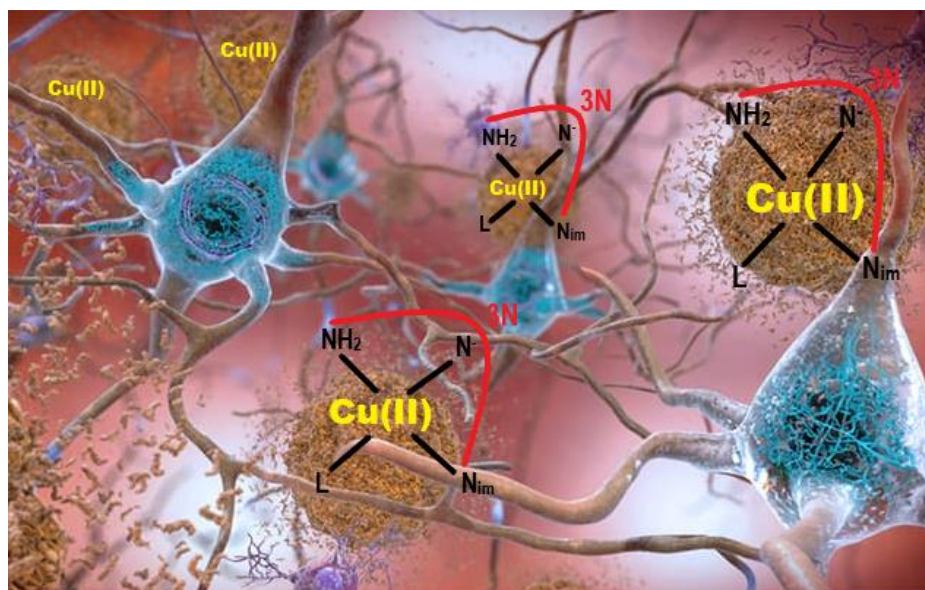




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)
 «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»

Συνεισφορά στην βελτιστοποίηση των θερμοδυναμικών παραμέτρων 3N
 συμπλόκων Cu(II) με πεπτίδια που φέρουν το αμινοξύ ιστιδίνη για χρήση σε
 βιολογικές-ιατρικές εφαρμογές.



Περικλής Παπαδόπουλος, Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

**Διατριβή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
(Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ» του κ. Περικλή Παπαδόπουλου.**

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Γεράσιμος Μαλανδρίνος

Θέμα: «Συνεισφορά στην βελτιστοποίηση των θερμοδυναμικών παραμέτρων 3N συμπλόκων Cu(II) με πεπτίδια που φέρουν το αμινοξύ ιστιδίνη για χρήση σε βιολογικές-ιατρικές εφαρμογές».

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.: ...^A/...-...-....

- 1 Αναπ. Καθ. Γεράσιμος Μαλανδρίνος (επιβλέπων)
- 2 Καθ. Ιωάννης Πλακατούρας (μέλος)
- 3 Καθ. Αχιλλέας Γαρούφης (μέλος)

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.
Καθηγητής Σ. Χατζηκακού

Ο/Η Γραμματέας

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Δι-ιδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.) «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» κατά τη χρονική περίοδο 2020-2022.

Επιβλέπων της εργασίας ήταν ο κύριος Γεράσιμος Μαλανδρίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στον οποίο οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για τη συνεχή υποστήριξη που μου παρείχε τόσο σε ακαδημαϊκό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Οι επιστημονικές γνώσεις και οι συμβουλές που μου παρείχε, με βάση την εμπειρία του, θα αποτελούν οδηγό για τη συνέχεια της σταδιοδρομίας μου ως χημικός, αλλά και ως άνθρωπος.

Επιπλέον, οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη συνάδελφο και υποψήφια Διδάκτορα Δήμητρα Κυριάκου η συμβολή της οποίας ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας. Οι συμβουλές της και η υποστήριξή της για την πραγματοποίηση των πειραμάτων και τη συγγραφή της εργασίας ήταν πολύτιμες και της εύχομαι τα καλύτερα σε προσωπικό και επαγγελματικό επίπεδο.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τους φίλους και συναδέλφους του εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας Σταματία Δασκάλου, Δημήτρη Γλυκό και Εύα Διαμάντη για την εξαιρετική συνεργασία σε φιλικό κλίμα συμπαράστασης που υπήρχε σε όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας στους οποίους, επίσης, εύχομαι καλή σταδιοδρομία.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Δρ. Βασιλική Μπότη, μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Χημείας, υπεύθυνη της Μονάδας Περιβαλλοντικής, Οργανικής και Βιοχημικής Ανάλυσης Υψηλής Ευκρίνειας-ORBITRAP-LC-MS για την λήψη των φασμάτων μάζας, καθώς και στο Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πρόσβαση στις υπηρεσίες της Μονάδας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το εκφράσω στους γονείς μου, την αδελφή μου και τους φίλους μου που με στηρίζουν έμπρακτα σε κάθε βήμα και επιλογή μου και χωρίς τη συμπαράστασή τους οι δυσκολίες που προέκυψαν θα ήταν ανέφικτο να αντιμετωπιστούν.

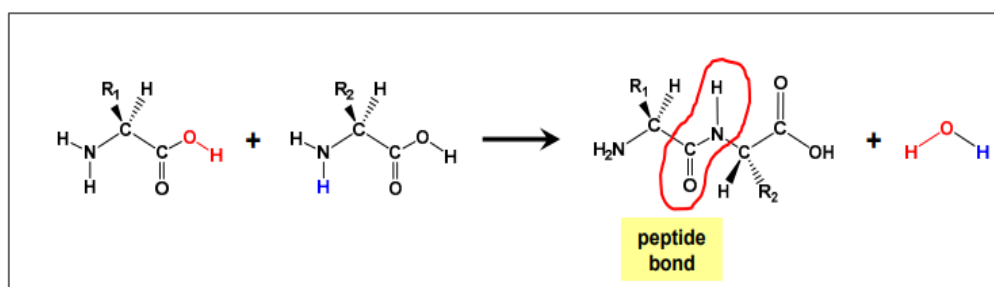
Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Σύμπλοκα πεπτιδίων με μεταλλικά ιόντα.....	1
1.1 Ιδιότητες, μηχανισμός και αρχές ένταξης μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια..	3
1.2 Αποπρωτονίωση κι ένταξη του αμιδικού ατόμου αζώτου.....	6
1.3 Ο ρόλος των αμινοξέων στην ένταξη μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων.....	8
1.4 Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν το αμινοξύ ιστιδίνη.....	12
1.5 Ο ρόλος των μεταλλικών ιόντων.....	17
Κεφάλαιο 2: Φυσικοχημικές και βιοχημικές ιδιότητες χαλκού.	18
2.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες και χημεία ένταξης του Cu(I/II).....	18
2.2 Βιολογικός ρόλος του χαλκού.....	20
2.3 3N σύμπλοκα Cu(II) με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη.	22
Κεφάλαιο 3: Εφαρμογές συμπλόκων πεπτιδίων-Cu(II) (ATCUN) στη Βιολογία και την Ιατρική.	24
3.1 Διάσπαση βιομορίων.	24
3.2 Εφαρμογές με βάση τη φωταύγεια.	27
3.3 Ενίσχυση δράσης αντιμικροβιακών πεπτιδίων.	30
3.4 Δέσμευση-απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων.	32
3.4.1 Απομάκρυνση του Cu(II) από το β-αμυλοειδές πεπτίδιο.	33
Κεφάλαιο 4: Στόχος της εργασίας.	38
Κεφάλαιο 5: Πειραματική πορεία.	40
5.1 Σύνθεση πεπτιδίων.....	40
5.2 Χαρακτηρισμός πεπτιδίων.	44
5.2.1 Φασματοσκοπία NMR.....	44
5.2.1.1 Πειραματική πορεία φασματοσκοπίας NMR.....	47
5.2.2 Φασματομετρία ESI-MS.....	47
5.2.2.1 Πειραματική πορεία φασματομετρίας ESI-MS.....	49
5.3 Ποτενσιομετρία.....	49
5.3.1 Πειραματική πορεία ποτενσιομετρίας.....	52
5.4 Χαρακτηρισμός συμπλόκων πεπτιδίων-Cu(II).	53
5.4.1 Φασματοσκοπία UV-vis.	53
5.4.1.1 Πειραματική πορεία φασματοσκοπίας UV-vis.	58
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα.	59
6.1 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H ₂ N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.....	59

6.2 Ποτενσιομετρική μελέτη του πεπτιδίου H ₂ N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και της αλληλεπίδρασης του με το ιόν Cu(II).....	65
6.2.1 Προσδιορισμός τιμών logβ και pK _a του ελεύθερου πεπτιδίου H ₂ N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.	65
6.2.2 Ποτενσιομετρική μελέτη της αλληλεπίδρασης των ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο H ₂ N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.	67
6.3 Φασματοσκοπική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H ₂ N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.....	69
6.4 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων για το πεπτίδιο H ₂ N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και το σύμπλοκό του με ιόντα Cu(II).	71
6.5 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H ₂ N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.	74
6.6 Ποτενσιομετρική μελέτη του πεπτιδίου H ₂ N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide και της αλληλεπίδρασης του με το ιόν Cu(II).....	80
6.6.1 Προσδιορισμός των τιμών logβ και pK _a του ελεύθερου πεπτιδίου H ₂ N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.	80
6.6.2 Ποτενσιομετρική μελέτη της αλληλεπίδρασης ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο H ₂ N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.	82
6.7 Φασματοσκοπική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H ₂ N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.....	85
6.8 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων του συστήματος Cu(II): H ₂ N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.....	86
Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα.	89
Περίληψη	95
Abstract.....	96
Βιβλιογραφία	97

Κεφάλαιο 1: Σύμπλοκα πεπτιδίων με μεταλλικά ιόντα.

Η χημική δομή των πεπτιδίων αποτελεί ένα ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ των αντίστοιχων δομών των ελεύθερων αμινοξέων και των πρωτεϊνών. Όσον αφορά τα αμινοξέα, που αποτελούν τους δομικούς λίθους τόσο των πεπτιδίων, όσο και των πρωτεϊνών, έχει μελετηθεί εκτενώς η αλληλεπίδρασή τους με τα περισσότερα μεταλλικά ιόντα κι έχουν καθοριστεί οι θερμοδυναμικές, οι κινητικές και οι δομικές ιδιότητες των σχηματιζόμενων συμπλόκων [1]. Οι πρωτεΐνες σχηματίζονται μέσω της δημιουργίας πεπτιδικού δεσμού μεταξύ της ελεύθερης καρβοξυλικής ομάδας ενός αμινοξέος με την ελεύθερη αμινομάδα του επόμενου αμινοξέος η οποία συνοδεύεται από την απελευθέρωση ενός μορίου νερού, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 [2], [3].



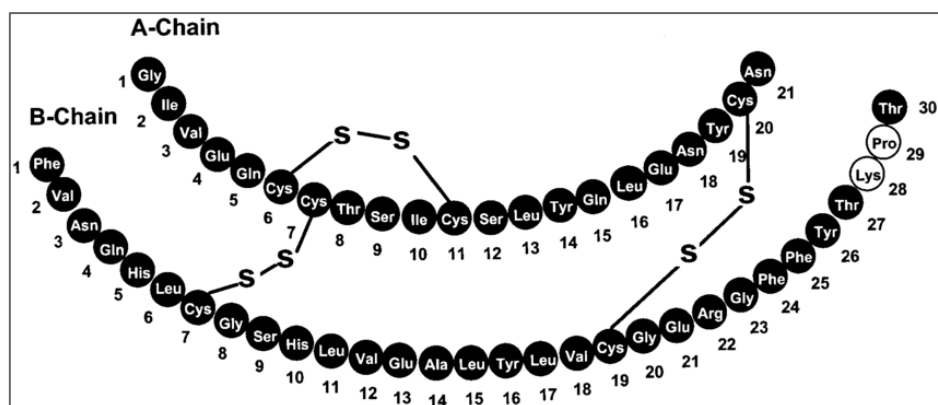
Εικόνα 1. Ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού (peptide bond) μεταξύ δύο αμινοξέων [2].

Οι πρωτεΐνες αποτελούν τις πλέον κοινές και αποτελεσματικές περιοχές ένταξης των μεταλλικών ιόντων στα βιολογικά συστήματα, ενώ έχει αποδειχθεί πως πάνω από το 30% των κυτταρικών πρωτεϊνών συμπλοκοποιούν τουλάχιστον ένα μεταλλικό ιόν [3], [4].

Τα πεπτίδια αποτελούν δομές αμινοξέων που συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς, αλλά η έκτασή τους είναι μικρότερη από αυτή των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Αυτό το χαρακτηριστικό, δίνει τη δυνατότητα εύκολης σύνθεσης και προσομοίωσης-μίμησης μίας συγκεκριμένης περιοχής ή αλληλουχίας κάποιας πρωτεΐνης η οποία είτε θα είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση της πρωτεΐνης με κάποιο μεταλλικό ιόν, είτε θα διαδραματίζει σημαντικό δομικό ή λειτουργικό ρόλο [3].

Η βασική πειραματική παρατήρηση που οδήγησε στη μεθοδική μελέτη της αλληλεπίδρασης των μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια ήταν η ικανότητα αποπρωτονίωσης και ένταξης των αμιδικών ατόμων N των πεπτιδικών δεσμών με το μεταλλικό ιόν, μετά την αρχική ένταξη του μεταλλικού ιόντος με το πεπτίδιο. Οι αρχικές μελέτες ξεκίνησαν περίπου τη δεκαετία του 1960 με τη συνεχή πρόοδο στη Βιοανόργανη Χημεία να δίνει την ώθηση στους επιστήμονες για τη μελέτη όλο και περισσότερων πεπτιδίων ως προς τις ιδιότητες ένταξής τους με τα μεταλλικά ιόντα [1], [5].

Μεγάλος αριθμός πεπτιδίων έχει αποδειχθεί πως επηρεάζει σημαντικές βιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό, όπως ο μεταβολισμός, ενώ σημαντικός είναι κι ο ρόλος που διαδραματίζουν τα πεπτίδια σχετικά με τη λειτουργία διάφορων ορμονών και νευροδιαβιβαστών. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμα φάρμακα πεπτιδίων για την αντιμετώπιση διάφορων διαταραχών της φυσιολογίας του ανθρώπινου οργανισμού. Το πιο αξιοσημείωτο παράδειγμα ουσίας με φαρμακευτική δράση που περιέχει στη δομή της αλληλουχίες πεπτιδίων είναι αυτό της ινσουλίνης η οποία απομονώθηκε, περίπου, το 1920 και χορηγήθηκε σε ασθενείς που έπασχαν από διαβήτη και δεν παρήγαγαν φυσιολογικά τη συγκεκριμένη ορμόνη (Εικόνα 2) [6], [7]. Άξιο αναφοράς είναι, επίσης, το γεγονός πως πολυάριθμα και διαφορετικά πεπτίδια αποτελούν φυσιολογικά συστατικά των κυττάρων, αλλά και των πρωτεϊνικών υγρών του ανθρώπινου οργανισμού [8].



Εικόνα 2. Η δομή της ινσουλίνης. Αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες ενωμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ αμινοξέων κυστεΐνης[6,7].

Τα μεταλλικά ιόντα μπορεί να αποτελούν μέρος μιας οργανομεταλλικής ή μη σύμπλοκης ένωσης με κάποιο πεπτίδιο που δημιουργείται και προϋπάρχει υπό φυσιολογικές συνθήκες στον οργανισμό, είτε να αλληλεπιδρούν με τα πεπτίδια σε περίπτωση που βρεθούν κοντά σε αυτά και στην κατάλληλη θέση-περιοχή. Τα ενταγμένα, με τα πεπτίδια, μεταλλικά ιόντα σε πολλές περιπτώσεις είναι υπεύθυνα για πολυάριθμες βιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό (π.χ. οξειδοαναγωγικές διεργασίες), ενώ συχνά εμπλέκονται και συμμετέχουν και σε καταλυτικές διεργασίες. Επιπροσθέτως, η αλληλεπίδραση πεπτιδίου-μεταλλικού ιόντος είναι πιθανό να προκαλέσει δομικές τροποποιήσεις σε ορισμένα βιομόρια αποδεικνύοντας την έμμεση επιρροή της στη λειτουργία των βιολογικών συστημάτων. Επίσης, ορισμένα πεπτίδια και πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να συμβάλλουν στην αποτοξίνωση του οργανισμού από βαρέα μεταλλικά ιόντα μέσω της συμπλοκοποίησής τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι μεταλλοθειονίνες που είναι πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη και έχουν την ικανότητα δέσμευσης μεταλλικών ιόντων τα οποία είναι πιθανό να προκαλέσουν τοξικότητα στον οργανισμό (π.χ. Cd, Hg, As) [5], [8], [9], [10].

Επομένως, προκειμένου να γίνει κατανοητός ο ρόλος που διαδραματίζουν τα μεταλλικά ιόντα κατά την αλληλεπίδρασή τους με τα διάφορα πεπτίδια κρίνεται απαραίτητη η εμβάθυνση στον γενικό μηχανισμό και τις ιδιότητες ένταξης μεταλλικού ιόντος-πεπτιδίου.

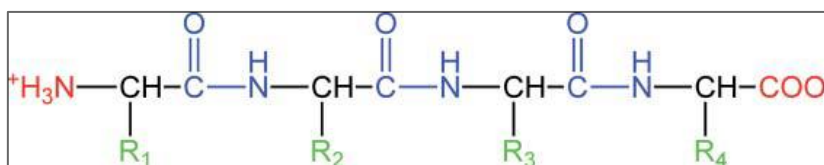
1.1 Ιδιότητες, μηχανισμός και αρχές ένταξης μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια.

Τα πεπτίδια αποτελούν πολύ αποτελεσματικούς και συχνά εκλεκτικούς υποκαταστάτες για πληθώρα μεταλλικών ιόντων. Η σύνδεση των πεπτιδίων με τα μεταλλικά ιόντα βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ ενός δότη ηλεκτρονίων που βρίσκεται στη δομή του πεπτιδίου (βάση κατά Lewis) κι ενός δέκτη ηλεκτρονίων, όπως τα μεταλλικά ιόντα που έχουν μία ή περισσότερες θέσεις ένταξης ελεύθερες (οξέα κατά Lewis). Έτσι, το σχηματιζόμενο σύμπλοκο προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ μιας βάσης κι ενός οξέος κατά Lewis [11], [12], [13].

Ωστόσο, για να είναι εφικτός ο σχηματισμός συμπλόκου είναι απαραίτητο να πληρούνται ορισμένες προϋποθέσεις:

1. ο υποκαταστάτης (πεπτίδιο) να έχει διαθέσιμες λειτουργικές θέσεις ελεύθερες για τη δημιουργία δεσμού ένταξης με το μεταλλικό ιόν,
2. το μεταλλικό ιόν να διαθέτει ελεύθερες θέσεις ένταξης,
3. στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο να μην υφίστανται στερικές παρεμποδίσεις,
4. η αντίδραση συμπλοκοποίησης να είναι θερμοδυναμικά εφικτή [11].

Οι πιθανές θέσεις μέσω των οποίων ένα πεπτίδιο μπορεί να αλληλεπιδράσει με ένα μεταλλικό ιόν είναι το N της N-τελικής αμινομάδας, το τερματικό O της C-τελικής καρβοξυλομάδας, το O της καρβonyλομάδας του πεπτιδικού δεσμού, το αμιδικό N του πεπτιδικού δεσμού (υπό κατάλληλες προϋποθέσεις) και άτομα-δότες ηλεκτρονίων των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων που συγκροτούν το πεπτίδιο (Εικόνα 3) [1], [8], [12], [13], [14].

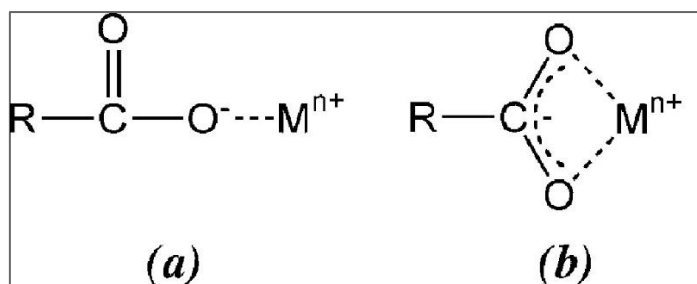


Εικόνα 3. Πιθανές θέσεις αλληλεπίδρασης πεπτιδίων με μεταλλικά ιόντα.

Κόκκινο: N-τελική αμινομάδα και C-τελική καρβοξυλομάδα, *Μπλε:* Πεπτιδικός δεσμός, *Πράσινο:* Πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων [8].

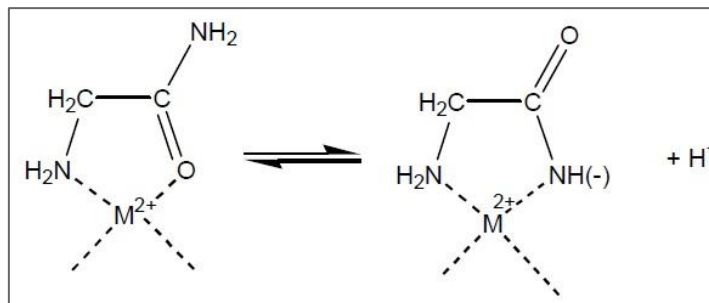
Σε περίπτωση που οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων του πεπτιδίου δεν περιέχουν άτομα ικανά να ενταχθούν με το μεταλλικό ιόν, η ένταξη μπορεί να ξεκινήσει είτε από τη N-τελική αμινομάδα, είτε από τη C-τελική καρβοξυλομάδα, σε περίπτωση που αυτές δεν είναι προστατευμένες.

Η ένταξη μέσω της C-τελικής καρβοξυλομάδας, είτε μονοδοντικά μέσω του τερματικού της οξυγόνου, είτε διδοντικά με τη συμμετοχή και της καρβοξυλικής αλυσίδας πέρα του τερματικού οξυγόνου δεν ευνοείται καθώς τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα δεν σταθεροποιούνται σε φυσιολογικές τιμές pH σε υδατικά διαλύματα, με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα πιθανή η υδρόλυση και η αποσύνδεση της καρβοξυλομάδας από το μεταλλικό ιόν (Εικόνα 4) [1], [8], [12].



Εικόνα 4. Πιθανοί τρόποι ένταξης C-τελικής καρβοξυλομάδας με μεταλλικό ιόν. (a): Μονοδοντικός τρόπος ένταξης, (b): διδοντικός τρόπος ένταξης [8].

Αντίθετα, η ένταξη μέσω της N-τελικής αμινομάδας σε συνδυασμό με την ύπαρξη σε ευνοϊκή θέση για ένταξη του O της καρβονυλομάδας του πεπτιδικού δεσμού οδηγεί σε θερμοδυναμικά σταθερό σύμπλοκο. Η θερμοδυναμική σταθερότητα οφείλεται κατά μεγάλο βαθμό στη δημιουργία 5-μελούς χηλικού δακτυλίου με άτομα δότες τόσο το N της N-τελικής αμινομάδας, όσο και το O της καρβονυλομάδας του (πρώτου) πεπτιδικού δεσμού, ενώ λαμβάνει χώρα σε τιμές pH κάτω από 4 (Εικόνα 5) [1], [8], [12], [13], [14].



Εικόνα 5. Ένταξη του μεταλλικού ιόντος μέσω της N-τελικής αμινομάδας που οδηγεί σε χηλικό δακτύλιο [12].

Η ένταξη των μεταλλικών ιόντων διδοντικά μέσω της N-τελικής αμινομάδας και της C-τελικής καρβοξυλομάδας δεν ευνοείται ακόμα και στο πιο απλό διπεπτίδιο λόγω στερικών παρεμποδίσεων και μεγάλης απόστασης των ατόμων δοτών [1].

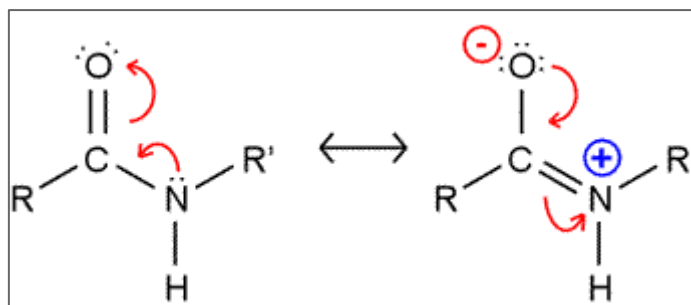
Επομένως, ο πιθανότερος τρόπος έναρξης της ένταξης του μεταλλικού ιόντος με ένα πεπτίδιο είναι μέσω της N-τελικής αμινομάδας, σε περίπτωση που αυτή δεν είναι προστατευμένη και δεν υπάρχουν αμινοξέα με πλευρικές αλυσίδες που μπορεί να

επηρεάζουν τον τρόπο ένταξης (π.χ. ιστιδίνη ή κυστεΐνη). Ταυτόχρονα, πεπτίδια που περιέχουν ελεύθερη N-τελική αμινομάδα από την οποία ξεκινάει η ένταξη, ενώ το μεταλλικό ιόν με το οποίο δημιουργούν σύμπλοκα είναι το Ni(II) ή ο Cu(II) ονομάζονται και «μοτίβα» ATCUN (Amino-Terminal Copper and Nickel motifs).

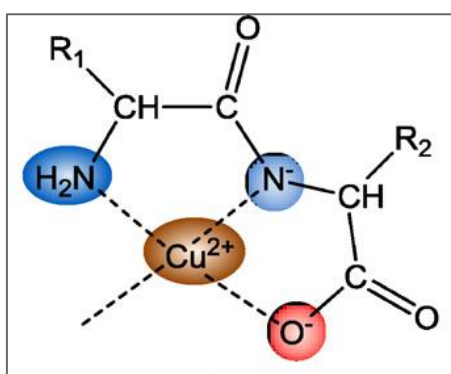
1.2 Αποπρωτονίωση κι ένταξη του αμιδικού ατόμου αζώτου.

Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 1, η κύρια πειραματική διαπίστωση που οδήγησε σε εκτεταμένη μελέτη της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων με τα μεταλλικά ιόντα ήταν η δυνατότητα ένταξης του αμιδικού ατόμου N των πεπτιδικών δεσμών. Για να ενταχθεί, ωστόσο, το αμιδικό άτομο N του πεπτιδικού δεσμού, είναι απαραίτητο να αποπρωτονιωθεί.

Ο πεπτιδικός δεσμός έχει την ικανότητα να σταθεροποιείται μέσω του φαινομένου του συντονισμού, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τόσο η πρωτονίωση, όσο και η αποπρωτονίωση του αμιδικού ατόμου N να μην πραγματοποιείται σε φυσιολογικές τιμές pH. Πιο συγκεκριμένα, η αποπρωτονίωση πραγματοποιείται σε $\text{pH} > 14$ και η πρωτονίωση σε $\text{pH} < 0$. Ωστόσο, με την αρχική ένταξη του μεταλλοϊόντος μέσω της N-τελικής αμινομάδας και τον σχηματισμό 5-μελούς χηλικού δακτυλίου, η τιμή pK_a για την αποπρωτονίωση του αμιδικού ατόμου N, μειώνεται πολύ (τιμές περίπου 4.5-5,5) για ιόντα Cu(II). Έτσι, το μεταλλικό ιόν μετά την αρχική ένταξή του μέσω της N-τελικής αμινομάδας (pH περίπου 4 για ιόντα Cu(II)) και με την αύξηση του pH αποσυνδέεται από το O της καρβονυλομάδας του πρώτου πεπτιδικού δεσμού, συνδέεται με το άτομο N του πρώτου πεπτιδικού δεσμού και με το O της καρβονυλομάδας του δεύτερου πεπτιδικού δεσμού. Σε αυτό το στάδιο, το μεταλλικό ιόν έχει στη σφαίρα ένταξής του 2 άτομα N κι ένα άτομο O, ενώ έχει δημιουργηθεί ένα θερμοδυναμικά σταθερό σύμπλοκο με δύο χηλικούς δακτύλιους (Εικόνα 7) [1], [8], [13], [14].

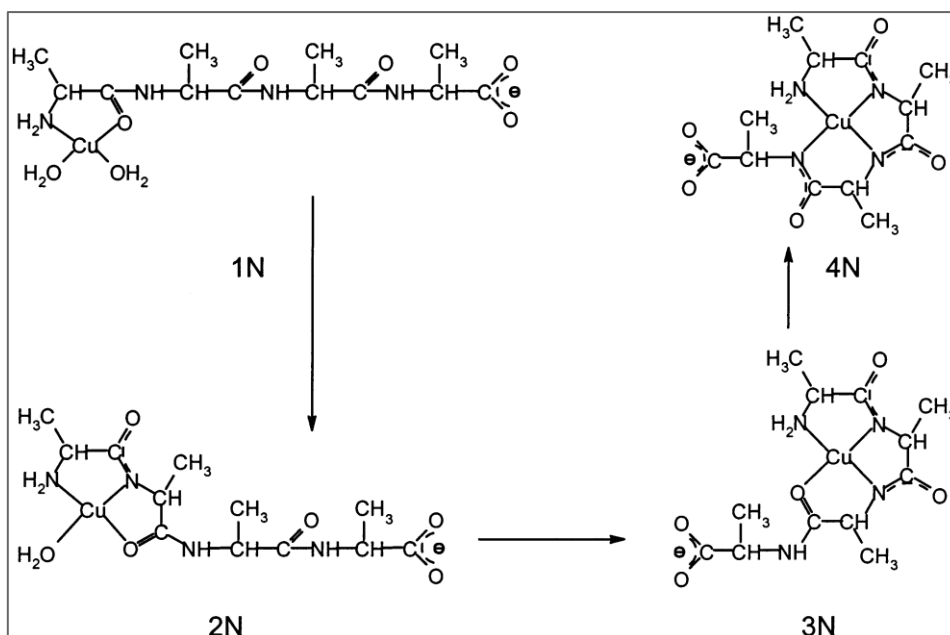


Εικόνα 6. Το φαινόμενο του συντονισμού που σταθεροποιεί τον πεπτιδικό δεσμό [Ιστοσελίδα: <http://guweb2.gonzaga.edu/>].



Εικόνα 7. Σύμπλοκο με δύο 5-μελείς χηλικούς δακτυλίους που δημιουργείται μετά την ένταξη του πρώτου αμιδικού ατόμου N [1].

Μετά την ένταξη του αμιδικού ατόμου αζώτου του πρώτου πεπτιδικού δεσμού, με τον ίδιο τρόπο συνεχίζεται η ένταξη και των επόμενων αμιδικών ατόμων αζώτου με σταδιακή αύξηση του pH, όσον αφορά κυρίως τα ιόντα Cu(II). Δηλαδή, σταδιακά αποπρωτονιώνονται με την αύξηση του pH τα αμιδικά άτομα N των επόμενων πεπτιδικών δεσμών κι εντάσσονται μέχρι που στην σφαίρα ένταξης του μεταλλικού ιόντος να υπάρχουν 4 άτομα N (Εικόνα 8) [13].



Εικόνα 8. Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται με τις διαδοχικές αποπρωτονιώσεις κι εντάξεις των αμιδικών ατόμων N στο πεπτίδιο τετρααλανίνη [13].

1.3 Ο ρόλος των αμινοξέων στην ένταξη μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων.

Παρά τον γενικό μηχανισμό που περιγράφηκε στην Ενότητα 1.2, ο τρόπος ένταξης, η σταθερότητα και η διαμόρφωση των σχηματιζόμενων συμπλόκων επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την πρωτοταγή δομή των πεπτιδίων, δηλαδή, από τα αμινοξέα που τα απαρτίζουν.

Αρχικά, αξίζει να σημειωθεί πως αν και ορισμένα αμινοξέα της αμινοξικής αλληλουχίας του πεπτιδίου μπορεί να μην περιέχουν άτομα-δότες ικανά να ενταχθούν με το μεταλλικό ιόν, το μέγεθος των πλευρικών τους αλυσίδων είναι πιθανό να δημιουργεί στερικές παρεμποδίσεις. Οι συγκεκριμένες στερικές παρεμποδίσεις προκαλούν μείωση της θερμοδυναμικής σταθερότητας των σχηματιζόμενων συμπλόκων, ενώ επηρεάζεται και η δομική τους διαμόρφωση. Τέτοια αμινοξέα είναι η λευκίνη, η τρυπτοφάνη και η φαινυλαλανίνη [1], [8], [13].

Παράλληλα, σημαντική μείωση στη θερμοδυναμική σταθερότητα είναι πιθανό να προκαλέσει η ύπαρξη αμινοξέων με πλευρικές αλυσίδες στις οποίες εμπεριέχονται συγκεκριμένες ομάδες που μπορεί να αλληλεπιδράσουν με το μεταλλικό ιόν με άλλου τύπου αλληλεπιδράσεις, πέρα από τη δημιουργία του δεσμού ένταξης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων αμινοξέων είναι η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη και η τρυπτοφάνη

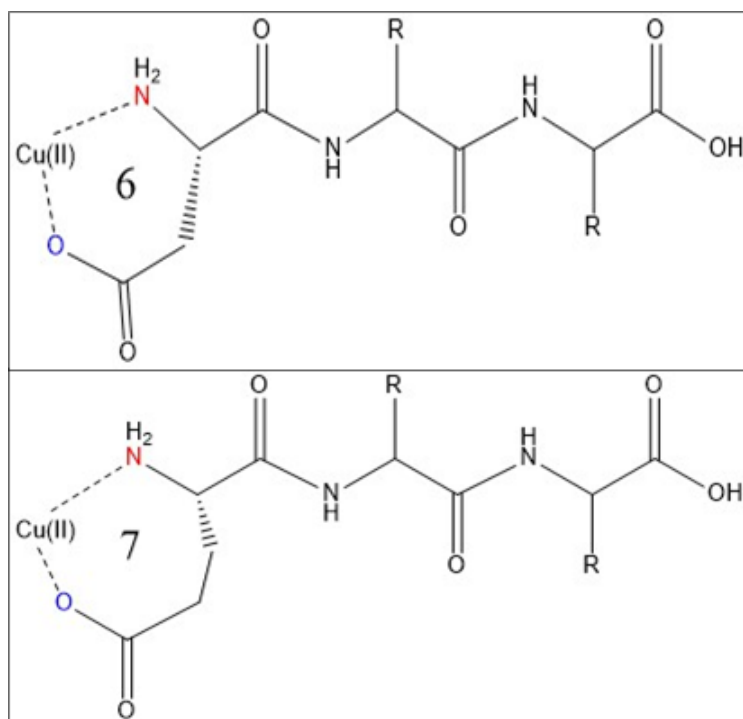
που περιέχουν στη δομή τους αρωματικούς δακτυλίους που μπορεί να αλληλεπιδράσουν με το μεταλλικό ιόν σταθεροποιώντας μία συγκεκριμένη δομή του πεπτιδίου η οποία πιθανώς να μην είναι η αναμενόμενη και να στερείται θερμοδυναμικής σταθερότητας [1], [8], [13].

Από την άλλη πλευρά, οι πλευρικές αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων μπορεί να περιέχουν άτομα δότες ηλεκτρονίων ικανά να ενταχθούν με το μεταλλικό ιόν, όπως το O της υδροξυλομάδας (-OH) της σερίνης ή της θρεονίνης, το S της σουλφυδρυλομάδας (-SH) της κυστεΐνης, το O της β-καβοξυλομάδας (-COOH) της πλευρικής αλυσίδας του ασπαρτικού ή του γλουταμινικού οξέος και το N₃ του ημιδαζολίου τους ιστιδίνης. Ωστόσο, δεν εντάσσονται το ίδιο ισχυρά με τα μεταλλικά ιόντα όλες οι παραπάνω ομάδες [1], [8], [13].

Πιο συγκεκριμένα, η υδροξυλομάδα της σερίνης ή της θρεονίνης δεν εμφανίζει υψηλή συγγένεια ως προς τη σύνδεσή της με τα μεταλλικά ιόντα. Παρ' όλα αυτά, σε ορισμένες περιπτώσεις η ύπαρξή τους είναι πιθανό να προκαλέσει μικρή ενίσχυση της θερμοδυναμικής σταθερότητας είτε άμεσα μέσω της αλληλεπίδρασης της υδροξυλομάδας με το μεταλλικό ιόν στο ισημερινό ή το αξονικό επίπεδο, είτε έμμεσα μέσω των δεσμών υδρογόνου στους οποίους μπορεί να συμμετέχει με ένα ενταγμένο μόριο νερού. Αντίστοιχα μικρή σταθερά σύνδεσης με τα μεταλλικά ιόντα εμφανίζει και η ένταξη της υδροξυλομάδας του φαινολικού δακτυλίου τους τυροσίνης η οποία, όμως, δεν πραγματοποιείται σε φυσιολογικές τιμές pH (pH 9-10) [1], [9].

Αντίθετα, η ύπαρξη του ασπαρτικού ή του γλουταμικού οξέος μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό θερμοδυναμικά σταθερών συμπλόκων μέσω της δημιουργίας χηλικών δακτυλίων με τη συμμετοχή του O της β ή γ-καβοξυλομάδας των πλευρικών τους αλυσίδων αντίστοιχα. Ειδικότερα, αν τα συγκεκριμένα αμινοξέα βρεθούν στις πρώτες θέσεις της αμινοξικής αλληλουχίας ως προς το N-τελικό άκρο, η ένταξή τους οδηγεί στον σχηματισμό χηλικού δακτυλίου με τη συμμετοχή του N της N-τελικής αμινομάδας, του O της β-καβοξυλομάδας του ασπαρτικού ή γ- του γλουταμικού οξέος κι όχι με το άτομο O της καρβονυλομάδας του πρώτου πεπτιδικού δεσμού, όπως θα αναμέναμε. Ως αποτέλεσμα προκύπτουν τόσο θερμοδυναμικά σταθερά σύμπλοκα, ώστε η ένταξη να μην μπορεί να συνεχιστεί περαιτέρω σε φυσιολογικές τιμές pH καθώς δεν είναι δυνατός ο ιονισμός και η ένταξη των επόμενων αμιδικών ατόμων N. Αξίζει να σημειωθεί πως με τη συμμετοχή του ασπαρτικού οξέος στην πρώτη θέση ως προς

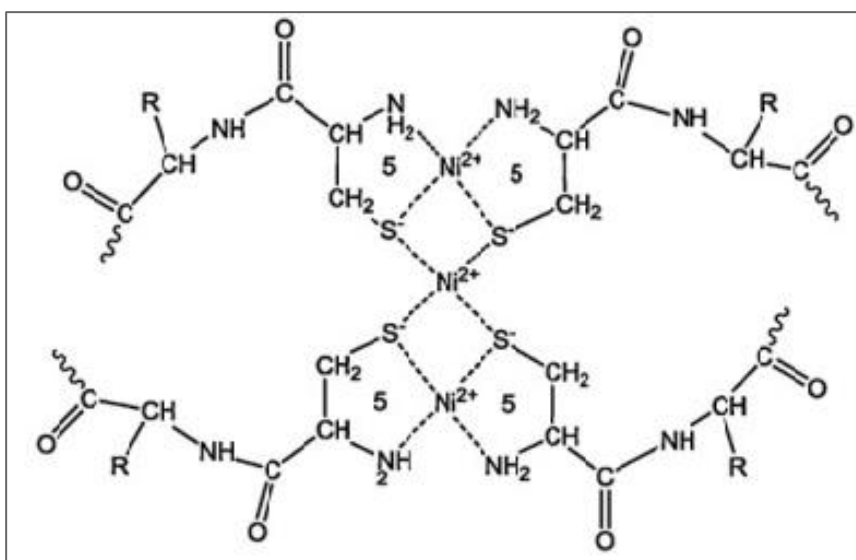
το N-τελικό άκρο σχηματίζεται 6-μελής χηλικός δακτύλιος (με τη συμμετοχή και της N-τελικής αμινομάδας) ο οποίος προσδίδει περισσότερη θερμοδυναμική σταθερότητα από τον αντίστοιχο 7-μελή που δημιουργείται με τη συμμετοχή του γλουταμικού οξέος, ενώ και στις δύο περιπτώσεις παρεμποδίζεται ο ιονισμός και η ένταξη του πρώτου αμιδικού ατόμου αζώτου (Εικόνα 9) [1], [14], [15], [16].



Εικόνα 9. Τρόπος ένταξης πεπτιδίων που περιέχουν το ασπαρτικό οξύ (πάνω) και το γλουταμικό οξύ (κάτω). Οι αριθμοί υποδηλώνουν τον αριθμό των ατόμων-μελών των σχηματιζόμενων χηλικών δακτυλίων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και τα πεπτίδια που φέρουν την κυστεΐνη σε θέση κατάλληλη για ένταξη με το μεταλλικό ιόν. Η ένταξη του S της σουλφυδρυλομάδας της κυστεΐνης με τα μεταλλικά ιόντα είναι ιδιαίτερα εκλεκτική. Γενικά, τα πεπτίδια με κυστεΐνη σχηματίζουν ισχυρό ομοιοπολικό δεσμό με σχετικά μαλακά μεταλλικά ιόντα (π.χ. Pd(II), Pt(II), Cd(II), Hg(II)) και με τα απαραίτητα 3d μεταλλικά ιόντα (π.χ. Cu(I), Ni(II), Zn(II), Fe(II)), ιδιαίτερα όταν σχηματίζονται χηλικοί δακτύλιοι με τη συμμετοχή και ατόμου N, πέρα από το άτομο S. Αν και η ένταξη μέσω της κυστεΐνης είναι αρκετά σταθερή θερμοδυναμικά, η δυνατότητα της σουλφυδρυλομάδας να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικά ενεργά συστήματα, μπορεί να προκαλέσει την αναγωγή των μεταλλικών ιόντων με αποτέλεσμα να αλλάξει η

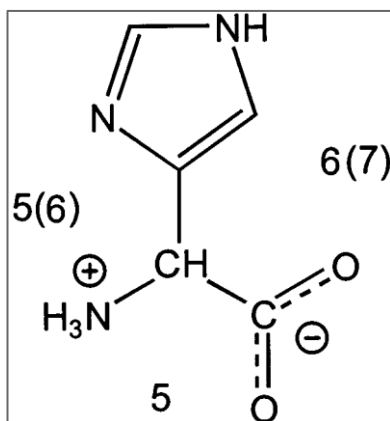
διαμόρφωση του σχηματιζόμενου συμπλόκου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα σύμπλοκα των πεπτιδίων που περιέχουν κυστεΐνη με Cu(II) στα οποία παρατηρείται γρήγορη αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I). Με την αναγωγή των μεταλλικών ιόντων, η σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης οξειδώνεται με αποτέλεσμα τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τον τρόπο ένταξης του πεπτιδίου με το μεταλλικό ιόν. Επίσης, αξιοσημείωτη είναι η ικανότητα γεφύρωσης μέσω της σουλφυδρυλομάδας με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πολυπυρηνικών συμπλόκων, όπως αυτό της Εικόνας 10 [1], [17], [18], [19].



Εικόνα 10. Τριπυρηνικό σύμπλοκο Ni^{2+} με πεπτίδια στο οποίο οι σουλφυδρυλομάδες δρουν ως γέφυρες μεταξύ των ιόντων Ni^{2+} , ενώ παρατηρούνται και σχηματιζόμενοι 5-μελείς χηλικοί δακτύλιοι με τη συμμετοχή του S της κυστεΐνης και του N της αμινομάδας του N-τελικού άκρου [10].

1.4 Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν το αμινοξύ ιστιδίνη.

Το αμινοξύ που έχει τις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές και συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον σχετικά με την ένταξή του με τα μεταλλικά ιόντα είναι η ιστιδίνη, μέσω του N₃ του ημιδαζολίου της, έχοντας, παράλληλα, την ικανότητα σχηματισμού χηλικών δακτυλίων (Εικόνα 11). Ο δεσμός του ημιδαζολικού ατόμου N της ιστιδίνης με τα μεταλλικά ιόντα αποτελεί συχνό φαινόμενο στο ενεργό κέντρο πολλών μεταλλοπρωτεϊνών [1], [3], [13].



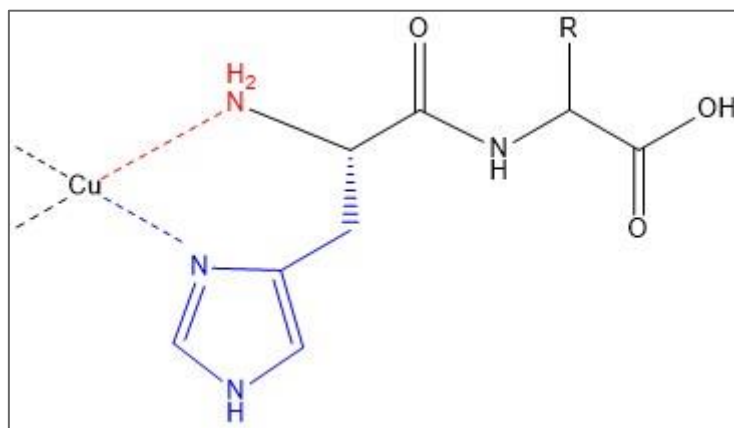
Εικόνα 11. Η δομή της ιστιδίνης. Οι αριθμοί υποδηλώνουν τον αριθμό ατόμων-μελών των χηλικών δακτυλίων που μπορούν να δημιουργηθούν [13].

Αρχικά, το N₃ του ημιδαζολίου της ιστιδίνης μπορεί να αποτελέσει την αρχική θέση ένταξης σε περίπτωση που η N-τελική αμινομάδα είναι προστατευμένη ή ακόμα και σε περιπτώσεις που η ιστιδίνη απέχει αρκετά από την N-τελική αμινομάδα (συνήθως πάνω από 2-3 θέσεις στην αμινοξική αλληλουχία). Ωστόσο, σε αυτές τις περιπτώσεις ο τρόπος ένταξης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος κι όχι ξεκάθαρος [1], [3], [19], [20], [21].

Στην περίπτωση που η N-τελική αμινομάδα είναι ελεύθερη, η θέση της ιστιδίνης μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τον τρόπο ένταξης και τη θερμοδυναμική σταθερότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων, ειδικότερα αν βρεθεί στις πρώτες τρεις θέσεις της αμινοξικής αλληλουχίας. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται οι εξής περιπτώσεις:

i. Ιστιδίνη στη θέση 1- Ένταξη τύπου ισταμίνης:

Στην περίπτωση που η ιστιδίνη βρεθεί στην πρώτη θέση της αμινοξικής αλληλουχίας ως προς τη Ν-τελική αμινομάδα κι αυτή δεν είναι προστατευμένη, τότε πραγματοποιείται ένας τρόπος ένταξης που ονομάζεται ένταξη τύπου ισταμίνης. Ο συγκεκριμένος τρόπος ένταξης περιλαμβάνει τη δημιουργία 6-μελούς χηλικού δακτυλίου του μεταλλικού ιόντος με το πεπτίδιο, με τη συμμετοχή του Ν της Ν-τελικής αμινομάδας, αλλά και του Ν₃ της ιστιδίνης (Εικόνα 12). Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός συμπλόκου μεγάλης θερμοδυναμικής σταθερότητας (λόγω του χηλικού δακτυλίου) το οποίο σχηματίζεται σε φυσιολογικές τιμές pH και παρεμποδίζει τον ιονισμό και την ένταξη των αμιδικών ατόμων αζώτου των πεπτιδικών δεσμών [1].

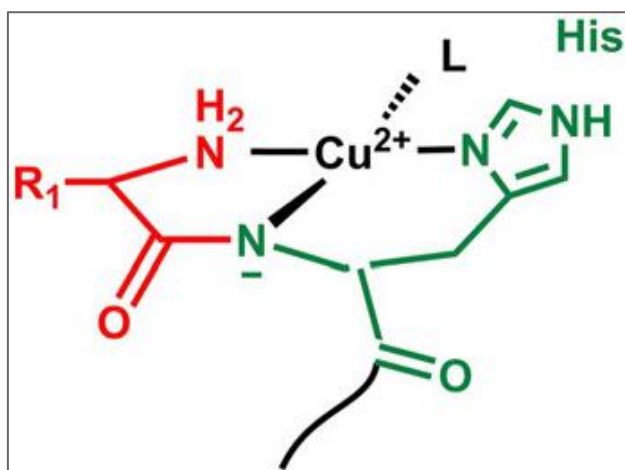


Εικόνα 12. Σύμπλοκο Cu^{2+} με πεπτίδια που περιέχουν την ιστιδίνη στην πρώτη θέση της αμινοξικής αλληλουχίας με ένταξη τύπου ισταμίνης και δημιουργία 6-μελούς χηλικού δακτυλίου.

ii. Ιστιδίνη στη θέση 2- Σύμπλοκα 3N:

Στην περίπτωση που η ιστιδίνη βρεθεί στη δεύτερη θέση της αμινοξικής αλληλουχίας ως προς τη μη προστατευμένη Ν-τελική αμινομάδα, τότε η ένταξη ξεκινά με το Ν της Ν-τελικής αμινομάδας και το Ο της καρβονυλομάδας του πρώτου πεπτιδικού δεσμού, σε τιμές $pH \approx 4$ για τα ιόντα $Cu(II)$, σχηματίζοντας έναν 5-μελή χηλικό δακτύλιο. Στη συνέχεια, ιονίζεται και εντάσσεται το αμιδικό Ν του πρώτου πεπτιδικού δεσμού (αυτού μεταξύ του πρώτου αμινοξέος και της ιστιδίνης)

και με τη συμμετοχή και του N₃ της ιστοιδίνης δημιουργείται κι ένας δεύτερος χηλικός δακτύλιος αποτελούμενος από 6 άτομα-μέλη. Ως αποτέλεσμα, δημιουργείται ένα ιδιαίτερα σταθερό θερμοδυναμικά σύμπλοκο το οποίο παρεμποδίζει την ένταξη και τον ιονισμό των αμιδικών ατόμων N των επόμενων πεπτιδικών δεσμών. Έτσι, σχηματίζονται 3N σύμπλοκα (NH₂, N⁻, N_{im}) με στοιχειομετρία MH₂L των οποίων το βασικό πλεονέκτημα σε σύγκριση με άλλα σύμπλοκα που περιέχουν την ιστοιδίνη είναι πως σχηματίζονται σε φυσιολογικές τιμές pH, περίπου στο 7 (Εικόνα 13). Ταυτόχρονα, η 4^η θέση ένταξης του μετάλλου στα 3N σύμπλοκα, αν και συχνά καταλαμβάνεται από ένα ενταγμένο μόριο H₂O, είναι διαθέσιμη για αλληλεπίδραση με άλλα συστήματα (π.χ. το N₃ του ημιδαζολίου της ιστοιδίνης ενός άλλου πεπτιδίου ή της ιστοιδίνης του ίδιου πεπτιδίου που μπορεί να βρεθεί στην κατάλληλη θέση για αλληλεπίδραση) παρέχοντας τη δυνατότητα περαιτέρω διερεύνησης του ρόλου των 3N συμπλόκων. [1], [20].

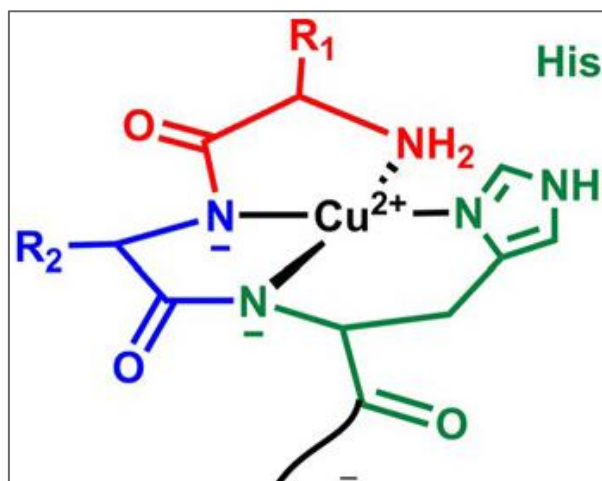


Εικόνα 13. 3N σύμπλοκο Cu²⁺ με πεπτιδίο που περιέχει την ιστοιδίνη στη δεύτερη θέση της αμινοξικής αλληλουχίας με δημιουργία ενός 5-μελούς κι ενός 6-μελούς χηλικού δακτυλίου [20].

iii. Ιστοιδίνη στη θέση 3- Σύμπλοκα 4N:

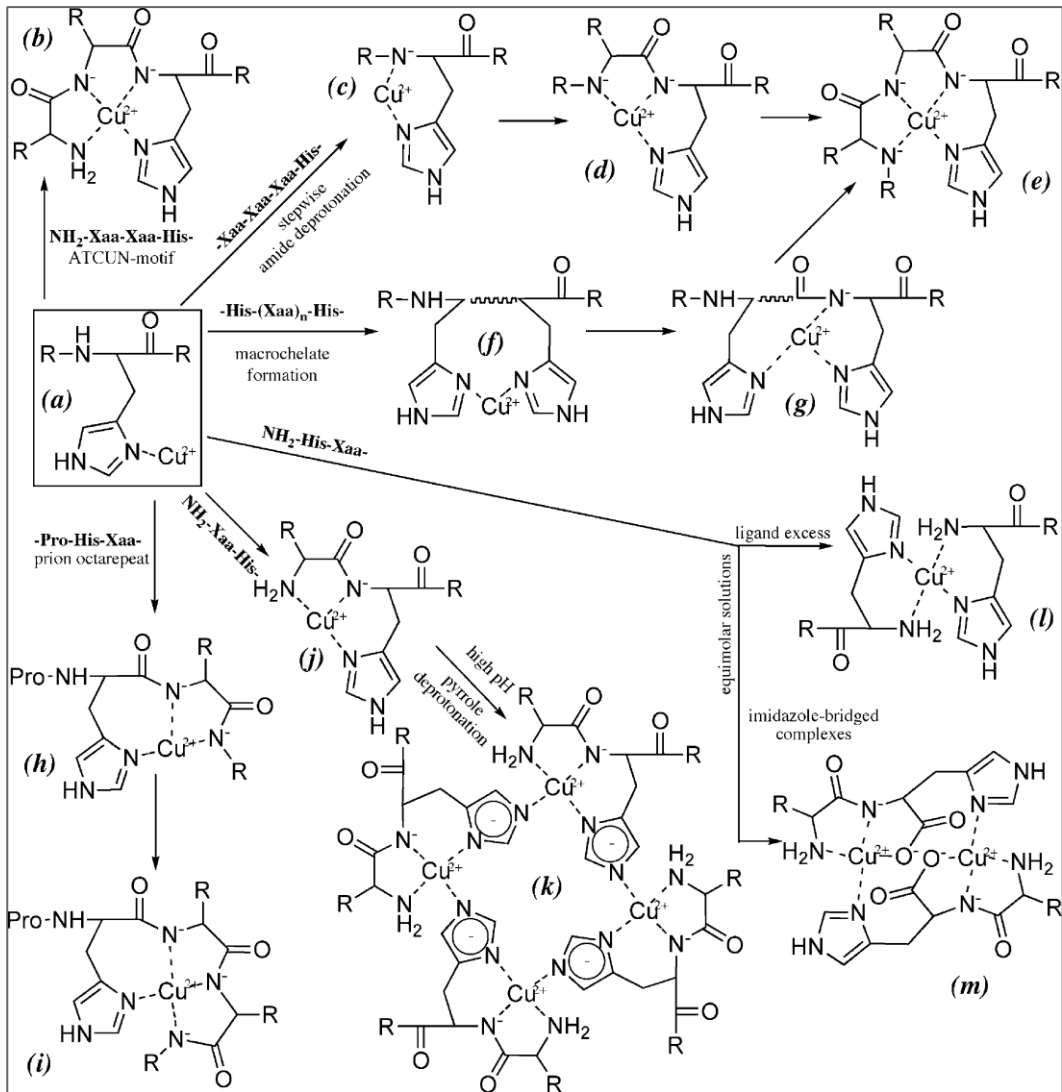
Στην περίπτωση που η ιστοιδίνη βρεθεί στην τρίτη θέση της αμινοξικής αλληλουχίας ως προς τη μη προστατευμένη N-τελική αμινομάδα, τότε σχηματίζονται 4N σύμπλοκα. Πιο συγκεκριμένα, εντάσσονται παράλληλα με ταυτόχρονη αύξηση του pH το N της N-τελικής αμινομάδας, το αμιδικό άτομο N του πρώτου πεπτιδικού δεσμού, το αμιδικό άτομο N του δεύτερου πεπτιδικού

δεσμού και τέλος το N₃ του ημιδαζολίου τους ιστιδίνης (NH₂, 2N⁻, N_{im}). Τα συγκεκριμένα σύμπλοκα (στοιχειομετρίας MH₂L) είναι θερμοδυναμικά σταθερά καθώς αποτελούνται από τρεις χηλικούς δακτυλίους (2 πενταμελείς και 1 εξαμελής), όπως φαίνεται στην Εικόνα 14, και σχηματίζονται σε τιμές pH>5-6 [1], [13], [20].



Εικόνα 14. 4N σύμπλοκο Cu²⁺ με πεπτιδίο που περιέχει την ιστιδίνη στην τρίτη θέση της αμινοξικής αλληλουχίας με δημιουργία δύο 5-μελών κι τους 6-μελούς χηλικού δακτυλίου [20].

Οι παραπάνω τρόποι ένταξης αποτελούν τους συχνότερους και πιθανότερους όσον αφορά τα πεπτιδία που περιέχουν ιστιδίνη στην αμινοξική τους αλληλουχία. Ωστόσο, αυτό δε σημαίνει πως είναι οι μοναδικοί, καθώς πολλοί παράγοντες μπορεί να επηρεάζουν τον τρόπο ένταξης πεπτιδίων με ένα ή περισσότερα αμινοξικά κατάλοιπα ιστιδίνης, ενώ οι συνδυασμοί αμινοξέων στην αλληλουχία των πεπτιδίων μπορεί να είναι απεριόριστοι. Μία προσπάθεια σύνοψης των σημαντικότερων τρόπων ένταξης-συμπλοκοποίησης παρουσιάζεται στην Εικόνα 15 [8].



Εικόνα 15. Σημαντικότερες πορείες ένταξης πεπτιδίων που περιέχουν ένα ή περισσότερα αμινοξέα ιστιδίνης με ιόντα Cu^{2+} [8].

1.5 Ο ρόλος των μεταλλικών ιόντων.

Στα περισσότερα παραδείγματα συμπλόκων πεπτιδίων-μεταλλικών ιόντων που αναφέρθηκαν στις προηγούμενες ενότητες, πρωταγωνιστικό ρόλο διαδραματίζουν τα σύμπλοκα που περιέχουν ως μεταλλικό ιόν, είτε τον Cu(II), είτε το Ni(II). Αυτά τα δύο μεταλλικά ιόντα επιλέγονται στις περισσότερες πορείες συμπλοκοποίησης καθώς παρουσία τους ευνοείται η αποπρωτονίωση και η ένταξη ενός ή περισσότερων αμιδικών ατόμων N του πεπτιδίου μιας και αποτελούν ισχυρά οξέα κατά Lewis. Παράλληλα, αυτά τα δύο μεταλλικά ιόντα έχουν την ικανότητα σχηματισμού 3N ή 4N συμπλόκων με την ένταξη των πεπτιδίων που έχουν ελεύθερη την N-τελική αμινομάδα (ATCUN). Η βασική διαφορά μεταξύ των συμπλόκων Cu(II) και Ni(II) είναι πως παρουσία Ni(II) απαιτούνται υψηλότερες τιμές pH για την αποπρωτονίωση του πρώτου αμιδικού ατόμου αζώτου, ενώ η αποπρωτονίωση των υπόλοιπων αμιδικών ατόμων αζώτου γίνεται συνεργατικά, κάτι που στον Cu(II) δε συμβαίνει καθώς η ένταξη των αμιδικών ατόμων N πραγματοποιείται με διαδοχική αύξηση της τιμής του pH κι όχι ταυτόχρονα. Επίσης, παρουσία ιόντων Ni(II) σε τιμές pH πάνω από 9 παρατηρείται αλλαγή της γεωμετρίας του συμπλόκου από οκταεδρική (high spin, παραμαγνητικό) σε επίπεδη τετραγωνική (low spin, διαμαγνητικό) λόγω της υψηλής ενέργειας διαχωρισμού του κρυσταλλικού πεδίου.

Εκτός από τα σύμπλοκα με Cu(II) και Ni(II) έχουν μελετηθεί και σύμπλοκα πεπτιδίων με διάφορα άλλα μεταλλικά ιόντα, όπως Pt(II), Pd(II), Co(II), Au(III) και Zn(II). Τα ιόντα Pt(II) και Au(III) αν και έχουν την ικανότητα να συμπλοκοποιούν τα πεπτίδια με παρόμοιο τρόπο με τον Cu(II), η κινητική των συγκεκριμένων αντιδράσεων είναι ιδιαίτερα αργή. Παράλληλα, τα ιόντα Co(II) εντάσσονται με τα πεπτίδια σε pH πάνω από 9, ενώ εμφανίζουν την ιδιότητα να οξειδώνονται εύκολα σε αλκαλικά διαλύματα σε Co(III), ενώ, αντίστοιχα, τα ιόντα Zn(II) εμφανίζουν μειωμένη οξύτητα κατά Lewis με αποτέλεσμα ο σχηματισμός των αναμενόμενων συμπλόκων να πραγματοποιείται σε υψηλές τιμές pH, πάνω από 9 [1], [20].

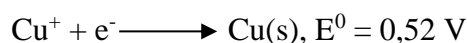
Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω χαρακτηριστικά πολυάριθμων μεταλλικών ιόντων σχετικά με την ικανότητα και τις ιδιότητες ένταξής τους με τα πεπτίδια, γίνεται εύκολα αντιληπτό πως τα ιόντα Cu(II) παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον ως προς την χημεία ένταξής τους με τα πεπτίδια, ενώ διαδραματίζουν και σπουδαίο βιοχημικό ρόλο.

Κεφάλαιο 2: Φυσικοχημικές και βιοχημικές ιδιότητες χαλκού.

2.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες και χημεία ένταξης του Cu(I/II).

Ο χαλκός (Copper, Cu) αποτελεί ένα στοιχείο της πρώτης σειράς μετάπτωσης του d-τομέα του περιοδικού πίνακα με ατομικό αριθμό 29 και ηλεκτρονιακή διαμόρφωση: $[Ar]3d^{10}4s^1$. Παρόλο που η d υποστιβάδα είναι πλήρως κατειλημμένη, εμφανίζει μειωμένη αποτελεσματικότητα σχετικά με τη θωράκιση του s ηλεκτρονίου από το πυρηνικό φορτίο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το πρώτο δυναμικό ιονισμού του Cu να είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο των αλκαλίων. Επίσης, ο Cu έχει υψηλότερο σημείο τήξης ($1084,6\text{ }^{\circ}\text{C}$) από τα αλκάλια εξαιτίας της συμμετοχής των ηλεκτρονίων της d υποστιβάδας στον μεταλλικό δεσμό. Οι οξειδωτικές βαθμίδες που επικρατούν είναι οι +1 και +2 [22].

Όσον αφορά τα ιόντα Cu(I), με ηλεκτρονιακή διαμόρφωση $[Ar]3d^{10}$, είναι διαμαγνητικά, χωρίς μονήρη ηλεκτρόνια. Είναι σχετικά ασταθή σε υδατικά διαλύματα με αποτέλεσμα να υφίστανται είτε οξείδωση προς σχηματισμό Cu(II) τα οποία έχουν υψηλότερες σταθερές σχηματισμού συμπλόκων, είτε αναγωγή προς σχηματισμό Cu(0). Τα δυναμικά αναγωγής των κύριων οξειδωτικών βαθμίδων του χαλκού είναι τα εξής:

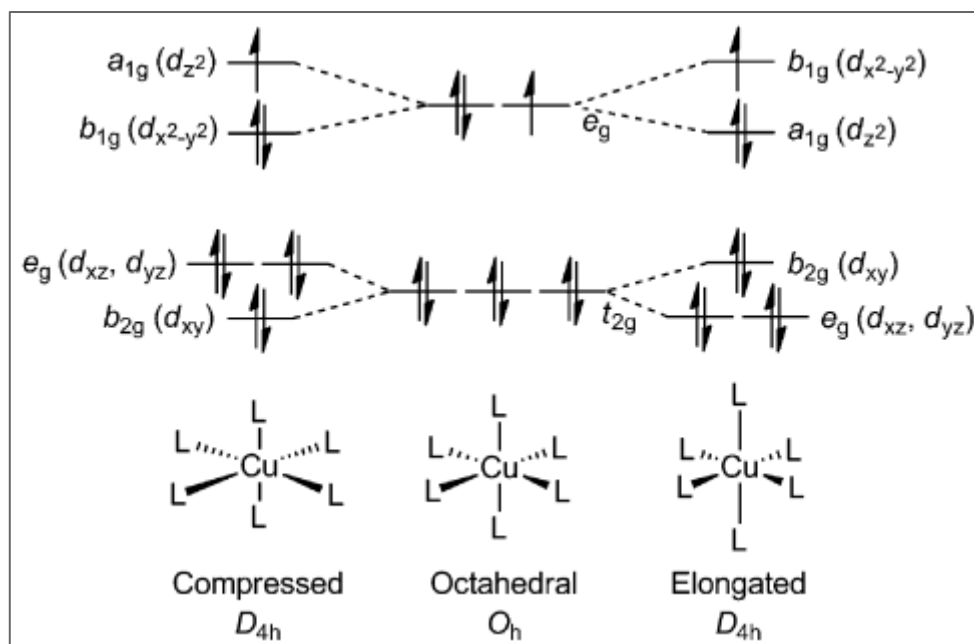


Τα σύμπλοκα των ιόντων Cu(I) χαρακτηρίζονται από αριθμό ένταξης 2 ή 4. Τα σύμπλοκα με αριθμό ένταξης 2 εμφανίζουν γραμμική γεωμετρία, ενώ τα αντίστοιχα με αριθμό ένταξης 4, τα οποία είναι και τα συχνότερα εμφανιζόμενα, εμφανίζουν τετραεδρική γεωμετρία. [22]

Τα ιόντα Cu(I) δρουν ως μαλακά οξέα με αποτέλεσμα να εμφανίζουν προτίμηση για δημιουργία συμπλοκών ενώσεων με υποκαταστάτες μαλακές βάσεις, όπως ομάδες με άτομα δότες S (π.χ. S κυστεΐνης ή μεθειονίνης) ή ομάδες με άτομα δότες N (π.χ. N N-τελικής αμινομάδας ή N_3 ημιδαζολίου ιστιδίνης). Η σταθερά σχηματισμού συμπλόκων με τα συγκεκριμένα αμινοξέα εξαρτάται από το pH. Σε pH 7,4 η σειρά δραστηρότητας είναι Κυστεΐνη>Ιστιδίνη>Μεθειονίνη, ενώ σε χαμηλότερο pH η σειρά δραστηρότητας είναι Κυστεΐνη>Μεθειονίνη>Ιστιδίνη, καθώς η ένταξη με το S της μεθειονίνης εξαρτάται από το pH [25].

Τα σύμπλοκα των Cu(II) είναι πολύ περισσότερο σταθερά σε υδατικά διαλύματα από τα αντίστοιχα με Cu(I), ενώ η οξειδωση των ιόντων Cu(II) σε Cu(III) είναι εξαιρετικά δύσκολη. Η ηλεκτρονιακή διαμόρφωση του Cu(II) είναι $[Ar]3d^9$ με αποτέλεσμα να είναι παραμαγνητικό, καθώς υπάρχει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο.

Οι κυριότεροι αριθμοί ένταξης των συμπλόκων Cu(II) είναι 4, 5 και 6, οπότε οι γεωμετρίες των συμπλόκων είναι επίπεδη τετραγωνική ή παραμορφωμένη τετραεδρική, τετραγωνική πυραμίδα και παραμορφωμένη οκταεδρική, αντίστοιχα. Ωστόσο, σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις λόγω της d^9 διαμόρφωσης του Cu(II) παρατηρούνται στερεοχημικές παραμορφώσεις που οδηγούν σε διαφοροποιημένες-παραμορφωμένες γεωμετρίες σε σχέση με τις αναμενόμενες. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι αυτό του παραμορφωμένου οκταέδρου, όταν ο αριθμός ένταξης είναι 6. Τα συγκεκριμένα σύμπλοκα υφίστανται παραμόρφωση Jahn-Teller που οδηγεί στον σχηματισμό τεσσάρων δεσμών Cu-L στο επίπεδο και δύο επιμηκυμένων (ή συρρικνωμένων) αξονικών δεσμών Cu-L εκτός επιπέδου που βρίσκονται σε διαμόρφωση trans μεταξύ τους (Εικόνα 16). [22, 27, 28]



Εικόνα 16. Παραμορφώσεις Jahn-Teller των οκταεδρικών d^9 συμπλόκων του Cu(II).

Αριστερά της κλασικής οκταεδρικής γεωμετρίας (Octahedral) παρατηρούμε τη συρρίκνωση των δύο αξονικών trans δεσμών Cu-L (Compressed) και δεξιά της την επιμήκυνση των δύο αξονικών trans δεσμών Cu-L (Elongated) [28].

Τα ιόντα Cu(II) με βάση τη θεωρία μαλακών/σκληρών οξέων δρουν ως «ενδιάμεσα» οξέα (μεταξύ σκληρών και μαλακών οξέων), με αποτέλεσμα να εμφανίζουν προτίμηση σε υποκαταστάτες με άτομα δότες N (π.χ. αμίνες, αμινοξέα, πεπτίδια) ή άτομα δότες O (π.χ. κετόνες). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί η προτίμηση του Cu(II) για συμπλοκοποίηση με υποκαταστάτες με άτομα δότες N, έναντι των υποκαταστατών με άτομα δότες O, καθώς τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα είναι περισσότερο σταθερά θερμοδυναμικά. Στην ίδια κατηγορία ανήκουν και τα πεπτίδια σε περίπτωση που η τιμή του pH είναι ικανοποιητικά υψηλή για να ευνοηθεί η αποπρωτονίωση των αμιδικών ατόμων N. Η σειρά δραστηριότητας των ατόμων δωτών N που υφίστανται σε ένα πεπτίδιο αναφορικά με την συμπλοκοποίηση των ιόντων Cu(II) είναι N της N-τελικής αμινομάδας >N-ιμιδαζολίου ιστιδίνης > Αμιδικά άτομα N πεπτιδικών δεσμών [1], [13], [22].

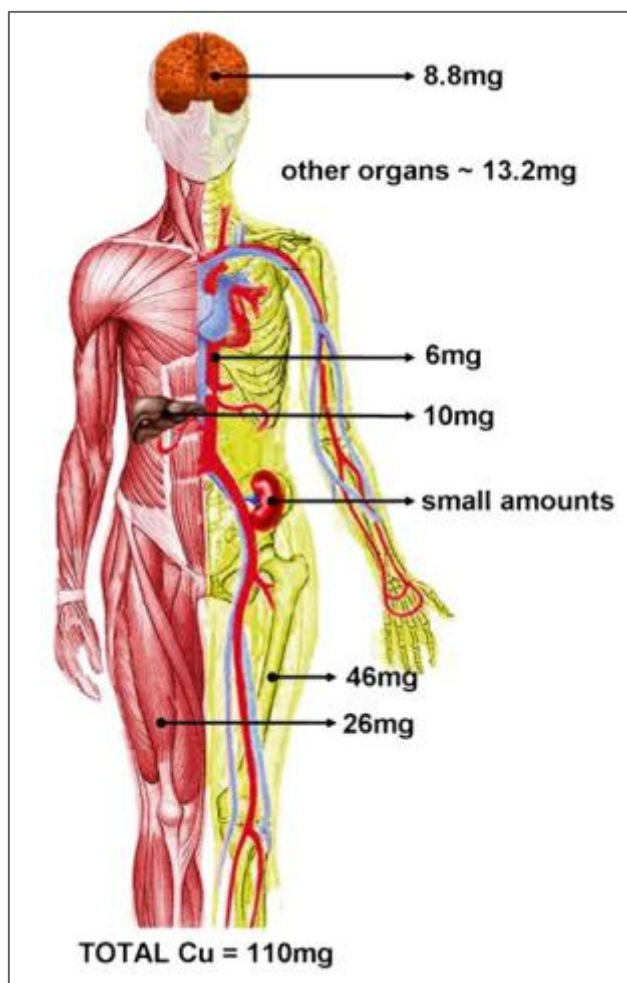
2.2 Βιολογικός ρόλος του χαλκού.

Ο χαλκός αποτελεί ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τον ανθρώπινο οργανισμό και συνιστά ένα από τα επικρατέστερα στοιχεία μετάπτωσης που συμμετέχουν στα βιολογικά συστήματα. Στο σώμα ενός φυσιολογικού ενήλικα (βάρους περίπου 70 κιλών) βρίσκεται σε ποσότητα περίπου 80-120 mg, με την αντίστοιχη ποσότητα για τον σίδηρο να είναι τα 4-5 g και για τον ψευδάργυρο τα 1,4-2,3g. [29], [30], [31], [32].

Η συνιστώμενη ημερήσια δόση χαλκού είναι 0,9 mg με ανώτατο όριο τα 10 mg/ημέρα. Τρόφιμα πλούσια σε χαλκό είναι τα θαλασσινά, το συκώτι, οι ξηροί καρποί, οι σπόροι, η μαύρη σοκολάτα και τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά [31], [32].

Η απορρόφηση του χαλκού στον ανθρώπινο οργανισμό πραγματοποιείται κυρίως στο λεπτό έντερο απ' όπου το μεγαλύτερο ποσοστό του απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος με τη βοήθεια της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης ATP7A και συνδέεται με την αλβουμίνη η οποία συντελεί στη μεταφορά και αποθήκευση του χαλκού στο ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας. Το ποσοστό απορρόφησης του χαλκού επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό και από την πρόσληψη άλλων ιχνοστοιχείων που μπορεί να δρουν ανταγωνιστικά, αλλά και από παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και οι διατροφικές συνήθειες του ανθρώπου. Από το ήπαρ, ο χαλκός απελευθερώνεται στο πλάσμα του αίματος όπου συνδέεται σε ένα μεγάλο ποσοστό (περίπου 95%) με την σερουλοπλασμίνη και σε ένα μικρότερο (περίπου 5%) με την αλβουμίνη με τη βοήθεια

των οποίων μεταφέρεται και κατανέμεται στα όργανα και τους ιστούς του σώματος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 17 [31], [33], [34].



Εικόνα 17. Η κατανομή του χαλκού στα διάφορα όργανα του ανθρώπινου σώματος. Το παράδειγμα αναφέρεται σε ενήλικο υγιή άνθρωπο περίπου 70 kg. Τα περίπου 110 mg χαλκού κατανέμονται ως εξής: 8,8 mg στον εγκέφαλο, 10 mg στο ήπαρ, 6 mg στο αίμα, 26 mg στους σκελετικούς μύες και 46 mg στον σκελετό και τον μυελό των οστών [34].

Η ύπαρξη του χαλκού σε ποσότητες μεγαλύτερες από το φυσιολογικό ή η έλλειψη χαλκού είναι πιθανό να οδηγήσει σε εμφάνιση σοβαρών νευροεκφυλιστικών παθήσεων. Δύο τέτοια παραδείγματα είναι η ασθένεια Wilson κατά την οποία οι ασθενείς έχουν υψηλή ποσότητα χαλκού στον ηπατικό ιστό και η ασθένεια Menkes κατά την οποία οι ασθενείς εμφανίζουν έλλειψη σε χαλκό στον εγκέφαλο, πιθανώς λόγω δυσλειτουργίας στον μεταβολισμό του μετάλλου [33].

Ο κύριος ρόλος του χαλκού στα βιολογικά συστήματα προκύπτει από την ικανότητα των ιόντων χαλκού να συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές διεργασίες. Ο χαλκός αποτελεί, επίσης, έναν απαραίτητο συμπράγοντα ή/και ένα δομικό συστατικό στο ενεργό κέντρο πολλών μεταλλοενζύμων και μεταλλοπρωτεϊνών συμμετέχοντας σε βιολογικές διεργασίες όπως ο μεταβολισμός του σιδήρου (σερουλοπλασμίνη), η αντιοξειδωτική δράση μέσω της «απομάκρυνσης» ελευθέρων ριζών-δραστικών μορφών οξυγόνου (υπεροξειδική δισμουτάση, Cu/Zn-SOD), η μεταφορά οξυγόνου (αιμοκυανίνες), η μεταφορά ηλεκτρονίων (οξειδάση του κυτοχρώματος C) κ.α. [31], [32], [33].

Με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές, στις περισσότερες περιπτώσεις ο χαλκός (υπό τη μορφή ιόντων χαλκού, κατά βάση Cu(II)) συνδέεται με μία πρωτεΐνη ή ένα ένζυμο, δηλαδή με μία πεπτιδική αλληλουχία, για να επιτελέσει τον βιολογικό/δομικό του ρόλο. Παράλληλα, κατά τον μεταβολισμό του συνδέεται συνεχώς με πεπτιδικές αλληλουχίες (π.χ. αλβουμίνη, σερουλοπλασμίνη). Έτσι, η μελέτη της επίδρασης της αλληλεπίδρασης πεπτιδικής αλληλουχίας μίας πρωτεΐνης ή ενός μεταλλοενζύμου με τα ιόντα Cu(II) στις διάφορες βιολογικές διεργασίες κρίνεται ιδιαίτερα σημαντική με πολυάριθμες εφαρμογές.

2.3 3N σύμπλοκο Cu(II) με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη.

Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 1.4, η ένταξη του Cu(II) με πεπτίδια που φέρουν την ιστιδίνη στη δεύτερη θέση της αλληλουχίας ως προς την ελεύθερη N-τελική αμινομάδα ξεκινά σε τιμές pH περίπου 4 μέσω της ένταξης του N της N-τελικής αμινομάδας. Με αύξηση του pH σε φυσιολογικές τιμές, ιονίζεται κι εντάσσεται το N του πρώτου πεπτιδικού δεσμού και το N₃ του ημιδαζολίου της ιστιδίνης δημιουργώντας ένα 3N σύμπλοκο (NH₂, N⁻, N_{im}). Πληθώρα 3N συμπλόκων πεπτιδίων-Cu(II) έχει απομονωθεί από διάφορες αμινοξικές αλληλουχίες, ενώ σε ποσοστό περίπου 25% οι πρωτεΐνες με την ιστιδίνη στη θέση 2 είναι εξωκυτταρικές, κάτι που σημαίνει πως έχουν φυσιολογικά ελεύθερη N-τελική αμινομάδα μέσω της οποίας ξεκινά η ένταξη με τα ιόντα Cu(II). Ωστόσο, το πεπτίδιο που έχει μελετηθεί περισσότερο ως προς τη δημιουργία 3N συμπλόκου με τον Cu(II) είναι το τριπεπτίδιο GHK το οποίο έχει βρεθεί και απομονωθεί από το πλάσμα του αίματος. Για το συγκεκριμένο, έχει αποδειχθεί πως ο σχηματισμός του 3N συμπλόκου του με τον Cu(II) μπορεί να δράσει είτε

αντιοξειδωτικά περιορίζοντας τις ελεύθερες ρίζες, είτε επουλωτικά προς το δέρμα εγείροντας την παραγωγή πρωτεϊνών όπως η ελαστίνη και το κολλαγόνο. [35], [36].

Εξίσου μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον εκδηλώθηκε για πεπτίδια που φέρουν την ιστιδίνη στην 3^η θέση της αλληλουχίας δημιουργώντας 4N σύμπλοκα με τα ιόντα Cu(II), με χαρακτηριστικά παραδείγματα να αποτελούν οι ATCUN αλληλουχίες της αλβουμίνης (HSA) η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του Cu(II), όπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 2.2, και της εψιδίνης, μίας πρωτεΐνης μεγάλης σημασίας για την ρύθμιση της εισόδου του σιδήρου στην κυκλοφορία του αίματος [37].

Κεφάλαιο 3: Εφαρμογές συμπλόκων πεπτιδίων-Cu(II) (ATCUN) στη Βιολογία και την Ιατρική.

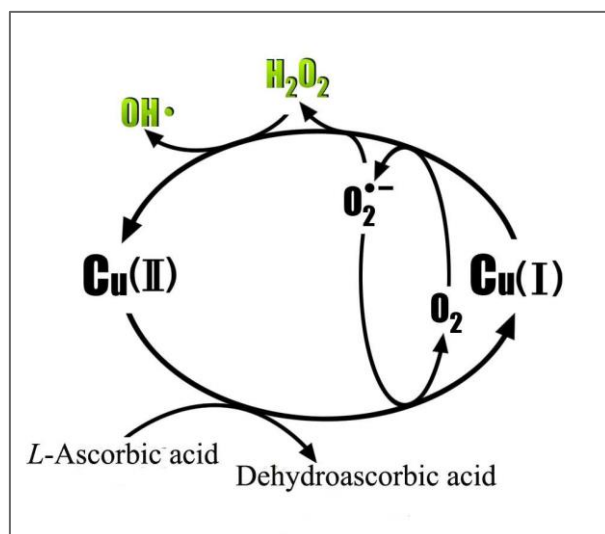
Τα πεπτίδια με ελεύθερη N-τελική αμινομάδα και ιστιδίνη στις πρώτες δύο, κατά βάση, θέσεις της αλληλουχίας ως προς το N-τελικό άκρο (ATCUN) έχουν μελετηθεί εκτενώς σε εφαρμογές στη Βιολογία και την Ιατρική.

3.1 Διάσπαση βιομορίων.

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στην καταλυτική, αλλά και τη στοιχειομετρική δραστηριότητα πεπτιδίων με ιστιδίνη στην 2^η ή 3^η θέση της αλληλουχίας τους ως προς το N-τελικό άκρο, όταν αυτά δεσμεύονται με μεταλλικά ιόντα. Οι αρχικές μελέτες εστίαζαν στην οξειδωτική προσβολή του DNA από ελεύθερες ρίζες με τα οξειδοαναγωγικά ενεργά μεταλλικά ιόντα, όπως τα ιόντα Cu(II), να διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο. Ωστόσο, αξιοποιώντας τη συγκεκριμένη ιδιότητα ορισμένων μεταλλικών ιόντων, έχει επιχειρηθεί με μεγάλη επιτυχία ο σχεδιασμός τεχνητών νουκλεασών με σκοπό τη χρήση τους για θεραπευτικούς σκοπούς στοχεύοντας κυρίως στο DNA και το RNA. Ως δομές που δεσμεύουν αποτελεσματικά μεταλλικά ιόντα (κυρίως ιόντα Cu(II)), τα ATCUN πεπτίδια μπορεί να αποτελέσουν πιθανές «πηγές» μελέτης για την περαιτέρω ανάπτυξη νουκλεασών ή μορίων που προκαλούν διάσπαση σε βιομόρια όπως τα σάκχαρα ή οι πρωτεΐνες [20], [37].

Η πρώτη απόπειρα χρήσης συμπλόκου ATCUN πεπτιδίου-Cu(II) ως νουκλεάση με στόχο το DNA καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε το 1983 [38]. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δράση του συμπλόκου Cu(II)-GGH έναντι συγκεκριμένων κυττάρων ενός καρκινώματος με μεγάλη βιολογική σημασία όσον αφορά τη μελέτη των καρκινικών όγκων που ονομάζεται καρκίνωμα Erlich (Erlich Ascites Carcinoma, EAC). Η μελέτη απέδειξε πως *in vitro* το σύμπλοκο Cu(II)-GGH παρουσία ασκορβικού οξέος είναι ικανό να προκαλέσει θάνατο των συγκεκριμένων καρκινικών κυττάρων, ενώ οι *in vivo* μελέτες σε ποντικούς επιβεβαίωσαν τη θεραπευτική δράση του. Παρά την μειωμένη οξειδωτική δραστηριότητα του Cu(II) όταν δεσμευτεί με πρωτεϊνικούς υποκαταστάτες, όπως τα ATCUN πεπτίδια, η δράση του ως προς τη σχάση της διπλής έλικας του DNA βασίζεται στην οξειδοαναγωγική του δραστηριότητα, καθώς παρουσία ασκορβικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου

(H₂O₂) είναι δυνατός ο σχηματισμός δραστικών ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (\bullet OH) σύμφωνα με τον καταλυτικό κύκλο της Εικόνας 18 [37] [38], [39], [40].



Εικόνα 18. Καταλυτικός κύκλος παραγωγής ελευθέρων ριζών υδροξυλίου (\bullet OH) από το οξειδοαναγωγικό ζεύγος Cu(I/II) παρουσία ασκορβικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) [40].

Οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (\bullet OH) δρουν μέσω ενός γενικού μηχανισμού κατά τον οποίο αποσπών ένα υδρογόνο από ένα άτομο άνθρακα της δεοξυριβόζης και παρουσία O₂ πραγματοποιείται σχάση της διπλής έλικας του DNA, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 19 [37], [40].

Η συγκεκριμένη μελέτη έδωσε ώθηση σε συνεχείς έρευνες σχετικά με την χρήση των συμπλόκων Cu(II) με ATCUN πεπτίδια ως πιθανές νουκλεάσες για τη σχάση του DNA. Ωστόσο, η επιτυχημένη χρήση τους πέρα από την οξειδοαναγωγική ικανότητα του μεταλλικού ιόντος, εξαρτάται κι από την πρωτοταγή δομή του πεπτιδίου, δηλαδή των αμινοξέων από το οποίο αποτελείται. Το φορτίο που μπορεί να φέρουν οι πλευρικές τους αλυσίδες, αλλά και οι στερεοχημικές παρεμποδίσεις που είναι πιθανό να δημιουργούνται από τις ογκώδεις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν τον τρόπο δράσης του συμπλόκου προς το DNA [37].

Ένα ακόμα βιομόριο με μεγάλη βιολογική σημασία το οποίο μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως στόχο τα σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με ATCUN πεπτίδια είναι τα ένζυμα και οι πρωτεΐνες. Η απενεργοποίηση ενός ενζύμου ή μιας πρωτεΐνης αποτελεί μία πιθανή θεραπευτική οδό για πολλές ασθένειες. Αξιοσημείωτα παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών-θεραπευτικών στόχων από μεταλλοφάρμακα είναι το μετατρεπτικό ένυμο της αγγειοτενσίνης (Angiotensin-Converting Enzyme, ACE) το οποίο σε μη φυσιολογικές τιμές προκαλεί αύξηση της αρτηριακής πίεσης και συνδέεται με την ανάπτυξη σαρκοείδωσης και η καρβονική ανυδράση (Carbonic Anhydrase, CA) που καταλύει την αντίδραση του διοξειδίου του άνθρακα με νερό, ενώ οι αυξημένες τιμές της σχετίζονται με ασθένειες όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος και το γλαύκωμα. Ένα φάρμακο με αλληλουχία πεπτιδίου που έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την αναστολή του ACE είναι η λισινοπρίλη. Η αποτελεσματικότητά της έδωσε ώθηση σε προσπάθειες σύνθεσης πεπτιδίων που έχουν την ικανότητα να εντάσσονται με μεταλλικά ιόντα Cu(II) και να προκαλούν αναστολή του ACE. Ένα τέτοιο σύμπλοκο που έχει μελετηθεί και αποδειχθεί αποτελεσματικό είναι το Cu(II)-KGHK [37], [44].

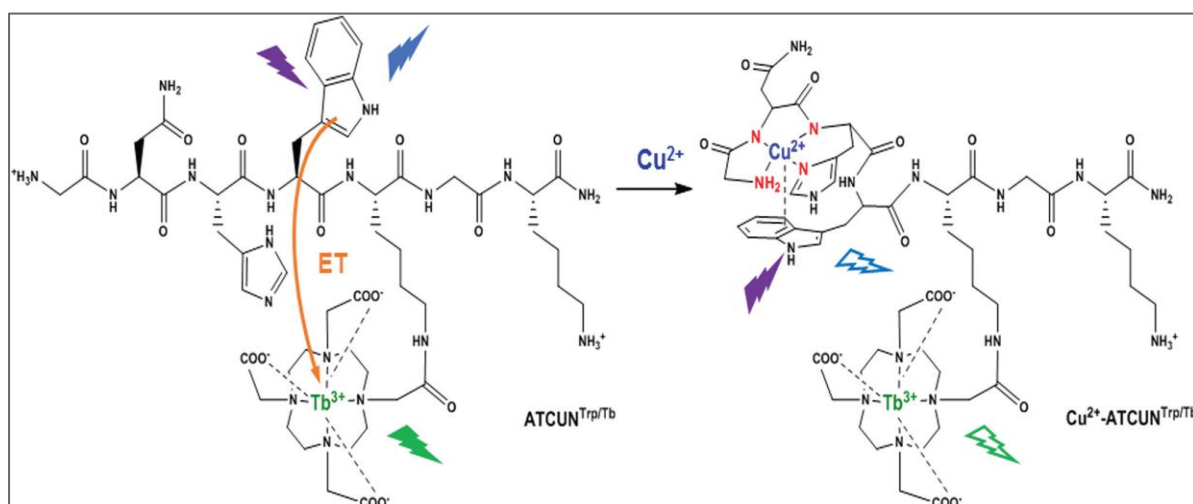
3.2 Εφαρμογές με βάση τη φωταύγεια.

Ο φθορισμός και η φωταύγεια αποτελούν ένα από τα πιο σημαντικά εργαλεία οπτικής ανάλυσης και απεικόνισης με μεγάλο εύρος εφαρμογών στους τομείς της Χημείας, της Βιολογίας, της Ιατρικής, της Φαρμακευτικής και των Επιστημών Περιβάλλοντος. Μία πολύ σημαντική εφαρμογή είναι η ανίχνευση της ύπαρξης κάποιου μεταλλικού ιόντος (π.χ. Cu(II)) ή της δράσης κάποιου ενζύμου μέσω είτε εμφάνισης φθορισμού από ένα μη φθορίζον σύστημα (turn-on φαινόμενο), είτε της απόσβεσης του φθορισμού από ένα φθορίζον σύστημα (turn-off φαινόμενο) [20], [37].

Ο Cu(II) εξαιτίας του παραμαγνητικού χαρακτήρα του συμμετέχει κυρίως σε turn-off φαινόμενα, προκαλώντας, δηλαδή, απόσβεση του φθορισμού, ενώ το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση που ενταχθεί με κάποιο ATCUN πεπτίδιο. Για παράδειγμα, η αλβουμίνη BSA περιέχει στη δομή της το αμινοξύ τρυπτοφάνη το οποίο χαρακτηρίζεται ως ένα χρωμοφόρο εξαιτίας του οποίου είναι πιθανή η εκπομπή φθορισμού. Ωστόσο, η BSA περιέχει μία ATCUN δομή πεπτιδίου (DTH) στην οποία μπορεί να ενταχθεί ο Cu(II) κι αυτή η ένταξη προκαλεί σε μεγάλο ποσοστό απόσβεση του φθορισμού που εκπέμπεται λόγω της τρυπτοφάνης. Έτσι, αυτή η ικανότητα του

Cu(II) και των συμπλόκων του με ATCUN πεπτίδια που υφίστανται φυσιολογικά έχει αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη αισθητήρων-ανιχνευτών συγκεκριμένων μεταλλικών ιόντων (chemosensors), την βιοαπεικόνιση (bioimaging) και την ανίχνευση της δράσης ορισμένων ενζύμων, όπως οι πρωτεάσες [20], [37].

Σε πολλές περιπτώσεις, για την ανίχνευση της ύπαρξης και της ικανότητας δέσμευσης των ιόντων Cu(II), χρησιμοποιείται η τεχνική της προσθήκης ενός χρωμοφόρου στην πλευρική αλυσίδα ενός αμινοξέος της πεπτιδικής αλληλουχίας, ούτως ώστε σε περίπτωση που ο Cu(II) καταφέρει να ενταχθεί με το πεπτίδιο να οδηγήσει σε απόσβεση του φθορισμού [37], [45], [46]. Ένα παράδειγμα αυτής της κατηγορίας, φαίνεται στην Εικόνα 20, όπου η ύπαρξη και η ένταξη του Cu(II) οδηγεί σε απόσβεση του φθορισμού που εκπέμπεται τόσο από την τρυπτοφάνη όσο και από ένα φθορίζον σύμπλοκο Tb³⁺ το οποίο έχει συνδεθεί με την πλευρική αλυσίδα της λυσίνης [47].



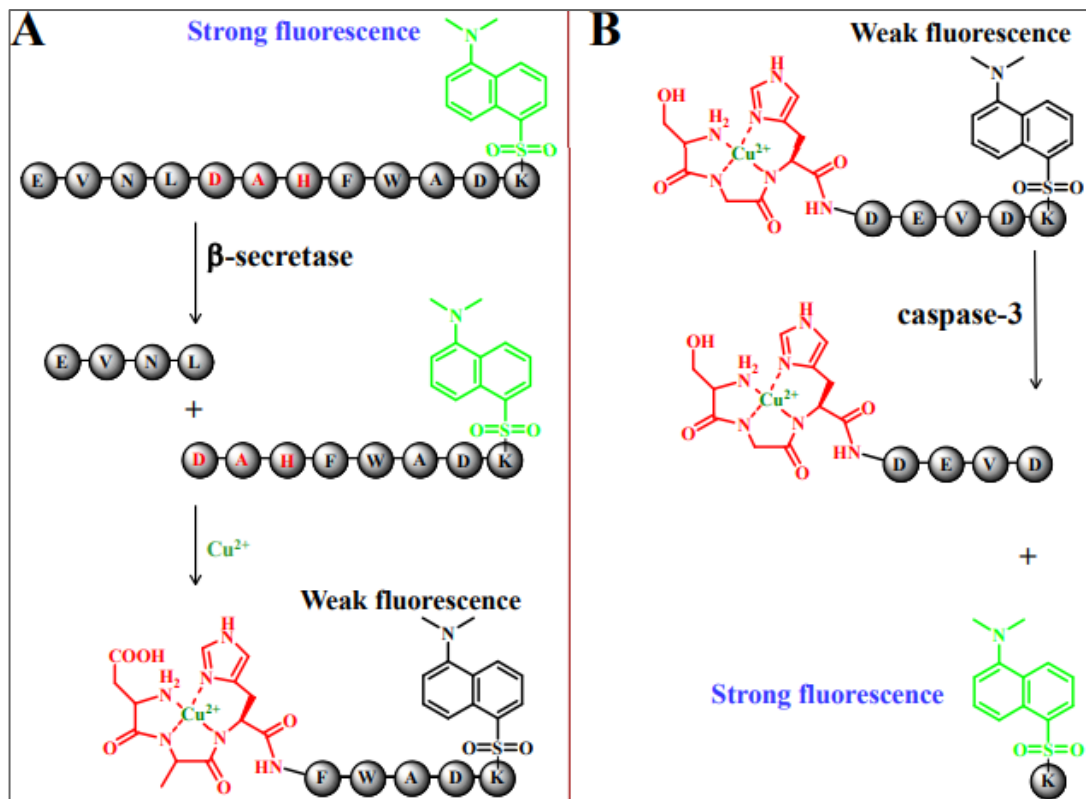
Εικόνα 20. Δομή και μηχανισμός ανίχνευσης Cu²⁺ μέσω απόσβεσης φθορισμού.

Απουσία ιόντων Cu²⁺, με την επίδραση ακτινοβολίας, εκπέμπεται φως τόσο από την τρυπτοφάνη, όσο και από το σύμπλοκο του Tb³⁺ που έχει συνδεθεί στη γειτονική λυσίνη και διεγείρεται με απορρόφηση ακτινοβολίας μέσω της τρυπτοφάνης που δρα ως κεραία (antenna effect). Παρουσία ιόντων Cu²⁺ παρατηρείται ο σχηματισμός συμπλόκου με την ATCUN αλληλουχία, με αποτέλεσμα να μην εκπέμπεται φως [47].

Αξίζει να σημειωθεί πως η πιο δύσκολη συνθετικά εισαγωγή ενός χρωμοφόρου στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων μπορεί να αντικατασταθεί από τη δέσμευση

του στην κενή θέση ένταξης που φέρει ο Cu(II) στα 3N σύμπλοκα με ATCUN πεπτίδια (η θέση αυτή συνήθως καταλαμβάνεται από ένα μόριο H₂O).

Ο σχηματισμός μίας ATCUN αλληλουχίας πεπτιδίου μπορεί να προκύψει και από τη δράση των πρωτεασών. Οι πρωτεάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση των εσωτερικών πεπτιδικών δεσμών μίας πρωτεΐνης. Έτσι, σε περίπτωση που από αυτή τη διάσπαση προκύψει μία αλληλουχία με ελεύθερη N-τελική αμινομάδα και ιστιδίνη στη θέση 2 ή 3 ως προς αυτήν, είναι δυνατή η αποτελεσματική ένταξη του Cu(II). Η δράση των συγκεκριμένων ενζύμων μπορεί να ανιχνευθεί μέσω του φθορισμού. Πιο συγκεκριμένα, ένα χρωμοφόρο μπορεί να προσαρμοστεί στην πλευρική αλυσίδα ενός αμινοξέος μίας πρωτεΐνης πριν τη δράση της πρωτεάσης. Αν με τη δράση της πρωτεάσης προκύψει ATCUN αλληλουχία πεπτιδίου στην οποία μπορεί να δεσμευτεί ο Cu(II), τότε παρατηρείται απόσβεση του εκπεμπόμενου φωτός (turn-off φαινόμενο). Αντίθετα, σε περίπτωση που έχει δημιουργηθεί σύμπλοκο Cu(II) με ATCUN πεπτίδιο και στην αμινοξική αλληλουχία έχει ενσωματωθεί κάποιο χρωμοφόρο σε ένα αμινοξύ (συνήθως σε μεγάλη απόσταση από την θέση ένταξης του Cu(II)), τότε δεν εκπέμπεται φως λόγω της ύπαρξης του παραμαγνητικού Cu(II). Ωστόσο, σε περίπτωση που μία πρωτεάση δράσει έτσι ώστε να διασπάσει τον κατάλληλο πεπτιδικό δεσμό και να αποδεσμευτεί το αμινοξύ που φέρει το χρωμοφόρο από την υπόλοιπη αλληλουχία, παρατηρείται εκπομπή φωτός (turn-on φαινόμενο), πιστοποιώντας τη δράση του ενζύμου. Μελέτες βασισμένες σε αυτές τις περιπτώσεις έχουν πραγματοποιηθεί για τη δράση της β-σεκρετάσης και της κασπάσης-3, όπως φαίνεται στην Εικόνα 21 [37], [48].



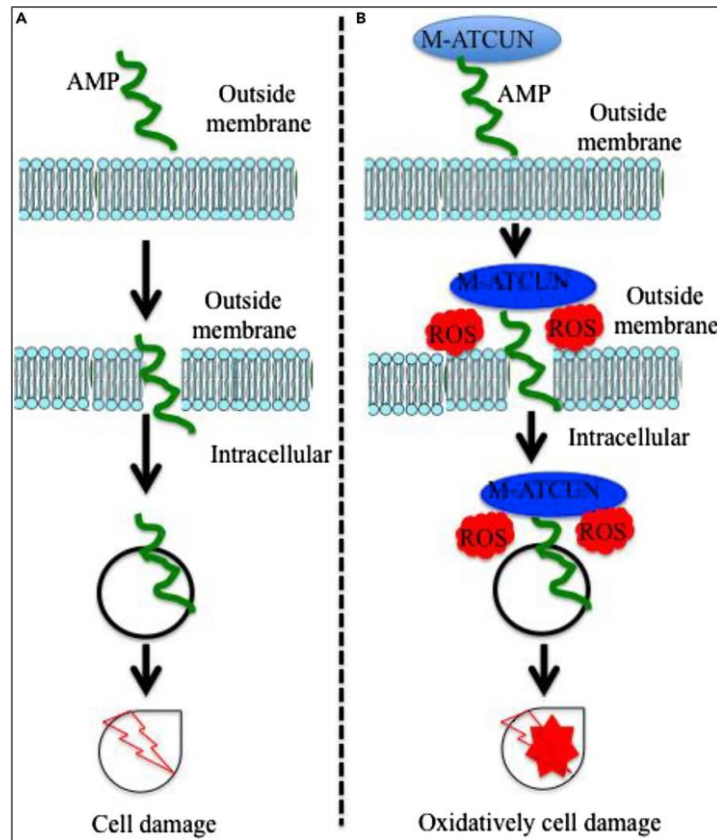
Εικόνα 21. Μηχανισμός ανίχνευσης της αποτελεσματικής δράσης ενζύμων μέσω του φθορισμού. *A:* β-σεκρετάση (β-secretase) και turn-off φαινόμενο, *B:* κασπάση-3 (caspase-3) και turn-on φαινόμενο. Και στις δύο περιπτώσεις έχει ενσωματωθεί χρωμοφόρο (DNS) στην πλευρική αλυσίδα της λυσίνης (K) [48].

3.3 Ενίσχυση δράσης αντιμικροβιακών πεπτιδίων.

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (Antimicrobial Peptides, AMPs) είναι πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους με ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών ενάντια σε βακτήρια, ιούς και μύκητες. Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια αποτελούν μέρος της πρώτης γραμμής άμυνας των πολυκύτταρων οργανισμών ενάντια σε πολλά παθογόνα. Όσον αφορά τη δομή τους, αποτελούνται από 10 έως 50 αμινοξέα και φέρουν συνολικά θετικό φορτίο, ενώ συνδυάζουν κυρίως βασικά αμινοξέα και υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες. Οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες έχουν την τάση να στοιχίζονται η μία κοντά στην άλλη δημιουργώντας δομές οι οποίες φέρουν θετικό φορτίο και υδρόφοβο χαρακτήρα. Η δράση τους ενάντια στα παθογόνους μικροοργανισμούς οφείλεται σε αυτό το θετικό φορτίο και τον υδρόφοβο χαρακτήρα γεγονός που επιτρέπει να αλληλεπιδρούν εκλεκτικά με το αρνητικό φορτίο που φέρουν οι κυτταρικές μεμβράνες και τα κυτταρικά τοιχώματα των παθογόνων. Έτσι, όλο και περισσότερα φάρμακα έχουν

σχεδιαστεί με βάση τις θεραπευτικές προοπτικές που παρέχει η δράση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων [49], [50], [51], [52].

Πολυάριθμα αντιμικροβιακά πεπτίδια φέρουν στη δομή τους ATCUN αλληλουχία. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το πεπτίδιο histatin, η βασική πρωτεΐνη του σάλιου του ανθρώπινου οργανισμού και η επιδίνη που υπάρχει φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό. Η ATCUN αλληλουχία μπορεί να ενταχθεί με μεταλλικά ιόντα Cu(II). Τα μεταλλικά ιόντα, και ιδιαίτερα τα ιόντα Cu(II), μπορούν να ενισχύσουν τη δράση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων, καθώς έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που οδηγούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών οι οποίες με τη σειρά τους επιτελούν οξειδωτική προσβολή της κυτταρικής μεμβράνης ή του κυτταρικού τοιχώματος των παθογόνων μικροοργανισμών (Εικόνα 22). Από πολυάριθμες μελέτες έχει επιβεβαιωθεί πως τα σύμπλοκα Cu(II) με αντιμικροβιακά πεπτίδια έχουν αυξημένη δραστηριότητα σε σύγκριση με τα ίδια πεπτίδια χωρίς το μεταλλικό ιόν [20], [37], [53], [54], [55].



Εικόνα 22. Μηχανισμός δράσης AMP χωρίς μεταλλικό ιόν (A) και AMP με μεταλλικό ιόν στην ATCUN αλληλουχία, μέσω παραγωγής ROS (B) έναντι σε κύτταρο παθογόνου οργανισμού [37].

3.4 Δέσμευση-απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων.

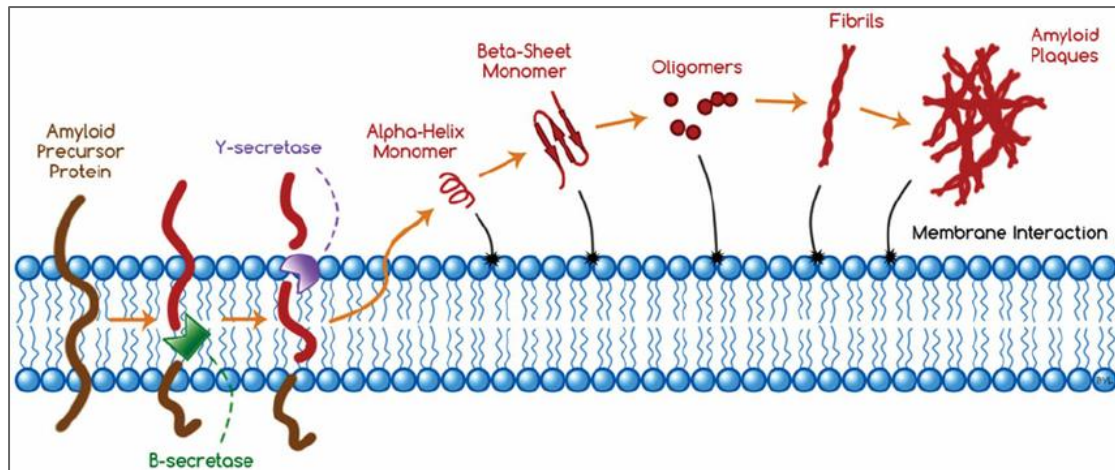
Πέρα από τα οφέλη που μπορεί να προσφέρει η ύπαρξη και η ένταξη των μεταλλικών ιόντων με τα πεπτίδια, υπάρχει και η πιθανότητα ανάπτυξης τοξικότητας. Για παράδειγμα, η παραγωγή ελευθέρων ριζών από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που καταλύονται με Cu(I/II) σε περίπτωση που δεν πραγματοποιηθεί εκλεκτικά, είναι πιθανό να επιφέρει ανεπανόρθωτες βλάβες στον ανθρώπινο οργανισμό. Παράλληλα, η ύπαρξη μεταλλικών ιόντων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τις επιτρεπτές ή η συσσώρευσή τους σε συγκεκριμένες θέσεις συνδέονται με πολυάριθμες παθήσεις. Έτσι, τα ATCUN πεπτίδια, ως αποτελεσματικοί υποκαταστάτες των μεταλλικών ιόντων, μπορούν να τα «απομακρύνουν» από περιοχές που αν βρεθούν σε μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις προκαλούν τοξικότητα [20], [37].

3.4.1 Απομάκρυνση του Cu(II) από το β-αμυλοειδές πεπτίδιο.

Η νόσος Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD) αποτελεί την πιο συνηθισμένη νευροεκφυλιστική ασθένεια και τον πλέον κοινό τύπο άνοιας, ενώ επηρεάζει δεκάδες εκατομμύρια ανθρώπους στον κόσμο με τον αριθμό των νοσούντων να αυξάνεται δραματικά τα τελευταία χρόνια. Παρά την εξέλιξη στους τομείς της Ιατρικής και της Βιολογίας, η έλλειψη αποτελεσματικής και γρήγορης θεραπευτικής μεθόδου, αλλά και της πρόωξης διάγνωσης της νόσου, θέτουν την νόσο Alzheimer ως μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις για τους επιστήμονες [4], [56], [57], [58].

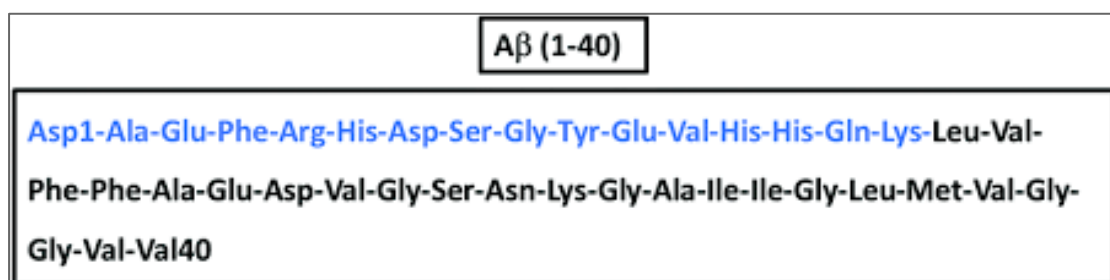
Στον εγκέφαλο των ασθενών με τη νόσο Alzheimer έχουν παρατηρηθεί δύο συγκεκριμένα παθολογικά χαρακτηριστικά. Το πρώτο αφορά τον σχηματισμό εξοκυτταρικών αμυλοειδών πλακών και το δεύτερο τον σχηματισμό ενδοκυτταρικών νευροϊνωδών συσσωματωμάτων. Οι αμυλοειδείς πλάκες αποτελούνται κυρίως από το β-αμυλοειδές πεπτίδιο (Amyloid β peptide, A β), ενώ το κύριο συστατικό των νευροϊνωδών συσσωματωμάτων (NeuroFibrillary Tangles, NFTs) είναι η υπερφωσφορυλιωμένη τ-πρωτεΐνη [4], [56], [57], [58], [59].

Το β-αμυλοειδές πεπτίδιο προκύπτει από την πρωτεολυτική διάσπαση μίας μεγαλύτερης γλυκοπρωτεΐνης, της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein, APP). Η πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς αποτελεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I που φυσιολογικά συμμετέχει σε ένα μεγάλο εύρος βιολογικών διεργασιών, όπως η ανάπτυξη των νευρώνων, οι ενδοκυτταρικές διαβιβάσεις και διάφορες διεργασίες διατήρησης της ομοιόστασης των νευρώνων. Από τη διάσπασή της με τη βοήθεια της β-σεκρετάσης και της γ-σεκρετάσης προκύπτουν μονομερή β-αμυλοειδούς πεπτιδίου τα οποία έχουν την τάση να αναδιπλώνονται και να συσσωματώνονται οδηγώντας στο σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών (Εικόνα 23) [4], [56], [57], [58], [59], [60].



Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού σχηματισμού των μονομερών του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου που στη συνέχεια αναδιπλώνονται και συσσωματώνονται σχηματίζοντας τις αμυλοειδείς πλάκες που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τη λιπιδική μεμβράνη [60].

Όσον αφορά τη δομή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, αυτό αποτελείται από 39 με 43 αμινοξικά κατάλοιπα. Τα δύο μεγαλύτερα και σημαντικότερα θραύσματα είναι το Αβ₁₋₄₀ και το Αβ₁₋₄₂, με το πρώτο να αποτελεί την πιο συνήθη δομή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου και το δεύτερο να προκαλεί τοξικότητα σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το πρώτο και να συσσωματώνεται πιο αποτελεσματικά (Εικόνα 24) [56].

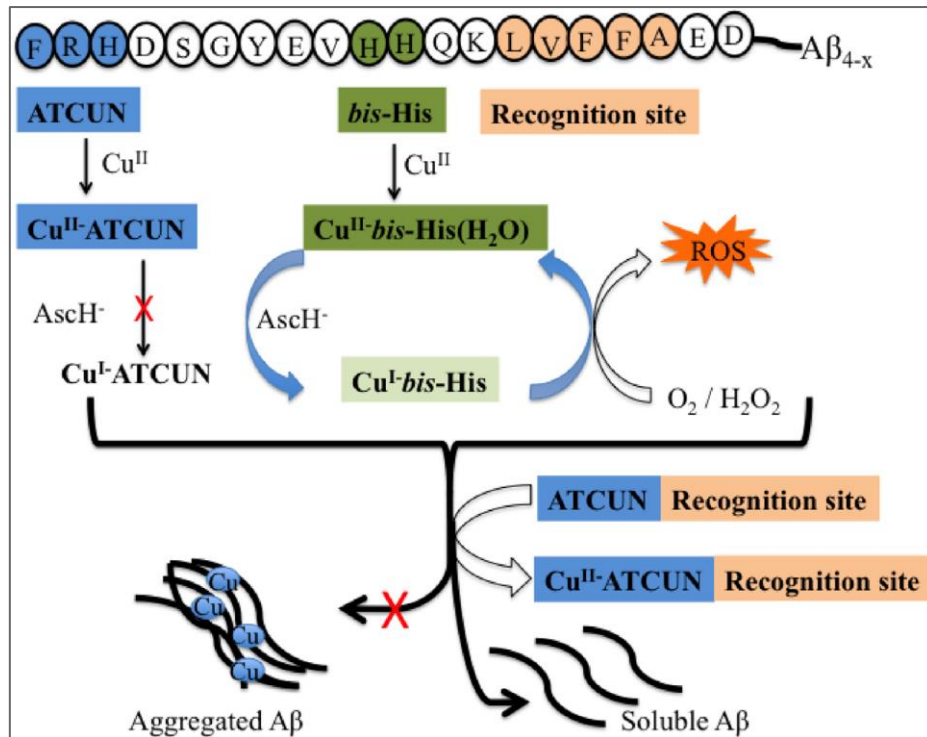


Εικόνα 24. Αμινοξική αλληλουχία (1-40) του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου [59].

Ένα εξίσου σημαντικό παθολογικό χαρακτηριστικό των ασθενών της νόσου Alzheimer είναι η αυξημένη συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων στις αμυλοειδείς πλάκες. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων

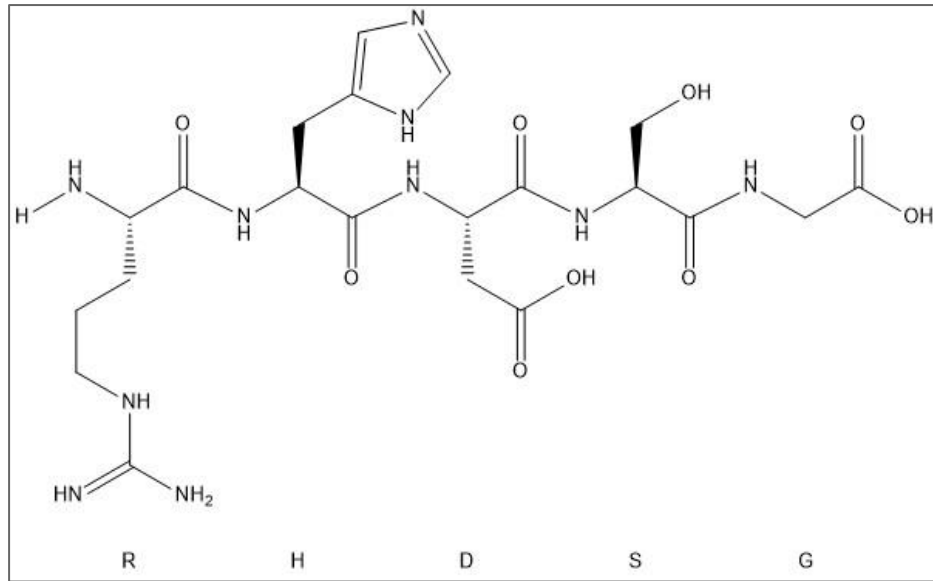
Cu(II), Zn(II) και Fe(III) η οποία είναι μία πιθανή αιτία παθογένεσης της νόσου Alzheimer. Όσον αφορά τη δράση τους, τα ιόντα Cu(II) έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν ισχυρά με το β-αμυλοειδές πεπτίδιο μέσω των καταλοίπων ιστιδίνης που περιέχει στη δομή του (Εικόνα 24). Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 2, ο Cu(II) είναι ένα ενεργό οξειδοαναγωγικά μεταλλικό ιόν, με αποτέλεσμα αφού δεσμευτεί στο β-αμυλοειδές πεπτίδιο να συμμετέχει σε αντιδράσεις σχηματισμού ελευθέρων ριζών που μπορούν να προσβάλλουν οξειδωτικά τους νευρώνες προκαλώντας την επιδείνωση της νόσου. Σε παρόμοιες διεργασίες ανάπτυξης δραστικών μορφών οξυγόνου είναι πιθανό να συμμετέχουν και τα ιόντα Fe(III). Τόσο τα ιόντα Cu(II) και Fe(III), όσο και τα ιόντα Zn(II) σε αυξημένες συγκεντρώσεις συντελούν στη μη φυσιολογική αναδίπλωση και τελικά στη συσσωμάτωση των μονομερών του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου [56], [61], [62], [63], [64], [65], [66].

Από την πρωτοταγή δομή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Εικόνα 24) παρατηρείται η ύπαρξη τριών καταλοίπων ιστιδίνης που μπορούν υπό κατάλληλες προϋποθέσεις να ενταχθούν ισχυρά με τον Cu(II) προκαλώντας τοξικότητα που συνδέεται με την ανάπτυξη της νόσου Alzheimer. Ωστόσο, η συγκεκριμένη υπόθεση άνοιξε τον δρόμο στον σχεδιασμό εκλεκτικών υποκαταστατών που δρουν ανταγωνιστικά προς το β-αμυλοειδές πεπτίδιο έχοντας την ικανότητα να δεσμεύουν ισχυρότερα τα ιόντα Cu(II). Όπως εκτενώς αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 1, τέτοιοι αποτελεσματικοί υποκαταστάτες είναι τα ATCUN πεπτίδια. Τα ATCUN πεπτίδια έχουν την ικανότητα να δεσμεύσουν ισχυρά το ιόν Cu(II) αποτρέποντάς την αποτελεσματική ένταξη του με το β-αμυλοειδές πεπτίδιο και παρεμποδίζοντας τόσο τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου όσο και τη συσσωμάτωση των μονομερών του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Εικόνα 25) [37], [56].



Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού δέσμευσης του $Cu(II)$ από ATCUN πεπτιδίο αποτρέποντας το σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου και τη συσσωμάτωση των μονομερών του β -αμυλοειδούς πεπτιδίου [37].

Μετά τον σχηματισμό τους, τα $A\beta_{1-40}$ και $A\beta_{1-42}$ υφίστανται επιπλέον αντιδράσεις υδρόλυσης από τις οποίες σχηματίζονται μικρότερα πεπτίδια με ελεύθερη N-τελική αμινομάδα τα οποία αντιπροσωπεύουν περίπου το 60% όλων των ειδών $A\beta$ στον εγκέφαλο ασθενών με Alzheimer. Δύο τέτοια πολύ σημαντικά πεπτίδια τα οποία έχουν ATCUN αλληλουχία είναι το $A\beta_{4-42}$, το οποίο περιέχει την ιστιδίνη στη θέση 3 και το $A\beta_{5-42}$ το οποίο περιέχει την ιστιδίνη στη θέση 2. Ταυτόχρονα, πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε πιο μικρά πεπτιδικά μοντέλα, όπως το $A\beta_{5-9}$ (Εικόνα 26) το οποίο έχει την ικανότητα να εντάσσεται με τον $Cu(II)$ δημιουργώντας 3N σύμπλοκα (NH_2 , N' , N_{im}) που σχηματίζονται σε φυσιολογικές τιμές pH [67]. Έτσι, ο σχεδιασμός υποκαταστατών που μπορούν να «αποδεσμεύσουν» τον $Cu(II)$ από τέτοιες αλληλουχίες του $A\beta$ κρίνεται απαραίτητος κι αποτελεί άλλη μία πρόκληση στη μάχη για την αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer.



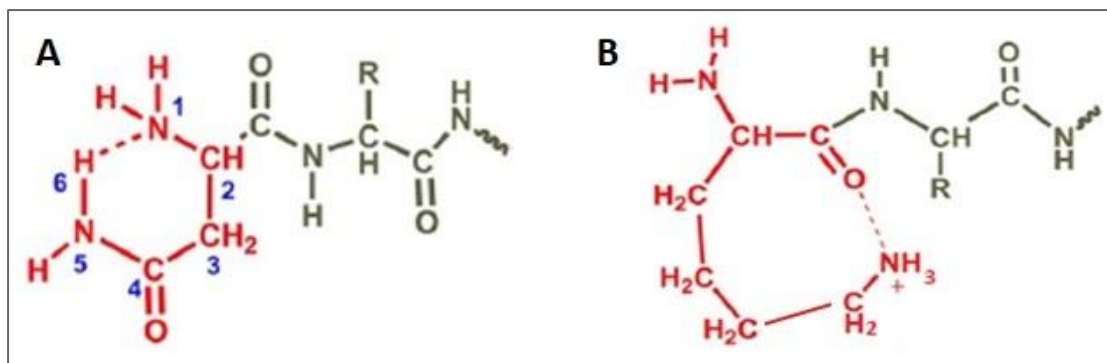
Εικόνα 26. Η δομή του Ab_{5.9} πεπτιδίου.

Κεφάλαιο 4: Στόχος της εργασίας.

Ο σχηματισμός, η αναδίπλωση και η συσσωμάτωση των μονομερών του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου που οδηγούν στον σχηματισμό των αμυλοειδών πλακών αποτελούν το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό εκδήλωσης της νόσου Alzheimer. Εξίσου σημαντικός είναι και ο ρόλος των μεταλλικών ιόντων Cu(II) που έχουν την ικανότητα ισχυρής δέσμευσης στα διάφορα θραύσματα του Αβ προκαλώντας την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου που μπορούν να αποβούν καταστροφικές για τους νευρώνες. Ένα τέτοιο θραύσμα β-αμυλοειδούς πεπτιδίου είναι το Αβ₅₋₄₂, μοντέλο του οποίου αποτελεί το απλούστερο Αβ₅₋₉. Η δεσμευτική ικανότητα του τελευταίου έναντι του ιόντος Cu(II) έχει ήδη μελετηθεί [67].

Στη συγκεκριμένη εργασία, επιχειρείται ο σχεδιασμός δύο νέων πεπτιδίων τροποποιώντας το αμινοξύ του Ν-τελικού άκρου του Αβ₅₋₉. Ο λόγος αυτής της τροποποίησης είναι η προσπάθεια για βελτιστοποίηση των θερμοδυναμικών παραμέτρων των σχηματιζόμενων συμπλόκων με Cu(II), δηλαδή, η αύξηση της δεσμευτικής ικανότητας τους έναντι του ιόντος Cu(II) σε σχέση με το Αβ₅₋₉ και κατ' επέκταση με το θραύσμα Αβ₅₋₄₂.

Πιο συγκεκριμένα, αντί για την αργινίνη του Ν-τελικού άκρου του Αβ₅₋₉ (Εικόνα 26) αποφασίστηκε να συντεθούν πεπτίδια με αρχικό αμινοξύ την ασπαραγίνη και λυσίνη αντίστοιχα. Η ασπαραγίνη επιλέχθηκε καθώς οδηγεί σε μείωση της τιμής pK_a της Ν-τελικής αμινομάδας λόγω σταθεροποίησης της αποπρωτονιωμένης της μορφής μέσω δεσμού υδρογόνου και σχηματισμού 6-μελούς χηλικού δακτυλίου (Εικόνα 27Α). Η λυσίνη επιλέχθηκε καθώς οδηγεί σε μείωση της τιμής pK_a ιονισμού κι ένταξης του πρώτου αμιδικού ατόμου Ν μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του Ο της καρβονυλομάδας του πρώτου πεπτιδικού δεσμού και του μερικώς θετικά φορτισμένου ατόμου Ν της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης (Εικόνα 27Β) [20].



Εικόνα 27. *A: 6-μελής χηλικός δακτύλιος ασπαραγίνης μέσω δεσμού υδρογόνου, B: Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις λυσίνης [20].*

Θα ακολουθήσει η ποτενσιομετρική-φασματοσκοπική μελέτη των πεπτιδίων παρουσία Cu(II) με στόχους (i) τη διαπίστωση κατά πόσο οι αναμενόμενες μειώσεις των τιμών (α) pK_a της N-τελικής αμινομάδας, (β) pK_a ιονισμού κι ένταξης με τον Cu(II) του πρώτου αμιδικού ατόμου N σε σχέση πάντα με αντίστοιχες τιμές του Aβ₅₋₉ επιβεβαιώνονται και πειραματικά και (ii). Αν επιβεβαιωθούν, ποια θα είναι η δεσμευτική ικανότητα έναντι του Cu(II) των νέων πεπτιδίων (μεγαλύτερη-μικρότερη) έναντι της αντίστοιχης με το Aβ₅₋₉.

Σε περίπτωση που το εγχείρημα κριθεί επιτυχές (μεγαλύτερη δεσμευτική ικανότητα), ευελπιστούμε να συμβάλουμε, έστω και ελάχιστα, στη συνεχή «μάχη» για την αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer μιας και θα έχουν σχεδιαστεί δύο πεπτίδια-υποκαταστάτες ικανοί να δεσμεύσουν αποτελεσματικότερα τον Cu(II) σε σχέση με το Aβ₅₋₉. Η ισχυρότερη δέσμευση των ιόντων Cu(II) με τα υπό μελέτη πεπτίδια, θα μπορούσε επιπρόσθετα να οδηγήσει στη χρήση τους και σε άλλες βιολογικές εφαρμογές (Κεφάλαιο 3).

Κεφάλαιο 5: Πειραματική πορεία.

5.1 Σύνθεση πεπτιδίων.

Η σύνθεση των πεπτιδικών μοντέλων αποτελεί το πρώτο βήμα της πειραματικής πορείας της συγκεκριμένης εργασίας και στηρίχθηκε στις αρχές πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield με βάση την Fmoc/tBu στρατηγική χρησιμοποιώντας για την έναρξη της σύνθεσης την ρητίνη Rink Amide ή (4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)αμινομεθυλ]-φαινοξυ)-ρητίνη. Χαρακτηριστικό της Rink Amide ρητίνης είναι πως οδηγεί σε σχηματισμό πεπτιδίων με αμιδικό άκρο μετά την απομάκρυνσή της και πως διαθέτει ελεύθερη ομάδα για αλληλεπίδραση με το C-τελικό άκρο των αμινοξέων.

Τα προστατευμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν (κατά σειρά) για την πεπτιδική σύνθεση παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Προστατευμένα αμινοξέα πεπτιδικής σύνθεσης και το μοριακό τους βάρος.

Προστατευμένο αμινοξύ	MB (g/mol)
Fmoc-Gly-OH	297,3
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383,4
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	411,5
Fmoc-His(Mtt)-OH	633,7
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,7
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την πεπτιδική σύνθεση είναι οι εξής:

- Διχλωρομεθάνιο (DCM, >99,9% Fluka-Schnelldorf, Germany) ως διαλύτης διόγκωσης των κόκκων της ρητίνης, διαλύτης των εκπλύσεων μετά τη σύζευξη των αμινοξέων και μετά την αποκοπή των Fmoc και διαλύτης των διαλυμάτων σύζευξης,
- Διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF, >99,9% Fluka-Schnelldorf, Germany), ως διαλύτης διόγκωσης των κόκκων της ρητίνης, διαλύτης εκπλύσεων μετά τη σύζευξη των αμινοξέων και μετά την αποκοπή των Fmoc και διαλύτης των διαλυμάτων σύζευξης,

- Τριφθοροξικό οξύ (TFA, 99% SAFC-Aldrich, Germany) για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και των προστατευτικών ομάδων των αμινοξέων,
- Πιπεριδίνη (Piperidine, 99% Aldrich, Germany), για την αποκοπή της Fmoc προστατευτικής ομάδας των αμινοξέων και της ρητίνης,
- Διαιθυλαιθέρας (Diethyl Ether >99,5% Riedel-de Haen, Germany) για τη συρρίκνωση των κόκκων της ρητίνης και την καταβύθιση του τελικού πεπτιδίου,
- Τριόσοπροπυλοσιλάνιο (TIS, 98% Fluka, USA) για την απομάκρυνση των πιθανών σχηματιζόμενων καρβοκατιόντων,
- Εξάνιο (n-hexane, LAB-SCAN, Dublin, Ireland) για την απομάκρυνση του τριφθοροξικού οξέος στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύζευξη των αμινοξέων είναι τα εξής:

- Διόσοπρόπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC, Fluka, Germany),
- 1-Υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBT, Neosystem-Strasbourg, Germany) ως βοηθητικό πυρηνόφιλο για τη σύζευξη των αμινοξέων.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων του test Kaiser είναι τα εξής:

- Νινυδρίνη (Ninhydrin C₉H₆O₄, Sigma-Aldrich),
- Κυανιούχο κάλιο 0,001M (KCN 0,001 mol/L, Fluka Chemie AG),
- Αιθανόλη (Ethanol 99%, Fiscer Scientific),
- Φαινόλη (Phenol pure p.a., Riedel-de-Haen),
- Πυριδίνη (Pyridine, Lab-Scan Analytical).

Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν για το test Kaiser είναι τα εξής:

1. 5% νινυδρίνη σε αιθανόλη (w/v),
2. 80% φαινόλη σε αιθανόλη (w/v),
3. 2% κυανιούχο κάλιο 0,001M σε πυριδίνη (v/v).

Το πρώτο βήμα της πειραματικής πορείας ήταν η διόγκωση των κόκκων της ρητίνης με DMF και DCM για να επιτευχθεί όσο το δυνατόν καλύτερη σύζευξη της ρητίνης με το πρώτο αμινοξύ. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε αποκοπή της Fmoc προστατευτικής ομάδας της ρητίνης με διάλυμα πιπεριδίνης 20% σε DMF πραγματοποιώντας δύο προσθήκες. Κατά την πρώτη (διάρκειας 5 min) απομακρύνονται τα καρβοκατιόντα που είναι πιθανό να σχηματίζονται και κατά τη δεύτερη (διάρκειας 10min) αποκόβεται και απομακρύνεται η Fmoc προστατευτική ομάδα της ρητίνης. Ακολούθησαν εκπλύσεις με DMF και DCM και η επιτυχής αποκοπή της Fmoc ελέγχθηκε με test Kaiser (θετικό test Kaiser) [68], [69], [70], [71].

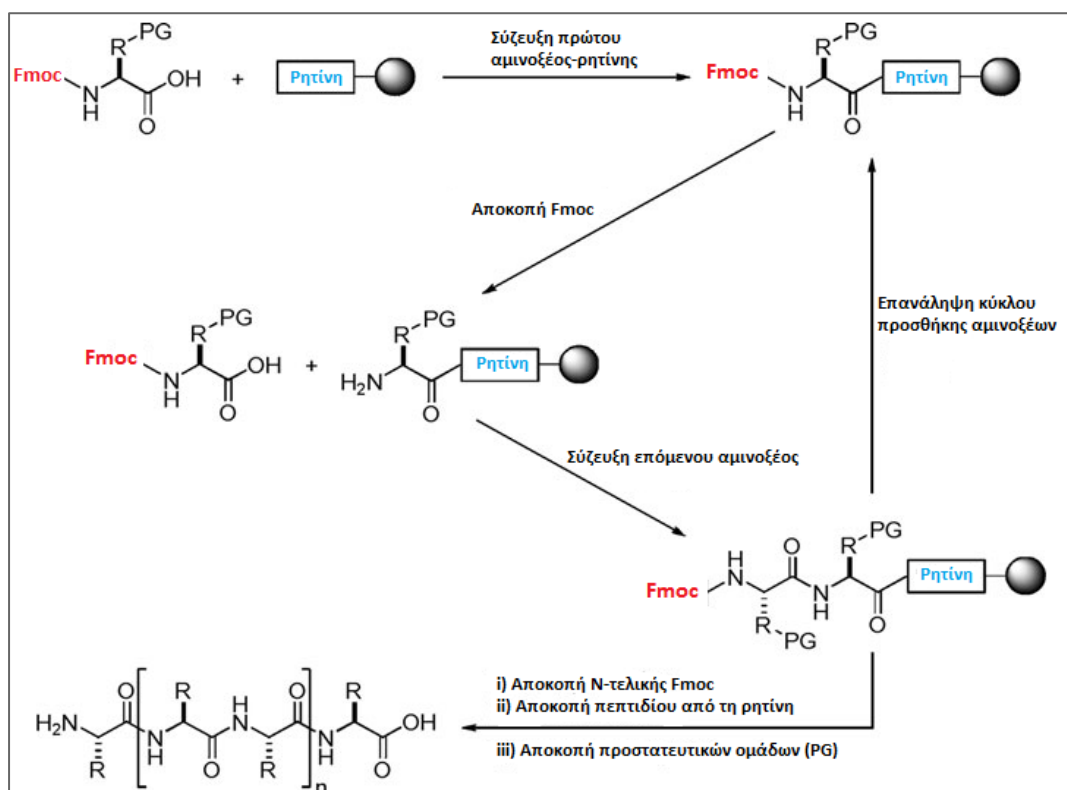
Ακολούθησε η σύζευξη του πρώτου αμινοξέος (Fmoc-Gly-OH) χρησιμοποιώντας περίπου τριπλάσια αναλογία προστατευμένου αμινοξέος και αντιδραστηρίων σύζευξης ως προς τη ρητίνη, Αμινοξύ/HoBt/DIC/ρητίνη = 3/3/3/1. Το HOBt χρησιμοποιήθηκε ως βοηθητικό πυρηνόφιλο για την μείωση του κινδύνου ρακεμοποίησης. Το προστατευμένο αμινοξύ, το HOBt και το DIC διαλύθηκαν με μείγμα DMF:DCM 1:1 σε παγόλουτρο για περίπου 15min υπό ανάδευση και στη συνέχεια το διάλυμα σύζευξης προστέθηκε στην αποκομμένη ρητίνη. Η αντίδραση διήρκησε περίπου 3h υπό ανάδευση με τη χρήση ειδικής λάμπας για τη διατήρηση της θερμοκρασίας δωματίου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις με DMF και DCM και η επιτυχής σύζευξη του αμινοξέος με τη ρητίνη ελέγχθηκε με test Kaiser (αρνητικό test Kaiser). Με τον ίδιο τρόπο συνεχίστηκε και η προσθήκη των επόμενων αμινοξέων μέχρι την ιστιδίνη (κατά σειρά Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH και Fmoc-His(Mtt)-OH). Δηλαδή, αρχικά πραγματοποιήθηκε αποκοπή της Fmoc του πρώτου αμινοξέος και προσθήκη του επόμενου μέχρι τη σύζευξη όλων των αμινοξέων μέχρι την ιστιδίνη. Οι επιτυχείς συζεύξεις κι αποκοπές ελέγχθηκαν με test Kaiser.

Στη συνέχεια, η πεπτιδορητίνη χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη για την προσθήκη της ασπαραγίνης στο ένα και της λυσίνης στο άλλο με τον ίδιο τρόπο. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε αποκοπή της Fmoc ομάδας της ασπαραγίνης και της λυσίνης, αντίστοιχα, με διάλυμα πιπεριδίνης 20%. Οπότε, σχηματίστηκαν δύο πεπτιδορητίνες με ελεύθερο το N-τελικό άκρο της ασπαραγίνης και της λυσίνης.

Το επόμενο βήμα ήταν η αποκοπή των πεπτιδίων από τη ρητίνη και η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων που χρησιμοποιήθηκαν. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα TFA/H₂O/TIS το οποίο μαζί

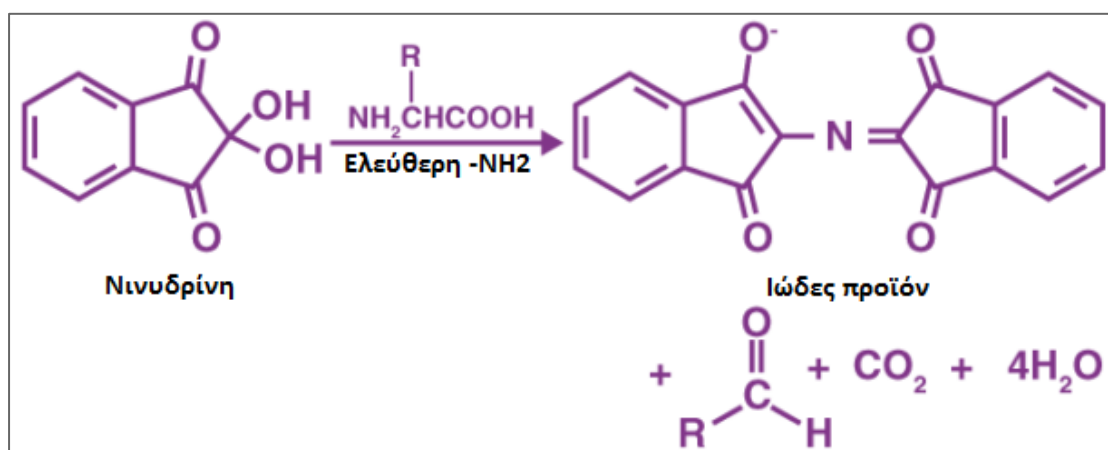
με την πεπτιδορητίνη προστέθηκε σε σφαιρική φιάλη υπό ανάδευση για περίπου 3h. Ακολούθησε διήθηση σε ειδικό ηθμό από την οποία το διήθημα ήταν το μείγμα TFA-πεπτιδίου και στον ηθμό απομονώθηκε η ρητίνη, σε στερεή μορφή [68], [69], [70], [71].

Για την εξάτμιση του TFA και την απομόνωση του πεπτιδίου, χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστήρας (flash evaporator). Επίσης, για να επιτευχθεί όσο το δυνατόν καλύτερη απομάκρυνση των υπολειμμάτων του TFA, η διαδικασία εξάτμισης στον περιστροφικό εξατμιστήρα επαναλήφθηκε τέσσερις φορές προσθέτοντας στο υπόλειμμα διάλυμα DCM:Εξάνιο 1:1. Στη συνέχεια, τα πεπτίδια καταβυθίστηκαν με την προσθήκη παγωμένου διαιθυλαιθέρα στη σφαιρική φιάλη και διηθήθηκαν σε ειδικό ηθμό με την προσθήκη επιπλέον διαιθυλαιθέρα, ώστε να παραμείνει καθαρό πεπτίδιο (στερεό) στον ηθμό και να απομακρυνθεί πιθανή περίσσεια από τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα διάφορα στάδια της σύνθεσης. Τέλος, τα πεπτίδια (στερεά) διαλύθηκαν με διάλυμα TFA $10^{-2}M$ και H_2O , παραλήφθηκαν σε ειδικά φιαλίδια για τη λιοφυλιοποίησή τους. Μία συνοπτική απεικόνιση της πεπτιδικής σύνθεσης φαίνεται στην Εικόνα 28 [68], [69], [71], [72].



Εικόνα 28. Συνοπτική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση [68].

Το test Kaiser που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των αποκοπών των Fmoc ομάδων των αμινοξέων και της ρητίνης και της σύζευξης των αμινοξέων μεταξύ τους και του πρώτου αμινοξέος με την ρητίνη βασίζεται στην αντίδραση νινυδρίνης και εξαρτάται από την ύπαρξη ή όχι ελεύθερης αμινομάδας (-NH₂) (Εικόνα 29). Πιο συγκεκριμένα, σε μία μικρή ποσότητα πεπτιδορητίνης (ελάχιστοι κόκκοι) προστέθηκαν τέσσερις σταγόνες από το κάθε διάλυμα του test Kaiser και το μείγμα τέθηκε σε βρασμό για 1min. Παρουσία ελεύθερης αμινομάδας (επιτυχής αποκοπή Fmoc), όλοι οι κόκκοι της πεπτιδορητίνης από λευκοί χρωματίστηκαν μπλε-μωβ και το test Kaiser χαρακτηρίστηκε θετικό, ενώ απουσία ελεύθερης αμινομάδας (επιτυχής σύζευξη αμινοξέων) οι κόκκοι παρέμειναν λευκοί και το test Kaiser χαρακτηρίστηκε αρνητικό [68].



Εικόνα 29. Η αντίδραση νινυδρίνης παρουσία ελεύθερης αμινομάδας που οδηγεί στον σχηματισμό ιώδους προϊόντος.

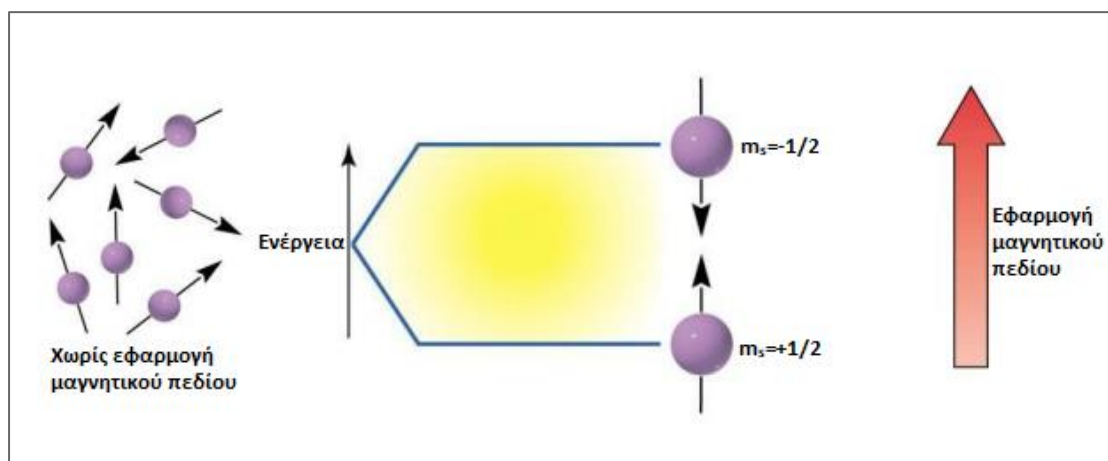
5.2 Χαρακτηρισμός πεπτιδίων.

Ο χαρακτηρισμός των σχηματιζόμενων πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε τις φασματοσκοπικές τεχνικές NMR και ESI-MS.

5.2.1 Φασματοσκοπία NMR.

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αποτελεί ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται όταν οι πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετηθούν εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Οι πυρήνες που είναι ενεργοί στο NMR διακρίνονται από την μαγνητική τους ιδιότητα να έχουν spin (ιδιοπεριστροφή) το οποίο

τους δίνει τη δυνατότητα να συμπεριφέρονται ως μαγνήτες, ενώ εξαιρετικά σημαντικό είναι το γεγονός πως όλοι οι πυρήνες των ατόμων είναι ηλεκτρικά φορτισμένοι. Απουσία μαγνητικού πεδίου, τα πυρηνικά spin προσανατολίζονται τυχαία. Ωστόσο, σε περίπτωση που οι πυρήνες με spin βρεθούν εντός ισχυρού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου μπορούν αρχικά να αποκτήσουν συγκεκριμένο προσανατολισμό και στη συνέχεια να απορροφήσουν ενέργεια στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων ικανή να προκαλέσει τη διέγερσή τους σε ανώτερη ενεργειακή κατάσταση με ταυτόχρονη αλλαγή της φοράς του spin. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται συντονισμός (Εικόνα 30) [73], [74].



Εικόνα 30. Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας του NMR.

Η φασματοσκοπία NMR μελετά την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τους πυρήνες που έχουν spin κι αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία ταυτοποίησης χημικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρέως εκτός από τη Χημεία και στους τομείς της Ιατρικής και της Βιολογίας με εφαρμογές στην απεικόνιση και την ταυτοποίηση βιολογικών μορίων. Οι κυριότεροι πυρήνες που χρησιμοποιούνται κατά τις μελέτες NMR είναι το ^1H και ο ^{13}C , καθώς ο άνθρακας και το υδρογόνο αποτελούν τα κυριότερα συστατικά των χημικών ενώσεων. Όσον αφορά τα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες, μέσω της φασματοσκοπίας NMR είναι δυνατή η ταυτοποίηση των αμινοξέων της αλληλουχίας τους, η σειρά με την οποία συνδέονται τα αμινοξέα μεταξύ τους, η μελέτη της δευτεροταγούς δομής τους, αλλά και των πιθανών αλληλεπιδράσεων με άλλα βιομόρια που οδηγούν σε αλλαγή της δομής τους. Ωστόσο, εκτός από τη φασματοσκοπία NMR ενός πυρήνα σε μία διάσταση, ιδιαίτερα

σημαντικές είναι οι τεχνικές NMR σε δύο διαστάσεις (2D NMR) [74], [75], [76], [77], [78].

Μέσω της φασματοσκοπίας 2D NMR είναι δυνατή η μελέτη των συσχετισμών-αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ενεργών στο NMR πυρήνων σε δύο διαστάσεις, δίνοντας επιπλέον και πιο ασφαλή στοιχεία για τη δομή μιας ένωσης σε σχέση με τα φάσματα μίας διάστασης. Στο NMR δύο διαστάσεων μπορεί να μελετηθεί ο συσχετισμός μεταξύ ίδιων πυρήνων (π.χ. ομοπυρηνικό $^1\text{H}-^1\text{H}$), αλλά και διαφορετικών πυρήνων (π.χ. ετεροπυρηνικό $^1\text{H}-^{13}\text{C}$). Ο συνδυασμός των φασμάτων NMR τόσο σε μία διάσταση, όσο και σε δύο διαστάσεις μπορεί να οδηγήσει στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για τη δομή των πεπτιδίων [75], [76], [77], [78].

Πιο συγκεκριμένα, για τα πεπτίδια της συγκεκριμένης εργασίας λήφθηκαν τα εξής φάσματα NMR:

- ^1H NMR μίας διάστασης,
- ^{13}C NMR μίας διάστασης,
- $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (COrelated SpectroscopY) NMR, το οποίο αποτελεί ένα ομοπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων και βοηθά στην ταυτοποίηση του συσχετισμού των γειτονικών πυρήνων ^1H σε απόσταση το πολύ ως τέσσερις δεσμούς (δεσμική συγγένεια),
- $^1\text{H}-^1\text{H}$ ROESY (Rotating frame Overhause Effect SpectroscopY) NMR, το οποίο αποτελεί ένα ομοπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων και βοηθά στην ταυτοποίηση του συσχετισμού πυρήνων ^1H που έχουν χωρική συγγένεια μεταξύ τους με βάση τη διαμόρφωση στον χώρο της ένωσης στην οποία ανήκουν, με μέγιστη χωρική απόσταση ανίχνευσης συσχετισμού τα 5Å,
- $^1\text{H}-^1\text{H}$ TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) NMR, το οποίο αποτελεί ένα ομοπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων που περιλαμβάνει όλους τους συσχετισμούς των spin των πυρήνων ^1H , ανεξάρτητα με την δεσμική (COSY) ή την χωρική τους συγγένεια (ROESY),
- $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) NMR, το οποίο αποτελεί ένα ετεροπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων που περιλαμβάνει τους συσχετισμούς μεταξύ των πυρήνων ^{13}C με τα ^1H που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμό, βοηθώντας στην ταυτοποίηση όλων των ανθράκων εκτός των τεταρτοταγών που δε συνδέονται με κάποιο υδρογόνο και

- ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) NMR, το οποίο αποτελεί ένα ετεροπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων που περιλαμβάνει τους συσχετισμούς των πυρήνων ^{13}C και ^1H που χωρίζονται μεταξύ τους με δύο ή τρεις δεσμούς, επιτρέποντας έτσι και την ταυτοποίηση των τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα που δεν ανιχνεύονται στο HSQC. [75], [76], [77], [78].

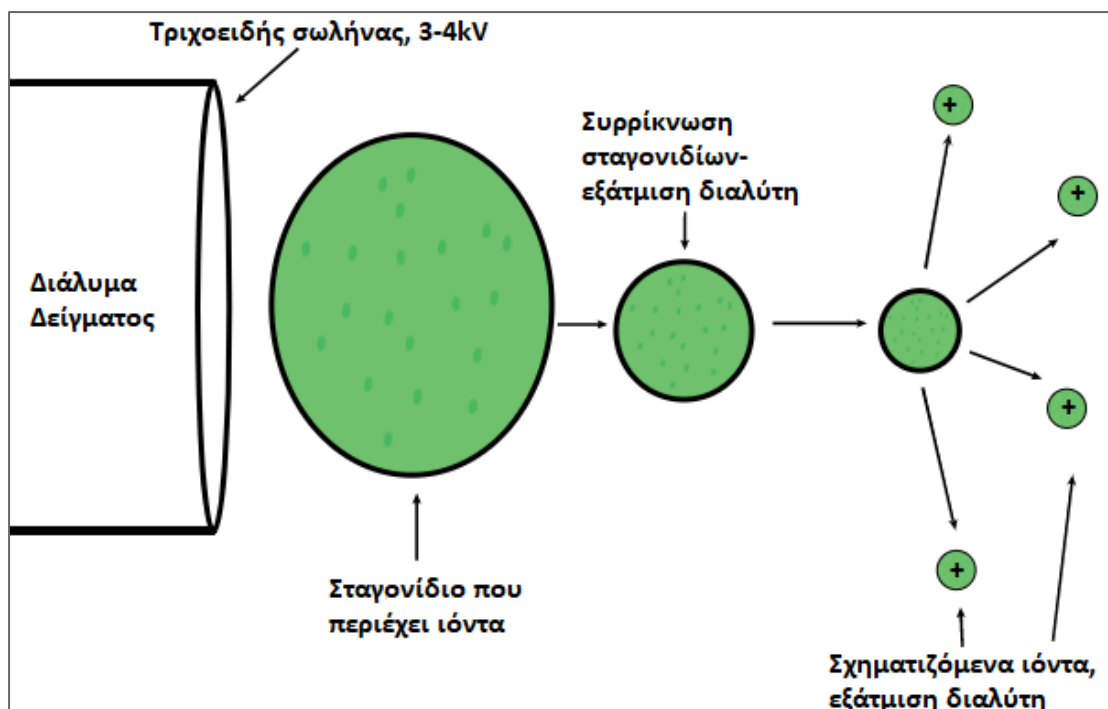
5.2.1.1 Πειραματική πορεία φασματοσκοπίας NMR.

Η λήψη των φασμάτων NMR μίας και δύο διαστάσεων (^1H , ^{13}C , TOCSY, ROESY, HSQC και HMBC) των συντιθέμενων πεπτιδικών μοντέλων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του οργάνου Bruker Avance συχνότητας συντονισμού ^1H 500.13 MHz. Τα πεπτίδια διαλύθηκαν σε μίγμα $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 9:1 v/v (για την εμφάνιση των σημάτων των αμιδικών πρωτονίων), η συγκέντρωσή των πεπτιδίων ήταν 5mM, η τιμή pH ήταν 2,5 και η θερμοκρασία καταγραφής 298 K.

5.2.2 Φασματομετρία ESI-MS.

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό εργαλείο ταυτοποίησης χημικών ενώσεων με τη φασματοσκοπία NMR. Η αρχή λειτουργίας της φασματομετρίας μάζας βασίζεται στην μετατροπή μίας ένωσης σε ιόντα μετά την εξάτμισή της σε ένα φασματόμετρο μάζας. Τα σχηματιζόμενα ιόντα μπορούν να διαχωριστούν με βάση τον λόγο της μάζας τους προς το φορτίο τους (m/z) και να ανιχνευθούν. Για τον ιονισμό της ένωσης χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές προσβολής των ενώσεων με ηλεκτρόνια. Μία από τις σημαντικότερες τεχνικές για αναλύσεις πεπτιδίων και πρωτεϊνών είναι ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI) [74], [79].

Κατά τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό, το διάλυμα του δείγματος τοποθετείται σε έναν τριχοειδή σωλήνα ψεκασμού (capillary) στον οποίο εφαρμόζεται υψηλή τάση δυναμικού περίπου 3-4 kV. Εξαιτίας του υψηλού δυναμικού, δημιουργείται ένα νέφος (spray) από μικροσκοπικά φορτισμένα σωματίδια τα οποία συρρικνώνονται και διασπώνται επαναλαμβανόμενα μέχρι να σχηματιστούν ιόντα αέριας φάσης μετά την εξάτμιση του διαλύτη τα οποία διαχωρίζονται και ανιχνεύονται από τους κατάλληλους ανιχνευτές του φασματόμετρου μάζας (Εικόνα 31). [74], [79], [80], [81], [82], [83], [84].



Εικόνα 31. Αρχή λειτουργίας ESI (ElectroSpray Ionization).

Στο φάσμα μάζας που προκύπτει παριστάνεται η σχετική αφθονία κάθε θραύσματος συναρτήσει του λόγου m/z . Από το συγκεκριμένο γράφημα είναι ικανή η εξαγωγή ενός ασφαλούς συμπεράσματος όσον αφορά την μοριακή μάζα της ένωσης που αναλύεται, μιας και ο μεγαλύτερος λόγος m/z αντιστοιχεί συνήθως στο μοριακό ιόν, δηλαδή ταυτίζεται με τη μοριακή μάζα της ένωσης. Συνεπώς, με τη φασματομετρία μάζας προσδιορίζεται η μοριακή μάζα των συντιθέμενων πεπτιδίων μιας και αποτελούν ενώσεις που περιέχουν διάφορες όξινες-βασικές ομάδες που μπορούν να ιονιστούν, όπως οι φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες κάποιων αμινοξέων, η N-τελική αμινομάδα και η C-τελική καρβοξυλομάδα [74], [79], [80], [81], [82].

5.2.2.1 Πειραματική πορεία φασματομετρίας ESI-MS.

Τα φάσματα μάζας λήφθηκαν σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας (LC) συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας μάζας (high-resolution mass spectrometry, HRMS), εξοπλισμένο με γραμμική παγίδα ιόντων και τροχιακό αναλυτή μάζας Orbitrap, της εταιρίας Thermo Scientific. Για τις αναλύσεις, εγχύθηκαν αραιά (10^{-5} M) διαλύματα ($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ 1:1 v/v) των πεπτιδίων και το σύστημα λειτούργησε στην τεχνική του θετικού ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI). Για την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων και την εξαγωγή των θεωρητικών φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Xcalibur™ 2.1.1 (Thermo Fisher Scientific).

5.3 Ποτενσιομετρία.

Η ποτενσιομετρία (potentiometry) αποτελεί μία ηλεκτροχημική μέθοδο ανάλυσης μέσω της οποίας προσδιορίζεται η διαφορά δυναμικού ηλεκτροχημικών στοιχείων σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος. Η μετρούμενη διαφορά δυναμικού αναπτύσσεται μεταξύ ενός ηλεκτροδίου με γνωστό δυναμικό το οποίο είναι ανεξάρτητο από το διάλυμα στο οποίο θα τοποθετηθεί (ηλεκτρόδιο αναφοράς, reference electrode) κι ενός ηλεκτροδίου το οποίο καθώς εμβαπτίζεται στο προς μελέτη διάλυμα αναπτύσσει δυναμικό ανάλογα με την ενεργότητα του διαλύματος (ενδεικτικό ηλεκτρόδιο, indicator electrode). Τα δύο ηλεκτρόδια συνδέονται μέσω ενός συνδέσμου και συνιστούν το ηλεκτρόδιο συνδυασμού. Το πλέον χρησιμοποιούμενο ηλεκτρόδιο είναι το εκλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων σε διάλυμα (π.χ. ιόντα H^+) το οποίο είναι εκλεκτικό ως προς το μετρούμενο ιόν, ενώ πολύ συχνά ταυτίζεται με το ηλεκτρόδιο ενός κοινού πεχαμέτρου όταν το μετρούμενο ιόν είναι τα ιόντα H^+ . Η μέτρηση της διαφοράς δυναμικού γίνεται συναρτήσει του όγκου προστιθέμενης βάσης ή οξέος γνωστής συγκέντρωσης [85], [86], [87], [88].

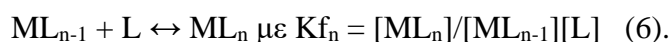
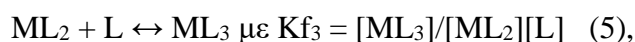
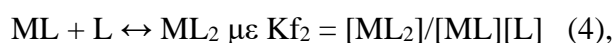
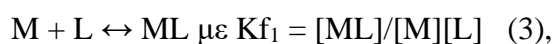
Σε περίπτωση που το διάλυμα στο οποίο εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο είναι το διάλυμα ενός πεπτιδίου ή ενός συμπλόκου πεπτιδίου-μεταλλικού ιόντος, τότε με την προσθήκη βάσης γνωστής συγκέντρωσης είναι δυνατή η εξαγωγή θερμοδυναμικής φύσης πληροφοριών μέσω της μέτρησης της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου. Έτσι, η ποτενσιομετρία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες και απλούστερες μεθόδους προσδιορισμού της τιμής pK_a του υποκαταστάτη (πεπτίδιο), της στοιχειομετρίας και των σταθερών σχηματισμού των συμπλόκων που σχηματίζονται,

της συγκέντρωσης του υποκαταστάτη και του μεταλλικού ιόντος και κατασκευής του διαγράμματος κατανομής σωματιδίων συναρτήσει του pH [85], [86], [87], [88].

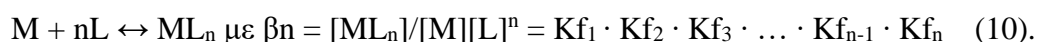
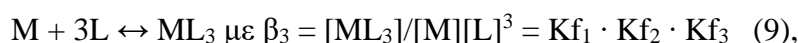
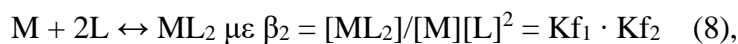
Οι σταθερές σχηματισμού συμπλόκων (K_f) ορίζονται με βάση τις εξής εξισώσεις στις οποίες μετέχουν οι υποκαταστάτες (L) και τα μεταλλικά ιόντα (M):



Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υποκαταστάτη (L) λαμβάνουν χώρα διαδοχικές αντιδράσεις υποκατάστασης μορίων νερού ως εξής:



Επίσης, μπορούν να οριστούν οι ολικές σταθερές σχηματισμού (β) ως εξής:

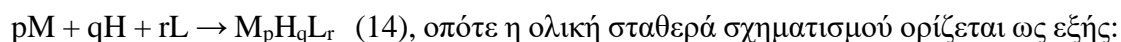


Άρα, αφού $\beta_n = K_n \cdot K_{n-1} \cdot K_{n-2} \cdot \dots \cdot K_1$ (11), μπορούν να οριστούν οι εξής σχέσεις:

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

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

Σε ισορροπίες που περιλαμβάνουν p μεταλλικά ιόντα (M), q πρωτόνια (H^+) και r υποκαταστάτες (L) ισχύει η εξής εξίσωση συμπλοκοποίησης:

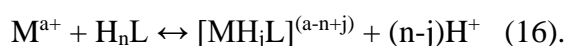


$$\beta_{p,q,r} = [M_p H_q L_r]/[M]^p [H]^q [L]^r \quad (15).$$

Ο συντελεστής των πρωτονίων (q) μπορεί να πάρει αρνητικές τιμές σε δύο περιπτώσεις. Η πρώτη αφορά την περίπτωση υδρόλυσης του μεταλλικού ιόντος ή του

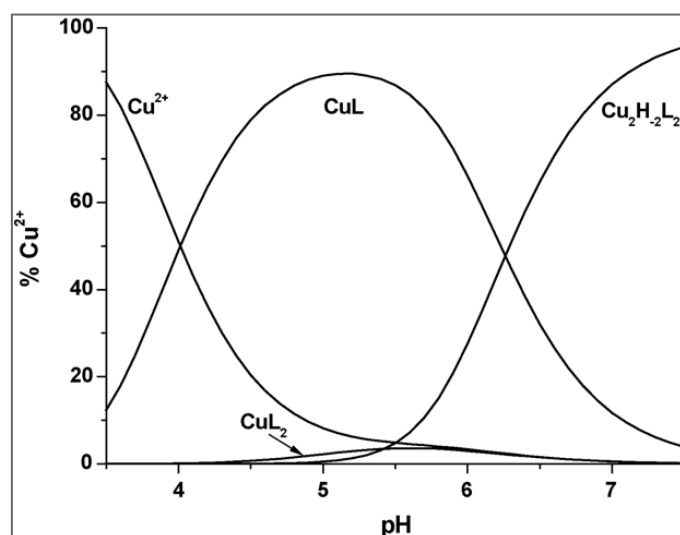
συμπλόκου. Η δεύτερη αφορά την περίπτωση ιονισμού πρωτονίου που φυσιολογικά δεν ιονίζεται στην κλίμακα pH = 0-14. Τέτοιου είδους πρωτόνια είναι τα πρωτόνια των αμιδικών δεσμών που συμμετέχουν και στα πεπτίδια, με αποτέλεσμα στα περισσότερα πεπτιδικά μοντέλα που εντάσσονται με μεταλλικά ιόντα ο αριθμός q να παίρνει αρνητικές τιμές ανάλογα με τον αριθμό των πρωτονίων που ιονίζονται.

Επιπροσθέτως, η αντίδραση σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ ενός μεταλλικού ιόντος (M) κι ενός υποκαταστάτη (L) μπορεί να θεωρηθεί ως ανταγωνιστική προς την πρωτονίωσή του σύμφωνα με την εξής εξίσωση:



Από την εξίσωση (16) μπορεί να υπολογιστεί η τιμή της σταθεράς ισορροπίας τέτοιων αντιδράσεων (K^*), ως εξής: $\log K^* = \log \beta(MH_jL) - \log \beta(H_nL)$ (17).

Ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταλλικών ιόντων με πεπτιδικά μοντέλα και του προσδιορισμού των επί μέρους συμπλόκων που σχηματίζονται συναρτήσει του pH είναι το διάγραμμα κατανομής στο οποίο παριστάνεται το μοριακό κλάσμα κατανομής του μεταλλικού ιόντος (ή του υποκαταστάτη) συναρτήσει της τιμής του pH. Μέσω του διαγράμματος κατανομής εξάγονται συμπεράσματα για τη θερμοδυναμική σταθερότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων συναρτήσει του pH (Εικόνα 32) [87], [88], [89], [90], [91], [92], [93], [94], [95].



Εικόνα 32. Παράδειγμα διαγράμματος κατανομής στο οποίο παριστάνεται το μοριακό κλάσμα των ιόντων Cu^{2+} ($\%Cu^{2+}$) συναρτήσει της τιμής pH [88].

5.3.1 Πειραματική πορεία ποτενσιομετρίας.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία της ποτενσιομετρικής μελέτης ήταν τα εξής:

- Πρότυπο διάλυμα $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ γνωστής περιεκτικότητας σε Cu^{2+} (1g Cu^{2+}/L) της Sigma-Aldrich,
- Πρότυπο διάλυμα KOH 0,1M ως βάση τιτλοδότησης,
- Πρότυπο διάλυμα HNO_3 0,1M για τη ρύθμιση της οξύτητας των διαλυμάτων,
- Πρότυπο διάλυμα KNO_3 για τη ρύθμιση της ιοντικής ισχύος.

Για τις ποτενσιομετρικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε ποτενσιόμετρο τύπου Molspin συνδεδεμένο με αυτόματη προχοΐδα και ηλεκτρόδιο υάλου Ag/AgCl . Το ποτενσιόμετρο ήταν συνδεδεμένο και πλήρως ελεγχόμενο από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 298 K και τα διαλύματα είχαν ιοντική ισχύ 0,1 M (ρύθμιση με χρήση KNO_3). Η πειραματική πορεία περιλάμβανε τα εξής στάδια:

1. **Βαθμονόμηση ηλεκτροδίου υάλου:** Για τη βαθμονόμηση του ηλεκτροδίου υάλου πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση πρότυπου διαλύματος-μίγματος 0,1mL HNO_3 0,1M, 2,25mL KNO_3 0,1M και 0,25mL H_2O με πρότυπο διάλυμα KOH 0,1M, υπό ροή αερίου αργού και με συνεχή μαγνητική ανάδευση. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού (Glee), ούτως ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές E^0 και S της τροποποιημένης εξίσωσης Nerst για το ηλεκτρόδιο υάλου η οποία είναι η εξής:

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

με E = δυναμικό ηλεκτροδίου,

E^0 = δυναμικό ηλεκτροδίου όταν το $\text{pH} = 0$,

S = κλίση του ηλεκτροδίου (mV/pH).

2. **Προσδιορισμός $\log\beta$ και pK_a για τα πεπτιδικά μοντέλα:** Αρχικά, παρασκευάστηκαν stock διαλύματα των καθαρών πεπτιδίων συγκέντρωσης πεπτιδίου περίπου 5mM σε τελικό όγκο 5mL. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν ογκομετρήσεις των καθαρών πεπτιδίων περιεκτικότητας περίπου 0,002 mmol πεπτιδίου και όγκου 2mL ιοντικής ισχύος 0,1 M (KNO_3)

στους 25°C με πρότυπο διάλυμα KOH 0,1 M, υπό ροή αερίου αργού και με συνεχή μαγνητική ανάδευση.

3. Προσδιορισμός $\log\beta$ και pK_a για τα σύμπλοκα πεπτιδίων-Cu(II):

Πραγματοποιήθηκαν ογκομετρήσεις των μιγμάτων πεπτιδίων συγκέντρωσης 1.1 mM και ιόντων Cu(II) συγκέντρωσης 1.0 mM (ιοντικής ισχύος 0,1 M (KNO₃)) στους 25°C με πρότυπο διάλυμα KOH 0,1 M, υπό ροή αερίου αργού και με συνεχή μαγνητική ανάδευση. Στη συνέχεια, τα πειραματικά δεδομένα που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με την βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Hyperquad) [96]. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν το πλήθος, την στοιχειομετρία και τις ολικές σταθερές σχηματισμού των σχηματιζόμενων συμπλόκων.

5.4 Χαρακτηρισμός συμπλόκων πεπτιδίων-Cu(II).

Για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων πεπτιδίων-Cu(II) που ανιχνεύθηκαν, μελέτες πραγματοποιήθηκε και φασματοσκοπική μελέτη με την βοήθεια της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV-vis Spectroscopy).

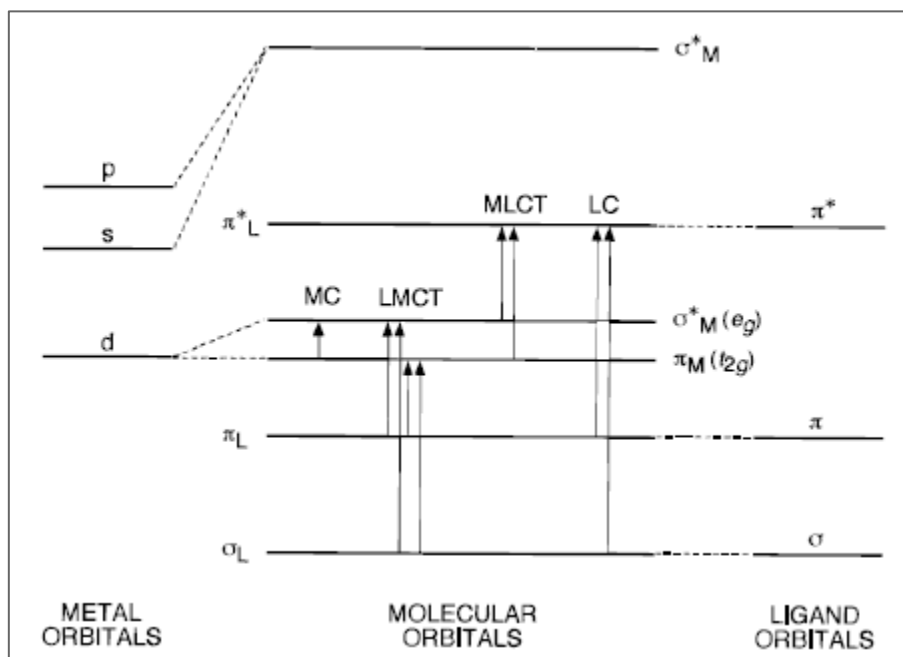
5.4.1 Φασματοσκοπία UV-vis.

Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-vis Spectroscopy) αποτέλεσε ένα από τα πρώτα εργαλεία για τη διαμόρφωση της ατομικής θεωρίας, ενώ ταυτόχρονα χαρακτηρίζεται από αμεσότητα σχετικά με την παρατήρησή της κάτι που την καθιστά μία ιδιαίτερα εύκολη κι αποτελεσματική τεχνική. Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά των συμπλοκων ενώσεων είναι η ανάπτυξη χρώματος (σε διάλυμα). Η εμφάνιση του χρώματος οφείλεται στις μεταπτώσεις ηλεκτρονίων, κυρίως της εξωτερικής στιβάδας του μετάλλου, που παρατηρείται κατά την απορρόφηση ακτινοβολίας ορατού και εξαρτάται από τις διάφορες ενεργειακές στάθμες τους, αλλά και από τη γεωμετρική διάταξη των υποκαταστατών γύρω από το μεταλλικό ιόν. Το φάσμα του ορατού εκτείνεται σε μήκος κύματος μεταξύ 380nm και 780nm, ενώ το φάσμα του υπεριώδους εκτείνεται σε μήκος κύματος μεταξύ 10nm και 380nm [4], [97], [98].

Οι κυριότερες ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις που παρατηρούνται κατά την απορρόφηση ακτινοβολίας είναι οι εξής:

1. **d-d μεταπτώσεις ή μεταπτώσεις μεταλλικού κέντρου (Metal-Center transition, MC):** Οι d-d μεταπτώσεις περιλαμβάνουν την διέγερση των ηλεκτρονίων από τα αδεδσμικά t_{2g} τροχιακά του μετάλλου στα αντιδεδσμικά e_g^* (Εικόνα 33). Η μετάπτωση λαμβάνει χώρα μόνο μεταξύ των d τροχιακών του μετάλλου και γι' αυτό καλείται και d-d μετάπτωση. Οι d-d μεταπτώσεις είναι χαρακτηριστικές για κάθε μεταλλικό ιόν και εμφανίζονται στην ορατή περιοχή του φάσματος, λόγω της άρσης του εκφυλισμού των d τροχιακών.
2. **Μεταφορά φορτίου από το μέταλλο προς τον υποκαταστάτη (Metal to Ligand Charge Transfer, MLCT):** Αυτού του είδους οι μεταπτώσεις περιλαμβάνουν τη διέγερση ηλεκτρονίων από τα κατειλημμένα d τροχιακά των μετάλλων προς τα διαθέσιμα για ηλεκτρόνια αντιδεδσμικά τροχιακά των υποκαταστατών (π^*) (Εικόνα 33). Οι συγκεκριμένες ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μπορεί να θεωρηθεί ότι έχουν ως αποτέλεσμα την οξειδωση του μεταλλικού ιόντος (που «χάνει» ηλεκτρόνια) με ταυτόχρονη αναγωγή του υποκαταστάτη (που «δέχεται» ηλεκτρόνια). Γι' αυτόν τον λόγο χαρακτηρίζονται και μεταπτώσεις μεταφοράς φορτίου (Charge Transfer transition). Οι MLCT μεταπτώσεις παρατηρούνται πολύ συχνά λόγω της μικρής διαφοράς ενέργειας μεταξύ των τροχιακών-δοτών ηλεκτρονίων του μετάλλου και των τροχιακών-δεκτών ηλεκτρονίων του υποκαταστάτη. Οι συγκεκριμένες μεταπτώσεις είναι υψηλής ενέργειας μεταπτώσεις και παρατηρούνται κυρίως στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος.
3. **Μεταφορά φορτίου από τον υποκαταστάτη προς το μέταλλο (Ligand to Metal Charge Transfer, LMCT):** Αυτή η κατηγορία ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων περιλαμβάνει τη διέγερση ηλεκτρονίων από κατειλημμένα τροχιακά των υποκαταστατών (σ ή π) προς τα d τροχιακά του μεταλλικού ιόντος (t_{2g} ή e_g) (Εικόνα 33). Όπως γίνεται αντιληπτό, σε αυτήν την περίπτωση το μέταλλο δέχεται ηλεκτρόνια, οπότε ανάγεται, ενώ οι υποκαταστάτες δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να οξειδώνονται. Οι LMCT μεταπτώσεις είναι λιγότερο πιθανές από τις MLCT, ενώ κι αυτές εντοπίζονται κυρίως στην υπεριώδη περιοχή λόγω υψηλής ενέργειας.
4. **Ενδοσυστημική μετάπτωση μεταξύ των υποκαταστατών (Intraligand transition ή Ligand-Centered transition, IL ή LC):** Οι συγκεκριμένες ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις πραγματοποιούνται μεταξύ τροχιακών που προέρχονται αποκλειστικά από τους υποκαταστάτες (Εικόνα 33). Πιο

συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια μεταβαίνουν από κάποιο δεσμικό τροχιακό των υποκαταστατών (σ ή π) προς κάποιο αντιδεσμικό τροχιακό υψηλότερης ενέργειας, επίσης, των υποκαταστατών (σ^* ή π^*). Τέτοιου τύπου μεταβάσεις δεν επηρεάζουν την οξειδωτική βαθμίδα του μετάλλου. Οι ιδιότητες του φάσματος του συμπλόκου στο οποίο έχει παρατηρηθεί LC μετάπτωση ταυτίζονται σε μεγάλο βαθμό με τις ιδιότητες του φάσματος του ελεύθερου υποκαταστάτη. Οι ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μεταξύ των τροχιακών των υποκαταστατών εμφανίζονται κυρίως στην υπεριώδη (UV) περιοχή του φάσματος [97], [98], [99], [100], [101], [102], [103], [104], [105], [106].



Εικόνα 33. Απλοποιημένο ενεργειακό διάγραμμα μοριακών τροχιακών ενός οκταεδρικού μονοπυρηνικού συμπλόκου στο οποίο απεικονίζονται οι πιθανές ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις διέγερσης κατά την απορρόφηση ακτινοβολίας [97].

Πειραματικά, η ένταση των απορροφήσεων υπολογίζεται από τον νόμο Lambert-Beer:

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad (19),$$

με A = απορρόφηση,

I = ένταση δέσμης φωτός αφού περάσει η ακτινοβολία από το δείγμα,

I_0 = ένταση δέσμης φωτός πριν περάσει η ακτινοβολία από το δείγμα,

ε = συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$),

C = συγκέντρωση ουσίας που απορροφά (M),

l = μήκος διαδρομής ακτινοβολίας (cm).

Οι συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας (ε) αντιστοιχούν στην απορρόφηση (A) για $C=1\text{M}$ και $l=1\text{cm}$ και αποτελούν σημαντικό συγκριτικό στοιχείο καθώς δεν εξαρτώνται από την ποσότητα του δείγματος κι είναι χαρακτηριστικές για τα άτομα-δότες των διάφορων σχηματιζόμενων συμπλόκων. Αντίστοιχα σημαντικές πληροφορίες για τη φύση των ατόμων-δοτών παρέχει η τιμή λ_{max} η οποία αντιστοιχεί στο μήκος κύματος στο οποίο μεγιστοποιείται η απορρόφηση (A). Συγκεκριμένα, για τα σύμπλοκα ιόντων Cu(II) με υποκαταστάτες άτομα-δότες πεπτιδικής αλληλουχίας έχει προκύψει η εξής εμπειρική εξίσωση (Prenesti) [107] υπολογισμού του λ_{max} :

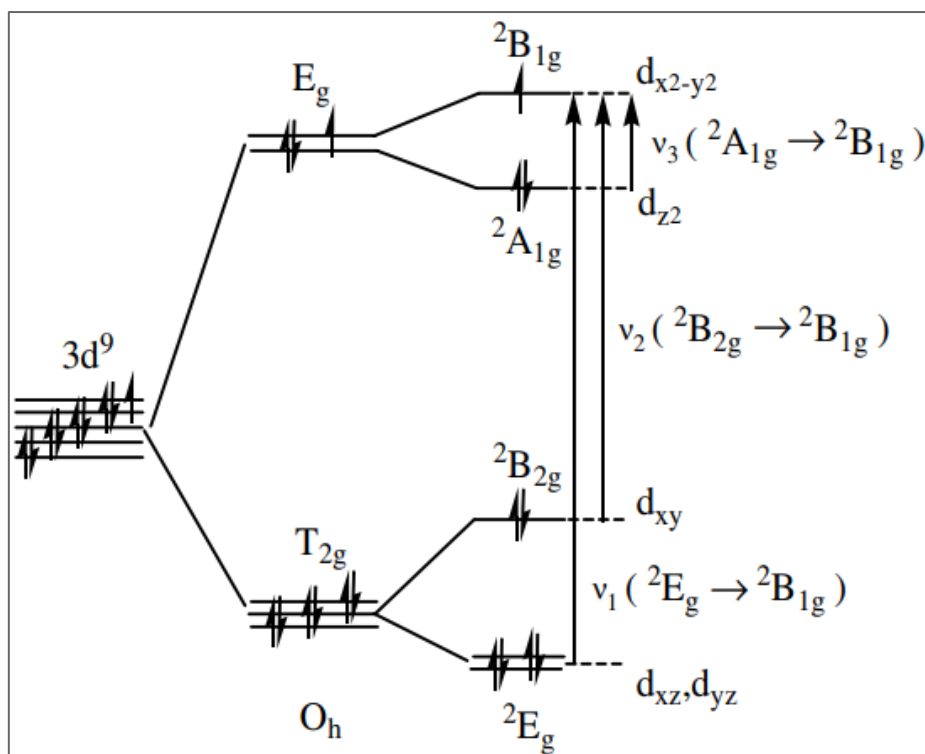
$$\lambda_{\text{max}}(\text{nm}) = 10^3 / [0.294(\text{C=O}/\text{H}_2\text{O}) + 0.346(\text{COO}^-) + 0.434(\text{N}_{\text{im}}) + 0.460(\text{NH}_2) + 0.494(\text{N}^-)] \quad (20)$$

την οποία οι όροι στην παρένθεση αντιπροσωπεύουν τους υποκαταστάτες που εντάσσονται με τα ιόντα Cu(II) . Πιο συγκεκριμένα, $\text{C=O}/\text{H}_2\text{O}$ αντιστοιχεί σε καρβονυλικό οξυγόνο, μόριο νερού ή υδροξύλιο, COO^- αντιστοιχεί σε καρβοξυλικό οξυγόνο, N_{im} σε ημιδαζολικό άτομο αζώτου, NH_2 σε άζωτο αμινομάδας και N^- σε αποπρωτονιωμένο άζωτο πεπτιδικού δεσμού. Από τη σύγκριση των πειραματικών με τα θεωρητικά δεδομένα για τις τιμές λ_{max} μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες για τον τρόπο ένταξης των πεπτιδικών μοντέλων με τα ιόντα Cu(II) . Η αντικατάσταση των ισημερινών μορίων νερού από άτομα οξυγόνου και κυρίως αζώτου στη σφαίρα ένταξης του Cu(II) μετακινεί το λ_{max} σε μικρότερες τιμές, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 [4], [14], [87].

Πίνακας 2: Εφαρμογή της εμπειρικής εξίσωσης Prenesti υπολογισμού λ_{\max} σε σύμπλοκα με διάφορα άτομα δότες O και N.

Άτομα δότες	λ_{\max} (nm)
1NH ₂ , 3O (C=O ή και H ₂ O)	747
1NH ₂ , 1N ⁻ , 2O (C=O ή και H ₂ O)	651
1NH ₂ , 1N ⁻ , 1N _{im} , 1O (OH ⁻) - 3N σύμπλοκα με ιστιδίνη στη θέση 2	567
1NH ₂ , 2N ⁻ , 1O (C=O ή H ₂ O)	576
1NH ₂ , 3N ⁻ - 4N σύμπλοκα	517
1NH ₂ , 1N ⁻ , 1N _{im} , 1O (H ₂ O) - 3N σύμπλοκα με ιστιδίνη στη θέση 2	600
1NH ₂ , 2N ⁻ , 1N _{im} - 4N σύμπλοκα με ιστιδίνη στη θέση 3	536

Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 2.1, τα d⁹ σύμπλοκα Cu(II) υφίστανται παραμόρφωση Jahn-Teller η οποία έχει επίδραση και στα φασματοσκοπικά δεδομένα UV-Vis. Πιο συγκεκριμένα, για τα επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα Cu(II), όπως αυτά των ιόντων Cu(II) με τα πεπτιδικά μοντέλα, αντί για μία ταινία στο φάσμα ορατού που θα αναμενόταν εξαιτίας της ηλεκτρονιακής μετάπτωσης από τα t_{2g} στα e_g τροχιακά του μετάλλου αναμένονται τρεις λόγω άρσης του εκφυλισμού τόσο των t_{2g}, όσο και των e_g. Αυτές οι μεταπτώσεις είναι από τα dx_z, dy_z στα dx²-y², από τα dx_y στα dx²-y² και από τα dz² στα dx²-y² (Εικόνα 34). Η πρώτη αφορά την μεγαλύτερη ενεργειακά μετατόπιση, άρα αντιστοιχεί στο μικρότερο μήκος κύματος (κυανή περιοχή του φάσματος) [27], [28], [108].



Εικόνα 34. Ενεργειακό διάγραμμα d τροχιακών των ιόντων Cu(II) σε επίπεδο τετραγωνικό πεδίο υποκαταστατών. Παρατηρούνται τρεις πιθανές ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις ($dxz, dyz \rightarrow dx^2-y^2$, $dxy \rightarrow dx^2-y^2$ και $dz^2 \rightarrow dx^2-y^2$) λόγω της παραμόρφωσης Jahn-Teller που οδηγεί σε άρση του εκφυλισμού των d τροχιακών [108].

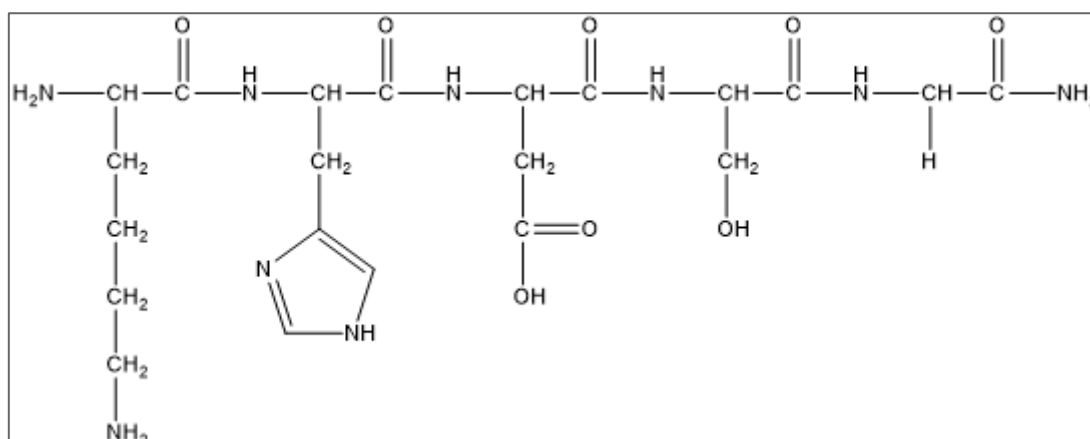
5.4.1.1 Πειραματική πορεία φασματοσκοπίας UV-vis.

Η λήψη των φασμάτων στην περιοχή του ορατού (Vis) πραγματοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UVPC-2401. Η θερμοκρασία πραγματοποίησης των πειραμάτων ήταν οι 25°C, η περιοχή στην οποία λήφθηκαν τα φάσματα ήταν μεταξύ 350nm και 850nm, ενώ χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία μήκους οπτικής διαδρομής $l = 1\text{cm}$. Για τη λήψη των φασμάτων, αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα Cu(II):πεπτιδίων 1:1.1 ($C=1\text{mM}$) στα οποία προστέθηκαν σταδιακά συγκεκριμένες ποσότητες KOH 0,1M και KOH 0,01M, τέτοιες ώστε το pH των επί μέρους διαλυμάτων να αντιστοιχεί στα μέγιστα των καμπυλών κατανομής των συμπλόκων όπως παριστάνονται στα διαγράμματα κατανομής. Η μέτρηση του pH πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ηλεκτροδίου υάλου Ag/AgCl στο εύρος τιμών από 3 έως 12.

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα.

6.1 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.

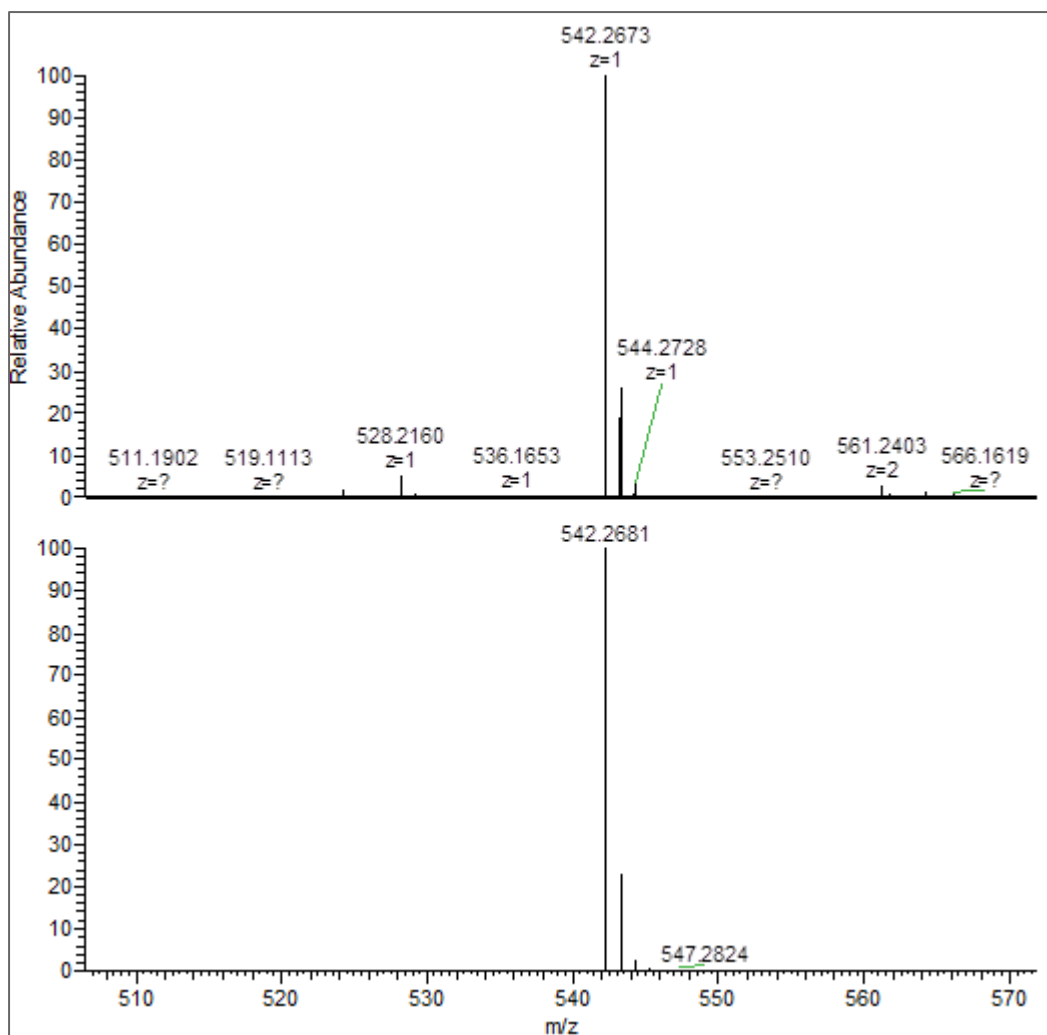
Η σύνθεση του πεπτιδίου H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide (Σχήμα 1) πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield με την Fmoc/tBu στρατηγική και ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας (ESI-MS) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).



Σχήμα 1. Η δομή του πεπτιδίου H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Η μάζα της συντιθέμενης πεπτιδορητίνης ήταν 3,5164g και η απόδοση σύνθεσης 78%. Μετά την αποκοπή της ρητίνης και των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων παραλήφθηκαν 0,5482g πεπτιδίου με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 69,8%

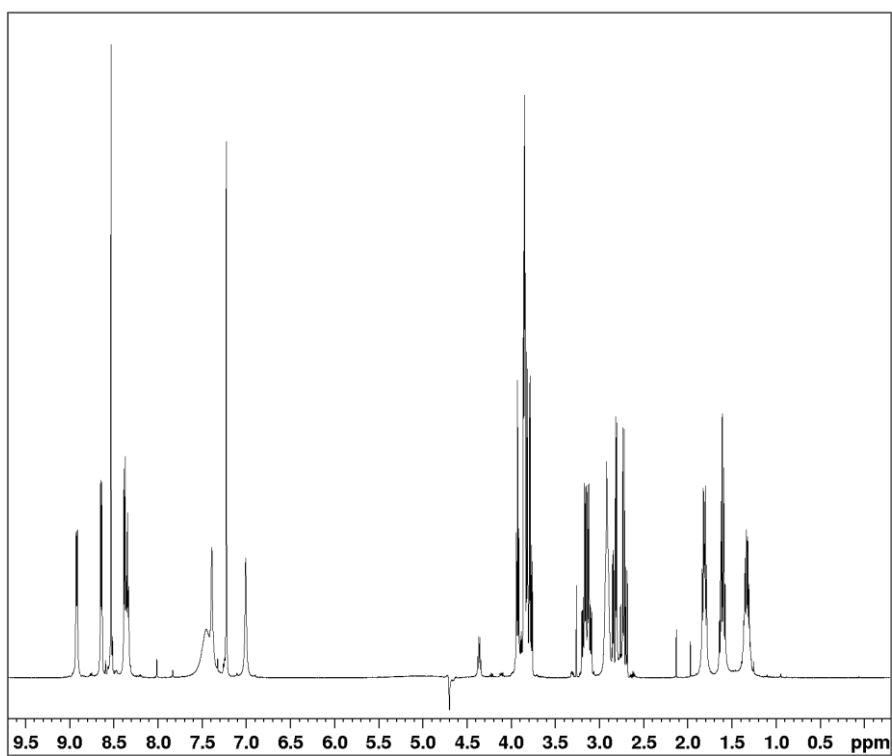
Στο φασματογράφημα μάζας που προέκυψε από την φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 2) παρατηρείται μία συστάδα (cluster) κορυφών με $m/z = 542,2673$ amu η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν $[L+H^+]$. Η αντίστοιχη θεωρητικά υπολογιζόμενη τιμή με βάση τον αναμενόμενο μοριακό τύπο είναι $m/z = 542,2681$ amu.



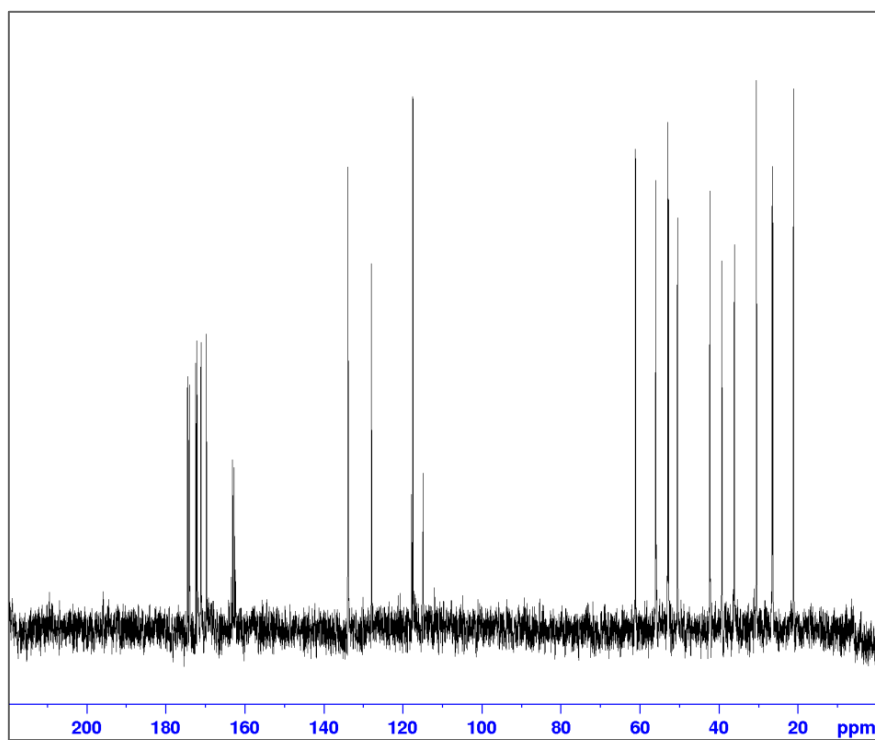
Σχήμα 2. Φάσμα μάζας ESI-MS του πεπτιδίου H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Πάνω: πειραματικό φάσμα, κάτω: θεωρητικά υπολογιζόμενο.

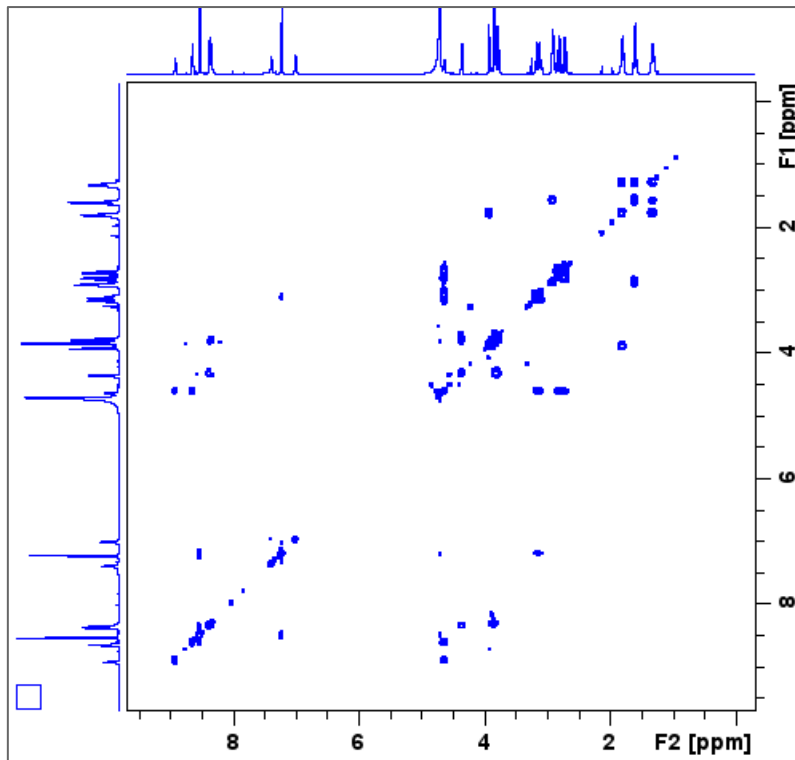
Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του πεπτιδίου H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide λήφθηκαν τα φάσματα NMR 1H (Σχήμα 3), ^{13}C (Σχήμα 4), COSY (Σχήμα 5), ROESY (Σχήμα 6), TOCSY (Σχήμα 7), HSQC (Σχήμα 8) και HMBC (Σχήμα 9). Οι αποδόσεις των κορυφών συντονισμού σε συγκεκριμένους πυρήνες 1H δίνονται στον Πίνακα 3.



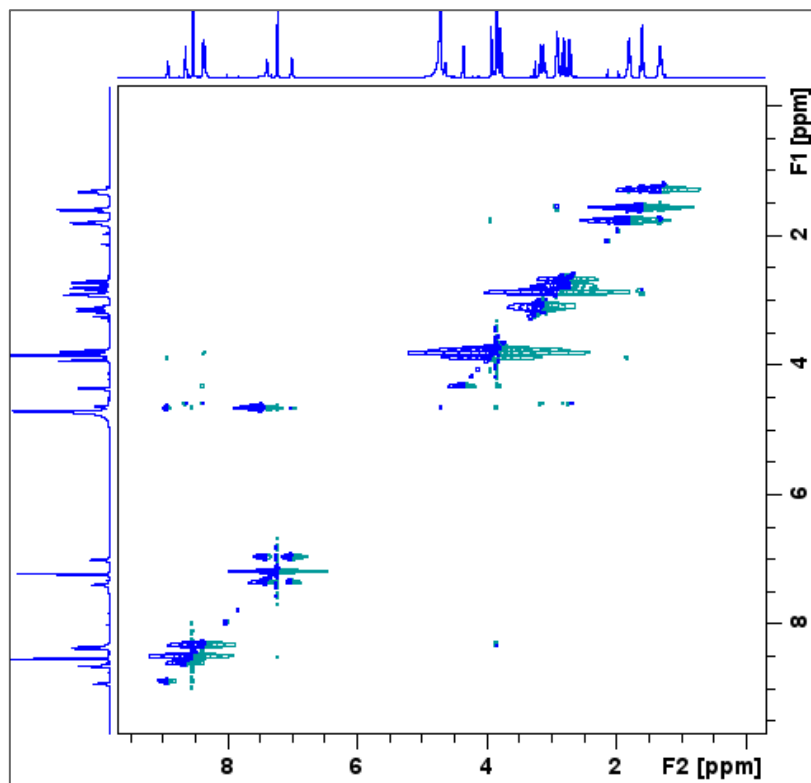
Σχήμα 3. ^1H NMR του πεπτιδίου $\text{H}_2\text{N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.



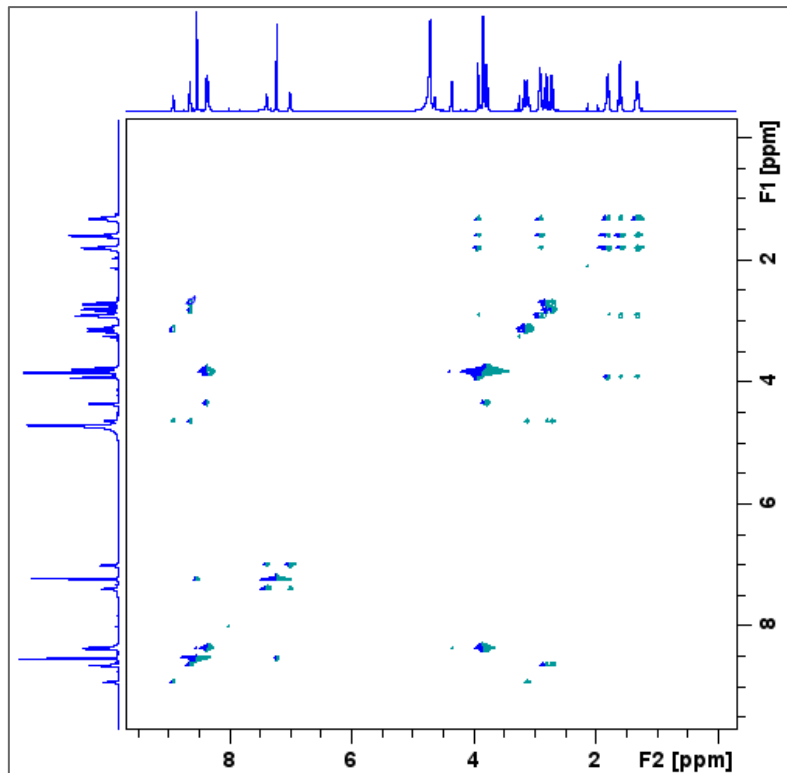
Σχήμα 4. ^{13}C NMR του πεπτιδίου $\text{H}_2\text{N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.



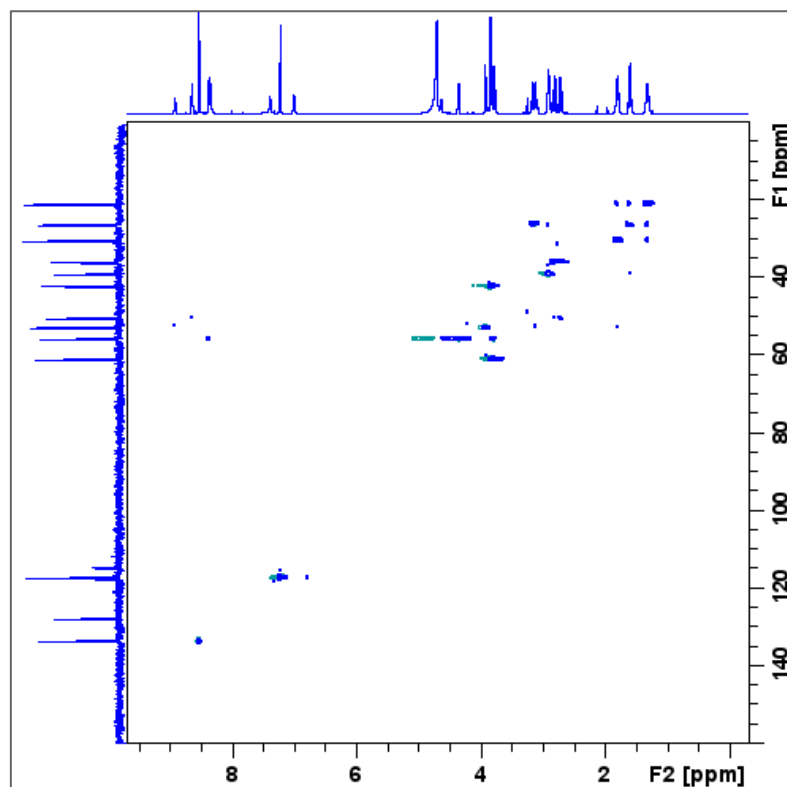
Σχήμα 5. 2D COSY NMR του πεπτιδίου H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.



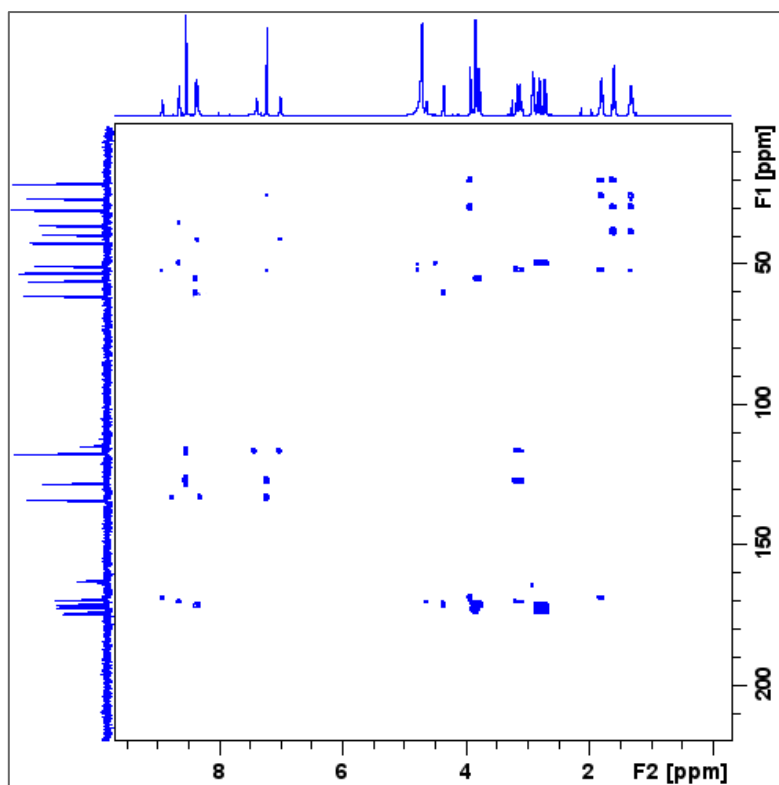
Σχήμα 6. 2D ROESY NMR του πεπτιδίου H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.



Σχήμα 7. 2D TOCSY NMR του πεπτιδίου $H_2N\text{-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.



Σχήμα 8. 2D HSQC NMR του πεπτιδίου $H_2N\text{-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.



Σχήμα 9. 2D HMBC NMR του πεπτιδίου H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.

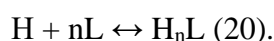
Πίνακας 3: Χημικές μετατοπίσεις 1H (δ , ppm) του πεπτιδίου H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide (pH = 2,5 T = 298 K).

	αH	βH	NH	CONH ₂	γCH_2	δCH_2	ϵCH_2	ϵNH_3^+	C _{2H}	C _{4H}
Lys	3,90	1,83	8,38	-	1,32	1,63	2,87	7,43	-	-
His	4,71	3,13 3,22	8,54	-	-	-	-	-	7,22	8,53
Asp	4,71	2,75 2,88	8,56	-	-	-	-	-	-	-
Gly	3,86 4,36	-	8,36	-	-	-	-	-	-	-
Ser	2,82	4,66 4,64	8,87	-	-	-	-	-	-	-
terminal- CONH₂	-	-	-	6,9 (cis) 7,6 (trans)	-	-	-	-	-	-
terminal- NH₂	1,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-

6.2 Ποτενσιομετρική μελέτη του πεπτιδίου H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και της αλληλεπίδρασης του με το ιόν Cu(II).

6.2.1 Προσδιορισμός τιμών logβ και pK_a του ελεύθερου πεπτιδίου H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Το πεπτίδιο H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide περιλαμβάνει τέσσερις ομάδες που είναι πιθανό να ιονιστούν στην περιοχή pH από 0 έως 12. Γι' αυτόν τον λόγο μπορεί να συμβολιστεί και ως LH₄. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες που μπορούν να ιονιστούν είναι η καρβοξυλομάδα του ασπαρτικού οξέος (Asp-β-COOH), το άτομο N₃ του ιμιδαζολίου της ιστοιδίνης (N_{im}), η N-τελική αμινομάδα (NH₂) και η ε-αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης (ε-NH₃⁺-Lys). Η αντίδραση για τον σχηματισμό των πρωτονιωμένων σωματιδίων είναι η εξής:



Οι ολικές σταθερές πρωτονίωσης (β ή logβ) (Πίνακας 4) υπολογίζονται ως εξής:

$$\beta (LH_n) = [LH_n] / [H]^n [L] \quad (21).$$

Οι τιμές pK_a (Πίνακας 4) υπολογίζονται ως εξής:

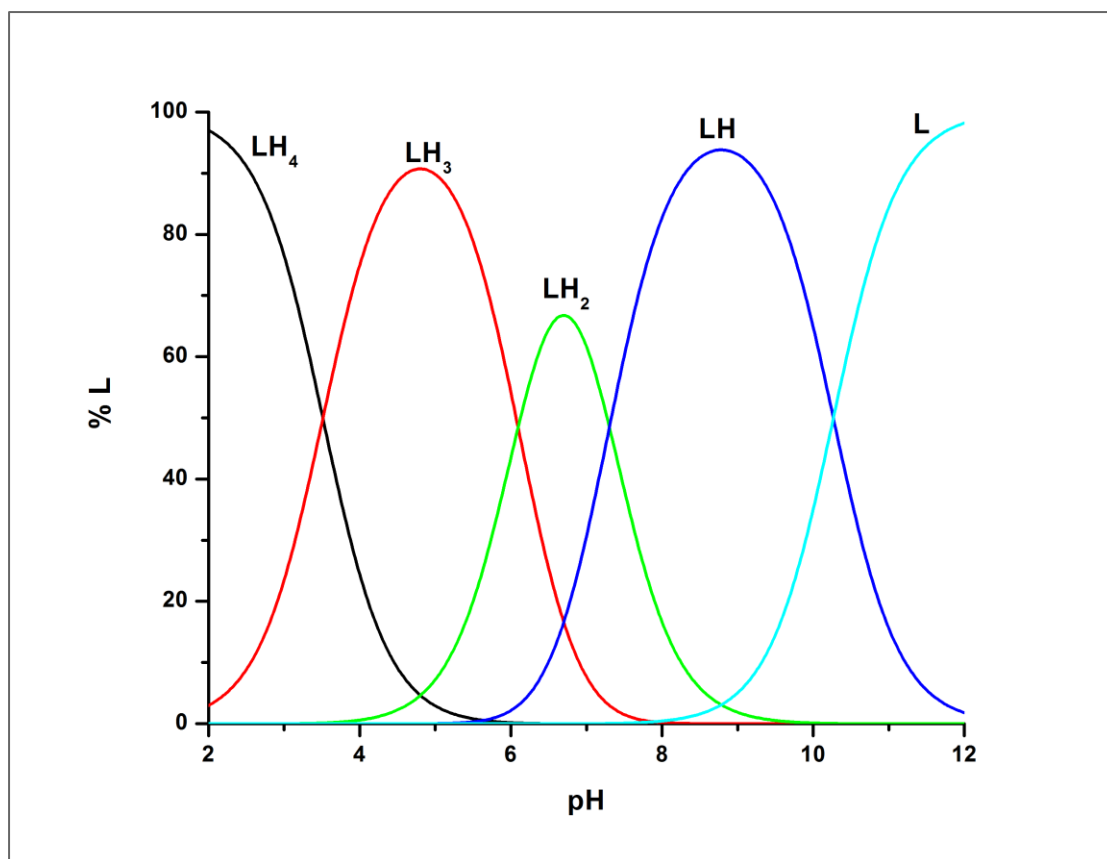
$$pK_a (LH_n) = \log\beta (LH_n) - \log\beta (LH_{n-1}) \quad (22).$$

Στον Πίνακα 4 συνοψίζονται τα αποτελέσματα υπολογισμού των τιμών logβ και pK_a, ενώ στο Σχήμα 10 παρατίθεται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (πρωτονιωμένων και μη μορφών) του πεπτιδίου H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Πίνακας 4: Ολικές σταθερές πρωτονίωσης (logβ) και τιμές pK_a των χαρακτηριστικών ομάδων του πεπτιδίου H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide (T=298 °K, I=0,1M (KNO₃)).

Σχηματιζόμενο σωματίδιο	logβ*	pK _a	Χαρακτηριστική ομάδα
LH ₄	27,18	3,5	Asp-β-COOH
LH ₃	23,67	6,1	N ₃ -His-im
LH ₂	17,57	7,3	terminal-NH ₂
LH	10,27	10,3	Lys-NH ₃ ⁺

*: Τυπική απόκλιση = 10⁻²



Σχήμα 10. Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του πεπτιδίου H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα κατανομής (Σχήμα 10), αρχικά το πεπτίδιο βρίσκεται στην πλήρως πρωτονιωμένη μορφή του, LH_4 . Με την αύξηση του pH πραγματοποιείται η αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας του ασπαρτικού οξέος ($Asp-COOH$) με τιμή $pK_a = 3,5$. Με περαιτέρω αύξηση του pH, πραγματοποιείται αποπρωτονίωση του N_3 του ιμιδαζολίου της ιστοιδίνης με τιμή $pK_a = 6,1$. Ακολουθεί ο ιοντισμός της N-τελικής αμινομάδας του πεπτιδίου με τιμή $pK_a = 7,3$. Τέλος, η περαιτέρω αύξηση της τιμής του pH, οδηγεί στην αποπρωτονίωση της ε-αμινομάδας της λυσίνης με τιμή $pK_a = 10,3$. Στον Πίνακα 5, οι τιμές pK_a για το πεπτίδιο H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide συγκρίνονται με τις αντίστοιχες τιμές του πεπτιδίου στο οποίο βασίστηκε η συγκεκριμένη έρευνα (Aβ₅₋₉), αλλά και με το πεπτίδιο Gly-His-Lys το οποίο αποτελεί το πιο συχνά αναφερόμενο στις βιβλιογραφικές πηγές. [67], [109], [110].

Πίνακας 5: Σύγκριση των τιμών pK_a του πεπτιδίου H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide με τα πεπτίδια $A\beta_{5-9}$ και Gly-His-Lys.

Ομάδα ιοντισμού	pK_a (H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide)	pK_a ($A\beta_{5-9}$)	pK_a (Gly-His-Lys)
Asp-COOH	3,5	3,2	-
His-im(N_3)	6,1	6,1	6,5
terminal-NH ₂	7,3	7,4	7,9
Lys-ε-NH ₃ ⁺	10,3	-	10,5

Από τα δεδομένα του Πίνακα 5 εξάγεται το συμπέρασμα πως οι τιμές pK_a που αντιστοιχούν στον ιοντισμό των χαρακτηριστικών ομάδων του πεπτιδίου H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide είναι παρόμοιες με αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας για παρόμοια πεπτίδια. [67], [109], [110], [111].

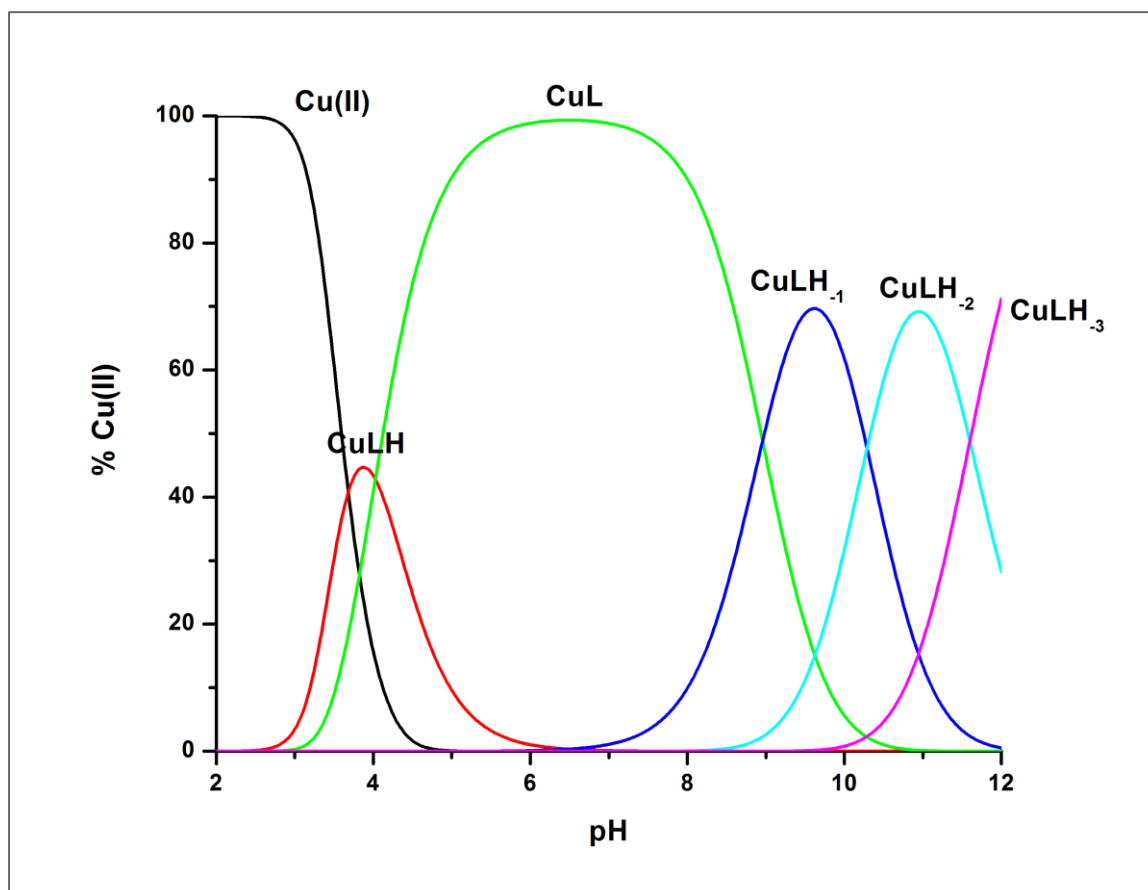
6.2.2 Ποτενσιομετρική μελέτη της αλληλεπίδρασης των ιόντων $Cu(II)$ με το πεπτίδιο H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Για την εύρεση της στοιχειομετρίας και του τρόπου ένταξης του πεπτιδίου H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide με τα ιόντα $Cu(II)$ πραγματοποιήθηκαν ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις σε υδατικά διαλύματα $Cu(II)$ /πεπτιδίου. Η αναλογία $Cu(II)$:πεπτίδιο για την πραγματοποίηση των ογκομετρήσεων ήταν περίπου ίση με 1:1,1. Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος Hyperquad με τη βοήθεια του οποίου ουσιαστικά προσομοιώνονται οι πειραματικές καμπύλες ογκομέτρησης με θεωρητικά υπολογιζόμενες που προκύπτουν από τις συνθήκες των πειραμάτων και τις προβλέψεις σχετικά με το πλήθος, τη στοιχειομετρία και τις σταθερές σχηματισμού των αναμενόμενων συμπλόκων συναρτήσει της τιμής pH. Στον Πίνακα 6 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν (πλήθος-στοιχειομετρία συμπλόκων και τιμές $\log\beta$ για το βέλτιστο μοντέλο). Επιπρόσθετα υπολογίστηκαν και παρουσιάζονται και οι τιμές pK_a για τις αντιδράσεις ιοντισμού: $CuLH_n \leftrightarrow CuLH_{n-1} + H^+$ (23).

Στο Σχήμα 11 παρατίθεται το αντίστοιχο διάγραμμα κατανομής συναρτήσει της τιμής pH.

Πίνακας 6: Ολικές σταθερές σχηματισμού ($\log\beta$) των συμπλόκων Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και τιμές pK_a (T=298 °K, I=0,1M KNO₃).

Σχηματιζόμενα σύμπλοκα	$\log\beta$	pK _a
CuLH	19,82	-
CuL	15,80	4,0
CuLH ₋₁	6,84	9,0
CuLH ₋₂	-3,45	10,3
CuLH ₋₃	-15,05	11,6



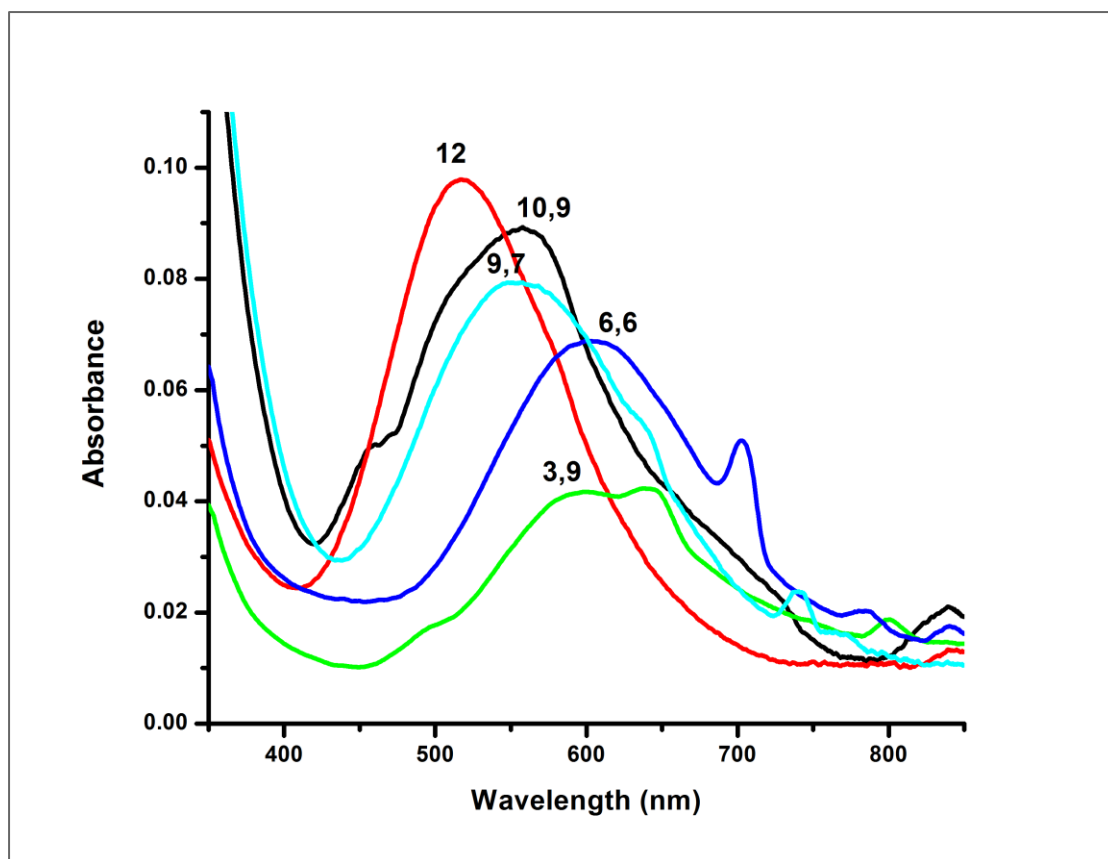
Σχήμα 11. Διάγραμμα κατανομής συμπλόκων Cu(II) για την αλληλεπίδραση Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide. Η συγκέντρωση των ιόντων Cu(II) ήταν 1 mM, ενώ του πεπτιδίου 1,1 mM

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα κατανομής (Σχήμα 11), η αλληλεπίδραση των ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο αρχίζει από χαμηλές τιμές pH περίπου 3 και συνεχίζεται μέχρι pH=12. Το προτεινόμενο μοντέλο περιλαμβάνει 5 σωματίδια στοιχειομετρίας 1:1. Επίσης, διακρίνεται πως το σύμπλοκο που επικρατεί σε μεγαλύτερο εύρος pH και σχηματίζεται σε φυσιολογικές τιμές pH είναι το στοιχειομετρίας CuL.

6.3 Φασματοσκοπική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Τα φάσματα ορατού του συστήματος Cu-πεπτιδίου σε αναλογία 1:1,1 (Σχήμα 12) καταγράφηκαν σε τιμές pH οι οποίες αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής κάθε σωματιδίου (Σχήμα 11) όπως προέκυψαν από τις ποτενσιομετρικές τιτλοδοτήσεις. Στον Πίνακα 7 αναγράφονται οι τιμές λ_{\max} και ϵ για κάθε φάσμα.

Η ενέργεια των d-d μεταπτώσεων των συμπλόκων Cu(II) εξαρτάται από το είδος των ατόμων δοτών στο ισημερινό επίπεδο. Ωστόσο, η συνεισφορά των ατόμων-δοτών αζώτου είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των ατόμων δοτών οξυγόνου. Με βάση αυτό το δεδομένο, δικαιολογείται η σταδιακή μείωση της τιμής λ_{\max} (αύξηση του ϵ) με σταδιακή αύξηση του pH, καθώς σταδιακά τα άτομα δότες οξυγόνου αντικαθίστανται από άτομα δότες N (Σχήμα 12) μέχρι που στη σφαίρα ένταξης του Cu(II) στο ισημερινό επίπεδο να έχουν ενταχθεί 3 άτομα N (NH₂, N⁻, N_{im}).



Σχήμα 12. Φάσματα υπεριώδους-ορατού μιγμάτων Cu(II): H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide (1:1.1) που καταγράφηκαν στις αναγραφόμενες τιμές pH.

Πίνακας 7: Φασματοσκοπικά δεδομένα ορατού (λ_{\max} , ϵ) του συστήματος Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide

pH	λ_{\max} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
3,9	599	41,7
	639	42,3
6,6	601	68,9
	702	50,9
9,7	558	79,3
	740	23,8
10,9	558	89,3
12	517	97,9

6.4 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων για το πεπτίδιο H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και το σύμπλοκό του με ιόντα Cu(II).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν το διάγραμμα κατανομής των σχηματιζόμενων σωματιδίων (Σχήμα 11) διαπιστώνεται η ύπαρξη πέντε συμπλόκων στην κλίμακα pH 3-12. Το πρώτο εξ αυτών, στοιχειομετρίας CuLH σχηματίζεται σε εύρος pH 2,8-5,8, ενώ το μέγιστο της κατανομής του εντοπίζεται σε pH 3,9. Το φάσμα απορρόφησης (UV-Vis) σε pH 3,9 (Σχήμα 12) αποτελείται από τρεις ταινίες απορρόφησης (δυο επικαλυπτόμενες υψηλότερης ενέργειας και μια χαμηλότερης >700 nm. Η ύπαρξη περισσότερων της μιας ταινίας στα σύμπλοκα Cu(II) είναι ενδεικτική του φαινομένου Jahn-Teller [112]. Η τιμή λ_{\max} =599 nm της μεγαλύτερης ενέργειας ταινίας βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με την θεωρητικά υπολογιζόμενη (εξίσωση Prenesti) 600 nm για σφαίρα ένταξης 3N {1 NH₂, 1 N_{im}, 1 N⁻, H₂O}. Η πειραματική μας τιμή συμφωνεί απόλυτα και με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα 3N συμπλόκων παρομοίων συστημάτων [20], [67], [109], [110], [111], [113], [114] και ιδιαίτερα αυτά του Cu(II) με τα πεπτίδια Αβ₅₋₉, Αβ₅₋₁₂ [67]. Με βάση δε την στοιχειομετρία του, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η β-COOH του ασπαρτικού είναι πρωτονιωμένη.

Από τιμή pH 4 και μετά (Σχήμα 11) παρατηρείται ο σχηματισμός του συμπλόκου στοιχειομετρίας CuL, το οποίο επικρατεί σε φυσιολογική τιμή pH. Η τιμή λ_{\max} παραμένει αμετάβλητη (601 nm) γεγονός που υποδεικνύει ότι υιοθετεί τον ίδιο τύπο ένταξης με το προηγούμενο. Η τιμή pK_a που αντιστοιχεί στον σχηματισμό του από το CuLH είναι 4,0 και πλησιάζει την αντίστοιχη (3,5) για τον ιοντισμό της καρβοξυλομάδας του Asp στο ελεύθερο πεπτίδιο. Επομένως αποδίδεται σε αυτή την ομάδα και στο συμπλοκοποιημένο. Η μικρή αύξηση της τιμής pK_a είναι ενδεικτική της συνολικής μείωσης του φορτίου του συστήματος κατά μια μονάδα λόγω της συμπλοκοποίησης του μετάλλου [67]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το εν λόγω σύμπλοκο είναι το πλέον σταθερό θερμοδυναμικά καθώς υφίσταται στο μεγαλύτερο εύρος τιμών pH (4,5-8,5).

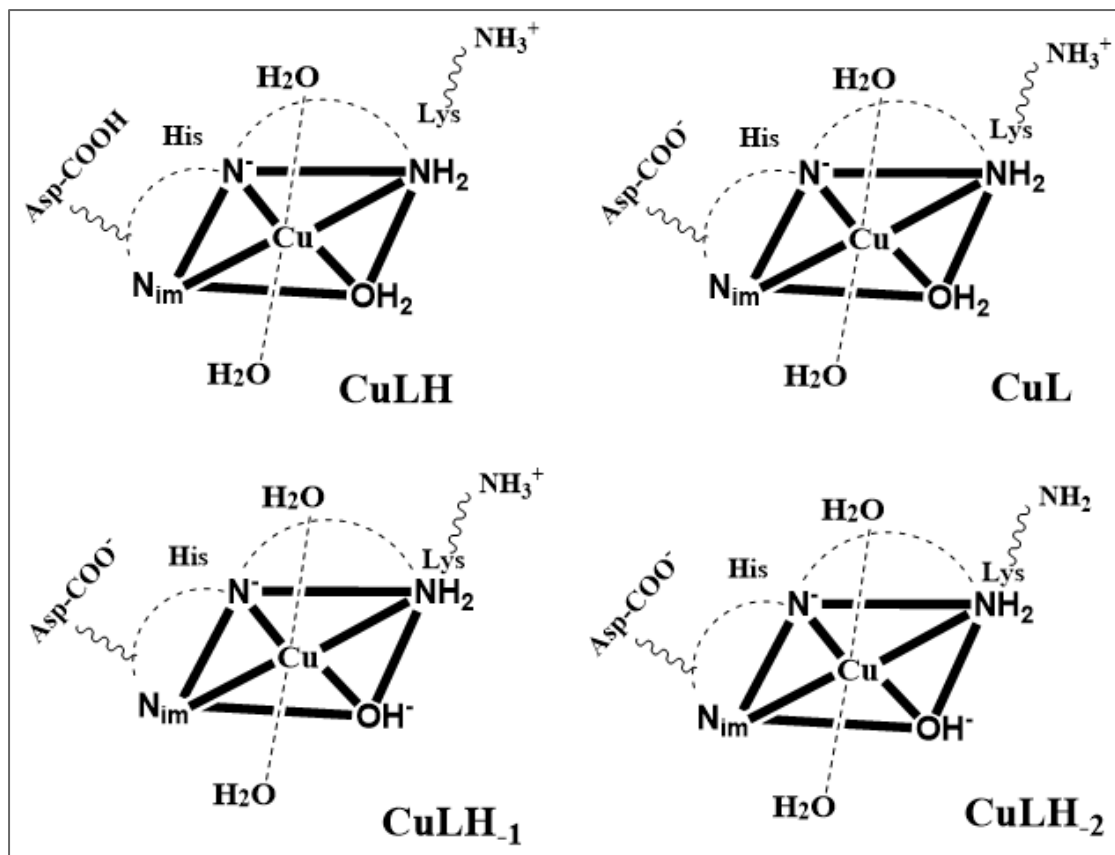
Το επόμενο σύμπλοκο στοιχειομετρίας CuLH₋₁ επικρατεί για τιμή pH 9,5 . Η μεγάλη μετατόπιση της τιμής λ_{\max} (558 nm) προς το κυανό (42 nm) είναι ενδεικτική της ισχυροποίησης του πεδίου των υποκαταστατών στο ισημερινό επίπεδο. Δεδομένου της έλλειψης αμιδικού δότη προς το N-τελικό άκρο και μελετώντας αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα [67] προτείνεται ο ιοντισμός ενός μορίου H₂O (pK_a=9) ο οποίος οδηγεί στο σχηματισμό ύδροξυ συμπλόκου. Εξάλλου και η θεωρητικά

υπολογιζόμενη τιμή $\lambda_{\max} = 567 \text{ nm}$ με βάση την εξίσωση Prenesti για σφαίρα ένταξης $\{1 \text{ NH}_2, 1 \text{ N}_{\text{im}}, 1 \text{ N}^+, \text{OH}^-\}$ ενισχύει την πρότασή μας.

Η επόμενη διεργασία ιοντισμού ($\text{pK}_a=10,3$) οδηγεί στον σχηματισμό του σωματιδίου στοιχειομετρίας CuLH_2 . Λαμβάνοντας υπόψη το αμετάβλητο της τιμής λ_{\max} (558 nm) και την παραπάνω τιμή pK_a η οποία είναι η ίδια με αυτή που αντιστοιχεί στον ιοντισμό της $\epsilon\text{-NH}_3^+$ της λυσίνης στο ελεύθερο πεπτίδιο, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα CuLH_1 και CuLH_2 διαφέρουν μόνο ως προς την κατάσταση πρωτονίωσης της εν λόγω ομάδας.

Τέλος, σε pH μεγαλύτερο του 10 ξεκινά ο σχηματισμός του συμπλόκου στοιχειομετρίας CuLH_3 . Για το συγκεκριμένο παρατηρείται μετατόπιση της τιμής λ_{\max} (517 nm) προς το κυανό (39 nm). Η απουσία αμιδικού δότη διαθέσιμου προς ένταξη στο πεπτίδιο (τουλάχιστον προς το N-τελικό άκρο) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πηγή του επιπλέον πρωτονίου που ογκομετρείται θα πρέπει να είναι το πυρρολικό άτομο N, N(1) του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης. Σε αυτή την περίπτωση είναι δυνατός ο σχηματισμός 4N πολυπυρηνικών συμπλόκων [111], [113], στα οποία το άτομο N(1) αντικαθιστά το ιόν υδροξειδίου που καταλαμβάνει τη τέταρτη θέση ένταξης στο ισημερινό επίπεδο. Πιθανό είναι επίσης να μην αλλάζει η σφαίρα ένταξης και η μεταβολή της τιμής λ_{\max} να οφείλεται στην έμμεση ισχυροποίηση του πεδίου των υποκαταστατών λόγω του παραπάνω ιοντισμού.

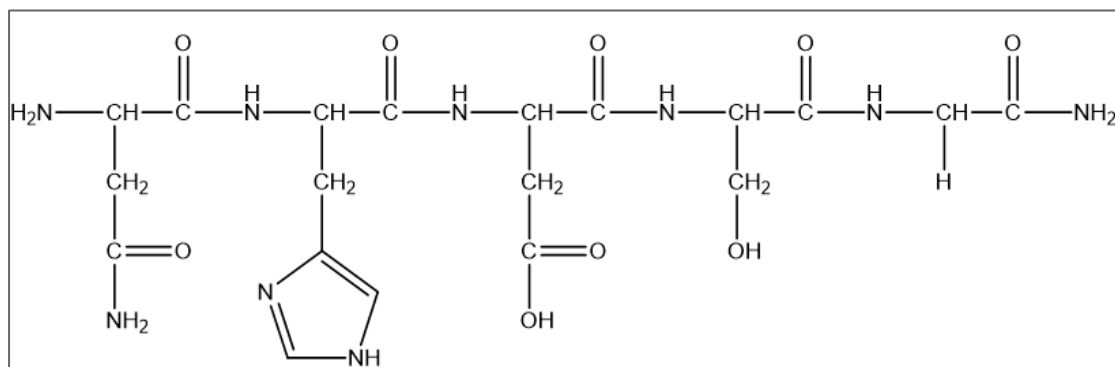
Στο Σχήμα 13 αναπαρίσταται η σφαίρα ένταξης των κυρότερων 3N συμπλόκων με το πεπτίδιο.



Σχήμα 13. Σχηματική αναπαράσταση της δομής των κυριότερων 3N συμπλόκων Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide.

6.5 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.

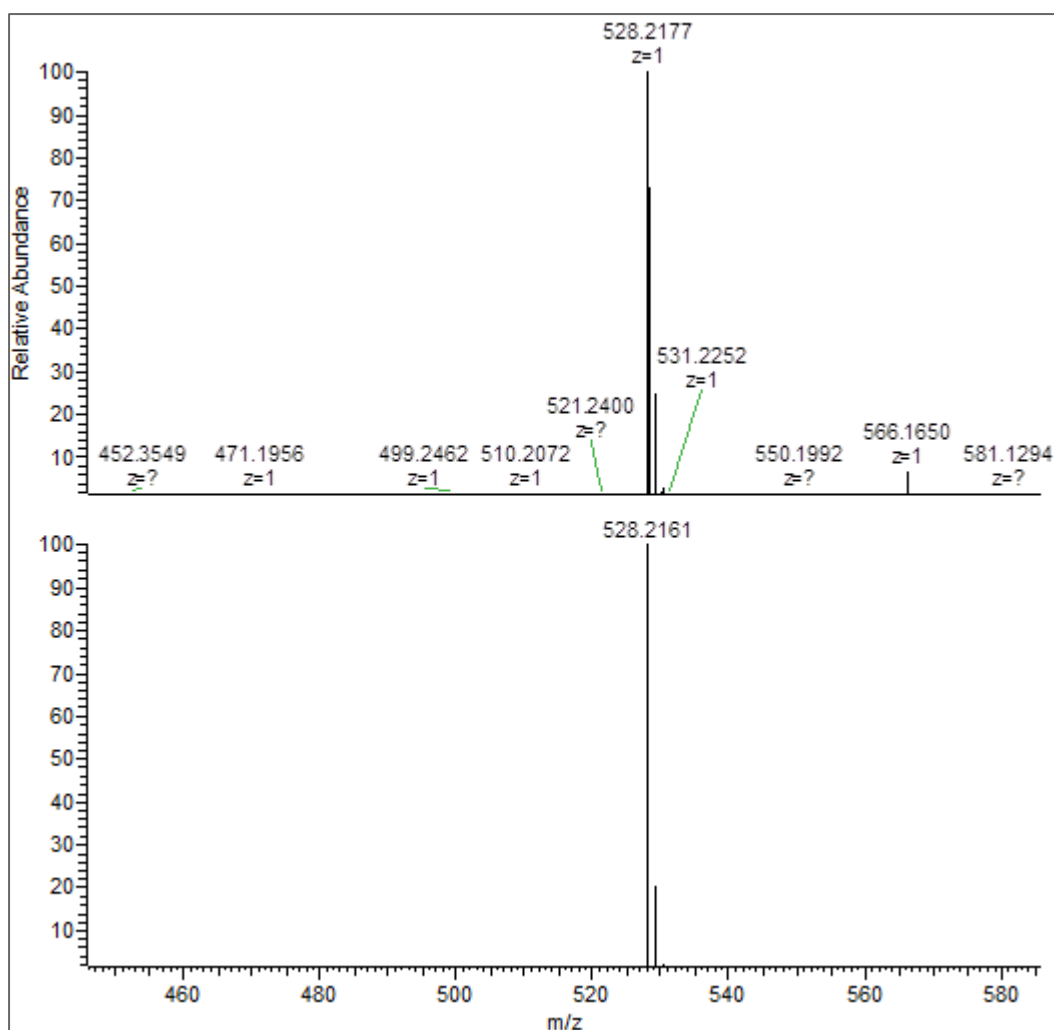
Η σύνθεση του πεπτιδίου H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide (Σχήμα 14) πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield με την Fmoc/tBu στρατηγική και χαρακτηρίστηκε με φασματομετρία μάζας (ESI-MS) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).



Σχήμα 14. Η δομή του πεπτιδίου H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Η μάζα της συντιθέμενης πεπτιδορητίνης ήταν 2,1389 g και η απόδοση σύνθεσης 45%. Μετά την αποκοπή της ρητίνης και των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων παραλήφθηκαν 0,414 g πεπτιδίου με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 94,5%

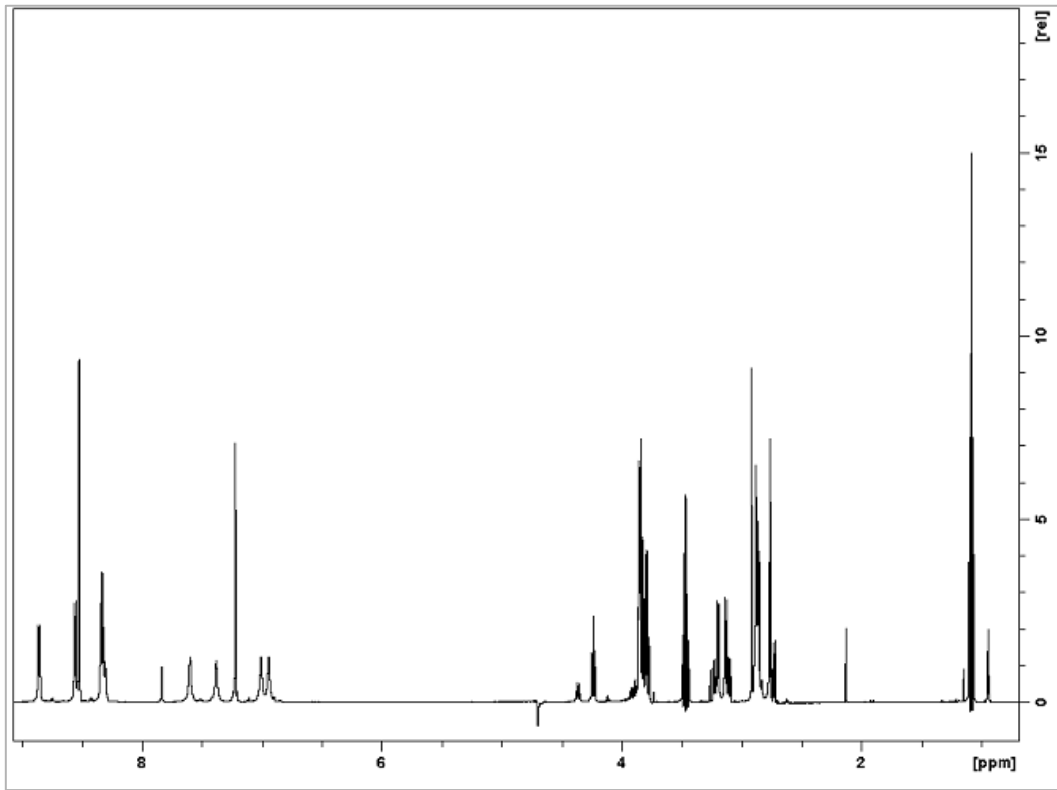
Στο φασματογράφημα μάζας που προέκυψε από την φασματομετρία μάζας ESI-MS (Σχήμα 15) παρατηρείται μία συστάδα (cluster) κορυφών με $m/z = 528,2177$ amu η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν $[L+H^+]$. Η αντίστοιχη θεωρητικά υπολογιζόμενη τιμή με βάση τον αναμενόμενο μοριακό τύπο είναι $m/z = 528,2161$ amu.



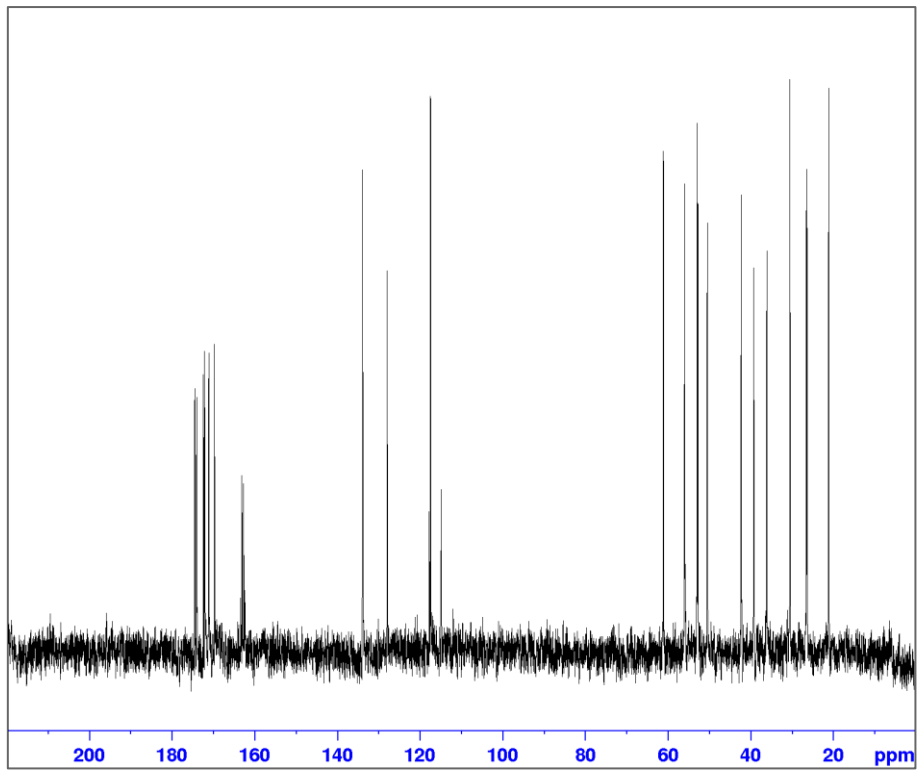
Σχήμα 15. Φάσμα μάζας ESI-MS του πεπτιδίου $H_2N\text{-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.

Πάνω: πειραματικό φάσμα, κάτω: θεωρητικά υπολογιζόμενο.

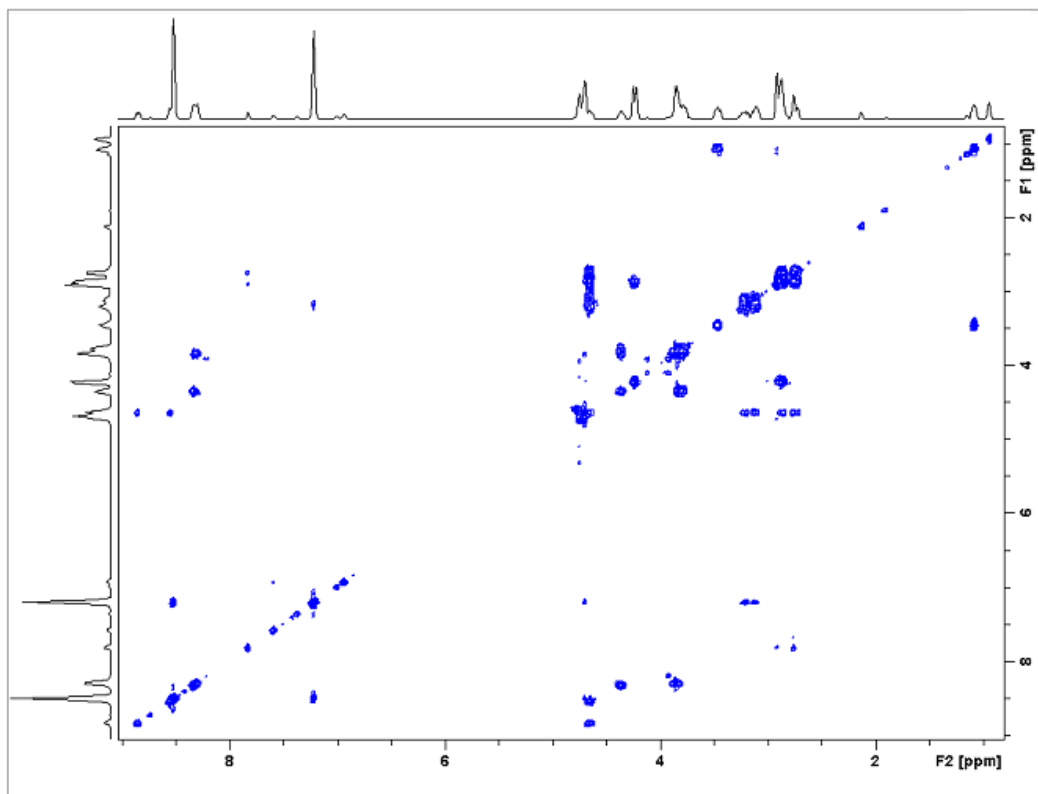
Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του πεπτιδίου $H_2N\text{-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$ λήφθηκαν τα φάσματα NMR 1H (Σχήμα 16), ^{13}C (Σχήμα 17), COSY (Σχήμα 18), ROESY (Σχήμα 19), TOCSY (Σχήμα 20), HSQC (Σχήμα 21) και HMBC (Σχήμα 22). Οι αποδόσεις των κορυφών συντονισμού σε συγκεκριμένους πυρήνες 1H δίνονται στον Πίνακα 8.



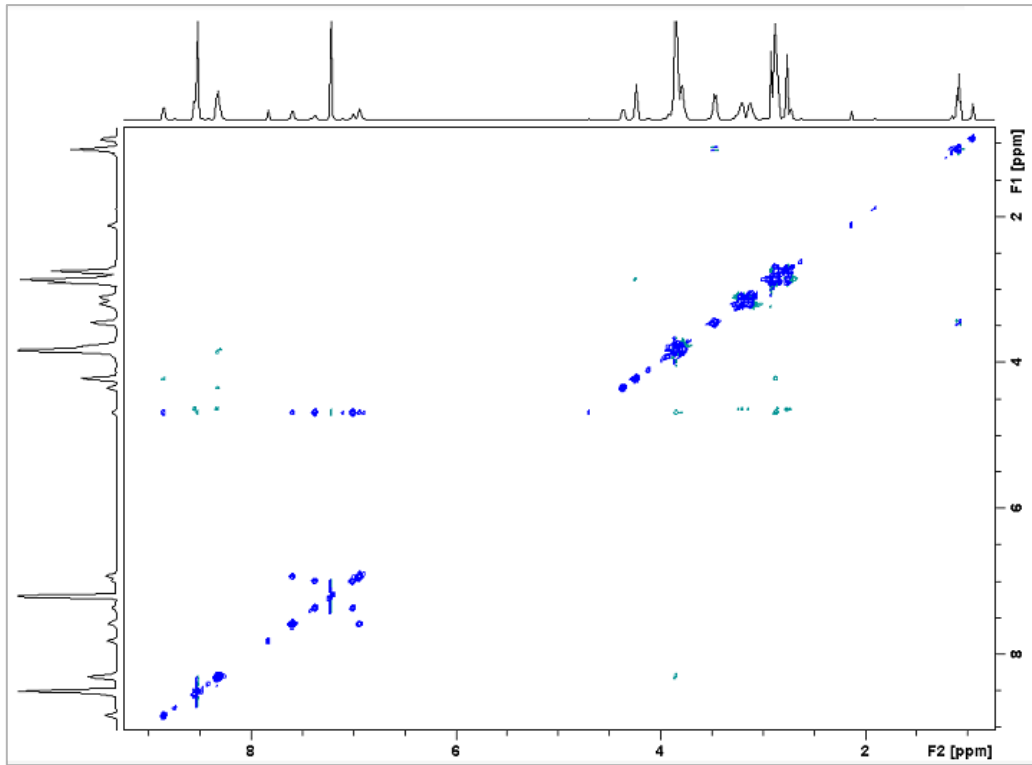
Σχήμα 16. ¹H NMR του πεπτιδίου H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.



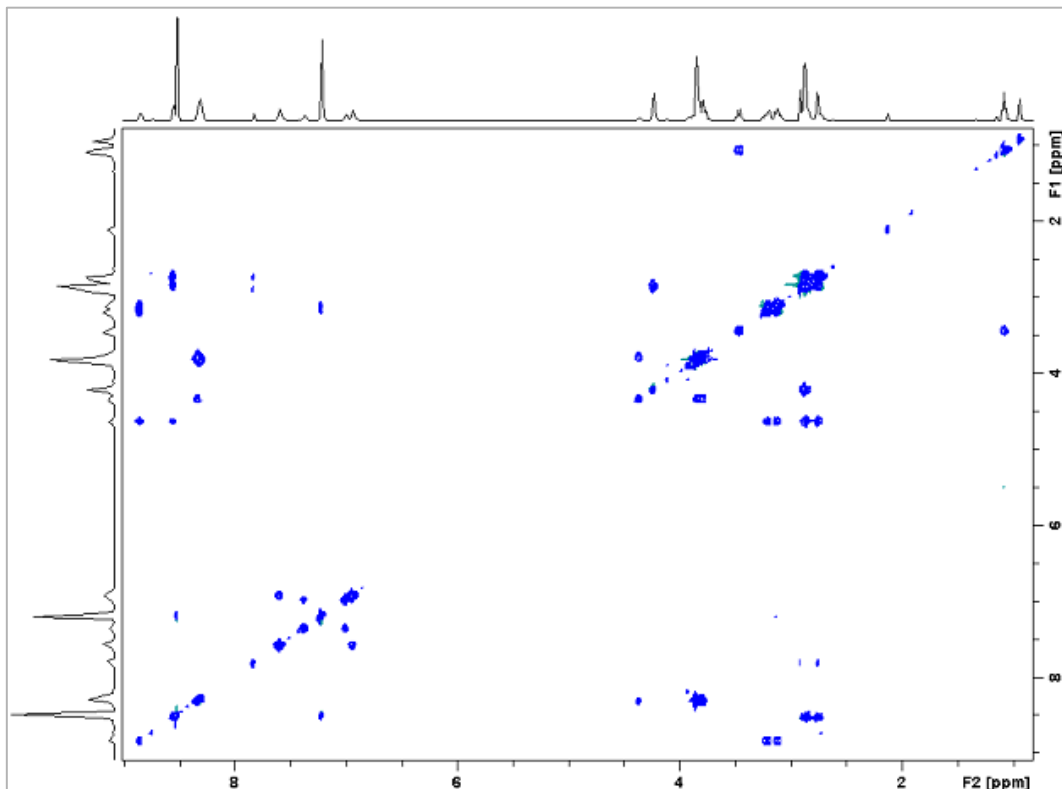
Σχήμα 17. ^{13}C NMR του πεπτιδίου $\text{H}_2\text{N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.



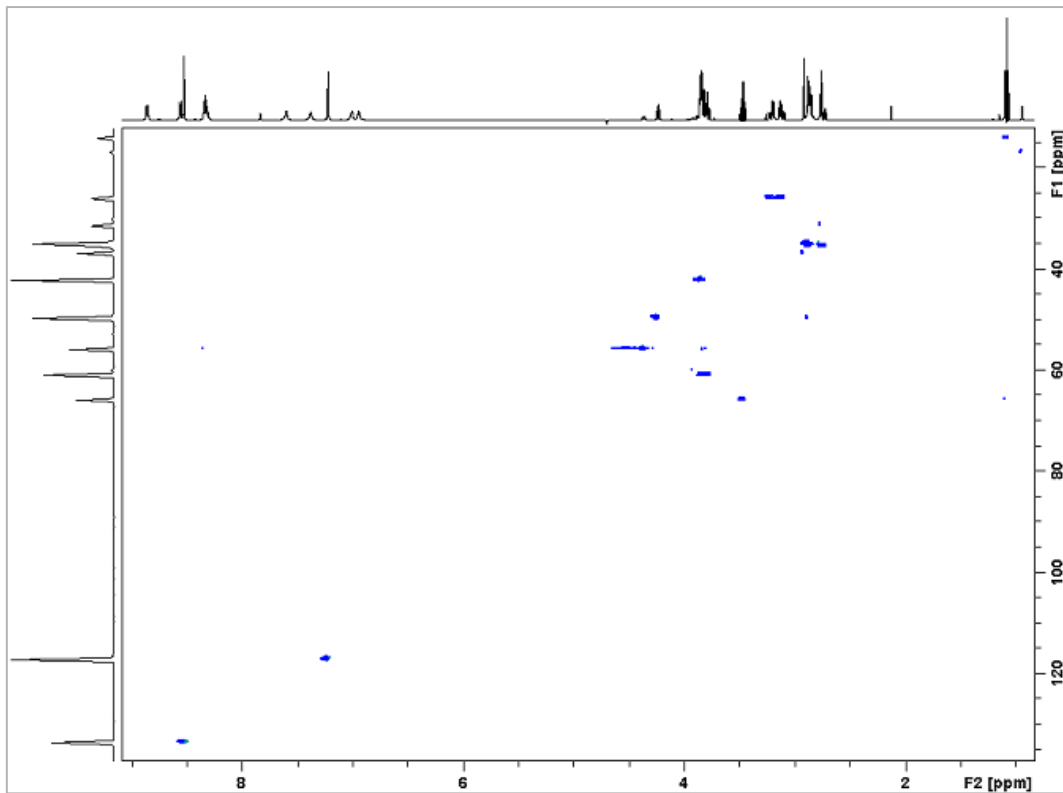
Σχήμα 18. 2D COSY NMR του πεπτιδίου $\text{H}_2\text{N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.



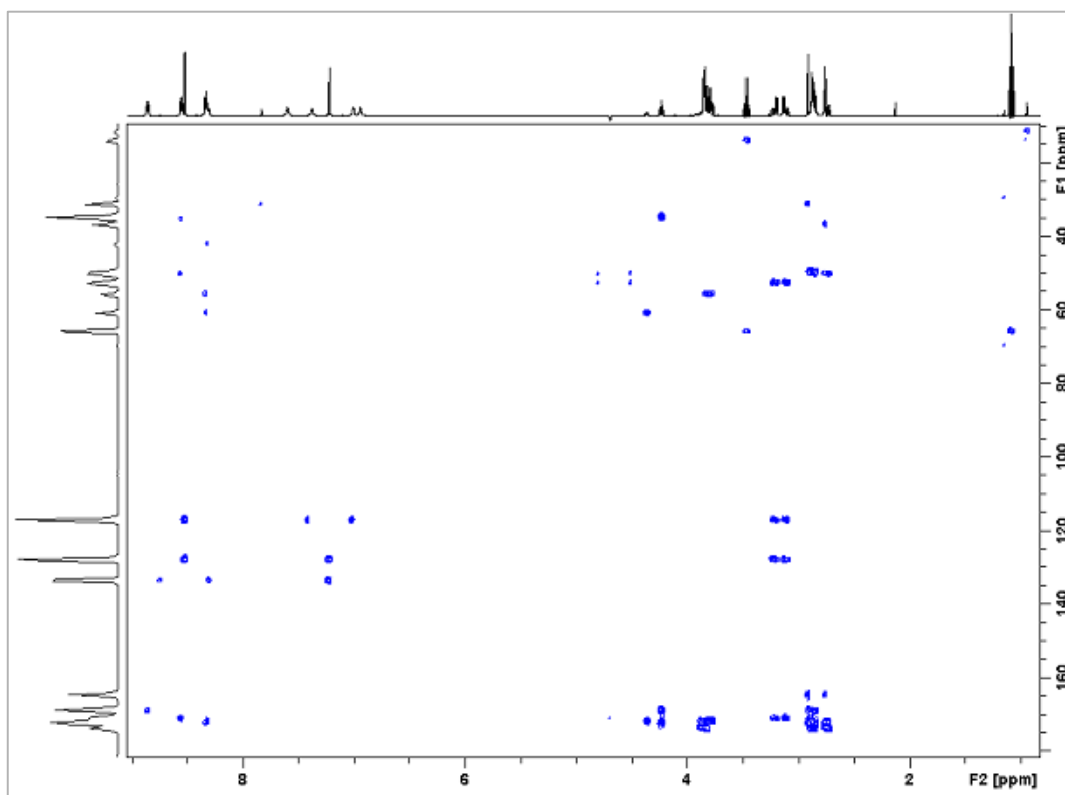
Σχήμα 19. 2D ROESY NMR του πεπτιδίου $H_2N\text{-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.



Σχήμα 20. 2D TOCSY NMR του πεπτιδίου $H_2N\text{-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.



Σχήμα 21. 2D HSQC NMR του πεπτιδίου H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.



Σχήμα 22. 2D HMBC NMR του πεπτιδίου H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Πίνακας 8: Χημικές μετατοπίσεις ^1H (δ , ppm) του πεπτιδίου $\text{H}_2\text{N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$ ($\text{pH} = 2,5$ $T = 298$ K).

	αH	βH	NH	CONH_2	C_2H	C_4H
Asn	4,30	2,93 2,77	7,84	7,05 (cis) 7,36(trans)	-	-
His	4,71	3,13 3,22	8,54	-	7,22	8,53
Asp	4,71	2,75 2,88	8,56	-	-	-
Gly	3,86 4,36	-	8,36	-	-	-
Ser	2,82	4,66 4,64	8,87	-	-	-
terminal- CONH₂	-	-	-	6,9 (cis) 7,6 (trans)	-	-
terminal- NH₂	1,33	-	-	-	-	-

6.6 Ποτενσιομετρική μελέτη του πεπτιδίου $\text{H}_2\text{N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$ και της αλληλεπίδρασης του με το ιόν Cu(II) .

6.6.1 Προσδιορισμός των τιμών $\log\beta$ και pK_a του ελεύθερου πεπτιδίου $\text{H}_2\text{N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.

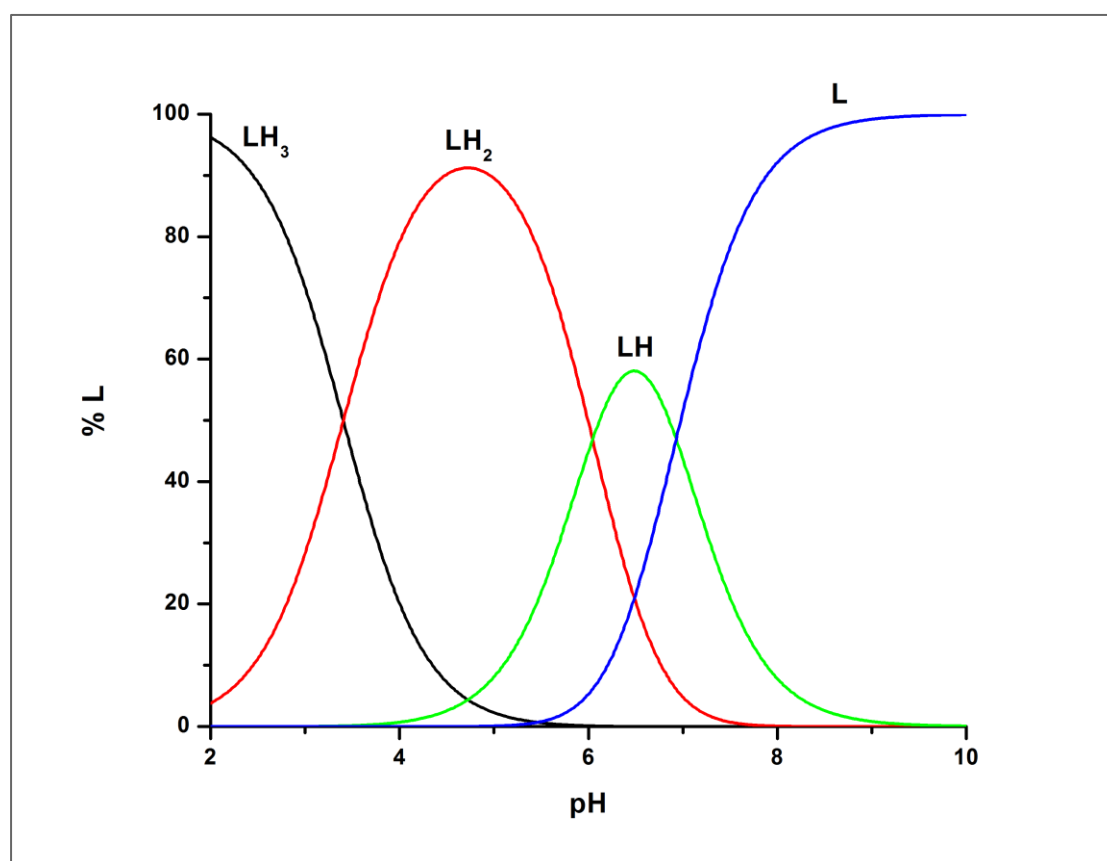
Το πεπτίδιο $\text{H}_2\text{N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$ περιλαμβάνει τρεις ομάδες που είναι πιθανό να ιονιστούν στην περιοχή pH από 2 έως 12. Γι' αυτόν τον λόγο μπορεί να συμβολιστεί και ως LH_3 . Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες αυτές είναι: η καρβοξυλομάδα του ασπαρτικού οξέος ($\text{Asp-}\beta\text{-COOH}$), το άτομο N_3 του ημιδαζολίου της ιστιδίνης (N_{im}) και η N-τελική αμινομάδα (NH_2). Οι αντιδράσεις για τον σχηματισμό των πρωτονιωμένων σωματιδίων είναι οι ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν στην Ενότητα 6.2.1 (20), (21), (22).

Στον Πίνακα 9 συνοψίζονται τα αποτελέσματα υπολογισμού των τιμών $\log\beta$ και pK_a , ενώ στο Σχήμα 23 παρατίθεται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (πρωτονιωμένων και μη μορφών) του πεπτιδίου $\text{H}_2\text{N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide}$.

Πίνακας 9: Ολικές σταθερές πρωτονίωσης ($\log\beta$) και τιμές pK_a των χαρακτηριστικών ομάδων του πεπτιδίου H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide ($T=298\text{ }^\circ\text{K}$, $I=0,1\text{M KNO}_3$).

Σχηματιζόμενο σωματίδιο	$\log\beta^*$	pK_a	Χαρακτηριστική ομάδα
LH_3	16,38	3,4	Asp- β -COOH
LH_2	12,97	6,0	N_3 -His-im
LH	6,93	6,9	terminal-NH ₂

*: Τυπική απόκλιση = 10^{-2}



Σχήμα 23. Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του πεπτιδίου H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα κατανομής (Σχήμα 23), αρχικά το πεπτίδιο βρίσκεται στην πλήρως πρωτονιωμένη μορφή του, LH_3 . Με την αύξηση του pH πραγματοποιείται η αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας του ασπαρτικού οξέος (Asp-COOH) με τιμή $pK_a = 3,4$. Με περαιτέρω αύξηση του pH, πραγματοποιείται αποπρωτονίωση του N_3 του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης με τιμή $pK_a = 6,0$. Τέλος, η

περαιτέρω αύξηση της τιμής του pH, οδηγεί στην αποπρωτονίωση της N-τελικής αμινομάδας με τιμή $pK_a = 6,9$.

Στον Πίνακα 10, οι τιμές pK_a για το πεπτιδίο H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide συγκρίνονται με τις αντίστοιχες τιμές του πεπτιδίου στο οποίο βασίστηκε η συγκεκριμένη έρευνα ($A\beta_{5-9}$), αλλά και με το πεπτιδίο Gly-His-Lys το οποίο αποτελεί το πιο συχνά αναφερόμενο στις βιβλιογραφικές πηγές. [67], [109], [110], [111].

Πίνακας 10: Σύγκριση των τιμών pK_a του πεπτιδίου H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide με τα πεπτιδία $A\beta_{5-9}$ και Gly-His-Lys.

Ομάδα ιοντισμού	pK_a (H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide)	pK_a ($A\beta_{5-9}$)	pK_a (Gly-His-Lys)
Asp-COOH	3,4	3,2	-
N_3 -His-im	6,0	6,1	6,5
terminal-NH ₂	6,9	7,4	7,9

Από τα δεδομένα του Πίνακα 10 εξάγεται το συμπέρασμα πως οι τιμές pK_a που αντιστοιχούν στον ιοντισμό των χαρακτηριστικών ομάδων του πεπτιδίου H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide είναι παρόμοιες με αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας για παρόμοια πεπτιδία. Ωστόσο αξιοσημείωτη είναι η μικρότερη τιμή pK_a για τον ιοντισμό της N-τελικής αμινομάδας στο υπό μελέτη πεπτιδίο [67], [109], [110], [111].

6.6.2 Ποτενσιομετρική μελέτη της αλληλεπίδρασης ιόντων Cu(II) με το πεπτιδίο H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Για την μελέτη της πορείας ένταξης του πεπτιδίου H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide με τα ιόντα Cu(II) πραγματοποιήθηκαν ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις σε υδατικά διαλύματα Cu(II)/πεπτιδίου. Η αναλογία Cu(II):πεπτιδίο για την πραγματοποίηση των ογκομετρήσεων ήταν περίπου ίση με 1:1,1. Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του προγράμματος Hyperquad οπότε προέκυψαν το πλήθος, η στοιχειομετρία και οι σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων. Στον Πίνακα 11 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν (πλήθος-

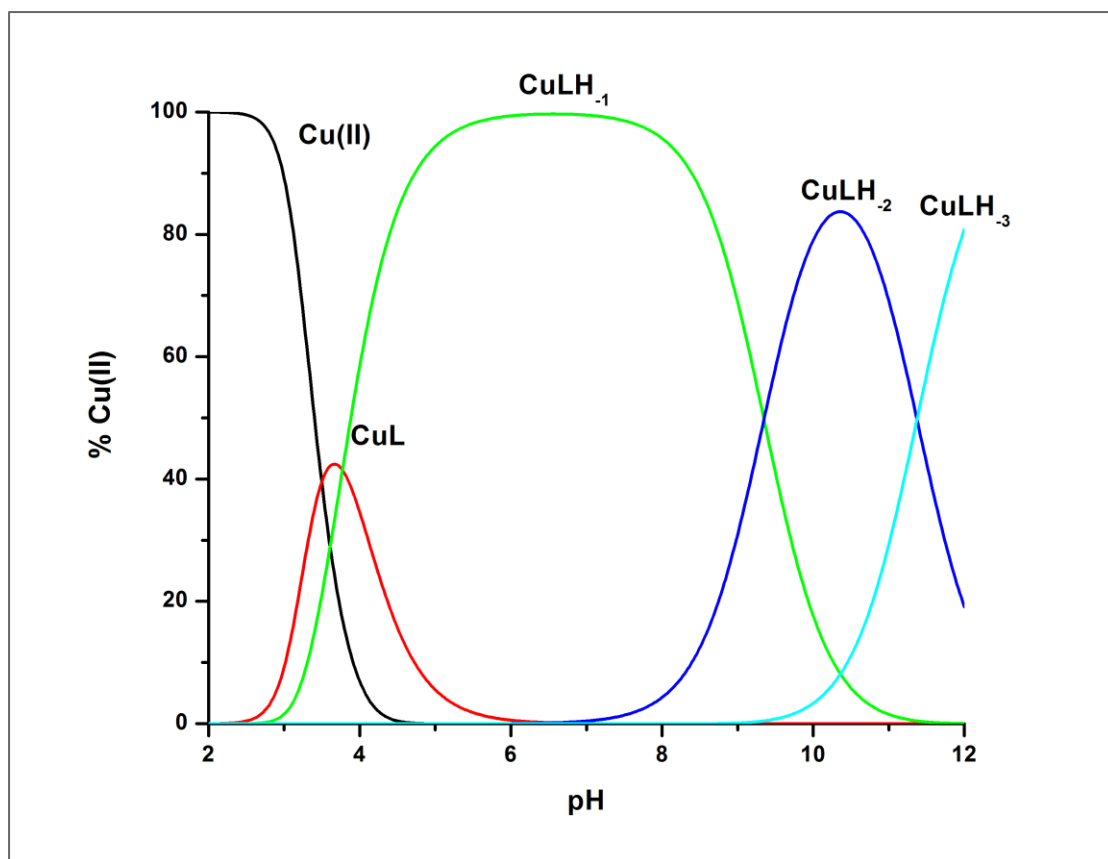
στοιχειομετρία συμπλόκων και τιμές $\log\beta$ για το βέλτιστο μοντέλο). Επιπρόσθετα υπολογίστηκαν και παρατίθενται και οι τιμές pK_a για τις αντιδράσεις ιοντισμού:



Στο Σχήμα 24 παρουσιάζεται και το αντίστοιχο διάγραμμα κατανομής συναρτήσει της τιμής pH.

Πίνακας 11: Ολικές σταθερές σχηματισμού ($\log\beta$) των συμπλόκων Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide και τιμές pK_a (T=298 °K, I=0,1M (KNO₃)).

Σχηματιζόμενα σύμπλοκα	$\log\beta$	pK_a
CuL	9,54	-
CuLH ₁	5,77	3,8
CuLH ₂	-3,58	9,3
CuLH ₃	-14,96	11,4



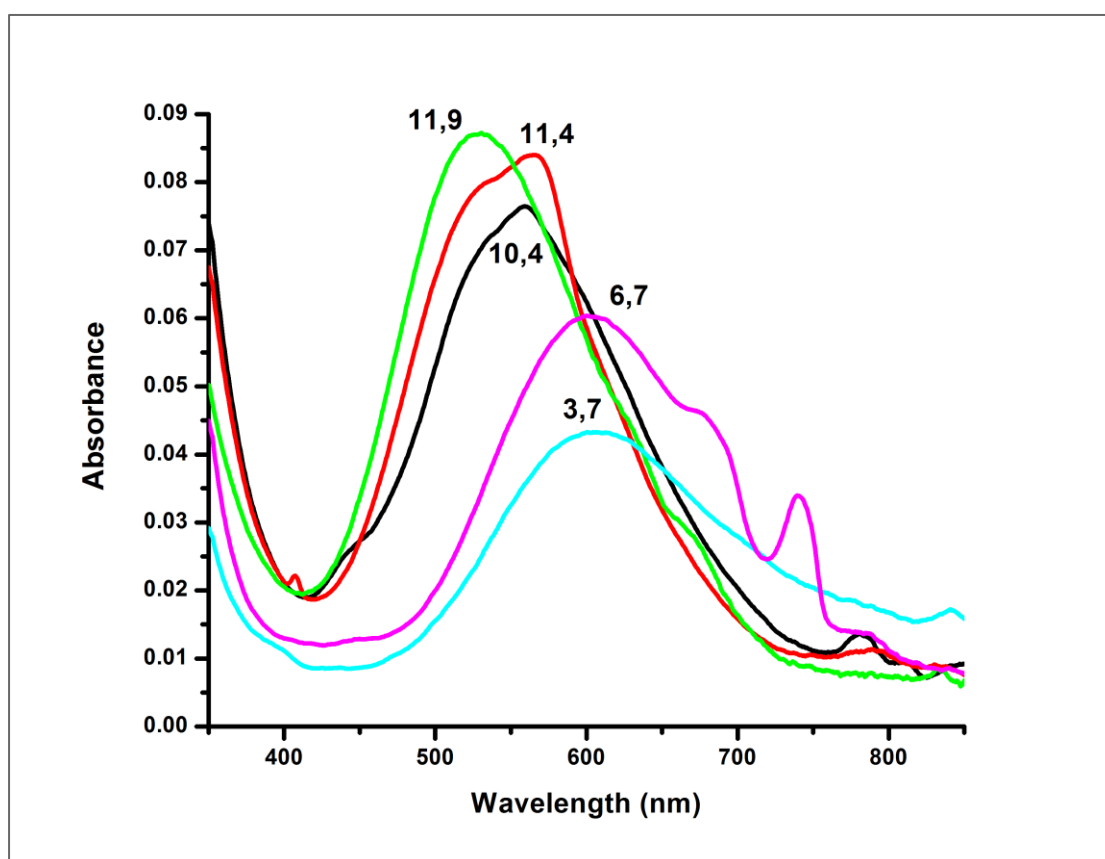
Σχήμα 24. Διάγραμμα κατανομής συμπλόκων Cu(II) για την αλληλεπίδραση Cu(II) με το πεπτιδίο H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide. Η συγκέντρωση των ιόντων Cu(II) ήταν 1 mM, ενώ του πεπτιδίου 1,1 mM.

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα κατανομής (Σχήμα 24), η αλληλεπίδραση των ιόντων Cu(II) με το πεπτιδίο αρχίζει από χαμηλές τιμές pH = 3 και συνεχίζεται μέχρι αλκαλικές τιμές pH = 12. Το προτεινόμενο μοντέλο περιλαμβάνει 4 σωματίδια στοιχειομετρίας 1:1. Επίσης, διακρίνεται πως το σύμπλοκο που επικρατεί σε μεγαλύτερο εύρος pH και σχηματίζεται σε φυσιολογικές τιμές pH είναι το στοιχειομετρίας CuLH₁.

6.7 Φασματοσκοπική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide

Τα φάσματα ορατού του συστήματος Cu(II):πεπτιδίου σε αναλογία 1:1,1 (Σχήμα 25) καταγράφηκαν σε τιμές pH οι οποίες αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής κάθε σωματιδίου (Σχήμα 24). Στον Πίνακα 12 αναγράφονται οι τιμές λ_{\max} και ϵ που προέκυψαν απ' την επεξεργασία των φασμάτων.

Η ενέργεια των d-d μεταπτώσεων των συμπλόκων Cu(II) εξαρτάται από το είδος των ατόμων δοτών στο ισημερινό επίπεδο. Ωστόσο, η συνεισφορά των ατόμων-δοτών αζώτου είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των ατόμων δοτών οξυγόνου. Με βάση αυτό το δεδομένο, δικαιολογείται η σταδιακή μείωση της τιμής λ_{\max} (αύξηση του ϵ) με σταδιακή αύξηση του pH, καθώς σταδιακά τα άτομα δότες οξυγόνου αντικαθίστανται από άτομα δότες N (Σχήμα 25) μέχρι που στη σφαίρα ένταξης του Cu(II) στο ισημερινό επίπεδο να έχουν ενταχθεί 3 άτομα N (NH₂, N⁻, N_{im}).



Σχήμα 25. Φάσματα υπεριώδους-ορατού του συστήματος Cu(II): πεπτιδίου H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide (1:1,1) που καταγράφηκαν στις αναγραφόμενες τιμές pH.

Πίνακας 12: Φασματοσκοπικά δεδομένα ορατού (λ_{\max} , ϵ) του συστήματος Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide σε αναλογία 1:1,1.

pH	λ_{\max} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
3,7	601	43,3
6,7	601	60,4
	740	33,9
10,4	559	76,5
	780	13,6
11,4	565	84
11,9	531	87,2

6.8 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων του συστήματος Cu(II): H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν το διάγραμμα κατανομής των σχηματιζόμενων σωματιδίων (Σχήμα 24) διαπιστώνεται η ύπαρξη τεσσάρων συμπλόκων στην κλίμακα pH 3-12. Το πρώτο εξ αυτών, στοιχειομετρίας CuL σχηματίζεται σε εύρος pH 2,8-5,8, ενώ το μέγιστο της κατανομής του εντοπίζεται σε pH 3,9. Το φάσμα απορρόφησης (UV-Vis) σε pH 3,7 (Σχήμα 25) χαρακτηρίζεται από μια ευρεία ταινία με μέγιστο σε τιμή $\lambda_{\max}=603$ nm. Η τελευταία τιμή, βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με την θεωρητικά υπολογιζόμενη (εξίσωση Prenesti) 600 nm για σφαίρα ένταξης 3N {1 NH₂, 1 N_{im}, 1 N⁻, H₂O}. Η πειραματική μας τιμή συμφωνεί απόλυτα και με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα 3N συμπλόκων παρομοίων συστημάτων [20], [67], [109], [110], [111], [113], [114] και ιδιαίτερα αυτά του Cu(II) με τα πεπτίδια Aβ₅₋₉, Aβ₅₋₁₂ [67]. Με βάση δε την στοιχειομετρία του, συνάγεται το συμπέρασμα ότι η β-COOH του ασπαρτικού είναι πρωτονιωμένη.

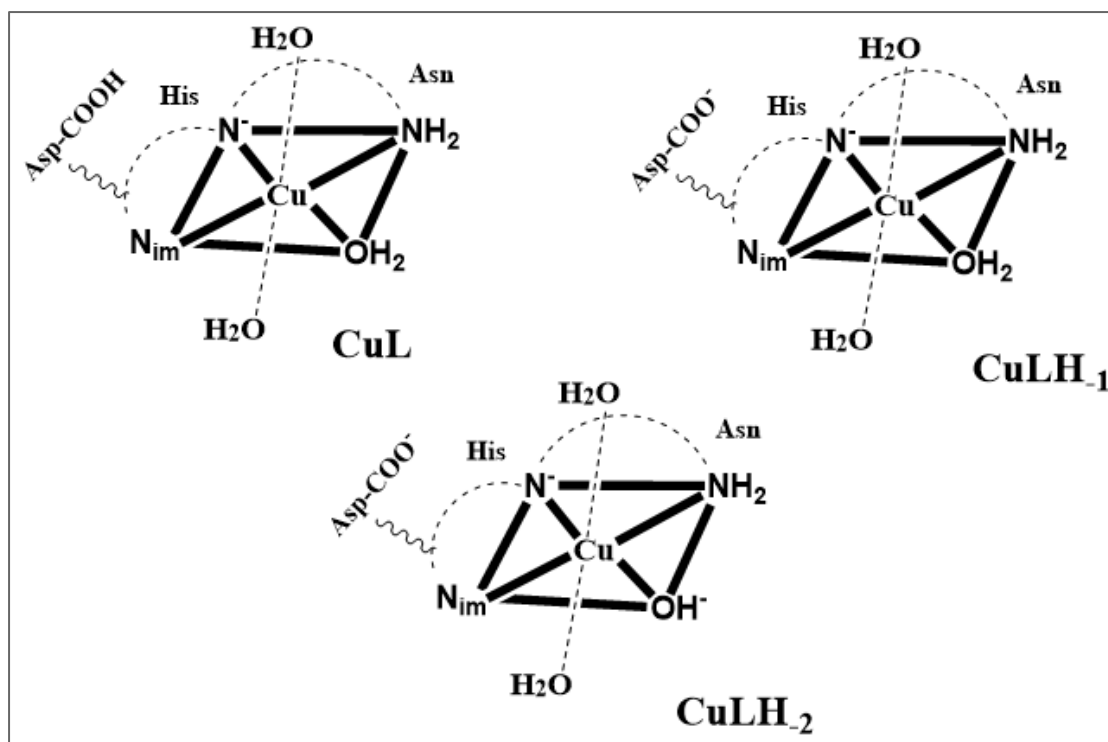
Από τιμή pH 4 και μετά (Σχήμα 24) παρατηρείται ο σχηματισμός του συμπλόκου στοιχειομετρίας CuLH₋₁, το οποίο επικρατεί σε φυσιολογική τιμή pH. Η τιμή λ_{\max} παραμένει αμετάβλητη (601 nm) γεγονός που υποδεικνύει ότι υιοθετεί τον ίδιο τύπο ένταξης με το προηγούμενο. Η τιμή pK_a που αντιστοιχεί στον σχηματισμό του από το CuL είναι 3,8 και πλησιάζει την αντίστοιχη (3,4) για τον ιοντισμό της καρβοξυλομάδας του Asp στο ελεύθερο πεπτίδιο. Επομένως αποδίδεται σε αυτή την

ομάδα και στο συμπλοκοποιημένο. Η μικρή αύξηση της τιμής pK_a είναι ενδεικτική της συνολικής μείωσης του φορτίου του συστήματος κατά μια μονάδα λόγω της συμπλοκοποίησης του μετάλλου [67]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το εν λόγω σύμπλοκο είναι το πλέον σταθερό θερμοδυναμικά καθώς υφίσταται στο μεγαλύτερο εύρος τιμών pH (3-11). Συγκρινόμενο δε με το εύρος ύπαρξης του ίδιου 3N συμπλόκου με το πεπτίδιο που ήδη μελετήσαμε (4,5-8,5) διαπιστώνεται ότι το πρώτο θα πρέπει να παρουσιάζει μεγαλύτερη θερμοδυναμική σταθερότητα.

Το επόμενο σύμπλοκο στοιχειομετρίας $CuLH_2$ επικρατεί σε τιμή pH 10,5. Η μεγάλη μετατόπιση της τιμής λ_{max} (559 nm) προς το κυανό (42 nm) είναι ενδεικτική της ισχυροποίησης του πεδίου των υποκαταστατών στο ισημερινό επίπεδο. Δεδομένου της έλλειψης αμιδικού δότη προς το N-τελικό άκρο και μελετώντας αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα [67] προτείνεται ο ιοντισμός ενός μορίου H_2O ($pK_a=9,3$) ο οποίος οδηγεί στο σχηματισμό ύδροξυ συμπλόκου. Εξάλλου και η θεωρητικά υπολογιζόμενη τιμή $\lambda_{max} = 567$ nm με βάση την εξίσωση Prenesti για σφαίρα ένταξης $\{1 NH_2, 1 N_{im}, 1 N^-, OH^-\}$ ενισχύει την πρότασή μας.

Η τελευταία διεργασία ιοντισμού ($pK_a=11,4$) οδηγεί στον σχηματισμό του σωματιδίου στοιχειομετρίας $CuLH_3$. Για το συγκεκριμένο παρατηρείται μετατόπιση της τιμής λ_{max} (531 nm) προς το κυανό (28 nm). Η απουσία αμιδικού δότη διαθέσιμου προς ένταξη στο πεπτίδιο (τουλάχιστον προς το N-τελικό άκρο) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πηγή του επιπλέον πρωτονίου που ογκομετρείται θα πρέπει να είναι το πυρρολικό άτομο N, N(1) του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης. Σε αυτή την περίπτωση είναι δυνατός ο σχηματισμός 4N πολυπυρηνικών συμπλόκων [111], [113], στα οποία το άτομο N(1) αντικαθιστά το ιόν υδροξειδίου που καταλαμβάνει τη τέταρτη θέση ένταξης στο ισημερινό επίπεδο. Πιθανό είναι επίσης να μην αλλάξει η σφαίρα ένταξης και η μεταβολή της τιμής λ_{max} να οφείλεται στην έμμεση ισχυροποίηση του πεδίου των υποκαταστατών λόγω του παραπάνω ιοντισμού. Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ύπαρξη περισσότερων της μιας ταινίας στα σύμπλοκα Cu(II) που μελετήσαμε ή/και η διεύρευσή των ταινιών απορρόφησης είναι ενδεικτική του φαινομένου Jahn-Teller [112].

Στο Σχήμα 26 αναπαρίστανται η πιθανή σφαίρα ένταξης των κυριότερων 3N συμπλόκων Cu(II) με το πεπτίδιο.



Σχήμα 26. Σχηματική αναπαράσταση της δομής των κυριότερων 3N συμπλόκων Cu(II) με το πεπτίδιο H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της αλληλεπίδρασης των ιόντων Cu(II) με τα πεπτίδια H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide. Τα συγκεκριμένα διαφέρουν σε σχέση με το πεπτίδιο Aβ₅₋₉, το οποίο αποτελεί θραύσμα του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου, ως προς το πρώτο αμινοξύ. Πιο συγκεκριμένα, στη θέση της αργινίνης του Aβ₅₋₉ τα συντιθέμενα πεπτίδια φέρουν λυσίνη και ασπαραγίνη, αντίστοιχα. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους, υπεύθυνα για την πορεία συμπλοκοποίησης με τα ιόντα Cu(II), είναι η ύπαρξη ελεύθερης αμινομάδας στο N-τελικό άκρο και του καταλοίπου ιστιδίνης στη θέση 2 (ως προς το N-τελικό άκρο). Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό κυρίως 3N συμπλόκων Cu(II) με σφαίρα ένταξης τύπου (NH₂, N⁻, N_{im}).

Αρχικά έλαβε χώρα η σύνθεση των πεπτιδικών μοντέλων (σύνθεση σε στερεή φάση κατά Merrifield) και ο χαρακτηρισμός τους (φασματομετρία μάζας ESI-MS και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν ποτενσιομετρικές οκομετρήσεις των πεπτιδίων απουσία και παρουσία ιόντων Cu(II). Από τα δεδομένα που προέκυψαν προσδιορίστηκε το πλήθος, η στοιχειομετρία και η θερμοδυναμική σταθερότητα (τιμές logβ, pK_a) των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός τους με φασματοσκοπία UV-Vis.

Τα δύο πεπτίδια αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με τα ιόντα Cu(II) οδηγώντας στον σχηματισμό συμπλόκων στοιχειομετρίας Cu(II):πεπτίδιο 1:1, στην περιοχή pH 3-12. Όσον αφορά τον τρόπο ένταξης τους συμπεριφέρονται όπως αναμένεται για πεπτίδια με ελεύθερη αμινομάδα και ιστιδίνη στη θέση 2. [1], [3]

Από τιμή pH περίπου 3,5 πραγματοποιείται η παράλληλη ένταξη των N-τελικής αμινομάδας, αμιδικού ατόμου αζώτου (N⁻) του πεπτιδικού δεσμού και του ατόμου N₃ του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης (N_{im}). Η παραπάνω διεργασία οδηγεί στον σχηματισμό των θερμοδυναμικά σταθερών 3N συμπλόκων με ένταξη τύπου (NH₂, N⁻, N_{im}, H₂O), στοιχειομετρίας CuL για το H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και CuLH₁ για το H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide. Σε φυσιολογική τιμή pH επικρατούν σύμπλοκα ίδας σφαίρας ένταξης και για τα δυο πεπτίδια με την μόνη διαφορά να εντοπίζεται στον ιοντισμό (αλλά όχι ένταξη) της β-καρβοξυλομάδας του καταλοίπου Asp. Παρόλα αυτά, η εν λόγω αποπρωτονίωση αυξάνει περαιτέρω την θερμοδυναμική τους σταθερότητα

με αποτέλεσμα να υφίστανται σε μεγάλο εύρος pH , 9-10 λογαριθμικών μονάδων (Σχήματα 11 και 24).

Ο προτεινόμενος τύπος ένταξης όσον αφορά τα άτομα δότες αζώτου δεν αλλάζει σε λίγο πιο αλκαλικά διαλύματα, όπου παρατηρείται ο ιοντισμός ενός μορίου H₂O στο ισημερινό επίπεδο με συνακόλουθο σχηματισμό ύδροξυ συμπλόκων (υδρόλυση). Με περαιτέρω προσθήκη βάσης παρατηρείται ο ιοντισμός (χωρίς ένταξη) της ε-αμινομάδας της Lys για το πεπτίδιο H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide, ενώ σε τιμή pH>11,5 και για τα δυο, προτείνεται η αποπρωτονίωση του πυρρολικού ατόμου αζώτου, N(1) του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης. Σε αυτή την περίπτωση είναι δυνατός ο σχηματισμός 4N πολυπυρηνικών συμπλόκων.

Σε μια προσπάθεια διαπίστωσης του κατά πόσο η αλλαγή του N-τελικού αμινοξέος επιδρά στις τιμές pK_a των ελεύθερων πεπτιδίων, παρατίθεται ο Πίνακας 13, στον οποίο συνοψίζονται οι εν λόγω τιμές για τα πεπτίδια μας καθώς και για τα ήδη μελετημένα Αβ₅₋₉ και Gly-His-Lys.

Πίνακας 13: Σύγκριση των τιμών pK_a των πεπτιδίων H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide με τα πεπτίδια Αβ₅₋₉ και Gly-His-Lys.

Χαρακτηριστική ομάδα	pK _a (H ₂ N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide)	pK _a (H ₂ N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide)	pK _a (Αβ ₅₋₉)	pK _a (Gly-His-Lys)
Asp-COOH	3,5	3,4	3,2	-
N ₃ -His-im	6,1	6,0	6,1	6,5
terminal-NH ₂	7,3	6,9	7,4	7,9
Lys-NH ₃ ⁺	10,3	-	-	10,5

Από τα παραπάνω δεδομένα διαφαίνεται πως το πεπτίδιο H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide παρουσιάζει την μικρότερη τιμή pK_a όσον αφορά τον ιοντισμό του N₃ του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης, αλλά και της N-τελικής αμινομάδας, σε συμφωνία με θεωρητικές προβλέψεις [20]. Επίσης, παρατηρείται πως οι αντίστοιχες τιμές pK_a για το Αβ₅₋₉ και για το H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide είναι παρόμοιες, υποδεικνύοντας ότι η αντικατάσταση της Arg του Αβ₅₋₉ (παράπλευρη αλυσίδα: γουανιδομάδα) με την Lys

(παράπλευτη αλυσίδα: αμινομάδα) δεν επιδρά στις παραπάνω τιμές, τουλάχιστον στα ελεύθερα (μη συμπλοκοποιημένα) πεπτίδια.

Περνώντας τώρα, στην σύγκριση της θερμοδυναμικής σταθερότητας των συμπλόκων Cu(II) των δυο πεπτιδίων και ιδιαίτερα αυτών που σχηματίζονται σε φυσιολογική τιμή pH, παρατίθενται, στον Πίνακα 14, οι τιμές $\log K^*$ που αντιστοιχούν στον σχηματισμό των 3N συμπλόκων των δύο πεπτιδίων και η αντίστοιχη τιμή για το Αβ₅₋₉ [67], [108], [109], [110]. Η σταθερά K^* ονομάζεται σταθερά σχηματισμού διορθωμένη ως προς την κατάσταση πρωτονίωσης και αποτελεί το μέτρο σύγκρισης μεταξύ συμπλόκων ίδιας σφαίρας ένταξης που περιλαμβάνουν υποκαταστάτες με διαφορετικό αριθμό όξινων-βασικών ομάδων. Για τα 3N σύμπλοκα που μελετάμε, η παραπάνω χαρακτηρίζει αντιδράσεις σχηματισμού τύπου



όπου $n=3$ για τα πεπτίδια H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και Αβ₅₋₉ και $n=2$ για το H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide, ενώ υπολογίζεται ως εξής:

$$\log K^* = \log \beta(\text{CuLH}_{n-3}) - \log \beta(\text{H}_n\text{L}) \quad (25)$$

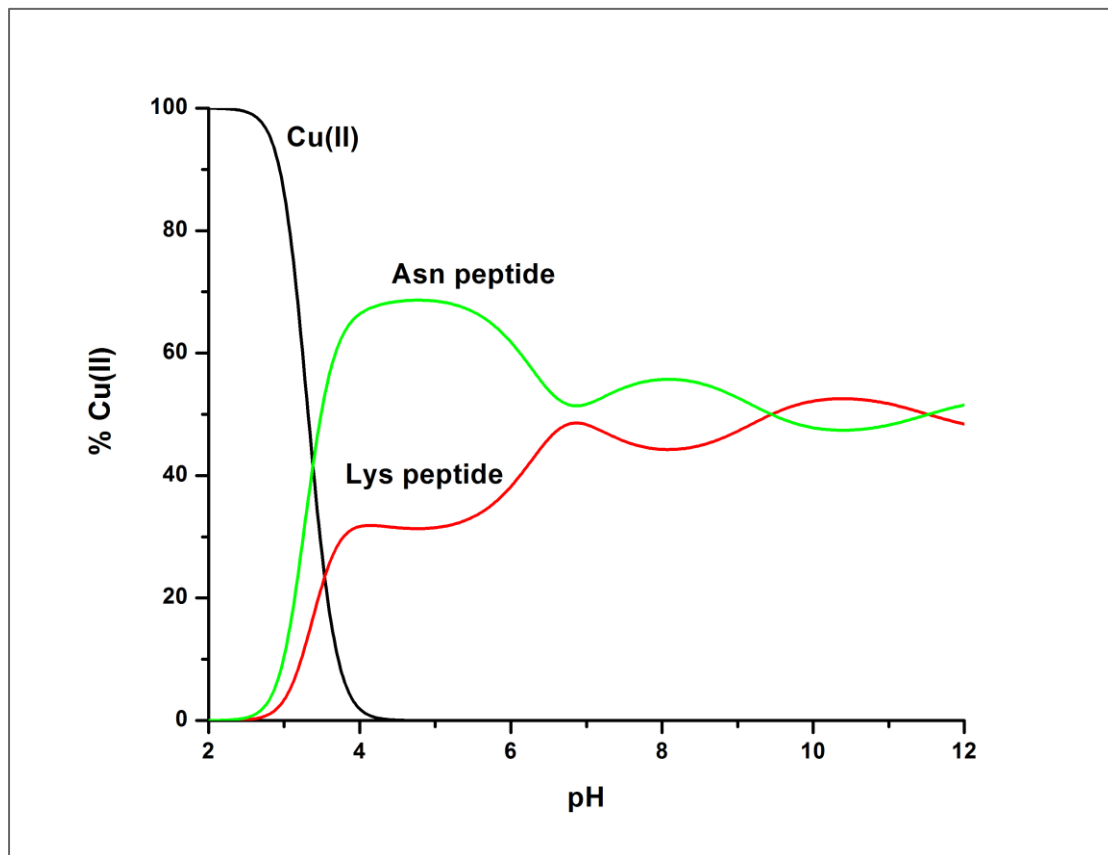
Πίνακας 14: Σύγκριση τιμών $\log K^*$ του πεπτιδίου H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και του πεπτιδίου H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide με το πεπτίδιο Αβ₅₋₉ (για τον σχηματισμό των 3N συμπλόκων).

	H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide	H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide	Αβ₅₋₉
logK*	-7,87	-7,22	-7,85

Από τα δεδομένα του Πίνακα 14 προκύπτει το συμπέρασμα πως το 3N σύμπλοκο του πεπτιδίου H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide με τα ιόντα Cu(II) είναι παρόμοιας θερμοδυναμικής ισχύος με το αντίστοιχο του Αβ₅₋₉, ενώ όταν χρησιμοποιείται ως αρχικό αμινοξύ η Asn, το 3N σύμπλοκο είναι αρκετά πιο σταθερό συγκρινόμενο και με τα δυο προαναφερθέντα (περίπου 0,65 λογαριθμικές μονάδες)

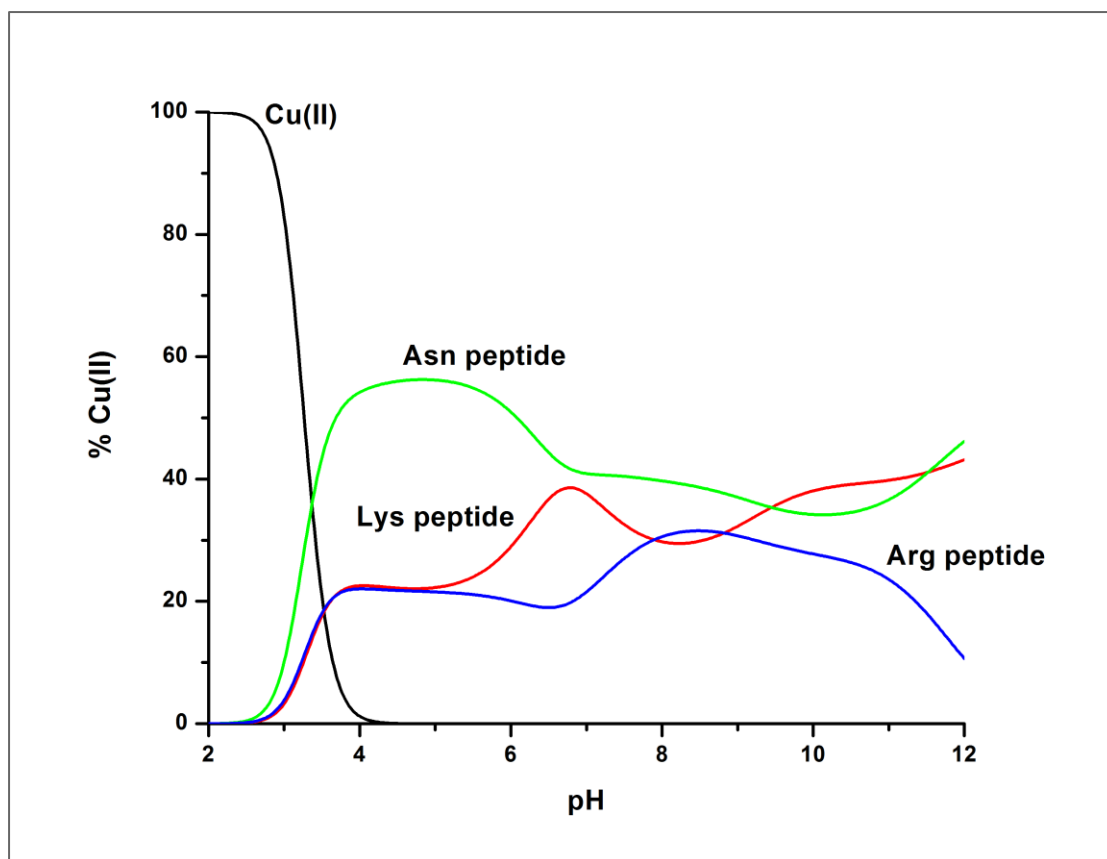
Μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση της δεσμευτικής ικανότητας των πεπτιδίων έναντι του ιόντος Cu(II) συναρτήσει της τιμής pH. Προς αυτή την κατεύθυνση, αξιοποιώντας τα θερμοδυναμικά δεδομένα, παρουσιάζονται τα Σχήματα 27 και 28. Σε αυτά απεικονίζεται το ποσοστό δέσμευσης του Cu(II) από τα πεπτίδια

της παρούσας διατριβής απουσία (Σχήμα 27) και παρουσία (Σχήμα 28) του πεπτιδίου Αβ₅₋₉.



Σχήμα 27. Διάγραμμα κατανομής ενός υποθετικού συστήματος που περιέχει τα πεπτίδια H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide (Lys peptide), H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide (Asn peptide) και Cu(II) σε ισομοριακή αναλογία ($C=1mM$).

Από το διάγραμμα του Σχήματος 27 καθίσταται εμφανές ότι το πεπτίδιο H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide είναι πιο αποτελεσματικός υποκαταστάτης για τον Cu(II) σε σχέση με το H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide σε μεγάλο εύρος pH (από pH 4 έως pH 9,5). Η διαφορά στην δεσμευτική ικανότητα τους μεγιστοποιείται σε τιμή pH=5 όπου επικρατεί σχεδόν αποκλειστικά και για τα δυο το 3N σύμπλοκο με αποπρωτονιωμένη την καρβοξυλομάδα του ασπαρτικού. Προφανώς η παραπάνω διεργασία επιδρά διαφορετικά όσον αφορά την ικανότητα δέσμευσης του Cu(II) από τα πεπτίδια και θα αποτελέσει αντικείμενο μελέτης της ερευνητικής μας ομάδας στο μέλλον.



Σχήμα 28. Διάγραμμα κατανομής ενός υποθετικού συστήματος που περιέχει τα πεπτίδια H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide (Lys peptide), H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide (Asn peptide), του $A\beta_{5-9}$ (H_2N -Arg-His-Asp-Ser-Gly-amide=Arg peptide) και $Cu(II)$ σε ισομοριακή αναλογία ($C=1mM$).

Η παρουσία και του πεπτιδίου $A\beta_{5-9}$ στο υποθετικό σύστημα του Σχήματος 28, αναδεικνύει και πάλι την υπεροχή του πεπτιδίου H_2N -Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide ως προς την δεσμευτική του (έναντι του $Cu(II)$) ικανότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα. Η δε σύγκριση μεταξύ των H_2N -Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και $A\beta_{5-9}$ δείχνει πως το πρώτο δεσμεύει πιο αποτελεσματικά τα ιόντα $Cu(II)$ σε φυσιολογική τιμή pH, ενώ αυτή η διαφορά δεν υφίσταται μέχρι της τιμής $pH \sim 5$. Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν τις θεωρητικές προβλέψεις [20] σχετικά με την θετική επίδραση των καταλοίπων Asn και Lys όσον αφορά την δέσμευση του μετάλλου.

Συνοψίζοντας, τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη συγκεκριμένη εργασία είναι τα εξής:

- Τα συντιθέμενα πεπτίδια έχουν την ικανότητα αποτελεσματικής δέσμευσης των ιόντων Cu(II) καθώς σε pH >4 παύουν να υφίστανται ελεύθερα ιόντα Cu(II),
- Το πεπτίδιο H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide δεσμεύει πιο αποτελεσματικά τα ιόντα Cu(II) σε σύγκριση με το πεπτίδιο H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide,
- Η μείωση της τιμής pK_a ιονισμού της N-τελικής αμινομάδας που αναμενόταν θεωρητικά με το πεπτίδιο H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide σε σύγκριση με το Αβ₅₋₉ επιβεβαιώνεται και πειραματικά (6,9 έναντι 7,4), ενώ με το H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide η διαφορά είναι ελάχιστη
- Τόσο το πεπτίδιο H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide, όσο και το πεπτίδιο H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide δεσμεύουν ισχυρότερα τα ιόντα Cu(II) σε σύγκριση με το Αβ₅₋₉.

Τα παραπάνω κρίνουν το εγχείρημα της παρούσας εργασίας απολύτως πετυχημένο δίνοντας τη δυνατότητα για περαιτέρω βελτιστοποίηση των παραγόντων που οδηγούν σε αυξημένη θερμοδυναμική σταθερότητα 3N συμπλόκων Cu(II) με πεπτίδια που φέρουν ελεύθερη N-τελική αμινομάδα και κατάλοιπο ιστιδίνης στη θέση 2. Οι παραπάνω μελέτες κρίνονται επιβεβλημένες ώστε τα εν λόγω σύμπλοκα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε βιολογικές-ιατρικές εφαρμογές.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την αλληλεπίδραση του ιόντος Cu(II) με τα πεπτίδια H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide και H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide σε μια προσπάθεια διερεύνησης των παραγόντων που μπορεί να οδηγήσουν στην βελτιστοποίηση της δεσμευτικής τους ικανότητας έναντι του μετάλλου. Ως πεπτίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το Aβ₅₋₉ (H₂N-Arg-His-Asp-Ser-Gly-amide). Το συγκεκριμένο αποτελεί μοντέλο του θραύσματος Aβ₅₋₄₂ του αμυλοειδούς πεπτιδίου (Aβ), το οποίο ως γνωστόν είναι το κύριο συστατικό των αμυλοειδών πλακών που σχηματίζονται στον εγκέφαλο ασθενών που πάσχουν απ' την νόσο Alzheimer. Η επιλογή της παραπάνω αλληλουχίας βασίστηκε στο γεγονός της ισχυρής αλληλεπίδρασής του με τα ιόντα χαλκού. Αλλάζοντας το N-τελικό αμινοξύ του Aβ₅₋₉ (στη θέση της Arg Lys, Asn αντίστοιχα) και μελετώντας θερμοδυναμικά (ποτενσιομετρία) και φασματοσκοπικά (UV-Vis) τα συστήματα Cu(II)-πεπτιδίων, μας επέτρεψε να ελέγξουμε την επίδραση της παραπάνω αλλαγής στην δεσμευτική τους ικανότητα.

Τα δύο πεπτίδια αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με τα ιόντα Cu(II) οδηγώντας στον σχηματισμό συμπλόκων στοιχειομετρίας Cu(II):πεπτίδιο 1:1, στην περιοχή pH 3-12. Όσον αφορά τον τρόπο ένταξής τους, συμπεριφέρονται όπως αναμένεται για πεπτίδια με ελεύθερη αμινομάδα και ιστιδίνη στη θέση 2 (σχηματισμός 3N συμπλόκων με σφαίρα ένταξης τύπου (NH₂, N⁻, N_{im}, X) όπου X=H₂O ή OH⁻). Αποδείχθηκε επίσης ότι και τα δυο είναι πιο αποτελεσματικά όσον αφορά την δέσμευση του Cu(II) σε σχέση με το πεπτίδιο αναφοράς Aβ₅₋₉, με νικητή τελικά το H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide.

Τα αποτελέσματα της εργασίας μας υποδεικνύουν πως υπάρχει η δυνατότητα περαιτέρω βελτιστοποίησης των παραγόντων που οδηγούν σε αυξημένη θερμοδυναμική σταθερότητα 3N συμπλόκων Cu(II) με πεπτίδια που φέρουν ελεύθερη N-τελική αμινομάδα και κατάλοιπο ιστιδίνης στη θέση 2. Οι παραπάνω μελέτες κρίνονται απαραίτητες ώστε τα εν λόγω σύμπλοκα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε βιολογικές-ιατρικές εφαρμογές.

Abstract

In this MSc thesis, the interaction of Cu(II) ion with the peptides H₂N-Lys-His-Asp-Ser-Gly-amide and H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide was studied by means of potentiometric and spectroscopic techniques. Our main goal was the improvement of Cu(II) binding affinity of peptides containing a free N-amino group and a histidine residue at position 2 (i.e H₂N-X-His-Y-Z-). In this respect, we chose to mutate the N-terminus amino acid of H₂N-Arg-His-Asp-Ser-Gly-amide (Arg by Lys and Arg by Asn), a strong Cu(II) chelator [67], which was used as a reference. The latter, A β ₅₋₉, is a model of the N-truncated A β ₅₋₄₂ species of the amyloid peptide (A β), which in turn, is known to be the main component of the amyloid plaques that form in the brain of patients suffering from Alzheimer's disease.

The two peptides interacted efficiently with Cu(II) ions over the pH range 3-12, forming 1:1 Cu(II):peptide complexes. The metal coordination process was the expected one for peptides containing a N-terminus free amino group and a histidine residue in position 2 (i.e formation of 3N Cu(II) complexes, in which the coordination proposal involves the donors set (NH₂, N⁻, N_{im}, X), where X=H₂O or OH⁻). Both were also found to be more effective ligands for Cu(II) than the reference peptide A β ₅₋₉, with H₂N-Asn-His-Asp-Ser-Gly-amide being the winner of this competition.

The results of our work indicate that further optimization of the thermodynamic stability of 3N Cu(II) complexes with analogous peptides is possible. Strong Cu(II) chelators of this type can be used effectively in biological-medical applications

Βιβλιογραφία

- [1]. Sovago, I., Kallay, C., & Varnagy, K. (2012). Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(19-20), 2225-2233.
- [2]. Martínez-Bachs, B., & Rimola, A. (2019). Prebiotic peptide bond formation through amino acid phosphorylation. insights from quantum chemical simulations. *Life*, 9(3), 75.
- [3]. Sovago, I., Várnagy, K., Lihi, N., & Grenács, Á. (2016). Coordinating properties of peptides containing histidyl residues. *Coordination Chemistry Reviews*, 327, 43-54.
- [4]. Κυριάκου, Δ. (2018). *Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ιόντων Cu(II) με πεπτιδικά μοντέλα της τ-πρωτεΐνης. συνεισφορά στη διεκρίνιση του ρόλου τους στη νόσο Alzheimer*. Διατριβή μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- [5]. Wątył, J., Miller, A., Kozłowski, H., & Rowińska-Żyrek, M. (2021). Peptidomimetics—An infinite reservoir of metal binding motifs in metabolically stable and biologically active molecules. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 217, 111386.
- [6]. Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today*, 20(1), 122-128.
- [7]. Lau, J. L., & Dunn, M. K. (2018). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 26(10), 2700-2707.
- [8]. Sónvágó, I., & Ósz, K. (2006). Metal ion selectivity of oligopeptides. *Dalton Transactions*, (32), 3841-3854.
- [9]. Vandenbossche, M., Jimenez, M., Casetta, M., & Traisnel, M. (2015). Remediation of heavy metals by biomolecules: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(15), 1644-1704.
- [10]. Lillo, V., & Galán-Mascarós, J. R. (2014). Transition metal complexes with oligopeptides: single crystals and crystal structures. *Dalton Transactions*, 43(26), 9821-9833.

- [11]. Caetano-Silva, M. E., Netto, F. M., Bertoldo-Pacheco, M. T., Alegría, A., & Cilla, A. (2021). Peptide-metal complexes: Obtention and role in increasing bioavailability and decreasing the pro-oxidant effect of minerals. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(9), 1470-1489.
- [12]. Gooding, J. J., Hibbert, D. B., & Yang, W. (2001). Electrochemical metal ion sensors. Exploiting amino acids and peptides as recognition elements. *Sensors*, 1(3), 75-90.
- [13]. Kozłowski, H., Bal, W., Dyba, M., & Kowalik-Jankowska, T. (1999). Specific structure–stability relations in metallopeptides. *Coordination Chemistry Reviews*, 184(1), 319-346.
- [14]. Sigel, H., & Martin, R. B. (1982). Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chemical Reviews*, 82(4), 385-426.
- [15]. Sajadi, S. A. A. (2010). Metal ion-binding properties of L-glutamic acid and L-aspartic acid, a comparative investigation. *Natural Science*, 2(02), 85.
- [16]. Kállay, C., Várnagy, K., Micera, G., Sanna, D., & Sóvágó, I. (2005). Copper (II) complexes of oligopeptides containing aspartyl and glutamyl residues. Potentiometric and spectroscopic studies. *Journal of inorganic biochemistry*, 99(7), 1514-1525.
- [17]. Cherifi, K., Decock-Le Reverend, B., Loucheux, C., Varnagy, K., Kiss, T., Sovago, I., & Kozłowski, H. (1990). Transition metal complexes of L-cysteine containing di- and tripeptides. *Journal of inorganic biochemistry*, 38(1), 69-80.
- [18]. Pesonen, H., Aksela, R., & Laasonen, K. (2010). Density functional complexation study of metal ions with cysteine. *The Journal of Physical Chemistry A*, 114(1), 466-473.
- [19]. Lukács, M., Pálinkás, D. C., Szunyog, G., & Várnagy, K. (2021). Metal Binding Ability of Small Peptides Containing Cysteine Residues. *ChemistryOpen*, 10(4), 451.
- [20]. Gonzalez, P., Bossak, K., Stefaniak, E., Hureau, C., Raibaut, L., Balc, W., & Faller, P. (2018). N-terminal Cu binding motifs Xxx-Zzz-His (ATCUN) and Xxx-His and their derivatives: Chemistry, biology, and medicinal applications. *Chemistry a European Journal*, 24, 8029–8041.

- [21]. Lutsenko, S., Petrukhin, K., Cooper, M. J., Gilliam, C. T., & Kaplan, J. H. (1997). N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatases (the Wilson's and Menkes disease proteins) bind copper selectively in vivo and in vitro with stoichiometry of one copper per metal-binding repeat. *Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18939-18944.
- [22]. Cotton, F. A., Wilkinson, G., & Gaus, P. L. (1995). *Basic inorganic chemistry*. John Wiley & Sons.
- [23]. Housecroft, C. E., & Sharpe, A. G. (2012). *Inorganic chemistry (3rd ed.)*. Prentice Hall.
- [24]. Melník, M., Kabešová, M., Koman, M., Macáškova, L., Garaj, J., Holloway, C. E., & Valent, A. (1998). Copper (II) coordination compounds: Classification and analysis of crystallographic and structural data III. Dimeric compounds. *Journal of coordination chemistry*, 45(1-4), 147-359.
- [25]. Rubino, J. T., Chenkin, M. P., Keller, M., Riggs-Gelasco, P., & Franz, K. J. (2011). A comparison of methionine, histidine and cysteine in copper (I)-binding peptides reveals differences relevant to copper uptake by organisms in diverse environments. *Metallomics*, 3(1), 61-73.
- [26]. Conry, R.R. (2011). Copper: Inorganic & Coordination Chemistry. Based in part on the article Copper: Inorganic & Coordination Chemistry by Rebecca R. Conry & Kenneth D. Karlin which appeared in the *Encyclopedia of Inorganic Chemistry, First Edition*.. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, R.A. Scott (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781119951438.eibc0050>
- [27]. Conradie, J. (2019). Jahn-Teller effect in high spin d4 and d9 octahedral metal-complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 486, 193-199.
- [28]. Halcrow, M. A. (2013). Jahn–Teller distortions in transition metal compounds, and their importance in functional molecular and inorganic materials. *Chemical Society Reviews*, 42(4), 1784-1795.
- [29]. Κεσίσογλου, Δ. & Ψωμάς, Γ. (2015). *Βιοανόργανη Χημεία*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ZHTH.

- [30]. Krasnovskaya, O., Naumov, A., Guk, D., Gorelkin, P., Erofeev, A., Beloglazkina, E., & Majouga, A. (2020). Copper coordination compounds as biologically active agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3965.
- [31]. Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J. F., & Margaritis, I. (2016). Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35, 107-115.
- [32]. Χαβιάρα, Α. (2006). *Σύνθεση και μελέτη της δομής και της βιοδραστικότητας σύμπλοκων ενώσεων του Cu(II) με πολυαμίνες, θειαζολικά, ιμιδαζολικά και τριαζολικά ligands. Διερεύνηση της σχέσης δομής-δραστικότητας. Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.*
- [33]. Chen, J., Jiang, Y., Shi, H., Peng, Y., Fan, X., & Li, C. (2020). The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 472, 1415-1429.
- [34]. Collins, J. F., Prohaska, J. R., & Knutson, M. D. (2010). Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition reviews*, 68(3), 133-147.
- [35]. Pickart, L. (2008). The human tri-peptide GHK and tissue remodeling. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19(8), 969-988.
- [36]. Frączyk, T. (2021). Cu (II) Binding N-Terminal Sequences of Human Proteins. *Chemistry & Biodiversity*, 18(4), e2100043.
- [37]. Maiti, B. K., Govil, N., Kundu, T., & Moura, J. J. (2020). Designed Metal-ATCUN Derivatives: Redox and Non-redox Based Applications Relevant for Chemistry, Biology and Medicine. *Iscience*, 101792.
- [38]. Kimoto, E., Tanaka, H., Gytoku, J., Morishige, F., & Pauling, L. (1983). Enhancement of antitumor activity of ascorbate against Ehrlich ascites tumor cells by the copper:glycylglycylhistidine complex. *Cancer research*, 43(2), 824-828.
- [39]. Harford, C., & Sarkar, B. (1997). Amino terminal Cu (II)-and Ni (II)-binding (ATCUN) motif of proteins and peptides: metal binding, DNA cleavage, and other properties. *Accounts of Chemical Research*, 30(3), 123-130.
- [40]. Zhou, P., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, Y., Liang, J., Liu, B., & Zhang, W. (2016). Generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radical resulting from oxygen-

dependent oxidation of L-ascorbic acid via copper redox-catalyzed reactions. *RSC advances*, 6(45), 38541-38547.

[41]. Kobayashi, S., Ueda, K., Morita, J., Sakai, H., & Komano, T. (1988). DNA damage induced by ascorbate in the presence of Cu²⁺. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 949(1), 143-147.

[42]. Joyner, J. C., & Cowan, J. A. (2011). Targeted cleavage of HIV RRE RNA by Rev-coupled transition metal chelates. *Journal of the American Chemical Society*, 133(25), 9912-9922.

[43]. Jin, Y., & Cowan, J. A. (2007). Cellular activity of Rev response element RNA targeting metallopeptides. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(5), 637-644.

[44]. Gokhale, N. H., & Cowan, J. A. (2005). Inactivation of human angiotensin converting enzyme by copper peptide complexes containing ATCUN motifs. *Chemical communications*, (47), 5916-5918.

[45]. Torrado, A., Walkup, G. K., & Imperiali, B. (1998). Exploiting polypeptide motifs for the design of selective Cu (II) ion chemosensors. *Journal of the American Chemical Society*, 120(3), 609-610.

[46]. Zheng, Y., Gattás-Asfura, K. M., Konka, V., & Leblanc, R. M. (2002). A dansylated peptide for the selective detection of copper ions. *Chemical communications*, (20), 2350-2351.

[47]. Falcone, E., Gonzalez, P., Lorusso, L., Sénèque, O., Faller, P., & Raibaut, L. (2020). A terbium (iii) luminescent ATCUN-based peptide sensor for selective and reversible detection of copper (ii) in biological media. *Chemical Communications*, 56(35), 4797-4800.

[48]. Deng, D., Hao, Y., Yang, P., Xia, N., Yu, W., Liu, X., & Liu, L. (2019). Single-labeled peptide substrates for detection of protease activity based on the inherent fluorescence quenching ability of Cu²⁺. *Analytical Methods*, 11(9), 1248-1253.

[49]. Izadpanah, A., & Gallo, R. L. (2005). Antimicrobial peptides. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 52(3), 381-390.

- [50]. Gordon, Y. J., Romanowski, E. G., & McDermott, A. M. (2005). A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current eye research*, 30(7), 505-515.
- [51]. Zhang, L. J., & Gallo, R. L. (2016). Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), R14-R19.
- [52]. Jeżowska-Bojczuk, M., & Stokowa-Sołtys, K. (2018). Peptides having antimicrobial activity and their complexes with transition metal ions. *European journal of medicinal chemistry*, 143, 997-1009.
- [53]. Portelinha, J., Duay, S. S., Yu, S. I., Heilemann, K., Libardo, M. D. J., Juliano, S. A., ... & Angeles-Boza, A. M. (2021). Antimicrobial Peptides and Copper (II) Ions: Novel Therapeutic Opportunities. *Chemical Reviews*, 121(4), 2648-2712.
- [54]. Melino, S., Santone, C., Di Nardo, P., & Sarkar, B. (2014). Histatins: Salivary peptides with copper (II) and zinc (II) binding motifs: Perspectives for biomedical applications. *The FEBS journal*, 281(3), 657-672.
- [55]. Joyner, J. C., Hodnick, W. F., Cowan, A. S., Tamuly, D., Boyd, R., & Cowan, J. A. (2013). Antimicrobial metallopeptides with broad nuclease and ribonuclease activity. *Chemical Communications*, 49(21), 2118-2120.
- [56]. Rodríguez-Rodríguez, C., Telpoukhovskaia, M., & Orvig, C. (2012). The art of building multifunctional metal-binding agents from basic molecular scaffolds for the potential application in neurodegenerative diseases. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(19-20), 2308-2332.
- [57]. Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology, and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205-1235.
- [58]. Hayne, D. J., Lim, S., & Donnelly, P. S. (2014). Metal complexes designed to bind to amyloid- β for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews*, 43(19), 6701-6715.
- [59]. Deshpande, A., Mina, E., Glabe, C., & Busciglio, J. (2006). Different conformations of amyloid β induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *Journal of Neuroscience*, 26(22), 6011-6018.

- [60]. Drolle, E., Hane, F., Lee, B., & Leonenko, Z. (2014). Atomic force microscopy to study molecular mechanisms of amyloid fibril formation and toxicity in Alzheimer's disease. *Drug metabolism reviews*, 46(2), 207-223.
- [61]. Bagheri, S., Squitti, R., Haertlé, T., Siotto, M., & Saboury, A. A. (2018). Role of copper in the onset of Alzheimer's disease compared to other metals. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 446.
- [62]. Bush, A. I. (2003). Copper, zinc, and the metallobiology of Alzheimer disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 17(3), 147-150.
- [63]. Atwood, C. S., Scarpa, R. C., Huang, X., Moir, R. D., Jones, W. D., Fairlie, D. P. & Bush, A. I. (2000). Characterization of Copper Interactions with Alzheimer Amyloid β Peptides: Identification of an Attomolar-Affinity Copper Binding Site on Amyloid β 1-42. *Journal of neurochemistry*, 75(3), 1219-1233.
- [64]. Castellani, R. J., Honda, K., Zhu, X., Cash, A. D., Nunomura, A., Perry, G., & Smith, M. A. (2004). Contribution of redox-active iron and copper to oxidative damage in Alzheimer disease. *Ageing research reviews*, 3(3), 319-326.
- [65]. Mezzaroba, L., Alfieri, D. F., Simão, A. N. C., & Reiche, E. M. V. (2019). The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology*, 74, 230-241.
- [66]. Arena, G., Pappalardo, G., Sovago, I., & Rizzarelli, E. (2012). Copper (II) interaction with amyloid- β : Affinity and speciation. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(1-2), 3-12.
- [67]. Wezynfeld, N. E., Tobolska, A., Mital, M., Wawrzyniak, U. E., Wiloch, M. Z., Płonka, D. & Bal, W. (2020). A β 5-x Peptides: N-Terminal Truncation Yields Tunable Cu (II) Complexes. *Inorganic chemistry*, 59(19), 14000-14011.
- [68]. Maude, S., Tai, L. R., Davies, R. P. W., Liu, B., Harris, S. A., Kocienski, P. J., & Aggeli, A. (2011). Peptide synthesis and self-assembly. *Peptide-Based Materials*, 27-69.
- [69]. Behrendt, R., White, P., & Offer, J. (2016). Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, 22(1), 4-27.

- [70]. Merrifield, R. B. (1963). Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149-2154.
- [71]. Amblard, M., Fehrentz, J. A., Martinez, J., & Subra, G. (2006). Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular biotechnology*, 33(3), 239-254.
- [72]. Bodanszky, M. (1985). In search of new methods in peptide synthesis. A review of the last three decades. *International journal of peptide and protein research*, 25(5), 449-474.
- [73]. Legchenko, A. (2013). The basics of NMR. *Magnetic resonance imaging for groundwater*, 15-44.
- [74]. Klein, D. R. (2020). *Organic chemistry*. John Wiley & Sons.
- [75]. Ishima, R., & Torchia, D. A. (2000). Protein dynamics from NMR. *Nature structural biology*, 7(9), 740-743.
- [76]. Wider, G., Macura, S., Kumar, A., Ernst, R. R., & Wüthrich, K. (1984). Homonuclear two-dimensional ¹H NMR of proteins. Experimental procedures. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 56(2), 207-234.
- [77]. Bax, A. (1989). Two-dimensional NMR and protein structure. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 223-256.
- [78]. Jahnke, W., & Widmer, H. (2004). Protein NMR in biomedical research. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(5), 580-599.
- [79]. Awad, H., Khamis, M. M., & El-Aneed, A. (2015). Mass spectrometry, review of the basics: ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(2), 158-175.
- [80]. Di Marco, V. B., & Bombi, G. G. (2006). Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the study of metal–ligand solution equilibria. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(3), 347-379.
- [81]. Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 312(5771), 212-217.

- [82]. Di Natale, G. (2021). A survey of different approaches using ESI Mass Spectrometry for the characterization of metal binding sites in amyloid peptide fragments. *SMART eLAB*, 16, 8-9.
- [83]. Tobolkina, E. (2014). *New analytical tools combining gel electrophoresis and mass spectrometry*. PhD Thesis, École Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- [84]. Sisley, E. K., Hale, O. J., Styles, I. B., & Cooper, H. J. (2022). Native Ambient Mass Spectrometry Imaging of Ligand-Bound and Metal-Bound Proteins in Rat Brain. *Journal of the American Chemical Society*, 144(5), 2120-2128. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c10032>
- [85]. Skoog D. A. West D. M. Holler F. J. & Crouch S. R. (2004). *Fundamentals of analytical chemistry* (8th ed.). Brooks/Cole.
- [86]. Kállay, C., Várnagy, K., Malandrinos, G., Hadjiliadis, N., Sanna, D., & Sónvágó, I. (2009). Thermodynamic and structural characterization of the macrochelates formed in the reactions of copper (II) and zinc (II) ions with peptides of histidine. *Inorganica Chimica Acta*, 362(3), 935-945.
- [87]. Ζαβιτσάνος, Κ. (2009). *Αλληλεπίδραση των ιόντων Ni(ii) και Cu(ii) με πεπτιδικά μοντέλα της ιστόνης H2B: μελέτη των μηχανισμών τοξικότητας και καρκινογένεσης που προκαλούνται από μεταλλικά ιόντα..* Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- [88]. Kozłowski, H., Kowalik-Jankowska, T., & Jeżowska-Bojczuk, M. (2005). Chemical and biological aspects of Cu²⁺ interactions with peptides and aminoglycosides. *Coordination Chemistry Reviews*, 249(21-22), 2323-2334.
- [89]. Lukács, M., Szunyog, G., Grenács, Á., Lihi, N., Kállay, C., Di Natale, G., ... & Várnagy, K. (2019). Copper (II) Coordination Abilities of the Tau Protein's N-Terminus Peptide Fragments: A Combined Potentiometric, Spectroscopic and Mass Spectrometric Study. *ChemPlusChem*, 84(11), 1697-1708.
- [90]. Kállay, C., Nagy, Z., Várnagy, K., Malandrinos, G., Hadjiliadis, N., & Sónvágó, I. (2007). Thermodynamic and structural characterization of the copper(II) complexes of peptides containing both histidyl and aspartyl residues. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2007, 30394. <https://doi.org/10.1155/2007/30394>

- [91]. Damante, C. A., Osz, K., Nagy, Z., Pappalardo, G., Grasso, G., Impellizzeri, G., ... & Sovago, I. (2008). The metal loading ability of β -amyloid N-terminus: a combined potentiometric and spectroscopic study of copper (II) complexes with β -amyloid (1–16), its Short or mutated peptide fragments, and its polyethylene glycol (PEG)-ylated analogue. *Inorganic chemistry*, 47(20), 9669-9683.
- [92]. Kotynia, A., Wiatrak, B., Kamysz, W., Neubauer, D., Jawień, P., & Marciniak, A. (2021). Cationic Peptides and Their Cu (II) and Ni (II) Complexes: Coordination and Biological Characteristics. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 12028.
- [93]. Turi, I., Sanna, D., Garribba, E., Pappalardo, G., & Sóvágó, I. (2013). The effect of non-coordinating side chains on the metal binding affinities of peptides of histidine. *Polyhedron*, 62, 7-17.
- [94]. Raics, M., Sanna, D., Sóvágó, I., & Kállay, C. (2015). Copper (II), nickel (II) and zinc (II) complexes of hexapeptides containing separate aspartyl and histidyl residues. *Inorganica Chimica Acta*, 426, 99-106.
- [95]. Kowalik-Jankowska, T., Ruta, M., Wiśniewska, K., & Łankiewicz, L. (2003). Coordination abilities of the 1–16 and 1–28 fragments of β -amyloid peptide towards copper (II) ions: a combined potentiometric and spectroscopic study. *Journal of inorganic biochemistry*, 95(4), 270-282.
- [96]. Gans P, Sabatini A, Vacca A., (1996) "Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs", *Talanta*, 43, 1739- 1753.
- [97]. Κεσίσογλου, Δ., Ακρίβος, Π., Ασλανίδης, Π., Καραφίλογλου, Π & Δενδρινού-Σαμαρά Α.(2006). *Βιοσυναρμοστική Χημεία*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ΖΗΤΗ.
- [98]. Balzani, V., Juris, A., Venturi, M., Campagna, S., & Serroni, S. (1996). Luminescent and redox-active polynuclear transition metal complexes. *Chemical Reviews*, 96(2), 759-834.
- [99]. Förster, H. (2004). UV/Vis spectroscopy. In *Characterization I* (pp. 337-426). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [100]. Akash, M. S. H., & Rehman, K. (2020). *Essentials of pharmaceutical analysis* (pp. 173-184). Singapore: Springer.

- [101]. Lees, A. J. (1987). Luminescence properties of organometallic complexes. *Chemical Reviews*, 87(4), 711-743.
- [102]. Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: Springer US.
- [103]. Crosby, G. A. (1975). Spectroscopic investigations of excited states of transition-metal complexes. *Accounts of Chemical Research*, 8(7), 231-238.
- [104]. Heinrich, J., Bossak-Ahmad, K., Riisom, M., Haeri, H. H., Steel, T. R., Hergl, V. & Kulak, N. (2021). Incorporation of β -Alanine in Cu (II) ATCUN Peptide Complexes Increases ROS Levels, DNA Cleavage and Antiproliferative Activity. *Chemistry—A European Journal*, 27(72), 18093-18102.
- [105]. Neupane, K. P., Aldous, A. R., & Kritzer, J. A. (2014). Metal-binding and redox properties of substituted linear and cyclic ATCUN motifs. *Journal of inorganic biochemistry*, 139, 65-76.
- [106]. Godlewska, S., Jezierska, J., Baranowska, K., Augustin, E., & Dołęga, A. (2013). Copper (II) complexes with substituted imidazole and chlorido ligands: X-ray, UV–Vis, magnetic and EPR studies and chemotherapeutic potential. *Polyhedron*, 65, 288-297.
- [107]. Prenesti, E., Daniele P.G., Prencipe M., Ostacoli G., (1999), Spectrum–structure correlation for visible absorption spectra of copper(II) complexes in aqueous solution, *Polyhedron*, 18, 3233–3241.
- [108]. Karadağ, A. (2007). Preparation, spectra and thermal properties of two novel cyano-bridged complexes: crystal structure of one-dimensional copper (II)/palladium (II). *Zeitschrift für Kristallographie*, 222(1), 39-45.
- [109]. Kozłowski, H., Młynarz, P., & Remelli, M. (2001). Copper complexes of glycyl-histidyl-lysine and two of its synthetic analogues: Chemical behaviour and biological activity *Biochimica et Biophysica Acta Gen Subj*, 1526, 199-210.
- [110]. Schirer, A., El Khoury, Y., Faller, P., & Hellwig, P. (2017). Similarities and differences of copper and zinc cations binding to biologically relevant peptides studied by vibrational spectroscopies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22(4), 581-589.

- [111]. Daniele, P. G., Zerbinati, O., Zelano, V., & Ostacoli, G. (1991). Thermodynamic and spectroscopic study of copper (II)–glycyl-L-histidylglycine complexes in aqueous solution. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (10), 2711-2715.
- [112]. Lever, A. B. P. (1984). Inorganic electronic spectroscopy (2nd ed.). *Elsevier Science B. V.*
- [113]. Kotuniak, R.; Frączyk, T.; Skrobecki, P.; Płonka, D.; Bal, W. (2018) GHTD-amide, an insulin activating peptide from human pancreas is a strong Cu(II) chelator. *Inorganic Chemistry*, 57, 15507–15516.
- [114]. Trapaidze, A.; Hureau, C.; Bal, W.; Winterhalter, M.; Faller, P. (2012) Thermodynamic study of Cu²⁺ binding to the DAHK and GHK peptides by Isothermal Titration calorimetry (ITC). *JBIC, Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17, 37–47.