes of glycyl-L-histidine, *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry* 33, 2913-2918.
257. Sovago, I., Farkas, E., and Gergely, A. (1982) Studies on transition metal-peptide complexes. Part 7. Copper(II) complexes of dipeptides containing L-histidine, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2159-2163.
258. Rainer, M. J. A., and Rode, B. M. (1985) The complex formation of copper(II) with GHL and related peptides, *Inorganica Chim Acta* 107, 127-132.
259. May, P. M., Whittaker, J., and Williams, D. R. (1983) Copper complexing by growth stimulating tripeptide, glycylhistidyllysine, *Inorganica Chim Acta* 80, L5-L7.
260. Lau, S.-J., and Sarkar, B. (1981) The interaction of copper(II) and glycyl-L-histidyl-L-lysine, a growth-modulating tripeptide from plasma, *Biochem. J.* 199, 649-656.
261. Pickart, L., and Lovejoy, S. (1987) Biological activity of human plasma copper-binding growth factor glycyl-L-histidyl-L-lysine, *Methods Enzymol* 147, 314-328.
262. Hay, R. W., Hassan, M. M., and Chen, Y. Q. (1993) Kinetic and thermodynamic studies of the copper(II) and nickel(II) complexes of glycylglycyl-L-histidine, *J. Inorg. Biochem.* 52, 17-25.
263. Aiba, H., Yokoyama, A., and Tanaka, H. (1974) Copper(II) complexes of glycyl-L-histidylglycine, and glycylglycyl-L-histidine in aqueous solutions, *Bull. Chem. Soc. Jap.* 47, 1437-1441.
264. Farkas, E., Sovago, I., Kiss, T., and Gergely, A. (1984) Studies on transition metal-peptide complexes. Part 9. Copper(II) complexes of tripeptides containing histidine, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 611-614.
265. Bal, W., Kozłowski, H., Kupryszewski, G., Mackiewicz, Z., Pettit, L., and Robbins, R. (1993) Complexes of Cu(II) with Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-NH₂; an example of metal ion-promoted conformational organization which results in exceptionally high complex stability, *J. Inorg. Biochem.* 52, 79-87.

266. Bannister, C. E., Raycheba, J. M. T., and Margerum, D. W. (1982) Kinetics of nickel(II) glycyglycyl-L-histidine reactions with acids and triethylenetetramine, *Inorg. Chem.* 21, 1106-1112.
267. Camerman, N., Camerman, A., and Sarkar, B. (1976) Molecular design to mimic the copper(II) transport site of human albumin. The crystal and molecular structure of copper(II)-glycyglycyl-L-histidine-N-methyl amide monoaquo complex, *Can. J. Chem.* 54, 1309-1316.
268. Bal, W., Djuran, M. I., Margerum, D. W., Gray, E. T., Jr., Mazid, M. A., Tom, R. T., Nieboer, E., and Sadler, P. J. (1994) Dioxygen-induced decarboxylation and hydroxylation of [NiII(glycyl-glycyl-L-histidine)] occurs via NiIII: x-ray crystal structure of [NiII(glycyl-glycyl-a-hydroxy-D,L-histamine)], 3H₂O, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1889-1890.
269. Bal, W., Chmurny, G. N., Hilton, B. D., Sadler, P. J., and Tucker, A. (1996) Axial hydrophobic fence in highly-stable Ni(II) complex of des-angiotensinogen N-terminal peptide, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 4727-4728.
270. Pettit, L. D., Pyburn, S., Bal, W., Kozlowski, H., and Bataille, M. (1990) A study of the comparative donor properties to copper(II) of the terminal amino and imidazole nitrogen in peptides, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3565-3570.
271. Bal, W., Jezowska-Bojczuk, M., Kozlowski, H., Chruscinski, L., Kupryszewski, G., and Witczuk, B. (1995) Cu(II) binding by angiotensin II fragments: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His and Arg-Val-Tyr-Ile-His. Competition between amino group and imidazole nitrogens in anchoring of metal ions, *J. Inorg. Biochem.* 57, 235-247.
272. Mylonas, M., Krezel, A., Plakatouras, J. C., Hadjiliadis, N., and Bal, W. (2002) The binding of Ni(II) ions to terminally blocked hexapeptides derived from the metal binding -ESHH- motif of histone H2A, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 4296-4306.
273. Allen, G., and Campbell, R. O. (1996) Specific cleavage of histidine-containing peptides by copper(II), *Int. J. Pept. Protein Res.* 48, 265-273.
274. Karavelas, T., Malandrinou, G., Hadjiliadis, N., Mlynarz, P., Kozlowski, H., Barsam, M., and Butler, I. (2008) Coordination properties of Cu(ii) and Ni(ii) ions towards the C-terminal peptide fragment -TYTEHA- of histone H4, *Dalton Trans.*, 1215-1223.
275. Zoroddu, M. A., Kowalik-Jankowska, T., Kozlowski, H., Molinari, H., Salnikow, K., Broday, L., and Costa, M. (2000) Interaction of Ni(II) and Cu(II) with a metal binding sequence of histone H4: AKRHRK, a model of the H4 tail, *Biochim. Biophys. Acta* 1475, 163-168.
276. Zoroddu, M. A., Peana, M., Kowalik-Jankowska, T., Kozlowski, H., and Costa, M. (2002) The binding of Ni(II) and Cu(II) with the N-terminal tail of the histone H4, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 458-465.
277. Midorikawa, K., Murata, M., and Kawanishi, S. (2005) Histone peptide AKRHRK enhances H₂O₂-induced DNA damage and alters its site specificity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 1073-1077.
278. Bal, W., Lukszo, J., Jezowska-Bojczuk, M., and Kasprzak, K. S. (1995) Interactions of nickel(II) with histones. Stability and solution structure of complexes with CH₃CO-Cys-Ala-Ile-His-NH₂, a putative metal binding sequence of histone H3, *Chem. Res. Toxicol.* 8, 683-692.
279. Bal, W., Karantza, V., Moudrianakis, E. N., and Kasprzak, K. S. (1999) Interaction of Nickel(II) with histones: in vitro binding of nickel(II) to the core histone tetramer, *Arch. Biochem. Biophys.* 364, 161-166.
280. Bal, W., and Kasprzak, K. S. (2002) Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals, *Toxicol. Lett.* 127, 55-62.

281. Karavelas, T., Mylonas, M., Malandrinou, G., Plakatouras, J. C., Hadjiliadis, N., Mlynarz, P., and Kozlowski, H. (2005) Coordination properties of Cu(II) and Ni(II) ions towards the C-terminal peptide fragment -ELAKHA- of histone H2B, *J. Inorg. Biochem.* 99, 606-615.
282. Karaczyn, A. A., Golebiowski, F., and Kasprzak, K. S. (2006) Ni(II) affects ubiquitination of core histones H2B and H2A, *Exp. Cell Res.* 312, 3252-3259.
283. Karaczyn, A. A., Golebiowski, F., and Kasprzak, K. S. (2005) Truncation, deamidation, and oxidation of histone H2B in cells cultured with nickel(II), *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1934-1942.
284. Atherton, E., Fox, H., Harkiss, D., and Sheppard, R. C. (1978) Application of polyamide resins to polypeptide synthesis: an improved synthesis of beta -endorphin using fluorenylmethoxycarbonylamino-acids, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 539-540.
285. Sieber, P. (1987) A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method, *Tetrahedron Lett.* 28, 2107-2110.
286. White, P. D., and Chan, W. C. (2000) *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*, Oxford University Press Inc., New York.
287. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W., and Gillesen, D. (1989) New coupling reagents in peptide chemistry, *Tetrahedron Lett.* 30, 1927-1930.
288. Fields, C. G., Lloyd, D. H., Macdonald, R. L., Otteson, K. M., and Noble, R. L. (1991) HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis, *Pept. Res.* 4, 95-101.
289. Wade, J. D., Bedford, J., Sheppard, R. C., and Tregear, G. W. (1991) DBU as an Nalpha -deprotecting reagent for the fluorenylmethoxycarbonyl group in continuous flow solid-phase peptide synthesis, *Pept. Res.* 4, 194-199.
290. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., and Cook, P. I. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.* 34, 595-598.
291. Vojkovsky, T. (1995) Detection of secondary amines on solid phase, *Pept. Res.* 8, 236-237.
292. Pearson, D. A., Blanchette, M., Baker, M. L., and Guindon, C. A. (1989) Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.* 30, 2739-2742.
293. Malawer, E. G. (1995) *Handbook of size exclusion chromatography*, (Wu, C.-s., Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York.
294. Braithwaite, A., and Smith, F. J. (1996) *Chromatographic Methods*, 5 ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
295. Prokai, L. (2002) *Mass Spectrometry of Polymers*, (Montaudou, G., and Lattimer, R. P., Eds.), CRC Press.
296. Motekaitis, R. J., Martell, A. E., Martell, A. E., and Motekaitis, R. J. (1988) *The determination and use of stability constants*, VCH Publishers New York.
297. Sigel, H., and Sigel, A. (1976) *Metal ions in biological systems : Amino acids and derivatives as ambivalent ligands*, Vol. 9, Marcel Dekker.
298. Gans, P., Sabatini, A., and Vacca, A. (1996) Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with HYPERQUAD suite of programs, *Talanta* 43, 1739-1753.
299. Cowan, J. A. (1997) *Inorganic biochemistry an introduction*, Wiley-Vch.
300. Huheey, J. E., Keiter, E. A., and Keiter, R. L. (1978) *Inorganic chemistry*, Harper & Row New York.

301. Χατζηλιάδης, Ν. (1999) Ηλεκτρονική Φασματοσκοπία, in *Φασματοχημικές, φασματοσκοπικές και βιοχημικές μέθοδοι στη Βιοανόργανη Χημεία* (Χατζηλιάδης, Ν., Ed.), pp 105-139, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
302. Tsangaris, J. M., Chang, J. W., and Martin, R. B. (1969) Ultraviolet circular dichroism of cupric and nickel ion complexes of amino acids and peptides, *Journal of the American Chemical Society* 91, 726-731.
303. Martin, R. B. (1974) Optical properties of transition metal ion complexes of amino acids and peptides, *Met. Ions Biol. Syst. 1*, 129-156.
304. Τσαγάρης, Ι. (1999) Στροφικός Διχρωισμός, in *Φασματοχημικές, φασματοσκοπικές και βιοχημικές μέθοδοι στη Βιοανόργανη Χημεία* (Χατζηλιάδης, Ν., Ed.), pp 211-257, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
305. Hammes, G. G. (2005) *Spectroscopy for the biological sciences*, Wiley-Interscience.
306. Macomber, R. S., and Harbison, G. S. (1999) A complete introduction to modern NMR spectroscopy.
307. Lambert, J. B., and Mazzola, E. P. (2004) *Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods*, Pearson Education.
308. Piantini, U., Sorensen, O. W., and Ernst, R. R. (1982) Multiple quantum filters for elucidating NMR coupling networks, *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6800-6801.
309. Braunschweiler, L., and Ernst, R. R. (1983) Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 53, 521-528.
310. Bax, A., and Davis, D. G. (1985) MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 65, 355-360.
311. Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. (1991) Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure, *J. Mol. Biol.* 222, 311-333.
312. Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. (1992) The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy, *Biochemistry* 31, 1647-1651.
313. Wishart, D. S., and Sykes, B. D. (1994) The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data, *J. Biomol. NMR* 4, 171-180.
314. Wishart, D. S., and Case, D. A. (2001) Use of chemical shifts in macromolecular structure determination, *Meth. Enzymol.* 338, 3-34.
315. Guntert, P. (2004) Automated NMR structure calculation with CYANA, *Methods Mol. Biol. (Totowa, NJ, U. S.)* 278, 353-378.
316. e-NMR infrastructure, CERM Magnetic Resonance Center, Florence, <http://www.cerm.unifi.it/home/research/onlinecalculations.html>.
317. Koradi, R., Billeter, M., and Wuethrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graph.* 14, 51-55, plates, 29-32.
318. Froimowitz, M. (1993) HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling, *BioTechniques* 14, 1010-1013.
319. Βαλαβανίδης, Α. (2006) in *Ελεύθερες Ρίζες στην Οργανική Χημεία*, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
320. Freitag, R. (2008) *An Introduction to Molecular Biotechnology*. By Michael Wink (Editor), WILEY-VCH Verlag Weinheim.
321. Scheppler, J. A., Cassin, P. E., and Gambier, R. M. (2000) *Biotechnology explorations: applying the fundamentals*, Amer Society for Microbiology.

322. Kowalik-Jankowska, T., Rajewska, A., Wisniewska, K., Grzonka, Z., and Jezierska, J. (2005) Coordination abilities of N-terminal fragments of α -synuclein towards copper(II) ions: A combined potentiometric and spectroscopic study, *J. Inorg. Biochem.* 99, 2282-2291.
323. Zoroddu, M. A., Kowalik-Jankowska, T., Kozlowski, H., Salnikow, K., and Costa, M. (2001) Ni(II) and Cu(II) binding with a 14-aminoacid sequence of Cap43 protein, TRSRSHTSEGTRSR, *J. Inorg. Biochem.* 84, 47-54.
324. Kowalik-Jankowska, T., Ruta-Dolejsz, M., Wisniewska, K., and Lankiewicz, L. (2002) Coordination of copper(II) ions by the 11-20 and 11-28 fragments of human and mouse beta-amyloid peptide, *J. Inorg. Biochem.* 92, 1-10.
325. Kowalik-Jankowska, T., Rajewska, A., Jankowska, E., and Grzonka, Z. (2006) Copper(II) binding by fragments of alpha-synuclein containing M1-D2- and -H50-residues; a combined potentiometric and spectroscopic study, *Dalton Trans.*, 5068-5076.
326. Orfei, M., Alcaro, M. C., Marcon, G., Chelli, M., Ginanneschi, M., Kozlowski, H., Brasun, J., and Messori, L. (2003) Modeling of copper(II) sites in proteins based on histidyl and glycyl residues, *J. Inorg. Biochem.* 97, 299-307.
327. Zavitsanos, K., Nunes, A. M., Malandrinos, G., Kallay, C., Sovago, I., Magafa, V., Cordopatis, P., and Hadjiliadis, N. (2008) Interaction of Cu(ii) and Ni(ii) with the 63-93 fragment of histone H2B, *Dalton Trans.*, 6179-6187.
328. Conato, C., Kamysz, W., Kozlowski, H., Luczkowski, M., Mackiewicz, Z., Mlynarz, P., Remelli, M., Valensin, D., and Valensin, G. (2002) Cu(II) ion coordination to the pentadecapeptide model of the SPARC copper-binding site, *Dalton Trans.*, 3939-3944.
329. Peisach, J., and Blumberg, W. E. (1974) Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins, *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 691-708.
330. Kowalik-Jankowska, T., Ruta, M., Wisniewska, K., and Lankiewicz, L. (2003) Coordination abilities of the 1-16 and 1-28 fragments of b-amyloid peptide towards copper(II) ions: a combined potentiometric and spectroscopic study, *J. Inorg. Biochem.* 95, 270-282.
331. Abuhijleh, A. L., Woods, C., Bogas, E., and Le Guenniou, G. (1992) Synthesis, characterization and catecholase-mimetic activity of mononuclear copper(II) aspirinate complexes, *Inorg. Chim. Acta* 195, 67-71.
332. Malachowski, M. R., and Davidson, M. G. (1989) Novel mono- and binuclear copper(II) complexes: synthesis, characterization and catecholase activity, *Inorg. Chim. Acta* 162, 199-204.
333. Grigoropoulou, G., Christoforidis, K. C., Louloudi, M., and Deligiannakis, Y. (2007) Structure-Catalytic Function Relationship of SiO₂-Immobilized Mononuclear Cu Complexes: An EPR Study, *Langmuir* 23, 10407-10418.
334. Scholl, H. J., and Huettermann, J. (1992) ESR and ENDOR of copper(II) complexes with nitrogen donors: probing parameters for prosthetic group modeling of superoxide dismutase, *J. Phys. Chem.* 96, 9684-9691.
335. Raycheba, J. M. T., and Margerum, D. W. (1980) Effect of noncoordinative axial blocking on the stability and kinetic behavior of ternary 2,6-lutidine-nickel(II)-oligopeptide complexes, *Inorg Chem* 19, 837-843.
336. Nunes, A. M. P. C., Zavitsanos, K., Del Conte, R., Malandrinos, G., and Hadjiliadis, N. (2009) Interaction of histone H2B (fragment 63-93) with Ni(ii). An NMR study, *Dalton Trans.* , 1904-1913.

337. Osz, K., Varnagy, K., Suli-Vargha, H., Sanna, D., Micera, G., and Sovago, I. (2002) Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of amino acids containing bis(imidazol-2-yl)methyl residues, *Inorg. Chim. Acta* 339, 373-382.
338. Morris, P. J., and Martin, R. B. (1970) Tetrahedral complexes of cobalt(II) with L-histidine, histamine, imidazole, and N-acetyl-L-histidine, *J. Am. Chem. Soc.* 92, 1543-1546.
339. Osz, K., Varnagy, K., Sueli-Vargha, H., Sanna, D., Micera, G., and Sovago, I. (2003) Transition metal complexes of bis(imidazol-2-yl) derivatives of dipeptides, *Dalton Trans.*, 2009-2016.
340. Chang, J. W., and Martin, R. B. (1969) Visible circular dichroism of planar nickel ion complexes of peptides and cysteine and derivatives, *J. Phys. Chem.* 73, 4277-4283.
341. Livera, C., Pettit, L. D., Bataille, M., Krembel, J., Bal, W., and Kozlowski, H. (1988) Copper(II) complexes with some tetrapeptides containing the 'break-point' prolyl residue in the third position, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1357-1360.
342. Kozlowski, H., and Jezowska, M. (1977) Proton NMR studies of palladium(II) complex conformation with glycyl-L-tyrosine in aqueous solution, *Chem. Phys. Lett.* 47, 452-456.
343. Van der Helm, D., and Franks, W. A. (1968) A variation of the square-pyramidal copper(II) surrounding. A possible copper interaction with tyrosine, *J. Am. Chem. Soc.* 90, 5627-5629.
344. Kozlowski, H. (1978) Spectroscopic and magnetic resonance studies on nickel(II), copper(II) and palladium(II) complexes with Gly-Leu-Tyr and Tyr-Gly-Gly tripeptides, *Inorg Chim Acta* 31, 135-140.
345. Amirthalingam, V., and Muralidharan, K. V. (1976) The crystal structure of (L-valyl-L-tyrosine)copper(II) tetrahydrate, *Acta Crystallogr., Sect. B* B32, 3153-3156.
346. Mosset, A., and Bonnet, J. J. (1977) Crystal and molecular structure of diaqua(glycyl-L-tyrosinato)copper(II) dihydrate, *Acta Crystallogr., Sect. B* B33, 2807-2812.
347. Yamashita, M. M., Wesson, L., Eisenman, G., and Eisenberg, D. (1990) Where metal ions bind in proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5648-5652.
348. Regan, L. (1993) The design of metal-binding sites in proteins, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22, 257-281.
349. Dizdaroglu, M. (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin, *Mutat. Res., DNAGing: Genet. Instab. Aging* 275, 331-342.
350. Lloyd, D. R., Carmichael, P. L., and Phillips, D. H. (1998) Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by Fenton reactions, *Chem. Res. Toxicol.* 11, 420-427.
351. Lee, D.-H., O'Connor Timothy, R., and Pfeifer Gerd, P. (2002) Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG-->TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells, *Nucleic Acids Res* 30, 3566-3573.
352. Chevion, M. (1988) A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals, *Free Radical Biol. Med.* 5, 27-37.
353. Lloyd, D. R., and Phillips, D. H. (1999) Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 424, 23-36.

354. Bilsland, E., and Downs, J. A. (2005) Tails of histones in DNA double-strand break repair, *Mutagenesis* 20, 153-163.
355. Friedberg, E. C. (2003) DNA damage and repair, *Nature (London, U. K.)* 421, 436-440.
356. Lloyd, D. R., Phillips, D. H., and Carmichael, P. L. (1997) Generation of Putative Intrastrand Cross-Links and Strand Breaks in DNA by Transition Metal Ion-Mediated Oxygen Radical Attack, *Chem. Res. Toxicol.* 10, 393-400.
357. Eichhorn, G. L., and Shin, Y. A. (1968) Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity, *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 7323-7328.
358. Davey, C. A., Sargent, D. F., Luger, K., Maeder, A. W., and Richmond, T. J. (2002) Solvent Mediated Interactions in the Structure of the Nucleosome Core Particle at 1,9 Resolution, *J. Mol. Biol.* 319, 1097-1113.
359. Vogt, W. (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal, *Free Radical Biol. Med.* 18, 93-105.
360. Nakao, L. S., Iwai, L. K., Kalil, J., and Augusto, O. (2003) Radical production from free and peptide-bound methionine sulfoxide oxidation by peroxynitrite and hydrogen peroxide/iron(II), *FEBS Lett.* 547, 87-91.
361. Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann Stefan, H., Lowther, W. T., Matthews, B., St John, G., Nathan, C., and Brot, N. (2002) Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function, *Arch. Biochem. Biophys.* 397, 172-178.
362. Moskovitz, J., Flescher, E., Berlett, B. S., Azare, J., Poston, J. M., and Stadtman, E. R. (1998) Overexpression of peptide-methionine sulfoxide reductase in *Saccharomyces cerevisiae* and human T cells provides them with high resistance to oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14071-14075.
363. Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W. M., Requena, J., Berlett, B. S., and Stadtman, E. R. (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12920-12925.
364. Ruan, H., Tang, X. D., Chen, M. L., Joiner, M. A., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S. H., Iverson, L., Wu, C.-F., and Hoshi, T. (2002) High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2748-2753.
365. Levine, R. L., Moskovitz, J., and Stadtman, E. R. (2000) Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation, *IUBMB Life* 50, 301-307.
366. Petropoulos, I., Mary, J., Perichon, M., and Friguet, B. (2001) Rat peptide methionine sulphoxide reductase: cloning of the cDNA, and down-regulation of gene expression and enzyme activity during aging, *Biochem. J.* 355, 819-825.