

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



Σχεδιασμός και σύνθεση μικρών πεπτιδίων τύπου ATCUN (<u>A</u>mino <u>T</u>erminal <u>Cu</u> and <u>N</u>i binding). Διερεύνηση της δεσμευτικής τους ικανότητας έναντι των ιόντων Cu(II).

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΣΤΑΜΑΤΙΑ ΔΑΣΚΑΛΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του τμήματος Χημείας κατά τη χρονική περίοδο 2019-2022.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Γεράσιμο Μαλανδρίνο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τόσο για την ανάθεση του θέματος της παρούσας εργασίας, όσο και για την πολύτιμη βοήθειά του. Τον ευχαριστώ για τα όσα μου έμαθε, την άψογη συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος και τις χρήσιμες συμβουλές για τα επόμενα βήματα.

Οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου 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, στον Δρ. Δημήτρη Κρικοριάν, μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Χημείας, για τη βοήθεια του στον καθαρισμό των πεπτιδίων με HPLC, καθώς και τη Μονάδα NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πρόσβαση στις υπηρεσίες της Μονάδας. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνάδελφο και υποψήφια Διδάκτορα Δήμητρα Κυριάκου για την βοήθεια της σε θέματα πεπτιδικής σύνθεσης, καθώς και τις τεχνικές που απαιτήθηκαν για την υλοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Ήταν πάντα πρόθυμη να μεταδώσει τις γνώσεις της και να με στηρίξει πρακτικά και συμβουλευτικά σε όποια δυσκολία παρουσιάστηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Ευχαριστώ θερμά τους φίλους και συναδέλφους μέλη του Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας, και ιδιαίτερα τον Αθανάσιο Ντιντούδη, τον Περικλή Παπαδόπουλο και τον Δημήτρη Γλυκό, αλλά και τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας Πεπτιδίων για την υποστήριξη, την άριστη συνεργασία, το φιλικό περιβάλλον και τις υπέροχες στιγμές καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για τη στήριξη, την πίστη τους σε εμένα και την εμπιστοσύνη που μου δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια.

> Σταματία Δασκάλου Ιωάννινα, Νοέμβριος 2022

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1	7
1.1 Βασικές αρχές αλληλεπίδρασης μεταλλικών ιόντων -πεπτιδίων	7
1.2 Σύμπλοκα πεπτιδίων με παράπλευρες αλυσίδες που δεν περιλαμβάνουν εντάξιμα άτομα δότες	9
1.3 Σύμπλοκα πεπτιδίων με πλευρικές αλυσίδες που εντάσσονται	
ασθενώς	16

Κεφάλαιο 2	18
2.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες του Cu(II)	18
2.2 Σχηματισμός συμπλόκων με πεπτίδια ιστιδίνης	20

Κεφάλαιο 3	24
3.1 Ενώσεις του Cu(II) με μοντέλα τύπου Xxx-Zzz-His, Xxx-His και τα παραγωγά τους	24
3.2 Σύμπλοκα χαλκού με τα πεπτίδια τύπου XH και XZH	25
3.2.1 Η ταυτότητα του αμινοξέος	25
3.2.2 Επίδραση της θέσης της ιστιδίνης στη δέσμευση του μετάλλου	25
3.2.3 Το ιόν του Cu(II)	25
3.3 Σχετικές συγγένειες των δύο μοντέλων και η εξάρτηση τους από το pH	26
3.3.1 Σύγκριση των ΧΖΗ και ΧΗ	26
3.3.2 Εξάρτηση από το pH	27
3.3.3 Επίδραση των αμινοξέων Xxx/Zzz στη δέσμευση του Cu(II)	27
3.3.4 Μέγεθος δακτυλίου χηλικής ένωσης	29
3.3.5 Κινητική σταθερότητα	29
3.4 Οξειδοαναγωγική χημεία	29
3.4.1 Ηλεκτροχημική ανάλυση	29
3.4.2 Χημική οξειδοαναγωγική δραστηκότητα	30
3.5 Εμφάνιση και πιθανοί ρόλοι στη βιολογία	30
3.5.1 Cu-XZH	30

Κεφάλαιο 4	32
4. Εφαρμογές	32
4.1 Καταλυτική δραστηκότητα: διάσπαση βιομορίων όπως DNA, RNA και σάκχαρα	32
4.1.1 Διάσπαση DNA και RNA από σύμπλοκα ATCUN	32
4.1.2 Διάσπαση πρωτεϊνών από ATCUN σύμπλοκα	33
4.1.3 Διάσπαση σακχάρων από σύμπλοκα ATCUN	34
4.2 Συνδυασμός με αντιμικροβιακά και αντιμυκητιασικά πεπτίδια	34
4.3 ΧΖΗ και ΧΗ ως χηλικοί παράγοντες απομάκρυνσης ή/και οξειδοαναγωγική απενεργοποίηση του Cu(II)	34
4.4 Ανίχνευση του Cu(II)	35
Κεφάλαιο 5	36
Σκοπός και αντικείμενο έρευνας	36
Κεφάλαιο 6	37
Πειραματική πορεία	37
6.1 Αντιδραστήρια	37
6.2 Συνθετική πορεία των πεπτιδίων H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂και H₂l Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ στην στερεά φάση	N- 39
6.3 Μέθοδος καθαρισμού HPLC	41
6.4 Ποτενσιομετρία	42
6.4.1 Βασικές έννοιες	42
6.4.2 Πειραματική πορεία	45
6.5 Φασματοκοπικές τεχνικές	46
6.5.1 Φασματοσκοπία UV-Vis	46
6.5.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR	50
	БЭ

Κεφάλαιο 753
Αποτελέσματα-Συζήτηση53
7.1 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H ₂ N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH ₂ 53
7.2 Αλληλεπίδραση ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile- CONH₂59
7.2.1 Ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις59
7.2.1.1 Προσδιορισμός ρΚ _α του ελεύθερου πεπτιδίουδ9
7.2.1.2 Αλληλεπίδραση Cu(II): πεπτιδίου H ₂ N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH ₂ 61
7.3 Φασματοσκοπική μελέτη62
7.3.1 Φασματοσκοπία UV-Vis62
7.4 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων64
7.5 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H ₂ N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH ₂ 67
7.6 Αλληλεπίδραση των ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile- CONH₂
7.6.1 Ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις72
7.6.1.1 Προσδιορισμός των τιμών pKα του ελεύθερου πεπτιδίου
7.6.1.2 Αλληλεπίδραση Cu(II): πεπτιδίου H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂74
7.7 Φασματοσκοπική μελέτη75
7.7.1 Φασματοσκοπία UV-Vis75 7.8 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων76
Κεφάλαιο 8
Συμπεράσματα
Περίληψη81
Abstract
Βιβλιογραφία

<u>Κεφάλαιο 1</u>

1.1 Βασικές αρχές αλληλεπίδρασης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων

Η χημική δομή των πεπτιδίων αντιπροσωπεύει ένα ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ αυτής των αμινοξέων και των πρωτεΪνών, πράγμα που ισχύει και για τη χημεία ένταξής τους με μεταλλικά ιόντα. Οι τελικές άμινο και καρβόξυ ομάδες είναι απομακρυσμένες μεταξύ τους ώστε να δημιουργήσουν ένα σταθερό χηλικό δακτύλιο, ακόμη και στην περίπτωση των απλούστερων διπεπτιδίων. Συνεπώς, σημαντικός καθίσταται και ο ρόλος των παράπλευρων αλυσίδων στην περίπτωση που φέρουν κατάλληλα άτομα δότες. Από την άλλη, η τελική άμινο ομάδα είναι σε χηλική θέση με δότες οξυγόνου της καρβονυλικής ομάδας και αζώτου της άμινο ομάδας του πεπτιδικού δεσμού, παρέχοντας τη δυνατότατα δημιουργίας χηλικού



Σχήμα1: Πιθανές θέσεις αλληλεπίδρασεις πεπτιδίων με μεταλλικά ιόντα(κόκκινο: Ν-τελικό και C-τελικό άκρο, μπλέ: πεπτιδικός δεσμός, πράσινο: παράπλευρες αλυσίδες [4]

δεσμού. Έχοντας υπ' όψη αυτές τις δυνατότητες, παρέχεται μεγάλη ευελιξία στις διαδικασίες σχηματισμού συμπλόκων πεπτιδίων ακόμη και απουσία εντάξιμων ατόμων δοτών πλευρικής αλυσίδας (π.χ. των Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Trp). Διαφορετικά μεταλλικά ιόντα, ωστόσο, θα προτιμήσουν διαφορετικούς τρόπους ένταξης, όπως παρατίθενται παρακάτω[1]:

- i. Η πιο κοινή μορφή σύνδεσης μετάλλου πεπτιδίου, με μέταλλο μετάπτωσης(π.χ. Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), Cd(II), κ.α.), είναι ο σχηματισμός μιας πενταμελούς χηλικής ένωσης με τη συμμετοχή της τελικής αμινομάδας και της γειτονικής καρβονυλικής ομάδας, όπως και η NH₂,CO του Σχήματος 1(a).
- ii. Η τελική αμινομάδα είναι σε χηλική θέση με το άτομο του αζώτου του δεσμού -CONH- του πεπτιδίου ή της αμιδικής ομάδας. Τόσο η πρωτονίωση όσο και η αποπρωτονίωση της αμιδικής ομάδας είναι αδύνατη στη μετρήσιμη κλίμακα pH για κοινά ολιγοπεπτίδια[2]-[5]. Αποδείχτηκε ότι η παρουσία ενός ακόμη αποτελεσματικού δότη σε χηλική θέση με το αμιδικό άζωτο μπορεί να προωθήσει την αποπρωτονίωση και την ένταξη της αμιδικής ομάδας των πεπτιδίων στο μεταλλικό ιόν ακόμη και σε όξινες τιμές pH, σε συνάρτηση βέβαια με τη φύση του μεταλλικού ιόντος. Ο Cu(II) είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά μεταλλικά ιόντα από αυτή την άποψη και το εύρος pH για το σχηματισμό των ενταγμένων με αμιδικό δότη ενώσεων είναι γενικά περίπου 4-5 για τις απλές ολιγογλυκίνες και παρόμοιους υποκαταστάτες. Στο Σχήμα 2(b) φαίνονται οι θέσεις δέσμευσης των πιο κοινών ειδών που σχηματίζονται από διπεπτίδια καταδεικνύοντας ότι ο τρόπος ένταξής (NH₂, N⁻, COO⁻) δημιουργεί δύο πενταμελείς χηλικούς δακτύλιους. Τα σύμπλοκα αυτά συνήθως

συμβολίζονται ως [CuL] για (NH₂, CO) και [CuH₋₁L] για (NH₂, N⁻, COO⁻) τρόπους ένταξης. Ο υποκαταστάτης αναγράφεται ως "L" και αναφέρεται στην ουδέτερη αμφιπρωτική μορφή του πεπτιδίου, ενώ με "H₋₁" υποδηλώνεται η αποπρωτονίωση μιας τέτοιας ομάδας που δεν μπορεί να αποπρωτονιωθεί απουσία των μεταλλικών ιόντων.

iii.

- Υπάρχουν δύο βασικές απαιτήσεις για το σχηματισμό συμπλόκων τύπου [ΜΗ. ₁L] στο μετρήσιμο εύρος pH:
- Η παρουσία μιας άλλης ομάδας (που γενικά ονομάζεται "άγκυρα"=ομάδα αρχικής ένταξης μεταλλοιόντος) σε κατάλληλη θέση ώστε να σχηματίζει χηλικό δακτύλιο με το άτομο αζώτου του πεπτιδικού δεσμού. Ο ρόλος "άγκυρας" της C-τελικής καρβοξυλικής ομάδας αποδεικνύεται μόνο στις διαδικασίες σχηματισμού συμπλόκων πεπτιδίων με κατιόντα διμεθυλ-κασσιτέρου(IV)[6], ενώ η τελική αμινομάδα θεωρείται γενικά ως η πιο κοινή ομάδα του παραπάνω τύπου. Συνεπώς, η χημεία ένταξης των πετιδίων με ελεύθερη Ν-τελική αμινομάδα διαφέρει σημαντικά σε σχέση με την αντίστοιχη των Νακετυλιωμένων. Τα πεπτίδια με ελεύθερο αμινοτελικό άκρο είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί υποκαταστάτες για σύνδεση των Cu(II), Ni(II), Pd(II) και ορισμένων άλλων πολύ λιγότερο μελετημένων στοιχείων, συμπεριλαμβανομένων των μετάλλων της ομάδας της πλατίνας, Au(I/II), Ag(I), Cd(II), Hg(II). Η σταθερή δέσμευση άλλων 3d στοιχείων όπως Zn(II), Co(II), Fe(II/III) ή Mn(II), ωστόσο, απαιτεί την παρουσία επιπλέον ατόμων δοτών στις παράπλευρες αλυσίδες. Αντιθέτως, τα πεπτίδια, των οποίων η τελική αμινομάδα δεν είναι ελεύθερη, δεν δεσμεύουν ισχυρά μεταλλικά ιόντα, εκτός εαν η αρχική ένταξη πραγματοποιείται μέσω ατόμου δότη παράπλευρης ομάδας με ικανότητα σχηματισμού χηλικού δακτυλίου με τον γειτονικό πεπτιδικό δεσμό.
- Πλήθος μεταλλικών ιόντων είναι ικανά να προωθήσουν την αποπρωτονίωση και την ένταξη αμιδίων. Ο χαλκός (ΙΙ) είναι ο πιο μελετημένος (pH ~ 4-5), ένας μεγάλος αριθμός παραδειγμάτων δημοσιεύθηκαν για το νικέλιο (ΙΙ) (pH ~ 8-9), αλλά μέχρι τώρα τα πιο αποτελεσματικά αποδείχθηκαν τα ιόντα λευκοχρύσου (ΙΙ) και παλλαδίου (ΙΙ) (pH <2,0).
- ίν. Όλες οι προηγούμενες δομικές πληροφορίες είναι απολύτως εφαρμόσιμες για τα απλά διπεπτίδια, ενώ η αύξηση του μεγέθους του μορίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευελιξίας του σχηματισμού των συμπλόκων. Τα άτομα αζώτου του δεύτερου και του τρίτου αμιδίου από το αμινοτελικό άκρο ενός ολιγοπεπτιδίου μπορούν επίσης σχηματίζουν χηλικούς δακτυλίους με αποτέλεσμα ένταξη τύπων (NH₂, 2N⁻, COO⁻) και (NH₂, 3N⁻) για τρι- και τετραπεπτίδια, αντίστοιχα (βλέπε σχήμα 2c και d). Οι παραπάνω υφίστανται με οποιοδήποτε πεπτιδικό μόριο με ελεύθερο N-τελικό άκρο και συχνά ονομάζονται ως ως δέσμευση μετάλλου μέσω του πεπτιδικού σκελετού. Για σύμπλοκα χαλκού (II)-τετραγλυκίνης [7], οι τιμές pK για την διαδοχική δέσμευση των ατόμων αζώτου των τριων αμιδικού (II) αυτές οι αντιδράσεις συμβαίνουν σε ένα πιο όξινο εύρος pH, ενώ τιμές pK για τις αντίστοιχες

αντιδράσεις είναι: 3,44, 4,68 και 7,68 [8]. Από τα προηγούμενα δεδομένα είναι επίσης προφανές, πως η αποπρωτονίωση και η ένταξη των αμιδικών ατόμων αζώτου γενικότερα λαμβάνει χώρα σε διαδοχικές αντιδράσεις και όλα τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα μπορούν να υφίστανται σε καλά διαχωρισμένες περιοχές pH. Στην περίπτωση όμως συμπλόκων νικελίου (II) με τρι- ή τετραπεπτίδια, ο σχηματισμός [NiH- 2L] ή [NiH-3L] λαμβάνει χώρα με συνεργατικό τρόπο σε στενό εύρος pH (pH ~ 8–9). Η διεργασία αυτή μπορεί να εξηγηθεί εύκολα λόγω της αλλαγής της γεωμετρίας ένταξης. Δηλαδή, οι απλοί τρόποι ένταξης τύπου (NH₂, CO) και (NH₂, N⁻, COO⁻) παρατηρούνται σε οκταεδρικά σύμπλοκα υψηλού spin, ενώ ο σχηματισμός των (NH₂,2N⁻, COO⁻) και (NH₂,3N⁻) σε υψηλότερες τιμές pH συνοδεύεται με αλλαγή της γεωμετρίας σε επίπεδη τετραγωνική χαμηλού σπιν [1].



Σχήμα 2: Κύριοι τρόποι ένταξης των ολιγογλυκινών και των σχετικών πεπτιδίων (οι ελεύθερες θέσεις ένταξης καταλαμβάνονται από το μόρια νερού) [1]

Σύμπλοκα πεπτιδίων με παράπλευρες αλυσίδες που δεν περιλαμβάνουν εντάξιμα άτομα δότες

Οι βασικοί τρόποι ένταξης των πεπτιδίων χωρίς κανένα πρόσθετο άτομο δότη στις πλευρικές αλυσίδες περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι ακόμη και σε αυτή την περίπτωση η παρουσία αμινοξικών καταλοίπων με ποικίλες πλευρικές αλυσίδες μπορεί να έχει σημαντική συμβολή στη συνολική σταθερότητα και δομική ποικιλομορφία των συμπλόκων. Η παρουσία μιας ογκώδους παράπλευρης αλυσίδας (π.χ. αυτές του Leu, Trp ή Phe) μπορεί να μειώσει τη θερμοδυναμική σταθερότητα των συμπλόκων ή να καταλήξει σε δομικές παραμορφώσεις. Από την άλλη όμως, η ύπαρξη μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να ενισχύσει την σταθερότητα διαφόρων ειδών ή να σταθεροποιήσει συγκεκριμένες διαμορφώσεις συμπλόκων πεπτιδίων. Οι αλληλεπιδράσεις συσσώρευσης μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων Phe, Tyr ή Trp καθώς και d-π αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιόντων μετάλλου και αρωματικών υποκαταστατών είναι οι πιο μελετημένες [5],[9],10]. Οι παραπάνω είναι ιδιαίτερα σημαντικές σε επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα νικελίου (ΙΙ) και σύμπλοκα παλλαδίου (ΙΙ), αλλά η συμβολή τους στη θερμοδυναμική σταθερότητα παρατηρήθηκε επίσης και σε σύμπλοκα χαλκού (ΙΙ) [1].

Η πιο χαρακτηριστή ωστόσο επίδραση αυτού του τύπου αμινοξέων παρατηρείται όταν το αμινοξύ προλίνη εντοπίζεται στην πεπτιδική αλυσίδα οπότε επηρεάζεται έντονα ο χαρακτηριστικός τρόπος ένταξης με τα αμιδικού τύπου άτομα του πεπτιδικού σκελετού. Η προλίνη περιέχοει μια δευτεροταγή άμινο ομάδα οπότε δεν υπάρχει πιθανότητα για αποπρωτονίωση και ένταξη του αμιδίου. Κατά συνέπεια, το προλίνη λειτουργεί ως "σημείο διακοπής" της ένταξης αμιδίων [1].

Η συμμετοχή β-αμινοξέων στην πεπτιδική αλληλουχία διαφοροποιεί επίσης την χαρακτηριστική ένταξη τύπου 4Ν ως προς το μέγεθος των χηλικών δακτυλίων που σχηματίζονται. Για παράδειγμα σε πεπτίδια αποτελούμενα από β-αλανίνη, ένταξη του παραπάνω τύπου οδηγεί στον σχηματισμό τριών συγχωνευμένων (fused) εξαμελών δακτυλίων (6,6,6) αντί των τριων πενταμελών (5,5,5). Γενικά, η αύξηση του μεγέθους του χηλικού δακτυλίου μειώνει τη σταθερότητα των πεπτιδικών συμπλόκων και ιδιαίτερα όταν σχηματίζονται δύο ή τρεις δακτύλιοι. Ο σχηματισμός μεικτών χηλικών συστημάτων, π.χ. (5,6,5) και (5,5,6), ωστόσο, μπορεί να προτιμηθεί για ορισμένα μεταλλικά ιόντα, ιδιαίτερα για το παλλάδιο (ΙΙ) λόγω της σχετικά μεγάλης ιοντικής ακτίνας [1],[11],[12].

Ο σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού μέσω της ε-αμινο ομάδας της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης ή β/γ-καρβοξυλικών καταλοίπων ασπαρτικού/γλουταμικού αντιπροσωπεύει μια άλλη κατηγορία που οδηγεί στον αποκλεισμό της σύνδεσης του μετάλλου μέσω της πεπτιδικού σκελετού. Η γλουταθειόνη (γ-GluCysGly) είναι το πιο γνωστό και σημαντικότερο παράδειγμα υποκαταστατών αυτού του τύπου. Η χημεία ένταξης της γλουταθειόνης [2],[3],[13] αποκαλύπτει με σαφήνεια τη μεγάλη ευελιξία και πολυπλοκότητα των αντιδράσεών της, η οποία προέρχεται από το διαχωρισμό του χηλικού αμινοτελικού άκρου από τα θειολικά και αμιδικά τμήματα που εντάσσονται ισχυρά. Η επίδραση της ε-αμινο ομάδας της λυσίνης μελετήθηκε σε σύμπλοκα χαλκού (ΙΙ) και νικελίου (ΙΙ) με πολλά δι- και τρι-πεπτίδια[14],[15]. Οι λειτουργικές ομάδες του τελικού δότη είναι πολύ μακριά σε αυτά τα πεπτίδια και γι΄αυτό ενισχύεται ο σχηματισμός σταθερών δομών «βρόχου» ή διπυρηνικών συμπλόκων [1]. Η ένταξη των ιόντων Cu (II) ή Ni (II) με την ολιγογλυκίνη ή την ολιγοαλανίνη ξεκινά στο άτομο αζώτου του N-τελικού άκρου το οποίο δρα ως σημείο αρχικής ένταξης (ή "άγκυρα"), αποτρέποντας την υδρόλυση των μεταλλικών ιόντων. Το γειτονικό καρβονυλικό οξυγόνο είναι ο δεύτερος δότης, ολοκληρώνοντας τον σχηματισμό του χηλικού δακτυλίου [2],[3],[16],[17]. Καθώς αυξάνεται το pH, τα μεταλλικά ιόντα είναι σε θέση να αποπρωτονιώσουν διαδοχικά πεπτιδικά άτομα αζώτου, σχηματίζοντας δεσμούς M-N, μέχρι που τελικά σχηματίζονται σύμπλοκα στοιχειομετρίας [MH₋₃L]²⁺ (σύμπλοκο 4N), σε pH 9-10. Στο Σχήμα 3 παρουσιάζονται οι δομές των συγκεκριμένων συμπλόκων Cu(II) με τετραγλυκίνη ή τετραλανίνη[5].



Σχήμα 3: Σταδιακός σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ Cu (ΙΙ) και τετρααλίνης [5]

Ο σχηματισμός σταθερών πενταμελών χηλικών δακτυλίων από διαδοχικά άτομα αζώτου είναι η κινητήρια δύναμη της ένταξης, μειώνοντας την τιμή pK του πρώτου αμιδικού αζώτου έως και 10 λογαριθμικές μονάδες [2],[3],[16]. Στην περίπτωση συμπλόκων Cu(II), οι διεργασίες αποπρωτονίωσης συγκεκριμένων αμιδικών ατόμων αζώτου είναι συνήθως καλά διαχωρισμένες η μία από την άλλη. Αυτό υποδηλώνει την έλλειψη συνεργασίας στη διαδικασία δέσμευσης. Στον πίνακα 1 περιέχονται οι διορθωμένες (ως προς την κατάσταση πρωτονίωσης) ολικές σταθερές σταθερότητας (log*K) για τετρα- και πενταπεπτίδια που περιέχουν Gly- και Ala. Όλα τα πεπτίδια της γλυκίνης σχηματίζουν ισχυρότερα σύμπλοκα από τα ομόλογα αλανίνης. Ο μεθυλικός υποκαταστάτης της αλανίνης δεν είναι αρκετά ογκώδης ώστε να παρεμβαίνει άμεσα στο σχηματισμό συμπλόκου. Προφανώς, η ευελιξία των καταλοίπων Gly μειώνει την τάση του χηλικού δακτυλίου και σταθεροποιεί έτσι το σύμπλοκο. Η επέκταση της πεπτιδικής αλυσίδας με ένα επιπλέον κατάλοιπο οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας του τελικού 4N συμπλόκου εις βάρος του 3N [2],[5],[18],[19].

Peptide	1N	2N	3N	4N
Gly-Gly-Gly-Gly	-2.89	-8.39	-15.28	-24.57
Ala-Gly-Gly-Gly	-2.89	-8.75	-15.73	-24.99
Ala-Ala-Ala-Ala	-3.36	-8.58	-16.22	-25.48
Ala-Ala-Ala-Ala-NH ₂	-3.11	-8.70	-16.44	-24.41
Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	-2.66	-8.76	-15.76	-23.90
Ala-Gly-Gly-Gly-Gly	-2.58	-8.58	-15.58	-23.79
Gly-Gly-Gly-Gly-Ala	-2.63	-8.64	-15.69	-23.94
Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	-2.86	-8.01	-15.13	-23.62
Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-NH2	-1.93	-6.91	-13.35	-20.08

Πίνακας 1: Τιμές log *Κ για σύμπλοκα Cu (ΙΙ) απλών τετρα- και πενταπεπτιδίων: δεδομένα για Met-εγκεφαλίνη και το πενταπεπτίδιο ANF δίνονται για σύγκριση [5]





Η ένταξη του Ni(II) στα τετραπεπτίδια είναι πιο περίπλοκη[2],[20]. Η αρχική ένταξη του Ni(II) σε ένα απλό πεπτίδιο γίνεται μέσω της N-τελικής αμινομάδας, το ίδιο όπως και με το Cu(II). Το σύμπλοκο, ωστόσο, είναι οκταεδρικό και όχι τετραγωνικό. Η αποπρωτονίωση του γειτονικού αζώτου της αμιδικής ομάδας συμβαίνει σε υψηλότερο pH από ό,τι στα αντίστοιχα σύμπλοκα Cu(II) (8–9 έναντι 5). Ωστόσο, τα άλλα δύο αμίδια δότες (όταν υπάρχουν) αποπρωτονιώνονται συνεργατικά. Αυτό υποδεικνύεται από την εύρεση τιμής pK για το 2° και 3° ιοντισμό μικρότερης της αντίστοιχης του πρώτου. Το γεγονός συνοδεύεται από μια μετάβαση από μία εξα-ενταγμένη (οκταεδρική) σε μια επίπεδη γεωμετρία, η οποία καθιστά επιπρόσθετα την αντίδραση βραδεία. Το διάγραμμα κατανομής συμπλόκων για το

σύστημα Ni(II) - τετραγλυκίνης είναι δίνεται στο Σχήμα 5. Σε αυτό απεικονίζεται σαφώς η



Σχήμα 5: Καμπύλες κατανομής για σύμπλοκα Ni (II) με Gly – Gly – Gly – Gly – Gly : αρχική συγκέντρωση μεταλλικού ιόντος 1 mmol dm⁻³, και μοριακή αναλογία μετάλλου: υποκαταστάτη 1: 1. [5]

συνεργατική αποπρωτονίωση των αμιδικού τύπου δοτών (μεγάλη επικάλυψη των καμπυλων κατανομής). Αν και τα στοιχειομετρικά είδη είναι ανάλογα με αυτά που λαμβάνονται για το ιον Cu(II), οι συγκεντρώσεις των ενδιάμεσων συμπλόκων 2N και 3N είναι πολύ χαμηλότερες από τα αντίστοιχα είδη Cu(II). Η συνεργατική μετάβαση από ένα οκταεδρικό NiL (1N) σε επίπεδο NiH₋₃L (4N) αντικατοπτρίζεται και στο γεγονός ότι περίπου μόνο το 20% του συνολικού Ni(II) σχηματίζει το ενδιάμεσο σύμπλοκο 2N στοιχειομετρίας NiH₋₁L [5].

Οι παράπλευρες αλυσίδες αμινοξέων που δεν έχουν εντάξιμες ομάδες επιδρούν στη σταθερότητα και τη δομή των μεταλλικών συμπλόκων με πεπτίδια, ως εξής:

α) Υπερσταθερότητα μέσω έμμεσων αλληλεπιδράσεων

Η σύγκριση των καμπυλών κατανομής των συστημάτων Cu(II)–NSFRY– NH₂ [19] και Cu(II)-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-NH₂ (Σχήμα 6) δείχνει σαφώς ότι οι ισορροπίες συμπλοκοποίησης και στα δύο συστήματα είναι πολύ διαφορετικές. Ο σχηματισμός του συμπλόκου 4N παρατηρείται σε πολύ χαμηλότερη τιμή pH στην περίπτωση του NSFRY -NH₂, υποδεικνύοντας ενίσχυση της σταθερότητας. Οι ολικές σταθερές σταθερότητας log*K (διορθωμένες ως προς την κατασταση πρωτονίωσης) που παρουσιάστηκαν στον Πίνακα 1 υποδεικνύουν ότι το σύμπλοκο 4N του Cu(II)-NSFRY-NH₂ είναι σχεδόν πέντε τάξεις μεγέθους πιο σταθερό από αυτό της πενταλανίνης. Αυτή η εξαιρετικά υψηλή σταθερότητα των συμπλόκων (το NSFRY–NH₂ είναι ο πιο αποτελεσματικός υποκαταστάτης για τα ιόντα Cu(II) μεταξύ ολιγοπεπτιδίων με μη συμπλοκοποιήσιμες πλευρικές αλυσίδες) πρέπει να προκύπτει από την εμπλοκή των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων [5]. Οι τιμές του pK που συνοδεύουν τον σχηματισμό συγκεκριμένων συμπλόκων και οι αντίστοιχες log*K είναι καλά μέτρα των της θερμοδυναμικής σταθερότητας συμπλόκων ιδίου τύπου ένταξης. Οι διαφορές των τιμών μεταξύ NSFRY-NH₂ και άλλων αναλόγων που φαίνονται στον Πίνακα 2 επιτρέπουν την αξιολόγηση της επίδρασης της αλλαγής συγκεκριμένου αμινοξέος όσον αφορά τον σχηματισμό και την θερμοδυναμική σταθερότητα των συμπλόκων τύπου 1-4N [5].



Σχήμα 6: Σύγκριση των καμπυλών κατανομής των ειδών που παρατηρούνται για σύμπλοκα Cu(II) με : (__) Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-NH₂ και (- - -) Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-NH₂. (α) CuHL (b) CuL (c) CuH₋₁L (d) CuH₋₂L (e) CuH₋₃L [5]

Πίνακας 2: Τιμές log *Κ για σύμπλοκα Cu (ΙΙ) και των αναλόγων του ΑΝF πενταπεπτιδίου [5]					
Peptide	1N	2N	3N	4N	
Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-NH2	-1.93	-6.91	-13.35	-20.08	
Ala-Ser-Phe-Arg-Tyr-NH ₂	-3.36	-8.26	-15.55	-21.52	
Asn-Ala-Phe-Arg-Tyr-NH2	-2.23	-7.40	-14.24	-20.59	
Asn-Ser-Ala-Arg-Tyr-NH2	-2.07	-6.97	-13.93	-20.56	
Asn-Ser-Phe-Ala-Tyr-NH2	-2.33	-7.24	-14.31	-20.88	
Asn-Ser-Phe-Arg-Ala-NH2	-2.84	-7.56	-14.65	-21.75	
Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH	-1.82	-6.89	-14.06	-20.47	
Ala-Ala-Ala-Ala-NH2	-3.11	-8.70	-16.44	-24.41	

β) Γενικές επιδράσεις των αρωματικών δακτυλίων στις ισορροπίες συμπλοκοποίησης

Οι αρωματικοί δακτύλιοι των Phe, Tyr ή Trp μπορούν να ενισχύσουν τη σταθερότητα του συμπλόκου μέσω άμεσων ηλεκτρονιακών αλληλεπιδράσεων με το μεταλλικό ιόν (d-π), αλληλεπιδράσεις συσσώρευσης μεταξύ δύο δακτυλίων, ή γενικότερα με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Υπάρχουν πολλά σχετικά παραδείγματα σε σύμπλοκα αμινοξέων [21],[22], διπεπτιδίων [23],[24] και τριπεπτιδίων [24]-[26]. Ωστόσο, όσο μεγαλύτερο είναι το πεπτίδιο, τόσο λιγότερο έντονη είναι η αύξηση της σταθερότητας λόγω των παραπάνω [5].

γ) Προ-διαμόρφωση στο μόριο του πεπτιδίου

Η αργινίνη-αγγειοπρεσίνη (AVP) και η οξυτοκίνη (OXT) αποτελούν σημαντικές ορμόνες της νευροϋποφύσης. Τα μόριά τους περιέχουν ένα βρόχο που προκύπτει από το δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ των κυστεϊνών στις θέσεις ένα και έξι. Βρέθηκε ότι αυτός ο βρόχος παρέχει μία εξαιρετική προκαθορισμένη θέση ένταξης για τα ιόντα Cu(II), με τη σταθερότητα για το σύμπλοκο 4N να αυξάνεται κατά περίπου τέσσερις τάξεις μεγέθους συγκρινόμενη με την αντίστοιχη ολιγοαλανινών που διαθέτουν το ίδιο σετ δοτών $\{NH_2, 3 \times N^-\}$ [27],[28] (Πίνακας 3). Σε αυτό το αποτέλεσμα οδηγεί η συγκεκριμένη διαμόρφωση αυτών των ορμονών, κλειδωμένη σε μορφή δακτυλίου από την προαναφερθείσα δισουλφιδική γέφυρα [5].

δ) <u>Ασυνήθιστη επίδραση ενός καταλοίπου α-υδροξυμεθυλοσερίνης στην ικανότητα</u> <u>ένταξης των πεπτιδίων</u>

Η HmS είναι ένα Ν-τελικό κατάλοιπο απαντώμενο σε πολλά πεπτιδικά αντιβιοτικά. Ο ρόλος του είναι ελάχιστα κατανοητός, αλλά είναι πιθανό ότι η ξεχωριστή επίδρασή του στη γεωμετρική διαμόρφωση των πεπτιδίων μπορεί να έχει βιολογική σημασία. Η τελευταία, από την άλλη πλευρά, είναι σημαντικής σπουδαιότητας όσον αφορά τις ικανότητες δέσμευσης των πεπτιδίων έναντι των μεταλλικών ιόντων. Η ογκώδης πλευρική αλυσίδα της HmS επηρεάζει σημαντικά τις ισορροπίες ένταξης στα συστήματα μέταλλου-πεπτίδιου [29], [30]. Πιο συγκεκριμένα διαθέτει δύο ομάδες υδροξυλίου στην πλευρική αλυσίδα, οι οποίες μπορεί να προσδεθούν με το μεταλλικό ιόν σε ισχυρά βασικό διάλυμα. Σε τιμές pH< 9, η τρις-HmS δεσμεύει τα ιόντα Cu(II) με ένταξη τύπου {NH₂, $2 \times N^{-}$ } όπως ακριβώς και η τριαλανίνη. Ωστόσο, η παρουσία του HmS αυξάνει τη σταθερά σταθερότητας του συμπλόκου 3N (CuH_2L) κατά τέσσερις τάξεις μεγέθους σε σύγκριση με το αντίστοιχο της τριαλανίνης (Σχήμα 7). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη πολύ αποτελεσματικών εμμέσων αλληλεπιδράσεων που περιλαμβάνουν τις πλευρικές αλυσίδες α-υδροξυμεθυλίου, σταθεροποιώντας τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι ακόμη και η εισαγωγή ενός μόνο καταλοίπου HmS σε ένα ολιγοπεπτίδιο, μπορεί να αλλάξει ευδιάκριτα την ικανότητα συμπλοκοποίησης του με το ιόν Cu(II) [30],[31]. Παρόλο που δεν υπάρχουν αρκετές δομικές πληροφορίες για τα σύμπλοκα Cu(II) με HmS μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ενίσχυση της σταθερότητας προκύπτει εν μέρει από την αποτελεσματική θωράκιση του επιπέδου ένταξης, από την υδρολυτική προσβολή του διαλύτη (βλ. σύμπλοκα ιστιδίνης, παρακάτω)[5].

Πίνακας 3: Τιμές log *Κ για σύμπλοκα Cu (ΙΙ) του ΑVP, τα ανάλογα του και τετρααλίνη [5]				
Log *K	1N	2N	3N	4N
Ala-AVP	-2.87	-8.04	-15.42	-24.68
OXT	-2.14	-7.94	-14.24	-21.34
AVP	-2.48	-8.26	-14.36	-20.51
D-Val ⁴ -AVP	-2.68	-8.06	-13.75	-22.17
Ala-Ala-Ala-Ala	-3.36	-8.58	-16.22	-25.48



Σχήμα 7: Σύγκριση καμπυλών κατανομής για σύμπλοκα Cu(II) με: (-) Ala – Ala – Ala και (---) HmS – HmS – HmS: αρχικές συγκεντρώσεις ιόντων μετάλλου 1 mmol dm⁻³, και μοριακές αναλογίες μετάλλου προς πεπτίδιο 1: 1. [5]

1.3. Σύμπλοκα πεπτιδίων με πλευρικές αλυσίδες που εντάσσονται ασθενώς.

Η μεγάλη πλειοψηφία των πεπτιδίων που περιέχουν τα φυσικά αμινοξέα ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία. Περιλαμβάνουν το αλκοολικό-ΟΗ της σερίνης και της θρεονίνης, το φαινολικό-ΟΗ της τυροσίνης, τις β και γ-καρβοξυλομάδες των ασπαρτικού και γλουταμικού αντίστοιχα, τα αμίδια της πλευρικής αλυσίδας της ασπαραγίνης και της γλουταμίνης, τη θειοαιθερική ομάδα της μεθειονίνης και τα επιπλέον άτομα δότη αζώτου της λυσίνης και της αργινίνης. Η παρουσία κάποιας από αυτές τις πλευρικές αλυσίδες δεν οδηγεί σε δραματική αλλαγή στη χημεία ένταξης των πεπτιδίων, αλλά όλες συμβάλλουν στη θερμοδυναμική σταθερότητα ή τη δομική τροποποίηση των πεπτιδικών συμπλόκων. Η έκταση αυτών των τροποποιήσεων σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από τη θέση αυτών των καταλοίπων στην αμινοξική αλληλουχία των πεπτιδίων και από τη φύση των μεταλλικών ιόντων [1].

Οι αλκοολικές-ΟΗ ομάδες της σερίνης και θρεονίνης γενικά λειτουργούν ως χαμηλής συγγένειας θέσεις ένταξης για όλα τα μεταλλικά ιόντα. Η μικρή αύξηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας που επιφέρει η παρουσία αυτών των καταλοίπων μπορεί να αποδοθεί σε μια ασθενή άμεση αξονική ή ισημερινή αλληλεπίδραση των υδροξυλομάδων-μεταλλικών ιόντων ή εμμέσως μέσω ενός δεσμού υδρογόνου που σχηματίζεται με ένα ενταγμένο μόριο νερού. [1],[32].

Η φαινολική ομάδα της τυροσίνης δεν είναι σε κατάλληλη θέση για να σχηματίσει χηλικούς δακτυλίους με τα αμιδικά άτομα δότες του πεπτιδικού σκελετού παρουσία μεταλλοϊόντων. Κατά συνέπεια, γενικά δεν αποτελεί θέση σύνδεσης και βρίσκεται στην πρωτονιωμένη της μορφή στα σύμπλοκα που υφίστανται σε τιμές pH < 9. Ωστόσο, αν μετά τη δέσμευση των ατόμων δοτών του πεπτιδικού σκελετού εξακολουθούν να υπάρχουν ελεύθερες θέσεις ένταξης, καθίσταται δυνατός ο σχηματισμός διπυρηνικών συμπλόκων μέσω φαινολικών γεφυρών ή σχηματισμός μακροχηλικών δακτυλίων που περιλαμβάνουν κατάλοιπα Tyr [33]-[35]. Ο ρόλος της

επιπλέον αμινομάδας της λυσίνης είναι μάλλον παρόμοιος με αυτό της φαινολικής ομάδας της τυροσίνης [1].

Η ενίσχυση της σταθερότητας των πεπτιδικών συμπλόκων είναι πολύ πιο συνηθισμένη και σημαντική παρουσία των β και γ- καρβοξυλικών ομάδων των καταλοίπων ασπαρτικού και γλουταμικού αντίστοιχα. Η ενίσχυση αυτή είναι πάντα πιο μεγάλη στην περίπτωση ύπαρξης του ασπαρτικού στην αμινοξική αλληλουχία. Όταν το ασπαρτικό βρίσκεται στην Ν-τελική θέση υπάρχει η δυνατότητα σχηματισμού ενός εξαμελούς χηλικού δακτυλίου (NH₂, β-COO⁻), σε αντίθεση με την περίπτωση του γλουταμικού στην ίδια θέση που σχηματίζει τον λιγότερο σταθερό επταμελή (Σχήμα 8). Σημαντική επίδραση στην διαδικασία συμπλοκοποίησης παρατηρείται και όταν το κατάλοιπο ασπαρτικού εντοπίζεται σε εσωτερική θέση. Συγκεκριμένα όταν βρίσκεται στην δεύτερη ή τρίτη θέση από το Ν-τελικό άκρο προάγει την αποπρωτονίωση-ένταξη των προηγούμενων αμιδικών δοτών και εμποδίζει την σύνδεση των επόμενων. Αυτές οι διαπιστώσεις ισχύουν ξεκάθαρα σε όλα τα αντίστοιχα σύμπλοκα χαλκού(ΙΙ), νικελίου(ΙΙ) ακόμη και στα σύμπλοκα που σχηματίζονται με τα μαλακά ιόντα παλλαδίου(ΙΙ) [36]. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι τα αντίστοιχα αμινοξέα που περιέχουν πλευρικές ομάδες αμιδίου, όπως η ασπαραγίνη και η γλουταμίνη, δεν είναι σε θέση επηρεάζουν τόσο αποτελεσματικά τις ιδιότητες ένταξης των πεπτιδικών υποκαταστατών. Οι αμιδικές ομάδες των αμινοξέων Asn και Gln μπορούν γενικά να ληφθούν υπόψη ως μη εντάξιμες πλευρικές αλυσίδες στα είδη που σχηματίζονται γύρω από το φυσιολογικό pH.



Σχήμα 8: 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).

Η επαγώμενη από ένα μεταλλικό ιόν αποπρωτονίωση αυτής της ομάδας μπορεί να εμφανιστεί μόνο σε ισχυρά αλκαλικά διαλύματα [1].

Η ομάδα γουανιδίνης της αργινίνης είναι πολύ γνωστή ως βιολογική θέση αναγνώρισης πεπτιδίων και πρωτεϊνών μέσω κατευθυνόμενου δεσμού υδρογόνου. Υπάρχουν αρκετά στοιχεία για το σταθεροποιητικό ρόλο του δεσμού υδρογόνου μεταξύ αργινίνης και ασπαρτικού/γλουταμικού στα σύμπλοκα χαλκού(ΙΙ) των αντίστοιχων διπεπτιδίων [37]. Τα τελικά άμινο και αμιδικά άτομα αζώτου του πεπτιδικού σκελετού προτάθηκαν ως οι κύριες θέσεις σύνδεσης μετάλλων, αλλά υπάρχει και αναφορά της πλευρικής σύνδεση του Cu(ΙΙ) και του NH₂ της Arg [1],[38].

Η εκλεκτικότητα των ιόντων μετάλλου όσον αφορά την σύνδεση τους με την θειοαιθερική ομάδα της μεθειονίνης είναι πολύ υψηλή και μπορεί να είναι η κύρια θέση σύνδεσης μετάλλου σε πολλά σύμπλοκα αργύρου(Ι), παλλαδίου(ΙΙ) και λευκοχρύσου(ΙΙ) [39],[40]. Αντιθέτως, μελέτες αλληλεπίδρασης των χαλκού(ΙΙ) και νικελίου(ΙΙ) με δι-και τρι-πεπτίδια που περιέχουν μεθειονίνη σε όλες τις πιθανές θέσεις υπέδειξαν ότι η υπό συζήτηση ομάδα δεν έχει σημαντική επίδραση τόσο στην πορεία συμπλοκοποίησης όσο και στην θερμοδυναμική σταθερότητα [1], [41].

<u>Κεφάλαιο 2</u>

2.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες του Cu(II)

Ο χαλκός (Cu) είναι ένα από τα στοιχεία της πρώτης σειράς μετάπτωσης με ατομικό αριθμό 29 και ηλεκτρονιακή δαμόρφωση [Ar]3d¹⁰4s¹. Είναι μαλακό και όλκιμο μέταλλο, σχετικά ευγενής, αλλά λιγότερο καλός αγωγός του ηλεκτρισμού και της θερμότητας από τον Ag. Έχει μόνο ένα s ηλεκτρόνιο έξω από την πλήρη 3d υποστιβάδα. Λόγω αυτού το πρώτο δυναμικό ιοντισμού του είναι μεγαλύτερο αυτό των αλκαλίων. Επιπλέον, το σημείο τήξης του χαλκού(1084,6°C) είναι μεγαλύτερο από εκείνο των αλκαλίων καθώς τα ηλεκτρόνια της d υποστιβάδας είναι αυτά που συμμετέχουν στο μεταλλικό δεσμό. Διαλύεται εύκολα σε νιτρικό και θειικό οξύ και σε διαλύματα KCN ή αμμωνίας παρουσία οξυγόνου[42].

Οι ενώσεις του Cu(I)([Ar]3d¹⁰) είναι διαμαγνητικές, χωρίς μονήρη ηλεκτρόνια, και άχρωμες (εκτός αν προκύπτει χρώμα από το ανιόν ή ταινίες μεταφοράς φορτίου), ενώ έχουν τετραεδρική στερεοχημεία με αριθμό ένταξης 4. Είναι ασταθείς σε υδατικά διαλύματα και είτε οξειδώνονται σε Cu(II) που έχει υψηλότερες σταθερές σχηματισμού ή ανάγονται προς Cu(0). Τα δυναμικά των οξειδωτικών βαθμίδων Cu(I) και Cu(II) είναι [42]:

> $Cu^+ + e^- \rightarrow Cu(s)$ E^o = 0.52 V $Cu^{2+} + e^- \rightarrow Cu^+$ E^o = 0.153 V

Το ιόν Cu(I) είναι μαλακό οξύ επομένως προτιμάται η δημιουργία συμπλόκων με υποκαταστάτες μαλακές βάσεις, όπως ομάδες με άτομα δότες S (π.χ. κυστεΐνη, μεθειονίνη) ή ομάδες με άτομα δότες N (π.χ. ιστιδίνη, N-τελική αμινομάδα) με τις σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων αυτών να εξαρτώνται από το pH [43].

Οι περισσότερες ενώσεις του Cu(I) οξειδώνονται εύκολα προς Cu(II), όμως η οξείδωση του Cu(II) προς Cu(III) είναι δύσκολη. Ο Cu(II) με ηλεκτρονιακή διαμόρφωση [Ar]3d⁹ είναι παραμαγνητικός με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Τα ιόντα Cu(II) είναι «ενδιάμεσα» οξέα (μεταξύ σκληρών και μαλακών) και έτσι προτιμώνται υποκαταστάτες με άτομα δότες N (π.χ. αμίνες, αμινοξέα) ή άτομα δότες Ο(π.χ. κετόνες). Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι προτιμώνται υποκαταστάτες με άτομα δότες N καθώς σχηματίζουν σύμπλοκα που είναι θερμοδυναμικά πιο σταθερά [1][5][42].

Οι γεωμετρίες που παρατηρούνται είναι επίπεδη τετραγωνική (ή παραμορφωμένη τετραεδρική), τετραγωνική πυραμίδα και παραμορφωμένη οκταεδρική, για αριθμούς ένταξης 4, 5 και 6, αντίστοιχα. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις λόγω της d⁹ διαμόρφωσης του Cu(II) παρατηρούνται στερεοχημικές παραμορφώσεις που οδηγούν σε παραμορφωμένες γεωμετρίες σε σχέση με τις αναμενόμενες. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι αυτή του παραμορφωμένου οκταέδρου. 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 [42][44][45].



Σχήμα 9: Παραμορφώσεις Jahn-Teller των οκταεδρικών d⁹ συμπλόκων του Cu(II). Στη Compressed D_{4h} έχουμε συρρίκνωση των αξονικών trans δεσμών Cu-L, ενώ στη Elongated D_{ah} έχουμε επιμήκυνση των αξονικών trans δεσμών Cu-L.[45]

2.2. Σχηματισμός συμπλόκων με πεπτίδια ιστιδίνης

Τα άτομα δότη N του ιμιδαζολίου είναι πιθανώς οι πιο κοινές θέσεις δέσμευσης στις μεταλλοπρωτεΐνες [5]. Ο ρόλος των καταλοίπων ιστιδίνης όσον αφορά την ένταξη μεταλλικών ιόντων πεπτίδια που την περιέχουν αλλάζει ανάλογα με τη θέση της στην αλληλουχία. Είναι γνωστό ότι το άτομο αζώτου (N3) του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης είναι η πρωταρχική θέση ένταξης, ακόμη και παρουσία N-τελικών αμινομάδων. Με τη συμμετοχή του ατόμου αζώτου της τελευταίας σχηματίζονται μακροχηλικοί δακτύλιοι, όμως με την αύξηση του pH κυριαρχεί η δέσμευση του χαλκού με το αμιδικό άτομο αζώτου. Στο Σχήμα 10 φαίνονται όλοι οι πιθανοί τρόποι



Σχήμα 10: Πορείες σχηματισμού συμπλόκων χαλκού με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη [4].

ένταξης των πεπτιδίων που περιέχουν ιστιδίνη. Οι πιο συνηθισμένοι τρόποι ένταξης ενός απλού πεπτιδίου μονοϊστιδίνης, μπορούν να περιγραφούν ως ακολούθως[4]:

 a) Το άτομο N3 του ιμιδαζολίου ενός N-τελικού ιστιδινικού καταλοίπου (αλληλουχίες τύπου HisXYZ...) μπορούν να σχηματίσει σταθερή 6μελή χηλική ένωση με την επιπλέον συμμετοχή της Ν-τελικής αμινομάδα στην σφαίρα ένταξης του ιόντος (ένταξη τύπου ισταμίνης). Αυτή η αλληλεπίδραση ενισχύει σημαντικά την θερμοδυναμική σταθερότητα των 1:1 και 1:2 συμπλόκων, και καθυστερεί την αποπρωτονίωση-ένταξη του πρώτου αμιδικού ατόμου αζώτου [5],[46],[47]. Τα ML και ML₂ είναι τα κύρια σύμπλοκα χηλικού τύπου ένταξης (NH₂, N_{im}) (βλέπε Σχήμα 11a) [1]. Παρουσία περίσσειας υποκαταστάτη, οδηγούμαστε σε σχηματισμό του 1:2 συμπλόκου, ενώ η δεσμευτική ικανότητα αυτών των πεπτιδίων ενισχύεται σε σύγκριση με την αντίστοιχη απλών ολιγογλυκινών [48],[49],[50]. Η παραπάνω αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα παρουσία ευρέος φάσματος μεταλλικών ιόντων, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων δισθενών μετάλλων μετάπτωσης [51].

- b) Η ιστιδίνη στη δεύτερη θέση από το αμινοτελικό άκρο (αλληλουχίες τύπου XHisYZ...) ενισχύει το σχηματισμό συμπλόκων που περιλαμβάνουν ιοντισμό και ένταξη του πρώτου πεπτιδικού αζώτου, ενώ παράλληλα καθυστερεί η αποπρωτονίωση και συμμετοχή των υπόλοιπων (εφόσον είναι διαθέσιμα). Το είδος με στοιχειομετρία MH₋₁L, τύπου ένταξης (NH₂,N⁻,N_{im}) (βλ. Σχήμα 11b) κυριαρχεί σε φυσιολογική τιμή pH. Επιπρόσθετα, η αποπρωτονίωση και η ένταξη των αμιδικών ομάδων αυτών των πεπτιδίων σε μεταλλικά ιόντα παρατηρούνται όχι μόνο για το χαλκό(II) και το νικελίο(II), αλλά και για ιόντα ψευδαργύρου(II) και κοβαλτίου(II) σε τιμές pH κοντα στο επτά (7) [1],[52],[53]. Ο προαναφερθείς τριδοντικός τρόπος ένταξης δεν επιφέρει κορεσμό στη σφαίρα ένταξης των μεταλλικών ιόντων και έτσι σε αλκαλικά διαλύματα (pH 9–10) μπορούν να σχηματιστούν τετραπυρηνικά σύμπλοκα με γέφυρα ιμιδαζολίου (συμμετοχή και του πυρολικού τύπου ατόμου Ν, N(1) του ιμιδαζολίου.
- c) Η ιστιδίνη στην τρίτη θέση από το αμινοτελικό άκρο (XYHisZ... αλληλουχίες) έχει την πιο έντονη επίδραση στις διαδικασίες σχηματισμού πεπτιδικών συμπλόκων. Τα είδη με στοιχειομετρία MH₋₂L και ένταξη τύπου (NH₂,2N⁻,N_{im}) (βλ. Σχήμα 11c) σχηματίζονται σχεδόν αποκλειστικά σε φυσιολγική τιμή pH[54],[55]. Αυτός ο τρόπος δέσμευσης είναι υπεύθυνος για την υψηλή συγγένεια δέσμευσης χαλκού (II) και νικελίου(II) της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού και η αλληλουχία αναφέρεται συχνά ως μοτίβο ATCUN (Amino Terminal CuNi binding site). Εκτός από τον χαλκό(II) και το νικέλιο(II), η δομή που φαίνεται στο Σχήμα 11c διαμορφώνεται επίσης κατά προτίμηση με παλλάδιο(II) και χρυσό(III) [1],[56].
- d) Οι τρόποι ένταξης του Σχήματος 10a–c δεν μπορούν να ληφθούν απουσία τελικής αμινομάδας. Ένα άτομο δότη N₃-ιμιδαζολίου, ωστόσο, μπορεί να λειτουργήσει ως αρχική θέση ένταξης (άγκυρα) προάγοντας την δέσμευση αμιδικού δότη του πεπτιδικού σκελετού. Αυτός ο τύπος αλληλεπίδρασης παρατηρείται με πεπτίδια των οποίων το N-τελικό άκρο είναι προστατευμένο, και περιέχουν κατάλοιπα ιστιδίνης σε εσωτερική θέση. Στην περίπτωση αυτή, τα N3-ιμιδαζολικά άτομα δότη μπορούν –παρουσία μεταλλοϊόντος- να σχηματίσουν 6- ή 7-μελείς χηλικές ενώσεις με τα γειτονικά άτομα αζώτου των πεπτιδικών δεσμών προς το αμινο- ή το καρβοξυ-τελικό άκρο, αντίστοιχα (βλέπε σχήμα 11d και e). Η θερμοδυναμική σταθερότητα των συμπλόκων με 6-μελή χηλικό δακτύλιο είναι πάντα μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του 7-μελούς και αυτό εξηγεί την προτίμηση για το

σχηματισμό της δομής 11d. Ωστόσο, αν το ιστιδινικό κατάλοιπο είναι το αμινοτελικό άκρο ή υπάρχει μια δευτεροταγής αμίνη (π.χ. προλίνη) στην αλληλουχία η αποπρωτονίωση μπορεί λαμβάνει χώρα μόνο προς το C-τελικό άκρο με αποτέλεσμα τη δομή 11e. Στις παραπάνω διεργασίες (δομές 11d και e) εμπλέκονται τα ιόντα χαλκού(ΙΙ), νικέλίου(ΙΙ) και παλλαδίου(ΙΙ) [1].

- e) Η εξαιρετική συγγένεια δέσμευσης μετάλλων με αλληλουχίες τύπου XYHisZ... εξηγείται από το γεγονός ότι και οι δύο ομάδες (άμινο και ιμιδαζολική) μπορούν να συνδεθούν παράλληλα στο ίδιο μεταλλικό ιόν. Αυτές οι θέσεις, ωστόσο, μπορεί να αποτελούν και ανεξάρτητες θέσεις ένταξης, εάν υφίσταται μεγάλη απόσταση μεταξύ τους. Η Ν-τελική αμινομάδα είναι ωστόσο πιο αποτελεσματική όσον αφορά την διευκόλυνση ιοντισμού και ένταξης ενός αμιδικού ατόμου αζώτου[1].
- f) Υπάρχουν σχεδόν αναρίθμητες δομικές παραλλαγές για το σχηματισμό συμπλόκου με πολυιστιδινικά πεπτίδια. Μεταξύ αυτών, τα πεπτίδια που περιέχουν καλά διαχωρισμένα κατάλοιπα ιστιδίνης είναι τα συνηθέστερα και καλύτερα μελετημένα [57]-[59]. Σε ελαφρώς όξινες συνθήκες μακροχηλικές ενώσεις τύπου ένταξης 2–4 Ν που σχηματίζονται με αποκλειστικά συμμετοχή των ιμιδαζολικών ατόμων Ν3 είναι τα κύρια είδη. Ο σχηματισμός των παραπάνω οδηγεί σε ελαφρά καταστολή αλλά δεν αποκλείει την αποπρωτονίωση του πρώτου αμιδικού δότη από το χαλκό(II) η οποία λαμβάνει χώρα στην περιοχή pH 6-7, ενώ για τους υπόλοιπους παρατηρείται συνεργατικότητα. Όλα τα κατάλοιπα ιστιδίνης αποτελούν ανεξάρτητες θέσεις ένταξης μεταλλικών ιόντων και τα πεπτίδια μπορούν να δεσμεύσουν τόσα ιόντα χαλκού(ΙΙ) όσος και ο αριθμός των καταλοίπων ιστιδίνης. Ο τρόπος δέσμευσης για τα (2N⁻,Nim) ενταγμένα δι- ή πολυπυρηνικά σύμπλοκα 3Ν φαίνεται στο Σχήμα 11f. Τα επόμενα είδη 4Ν σχηματίζονται σε pH 7–9 με την συμμετοχή ενός ακόμα αμιδικού τύπου δότη (3N⁻,N_{im}). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των υπό συζήτση συμπλόκων είναι η ύπαρξη μεγάλου αριθμού ισομερών ένταξης (για τα μονοπυρηνικά είδη), ανάλογα με το είδος των στερικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που προκαλούνται από τις πλευρικές αλυσίδες που δεν περιέχουν εντάξιμα άτομα [1].
- g) Το άτομο N3 του ιμιδαζολικού δακτυλίου των καταλοίπων ιστιδίνης αποτελεί την κύρια θέση σύνδεσης των μετάλλων στα προηγούμενα σύμπλοκα, επειδή το συγκεκριμένο μπορεί να σχηματίσει χηλικό δακτύλιο είτε με την Ν-τελική αμινομάδα είτε με το αμιδικό (πεπτιδικό άτομο αζώτου). Ο ιμιδαζολικός δακτύλιος ωστόσο, μπορεί επίσης να δράσει και και γεφυρωτικά. Τα πεπτίδια με Ν-τελικό ιστιδινικό κατάλοιπο παρέχουν τα απλούστερα παραδείγματα για το σχηματισμό διπυρηνικών συμπλόκων τύπου [Cu₂H₋₂L₂], στα οποία και τα δύο μεταλλικά ιόντα εντάσσονται τριδοντικά από τα διπεπτίδια, και η τέταρτη θέση ένταξης του κάθε μεταλλικού ιόντος καταλαμβάνεται από άτομο δότη Ν-ιμιδαζολίου του άλλου διπεπτιδίου (βλέπε Σχήμα 11g). Ο σχηματισμός συμπλόκων τύπου, όπου η χαρακτηριστική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας του Ν-τελικού αμινοξέος είναι ο υποκαταστάτης γεφύρωσης, προτάθηκε ότι εμφανίζεται και στα αντίστοιχα σύμπλοκα των πεπτιδίων λυσίνης και τυροσίνης [4]. Και τα δύο άτομα αζώτου του ιμιδαζολίου επαιδια σύμαλοκα των πεπτιδίου στο σχηρατισμός δαι του μιδαζολίου του άλου διτομα αζώτου του μιδαζολίου του μεταλικού του του μειδας είναι συ πεπτιδία σύμπλοκα των πεπτιδίων αυρικής αλυσίδη του και τα δύο ατομα αζώτου του μιδαζολίου εμπλέκονται στη σύμπου του μιδαζολίου του τα δι τομανίζεται και στα αντίστοι του μιδαζολίου εμπλέκονται στη και τυροσίνης [4].

δέσμευση μετάλλου στα γεφυρωμένα μέσω ιμιδαζολικού δακτυλίου πολυπυρηνικά σύμπλοκα (σχήμα 10κ) [1].



Σχήμα 11: Κύριοι τρόποι ένταξης πεπτιδίων που περιέχουν ιστιδίνη (οι ελεύθερες θέσεις ένταξης καταλαμβάνονται από μόρια νερού [1].

<u>Κεφάλαιο 3</u>

3.1. Ενώσεις του Cu(II) με μοντέλα τύπου Xxx-Zzz-His, Xxx-His και τα παραγωγά τους

Πεπτίδια και πρωτεΐνες με Ν-τελικές αλληλουχίες αμινοξέων όπως Xxx-His (XH) και Xxx-Zzz-His (XZH) συνδέονται με το ιον Cu(II) πολύ αποτελεσματικά. Η προσθήκη των XH ή XZH με χημικές ή ανασυνδυαστικές προσεγγίσεις σε οποιοδήποτε πεπτίδιο η είναι ένας απλός τρόπος για να περιλάβουμε σε αυτά μια θέση δέσμευσης Cu(II) υψηλής συγγένειας.

Οι δυο αλληλουχίες, H₂N-Xxx-His (XH) και H₂N-Xxx-Zzz-His (XZH), περιέχουν ελέυθερο N-τελικό άκρο και ένα κατάλοιπο His στη δεύτερη ή τρίτη θέση σε σχέση με την ελεύθερη N-τελική αμινομάδα. Ο Cu(II) μπορεί να συνδεθεί με την XH με τριδοντικό τρόπο, με τα τρία άζωτα που εμπλέκονται να είναι της N-τελικής αμινομάδας (NH₂), το πρώτο αμιδικό άτομο αζώτου (N⁻) και το άζωτο N3 του ιμιδαζολίου (Σχήμα 12, αριστερά). Η τέταρτη ισημερινή θέση ένταξης καταλαμβάνεται από ένα εξωτερικό μόριο όπως νερό, ρυθμιστικό ιόν κ.λπ. Στην περίπτωση του μοντέλου XZH, ο Cu(II) δεσμεύεται με τέσσερα άζωτα: της N-τελικής αμινομάδας, τα δύο πρώτα αμιδικά και το N3 του ιμιδαζολίου (Σχήμα 12, δεξιά). Αυτοί οι τρόποι ένταξης συμβολίζονται ως 3N (NH₂, N⁻, N_{Im}) και 4N (NH₂, 2xN⁻, N_{Im}), αντίστοιχα. Οι δομές τους είναι γνωστές από μελέτες ακτίνων X και από την ανάλυση των φασματοσκοπικών δεδομένων τους (Πίνακας 4) [60].



Σχήμα 12: Γραφική αναπαράσταση του τρόπου ένταξης των δύο μοντέλων, Χxx-His (αριστερά) και Xxx-Zzz-His (δεξιά) με το ιον Cu(II). Το L απεικονίζει έναν εξωτερικό υποκαταστάτη [60]

Πίνακας 4: Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων Cu(II)-XH και Cu(II)-XZH [60]						
Motif	Absorption d-d transition [nm]	CD d-d transition [nm]	Charge transfer [nm]	EPR g∥	g ⊥	A_{\parallel} (MHz) [cm ⁻¹]
хн хzн	≈600 ≈520	pprox 590 (+) pprox 490 (-) ^[a] pprox 480 (+) pprox 560 (-)	\approx 300 \approx 330 \approx 310	≈2.22 ≈2.19	\approx 2.05 \approx 2.04	\approx 560 [1.8 × 10 ⁻²] \approx 600 [2.0 × 10 ⁻²]
[a] weak band, not always discernible.						

3.2. Συμπλόκα χαλκού με πεπτίδια τύπου ΧΗ και ΧΖΗ

3.2.1. Η ταυτότητα του αμινοξέος

Το ιόν Cu(II) παρουσιάζει υψηλή συγγένεια ως προς δότες αζώτου και είναι ένα από τα λίγα μεταλλικά ιόντα που είναι ικανά να αποπρωτονιώνουν και να εντάξουν το άζωτο του πεπτιδικού δεσμού [5],[61]-[63]. Επιπλέον, η δέσμευση με το N^δ (N3) της πλευρικής αλυσίδας της ιστιδίνης δημιουργεί έναν σταθερό 6-μελή χηλικό δακτύλιο με το προηγούμενο αμιδικό άζωτο. Τέτοιοι δακτύλιοι επιτυγχάνονται επίσης μέσω των β και γ- καρβοξυλομάδων των καταλοίπων Asp και Cys. Τα άτομα Ο του Asp ως σκληρή βάση, δεσμεύει τον Cu(II) ασθενέστερα. Άλλα αμινοξέα (Glu, Met, κ.λπ.) σχηματίζουν μεγαλύτερους δακτυλίους, λιγότερο σταθερούς. Επομένως, όσον αφορά την αλληλεπίδραση με το ιον Cu(II), το κατάλοιπο της ιστιδίνης παρέχει την ισχυρότερη δέσμευση και το πιο σταθερό σύμπλοκο [60].

3.2.2. Επίδραση της θέσης της ιστιδίνης στη δέσμευση του μετάλλου

Με το κατάλοιπο της ιστιδίνης σε θέση 4 και πέρα, το πλεονέκτημα που δίνει ο σχηματισμός διαδοχικών 5 ή 6-μελών χηλικών δακτυλίων δεν μπορεί να επιτευχθεί. Έτσι, η δέσμευση του Cu(II) γίνεται πολύ πιο ασθενής [5]. Η ιστιδίνη στη θέση 1 παρέχει ένα σταθερό διδοντικό υποκαταστάτη (Ν-τελική αμινομάδα και το N3 της ιστιδίνης). Η σφαίρα ένταξης μπορεί να συμπληρωθεί από ένα άλλο μόριο πεπτιδίου που έχει την ιστιδίνη στη θέση 1, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός 1:2 συμπλόκου 4N (2xNH₂, 2xN_{Im}), στο οποίο ο χαλκός(II) εντάσσεται αποτελεσματικά υπό συνθήκες περίσσειας πεπτιδίου. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις και αναλογίες περίπου 1:1, τα XH και XZH μοντέλα δεσμεύουν το Cu(II) πολύ πιο ισχυρά [60].

3.2.3. Το ιόν του Cu(II)

Για να σχηματιστούν τα σύμπλοκα Cu-XH και Cu-XZH, πρέπει να αποπρωτονιωθούν ένα και δύο αμιδικά άτομα αζώτου, αντίστοιχα. Έτσι, απαιτείται

ένα ισχυρό οξύ κατά Lewis (μεταλλικό ιόν), που ευνοεί τον σχηματισμό τριών ή τεσσάρων δεσμών σε ισημερινό επίπεδο (η τελευταία συνθήκη πηγάζει από τις δομικά χαρακτηριστικά των πεπτιδίων που αποτελούνται από α-αμινοξέα). Αυτές οι απαιτήσεις ικανοποιούνται από τον Cu(II) και κάπως λιγότερο (σε υψηλότερο pH) από ιόντα Ni(II). Τα ιόντα Pd(II), Au(III) και Co(II) δεσμεύουν επίσης αμινοτελικά μοντέλα ένταξης χαλκού και νικελίου (ATCUN), αν και για τα ιόντα Pd(II) και Au(III) η κινητική είναι αργή και τα μέταλλα αυτά είναι λιγότερο σημαντικά βιοχημικά. Το Co(II) απαιτεί υψηλό pH για να έχει αποτελεσματική δέσμευση, ενώ ο Zn(II) φαίνεται να μην μπορεί να υποστηρίξει τον τύπο ένταξης 4N (τουλάχιστον όχι σε τιμές pH μικρότερες του 9), λόγω της χαμηλότερής του οξύτητας κατά Lewis και την προτίμησή του για τετραεδρική γεωμετρία. Αναφέρεται ότι ο Zn(II) παρουσία του XH μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκα 3N σε υψηλές τιμές pH [5],[53],[60],[64].

3.3. Σχετικές συγγένειες των δύο μοντέλων και η εξάρτησή τους από το pH

3.3.1. Σύγκριση των ΧΖΗ και ΧΗ

Τα σύμπλοκα Cu(XH) 3N αναζητούν έναν εξωτερικό υποκαταστάτη για να συμπληρωθεί η ισημερινή σφαίρα ένταξης, ενώ τα σύμπλοκα Cu(XZH) 4N την έχουν ήδη συμπληρωμένη (Σχήμα 12). Αυτό προκαλεί αύξηση της συγγένειας στο Cu(XZH) λόγω του εντροπικού χηλικού φαινομένου, που προκαλείται από τον πρόσθετο δότη

Πίνακας 5: Σταθερές συγγένειας για σύμπλοκα Cu(II) των μοντέλων XH και XZH, που λήφθηκαν με επανυπολογισμό των αρχικών ποτενσιομετρικών δεδομένων της μεθόδου Cl ή με θερμιδομετρική[a] ή φασματοσκοπική[b] τιτλοδότηση. [60]				
Peptide/protein	Cu ^{II} binding	log		
	sequence	^к 7,4		
хн				
GH COO-	CH.	11.3		
an-coo	On I	12.3		
RHA-COO	RH	12.6		
α-factor model	WH	12.8		
GHK-COO	GH	12.7		
dinecoo	GIT	13.2 ^[A]		
XZH				
HSA	DAH	12.0 ^(b)		
GGH-COO	GGH	12.4		
des-angiotensinogen N-term	VIH	13.0		
Αβ ₄₋₁₆	RFH	13.5		
DAHK-amide	DAH	13.8		
YYH-COO	YYH	14.4		
HP2 N-term	RTH	14.5		
Endostatin N-term	HSH	14.5		
Hepcidin N-term	DTH	14.7		
[a] This apparent discrepancy may be due to different background salts used, KNO_3 and CI^- the latter being a possible auxiliary Cu^{II} ligand.				

αμιδίου. Ωστόσο, η αύξηση της εντροπίας από τη χηλική επίδραση μιας πρόσθετης θέσης ένταξης αντισταθμίζεται από το ενθαλπικό κόστος της αποπρωτονίωσης του αμιδίου σε pH 7,4. Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει μερικές από τις σταθερές σταθερότητας σε pH 7,4 (^cK_{7.4}) και για τα δύο μοντέλα [65],[66]. Παρά την μερική επικάλυψη των τιμών αναδεικνυεται πως τα Cu(XZH) σύμπλοκα είναι συνήθως περίπου μία τάξη μεγέθους πιο σταθερά από τα σύμπλοκα Cu(XH) σε φυσιολογική τιμή pH [60].

3.3.2. Εξάρτηση από το pH

Οι συγγένειες δέσμευσης του μετάλλου για τα μοντέλα ΧΖΗ και ΧΗ είναι εξαρτώμενες από το pH. Η αύξηση της τιμής pH αυξάνει τη συγγένεια, γιατί για να δεσμευτεί αποτελεσματικά, το μεταλλικό ιόν πρέπει να αντικαταστήσει τα άτομα υδρογόνου (αμιδικά) του πεπτιδίου. Παρουσία Cu(II), αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε σχετικά χαμηλή τιμή pH (περίπου 3-4) για το μοντέλο XH και σε ελαφρώς υψηλότερη για το XZH, λόγω του μεγαλύτερου αριθμού των εμπλεκόμενων αμιδίων. Αυτό σημαίνει ότι για τιμές pH μικρότερες από μια καθορισμένη τιμή για κάθε σύστημα, τα σύμπλοκα 3N Cu(XH) είναι πιο σταθερά από τα 4N Cu(XZH). Η διαδικασία ένταξης είναι συνεργατική. Τα ενδιάμεσα σύμπλοκα που περιλαμβάνουν μικρότερο από το μέγιστο αριθμό δοτών αζώτου ουσιαστικά απουσιάζουν για το μοντέλο XH και σπάνια ανιχνεύονται για το XZH [60],[67].

3.3.3. Επίδραση των αμινοξέων Χχχ/Ζzz στη δέσμευση του Cu(II)

Οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων που περιβάλλουν τα κατάλοιπα His στα μοντέλα XH και XZH έχουν αντίκτυπο στην συγγένεια του Cu(II) με αυτά, αν και δεν συμμετέχουν άμεσα στην ένταξη [4],[5],[51],[63]. Για το μοντέλο ΧΗ, κατάλοιπα με κατάλληλους δότες που βρίσκονται πιο μακριά από το Ν-τελικό άκρο ή εξωτερικοί υποκαταστάτες μπορούν να δεσμεύονται στην κενή τέταρτη θέση ένταξης. Οι σχετικές μελέτες υπέδειξαν ότι τα αμινοξέα στις θέσεις 1 και 2 έχουν σημαντική επίδραση στην ένταξη του Cu(II) με το μοντέλο ΧΖΗ [68]. Η σύγκριση της θερμοδυναμικής σταθερότητας των 4Ν συμπλόκων Cu(II)-πεπτιδίων XZH (X=Z=Asn, Phe, Arg, Lys, Val, Asp, Glu, Tyr, Thr) [54],[69] αποκάλυψε ότι το pKa της N-τελικής αμινομάδας στα ελεύθερα (μη συμπλοκοποιημένα) πεπτίδια αποτελεί τον πιο καθοριστικό παράγοντα. Οι τιμές pKa ποικίλουν από 6,83 (Asn) έως 8,18 (Asp). Η υψηλότερη τιμή pK_a για το Asp αποδόθηκε στην σταθεροποίηση της πρωτονιωμένης αμινομάδας λόγω σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με την β-καρβοξυλική πλευρική αλυσίδα (σχηματισμός 6μελούς δακτυλίου) (Σχήμα 13Α). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ένταξη του Cu(II) περιλαμβάνει την αποπρωτονίωση αυτής της αμίνης, η συγγένεια του Cu(II) θα μειωθεί επειδή ο Cu(II) πρέπει να ανταγωνιστεί το σταθεροποιημένο πρωτόνιο της αμίνης. Αντίθετα, η Asn θα μπορούσε να σταθεροποιήσει την αποπρωτονιωμένη μορφή της ίδιας ομάδας, σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου, μέσω του αμιδίου της πλευρικής της αλυσίδας, ενισχύοντας έτσι τη δέσμευση του Cu(II) (Σχήμα 13B). Επίσης παρατηρήθηκε ότι και οι τιμές pKa του για το N3 του ιστιδινικού δακτυλίου της His μεταβάλλονται (εύρος τιμών 5,19-6,64). Παρόλα αυτά δεν προέκυψε συσχέτιση με τη θερμοδυναμική σταθερότητα των συμπλόκων.



Σχήμα 13: Α: Το Asp σταθεροποιεί την πρωτονιωμένη μορφή της Ν-τελικής αμινομάδας σχηματίζοντας έναν δεσμό υδρογόνου με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός 6μελούς δακτυλίου. Β: Η Asn σταθεροποιεί την αποπρωτονιωμένη μορφή της Ν-τελικής αμινομάδας μέσω ενός δεσμού υδρογόνου, με σχηματισμό 6μελούς δακτυλίου. C: Η Arg θα μπορούσε να μειώσει το pKa του αμίδιου μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με το οξυγόνο του αμιδικού δεσμού. Αυτό θα πρέπει να διευκολύνει την αποπρωτονίωση και ως εκ τούτου την ένταξη του Cu(II). D: Το Asp θα μπορούσε να σταθεροποιήσει την πρωτονιωμένη μορφή του αμιδίου σχηματίζοντας έναν δεσμό υδρογόνου, με σχηματισμό 6μελούς δακτυλίου. C: Η Arg θα μπορούσε να μειώσει το pKa του αμίδιου μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με το οξυγόνο του αμιδικού δεσμού. Αυτό θα πρέπει να διευκολύνει την αποπρωτονίωση και ως εκ τούτου την ένταξη του Cu(II). D: Το Asp θα μπορούσε να σταθεροποιήσει την πρωτονιωμένη μορφή του αμιδίου σχηματίζοντας έναν δεσμό υδρογόνου. Αυτό θα πρέπει να μειώσει τη συγγένεια του Cu(II), επειδή η σύνδεση του Cu(II) απαιτεί την αποπρωτονίωση αυτού του αμιδίου. [60]

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι τιμές pKa για την αποπρωτονίωση και ένταξη των πεπτιδικών ατόμων αζώτου (επηρεαζόμενες από τις ανίστοιχες τιμές για την Ντελική αμινομάδα) έχουν σημαντική επίδραση στην δεσμευτική ικανότητα (έναντι του Cu(II)) των πεπτιδίων. Ωστόσο αυτές στα ελεύθερα πεπτίδια είναι αδύνατον να μετρηθούν με τιτλοδότηση σε υδατικά διαλήυματα (pKa>15) [70]. Παράπλευρες αλυσίδες θετικά φορτισμένες και/ή δότες δεσμού υδρογόνου θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με το αμιδικό οξυγόνο του καρβονυλίου, και επομένως να μειώσουν το pKa της πεπτιδικής ομάδας (Σχήμα 13C). Έτσι, πλευρικές αλυσίδες όπως αυτές των Lys και Arg στις θέσεις 1 και 2 θα πρέπει αυξάνουν τη συγγένεια του Cu(II). Αντίθετα, πλευρικές αλυσίδες αρνητικά φορτισμένες και δέκτες δεσμών υδρογόνου θα μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν (μέσω δεσμού υδρογόνου) με το Η-Ν του αμιδικού δεσμού, αυξάνοντας το pKa του (Σχήμα 13D), και κατά συνέπεια να μειώσουν τη συγγένειά του για το ιόν Cu(II). Για παράδειγμα, το Asp είναι πιο αποτελεσματικό από το Glu από αυτή την άποψη, καθώς στην πρώτη περίπτωση ο δεσμός υδρογόνου οδηγεί στο σχηματισμό ενός 7-μελούς έναντι ενός 9-μελούς δακτυλίου στη δεύτερη. Επιπλέον, η παρουσία υδρόφοβων αμινοξέων και οι d-π αλληλεπιδράσεις παρουσία αρωματικών (p.x Tyr, Phe) αυξάνουν περαιτέρω την θερμοδυναμική σταθερότητα των 4Ν συμπλόκων Cu(II) με τις υπό μελέτη αλληλουχίες [4].

Λαμβάνοντας υπόψην όλες τις παραπάνω διαπιστώσεις, και ανακαλώντας τα δεδομένα του Πίνακα 6, καθίσταται σαφές πως ουσιαστικά το ίδιο μοντέλο ΧΖΗ

παράγει σύμπλοκα Cu(II) τα οποία παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος θερμοδυναμικής σταθερότητας. Η συγγένεια του Cu(II) για την αλληλουχία -DAH- στην πρωτεϊνη HSA είναι από τις μικρότερες. Όταν όμως η ίδια εντοπίζεται σε ένα τρι- ή τετραπεπτίδιο η θερμοδυναμική σταθερότητα αυξάνεται 100 φορές. Το παρόμοιο σύμπλοκο Cu(DTH) που σχηματίζεται από το N-τελικό εξαπεπτίδιο του hepcidin είναι το πιο σταθερό που είναι γνωστό μέχρι τώρα [60] [71].

3.3.4. Μέγεθος δακτυλίου χηλικής ένωσης

Η επίδραση του μεγέθους των τριων συγχωνευμένων (fused) χηλικών δακτυλίων που σχηματίζονται σε 4Ν σύμπλοκα χαλκού(ΙΙ) με την αλληλουχία –ΧΖΗστην θερμοδυναμική σταθερότητα, μελετήθηκε επίσης συστηματικά, εισάγοντας την β-Ala σε διαφορετικές θέσεις [72],[73]. Ο παραπάνω τύπος ένταξης οδηγεί στο σχηματισμό δυο πενταμελών και ενός εξαμελούς δακτυλίου (5,5,6) όπως φαίνεται στη δεξιά πλευρά του Σχήματος 12. Οι σχετικές συγκρίσεις κατέταξαν τη φυσική μορφή (χωρίς β-Αλα) ως πιο σταθερή. Η γενική σειρά θερμοδυναμικής σταθερότητας βάσει των μεγεθών των χηλικών δακτυλίων ήταν: 5,5,6>6,5,6 (β-Ala στη θέση 1)>5,6,6 (β-Αλα στη θέση 2)>6,6,6 (β-Αλα και στις δύο θέσεις) [4].

3.3.5. Κινητική σταθερότητα

Σε αντίθεση με τη θερμοδυναμική σταθερότητα, οι πληροφορίες σχετικά με την κινητική ευκινησία/αδράνεια των συμπλόκων XH και XZH είναι λιγότερες. Πρόσφατα, μετρήθηκε η διάρκεια ζωής στο πλάσμα αίματος συμπλόκων Cu(II) των τριπεπτιδίων XZH που αναφέρθηκαν παραπάνω (X=Z=Asn, Phe, Arg, Lys, Val, Asp, Glu, Tyr, Thr) [54][69]. Βρέθηκε ότι η ταχύτητα ανταλλαγής του Cu(II) εξαρτάται κυρίως από τον όγκο και την υδροφοβικότητα της πλευρικής αλυσίδας, με το YYH να παρουσιάζει τη μικρότερη (κινητικά πιο αδρανές), ακολουθούμενο από το VVH [60].

3.4. Οξειδοαναγωγική χημεία

3.4.1. Ηλεκτροχημική ανάλυση

Τα σύμπλοκα Cu^{II}-XH και Cu^{II}-XZH εμφανίζουν πολύ διαφορετικές ηλεκτροχημικές ιδιότητες στην κυκλική βολταμετρία (CV), που αντικατοπτρίζει τη διαφορετική θέση ένταξης του Cu(II) στα δύο είδη πεπτιδίων. Το Cu^{II}-XZH μπορεί να οξειδώνεται σε Cu(III) με ανοδικό δυναμικό που κυμαίνεται από 0,87– 1,07 V έναντι του NHE (normal hydrogen electron) ανάλογα με τη φύση των X και Z. Το αντιστεπτό της οξείδωσης εξαρτάται επίσης από τη φύση των X και Z και από τα υπόλοιπα αμινοξικά κατάλοιπα που ακολουθούν την ιστιδίνη [74]-[79]. Το Cu-XZH δεν μπορεί να αναχθεί ηλεκτροχημικά σε ~1,0 V έναντι του NHE [74]. Αντίθετα, τα σύμπλοκα Cu^{II}-XH δεν μπορούν να οξειδωθούν μέχρι 1,2 V έναντι του NHE, αλλά μπορούν να αναχθούν σε ένα καθοδικό δυναμικό περίπου ~0,2 V έναντι του NHE [74],[80]. Η αναγωγή είναι ηλεκτροχημικά μη αναστρέψιμη οδηγώντας σε δύο ανοδικές κορυφές στην αντίστροφη σάρωση περίπου στο 0,1 και 0,3 V έναντι του NHE, που αντιστοιχεί



Σχήμα 14: Σχηματική απεικόνιση των ηλεκτροχημικών (μπλε βέλος) και χημικών (κίτρινο βέλος) οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των Cu-XZH και Cu-XH. [60]

σε οξείδωση μη ενταγμένου Cu(I) και του Cu(I) που είναι δεσμευμένος σε δύο κατάλοιπα His, αντίστοιχα. Παρουσία περισσότερων από ένα καταλοίπων His ή μιας εξωγενούς πηγής ιμιδαζολίου, η πρώτη καθοδική κορυφή δεν παρατηρείται. Οι ηλεκτροχημικές ιδιότητες και των δύο συστημάτων συνοψίζονται στο Σχήμα 14 [60].

3.4.2. Χημική οξειδοαναγωγική δραστικότητα

Οι περισσότερες από τις μη ηλεκτροχημικές μελέτες οξειδοαναγωγικής δραστικότητας για τα σύμπλοκα Cu^{II}-XH και Cu^{II}-XZH αφορούν αντιδράσεις με ασκορβικό και/ή O₂ ή H₂O₂ ως υποστρώματα. Ο στόχος αυτών των διερευνήσεων μελέτες ήταν η διαπίστωση της ικανότητας ή μη των παραπάνω ζευγών να επάγουν την οξειδωτική διάσπαση του DNA ή άλλων βιομορίων. Βρέθηκε πως το οξειδοαναγωγικό ζεύγος Cu(II)/Cu(III) μπορεί να είναι προσβάσιμο από τα σύμπλοκα Cu^{II}-XZH, το Cu(I)/Cu(II) όμως όχι. Για τα σύμπλοκα Cu^{II}-XH ισχύει ακριβώς το αντίθετο [60].

3.5. Εμφάνιση και πιθανοί ρόλοι στη βιολογία

3.5.1. <u>Cu-XZH</u>

Ένα πλήθος πρωτεϊνών και πεπτιδίων διαθέτουν ως Ν-τελικό άκρο την αλληλουχία XZH-. Σε αυτό περιλαμβάνονται οι αλβουμίνες ορού των ανθρώπων και των περισσότερων θηλαστικών, ιστατίνες του σάλιου, Ctr1, νευροκινίνη Β [81], hepcidin [82],[83], προταμίνη 2 του ανθρώπινου σπέρματος και πολλών άλλων θηλαστικών και άλλα. Ωστόσο, στους ανθρώπους μόνο η αλβουμίνη ορού (HSA) δεσμεύει τον Cu(II) υπό φυσιολογικές συνθήκες. Για τις άλλες πρωτεΐνες και τα πεπτίδια, υπάρχουν ως επί το πλείστων στοιχεία για έμμεση in vivo δέσμευση του ιόντος Cu(II). Η HSA είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη στο αίμα, η συγκέντρωση της οποίας είναι περίπου 0,6 mM (40 mg mL⁻¹). Μόνο ένα μικρό κλάσμα, περίπου 0,5-1%, δεσμεύεται με τον Cu(II). Η δέσμεσυση του Cu(II) από άλλα πεπτίδια *in vivo* δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως. Μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση θα πρέπει να λάβουν υπόψην:

- Την συγγένεια δέσμευσης του Cu(II) (όπως υποδεικνύεται από τις σχετικές σταθερές σχηματισμού) και την συγκέντρωση του πεπτιδίου: όσο υψηλότερες, τόσο καλύτερα. Κατά την παρουσία του πεπτίδιου στο αίμα, υφίσταται ανταγωνισμός δέσμευσης του Cu(II) με το υψηλής αφθονίας HSA (που περιέχει το μοτίβο DAH).
- II. Που εντοπίζεται ο Cu(II): ο ενδοκυτταρικός Cu βρίσκεται κυρίως στην ανηγμένη Cu(I) κατάσταση, επομένως η δέσμευση Cu(II) είναι πιο πιθανό να λάβει χώρα εξωκυτταρικά όπου επικρατούν περισσότερο οξειδωτικές συνθήκες. Ως αποτέλεσμα, για την ενδοκυτταρική σύνδεση του Cu(II) η κινητική αδράνεια του συμπλόκου είναι πιο σημαντικός παράγοντας από την θερμοδυναμική σταθερότητα.
- III. Διαθεσιμότητα του Cu(II): Είναι επίσης πιθανό τα μοντέλα XH ή XZH να μη δεσμεύουν τον Cu(II) υπό κανονικές συνθήκες, αλλά μόνο ότα η συγκεντρωσή του αυξάνεται, όπως στην περίπτωση της δηλητηρίασης με Cu, της διαταραχής της ομεόστασης του στοιχείου κ.λπ.[60].

3.5.2. <u>Cu-XH</u>

Όπως και για το XZH, το XH εμφανίζεται σε ένα πλήθος πρωτεϊνών/πεπτιδίων, για παράδειγμα στην ανοσοκατασταλτική πρωτεΐνη του τσιμπουριού. Το πότε ή εάν δεσμεύουν το Cu(II) *in vivo* δεν είναι σίγουρο. Το πιο εξέχον πεπτίδιο αυτής της κατηγορίας είναι το GHK, που υπάρχει στο πλάσμα του αίματος σε υπομικρομοριακές συγκεντρώσεις. Ένδειξη ότι το GHK δεσμεύει το Cu in vivo προέρχεται από αναφορές ότι το GHK απομονώνεται τουλάχιστον εν μέρει ως σύμπλοκο Cu(II) και ότι ο Cu(II) απαιτείται για τη βιολογική του δραστικότητα. Ομοίως, ο α-παράγοντας, ο οποίος έχει μία N-τελική WHW αλληλουχία, συν-απομονώθηκε από κυτταροκαλλιέργεια ως σύμπλοκο Cu(II), και η συγγένεια του με τον Cu(II) υποδεικνύει ότι τα σύμπλοκα Cu(II) μπορεί να είναι η πραγματική βιολογική του μορφή[60].

<u>Κεφάλαιο 4</u>

4. Εφαρμογές

Τα μοντέλα ΧΖΗ και ΧΗ έχουν χρησιμοποιηθεί σε μια τεράστια ποικιλία εφαρμογών. Παρακάτω, εστιάζουμε κυρίως στις βιολογικές και φαρμακευτικές εφαρμογές τους, που είναι και οι πιο άφθονες.

4.1. Καταλυτική δραστικότητα: διάσπαση βιομορίων όπως DNA, RNA, πρωτεΐνες και σάκχαρα

Μελέτες για την καταλυτική δραστικότητα των συμπλόκων των ΧΖΗ και ΧΗ έχουν εμπνευστεί σε μεγάλο βαθμό από τη βιολογία. Η αρχική έρευνα επικεντρώθηκε σε πιθανούς μηχανισμούς τοξικότητας μετάλλων, με ιδιαίτερη έμφαση στην καταλυόμενη από οξειδοαναγωγικά ενεργά μεταλλικά ιόντα οξειδωτική καταστροφή του DNA [84]. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μπορούσαν να αξιοποιηθούν τώρα για τη δημιουργία τεχνητών νουκλεασών. Ακόμα πιο πρόσφτα υπήρχαν προσπάθειες ανάπτυξης νέων μεταλλικών αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) και τεχνητών πρωτεασών [60].

4.1.1. Διάσπαση DNA και RNA από σύμπλοκα ATCUN

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν σχετικά με την αντικαρκινική δραστικότητα του συμπλόκου Cu^{II}-GGH έναντι των κυττάρων του καρκινώματος Ehrlich αύξησαν το ενδιαφέρον για τα πεπτίδια τύπου ATCUN ως παράγοντες διάσπασης του DNA με θεραπευτική ικανότητα [85]. Έκτοτε, αρκετές ομάδες εργάζονται για την καλύτερη κατανόηση της νουκλεολυτικής δραστικότητας συμπλόκων Cu^{II}-XZH, η οποία συχνά συνοδεύεται από παράλληλες μελέτες για τα αντίστοιχα σύμπλοκα του Ni(II) [86]. Γενικά, τα μεταλλικά σύμπλοκα με ολιγοπεπτίδια είναι υποψήφια για μεταλλοφάρμακα επειδή είναι εύκολο να συντεθούν σε υψηλές ποσότητες, ενώ αλλάζοντας την αμινοξική αλληλουχία του μοντέλου ATCUN μπορεί να επιτευχθεί εκλεκτικότητα ως προς συγκεκριμένες περιοχές του DNA.

Για παράδειγμα η ενσωμάτωση μιας ATCUN αλληλουχίας σε ένα κυκλικό πεπτίδιο που δημιουργήθηκε με τη σύζευξη των πλευρικών αλυσίδων της Lys και του Asp παρουσίασε πιο αποτελεσματική διάσπαση του DNA από το γραμμικό αντίστοιχο. Αν και η εκλεκτικότητα αναγνώρισης συγκεκριμένων τμημάτων DNA δεν καθορίζεται απ' την ATCUN αλληλουχία του συζυγούς, εντούτοις είναι απαραίτητη για τη δραστικότητα νουκλεάσης. Προτάθηκε ότι το ενταγμένο μεταλλικό ιόν είναι ένα οξειδοαναγωγικό κέντρο ικανό να σχηματίσει ρίζες υδροξυλίου συνδεδεμένες με μέταλλο που δρουν ως δραστικά ενδιάμεσα, προκαλώντας την απόσπαση του

ατόμου Η από το C4 της 2- δεοξυριβόζης, η οποία με την σειρά της οδηγεί σε διάσπαση του κλώνου του DNA.

Αν και ιστορικά το σύμπλοκο Ni(GGH) ήταν το πρώτο που μελετήθηκε ως πιθανή νουκλεάση, οι πιο πρόσφατες μελέτες επικεντρώθηκαν στα σύμπλοκα Cu(II). Προτάθηκε ότι η οξειδοαναγωγική δραστικότητα του συμπλοκοποιημένου με την αλληλουχία XZH ζεύγους Cu(II)/Cu(III) υπό φυσιολογικές συνθήκες θα μπορούσε να οδηγήσει στον σχηματισμό δραστικών είδών οξυγόνου (ROS) που με τη σειρά τους συνεισφέρουν στην τοποεκλεκτική διάσπαση του DNA. Για να λάβει χώρα η συγκεκριμένη αντίδραση για την οποία προτάθηκε μηχανισμός τύπου Fenton απαιτεί ασκορβικό εκτός από μοριακό οξυγόνο. Η αντικατάσταση αμινοξέων, συμπεριλαμβανομένης και της χρήσης D-αμινοξέων στις θέσεις X και Z της αλληλουχίας βελτίωσε τη δέσμευση και αναγνώριση της ελάσσονος αύλακας του DNA (συνήθως εντός A/T πλούσιων περιοχών), και τελικά τη δραστικότητα τύπου νουκλεάσης. Τα σύμπλοκα Cu^{II}-XZH παρουσία των παραπάνω παραγόντων προήγαγαν όχι μόνο τη μονόκλωνη, αλλά και δίκλωνη διάσπαση του DNA [60].

Η διάσπαση του RNA μελετήθηκε κυρίως όσον αφορά το γενετικό υλικό των HIV, ιού της ηπατίτιδας C (HCV) και tRNA-Phe ζυμομύκητα. Σύμπλοκα Cu^{II}(GGH) και Cu^{II}(KGHK) συζευγμένα με κατάλληλα πεπτίδια των οποίων η ικανότητα αναγνώρισης περιοχών του γενετικού υλικού των ιών μελετήθηκε ξεχωριστά, μείωσαν σημαντικά την ταχύτητα πολλαπλασιασμού τους. Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, οι περισσότερες νουκλεάσες των παραπάνω τύπων λειτουργούν κυρίως *in vitro*. Η μεγάλη θερμοδυναμική σταθερότητα των συμπλόκων οδηγεί σε μειωμένη οξειδοαναγωγική δραστικότητα. Επιπρόθετα η παρουσία αναγωγικών παραγόντων (γλουταθειόνη), και άλλων βιολογικών υποκαταστατών του χαλκού(II) θα μπορούσαν δυνητικά να «απενεργοποιήσουν» τη μεταλλοπεπτιδική νουκλεάση προκαλώντας την αναγωγή ή/και την απομάκρυνσή του μετάλλου από το σύμπλοκο XZH. Επομένως, ο σχεδιασμός τέτοιων συμπλόκων θα πρέπει επίσης να επικεντρωθεί στην βελτίωση της κινητικής τους αδράνειας ώστε να μπορούν να προσεγγίσουν την θέση διάσπασης του DNA στόχου σε μια ενεργή μορφή [60].

4.1.2. Διάσπαση πρωτεϊνών από ΑΤCUN σύμπλοκα

Η προσέγγιση που αναφέρθηκε πιο πάνω για τον σχεδιασμό νουκλεασών (εισαγωγή της αλληλουχίας XZH στο N-τελικό άκρο ενός κατάλληλου μορίουυποκαταστάτη) μελετήθηκε και για το σχεδιασμό τεχνητών πρωτεασών. Η πρώτη μελέτη αφορούσε την αδρανοποίηση του μετατρεπτικού ενζύμου της ανθρώπινης αγγειοτενσίνης (ACE) από το σύμπλοκο Cu (KGHK)⁺, με οξειδοαναγωγικό κύκλο που παρέχεται από το ασκορβικό. Η διαδικασία αυτή ήταν πολύ πιο αργή συγκριτικά με το φυσικό ένζυμο ασκορβική οξειδάση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση πως τα Cu^{II} και Co^{III}(NH3)₂ σύμπλοκα με το KGHK προκαλούν αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας του ACE ανταγωνιστικά απουσία οξειδοαναγωγικού παράγοντα (ασκορβικό). Μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νέων αντι-υπερτασικών φαρμάκων [60].

4.1.3. Διάσπαση σακχάρων από σύμπλοκα ΑΤCUN

Σε μια πρόσφατη μελέτη προτάθηκε μια νέα τεχνητή φουκοζιδάση σύμπλεγμα των Cu^{II}-GGH-tOL, (tOL= KCFRYPNGVLACT)) για την παραγωγή τεχνητού φαινοτύπου αίματος Bombay (που στερείται το αντιγόνο H2, γνωστό και ως Oh). Βρέθηκε πως το σύμπλεγμα διασπά την L-φουκόζη πιο αποτελεσματικά από τη d-γλυκόζη. Επομένως, το Cu-GGH-tOL θα μπορούσε να λειτουργήσει ως παράγοντας διάσπασης του σχετικού πολυσακχαρίτη που εντοπίζεται στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, σε έναν δισακχαρίτη, σχηματίζοντας έτσι ένα τροποποιημένο αντιγόνο H2 ανάλογο με αυτό του φαινοτύπου αίματος Bombay. Η παραπάνω διάσπαση πραγματοποιείται παρουσία ήπιου αναγωγικού παράγοντα (ασκορβικό ή υπεροξείδιο του υδρογόνου) όπως συμβαίνει υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η σημασία αυτής της έρευνας έγκειται στη σπανιότητα ενός τέτοιου φαινοτύπου αίματος και την περιορισμένη προσφορά του σε τράπεζες αίματος[87].

4.2. Συνδυασμός με αντιμικροβιακά και αντιμυκητιασικά πεπτίδια

Στην βάση δεδομένων αντιμικροβιακών πεπτιδίων (APD) υπάρχουν σχεδόν 50 αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMP) που περιέχουν τη N-τελική αλληλουχία XZH από ένα σύνολο 2813 AMPs. Καταγράφηκαν μόνο μερικά παραδείγματα (<5) AMP που περιέχουν τη N-τελική αλληλουχία δέσμευσης μετάλλου XH. Ο χαλκός είναι γνωστός για την αντιμικροβιακή του δράση. Σε μερικές περιπτώσεις παρουσία της αλληλουχίας XZH παρατηρήθηκε αύξηση στη αντιμικροβιακή δραστικότητα των AMPs με προσθήκη Cu(II). Αν και οι μηχανισμοί ενίσχυσης της δραστικότητας παρουσία χαλκού δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί, έχει προταθεί η καταλυόμενη από Cu παραγωγή ROS που οδηγεί σε διάσπαση του DNA ή σε οξειδωτική αποικοδόμηση βιομορίων, όπως τα φωσφολιπίδια [60].

4.3. XZΗ και XΗ ως χηλικοί παράγοντες απομάκρυνσης ή/και οξειδοαναγωγικής απενεργοποίησης του Cu

Έχοντας υπόψην βάση την σχετική αδράνεια των συμπλόκων Cu^{II}(XZH) έναντι οξείδωσης και αναγωγής, τα παραπάνω θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την οξειδοαναγωγική απενεργοποίηση του χαλκού. Είναι γνωστό πως σε υδατικά διαλύματα, ο Cu(II) καταλύει αποτελεσματικά την οξείδωση του ασκορβικού παράγοντας ROS όπως το H_2O_2 και HO·. Έτσι, η προσθήκη πεπτιδίων που έφεραν την αλληλουχία XZH οδήγησε σε σχεδόν πλήρη διακοπή της παραγωγή ROS. Ένα πρώτο παράδειγμα αποτελεί η παρεμπόδιση της επιβλαβούς οξειδωτικής δράσης του

ζεύγους Cu(II)/H₂O₂ από το N-τελικό άκρο της ανθρώπινης πρωταμίνης 2 (HP2). Οι πρωταμίνες είναι πεπτίδια που αντικαθιστούν τις ιστόνες στα σπερματοζωάρια. Μειωμένη παραγωγή HP2 είναι μία από τις κύριες αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας στον άνθρωπο. Παρόμοια προστασία διαπιστώθηκε και έναντι της καταλυόμενης από το σύμπλοκο Cu με το πεπτίδιο Aβ_{1-x} παραγωγής ROS. Το εν λόγω πεπτίδιο σχηματίζει συσσωματώματα με υψηλή περιεκτικότητα σε Cu και εντοπίζεται σε εγκεφάλους ασθενών της νόσου Alzheimer. Προσθήκη XZH στο Cu(Aβ_{1-x}) είχε ως αποτέλεσμα τη μεταφορά του Cu από το Aβ_{1-x} στο XZH, και τη συνακόλουθη διακοπή της παραγωγής ROS. Επισπρόσθετα το XZH ήταν σε θέση να καταστείλει την επαγόμενη από τον Cu παραγωγή συσσωματωμάτων Aβ_{1-x} [60].

4.4. Ανίχνευση του Cu

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, έχουν αναπτυχθεί ποικίλοι μεταλλοαισθητήρες που χρησιμεύουν ως εργαλεία για τη μελέτη της ομοιόστασης και της μεταφοράς των μεταλλικών στοιχείων στη βιολογία. Έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές στρατηγικές αλλά οι πιο συνηθισμένες περιλαμβάνουν τη χρήση φθορισμού. Γενικά, ένας μηχανισμός ενεργοποίησης του φθορισμού είναι προτιμώμενος, με άλλα λόγια, το φθοροφόρο να καταστεί ενεργό μέχρι να δεσμεύσει το επιθυμητό μεταλλικό ιόν. Δυστυχώς, αυτό είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί για το Cu(II), λόγω του παραμαγνητικού του χαρακτήρα που έχει ως αποτέλεσμα την απόσβεση του φθορισμού. Έτσι, οι περισσότεροι από τους αισθητήρες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία έχουν χαρακτήρα «απενεργοποίησης». Οι πρώτοι αισθητήρες αυτού του τύπου αποτελούνταν από πενταπεπτίδια N-τελικής αλληλουχίας XZH (για αποτελεσματική και εκλεκτική δέσμευση του Cu(II)) και προσθήκη στην θέση X του φθοροφόρου Dns (5-(διμεθυλαμινο)ναφθαλινο-1-σουλφοναμίδιο) [88]. Η δέσμευση του Cu(II) είχε ως αποτέλεσμα την ισχυρή απόσβεση του φθορισμού.

Χρησιμοποιώντας την ίδια μεθοδολογία, η αλληλουχία Gly-Gly-His προστέθηκε δίπλα στο φθοροφόρο της πράσινα φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) [89]. Η δέσμευση του Cu(II) οδήγησε σε απόσβεση του φθορισμού κατά 85%, επιτρέποντας παράλληλα την απεικόνιση σε πραγματικό χρόνο των διακυμάνσεων της συγκέντρωσης του μετάλλου στην επιφάνεια των κυττάρων HeLa.
<u>Κεφάλαιο 5</u>

Σκοπός και αντικείμενο έρευνας

Με βάση τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε στο εισαγωγικό μέρος, έχει ενδιαφέρον η περαιτέρω μελέτη μοντέλων τύπου XZH-, καθώς τα αμινοξέα που βρίσκονται στις θέσεις X και Z παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του Cu(II) με ATCUN πεπτίδια.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης της αλλαγής του Ν-τελικού αμινοξέος σε πεπτίδια τύπου ATCUN όσον αφορά την δεσμευτική τους ικανότητα έναντι του ιόντος Cu(II). Συγκεκριμένα θα περιγραφεί:

- Η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του πεπτιδικού μοντέλου του Ν-τελικού άκρου της εψιδίνης H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ που ήδη αναφέρεται στην βιβλιογραφία [60], και του τροποποιημένου (αλλαγή του 1^{ου} αμινοξέος Asp με Asn) H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-COOH. Η χρήση του συγκεκριμένου αμινοξέος (Asn) βασίστηκε σε βιβλιογραφικές διαπιστώσεις [60]. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η παρουσία του σε Ν-τελική θέση πεπτιδίων τύπου ATCUN, οδηγεί σε μείωση της τιμής pK_ατης αμινομάδας με συνέπεια ισχυρότερη αρχική ένταξη του Cu(II).
- Ποτενσιομετρική μελέτη της αλληλεπίδρασης του Cu(II) με τα πεπτιδικά μοντέλα και εξαγωγή των θερμοδυναμικών παραμέτρων για τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα
- 3. Φασματοσκοπικός (UV-Vis) χαρακτηρισμός των συμπλόκων.
- 4. Συσχέτιση των πληροφοριών που λαμβάνονται και εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την κατανομή του ιόντος Cu(II), την ικανότητα δέσμευσης του με τα πεπτιδικά μοντέλα, την πιθανή επίδραση της Asn στη δεσμευτική (έναντι του Cu(II)) ικανότητα του πεπτιδίου κ.α.

<u>Κεφάλαιο 6</u>

Πειραματική πορεία

6.1. Αντιδραστήρια

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου ακολουθήθηκε η πορεία σύνθεσης στερεής φάσης κατά Merrifield σύμφωνα με τη στρατηγική Fmoc/tBu. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η {4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ) αμινομέθυλ]-φαινόξυ}-ρητίνη ή Rink Amide ρητίνη (Rink Amide AM, G.L. Biochem, Shangai, China).

<u>Διαλύτες</u>

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα στάδια της πειραματικής πορείας είναι οι εξής:

- Διχλωρομεθάνιο (DCM, >99,9% Fluka Schnelldorf, Germany).
- Διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF, >99,9% Fluka Schnelldorf, Germany), το οποίο είχε υποστεί απόσταξη υπεράνω νινυδρίνης, προκειμένου να δεσμευτούν οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες που προκύπτουν ως παραπροϊόντα της διάσπασής του.
- Τριφθοροξικό οξύ (TFA, 99% SAFC Aldrich, Germany) για την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη και την αφαίρεση των προστατευτικών ομάδων.
- Πιπεριδίνη (Piperidine, 99% Aldrich, Germany) για την αποπροστασία της Fmoc-ομάδας.
- Διαιθυλαιθέρας (>99,5% Riedel-de Haen, Germany) για τη συρρίκνωση των κόκκων της ρητίνης και καταβύθιση του πεπτιδίου μετά την αποκοπή του από τη ρητίνη.
- Εξάνιο (n-Hexane, LAB-SCAN, Dublin, Ireland) κατά την απομάκρυνση του τριφθοροξικού οξέος σε περιστροφικό εξατμιστήρα.
- Μεθανόλη για τη συρρίκνωση των κόκκων της ρητίνης και τον καθαρισμό του πεπτιδίου.
- ο Ακετονιτρίλιο (CH₃CN,> 99,9% LAB-SCAN) για τον καθαρισμό του πεπτιδίου.
- Τριϊσοπροπυλοσιλάνιο (TIS, 99% Sigma-Aldrich) ως μόριο 'παγίδα' για τη δέσμευση των καρβοκατιόντων που προκύπτουν από την αποκοπή του πεπτιδίου από τη ρητίνη.

Αντιδραστήρια σύζευξης

Για τη σύζευξη των αμινοξέων στη ρητίνη, χρησιμοποιήθηκε ως αντιδραστήριο σύζευξης το διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC, Fluka, Germany ή G.L. Biochem, Shangai, China). Ως βοηθητικό πυρηνόφιλο στη διαδικασία σύζευξης χρησιμοποιήθηκε το 1-υδρόξυβενζοτριαζόλιο (HOBt, Neosystem-Starsbourg, France ή G.L. Biochem, Shangai, China).

Αντιδραστήρια για την παρασκευή του διαλύματος του test Kaiser:

- Νινυδρίνη (C₉H₆O₄, Sigma-Aldrich),
- ο Κυανιούχο κάλιο (KCN, Fluka Chemie AG),
- ο Αιθανόλη (C₂H₆O, Fiscer Scientific),
- ο Φαινόλη (C₆H₆O, Riedel-de Haen),
- Πυριδίνη (C₅H₅N, Lab-Scan Analytical)

Τα προστατευμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Fmoc-Ile-OH, Mr=353,4
- Fmoc-Pro-OH, Mr=337,4
- Fmoc-Phe-OH, Mr=387,43
- Fmoc-His(Mtt)-OH, Mr=633,7
- Fmoc-Thr(t-Bu)-OH, Mr=397,5
- Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH, Mr=411,5
- Fmoc-Asn(Trt)-OH, Mr=596,7

Για την παρασκευή και την τιτλοδότηση διαλυμάτων Cu-πεπτιδίων:

- Πρότυπο διάλυμα Cu(NO₃)₂·6H₂O (1g Cu²⁺/L)
- ο Πρότυπα διαλύματα KOH, HNO3 0,1M και KNO3

6.2. Συνθετική πορεία των πεπτιδίων H_2N -Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CON H_2 και H_2N -Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CON H_2 στην στερεά φάση

Η σύνθεση των πεπτιδίων έγινε σύμφωνα με τη μεθοδολογία της Fmoc/tBu στρατηγικής (Σχήμα 15). Αρχικά, έγινε μεταφορά της Rink Amide ρητίνης σε δοχείο Vessel και διόγκωση των κόκκων της με προσθήκη κατάλληλων διαλυτών, ανάδευση και διήθηση για την απομάκρυνση τους, DMF ανάδευση για 6 min, DCM ανάδευση για 8 min, DMF ανάδευση για 6 min.



Σχήμα 15: : Γενική πορεία σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση με τη Fmoc/tBu μεθοδολογία.

Στην συνέχεια έλαβε χώρα αποκοπή της Fmoc προστατευτικής ομάδας της ρητίνης για να γίνει αποπροστασία της α-αμινομάδας με χρήση διαλύματος 20% πιπεριδίνη σε DMF. Έγινε ανάδευση για 5 min, διήθηση και στην συνέχεια για ποσοτική αποκοπή της Fmoc, επανάληψη προσθήκης και ανάδευση για 10 min και διήθηση. Έπειτα, έγινε απομάκρυνση των παραπροϊόντων της αποκοπής με κατάλληλους διαλύτες, 3 φορές DMF (ανάδευση για 1 min και διήθηση), 3 φορές DCM (ανάδευση για 1 min και διήθηση), 3 φορές DMF (ανάδευση για 1 minκαι διήθηση) και διαπιστώθηκε η αποπροστασία της Ν-τελικής αμινομάδας με test Kaiser. Το test Kaiser βασίζεται στην αντίδραση της νινυδρίνης με πρωτοταγείς αμίνες η οποία δίνει μια κυανοϊώδη χρωστική και δίνεται στο Σχήμα 16. Έτσι χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της αποπροστασίας των αμινομάδων στην πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης. Όταν το Ν-τελικό άκρο είναι αποπροστατευμένο, λαμβάνει χώρα η αντίδραση που αναφέρθηκε πιο πάνω και προκύπτει χρωστική με κυανό χρώμα και οι κόκκοι της ρητίνης χρωματίζονται κυανοί (θετικό test kaiser). Στην περίπτωση που το Ν-τελικό άκρο είναι προστατευμένο καθώς συνδέεται με την Fmoc προστατευτική ομάδα, το test Kaiser δίνει ένα άχρωμο ή κίτρινο αποτέλεσμα και οι κόκκοι να είναι άχρωμοι ή σε αποχρώσεις του κίτρινου (αρνητικό test kaiser).



Σχήμα 16: Αντίδραση νινυδρίνης με ελεύθερη αμινομάδα

Για την παρασκευή των διαλυμάτων του test Kaiser έγινε διαλυτοποίηση 400 mg φαινόλης σε 100 ml αιθανόλης, διαλυτοποίηση 2 ml KCN 10-3M σε 100 ml πυριδίνης και διαλυτοποίηση 5 g νινυδρίνης σε 100 ml αιθανόλης. Ενώ για την πραγματοποίηση του test Kaiser γίνεται προσθήκη 3-4 σταγόνων από κάθε διάλυμα σε μερικούς κόκκους ρητίνης και θέρμανση σε υδρόλουτρο των 100 °C για 1 min.

Η σύζευξη των αμινοξέων έγινε χρησιμοποιώντας τριπλάσια περίσσεια τόσο του προστατευμένου αμινοξέος όσο και των αντιδραστηρίων σύζευξης. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η αναλογία 3/3/3/1 : αμινοξύ/HOBt/DIC/ρητίνη, ενώ ως διαλύτης το μίγμα διχλωρομεθάνιο (DCM): διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) σε αναλογία 1:1. Αρχικά, το Fmoc-προστατευμένο αμινοξύ μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως των 50 ml και προστέθηκε το βοηθητικό αντιδραστήριο HOBt και DMF/DCM για διαλυτοποίηση. Ακολούθησε η προσθήκη του αντιδραστηρίου σύζευξης DIC και το διάλυμα παρέμεινε για ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Η χρήση του βοηθητικού πυρηνόφιλου HOBt αποσκοπεί στην παραγωγή αδιάλυτων ενεργοποιημένων εστέρων που αντιδρούν με αμίνες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να δώσουν αμίδια και να μειωθεί ο κίνδυνος για ρακεμοποίηση.

Έπειτα, το διάλυμα αυτό προστίθεται στη ρητίνη αφήνεται υπό ανάδευση για 3h. Ακολουθούν εκπλύσεις για την απομάκρυνση τυχών παραπροϊόντων: 3 φορές DMF (ανάδευση για 1min και διήθηση), 3 φορές DCM (ανάδευση για 1min και διήθηση) και 3 φορές DMF (ανάδευση για 1min και διήθηση). Στη συνέχεια με test Kaiser ελέγχεται η επιτυχής σύζευξη του προστιθέμενου αμινοξέος, με επιθυμητό αρνητικό test Kaiser(κόκκοι χρώματος λευκού ή απόχρωσης κίτρινου). Στην περίπτωση που παρατηρούνται μπλε κόκκοι γίνεται επανάληψη της προσθήκης του αμινοξέος καθώς δεν έγινε επιτυχής σύζευξη. Στην περίπτωση που οι κόκκοι είναι λευκοί ή απόχρωση του κίτρινου, συνεχίζει η συνθετική πορεία, με αποκοπή της Fmoc-προστατευτικής ομάδας του προηγούμενου αμινοξέος με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF δύο φορές για 5min και 10min αντίστοιχα. Ακολουθούν εκπλύσεις 3 φορές DMF (ανάδευση για 1min και διήθηση), 3 φορές DCM (ανάδευση για 1min και διήθηση) και 3 φορές DMF (ανάδευση για 1min και διήθηση) και διενέργεια test Kaiser για ανίχευση της επιτυχούς αποκοπής(επιθυμητοί μπλε κόκκοι, θετικό). Εάν είναι επιτυχής ακολουθείται η διαδικασία προσθήκης αμινοξέος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για το επόμενο αμινοξύ. Αντίστοιχα, γίνεται η προσθήκη για όλα τα αμινοξέα έως ότου προκύψει η επιθυμητή αλληλουχία.

Στη συνέχεια, ακολουθεί αποκοπή του πεπτιδίου από την ρητίνη, με παράλληλη απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων. Η ρητίνη μεταφέρεται από το Vessel σε ποτήρι ζέσεως, με χρήση διαιθυλαιθέρα για συρρίκνωση των κόκκων της ρητίνης και ξήρανση στο drypistol. Έπειτα κατεργάζεται με διάλυμα τροφθοροξικού οξέος (TFA) 95%, νερό 5% και τριϊσοπροπυλοσιλανίου (TIS) 5% (v/v) για την λήψη του ελεύθερου πεπτιδίου, όπου το TIS χρησιμοποιείται ως μόριο παγίδα για τα καρβοκατιόντα. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου.

Τέλος, ακολουθεί διήθηση τις ρητίνης και εκπλύσεις με DCM και εξάτμιση του TFA στον περιστροφικό εξατμιστήρα (flash evaporator), χρησιμοποιώντας 3 φορές διάλυμα DCM: εξάνιο (1:1) και συμπύκνωση εκ νέου στους 37-42 °C. Η καταβύθιση των πεπτιδίων επιτεύχθηκε με την προσθήκη παγωμένου διαιθυλαιθέρα, διήθηση και ακολούθησε παραλαβή των πεπτιδίων σε υδατικό διάλυμα με κατεργασία με οξικό οξύ 2N και λυοφιλοποίηση (freeze drying).

6.3. Μέθοδος καθαρισμού HPLC

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) γενικότερα χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό δραστικών ενώσεων σε μίγματα. Ειδικότερα, χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό μεγάλου αριθμού βιομορίων όπως πρωτεΐνες και πεπτίδια. Η RP-HPLC (χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος καθαρισμού των πεπτιδίων.

Ο διαχωρισμός μέσω της RP-HPLC βασίζεται στην διαφορετική ισχύ των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπό ανάλυση μορίων και του υλικού της στήλης. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με το συνδυασμό μίας μη πολικής στατικής και μίας υδατικής, μέτριας πολικότητας, κινητής φάσης, μετά από διάλυση των δειγμάτων σε H₂O-CH₃CN. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται ανιχνευτές που ανιχνεύουν μεταβολές στην περιοχή υπεριώδους-ορατού(γενικότερα στην περιοχή 210-220nm), καθώς ο πεπτιδικός δεσμός απορροφά έντονα στην περιοχή το υπεριώδους (<220nm) [90],[91], [92].

ο Παρασκευαστική RP-HPLC

Για τον καθαρισμό αλλά και τον ποιοτικό έλεγχο καθαρότητας των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε παρασκευαστική χρωματογραφία RP-HPLC, με χρήση οργάνου Shimadzu, Preparative Liquid Chromatograph, LC-8A Pump, SPD-M20A Diode Array Detector, με αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10AF. Το σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν: (A) H2O/0.1% TFA, (B) CH3CN/0.1% TFA και ο χρόνος έκλουσης: 25 min. Η ανίχνευση έγινε στα 214 nm.

6.4. Ποτενσιομετρία

6.4.1. <u>Βασικές έννοιες</u>

Η ποτενσιομετρία είναι μία από τις πιο επιτυχημένες τεχνικές που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό των σταθερών σχηματισμού συμπλόκων μετάλλων με διάφορους υποκαταστάτες. Ανήκει στην κατηγορία των ηλεκτροχημικών τεχνικών αναλύσεως και βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς δυναμικού που αναπτύσσεται μεταξύ ενός ηλεκτροδίου αναφοράς και ενός εκλεκτικού ηλεκτροδίου ιόντων σε διάλυμα (π.χ υποκαταστάτη ή υποκαταστάτημεταλλικού ιόντος) συναρτήσει του όγκου προστιθέμενης βάσης ή οξέος γνωστής συγκέντρωσης. Για την μέτρηση του pH, συνήθως χρησιμοποιείται ηλεκτρόδιο υάλου. Η ποτενσιομετρική προσέγγιση της ένταξης ιόντων μετάλλου είναι έμμεση, επειδή παρακολουθείται με ανίχνευση ιόντων υδρογόνου. Η ποτενσιομετρική μελέτη με την παραπάνω τεχνική είναι αδύνατη όταν αλληλεπιδρούν μεταλλικά ιόντα με υποκαταστάτες που δεν ανταλλάσσουν πρωτόνια. Αυτό το ζήτημα, ωστόσο, σπάνια αποτελεί πρόβλημα στη δέσμευση ιόντων χαλκού και ψευδαργύρου με βιομόρια [5],[93],[94].

Οι πληροφορίες που αντλούμε με την ποτενσιομετρία είναι:

- Προσδιορισμός συγκέντρωσης (Μ, L,κλπ)
- Παράμετροι βαθμονόμησης ηλεκτροδίου
- Προσδιορισμός τιμών pKα υποκαταστάτη
- Προσδιορισμός στοιχειομετρίας και σταθερών σχηματισμού συμπλόκων που σχηματίζονται

• Διαγράμματα κατανομής σωματιδίων συναρτήσει του pH, pL, pM

Ένταξη μεταλλικών ιόντων σε διάφορους υποκαταστάτες

Όσον αφορά τις σταθερές σχηματισμού (Kfi)μπορούν να οριστούν με τη βοήθεια των παρακάτω εξισώσεων (L=υποκαταστάτης):

 $[M(H_2O)_6]^{2+} + L \rightarrow [M(H_2O)_5L]^{2+} + H_2O(1)$

Ή απλούστερα

$$M + L \leftrightarrow ML(2)$$

Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις L λαμβάνουν χώρα οι παρακάτω διαδοχικές αντιδράσεις:

 $M + L \iff ML \qquad Kf_1 = [ML]/[M][L] (3)$ $ML + L \iff ML_2 \qquad Kf_2 = [ML_2]/[ML][L] (4)$ $ML_2 + L \iff ML_3 \qquad Kf_3 = [ML_3]/[ML_2][L] (5)$ $ML_{n-1} + L \iff ML_n \qquad Kf_n = [ML_n]/[ML_{n-1}][L] (6)$

Ορίζονται, επίσης, οι ολικές σταθερές σχηματισμού (β) για τις συνολικές αντιδράσεις:

$M + L \leftrightarrow ML$	$\beta_1 = Kf_1 = [ML]/[M][L]$ (7)
$M + 2L \leftrightarrow ML_2$	$\beta_2 = [ML_2]/[ML][L]^2 = Kf_1*Kf_2$ (8)
$M + 3L \leftrightarrow ML_3$	$\beta_3 = [ML_3]/\beta[ML2][L]^3 = Kf_1*Kf_2*Kf_3$ (9)
$M + nL \leftrightarrow ML_n$	$\beta_n = [ML_n]/[ML_{n-1}][L]^n = Kf_1*Kf_2*Kf_3*Kfn (10)$

Επομένως έχουμε:

$$\beta_{n} = K_{n} K_{n-1} K_{n-2} K_{1} (11)$$

Και έτσι ισχύει:

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

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

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

 $pM + qH + rL \leftrightarrow M_pH_qL_r$ (14)

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

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

Κατά την ένταξη πεπτιδικών ατόμων αζώτου η παράμετρος q μπορεί να πάρει και αρνητικές τιμές. Αυτό οφείλεται στην υδρόλυση του μεταλλικού ιόντος ή του συμπλόκου καθώς και σε πιθανό ιοντισμό πρωτονίου που κανονικά δεν ιοντίζεται στην κλίμακα pH=0-14 (π.χ. πρωτόνιο αμιδικού δεσμού).

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

 $M^{a+} + H_n L [MH_j L]^{(a-n+j)} + {}_{(n-j)} H^+(16)$

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

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

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

Το διάγραμμα αυτό είναι σημαντικό γιατί μας επιτρέπει να επιλέξουμε τις τιμές pH στις οποίες θα πραγματοποιήσουμε τη φασματοσκοπική μελέτη, δηλαδή θα εντοπίσουμε την τιμή pH στην οποία μεγιστοποιείται το μοριακό κλάσμα κάθε συμπλόκου. Επίσης, υποδεικνύει το/α σύμπλοκο/α που επικρατεί/ούν σε φυσιολογική τιμή pH [5],[93],[94].

6.4.2. Πειραματική πορεία ποτενσιομετρίας

Τα πειράματα ποτενσιομετρίας πραγματοποιήθηκαν σε ποτενσιόμετρο τύπου Molspin συνδεδεμένο με αυτόματη προχοίδα και ηλεκτρόδιο υάλου||Ag|AgCl. Η διάταξη είναι πλήρως αυτοματοποιημένη και ελέγχεται από H/Y με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού. Ο προσδιορισμός των θερμοδυναμικών παραμέτρων (σταθερές ιοντισμού, ολικές σταθερές σχηματισμού, κλπ) τόσο των ελεύθερων πεπτιδίων όσο και των συστημάτων Cu(II)-πεπτιδίων με μοριακή αναλογία 1:1.1 πραγματοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα ιοντικής ισχύος 0.1 (KNO₃) και σε θερμοκρασία 298 K (25°C). Για κάθε σύστημα πραγματοποιήθηκαν τρεις ογκομετρήσεις. Πιο συγκεκριμένα η πορεία εργασίας έχει ως εξής:

I. <u>Βαθμονόμηση ηλεκτροδίου υάλου</u>

Πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση πρότυπου διαλύματος, που περιείχε 0.1 ml HNO₃ 0.1 M και 2.5 ml KNO₃ 0.1M με πρότυπο διάλυμα KOH. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Glee) προσδιορίστηκαν οι παράμετροι E⁰ και S της τροποποιημένης εξίσωσης Nerst για το ηλεκτρόδιο υάλου:

 $E = E^0 - S pH$ (18)

Όπου Ε: δυναμικό του ηλεκτροδίου

E⁰: δυναμικό του ηλεκτροδίου όταν pH = 0

S: η κλίση του ηλεκτροδίου (mV/pH)

II. Προσδιορισμός των τιμών logβ και pK_a για τα πεπτίδια H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ και H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂.

Πραγματοποιήθηκαν ογκομετρήσεις διαλυμάτων των πεπτιδίων συγκέντρωσης 1 mM και όγκου 2ml (ιοντική ισχύς 0.1 M KNO₃) στους 25°C με πρότυπο διάλυμα KOH (ελεύθερων ανθρακικών ιόντων), υπό ροή αερίου αργού.

III. <u>Προσδιορισμός των logβ και pK_a για τα συστήματα πεπτιδίων H₂N-Asp-Thr-His-</u> <u>Phe-Pro-Ile-CONH₂ και H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ - Cu(II).</u> Πραγματοποιήθηκαν ογκομετρήσεις με πρότυπο διάλυμα ΚΟΗ. Τα συστήματα περιείχαν πεπτίδια συγκέντρωσης 1.1 mM ιόντα Cu(II) συγκέντρωσης 1 mM (ιοντική ισχύς 0.1 M (KNO₃)). Οι ογκομετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25°C με πρότυπο διάλυμα KOH (ελεύθερο ανθρακικών ιόντων), υπό ροή αερίου αργού. Η προσομοίωση των πειραματικών με τις αντίστοιχες θεωρητικές καμπύλες ογκομέτρησης καθώς και η εξαγωγή των θερμοδυναμικών παραμέτρων που αναφέρθηκαν πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (Hyperquad) [95].

6.5. Φασματοσκοπικές τεχνικές

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό της σύνθεσης των πεπτιδίων και επαλήθευση του είδους των συμπλόκων που σχηματίζονται με την ένταξη των ιόντων Cu(II) στα πεπτίδια που συντέθηκαν. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι: (i) Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), (ii) Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), (iii) Φασματομετρία μάζας ESI-MS.

6.5.1. Φασματοσκοπία UV/Vis

Η μοριακή φασματοσκοπία απορρόφησης, στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Η μοριακή φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού(ultra violet and visible spectroscopy, UV-Vis) αναφέρεται στην απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από τον αναλύτη στην υπεριώδη περιοχή (180-380nm) και ορατή περιοχή (380-780nm) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η φασματοσκοπία UV-Vis χρησιμοποιείται στον ποιοτικό έλεγχο (ταυτοποίηση μιας χημικής ένωσης), στον ποσοτικό έλεγχο (προσδιορισμός ποσότητας-συγκέντρωσης μιας χημικής ένωσης) αλλά και για την παρακολούθηση μιας αντίδρασης [92],[96],[97].

Τα ηλεκτρονιακά φάσματα προκύπτουν από μεταβάσεις ηλεκτρονίων μεταξύ ενεργειακών επιπέδων. Στις περιπτώσεις των συμπλόκων ενώσεων παρατηρούνται ταινίες με μεγάλο εύρος εντάσεων και σε μεγαλύτερη ποικιλία μορφών από τις τυπικές π→π* και n→π* διεγέρσεις των κοινών ενώσεων. Εάν ένα μόριο απορροφά την κατάλληλη ποσότητα ενέργειας, ένα ηλεκτρόνιο από ένα κατειλημμένο τροχιακό διεγείρεται σε ένα μη κατειλημμένο ή μερικώς κατειλημμένο τροχιακό. Ο διαχωρισμός HOMO-LUMO (HOMO: υψηλότερο κατειλημμένο μοριακό τροχιακό, LUMO: χαμηλότερο μη κατειλημμένο μοριακό τροχιακό) είναι τέτοιος, ώστε τα φάσματα απορρόφησης να παρατηρούνται συνήθως στην υπεριώδη (UV) ή στην ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος [98].

Οι πιθανές ηλεκτρονικές διεγέρσεις μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με την αρχική και την τελική κατάσταση του ηλεκτρονίου σθένους σε:

- d-d μεταπτώσεις μεταξύ τροχιακών του μετάλλου (μετάπτωση MC),
- π-π* ή n-π* μεταπτώσεις μεταξύ των υποκαταστατών (μετάπτωση IL)
- περιπτώσεις μεταπτώσεων μεταφοράς φορτίου από το μέταλλο στον υποκαταστάτη (MLCT) και μεταφοράς φορτίου από τον υποκαταστάτη στο μέταλλο (LMCT).

Η ενέργεια και η ένταση των ταινιών απορρόφησης, παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για το είδος των υποκαταστατών που περιβάλλουν ένα μεταλλικό ιόν, όπως και για την γεωμετρία των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Τα σύμπλοκα των μετάλλων των στοιχείων μετάπτωσης, που περιέχουν μη συμπληρωμένα d τροχιακά, εμφανίζουν χαρακτηριστικά φάσματα στην ορατή περιοχή. Η απορρόφηση οφείλεται στην άρση του εκφυλισμού των d τροχιακών [96],[97].

Η απορρόφηση (Α) ενός δείγματος σε ορισμένο μήκος κύματος λ, είναι το μέτρο της μεταβολής της έντασης της ακτινοβολίας όταν προσπίπτουσα ακτινοβολία (Ρο) διέλθει διαμέσου ενός διαλύματος μιας κυψελίδας οπτικής διαδρομής b που περιέχει αναλύτη συγκέντρωσης c. Ο αναλύτης μπορεί να απορροφήσει μέρος της ακτινοβολίας, εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων και η ποσότητα ακτινοβολίας που διέρχεται να έχει μικρότερη ένταση (Ρ). Η απορρόφηση αυτή δίνεται από το νόμο Lambert-Beer:

 $A = \log (P_0 / P) = \varepsilon b c \qquad (19)$

c: είναι η συγκέντρωση δείγματος (mol / L)

Όπου

b: είναι το μήκος οπτικής διαδρομής εντός της κυψελίδας (cm) και

ε: η μοριακή απορροφητικότητα ή μοριακός συντελεστής απόσβεσης του δείγματος (mol⁻¹L cm⁻¹).

Από τις τιμές λ_{max} και ε που προκύπτουν από τα φασματα ορατού μπορούμε να εξάγουμε πληροφορίες σχετικά με τη φύση των ατόμων δοτών που εντοπίζονται στη σφαίρα ένταξης των μεταλλικών ιόντων σε σύμπλοκα [92].

Από τη μελέτη μεγάλου πλήθους συμπλόκων Cu(II)-πεπτιδίων με διαφορετική σφαίρα ένταξης, ο Prenesti και η ομάδα του πρότειναν την παρακάτω εξίσωση [99],[100],[101] με τη βοήθεια της οποίας είναι δυνατή η θεωρητική πρόβλεψη της σφαίρας ένταξης του Cu(II) με διαφορετικά άτομα δότες στο ισημερινό επίπεδο:

$$\lambda_{\max} = 10^3 / \sum_{i=1}^4 n_i \overline{\nu_i}$$
 (20)

όπου \mathbf{n}_i είναι ο συνολικός αριθμός των ομάδων δοτών στο ισημερινό επίπεδο, $\overline{\mathbf{v}}_i$ είναι η ατομική συνεισφορά κάθε ομάδας δότη στο ισημερινό επίπεδο

Πίνακας 6: Τιμές συντελεστή ($\overline{\nu}_i$) για την εκτίμηση της φασματοφωτομετρικής τιμής λ_{max} των ενταγμένων στο ισημερινό επίπεδο ιόντων χαλκού (ΙΙ) με διάφορα άτομα δότες σε υδατικό διάλυμα.

Ομάδες δοτών	$\overline{oldsymbol{ u}}_{ ext{i}}$
N _{amino}	0.450
Nimidazole	0.495
N _{peptide}	0.427
Ocarboxylate	0.353
O _{water}	0.296

Με τη σχέση αυτή μπορεί να υπολογιστεί η τιμή λ_{max} αν γνωρίζουμε το πλήθος και το είδος των χαρακτηριστικών ατόμων δοτών που εντάσσονται στο ισημερινό επίπεδο (πίνακες 6,7) με απόκλιση 10nm. Από τις τιμές λ_{max} και ε που προκύπτουν από τα φασματα ορατού μπορούμε να εξάγουμε πληροφορίες σχετικά με τη φύση των ατόμων δοτών που εντοπίζονται στη σφαίρα ένταξης των μεταλλικών ιόντων σε σύμπλοκα με πεπτίδια [99]. Μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ θεωρητικά προβλεπόμενης και πειραματικά προσδιοριζόμενης τιμής, προς την περιοχή του ερυθρού (μεγαλύτερες τιμές λ_{max}) αποτελούν ένδειξη αξονικής ένταξης ατόμου δότη ισχυρότερου του ατόμου Ο του H₂O.

Πίνακας 7: Εφαρμογή της εξίσωσης Prenesti για διάφορα άτομα δότες στο ισημερινό επίπεδο

Άτομα δότες	λ _{max} (nm)
1 N _{im} 3 O _{water}	760
1N _{amino} 1 COO ⁻ 2 O _{water}	717
1 N _{im} 1N _{pep} 2 O _{water}	660
1 N _{im} 2 N _{pep} 1 O _{water}	608
1N _{im} 2 N _{pep} 1N _{amino}	556

Η αξονική αλληλεπίδραση αντιπροσωπεύει ένα σοβαρό εμπόδιο στην αξιοπιστία της πρόβλεψης της δομικής διευθέτησης για τα σύμπλοκα χαλκού (ΙΙ), καθώς το φαινόμενο Jahn – Teller είναι η αιτία της παραμορφωμένης οκταεδρικής γεωμετρίας της ένταξης σε αυτό το κατιόν. Μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ θεωρητικά προβλεπόμενης και πειραματικά προσδιοριζόμενης τιμής, προς την περιοχή του ερυθρού (μεγαλύτερες τιμές λmax) αποτελούν ένδειξη αξονικής ένταξης ατόμου δότη με το μέταλλο. Ο Prenesti [99-101] ύστερα από μελέτες πρότεινε τις πιθανές μετατοπίσεις προς το ερυθρό ανάλογα την κάθε ομάδα δότη σε αξονική θέση ένταξης, με μέση τιμή μετατόπισης 36nm ανά άτομο δότη. Πιο συγκεκριμένα 31-45nm για άτομα δότες N_{im}, 41nm για άτομα N_{amino} και 58nm για άτομα δότες OH⁻.

Τα φάσματα ορατού συμπλόκων Cu(II), ηλεκτρονιακής απεικόνισης d⁹, για τα οποία παρουσιάζεται το φαινόμενο Jahn-Teller, μπορούν να ερμηνευθούν με τη βοήθεια του παρακάτω σχήματος.



Σχήμα 17: Ένεργειακό διάγραμμα d τροχιακών ενός ηλεκτρονίου στην περίπτωση (1)οκταεδρικής γεωμετρίας (2) τετραγωνικά παραμορφωμένης με ελαφρά επιμήκυνση των δεσμών στην αξονική θέση (3) τετραγωνικά παραμορφωμένης με μεγάλη επιμήκυνση των δεσμών στην αξονική θέση και παράλληλη ισχυροποίηση των δεσμών στο ισημερινό επίπεδο (4) επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Τα βέλη στις περιπτώσεις (2) και (3) υποδηλώνουν τις παρατηρούμενες ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις. Στα τετραγωνικά παραμορφωμένα σύμπλοκα παρατηρούνται οι μεταπτώσεις dxz, dyz→dx²-y² και dz²→dx²-y².

Όπως φαίνεται και στο σχήμα σύμφωνα με το φαινόμενο Jahn-Teller, παρατηρείται περαιτέρω άρση του εκφυλισμού του αρχικά οκταεδρικής γεωμετρίας συμπλόκου, ώστε να προκύψει ένα σύστημα χαμηλότερης συμμετρίας και ενέργειας. Με άλλα λόγια, όσο εξασθενούν οι αξονικές αλληλεπιδράσεις, τόσο αυξάνει η τετραγωνική παραμόρφωση. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται ως εξής: καθώς το μήκος δεσμού Cu(II)-υποκαταστατών αυξάνεται στην αξονική θέση (εξασθένιση αλληλεπίδρασης), η αλληλεπίδραση στο ισημερινό επίπεδο αυξάνει. Αυτό σταθεροποιεί περισσότερο τα τροχιακά με χαρακτήρα z (ενεργειακή μείωση) και αποσταθεροποιεί αυτά με χαρακτήρα x,y (ενεργειακή αύξηση). Η ενεργειακή διαφορά dxz,dyz - dx²-y² αυξάνει και η ταινία παρουσιάζεται σε μικρότερο μήκος κύματος (περιπτώσεις 2,3 Σχήματος 17) [2],[96],[97],[102],[103].

<u>Λήψη φασμάτων UV-Vis</u>

Για την λήψη των φασμάτων ορατού (Vis) χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UVPC-2401. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους 25°C, σε κυψελίδες χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm, στη φασματική περιοχή 350-850 nm. Αρχικά παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα του συστήματος πεπτιδίου: Cu(II) και προστέθηκαν διαδοχικά μικρές ποσότητες αραιού υδατικού διαλύματος ΚΟΗ, έγινε μέτρηση της τιμής pH (με τη βοήθεια ηλεκτροδίου συνδυασμού υάλου ||Ag|AgCl) και εν συνεχεία ακολούθησε η καταγραφή του φάσματος. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για διάφορες τιμές pH (εύρος τιμών pH 5-12). Οι τιμές pH επιλέχτηκαν μετά την επεξεργασία των ποτενσιομετρικών δεδομένων και αντιστοιχούν στο μέγιστο του μοριακού κλάσματος κάθε συμπλόκου όπως υποδεικνύει το σχετικό διάγραμμα κατανομής.

6.5.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR

Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear magnetic resonance, NMR) είναι ένα φυσικό φαινόμενο στο οποίο οι πυρήνες σε ένα μαγνητικό πεδίο απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Αυτή η ενέργεια έχει μια συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού που εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες του ισοτόπου των ατόμων. Το NMR επιτρέπει την παρατήρηση ειδικών κβαντικών μαγνητικών ιδιοτήτων του ατομικού πυρήνα. Η συχνότητα συντονισμού των πυρήνων του υδρογόνου στις διάφορες ομάδες δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον και το είδος του δεσμού. Γενικότερα, χρισιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τη διευκρίνιση της δομής των χημικών ενώσεων, όπως επίσης και συμπλόκων καθώς με τη φασματοσκοπία NMR μελετάται η πορεία σχηματισμού και η δομή τους[104].

Οι διαφορές στις θέσεις απορρόφησης, σε ένα φάσμα NMR, οι οποίες οφείλονται στην ηλεκτρονική προστασία και αποπροστασία, ονομάζονται χημικές μετατοπίσεις. Η μεγάλη σημασία των φασμάτων NMR οφείλεται στην ύπαρξη αυτού του φαινομένου, καθώς η εύρεση των χημικών μετατοπίσεων οδηγεί στην εξαγωγή συμπερασμάτων (δομικά, κινητικά, αλληλεπιδράσεις). Παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών που μπορούν να ερμηνευθούν εκ των προτέρων, για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής. Για τις πρωτεΐνες τα μοτίβα των χημικών μετατοπίσεων είναι διαγνωστικά δευτεροταγούς δομής: άέλικες ή β-φύλλα. Οι χημικές μετατοπίσεις ¹Η ενός αμινοξέος εξαρτώνται από την ομοιοπολική δομή του (τύπος αμινοξέος), τα γειτονικά κατάλοιπα (αμινοξέα στην αλληλουχία), και το διαλύτη [104],[105].

Η φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D NMR, Two Dimensional NMR), παρέχει τη δυνατότητα να χαρακτηρίσει επιπλέον τη μαγνητική αλληλεπίδραση των πυρήνων σε συνάρτηση με τη δομική διάταξη στο μόριο και τη γειτνίαση στο χώρο. Τα φάσμα NMR δύο διαστάσεων (2D NMR) είναι συνδυασμός αρκετών απλών φασμάτων που έχουν σαφώς μεγαλύτερο πλεονέκτημα από τα απλά φάσματα στην ερμηνεία της δομής οργανικών ενώσεων, αλλά και η τεχνική απαιτεί μεγάλο χρόνο συλλογής και καταγραφής των δεδομένων με μετασχηματισμό Fourier. Στο φάσμα 2D NMR οργανικών ενώσεων γίνεται καταγραφή μαγνητικών πληροφοριών σε δύο διαστάσεις. Στη μία διάσταση καταγράφονται συνήθως οι απορροφήσεις ενός συγκεκριμένου πυρήνα μιας οργανικής ουσίας και στην άλλη διάσταση οι σταθερές σύζευξης ή απορρόφησης άλλων πυρήνων που αλληλεπιδρούν ή συσχετίζονται με τους πυρήνες της πρώτης διάστασης [106]-[110].

Για την ταυτοποίηση των πυρήνων ¹Η των πεπτιδίων καταγράφηκαν τα παρακάτω είδη φασμάτων [111]:

- <u>¹H-¹H COSY</u>: Η φασματοσκοπία ομοπυρηνικού συσχετισμού COSY (homonuclear correlation spectroscopy), στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων που χωρίζονται από 1-3 δεσμούς. Κάθε αμινοξύ εμφανίζει χαρακτηριστικό φάσμα λόγω διαφορετικών ομοιοπολικών συνδέσεων. Τα φάσματα COSY χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά για μικρότερα πεπτίδια.
- <u>¹H-¹H TOCSY</u>: Η χρήση της φασματοσκοπίας ολικού συσχετισμού TOCSY (Total Correlation SpectroscopY) μπορεί να συσχετίσει όλους τους πυρήνες ενός συγκεκριμένου συστήματος σπιν, όπως π.χ. τα πρωτόνια μιας αλειφατικής αλυσίδας.
- <u>¹H-¹H</u> NOESY: Η τεχνική NOESY (Nuclear Overhanser Effect SpectroscopY) στηρίζεται στην αλληλεπίδραση πυρήνων μεταξύ των αξόνων, όπου συμβαίνει ομοπυρηνική επίδραση διπόλου-διπόλου. Το φάσμα που λαμβάνεται είναι παρόμοιο με το COSY, με διαγώνιες και κορυφές διασταύρωσης, ωστόσο οι τελευταίες συνδέουν πυρήνες που βρίσκονται πιο κοντά στο χώρο (μέχρι 5Å) σε σχέση με εκείνους που συνδέονται μέσω χημικών δεσμών. Το μεγάλο μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι για ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους μεταξύ 1000 και 3000 οι κορυφές διασταύρωσης εξαφανίζονται εξαιτίας της εξάρτησης του φαινομένου NOE από το χρόνο συσχέτισης. Αντίθετα, το φαινόμενο NOE στο περιστρεφόμενο πλαίσιο και υπό συνθήκες 'κλειδώματος των

σπιν' είναι πάντα θετικό. Τα φάσματα αυτά παρέχουν πληροφορίες για την δευτεροταγή δομή και είναι προκαταρκτική ένδειξη της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης.

<u>Λήψη φασμάτων NMR</u>

Για την καταγραφή των φασμάτων NMR μιας και δύο διαστάσεων (¹H, ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹H NOESY) των ελεύθερων πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκε όργανο Bruker Avance με συχνότητα συντονισμού ¹H 500.13MHz. Ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης ήταν μίγμα H₂O:D₂O σε αναλογία 9:1 v/v (για την παρατήρηση των σημάτων των αμιδικών πρωτονίων) και η θερμοκρασία καταγραφής 298 K. Η συγκέντρωση των πεπτιδίων ήταν 5mM και η τιμή pH 2.5.

6.5.3. Φασματομετρία μάζας ESI-MS

Σε ένα φασματόμετρο μάζας, μια ένωση αρχικά εξατμίζεται και μετατρέπεται σε ιόντα, τα οποία στη συνέχεια διαχωρίζονται ανάλογα με τον λόγο μάζας/φορτίου (m/z). Η φασματομετρία μάζας με ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI-MS) χρησιμοποιείται για μεγάλα μόρια, όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, καθώς ενώσεις με μεγάλα μοριακά βάρη δεν μπορούν να εξατμιστούν με άλλο τρόπο χωρίς να αποσυντεθούν. Σε αυτή την τεχνική, η ένωση αρχικά διαλύεται σε έναν ιοντικό διαλύτη κ μετά ψεκάζεται μέσω μίας βελόνας υψηλής τάσης σε θάλαμο κενού. Τα μικροσκοπικά αυτά σταγονίδια φορτίζονται από τη βελόνα, εξατμίζονται και έτσι δημιουργούνται τα μοριακά ιόντα αέριας φάσης που φέρουν συνήθως πολλαπλά φορτία. Τα ιόντα αυτά διέρχονται από το φασματόμετρο μάζας όπου καταγράφεται η τιμή m/z για κάθε ιόν [112]. Για τον υπολογισμό του λόγου μάζας/φορτίου χρησιμοποιείται η εξίσωση [102],[113]:

 $m/z = M + nH^{+}/n$ (21)

Όπου Μ: η μοριακή μάζα του δείγματος

n: ο αριθμός των θετικών φορτίων

Η⁺: η μάζα του πρωτονίου

<u>Λήψη φασμάτων ESI-MS</u>

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. Τα δείγματα των ελεύθερων πεπτιδίων διαλύθηκαν σε διάλυμα H₂O/CH₃CN: 1/1 (v/v) που περιείχε 0.05% CH₃COOH. Για την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων και την εξαγωγή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Xcalibur 2.1.0.

<u>Κεφάλαιο 7</u>

Αποτελέσματα-Συζήτηση

7.1. Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H2N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH2

Η σύνθεση του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (σχήμα 18) έγινε βάσει των αρχών της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield σύμφωνα με την Fmoc/tBu στρατηγική και ταυτοποιήθηκε με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας (ESI-MS) καθώς και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).



Σχήμα 18: Το πεπτίδιο H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂

Το ποσό της πεπτιδορητίνης που συντέθηκε ήταν 2,0028g και η απόδοση σύνθεσης 50,1%. Στη συνέχεια, μετά την αποκοπή της ρητίνης και των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, ελήφθησαν 0,4001g πεπτιδίου με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 79,9%.



Σχήμα 19: Ημι-παρασκευαστική RP-HPLC, σύστημα έκλουσης: CH₃CN/H₂O από A/B: 100/0% σε A/B:50-50%

Για τον καθαρισμό του ελεύθερου πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με ημιπαρασκευαστική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης: (A) H₂O/0.1% TFA, (B) CH₃CN/0.1% TFA από A/B: 100/0% σε A/B:50-50%. Στο Σχήμα 19 παρατίθεται το χρωματογράφημα του πεπτιδίου.

Ο έλεγχος καθαρότητας-ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας ESI-MS, το φασματογράφημα της οποίας φαίνεται στο σχήμα 20. Η κορυφή σε τιμή m/z = 728.37 amu αποδίδεται στο μοριακό ιόν [L+H⁺]⁺ (θεωρητική τιμή 728.37 amu), ενώ η κορυφή σε τιμή m/z = 364.69 amu στο [L+2H⁺]²⁺. Μικρές αποκλίσεις μεταξύ των θεωρητικών-πειραματικών τιμών οφείλονται στον τρόπο βαθμονόμησης (mass calibration) του οργάνου.



Σχήμα 20: . Φάσμα μάζας ESI-MS του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-IIe-CONH₂ (πάνω πειραματικό, κάτω θεωρητικά υπολογιζόμενα).

Για τον πλήρη χαρακτηρισμό του πεπτιδίου καταγράφηκαν επιπρόσθετα τα φάσματα ¹H (σχήμα 21), ¹H -¹H COSY (σχήμα 22),¹H -¹H TOCSY (σχήμα 23), ¹H -¹H NOESY (σχήμα 24), ¹H -¹H ROESY (σχήμα 25), καθώς και ετεροπυρηνικά φάσματα (¹H,¹³C)-HSQC (σχήμα 26),(¹H,¹³C)-HMBC (σχήμα 27) σε διαλύτη H₂O : D₂O (9 : 1 v/v), pH=2.5, T=298 K. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των φασμάτων συνοψίζονται στον πίνακα 8 και βρίσκονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικές τιμές για παρόμοια πεπτίδια [114]-[116].



Σχήμα 21: Φάσμα ¹H-NMR του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O, pH=2.5



Σχήμα 22: Φάσμα ¹H-¹H-COSY NMR του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-IIe-CONH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1, pH=2.5.



Σχήμα 23: Φάσμα ¹H-¹H-TOCSY NMR του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1, pH=2.5.



Σχήμα 24: Φάσμα ¹H-¹H- NOESY NMR του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1, T=298 K.



Σχήμα 25: Φάσμα ¹H-¹H- ROESY NMR του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1, T=298K.



Σχήμα 26: Φάσμα (¹H,¹³C)-HSQC NMR του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1, T=298 K.



Σχήμα 27: Φάσμα (1 H, 13 C)-HMBC NMR του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1, T=298 K.

Πίνακας 8: Χημικές μετατοπίσεις (δ, ppm) ¹Η του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (pH = 2.5, T = 298K)

	αH	βН	γH	γCH ₂	CONH ₂	δΗ	H(2) _{im}	H(4) _{im}	NH
Asp	4.57	3,06							8.37
Thr	3.96	1.76		0.86					8.28
His	4.12	3.92 3.66					8.47	7.11	8.47
Phe	4,80	3.10 2.81							8.23
Pro	4.39	2.87 2.18		1.93		3.71 3.51			-
lle	4.43	4.07	2.87 1.78	0.88					8.09
CONH ₂ Ile					7.59				

7.2. Αλληλεπίδραση ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂

7.2.1. Ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις

7.2.1.1. <u>Προσδιορισμός τιμών pK_α του ελεύθερου πεπτιδίου</u>

Το πεπτίδιο H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (συμβολισμός LH₃) περιέχει τέσσερεις ομάδες που είναι ικανές να ιονιστούν σε περιοχή pH 2-12. Ειδικότερα, οι ομάδες αυτές περιλαμβάνουν την καρβοξυλομάδα του ασπαρτικού, το άτομο αζώτου (N₃) του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης και τη N-τελική αμινομάδα του ασπαρτικού. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 9) δίνονται οι ολικές σταθερές πρωτονίωσης (logβ) καθώς και οι σταθερές ιονισμού (pK_α) των παράπλευρων ομάδων. Οι αντιδράσεις σχηματισμού των πρωτονιωμένων μορφών του πεπτιδίου περιγράφονται από την εξίσωση:

$H + nL \leftrightarrow H_nL$

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

β (LH_n) = [LH_n] / [H]ⁿ[L]

Οι τιμές pK_α υπολογίστηκαν ως εξής:

$$pK_{\alpha}$$
 (LH_n) = log β (LH_n) – log β (LH_{n-1})

Πίνακας 9: Ολικές σταθερές πρωτονίωσης και τιμές pK_a για το πεπτίδιο H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (T=298K, I=0.1M KNO₃)

Σωματίδια	logβ()*	pK _α	Χαρακτηριστική ομάδα
LH3	17.08 (2)	2.95	Asp-COOH
LH ₂	14.13 (1)	6.46	His-N _{im} H ⁺
LH	7.67 (1)	7.67	Asp-NH ₃ +

*Τυπική απόκλιση (x10⁻²)

Στο Σχήμα 28 παρουσιάζεται το αντίστοιχο διάγραμμα κατανομής.



Σχήμα 28: Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του πεπτιδίου H2N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CoNH2 (C=1.1mM)

Από το διάγραμμα διακρίνεται ότι σε πολύ όξινες τιμές το πεπτίδιο βρίσκεται στην πλήρως πρωτονιωμένη του μορφή LH₃. Αύξηση του pH του διαλύματος οδηγεί αρχικά στην αποπρωτονίωση της καρβοξυλομάδας του ασπαρτικού (Asp-COOH). Η τιμή pK_α = 2.95 βρίσκεται σε συμφωνία με τις βιβλιογραφικές τιμές για τον ιονισμό της ίδιας ομάδας στο πεπτίδιο της N-τελικής αλληλουχίας του hepsidin-25 (pK_α=2.76) και των πεπτιδίων -GGHG-,-GGH-,MDH-am με τιμές pK_α 3.2, 2.9, 2.46 αντίστοιχα [83],[117-118].

Ev συνεχεία λαμβάνει χώρα η αποπρωτονίωση του ατόμου N₃ του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης με pK_a = 6.46. Η τιμή pK_α που αποδίδεται στον εν λόγω ιοντισμό είναι συγκρίσιμη με αντίστοιχες για το hepsidin-25 (pK_a= 6.47) και των πεπτιδίων -GGHG-,-GGH-,MDH-am, MNH-am, AAHAWG-NH₂, AAHAWGC(SMe)-NH₂ με τιμές pK_α 6.7, 6.8, 6.24, 6.22, 6.36, 6.23 αντίστοιχα [83],[117-119].

Η τελευταία αποπρωτονίωση αποδίδεται στην Ν-τελική αμινομάδα. Η υπολογιζόμενη τιμή pK_{α} = 7.67 συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τον ίδιο τύπο ιονισμού στα πεπτίδια του hepsidin-25 (pK_a =7.77) και των πεπτιδίων -GGHG-,-GGH-,MDH-am, MNH-am, AAHAWG-NH₂, AAHAWGC(SMe)-NH₂ με τιμές pK_a 8.1, 8.3, 7.63, 7.31, 7.94, 7.86 αντίστοιχα [83],[117-119].

7.2.1.2. <u>Αλληλεπίδραση Cu(II): πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-</u> <u>CONH₂.</u>

Τα ποτενσιομετρικά δεδομένα από την τιτλοδότηση υδατικού διαλύματος του συστήματος Cu²⁺: πεπτιδίου με υδατικό KOH σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1.1 προσομοιώνονται ικανοποιητικά δεχόμενοι την ύπαρξη τεσσάρων διαφορετικών συμπλόκων, με στοιχειομετρία : CuLH, CuLH-1, CuLH-2, CuLH-3. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10) παρουσιάζονται οι τιμές των ολικών σταθερών σχηματισμού των συμπλόκων χαλκού με το συγκεκριμένο πεπτίδιο, ενώ στο σχήμα παρατίθεται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (συμπλόκων) Cu(II), το οποίο προκύπτει με κατάλληλη επεξεργασία των θερμοδυναμικών δεδομένων (Σχήμα 29).

Πίνακας 10: Ολικές σταθερές σχηματισμού (logβ) και τιμές pK_{α} των συμπλόκων χαλκού με το πεπτίδιο H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂. (T = 298K, I = 0.1M KNO₃)

Σύμπλοκα	Logβ ()*	pK _α **
CuLH	12.87 (2)	-
CuLH ₋₁	4.11 (1)	-
CuLH.2	-0.46 (1)	4.57
CuLH ₋₃	-11.64 (2)	11.18

*τυπική απόκλιση (x10⁻²) ** Για την αντίδραση CuLH_n \leftrightarrow CuLH_{n-1} + H⁺

Το μοντέλο που προτείνεται περιλαμβάνει τέσσερα σωματίδια στοιχειομετρίας 1:1.1. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 29, η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με το χαλκό ξεκινάει από πολύ χαμηλές τιμές pH=4 και συνεχίζεται μέχρι pH=12. Όπως αναμένεται για πεπτίδια τύπου ATCUN το υψηλής θερμοδυναμικής σταθερότητας σύμπλοκο στοιχειομετρίας CuLH₋₂ επικρατεί σχεδόν αποκλειστικά στην περιοχή pH 5-10.



Σχήμα 29: Διάγραμμα κατανομής συμπλόκων του συστήματος Cu(II): H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε αναλογία 1:1.1 [L] = 1.1mM, [Cu²⁺]= 1mM

7.3. Φασματοσκοπική μελέτη 7.3.1. Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα ορατού του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου σε αναλογία 1:1.1 (Σχήμα 30) καταγράφηκαν στις τιμές pH, οι οποίες αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής για κάθε σωματίδιο και προκύπτουν από την επεξεργασία των ποτενσιομετρικών δεδομένων. Οι υπολογιζόμενες τιμές λ_{max} και ε δίνονται στον Πίνακα 11.

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα η ενέργεια των d-d μεταπτώσεων των συμπλόκων Cu(II), εξαρτάται από το είδος των ατόμων δοτών που βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο. Η συνεισφορά των άμινο ή άμιδο ατόμων αζώτου είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των ατόμων οξυγόνου. Στα φάσματα ορατού του υπό μελέτη συστήματος παρατηρήθηκε ότι με τη σταδιακή αύξηση του pH, η τιμή λ_{max} μειώνεται με παράλληλη αύξηση του συντελεστή ε. Το γενικό συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι κατά την αύξηση του pH, παρατηρείται διαδοχική αντικατάσταση ατόμων δοτών Ο από άτομα Ν στο ισημερινό επίπεδο των ιόντων Cu(II). Στην περίπτωση παράλληλης αλληλεπίδρασης σε αξονική θέση, αναμένεται μετατόπιση των θεωρητικά αναμενόμενων τιμών λ_{max} προς το ερυθρό (red shift). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα θα συζητηθούν στην αμέσως επόμενη ενότητα σε συνδυασμό και με τα αντίστοιχα θερμοδυναμικά.



Σχήμα 30: Φάσματα UV-Vis υδατικού μίγματος Cu(II)- H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-IIe-CONH₂ σε αναλογία 1:1.1 σε διάφορες τιμές pH (T=298 K, I=0.1 (KNO₃)).

Πίνακας	11:	Φασματοσκοπικά	δεδομένα	ορατού	(λ _{max} ,	ε)	του	συστήματος
Cu(II)- H ₂ N-Asp	-Thr-	-His-Phe-Pro-Ile-CO	NH ₂ (1:1.1)					

рН	λ _{max} (nm)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)
2.52	795	16.9
4.01	747	26.8
4.62	712	29.7
	532	50.1
7.36	528	111.1
11.0	526	113.6
11.8	526	114.7

7.4. Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων

Όπως αναφέρθηκε, οι πειραματικές καμπύλες ογκομέτρησης προσομοιώνονται ικανοποιητικά δεχόμενοι την ύπαρξη τεσσάρων μονοπυρηνικών σωματιδίων (συμπλόκων) στην κλίμακα pH 3-12, συγκεκριμένα των CuLH, CuLH₋₁, CuLH₋₂, CuLH₋₃.

Σύμφωνα με το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (Σχήμα 29) παρατηρείται ότι το πεπτίδιο αλληλεπιδρά με το χαλκό από πολύ χαμηλές τιμές pH. Το πρώτο σωματίδιο που σχηματίζεται για εύρος pH περίπου 2-5 είναι στοιχειομετρίας CuLH. Για το συγκεκριμένο θα μπορούσε να προταθεί ότι σε τιμή pH ~ 4.1, όπου παρατηρείται το μέγιστο της κατανομής, το μεταλλικό ιόν εντάσσεται είτε με το ιμιδαζολικό άτομο αζώτου (N₃) της His και τρια μόρια νερού, είτε με τον ίδιο δότη αζώτου και επιπλέον συμμετοχή του καρβοξυλίου του ασπαρτικού με σχηματισμό μακροχηλικού δακτυλίου στο ισημερινό επίπεδο, είτε με το άζωτο της Ν-τελικής αμινομάδας και το άτομο οξυγόνου του καρβοξυλίου του Asp σχηματίζοντας έναν εξαμελή χηλικό δακτύλιο. Αντίστοιχος τρόπος ένταξης παρατηρείται σε σύμπλοκα ίδιας στοιχειομετρίας (CuLH) με τα πεπτίδια της Ν-τελικής αλληλουχίας του hepcidin [117].

Η τιμή λ_{max} = 747 nm, που προκύπτει από το φάσμα απορρόφησης στην ορατή περιοχή, επιβεβαιώνει το συγκεκριμένο τρόπο ένταξης. Η εν λόγω τιμή πλησιάζει την θεωρητική προβλεπόμενη με βάση την εξίσωση Prenesti (λ_{max} = 760 nm για σφαίρα ένταξης N_{im} και 3H₂O, λ_{max} =717 nm για σφαίρα ένταξης ένα άτομο αζώτου της Nτελικής αμινομάδας, ενός ατόμου οξυγόνου της καρβοξυλομάδας του Asp και δύο μόρια H₂O) και λ_{max} =729 nm ένταξη τύπου N_{im}, COO⁻, 2H₂O. Εκτιμούμε λοιπόν πως στη συγκεκριμένη τιμή pH υφίσταται μίγμα τριων 1N συμπλόκων.

Η αύξηση του pH του διαλύματος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του CuLH. 1 στην περιοχή pH περίπου 3.5-7. Από φασματοσκοπικής άποψης δεν μπορούμε να εξάγουμε κάποιο συμπέρασμα καθώς το συγκεκριμένο είναι χαμηλής συγκέντρωσης και η καμπύλη κατανομής του επικαλύπτεται από την αντίστοιχη του CuLH-2. Η τιμή logK* για το σύμπλοκο αυτό είναι -10.02 και συγκρίσιμη με την αντίστοιχη για το 3N σύμπλοκο πεπτιδίου DP1 με Cu(II) (logK*=-9.75) για το οποίο προτείνεται σφαίρα ένταξης {NH₂, N_{amide}⁻, N_{im}, H₂O} [120]. Με βάση λοιπόν αποκλειστικά τα θερμοδυναμικά δεδομένα προτείνεται ότι η σφαίρα ένταξης του Cu(II) στο CuLH-1 περιλαμβάνει το ιμιδαζολικό άτομο αζώτου, ένα αμιδικό άτομο αζώτου πεπτιδικού δεσμού, το άτομο αζώτου της N-τελικής αμινομάδας και ένα μόριο νερού.

Σε εύρος pH 4-12, παρατηρείται ο σχηματισμός του συμπλόκου CuLH₋₂. Το εν λόγω σύμπλοκο επικρατεί αποκλειστικά στις τιμές pH 6-9, ενδεικτικό της μεγάλης θερμοδυναμικής του σταθερότητας. Η τιμή pK_α της μετάβασης από CuLH₋₁ σε CuLH₋₂ είναι 4,57 είναι σε συμφωνία με την αντίστοιχη του συμπλόκου CuLH₋₂ για το hepsidin (4.47). Από την άλλη τιμή log K^{*} = -14.59, είναι συγκρίσιμη με αυτές αντίστοιχων συμπλόκων με πεπτίδια, όπου το ιόν Cu²⁺, εντάσσεται με το ιμιδαζολικό άζωτο της His, 2 αμιδικά άζωτα του πεπτιδικού σκελετού και ένα άτομο αζώτου της N-τελικής αμινομάδας (AAHAWGC(SMe)-NH₂ logK*=-14.95, AAHAWG-NH₂ logK*=-14,77, MDHam logK*=-15.03, DP1 logK*=-14.83) [118-120].

Από τα φασματοσκοπικά δεδομένα, η τιμή λ_{max} = 528 nm στο φάσμα ορατού πλησιάζει πολύ τη θεωρητικά υπολογιζόμενη με την βοήθεια της εξίσωσης Prenesti (λ_{max} = 536 nm) για ένταξη του Cu²⁺, σε ένα σύνολο ατόμων δοτών τύπου {N_{im}, 2N_{amide}, N_{amino}} και την πειραματική τιμή για 4N σύμπλοκα με την ίδια σφαίρα ένταξης (525 nm) [121]. Επομένως, συμπεραίνουμε πως η σφαίρα ένταξης είναι η ίδια.

Το τελευταίο σύμπλοκο CuLH₋₃ σχηματίζεται σε πολύ αλκαλικά διαλύματα. Η τιμή λ_{max} (UV-Vis) διαφέρει πολύ λίγο σε σχέση με τις αντίστοιχη του συμπλόκου CuLH₋₂ γεγονός που υποδεικνύει ότι υιοθετούν ίδιο τρόπο ένταξης 4N (N_{im}, 2N_{amide}, N_{amino}). Από την άλλη, η τιμή pK_α που οδηγεί στον σχηματισμό του CuLH₋₃ είναι pK_α = 11.18 και θα πρέπει να αποδοθεί στον ιοντισμό (αλλά όχι ένταξη) του πυρολικού πρωτονίου του ατόμου N1 του ιμιδαζολίου [122-123].

Θα πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ με το ιόν Cu(II) έχει μελετηθεί στο παρελθόν, υπό ελαφρά διαφορετικές συνθήκες [117]. Η σύνθεση και η μελέτη του από την ερευνητική μας ομάδα πραγματοποιήθηκε κυρίως για λόγους επιβεβαίωσης των βιβλιογραφικών δεδομένων και κυρίως σύγκρισης με το σύστημα H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ : Cu(II) -με το οποίο θα ασχοληθούμε στην επόμενη ενότητα- υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες.

Ακολουθεί η σχηματική αναπαράσταση της σφαίρας ένταξης του Cu(II) για τα κύρια σύμπλοκα που συζητήθηκαν (Σχήμα 31).



CuLH



CuLH₋₂

Σχήμα 31: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των συμπλόκων CuLH(τρεις προτάσεις) και CuLH₋₂ που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ με τα ιόντα Cu(II). Εμφανίζονται τα άτομα δότες και η πρόλευσή τους (αμινοξικά κατάλοιπα). Τα τόξα με διακεκομμένες γραμμές συμβολίζουν χηλικούς δακτυλίους και με συνεχείς τον πεπτιδικό σκελετό.

7.5. Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H2N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH2.

Για τη σύνθεση του πεπτιδίου H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (Σχήμα 32) εφαρμόστηκε και σε αυτήν την περίπτωση η μέθοδος της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield σύμφωνα με την Fmoc/tBu στρατηγική, ενώ το πεπτίδιο ταυτοποιήθηκε με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας (ESI-MS) και φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).



Σχήμα 32: Το πεπτίδιο H2N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH2

Το ποσό της πεπτιδορητίνης που συντέθηκε ήταν 2.0006 g και η απόδοση σύνθεσης 62.9%. Στη συνέχεια, μετά την αποκοπή της ρητίνης και των προστατευτικών ομάδων των παράπλευρων αλυσίδων των αμινοξέων, ελήφθησαν 0.4338 g πεπτιδίου με απόδοση αποκοπής από τη ρητίνη 69%.



Σχήμα 33: Ημι-παρασκευαστική RP-HPLC, σύστημα έκλουσης: (A) Η₂Ο/0.1% TFA, (B) CH₃CN/0.1% TFA από A/B: 100/0% σε A/B:50-50%

Ο καθαρισμός του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με ημί-παρασκευαστική RP-HPLC με σύστημα έκλουσης: (A) H₂O/0.1% TFA, (B) CH₃CN/0.1% TFA από A/B: 100/0% σε A/B:50-50%. Στο παραπάνω σχήμα (Σχήμα 33) παρατίθεται το σχετικό χρωματογράφημα.

Ο έλεγχος καθαρότητας-ταυτοποίηση του πεπτιδίου πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασματομετρίας μάζας HR ESI-MS. Το φασματογράφημα παρουσιάζεται στο σχήμα 34. Το σύμπλεγμα κορυφών σε τιμή m/z = 727.3893 amu αποδίδεται στο μοριακό ιόν [M+H⁺]⁺ (θεωρητική τιμή 727.3886 amu). Μικρές αποκλίσεις μεταξύ των θεωρητικών-πειραματικών τιμών οφείλονται στον τρόπο βαθμονόμησης (mass calibration) του οργάνου.



Σχήμα 34: Φάσμα μάζας ESI-MS του καθαρού πεπτιδίου H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (πάνω πειρματικό, κάτω θεωρητικά υπολογιζόμενο)

Με στόχο τον πλήρη χαρακτηρισμό του πεπτιδίου καταγράφηκαν επιπρόσθετα τα φάσματα ¹H (Σχήμα 35), ¹H -¹H COSY (Σχήμα 36),¹H -¹H TOCSY (Σχήμα 37) καθώς και το (¹H,¹³C)-HSQC (Σχήμα 38) σε διαλύτη H₂O : D₂O (9 : 1 v/v), pH=2.5, T=298 K. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των φασμάτων συνοψίζονται στον



πίνακα 12 και βρίσκονται σε συμφωνία με βιβλιογραφικές τιμές για παρόμοια πεπτίδια [114]-[116].

Σχήμα 35: Φάσμα ¹H-NMR του πεπτιδίου H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1, pH=2.5, T=298K



Σχήμα 36: Φάσμα ¹Η-¹H-COSY NMR του πεπτιδίου H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1, pH=2.5, T=298K



Σχήμα 37: Φάσμα ¹H-¹H-TOCSY NMR του πεπτιδίου H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1, pH=2.5, T=298K



Σχήμα 38: Φάσμα (¹H,¹³C)-HSQC NMR του πεπτιδίου H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂σε διάλυμα H₂O:D₂O 9:1, pH=2.5, T=298K

	αH	βН	γН	γCH ₂	CONH ₂	δΗ	H(2) _{im}	H(4) _{im}	NH	δNH₂
	_								_	
Asn	4.56	3.01			7.60-6.95				8.41	7.60
										6.95
Thr	3.95	1.75		0.86					8.28	
His	4.16	3.97					8.45	7.11	8.50	
		3.62								
Phe	4.79	3.09							8.21	
		2.80								
Pro	4.39	2.85		1.89		3.69			-	
		2.18				3.51				
lle	4.42	4.06	2.86	0.87					8.06	
			1.76							
CoNH ₂					7.59(trans)					
lle					7.04(cis)					

Πίνακας 12: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η (δ, ppm) του πεπτιδίου H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (pH = 2.5, T = 298K)
7.6. Αλληλεπίδραση των ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο H2N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH2

7.6.1. Ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις

7.6.1.1. Προσδιορισμός των τιμών pK_α του ελεύθερου πεπτιδίου

Το πεπτίδιο H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CoNH₂ περιέχει μόνο δύο ομάδες ικανές να ιοντιστούν και συνεπώς να τιτλοδοτηθούν σε περιοχή pH 2-12. Ειδικότερα, αυτές περιλαμβάνουν την N-τελική αμινομάδα του πεπτιδίου και το ιμιδαζολικό άτομο αζώτου N3 του καταλοίπου ιστιδίνης. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 13) δίνονται οι ολικές σταθερές πρωτονίωσης (logβ) καθώς και οι σταθερές ιονισμού (pK_α) των παραπάνω ομάδων, ενώ στο Σχήμα 39 παρουσιάζεται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων.

Πίνακας 13: Ολικές σταθερές πρωτονίωσης (logβ) και τιμές pK_{α} για το πεπτίδιο H_2N -Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CoNH₂ (T = 298K, I = 0.1M KNO₃)

Σωματίδια	logβ ()*	pK _α	Χαρακτηριστική ομάδα
L'H ₂	12.87 (1)	6.05	His-N _{im} H ⁺
ĽΉ	6.82 (1)	6.82	Asn-NH₃ ⁺

*τυπική απόκλιση x10⁻²



Σχήμα 39: Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του πεπτιδίου H2N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH2 (C = 1.1 mM)

Από το διάγραμμα κατανομής διακρίνεται ότι σε πολύ όξινες τιμές pH το πεπτίδιο βρίσκεται στην πλήρως πρωτονιωμένη του μορφή. Η αύξηση του pH του διαλύματος οδηγεί αρχικά στην αποπρωτονίωση του ατόμου N₃ του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης με pK_α = 6.05. Η τιμή pK_α που καταγράφεται είναι λίγο μικρότερη από τις αντίστοιχες τιμές για πεπτίδια που περιέχουν το αμινοξύ ιστιδίνη σε διάφορες θέσεις και φέρουν ελεύθερη N-τελική αμινομάδα (pK_α=6.2-6.7) [83],[117-119].

Η τελική διεργασία αποπρωτονίωσης αποδίδεται στην N-τελική αμινομάδα της ασπαραγίνης με pK_α = 6.82. Η τελευταία είναι μικρότερη σε σύγκριση με βιβλιογραφικές τιμές που αντιστοιχούν στον ιοντισμό της ίδιας ομάδας στα πεπτίδια όπως το hepsidin-25 (pK₃= 7.77) και των πεπτιδίων -GGHG-,-GGH-,MDH-am, MNHam, AAHAWG-NH₂, AAHAWGC(SMe)-NH₂ με τιμές pK₃ 8.1, 8.3, 7.63, 7.31, 7.94, 7.86 αντίστοιχα [83],[117-119]. Η διαφορά αυτή πιθανόν οφείλεται στην σταθεροποίηση της αποπρωτονιωμένης της μορφής (NH₂) μέσω δεσμού υδρογόνου που οδηγεί στον σχηματισμό 6-μελούς χηλικού δακτυλίου (αλληλεπίδραση του αμιδίου, CONH₂ της Asn με την N-τελική αμινομάδα), όπως προβλέπεται [60].

7.6.1.2. <u>Αλληλεπίδραση Cu(II) : πεπτίδιου H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-</u> <u>CONH₂</u>

Τα ποτενσιομετρικά δεδομένα από την τιτλοδότηση υδατικού διαλύματος του συστήματος Cu(II) : πεπτιδίου σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1.1, προσομοιώνονται ικανοποιητικά δεχόμενοι την ύπαρξη τριών διαφορετικών συμπλόκων, με στοιχειομετρία : CuL'H₋₁, CuL'H₋₂, CuL'H₋₃. Στον Πίνακα 14 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι ολικές σταθερές σχηματισμού των σχηματιζόμενων συμπλόκων χαλκού με το συγκεκριμένο πεπτίδιο, ενώ στο Σχήμα 40 δίνεται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (συμπλόκων) Cu(II), το οποίο προκύπτει με κατάλληλη επεξεργασία των θερμοδυναμικών δεδομένων.

Πίνακας 14: Ολικές σταθερές σχηματισμού (log β) και τιμές pK_a των συμπλόκων χαλκού με το πεπτίδιο H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (T = 298K, I = 0.1M KNO₃)

Σύμπλοκα	Logβ()*	pK _α **
CuL'H ₋₁	2.75 (3)	-
CuL'H ₋₂	-0.65 (1)	3.40
CuL'H₋₃	-11.54 (1)	10.89

*τυπική απόκλιση x10⁻² ** Για την αντίδραση CuLH_n \leftrightarrow CuLH_{n-1}+ H⁺



Σχήμα 40: Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του συστήματος Cu(II): H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-IIe-CONH₂ σε αναλογία 1:1.1 [Cu²⁺]= 1mM

Όπως φαίνεται και από το σχήμα, η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με το χαλκό ξεκινάει από πολύ χαμηλές τιμές (pH~4) και συνεχίζεται μέχρι pH=12. Το πολύ μεγάλο εύρος ύπαρξης του CuL'H₋₂ (σχεδόν σε όλη τη μετρήσιμη κλίμακα pH), αποτελεί μια πρώτη ένδειξη της πολύ μεγάλης θερμοδυναμικής του σταθερότητας.

7.7. Φαματοσκοπική μελέτη

7.7.1. Φασματοσκοπία UV-Vis

Για το χαρακτηρισμό των παραπάνω συμπλόκων χαλκού, καταγράφηκαν φάσματα ορατού, σε εύρος pH 3-12 και γραμμομοριακή αναλογία 1:1.3. Οι τιμές pH αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής για κάθε ένα και προκύπτουν από την επεξεργασία των ποτενσιομετρικών δεδομένων. Στον Πίνακα 15 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα δεδομένα που προκύπτουν μετά την επεξεργασία των φασμάτων.



Σχήμα 41: Φάσματα UV-Vis του συστήματος Cu(II)- H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-IIe-CONH₂ (1:1.3) σε διάφορες τιμές pH (T=298 K, I=0.1 (KNO₃))

Πίκανας 15: Φασματοσκοπικά δεδομένα ορατού (λ_{max},ε) του συστήματος Cu(II)-H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (1:1.3**)**

рН	λ _{max} (nm)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)
2.61	810	13.3
4.10	772.5	10.7
	529	30.7
7.26	528	102.3
11.0	528	104.6
11.8	526.5	106.2

Από τα παραπάνω δεδομένα καθίσταται εμφανής η μείωση της τιμής λ_{max} καθώς η τιμή pH αυξάνεται, ως αποτέλεσμα της σταδιακής αντικάστασης ατόμων Ο (H₂O) από άτομα δότες αζώτου στη σφαίρα ένταξης των ιόντων Cu(II) (αύξηση Δο).

7.8. Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τρια σύμπλοκα ανιχνεύθηκαν στην κλίμακα pH 3-12 και συγκεκριμένα τα στοιχειομετρίας CuL'H₋₁, CuL'H₋₂ και CuL'H₋₃.

Με βάση το διάγραμμα κατανομής παρατηρείται ότι το πεπτίδιο αλληλεπιδρά με το χαλκό από πολύ χαμηλές τιμές pH. Το πρώτο σύμπλοκο που σχηματίζεται για εύρος pH περίπου 3-6 είναι στοιχειομετρίας CuL'H₋₁. Λόγω της πολύ μικρής του συγκέντρωσης και επικάλυψης της καμπύλης κατανομής του με το επόμενο CuL'H₋₂, δεν είναι δυνατός ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός του. Παρόλα αυτά η τιμή logK* που υπολογίστηκε για αυτό (-10.12) είναι συγκρίσιμη με τιμές που χαρακτηρίζουν ένταξη τύπου 3N { NH₂, N_{amide}⁻, N_{im}, H₂O } (π.χ στο πεπτίδιο DP1, (logK*=-9.75)) [120].

Σε εύρος pH 4-12, παρατηρείται ο σχηματισμός του συμπλόκου CuL'H₋₂. Το συγκεκριμένο δεσμεύει το σύνολο των ιόντων Cu(II) στην περιοχή pH=5.5-9, ενώ είναι παρόν σε όλη τη μετρήσιμη κλίμακα pH (Σχήμα 40). Η τιμή pK_α της μετάβασης από CuLH₋₁ σε CuLH₋₂ είναι 4,57 η οποία είναι σε συμφωνία με την αντίστοιχη του συμπλόκου CuLH₋₂ για το hepcidin(4.47). Η τιμή logK* = -13.52, βρίσκεται εντός του εύρους αντίστοιχων τιμών που χαρακτηρίζουν ένταξη 4N { NH₂, 2N_{amide}⁻, N_{im},} σε σύμπλοκα Cu(II) με παρόμοια πεπτίδια τύπου ATCUN [118-120,124]. Παράλληλα είναι μια λογαριθμική μονάδα περίπου μεγαλύτερη σε σχέση με την αντίστοιχη του

πεπτιδίου με Ν-τελικό αμινοξύ το Asp (-14.59), ίδιου τρόπου ένταξης. Συνεπώς το εν λόγω σύμπλοκο είναι πολύ πιο θερμοδυναμικά σταθερό.

Τα θερμοδυναμικά δεδομένα βρίσκονται σε συμφωνία με τα φασματοσκοπικά όσον αφορά τη σφαίρα ένταξης του μετάλλου. Η τιμή λ_{max} = 528 nm στο φάσμα ορατού πλησιάζει πολύ τη θεωρητικά υπολογιζόμενη με την βοήθεια της εξίσωσης Prenesti (λ_{max} = 536 nm) για ένταξη του Cu²⁺, σε ένα σύνολο ατόμων δοτών τύπου {N_{im}, 2N_{amide}, N_{amino}} και την πειραματική τιμή για 4N σύμπλοκα με την ίδια σφαίρα ένταξης (525 nm) [121].

Το τελευταίο σύμπλοκο CuL'H₋₃ σχηματίζεται σε πολύ αλκαλικά διαλύματα. Οι φασματοσκοπικές παράμετροι (UV-Vis) των CuL'H₋₂ και CuL'H₋₃ είναι σχεδόν ίδιες, άρα πιθανώς ο τρόπος ένταξης δεν αλλάζει. Υδρόλυση ενταγμένου μορίου H₂O θα πρέπει να αποκλειστεί ως πηγή του επιπλέον πρωτονίου που ογκομετρείται, καθώς σε αυτή την περίπτωση θα παρατηρούσαμε ερυθρή μετατόπιση στο φάσμα ορατού. Από την άλλη, η τιμή pK_α που αντιστοιχεί στον σχηματισμό του CuLH₋₃ (από το CuL'H-2) είναι pK_α = 10.89 και πλησιάζει σε τιμές που έχουν αποδοθεί στον ιοντισμό (χωρίς) ένταξη) του πυρολικού (N1) πρωτονίου του ιμιδαζολίου [122-123]. Σχηματική αναπράσταση της πιθανής δομής του CuL'H₋₂ δίνεται στο Σχήμα 42.



CuL'H₋₂

Σχήμα 42: Σχηματική αναπαράσταση της πιθανής δομής του συμπλόκου CuL'H-2 που σχηματίζεται κατά την αλληλεπίδραση του πεπτιδίου H2N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH2=L' με το ιόν Cu(II). Εμφανίζονται τα άτομα δότες και η προέλευσή τους (αμινοξικά κατάλοιπα). Τα διακεκομμένα τόξα συμβολίζουν χηλικούς δακτυλίους.

<u>Κεφάλαιο 8</u>

Συμπεράσματα

Έχοντας υπόψην μας το μεγάλος πλήθος εφαρμογών συμπλόκων Cu(II) με πεπτίδια τύπου ATCUN (amino terminal copper and nickel binding), επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε έναν από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα δέσμευσης του μετάλλου από αυτά. Στόχος μας ήταν η βελτιστοποίηση της δεσμευτικής ικανότητας του ήδη μελετημένου πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂=L έναντι του Cu(II). Το συγκεκριμένο αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως ο πιο αποτελεσματικός μέχρι σήμερα υποκαταστάτης πεπτιδικού τύπου για το συγκεκριμένο μεταλλοϊόν [117]. Εργαζόμενοι προς αυτή την κατεύθυνση αποφασίσαμε μελετήσουμε ξανά την αλληλεπίδραση του ιδίου με το ιόν Cu(II) (υπό ελαφρά διαφορετικές σε σχέση με τις βιβλιογραφικά αναφερόμενες συνθήκες) καθώς και του H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂=L'. Το τελευταίο διαφέρει μόνο ως προς την φύση του Ν-τελικού αμινοξέος (Asn αντί Asp). Η απόφαση για την τροποποίηση αυτή βασίστηκε στην βιβλιογραφική διαπίστωση [60] πως η Asn στην θέση 1 της αλληλουχίας έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της τιμή pK_{α} ιοντισμού της ελεύθερης αμινομάδας και κατά συνέπεια μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όσον αφορά την αρχική δέσμευση του μετάλλου.

Αρχικά έλαβε χώρα η σύνθεση των πεπτιδικών μοντέλων και στην συνέχεια ο καθαρισμός (με χρωματογραφία HPLC) και χαρακτηρισμός τους (φασματομετρία μάζας και φασματοσκοπία NMR). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν ποτενσιομετρικές τιτλοδοτήσεις απουσία και παρουσία ιόντων Cu(II), οπότε προσδιορίστηκε το πλήθος, η στοιχειομετρία και η θερμοδυναμική σταθερότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων Cu(II). Για την επιβεβαίωση της προτεινόμενης σφαίρας ένταξης του μετάλλου όπως υποδεικνύεται από την επεξεργασία των θερμοδυναμικών δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία UV-Vis.

Ο προσδιορισμός των τιμών pK_α για την N-τελική αμινομάδα επιβεβαίωσε την βιβλιογραφική εκτίμηση ότι για το N-Asn πεπτίδιο αναμένεται μικρότερη τιμή (pK_α= 6.82 έναντι pK_α= 7.67 για το N-Asp). Και τα δυο αλληλεπιδρούν με τα ιόντα Cu(II) σε υδατικά διαλύματα πολύ αποτελεσματικά, οδηγώντας στον σχηματισμό μιας σειράς μονοπυρηνικών σωματιδίων (συμπλόκων) στην κλίμακα pH (3-12). Η συμπεριφορά και των δυο όσον αφορά τη συμπλοκοποίηση είναι η τυπική για πεπτίδια τύπου ATCUN [4]. Η αρχική ένταξη του μετάλλου πραγματοποιείται είτε από την N-τελική αμινομάδα είτε από το άτομο N(3) του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Για το πρώτο πεπτίδιο (L) δεν μπορεί να αποκλειστεί και η πιθανή συμμετοχή του β-καρβοξυλίου του ασπαρτικού.

Το μεγαλύτερου ενδιαφέροντος σύμπλοκο στοιχειομετρίας CuL(ή L')H₋₂ χαρακτηρίζεται από πολύ μεγάλο εύρος ύπαρξης (8-9 λογαριθμικές μονάδες) ενώ

επικρατεί αποκλειστικά στην περιοχή pH=5.5-9 (Σχήματα 29, 40). Τόσο τα θερμοδυναμικά (logK*) όσο και τα φασματοσκοπικά (UV-Vis) δεδομένα υποδεικνύουν ότι το ιόν Cu(II) αλληλεπιδρά ισχυρά με ένα σύνολο τεσσάρων ατόμων δοτών αζώτου τύπου {NH₂, 2N⁻, N_{im}} στο ισημερινό επίπεδο. Η σύγκριση των τιμών logK* (σταθεράς σχηματισμού των 4N συμπλόκων διορθωμένης ως προς την κατάσταση πρωτονίωσης των πεπτιδίων) επιβεβαιώνει την επιτυχία της πρόβλεψής μας σχετικά με την μεγαλύτερη θερμοδυναμική σταθερότητα του αναλόγου που φέρει ασπαραγίνη στην N-τελική θέση (logK* = -13.52 έναντι -14.59 (N-Asp). Όσον αφορά την τελευταία διεργασία αποπρωτονίωσης που οδηγεί στα σύμπλοκα στοιχειομετρίας CuL(ή L')H₋₃, αυτή αποδόθηκε στον ιοντισμό (χωρίς ένταξη του πυρρολικού τύπου ατόμου N1 του ιμιδαζολίου).

Η παρατηρούμενη μεγάλη διαφορά θερμοδυναμικής σταθερότητας των CuLH-² και CuL'H-² μας ώθησε να μελετήσουμε θεωρητικά ποια θα ήταν η κατανομή του ιόντος χαλκού(II) συναρτήσει της τιμής pH σε ένα υποθετικό σύστημα που περιέχει και τα δυο πεπτίδια σε ισομοριακή αναλογία. Το διάγραμμα που προκύπτει ονομάζεται διάγραμμα ανταγωνισμού (Σχήμα 43) και εξάγεται σχετικά εύκολα με αξιοποίηση των θερμοδυναμικών δεδομένων και των δυο συστημάτων



Σχήμα 43: Διάγραμμα ανταγωνισμού (competition diagram) για το σύστημα Cu-L-L' σε αναλογία 1:1.1:1.1 mM

Εξετάζοντας το Σχήμα 43 μπορούμε να προχωρήσουμε στις εξής διαπιστώσεις:

(α) Καλύτερη δεσμευτική ικανότητα του DTHFPI μέχρι τιμής pH 4. Πιθανότατα αυτό οφείλεται στην παρουσία της β-καρβοξυλομάδας του ασπαρτικού με δυνατότητα ένταξης στο ιόν Cu(II)

(β) Ελεύθερο ιόν Cu(II) δεν υφίσταται σε τιμή pH>5, γεγονός που υποδεικνύει την πολύ αποτελεσματική δέσμευσή του και από τα δυο πεπτίδια

(γ) Στην περιοχή pH 4-7.8 με μέγιστο σε τιμή pH 5.5, νικητής του ανταγωνισμού είναι σαφώς το πεπτίδιο NTHFPI. Η μικρότερη τιμή pK_α ιοντισμού της N-τελικής ομάδας του συγκεκριμένου (pK_α= 6.82) θα πρέπει να είναι ο λόγος της παρατηρούμενης συμπεριφοράς

(δ) Μετά το σημείο τομής (pH~7.8) παρατηρείται μικρή μεταβολή προς ώφελος του DTHFPI (pH 7.8-11.5). Σε αυτή την περιοχή pH η σφαίρα ένταξης του Cu(II) και με τα δυο πεπτίδια είναι η ίδια (4N), διαφέρουν δε μόνο στην παρουσία της καρβοξυλομάδας του ασπαρτικού. Πιθανότητα η τελευταία προσφέρει κάποιου είδους μικρή σταθεροποίηση, χωρίς να γνωρίζουμε τη φύση της

Συμπερασματικά συνθέσαμε και μελετήσαμε έναν πιο αποτελεσματικό (όσον αφορά την δέσμευση του ιόντος Cu(II)) πεπτιδικό υποκαταστάτη τύπου ATCUN σε σχέση με τον καλύτερο βιβλιογραφικά αναφερόμενο [117]. Πιστεύουμε ότι το 4Ν σύμπλοκό του θα μπορούσε να αξιοποιηθεί και σε χημικές-βιολογικές εφαρμογές. Προς αυτή την κατεύθυνση αναμένεται να κινηθούμε μελλοντικά.

Περίληψη

Έχοντας υπόψην μας το μεγάλος πλήθος εφαρμογών συμπλόκων Cu(II) με πεπτίδια τύπου ATCUN (amino terminal copper and nickel binding), επιχειρήσαμε να διερευνήσουμε έναν από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα δέσμευσης του μετάλλου από αυτά. Στόχος μας ήταν η βελτιστοποίηση της δεσμευτικής ικανότητας του ήδη μελετημένου πεπτιδίου H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂=L έναντι του Cu(II). Το συγκεκριμένο αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως ο πιο αποτελεσματικός μέχρι σήμερα υποκαταστάτης πεπτιδικού τύπου για το συγκεκριμένο μεταλλοϊόν. Εργαζόμενοι προς αυτή την κατεύθυνση αποφασίσαμε μελετήσουμε ξανά την αλληλεπίδραση του ιδίου με το ιόν Cu(II) (υπό ελαφρά διαφορετικές σε σχέση με τις βιβλιογραφικά αναφερόμενες συνθήκες) καθώς και του H_2 N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂=L'. Το τελευταίο διαφέρει μόνο ως προς την φύση του Ν-τελικού αμινοξέος (Asn αντί Asp). Η απόφαση για την τροποποίηση αυτή βασίστηκε στην βιβλιογραφική διαπίστωση πως η Asn στην θέση 1 της αλληλουχίας έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της τιμή pK_α ιοντισμού της ελεύθερης αμινομάδας και κατά συνέπεια μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όσον αφορά την αρχική δέσμευση του μετάλλου. Βρέθηκε πως και τα δυο πεπτίδια αλληλεπιδρούν ισχυρά με το ιόν Cu(II), σχηματίζοντας τα αναμενόμενα σύμπλοκα με σφαίρα ένταξης 4N {NH₂, 2N⁻, N_{im}} σε τιμή pH>6. Η σύγκριση της θερμοδυναμικής τους σταθερότητας αποκάλυψε πως το πεπτίδιο H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ δεσμεύει το ιόν Cu(II) αρκετά πιο αποτελεσματικά.

Abstract

Being aware of the vast chemical, biological and medicinal applications of Cu(II) complexes with ATCUN (amino terminal copper and nickel binding) type peptides, we decided to investigate one of the factors that influence Cu(II) binding affinity. Our goal was to optimize the already known Cu(II) binding capacity of the peptide H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-IIe-CONH₂. The latter has already been reported as the most effective Cu(II) ATCUN-type ligand to date. In this context, a combined potentiometric and spectroscopic study of the interaction of Cu(II) with both H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-IIe-CONH₂ and its N-terminus mutant H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-IIe-CoNH₂ was carried out. Replacement of Asp with Asn is expected to decrease the pK_{α} value of the free amino group and thus facilitate Cu(II) binding. It was found that both peptides interacted strongly with the Cu(II) ion, forming the expected 4N {NH₂, 2N⁻, N_{im}} type complexes at pH>6. A comparison of their thermodynamic stability revealed that the peptide H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-IIe-CONH₂ binds Cu(II) ion much more efficiently.

Βιβλιογραφία

[1] I. Sóvágó, C. Kállay, K. Várnagy, Coord. Chem. Rev, (2012), 256, 2225.

[2] H. Sigel, R.B. Martin, Chem. Rev. 82 (1982) 385.

[3] I. Sóvágó, Metal complexes of peptides and their derivatives, in: K. Burger (Ed.), Biocoordination Chemistry, Ellis Horwood, New York, (1990), p. 135.

[4] I. Sóvágó, K. Osz, Dalton Trans. (2006) 3841.

[5] H. Kozlowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, Coord. Chem. Rev. 184 (1999) 319.

[6] P. Surdy, P. Rubini, N. Buzás, B. Henry, L. Pellerito, T. Gajda, Inorg. Chem. 38 (1999) 346.

[7] I. Sóvágó, D. Sanna, A. Dessi, K. Várnagy, G. Micera, J. Inorg. Biochem. 63 (1996) 99.

[8] C.G. Ágoston, T. Kowalik-Jankowska, I. Sóvágó, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1999) 3295.

[9] H. Kozlowski, Inorg. Chim. Acta 31 (1978) 135.

[10] O. Yamauchi, A. Odani, M. Takani, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (2002) 3411.

[11] D. Sanna, C.G. Ágoston, G. Micera, I. Sóvágó, Polyhedron 20 (2001) 3079.

[12] C. Ágoston, Z. Miskolczy, Z. Nagy, I. Sóvágó, Polyhedron 22 (2003) 2607.

[13] A. Krezel, W. Bal, Acta Biochim. Pol. 46 (1999) 567.

[14] P.G. Daniele, E. Prenesti, G. Ostacoli, J. Inorg. Biochem. 61 (1996) 165.

[15] C. Kállay, K. Várnagy, I. Sóvágó, D. Sanna, G. Micera, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (2002) 92.

[16] L.D. Pettit, J.E. Gregor, H. Kozlowski, in: R.W. Hay, J.R. Dilworth, K.B. Nolan (Eds.), Perspectives on Bioinorganic Chemistry, vol. 1, JAI Press, London (1991), pp. 1–41.

[17] W. Bal, M. Dyba, H. Kozlowski, Acta Biochim. Pol. 44 (1997) 467.

[18] B. Decock-Le Reverend, L. Andrianarijaona, C. Livera, L.D. Pettit, I. Steel, H. Kozlowski, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1986) 2221.

[19] W. Bal, H. Kozlowski, G. Kupryszewski, Z. Maækiewicz, L.D. Pettit, R. Robbins, J. Inorg. Biochem. 52 (1993) 79.

[20] R.B. Martin, in: H. Sigel (Ed.), Metal Ions in Biological Systems, vol. 23, Marcel Dekker, New York, 1987, p. 123.

[21] O. Yamauchi, A. Odani, J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 5938.

[22] G. Liang, R. Tribolet, H. Sigel, Inorg. Chim. Acta 155 (1989) 273.

[23] L. Xiao, M. Jouini, B.T. Fan, G. Lapluye, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1990) 1137.

[24] B. Radomska, T. Kiss, J. Coord. Chem. 21 (1990) 81.

[25] L.D. Pettit, S.Pyburn, B. Decock-Le Reverend, A. Lebkiri, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1989) 235.

[26] T. Kiss, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1987) 1263.

[27] H. Kozlowski, B. Radomska, G. Kupryszewski, B. Lammek, C. Livera, L.D. Pettit, S. Pyburn, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1989) 173.

[28] W. Bal, H. Kozlowski, B. Lammek, L.D. Pettit, K. Rolka, J. Inorg. Biochem. 45 (1992) 193.

[29] T. Kowalik-Jankowska, H. Kozlowski, M. Stasiak, M.T. Leplawy, J. Coord. Chem. 40 (1996) 113

[30] T. Kowalik-Jankowska, M. Stasiak, M.T. Leplawy, H. Kozlowski, J. Inorg. Biochem. 66 (1997) 193.

[31] E. Chruscinska, G. Micera, D. Sanna, H. Kozlowski, K. Kaczmarek, J. Olejnik, M.T. Leplawy, J. Inorg. Biochem.

[32] T. Szabó-Plánka, Z. Árkosi, A. Rockenbauer, L. Korecz, Polyhedron 20 (2001) 995.[Tou 1]

[33] T. Kiss, Z. Szucs, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1986) 2443.

[34] B. Radomska, I. Sóvágó, T. Kiss, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1990) 289.

[35] L.D. Pettit, I. Steel, T. Kowalik, H. Kozlowski, M. Bataille, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1985) 1201.

[36] V. Jószai, I. Sóvágó, Polyhedron 30 (2011) 2114.

[37] W.J. Puspita, A. Odani, O. Yamauchi, J. Inorg. Biochem. 73 (1999) 203.

[38] L. Chruscinski, M. Dyba, M. Jezowska-Bojczuk, H. Kozlowski, G. Kupryszewski, Z. Mackiewicz, A. Majewska, J. Inorg. Biochem. 63 (1996) 49.

[39] L.D. Pettit, A.Q. Lyons, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1986) 499.

[40] B. Bóka, Z. Nagy, K. Várnagy, I. Sóvágó, J. Inorg. Biochem. 83 (2001) 77.

[41] K. Várnagy, B. Bóka, I. Sóvágó, D. Sanna, P. Marras, G. Micera, Inorg. Chim. Acta 275–276 (1998) 440.

[42] Cotton, F. A., Wilkinson, G., & amp; Gaus, P. L. (1995). Basic inorganic chemistry. John Wiley & Sons.

[43] Rubino, J. T., Chenkin, M. P., Keller, M., Riggs-Gelasco, P., Franz, K. J. (2011) Metallomics, 3(1), 61-73.

[44] Conradie, Inorg. Chim. Acta (2019), 486, 193-199.

[45] Halcrow, M. A., Chem. Soc. Rev. (2013), 42(4), 1784-1795.

[46] G. Brooks, L.D. Pettit, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1975) 2112.

[47] I. Sóvágó, E. Farkas, A. Gergely, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1982) 2159.

[48] I. Sóvágó, E. Farkas, A. Gergely, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1982) 2159-2163.

[49] T. Szabó-Plánka, N.V. Nagy, A. Rockenbauer, L. Korecz, Inorg. Chem. 41 (2002) 3483-3490.

[50] G. Facchin, M.H. Torre, E. Kremer, E.J. Baran, A. Mombrú, H. Pardo, et al., Inorg. Chim. Acta 355 (2003) 408-413.

[51] Imre Sóvágó, Katalin Várnagy, Norbert Lihi, Ágnes Grenács, Coordination Chemistry Reviews (2016), 327–328, 43–54.

[52] E. Farkas, I. Sóvágó, A. Gergely, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1983) 1545.

[53] D.L. Rabenstein, S.A. Daignault, A.A. Isab, A.P. Arnold, M.M. Shoukry, J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 6435.

[54] N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkar, Can. J. Chem. 54 (1976) 1309.

[55] E. Farkas, I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1984) 611.

[56] S.L. Best, T.K. Chattopadhyay, M.I. Djuran, R.A. Palmer, P.J. Sadler, I. Sóvágó, K. Várnagy, J. Chem. Soc., Dalton Trans. (1997) 2587.

[57] K. Osz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Di Natale, D. Sanna, G. Micera, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, Chem. Eur. J. 13 (2007) 7129.

[58] G. Di Natale, K. Osz, Z. Nagy, D. Sanna, G. Micera, G. Pappalardo, I. Sóvágó, E. Rizzarelli, Inorg. Chem. 48 (2009) 4239.

[59] I. Turi, C. Kállay, D. Szikszai, G. Pappalardo, G. Di Natale, P. De Bona, E. Rizzarelli, I. Sóvágó, J. Inorg. Biochem. 104 (2010) 885.

[60] P. Gonzalez, K. Bossak, E. Stefaniak, C. Hureau, L. Raibaut, W. Bal, P. Faller, Chem. Eur. J. (2018), 24, 8029 – 8041.

[61] M. Sokolowska, A. Krezel, M. Dyba, Z. Szewczuk, W. Bal, Eur. J. Biochem. (2002), 269, 1323.

[62] W. Bal, G. N. Chmurny, B. D. Hilton, P. J. Sadler, A. Tucker, J. Am. Chem. Soc. (1996), 118, 4727.

[63] L. D. Pettit, S. Pyburn, W. Bal, H. Kozlowski, M. Bataille, H. Kozlowski, J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1990), 240, 3565.

[64] M. Fçrster, H. Vahrenkamp, Chem. Ber. (1995), 128, 541.

[65] A. Krezel, J. Wjjcik, M. Maciejczyk, W. Bal, R. W. Jeanloz, D. Beyersmann, Chem. Commun. (2003), 95, 704.

[66] M. Jezowska-Bojczuk, P. Kaczmarek, W. Bal, K. S. Kasprzak, J. Inorg. Biochem. (2004), 98, 1770.

[67] W. Bal, M. Jezowska-Bojczuk, K. S. Kasprzak, Chem. Res. Toxicol. (1997), 10, 906.

[68] P. Młynarz, N. Gaggelli, J. Panek, M. Stasiak, G. Valensin, T. Kowalik-Jan-kowska,M. L. Leplawy, Z. Latajka, H. Kozłowski, Dalton Trans. (2000), 1033.

[69] T. Miyamoto, Y. Fukino, S. Kamino, M. Ueda, S. Enomoto, Dalton Trans. (2016), 45, 9436.

[70] T. Branch, P. Girvan, M. Barahona, L. Ying, Angew. Chem. Int. Ed. (2015), 54, 1227
 – 1230; Angew. Chem. 2015, 127, 1243.

[71] D. Płonka, W. Bal, Inorg. Chim. Acta (2017), 472, 76.

[72] J. Nagaj, K. Stokowa-Sołtys, I. Zawisza, M. Jezowska-Bojczuk, A. Bonna, W. Bal, J. Inorg. Biochem. (2013), 119, 85.

[73] K.P. Neupane, A.R. Aldous, J.A. Kritzer, J. Inorg. Biochem. (2014), 139, 65.

[74] C. Hureau, H. Eury, R. Guillot, C. Bijani, S. Sayen, P.-L. Solari, E. Guillon, P. Faller, P. Dorlet, Chem. Eur. J. (2011), 17, 10151.

[75] M. Mital, N. E. Wezynfeld, T. Fraczyk, M. Z. Wiloch, U. E. Wawrzyniak, A. Bonna,
C. Tumpach, K. J. Barnham, C. L. Haigh, W. Bal, Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 10460
–10464; Angew. Chem. (2015), 127, 10606.

[76] K. P. Neupane, A. R. Aldous, J. A. Kritzer, Inorg. Chem. (2013), 52, 2729.

[77] M. Z. Wiloch, I. Ufnalska, A. Bonna, W. Bal, W. Wroblewski, U. E. Wawrzyniak, J. Electrochem. Soc. (2017), 164, G77.

[78] Y. Jin, J. A. Cowan, J. Am. Chem. Soc. (2005), 127, 8408.

[79] M. Z. Wiloch, U. E. Wawrzyniak, I. Ufnalska, A. Bonna, W. Bal, S. C. Drew, W. Wroblewski, J. Electrochem. Soc. (2016), 163, G196.

[80] P. Gonzalez, B. Vileno, K. Bossak, Y. El Khoury, P. Hellwig, W. Bal, C. Hureau, P. Faller, Inorg. Chem. (2017), 56, 14870.

[81] D. Russino, E. McDonald, L. Hejazi, G. R. Hanson, C. E. Jones, ACS Chem. Neurosci. (2013), 4, 1371.

[82] S. Melino, L. Garlando, M. Patamia, M. Paci, R. Petruzzelli, J. Pept. Res. (2008), 66, 65.

[83] K. Kulprachakarn, Y. L. Chen, X. Kong, M. C. Arno, R. C. Hider, S. Srichairatanakool,S. S. Bansal, Journal of Biological Inorganic Chemistry, (2016), 21(3), 329.

[84] Z. Yu, J. A. Cowan, Chem. Eur. J. (2017), 23, 14113.

[85] E. Kimoto, H. Tanaka, J. Gyotoku, F. Morishige, L. Pauling, Cancer Res. (1983), 43, 824.

[86] C. M. Agbale, M. H. Cardoso, I. K. Galyuon, O. L. Franco, Metallomics (2016), 8, 1159.

[87] Z. Yu, M. Han, J. A. Cowan, Angew. Chem. Int. Ed. (2015), 54, 1901–1905, Angew. Chem. 2015, 127, 1921.

[88] A. Torrado, G. K. Walkup, B. Imperiali, J. Am. Chem. Soc. (1998), 120, 609.

[89] Y.-A. Choi, J. O. Keem, C. Y. Kim, H. R. Yoon, W. Do Heo, B. H. Chung, Y. Jung, Chem. Sci. (2015), 6, 1301.

[90] C. T. Mant, Y. Chen, Z. Yan, et al, Methods Mol. Biol., (2007), 386, 3.

[91] C. T. Mant, D. Cepeniene, R. S. Hodges, J. Sep. Sci., (2010), 33, 3005.

[92] Δημήτριος Γ. Θεμελής, Αναστασία-Στέλλα Ζώτου, Αναλυτική χημεία (2017).Εκδόσεις ΖΗΤΗ.

[93] Θ. Π. Χατζηιωάννου, Μ. Α. Κουππάρης, Ενόργανη Ανάλυση (2015).Εκδόσεις ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ.

[94] Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch, 7th edition, D. Skoog (2017).

[95] Gans P, Sabatini A, Vacca A., Talanta, (1996), 43, 1739.

[96] Darrell Ebbing, Steven D. Gammon, "General Chemistry", 10th Edition, (2013). Cengage Learning.

[97] F. Albert Cotton, G. Wilkinson, C. A. Murillo, M. Bochmann, Advanced Inorganic Chemistry, 6th edition, J. Willey, (1999).

[98] Δ. Κεσίσογλου, Π. Ακρίβος, Π. Ασλανίδης, Π. Καραφίλογλου, Α. Δενδρινού-Σαμαρά, Βιοσυναρμοστική Χημεία (2008).Εκδόσεις ΖΗΤΗ.

[99] E. Prenesti, P.G. Daniele, M. Prencipe, G. Ostacoli, Polyhedron (1999), 18, 3233.

[100] E. Prenesti, P. G. Daniele, S. Toso, Analytica Chimica Acta (2002), 459, 323-336.

[101] E. Prenesti, P. G. Daniele, S. Berto, S. Toso, Polyhedron (2006), 25, 2815-2823.

[102] Ν. Χατζηλιάδης, Φασματοσκοπικές και Βιοχημικές Μέθοδοι στη Βιοανόργανη Χημεία, Ιωάννινα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, (1999).

[103] C. Housecroft, A. Sharpe, Inorganic Chemistry, 4th edition (2012). Pearson

[104] Leroy G. Wade, Whitman College, Organic Chemistry, 8th Edition (2013). Pearson.

[105] S. Raghothama, "NMR of peptides", J. Indian Inst. Sci. (2010), 90, 145.

[106] K. Wüthrich, NMR of Proteins and Nucleic Acids, Willey (1986).

[107] G. C. K. Roberts, NMR of Macromolecules: A Practical Approach, Oxford University Press, (1993).

[108] Kaptein, R., et al., Biochem. J., (1989), 257, 197.

[109] Kurt Wuthtich, Biopolymers. (1983), 22, 131.

[110] Ann E. Ferentz and Gerhard Wagner, Quarterly Reviews of Biophysics, (2000), 33, 29.

[111] Ι. Δεληγιαννάκης, Ι. Γεροθανάσης, Ν. Χατζηλιάδης, "Μέθοδοι μαγνητικού συντονισμού", Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 1999.

[112] D. Klein, "Ογρανική Χημεία, Τόμος ΙΙ", 1η Ελληνική Έκδοση(2015).Εκδόσεις UTOPIA.

[113] B. Domon, R. Aebersold, "Mass spectrometry and protein analysis, Science", Science (2006), 312, 212.

[114] Μ. Ε. Μυλωνάς, Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα, (2003).

[115] M. Mylonas, A. Krezel, J. C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, W. Bal, Journal of Molec.Liq., (2005), 118, 119.

[116] M. Mylonas, A. Krezel, J. C. Plakatouras, N. Hadjiliadis, W. Bal, Inorg. Chim. Acta, (2002), 399, 60.

[117] D. Płonka, W. Bal, Inorg. Chim. Acta (2018), 472, 76.

[118] K. Bossaka, S. C. Drewb, E. Stefaniaka, D. Płonkaa , A. Bonnac , W. Bal, J. Inorg. Biochem., (2018), 182, 230.

[119] M. Perinelli, R. Guerrini, V. Albanese, et al., J.Inorg.Biochem. (2020), 205, 110980.

[120] M. Peana, E. Gumienna-Kontecka, F. Piras, M. Ostrowska, K. Piasta, K. Krzywoszynska, S. Medici, and M. A. Zoroddu, Inorg. Chem. (2020), 59, 4661.

[121] R. Kotuniak, M. J. F. Strampraad, K. Bossak-Ahmad, U. E. Wawrzyniak, I. Ufnalska, P. Hagedoorn, and W. Bal, Angew. Chem. (2020), 132, 11330.

[122] D. Sanna, G. Micera, C. Kállay, V. Rigó and I. Sóvágo, Dalton Trans., (2004),2702.

[123] M. A. Zoroddu, T. Kowalik-Jankowska, S. Medici, M. Peana and H. Kozlowski,

Dalton Trans., (2008), 6127.

[124] J. Heinrich, K. Bossak-Ahmad, M. Riisom, H. H. Haeri, T. R. Steel, V. Hergl, A. Langhans, C. Schattschneider, J. Barrera, S. M. F. Jamieson, M. Stein, D. Hinderberger, C. G. Hartinger, W. Bal, and N. Kulak, Chem. Eur. J. (2021), 27, 18093.