

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

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

Συνεισφορά στην βελτιστοποίηση θερμοδυναμικών παραμέτρων 4Ν συμπλόκων Cu(II) με πεπτίδια που φέρουν το αμινοξύ ιστιδίνη για χρήση σε βιολογικές και ιατρικές εφαρμογές



Διαμάντη Εύα, Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

Διατριβή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ» της κα Εύα Διαμάντη.

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Γεράσιμος Μαλανδρίνος

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

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

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

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.

Ο/Η Γραμματέας

Καθηγητής Σ. Χατζηκακού

Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του τμήματος Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Δι-ιδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Π.Μ.Σ.) «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» κατά τη χρονική περίοδο 2020-2023.

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

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στα μέλη της Μονάδας Περιβαλλοντικής, Οργανικής και Βιοχημικής Ανάλυσης Υψηλής Ευκρίνειας-ORBITRAP-LC-MS για την λήψη των φασμάτων μάζας, καθώς και στο Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Επιπλέον, οφείλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη συνάδελφο μου και υποψήφια Διδάκτορα Δήμητρα Κυριάκου. Τόσο η υποστήριξή της, όσο οι συμβουλές της για την περάτωση των πειραμάτων και τη συγγραφή της εργασίας ήταν πολύτιμες και καθοριστικές. Παράλληλα, ευχαριστώ από καρδιάς τη συνάδελφο υποψήφια Διδάκτορα Βασιλική Μουλασιώτη, που με τις γνώσεις και τη ψυχολογική στήριξή της διευκόλυνε την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τους φίλους και συναδέλφους του εργαστηρίου, Περικλή Παπαδόπουλο και υποψήφιο Διδάκτορα Δημήτρη Γλυκό για την εξαιρετική συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας στους οποίους εύχομαι τα καλύτερα σε προσωπικό και επαγγελματικό επίπεδο.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, τους γονείς μου και τον αδελφό μου, καθώς και στους φίλους μου που με στηρίζουν έμπρακτα σε κάθε βήμα και επιλογή μου. Η πίστη και η εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου, μου έδειξαν το δρόμο και με συντρόφευαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

1	Εισα	γωγή1					
	1.1	Μεταβατικά στοιχεία	1				
	1.2	Μεταλλικά ιόντα και ο βιολογικός τους ρόλος	2				
	1.3	Βιοχημικός ρόλος χαλκού Cu(II)	3				
	1.4	Φυσικοχημικές ιδιότητες χαλκού Cu	3				
2	Αμιν	οξέα-Πεπτίδια	6				
	2.1	Αμινοξέα	6				
	2.2	Πεπτίδια	8				
	2.3	Πεπτιδική σύνθεση	9				
	2.3.1	Σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα	10				
	2.3.2	Σύνθεση πεπτιδίων στη στερεά φάση (Solid Phase Peptide Synthesis-SPPS)	10				
	2.3.3	Το στερεό υπόστρωμα	11				
	2.3.4	Προστατευτικές ομάδες	12				
	2.3.5	Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού	13				
	2.3.6	Μέθοδος των καρβοδιϊμιδίων	14				
	2.3.7	Τελική αποπροστασία και απομάκρυνση του πεπτιδίου από το πολυμερές	. 14				
3	Μετα	αλλικά ιόντα και πεπτίδια	15				
3	Μετα 3.1	ιλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια	15 15				
3	Μετα 3.1 3.2	ιλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων	15 15 15				
3	Μετα 3.1 3.2 3.3	ιλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων	15 15 15 16				
3	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1	ιλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη	15 15 15 16 17				
3	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1 3.3.2	αλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη Σχηματισμός 2Ν συμπλόκων.	15 15 15 16 17 17				
3	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3	αλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη Σχηματισμός 2Ν συμπλόκων Σχηματισμός 3Ν και 4Ν συμπλόκων	15 15 16 17 17 18				
3	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4	αλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη Σχηματισμός 2Ν συμπλόκων Σχηματισμός 3Ν και 4Ν συμπλόκων Αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη	15 15 16 17 17 18 18				
3	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 Μοτά	αλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη Σχηματισμός 2Ν συμπλόκων Σχηματισμός 3Ν και 4Ν συμπλόκων Αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη	15 15 16 17 17 18 18 21				
3	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 Μοτί 4.1	αλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη Σχηματισμός 2Ν συμπλόκων Σχηματισμός 3Ν και 4Ν συμπλόκων Αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη βο ATCUN	15 15 15 16 17 17 17 18 18 21				
3	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 Μοτί 4.1 4.2	ελλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη Σχηματισμός 2Ν συμπλόκων Σχηματισμός 3Ν και 4Ν συμπλόκων Αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη βο ATCUN Δομή ATCUN	15 15 15 16 17 17 17 18 18 21 21				
3	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 Moτi 4.1 4.2 4.3	ελλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη Σχηματισμός 2Ν συμπλόκων Σχηματισμός 3Ν και 4Ν συμπλόκων Αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη βο ATCUN Βιολογικός ρόλος. Σχεδιασμός συνθετικών παραγώγων ATCUN.	15 15 15 16 17 17 17 18 18 21 21 21				
3	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 Μοτί 4.1 4.2 4.3 4.4	ιλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη Σχηματισμός 2Ν συμπλόκων Σχηματισμός 3Ν και 4Ν συμπλόκων Αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη βο ATCUN Βιολογικός ρόλος Σχεδιασμός συνθετικών παραγώγων ATCUN	15 15 15 16 17 17 17 18 21 21 21 22 23				
3 4 5	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 Moτí 4.1 4.2 4.3 4.4 £ψιδ	αλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη Σχηματισμός 2Ν συμπλόκων Σχηματισμός 3Ν και 4Ν συμπλόκων Αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη Δομή ΑΤCUN Βιολογικός ρόλος Σχεδιασμός συνθετικών παραγώγων ΑTCUN Αλληλεπίδραση ΑTCUN με μεταλλικά ιόντα	15 15 15 16 17 17 17 18 21 21 21 22 23 25				
3 4 5	Μετα 3.1 3.2 3.3 3.3.1 3.3.2 3.3.3 3.4 Μοτί 4.1 4.2 4.3 4.4 4.3 4.4 5.1	αλλικά ιόντα και πεπτίδια Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων Αρχική ένταξη Σχηματισμός 2Ν συμπλόκων Σχηματισμός 3Ν και 4Ν συμπλόκων Αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη βο ATCUN Βιολογικός ρόλος Σχεδιασμός συνθετικών παραγώγων ATCUN Αλληλεπίδραση ATCUN με μεταλλικά ιόντα άνη-25.	15 15 15 16 17 17 17 18 18 21 21 21 22 23 25				

6	Εφα	ρμογές συμπλόκων πεπτιδίων τύπου ΑΤCUN-Cu(II) στη βιολογία και ιατρική	28
	6.1	Διάσπαση βιομορίων	28
	6.2	Εφαρμογές με βάση τη φωταύγεια	29
	6.3	Ενίσχυση αντιμικροβιακής δράσης	31
	6.4	Δέσμευση και απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων	32
7	Στόχ	ος της εργασίας	33
8	Πειρ	αματική πορεία	35
	8.1	Σύνθεση πεπτιδίων	35
	8.2	Χαρακτηρισμός πεπτιδίων	40
	8.2.1	Φασματοσκοπία NMR	40
	8.2.2	Φασματομετρία μάζας ESI-MS	43
	8.2.3	Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού(UV-Vis)	44
	8.3	Ποτενσιομετρία	50
	8.3.1	Πειραματική πορεία ποτενσιομετρίας	53
9	Απο	τελέσματα	55
	9.1	Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H2N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH2	55
	9.2 αλληλε	Ποτενσιομετρική μελέτη του πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ και της πίδρασής του με το ιόν Cu(II)	61
	9.2.1 Pro-l	. Προσδιορισμός τιμών logβ και pK _α του ελεύθερου πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Ph le-CONH₂	e- 61
	9.2.2 Pro-l	2 Ποτενσιομετρική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H ₂ N-Arg-Lys-His-Phe- le-CONH ₂	63
	9.3 Ile-CON	Φασματοσκοπική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro IH₂)- 64
	9.4 His-Phe	Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων για το σύστημα Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Arg-Ly e-Pro-Ile-CONH₂	/s- 66
	9.5	Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H2N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH2	67
	9.6 αλληλε	Ποτενσιομετρική μελέτη του πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ και της πίδρασής του με το ιόν Cu(II)	74
	9.6.1 Pro-l	. Προσδιορισμός τιμών logβ και pK _α του ελεύθερου πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Ph le-CONH₂	ie- 74
	9.6.2 Pro-l	2 Ποτενσιομετρική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe- le-CONH₂	75
	9.7 Ile-CON	Φασματοσκοπική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pr IH₂	o- 77

12	Βιβλιογραφία	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
11	Περίληψη	
10	Συμπεράσματα	
His-	Phe-Pro-Ile-CONH ₂	
9.8	Επεξεργασία πειραμ	τικών δεδομένων για σύστημα Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-

1 Εισαγωγή

1.1 Μεταβατικά στοιχεία

Στοιχεία μετάπτωσης ονομάζονται όλα τα χημικά στοιχεία που βρίσκονται μεταξύ των Κύριων Ομάδων ΙΙ και ΙΙΙ και ανήκουν στον d τομέα του Περιοδικού Πίνακα, όπως φαίνεται και στην εικόνα 1. Πρόκειται για 40 στοιχεία, εκ των οποίων τα 29 είναι φυσικά και τα υπόλοιπα τεχνητά. Όλα τα φυσικά μεταβατικά στοιχεία είναι, ανεξαιρέτως, μέταλλα, σκληρά στερεά με υψηλά σημεία τήξεως (πλην λίγων εξαιρέσεων), ελατά, όλκιμα και καλοί αγωγοί του ηλεκτρικού ρεύματος. Στις σημαντικές περιοδικές τάσεις των στοιχείων περιλαμβάνονται η ατομική και ιοντική ακτίνα, η ενέργεια ιοντισμού, η ηλεκτραρνητικότητα, ο μεταλλικός χαρακτήρας και η χημική δραστικότητα. [1]



Εικόνα 1: Θέση στοιχείων μετάπτωσης στο Περιοδικό Πίνακα. [2]

Εκτός από τη βιομηχανική σημασία τους, η οποία είναι σπουδαία, πολλά μέταλλα μετάπτωσης έχουν και σημαντική βιολογική σημασία. Παραδείγματος χάριν, ο σίδηρος(Fe) που υπάρχει στην αιμοσφαιρίνη είναι απαραίτητος για τη μεταφορά οξυγόνου στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ το κοβάλτιο(Co) απαντάται στη βιταμίνη B₁₂ η οποία εμπλέκεται στο μεταβολισμό των κυττάρων. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντική δράση έχουν ο χαλκός(Cu), το νικέλιο(Ni)και ο ψευδάργυρος(Zn), αφού αποτελούν συστατικά πολλών ενζύμων, τα οποία δρουν ως καταλύτες σε σημαντικές βιολογικές

αντιδράσεις. Η αιμοσφαιρίνη, η βιταμίνη Β12 και τα μεταλλοένζυμα είναι παραδείγματα σύμπλοκων ενώσεων ή αλλιώς ενώσεων ένταξης, στις οποίες το μέταλλο περιβάλλεται από άλλα άτομα ενωμένα με αυτό μέσω ηλεκτρονικών ζευγών[1], [2].

1.2 Μεταλλικά ιόντα και ο βιολογικός τους ρόλος

Μέσα σε μισό περίπου αιώνα, η χημεία ένταξης από μια περιορισμένη επιστημονική περιοχή, έχει αναπτυχθεί στο ενεργό πεδίο έρευνας της ανόργανης χημείας. Οι ενώσεις ένταξης αποτελούν μια από τις σπουδαιότερες κατηγορίες ενώσεων με ζωτικής σημασίας τον ρόλο τους στα βιολογικά συστήματα, ο οποίος οδήγησε στη δημιουργία της βιοανόργανης χημείας, ενός ελκυστικού και ταχέως αναπτυσσόμενου τομέα έρευνας [3].

Τα μεταλλικά ιόντα των μετάλλων μετάπτωσης είναι βασικοί συμπαράγοντες για πρωτεΐνες, δηλαδή συνδέονται ομοιοπολικά και αποτελούν το κέντρο της καταλυτικής τους δράσης. Παρέχουν πολυάριθμες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της μεταφοράς ηλεκτρονίων και της αντιοξειδωτικής δράσης [3]. Ωστόσο, κάποιες φορές μπορούν να καταστούν επιβλαβή για τον οργανισμό.

Πρώτον, τα οξειδοαναγωγικά ενεργά μεταλλικά ιόντα, όπως ο χαλκός και ο σίδηρος, μπορούν να διευκολύνουν το σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) όπως π.χ ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου και να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη σε πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια. Δεύτερον, μπορούν να συνδεθούν με διαφορετικό τρόπο σε αμινοξικά κατάλοιπα, αντικαθιστώντας τα ήδη υπάρχοντα ιόντα σε ενεργές θέσεις ενζύμων ή βασικές δομικές θέσεις, οδηγώντας σε μη σωστή βιολογική συμπεριφορά ή λάθος αναδίπλωση της πρωτεΐνης. Συνεπώς, οι συγκεντρώσεις των μεταλλικών ιόντων στο εσωτερικό των κυττάρων θα πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά για να διασφαλιστεί ότι αυτά παρέχονται σε βασικές μεταλλοπρωτεΐνες και μεταλλοένζυμα, αλλά δεν συσσωρεύονται φτάνοντας σε τοξικά επίπεδα [3].

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 έχει ανακαλυφθεί ένας αριθμός συστημάτων ομοιόστασης μετάλλων τόσο σε ευκαρυωτικούς όσο και σε

2

προκαρυωτικούς οργανισμούς. Η κατανόηση αυτών των συστημάτων σε μοριακό επίπεδο είναι ένα θεμελιώδες πρόβλημα στην ανόργανη βιολογική χημεία αφού ένας μεγάλος αριθμός ανθρώπινων ασθενειών συνδέεται και με ελλείψεις μετάλλων [3].

1.3 Βιοχημικός ρόλος χαλκού Cu(II)

Ο χαλκός (Cu) είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για το ανθρώπινο σώμα γιατί βοηθά στην εκτέλεση διαφόρων βιολογικών λειτουργιών, όπως στην απορρόφηση σιδήρου, στη σύνθεση αιμοσφαιρίνης και στην ενεργοποίηση των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας. Επιπλέον, συμβάλλει στη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος, ενώ στα βιολογικά συστήματα είναι μέρος του ενεργού κέντρου πρωτεΐνών και ενζύμων [4], [5], [6].

Ο χαλκός είναι ένα οξειδοαναγωγικά ενεργό μέταλλο μετάπτωσης και οι δύο κύριες οξειδωτικές καταστάσεις που εμφανίζεται είναι +2 και +1. [5] Ο τρόπος ένταξής του με ένζυμα ή πρωτεΐνες πραγματοποιείται με τη βοήθεια κατάλληλων ατόμων δοτών Ν, Ο, ή S των αμινοξικών καταλοίπων ιστιδίνης (ιμιδαζόλιο), ασπαρτικού/γλουταμικού οξέος, κυστεΐνης/μεθειονίνης, αντίστοιχα [4]. Αν και η αντίδραση οξειδοαναγωγής (Cu(II)/Cu(I)) είναι θεμελιώδους σημασίας για τη βιολογική δραστικότητα ενός μεγάλου αριθμού ενζύμων, μπορεί να γίνει εξαιρετικά επικίνδυνη αν δεν ρυθμίζεται με ακρίβεια. Για τους λόγους αυτούς, τα ιόντα χαλκού δεν μπορούν να κυκλοφορήσουν ελεύθερα. [5]

Η ικανότητα των ιόντων του να συμμετέχουν σε οξειοαναγωγικές διεργασίες (μεταφορά οξυγόνου, ηλεκτρονίων, αντιοξειδωτική δράση, κλπ) εξηγεί την ύπαρξη του στο ενεργό κέντρο πολυάριθμων μεταλλοενζύμων και μεταλλοπρωτεϊνών και παράλληλα το σημαντικό βιολογικό του ρόλο. [7], [8], [9]

1.4 Φυσικοχημικές ιδιότητες χαλκού Cu

Ο χαλκός Cu είναι μέταλλο με ατομικό αριθμό 29 και στοιχείο της πρώτης σειράς μετάπτωσης του d-τομέα του περιοδικού πίνακα με ηλεκτρονιακή διαμόρφωση [Ar]3d¹⁰4s¹. Λόγω της διαμόρφωσης αυτής, ο χαλκός έχει υψηλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, ενώ είναι αρκετά εύπλαστος. Η d-υποστιβάδα είναι πλήρως

συμπληρωμένη και δε συμμετέχει στις διατομικές αλληλεπιδράσεις του, στις οποίες κυριαρχούν τα s ηλεκτρόνια. Επίσης, ο Cu έχει υψηλό σημείο τήξης (1084,6°C) εξαιτίας της συμμετοχής των ηλεκτρονίων της d υποστιβάδας στον μεταλλικό δεσμό. Όπως αναφέρθηκε, είναι ένα οξειδοαναγωγικά ενεργό μέταλλο μετάπτωσης και οι δύο κύριες οξειδωτικές καταστάσεις που εμφανίζεται είναι +2 και +1. [10], [11], [12]

Τα ιόντα του μονοσθενούς χαλκού Cu(I), με ηλεκτρονιακή διαμόρφωση [Ar]3d¹⁰, είναι διαμαγνητικά χωρίς μονήρη ηλεκτρόνια, ενώ είναι σχετικά ασταθή σε υδατικά διαλύματα μετατρεπόμενα μέσω αντίδρασης αυτοοξειδοναγωγής σε Cu(II) και Cu. Όσον αφορά τη χημεία ένταξης του μονοσθενούς χαλκού, τα σύμπλοκα του χαρακτηρίζονται συνηθέστερα είτε από αριθμό ένταξης 2 γραμμικής γεωμετρίας ή από αριθμό ένταξης 4, τα οποία εμφανίζονται συχνότερα, τετραεδρικής γεωμετρίας. Ως μαλακά οξέα, τα ιόντα Cu(I) προτιμούν τη δημιουργία συμπλόκων με μαλακές βάσεις ως υποκαταστάτες, όπως ομάδες με άτομα δότες S ή άτομα δότες N (π.χ. άτομα N Nτελικής αμινομάδας ή ιμιδαζολικού δακτυλίου ιστιδίνης). [11], [12]

Τα ιόντα του δισθενούς χαλκού Cu(II), με ηλεκτρονιακή διαμόρφωση [Ar]3d⁹, είναι παραμαγνητικά με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Έτσι, τα σύμπλοκα του Cu(II) είναι πολύ σταθερότερα σε υδατικά διαλύματα από ότι τα αντίστοιχα του Cu(I), ενώ η οξείδωση του Cu(II) σε Cu(III) είναι ιδιαίτερα δύσκολη. Οι κυριότεροι αριθμοί ένταξης των ιόντων του δισθενούς χαλκού είναι 4, 5 και 6, με τις γεωμετρίες των σχηματιζόμενων συμπλόκων να είναι επίπεδη τετραγωνική ή παραμορφωμένη τετραεδρική, τετραγωνική πυραμίδα και παραμορφωμένη οκταεδρική, αντίστοιχα. Ωστόσο, λόγω της d⁹ (t_{2g}⁶e_g³) διαμόρφωσης του Cu(II), παρατηρείται το φαινόμενο Jahn-Teller που οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκων με τετραγωνικά παραμορφωμένη οκταεδρικής γεωμετρίας. Πιο συγκεκριμένα αναμένεται ο σχηματισμός τεσσάρων δεσμών μετάλλου υποκαταστάτη (Cu-L) στο επίπεδο και επιμήκυνση ή βράχυνση των δύο αξονικών δεσμών όπως φαίνεται στην εικόνα 2: [11], [12], [13]

4



Εικόνα 2: Παραμορφώσεις Jahn-Teller οκταεδρικών d⁹ συμπλόκων του Cu(II). Αριστερά της κλασσικής οκταεδρικής γεωμετρίας (O_h), το παράδειγμα βράχυνσης των δύο αξονικών δεσμών Cu-L και δεξιά της επιμήκυνσης. [12]

Τα ιόντα Cu(II) συμπεριφέρονται ως «ενδιάμεσα οξέα» σύμφωνα με τη θεωρία μαλακών/σκληρών οξέων, δηλαδή εμφανίζουν προτίμηση σε υποκαταστάτες με άτομα δότες N (π.χ. αμίνες, αμινοξέα, πεπτίδια) ή άτομα δότες O (π.χ. καρβοξυλικά οξέα). Παρ' όλα αυτά, έχει αποδειχτεί η προτίμηση του Cu(II) να σχηματίζει σύμπλοκα με άτομα δότες N έναντι ατόμων O, καθώς τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα παρουσιάζουν ιδιαίτερη θερμοδυναμική σταθερότητα. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν και τα πεπτίδια, όπου σε συγκεκριμένες περιοχές pH ευνοείται η αποπρωτονίωση των αμιδικών ατόμων αζώτου. Η σειρά δραστικότητας τον ατόμων δοτών που υφίστανται σε ένα πεπτίδιο αναφορικά με τη συμπλοκοποίηση των ιόντων Cu(II) είναι το άζωτο (N) της N-τελικής αμινομάδας > N₃ ιμιδαζολίου ιστιδίνης >>> Αμιδικά άτομα αζώτου πεπτιδικών δεσμών. [10], [11], [14]

2 Αμινοξέα-Πεπτίδια

2.1 Αμινοξέα

Αμινοξύ ονομάζεται ένα οργανικό μόριο το οποίο αποτελείται από μια βασική αμινομάδα (–NH₂), μια ομάδα καρβοξυλίου (–COOH) και μια οργανική ομάδα R (ή πλευρική αλυσίδα) που είναι μοναδική για κάθε αμινοξύ (Εικόνα 2). Κάθε μόριο περιέχει ένα κεντρικό άτομο άνθρακα (C), που ονομάζεται α-άνθρακας, στο οποίο συνδέονται τόσο η αμινο ομάδα όσο και η καρβοξυλική ομάδα. Οι άλλοι δύο δεσμοί του ατόμου άνθρακα περιλαμβάνουν ένα άτομο υδρογόνου (H) και την ομάδα R, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 3 [15].



Εικόνα 3: Γενική δομή ενός αμινοξέος [15].

Τα αμινοξέα λειτουργούν ως δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες καταλύουν τη συντριπτική πλειοψηφία των χημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στο κύτταρο, ενώ παρέχουν πολλά από τα δομικά στοιχεία ενός κυττάρου και βοηθούν στη σύνδεση των κυττάρων σε ιστούς. Τα αμινοξέα είναι απαραίτητα για όλα τα έμβια όντα, από τα μικρόβια μέχρι τον άνθρωπο (εικόνα 4) [15].



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση θέσεων εύρεσης αμινοξέων στη φύση [16].

Τα αμινοξέα αποτελούν περίπου το 20% του σώματός μας ή περίπου το 50% της στερεής του μάζας (εικόνα 5). Είναι το επόμενο μετά το νερό συστατικό όσον αφορά την ποσότητα. Από συνδυασμό των 20 αμινοξέων σε επαναλαμβανόμενες αλυσίδες ποικίλου μήκους προκύπτουν οι 100.000 πρωτεΐνες που συναντώνται στους έμβιους οργανισμούς [16].



Εικόνα 5: Ποσοστό εύρεσης αμινοξέων στον ανθρώπινο οργανισμό [16].

2.2 Πεπτίδια

Τα πεπτίδια είναι μικρές ή μεγαλύτερες αλυσίδες αμινοξέων που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς. Ως εκ τούτου, εμπίπτουν στις ευρείες χημικές κατηγορίες βιολογικών πολυμερών και ολιγομερών. Τα αμινοξέα απ' τα οποία αποτελούνται συχνά ονομάζονται αμινοξικά κατάλοιπα ή υπολείμματα. Όλα τα πεπτίδια εκτός από τα κυκλικά διαθέτουν ένα Ν-τελικό (ομάδα αμίνης) άκρο και ένα C-τελικό (ομάδα καρβοξυλίου) (εικόνα 6). [17]



Εικόνα 6: Σχηματισμός διπεπτιδίου [17].

Ένα πεπτίδιο που περιέχει περισσότερα από περίπου πενήντα αμινοξέα είναι γνωστό ως πρωτεΐνη. Οι πρωτεΐνες αποτελούνται από ένα ή περισσότερα πολυπεπτίδια διατεταγμένα με βιολογικά λειτουργικό τρόπο, συχνά συνδεδεμένα με υποκαταστάτες όπως συνένζυμα και συμπαράγοντες, ή σε άλλη πρωτεΐνη ή άλλο μακρομόριο όπως DNA ή RNA, ή σε πολύπλοκα μακρομοριακά συγκροτήματα. [17]



Εικόνα 7: Από το αμινοξύ στην πρωτεΐνη [18].

Τα πεπτίδια συντίθενται με σύζευξη της καρβοξυλικής ομάδας ή του C-άκρου ενός αμινοξέος με την αμινομάδα ή το N-άκρο ενός άλλου. Λόγω της πιθανότητας ανεπιθύμητων αντιδράσεων, η προστασία με κατάλληλες ομάδες των παράπλευρων ομάδων είναι συνήθως απαραίτητη. Η χημική σύνθεση πεπτιδίου ξεκινά στο C- και τερματίζει στο N-τελικό άκρο.

2.3 Πεπτιδική σύνθεση

Από τα πρώτα βήματα τη πεπτιδικής σύνθεσης, δύο ήταν οι απαιτήσεις για τη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού: η ενεργοποίηση του καρβόξυ- άκρου και η προστασία κάθε άλλης ομάδας που δε συμμετέχει στη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού αλλά μπορεί να τον επηρεάσει με κάποιο τρόπο. Η τελευταία απαίτηση δεν αναφέρεται μόνο στην προστασία της καρβόξυ- ομάδας του ενός αμινοξέος και της αμινομάδας του ενεργοποιημένου αμινοξέος, αλλά και σε κάθε άλλη παράπλευρη αλυσίδα αμινοξέων [19], [20].

Έτσι, η πεπτιδική σύνθεση περιγράφεται ως μια διαδικασία πολλών σταδίων, που περιλαμβάνουν τη σύνθεση προστατευμένων τμημάτων αμινοξέων, την ενεργοποίηση του καρβόξυ- άκρου του ενός αμινοξέος, τη σύζευξή τους και τέλος την απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση πεπτιδίων και μικρών πρωτεϊνών είναι οι εξής:

- Σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα
- ii. Ενζυμική σύνθεση
- iii. Χημική σύζευξη τμημάτων πεπτιδίων-μικρών πρωτεϊνών
- iv. Σύνθεση πεπτιδίων σε στερεά φάση με τη χρήση πεπτιδικών τμημάτων
- ν. Σύνθεση σε στερεή φάση

2.3.1 Σύνθεση πεπτιδίων σε διάλυμα

Η σύνθεση των πεπτιδίων σε διάλυμα περιλαμβάνει την κλασική οργανική σύνθεση, όπου η επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας γίνεται στην υγρή φάση. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή τη μεθόδου είναι η προστασία όλων των δραστικών ομάδων που περιέχουν τα προς σύζευξη αμινοξέα πλην της αμινομάδας και της καρβοξυλομάδας που συμμετέχουν στη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού. Τα στάδια της σύνθεσης είναι τα εξής [19]:

- 1. Προστασία της αμινομάδας
- 2. Ενεργοποίηση καρβοξυλίου του Ν-προστατευμένου καρβόξυ αμινοξέος
- 3. Σχηματισμός του πεπτιδικού δεσμού
- Εκλεκτική αποπροστασία της α-αμινο- ή α-καρβόξυλο- προστατευτικής ομάδας
 και ανάπτυξη της πεπτιδικής αλυσίδας
- 5. Επανάληψη των βημάτων 2,3 και 4
- 6. Συνένωση πεπτιδικών τμημάτων

Έπειτα από την ολοκλήρωση της σύνθεσης, απομακρύνονται όλες οι προστατευτικές ομάδες και το ελεύθερο πεπτίδιο καθαρίζεται και ταυτοποιείται με φυσικοχημικές μεθόδους. Παρόλο που το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι μπορεί να συντεθούν μεγάλες ποσότητες, σήμερα είναι ελάχιστες οι περιπτώσεις που χρησιμοποιείται ως μέθοδος σύνθεσης πεπτιδίου.

2.3.2 Σύνθεση πεπτιδίων στη στερεά φάση (Solid Phase Peptide Synthesis-SPPS)

Το 1962 ο B. Merrifield εισήγαγε μια μέθοδο σύνθεσης πεπτιδίων σύμφωνα με την οποία τα α-αμινο και παράπλευρα προστατευμένα αμινοξέα προστίθενται πάνω σε ένα αδιάλυτο πολυμερές υπόστρωμα. Η σύνθεση στη στερεά φάση έχει αντικαταστήσει σχεδόν πλήρως την κλασική μέθοδο σύνθεσης σε διάλυμα λόγω των παρακάτω πλεονεκτημάτων [21]:

- Απλοποιεί και επιταχύνει τη σύνθεση, γιατί όλες οι αντιδράσεις γίνονται στο ίδιο δοχείο.
- Σε κάθε στάδιο δεν είναι απαραίτητη η απομόνωση και ο καθαρισμός των ενδιάμεσων προϊόντων.
- Σε κάθε βήμα της σύνθεσης χρησιμοποιείται περίσσεια αντιδραστηρίων, ώστε οι αντιδράσεις να είναι ποσοτικές και οι αποδόσεις στα προϊόντα μεγάλες.
- Νροβλήματα που έχουν να κάνουν με τη δυσδιαλυτότητα του αναπτυσσόμενου
 μορίου στους χρησιμοποιούμενους διαλύτες μειώνονται σημαντικά.

Η πορεία σύνθεσης περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Στο κατάλληλα ενεργοποιημένο υπόστρωμα προσδένεται το πρώτο αμινοξύ. Με αυτόν τον τρόπο το στερεό υπόστρωμα δρα ως καρβόξυ προστατευτική ομάδα του αμινοξέος.
- 2. Απομάκρυνση της προστασίας της N_{α} -αμινομάδας.
- 3. Σύζευξη του εισερχόμενου ενεργοποιημένου αμινοξέος με το πρώτο αμινοξύ.
- Επανάληψη των βημάτων μέχρι να γίνει η πλήρης ανάπτυξη της πεπτιδικής αλυσίδας.
- Τότε, απομακρύνονται όλες οι προστατευτικές ομάδες και το πεπτίδιο παραλαμβάνεται από το πολυμερές υπόστρωμα.

Η σύνθεση των πεπτιδίων σε στερεά φάση γίνεται κυρίως ακολουθώντας δυο στρατηγικές, ανάλογα με το είδος προστασίας της Ν_α-αμινομάδας. Η μια βασίζεται στην ευαίσθητη στα οξέα Boc-ομάδα ενώ η άλλη στην Fmoc-ομάδα που είναι ευαίσθητη στις βάσεις.

2.3.3 Το στερεό υπόστρωμα

Η βασική αρχή της σύνθεσης πεπτιδίων σε στερεή φάση είναι η σύνθεση του αναπτυσσόμενου πεπτιδίου πάνω σε ένα στερεό υπόστρωμα. Έτσι, απαιτείται προσεκτική επιλογή του πολυμερούς υποστρώματος, η οποία γίνεται με τα παρακάτω κριτήρια [21]:

- i. Τη μηχανική αντοχή του πολυμερούς
- ii. Την ικανότητα διόγκωσης στους διαλύτες που χρησιμοποιούνται και
- Την ευκολία πρόσβασης των αντιδραστηρίων σύνθεσης σε όλα τα ενεργά του σημεία.

Από διάφορα πολυμερή που υπάρχουν διαθέσιμα, ευρεία χρήση έχουν βρει το διασταυρωμένο πολυστυρένιο και οι πολυακρυλοαμιδικές ρητίνες. Σε αυτά τα πολυμερή εξασφαλίζεται μεγάλη ταχύτητα των αντιδράσεων, η οποία με τη σειρά της οφείλεται στην εύκολη διάχυση των αντιδραστηρίων μεταξύ των διογκωμένων από το διαλύτη σφαιρικού σχήματος κόκκων του πολυμερούς.

2.3.4 Προστατευτικές ομάδες

Η επιτυχής σύνθεση ενός πεπτιδίου απαιτεί την κατάλληλη προστασία όλων των ενεργών ομάδων των αμινοξέων. Οι προστατευτικές ομάδες της α-αμινομάδας διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες [21]:

- 1. Ομάδες που απομακρύνονται με οξέα
- 2. Ομάδες που απομακρύνονται με βάσεις
- 3. Ομάδες που απομακρύνονται με ειδικά αντιδραστήρια

Οι πιο γνωστές άμινο- προστατευτικές ομάδες είναι η Boc-, η Fmoc- και η Bsmoc- όπως φαίνονται στον πίνακα 1: Πίνακας 1: Οι πιο γνωστές αμινο- προστατευτικές ομάδες και χημικές τους ιδιότητες

Ομάδα	Απομάκρυνση	Σταθερότητα		
	50% TFA/CH ₂ Cl ₂	1% TFA, πιπεριδίνη		
Ο	20%(v/v) πιπεριδίνη σε DMF	Οξέα(ΤΓΑ)		
ο 1,1-Διοξοβενζο[b]θειοφαιν-2- υλμεθυλοξυκαρβονυλο- (Bsmoc-)	20%(v/v) πιπεριδίνη σε DMF	Οξέα(ΤΓΑ)		

Από τις παραπάνω ομάδες, η περισσότερο εύχρηστη είναι η προστατευτική ομάδα Fmoc. Αυτή απομακρύνεται σε βασικές συνθήκες με διάλυμα πιπεριδίνης 20% v/v σε διαλύτη DMF, ενώ μπορεί να συνδυαστεί με προστατευτικές ομάδες παράπλευρων ομάδων (π.χ τύπου t-Bu), οι οποίες είναι ευαίσθητες στα οξέα και σταθερές σε βασικό περιβάλλον [21].

2.3.5 Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού

Στην πεπτιδική σύνθεση, ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται με την αντίδραση του ενός αμινοξέος της μιας αμινομάδας και του ενεργοποιημένου καρβοξυλίου του άλλου, σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για να κριθεί μια μέθοδος ενεργοποίησης κατάλληλη θα πρέπει να εξασφαλίζει [21]:

- 1. Γρήγορη αντίδραση σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού και υψηλές αποδόσεις
- Απουσία παράπλευρων αντιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης της ρακεμοποίησης,
- 3. Ευκολία στην απομάκρυνση των παραπροϊόντων.

Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί η μέθοδος των ακυλαλογονιδίων, των ενεργών εστέρων, των ανυδριτών των αζιδίων, των καρβοδιϊμιδίων και των αλάτων της ουρίας. Ας εστιάσουμε στη μέθοδο των καρβοδιϊμιδίων.

2.3.6 Μέθοδος των καρβοδιϊμιδίων

Τα αντιδραστήρια αυτά προκαλούν την ενεργοποίηση του καρβοξυλίου του αμινοξέος, με σκοπό το σχηματισμό του πεπτιδικού δεσμού σε ήπιες συνθήκες. Οι κυριότερες ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι Ν,Ν'-δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμιδιο(DCC) και το Ν,Ν'-διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμιδιο(DIC) οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως στην πεπτιδική σύνθεση(εικόνες 8 και 9).



Εικόνα 8: Τα πιο σημαντικά καρβοδιϊμίδια DCC και DIC [21].



Εικόνα 9: Γενική αντίδραση σύζευξης [21]

Γενικά τα καρβοδιϊμίδια παρέχουν ταχείες και αποδοτικές συζεύξεις, ενώ παράλληλα είναι εύκολα διαθέσιμα και εύχρηστα αντιδραστήρια. Παρόλο που υπάρχουν κάποιες παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη χρήση τους, αυτές περιορίζονται με επιτυχία με τη χρήση ειδικών αντιδραστηρίων. Τέτοια αντιδραστήρια είναι βοηθητικά πυρηνόφιλα, όπως το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο(HOBt), το οποίο πλεονεκτεί έναντι των υπολοίπων, αφού στην περίπτωση αυτή ο πεπτιδικός δεσμός σχηματίζεται ταχύτερα.

2.3.7 Τελική αποπροστασία και απομάκρυνση του πεπτιδίου από το πολυμερές

Η τελική αποπροστασία και απομάκρυνση του πεπτιδίου από το πολυμερές είναι μια εξίσου σημαντική διαδικασία με τα στάδια που αναφέρθηκαν παραπάνω. Οι μόνιμες προστατευτικές ομάδες απομακρύνονται και στις δυο στρατηγικές απομάκρυνσης, Fmoc και Boc, χρησιμοποιώντας οξέα διαφορετικής ισχύος.

Τα πλέον χρησιμοποιούμενα είναι το ΗF και το TFA, με το τελευταίο να χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στην Fmoc στρατηγική. Η τελευταία έχει επικρατήσει της Boc, λόγω των ηπιότερων συνθηκών τελικής απόσπασης του πεπτιδίου από το πολυμερές [21].

3 Μεταλλικά ιόντα και πεπτίδια

3.1 Σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια

Η συστηματική μελέτη συμπλόκων μετάλλων-πεπτιδίων ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1960. Οι πρώτες αναφορές έδειξαν ότι διάφορα μεταλλικά ιόντα μπορούσαν να προάγουν την αποπρωτονίωση των ατόμων αζώτου των πεπτιδικών δεσμών, με αποτέλεσμα την ένταξή τους και το σχηματισμό σταθερών συμπλόκων. [13] [22], [23], [24], [25]

Τα πεπτίδια είναι πολύ αποτελεσματικοί και συχνά επιλεκτικοί υποκαταστάτες. Γενικά, ο τρόπος ένταξης μεταλλικών ιόντων με αυτά εξαρτάται από την ικανότητα του ιόντος να προκαλεί αποπρωτονίωση σε γειτονικά, ως προς την ομάδα από την οποία θα αρχίσει η ένταξη, αμιδικά άτομα αζώτου. Το ποιά θα είναι η ομάδα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πρωτοταγή δομή του πεπτιδίου. Έτσι, σε φυσικά πεπτίδια, δηλαδή πεπτίδια που αποτελούνται από συνδυασμούς αμινοξέων, ο πρωτεύων υποκαταστάτης μπορεί να είναι το άτομο αζώτου της Ν-τελικής αμινομάδας, το ιμιδαζολικό άζωτο ενός καταλοίπου ιστιδίνης ή το άτομο θείου μιας κυστεΐνης. [22], [23], [24]

3.2 Βασικές αρχές της χημείας ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων

Η δομή ενός απλού τετραπεπτιδίου απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα (εικόνα 10), όπου παρουσιάζονται οι πιθανές περιοχές σύνδεσης, συμπεριλαμβανομένου του C- και Ν-τελικού άκρου (κόκκινο),του αμιδίου (μπλε) καθώς και πιθανών ατόμων δοτών της πλευρικής αλυσίδας (πράσινο). [22]

15



Εικόνα 10: Η δομή ενός απλού τετραπεπτιδίου [22]

Τα μεταλλικά ιόντα δεν εντάσσονται ισχυρά στα πεπτίδια μέσω του C- τελικού άκρου. Αντίθετα, η ένταξη μέσω της N-τελικής αμινομάδας είναι πιο αποτελεσματική αφού οδηγεί στον σχηματισμό ενός πενταμελούς χηλικού δακτυλίου με το άτομο καρβονυλίου του πεπτιδικού δεσμού.

Παράλληλα, οι τελικές άμινο- και καρβοξυλικές ομάδες είναι πολύ μακριά η μία από την άλλη για να σχηματίσουν έναν σταθερό χηλικό δακτύλιο ακόμη και στην περίπτωση των απλούστερων διπεπτιδίων. Από την άλλη πλευρά, η τελική αμινομάδα βρίσκεται στην κατάλληλη θέση ώστε να σχηματίσει χηλικό δακτύλιο τόσο με τα άτομα δότη καρβονυλίου (οξυγόνο, Ο) όσο και του αμιδικού αζώτου Ν του πεπτιδικού δεσμού του επόμενου αμινοξέος. [22]

3.3 Βασικοί τρόποι ένταξης δισθενών μεταλλικών ιόντων

Στην εικόνα 11 παρουσιάζονται οι διαφορετικοί τρόποι ένταξης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων χωρίς βασικές-όξινες παράπλευρες ομάδες συναρτήσει της τιμής pH του διαλύματος. Πιο συγκριμένα:



Εικόνα 11: Διαφορετικοί τρόποι ένταξης του δισθενούς χαλκού(Cu⁺²) [24]

3.3.1 Αρχική ένταξη

Η πιο κοινή μορφή δέσμευσης δισθενούς μετάλλου-πεπτιδίου (π.χ. χαλκός (ΙΙ), νικέλιο (ΙΙ), ψευδάργυρος (ΙΙ), κοβάλτιο (ΙΙ), κ.λπ.) είναι ο σχηματισμός ενός 5-μελούς χηλικού δακτυλίου μέσω της Ν-τελικής αμινομάδας σε συνδυασμό με την ύπαρξη σε ευνοϊκή θέση για ένταξη του Ο της καρβονυλομάδας του πεπτιδικού δεσμού, δηλαδή τον τρόπο ένταξης (ΝΗ₂,CO),(εικόνα 11α) [24]

3.3.2 Σχηματισμός 2N συμπλόκων

Η τερματική αμινομάδα είναι σε θέση χηλίωσης με το άτομο αζώτου του πεπτιδικού δεσμού CONH. Η αρχική ένταξη ενός μεταλλοιόντος στην πρώτη (αμινομάδα) έχει ως αποτέλεσμα την προαγωγή της αποπρωτονίωσης και συνακόλουθης ένταξης του ατόμου αζώτου του πεπτιδικού δεσμού ακόμα και σε όξινες τιμές pH (η τιμή pH που θα συμβεί αυτό συναρτάται με τη φύση του μεταλλοϊόντος). Ο χαλκός (II) είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά μέταλλα για τέτοιου τύπου ένταξη, όπως φαίνεται στην εικόνα 11β, (σχηματισμός 2N συμπλόκου τύπου (NH₂,N⁻,COO⁻) με δυο 5-μελείς χηλικούς δακτυλίους). [24]

3.3.3 Σχηματισμός 3Ν και 4Ν συμπλόκων

Τα πεπτίδια με ελεύθερο αμινοτελικό άκρο είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί υποκαταστάτες για τη δέσμευση χαλκού (ΙΙ), νικελίου (ΙΙ), παλλαδίου(ΙΙ), σε αντίθεση με εκείνα στα οποία το N-τελικό άκρο είναι μη διαθέσιμο (προστατευμένο). Στην περίπτωση που το υπό μελέτη πεπτίδιο περιλαμβάνει περισσότερους του ενός πεπτιδικούς δεσμούς η αύξηση της τιμής pH του διαλύματος έχει ως αποτέλεσμα την αποπρωτονίωση και συνακόλουθη ένταξη και άλλων αμιδικών ατόμων δοτών έως ότου κορεστεί η σφαίρα ένταξης στο ισημερινό επίπεδο (4 άτομα δότες). Έτσι σχηματίζονται σύμπλοκα τύπου 3N (NH₂,2N⁻,) ή/και 4N (NH₂,3N⁻) που περιλαμβάνουν συγχωνευμένους 5μελείς χηλικούς δακτυλίους (εικόνες 11γ,δ). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές pK_α που αντιστοιχούν στις παραπάνω διεργασίες εξαρτώνται τόσο από την φύση του μεταλλοιόντος όσο και του πεπτιδίου. [24], [26], [27]

Οι παραπάνω γενικές πορείες συμπλοκοποίησης μπορούν να διαφοροποιηθούν όταν η αμονοξική αλληλουχία περιλαμβάνει αμινοξέα με όξινες/βασικές παράπλευρες ομάδες και κυρίως στην περίπτωση ύπαρξης ενός ή περισσοτέρων καταλοίπων ιστιδίνης όπως θα δούμε πιο κάτω.

3.4 Αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη

Οι μελέτες της αλληλεπίδρασης μεταλλικών ιόντων-πεπτιδίων που περιλαμβάνουν το αμινοξύ ιστιδίνη σε διάφορες θέσεις είναι εκτεταμένες λόγω της υψηλής συχνότητας παρουσίας του δεσμού μετάλλου-ατόμου αζώτου του ιμιδαζολίου της His (M-N_{im}) στα ενεργά κέντρα των μεταλλοπρωτεϊνών. Στην ενότητα αυτή θα αναφερθούμε μόνο σε πεπτιδικά μόρια που περιλαμβάνουν ένα κατάλοιπο ιστιδίνης σε διάφορες θέσεις. [22], [23], [28].

Για πεπτίδια με ιστιδίνη στη θέση-1 και ελεύθερο Ν-τελικό άκρο, τα άτομα δότες αζώτου, αμινο- και ιμιδαζολίου (Ν_{im}), μπορούν να σχηματίσουν έναν εξαμελή χηλικό δακτύλιο (ένταξη τύπου ισταμίνης). Η παραπάνω τύπου ένταξη έχει ως αποτέλεσμα την καθυστέρηση του ιοντισμού και ένταξης των αμιδικών ατόμων δοτών

18

σε υψηλότερες τιμές pH εφόσον αυτά είναι διαθέσιμα. Η παρουσία περίσσειας πεπτιδίου, οδηγεί στον σχηματισμό του δις χηλικού συμπλόκου (1:2) [22],[23],[28].

Για πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στη θέση-2 (αλληλουχίες τύπου X-His-Y), κυριαρχεί ή ένταξη τύπου 3N (NH₂,N⁻,N_{im}) με σχηματισμό πενταμελών-εξαμελών χηλικών δακτυλίων σε φυσιολογική τιμή pH (εικόνα 12). Η ένταξη ξεκινά από το άζωτο του N-τελικού άκρου με συμμετοχή και του οξυγόνου της καρβονυλομάδας του πρώτου πεπτιδικού δεσμού, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός 5-μελούς χηλικού δακτυλίου. Έπειτα, ιοντίζεται και εντάσσεται το αμιδικό άτομο N του πρώτου πεπτιδικού δεσμού με παράλληλη συμμετοχή του N_{im} του ιμιδαζολικού δακτυλίου, οπότε σχηματίζεται ένας δεύτερος 6-μελής χηλικός δακτύλιος. Ο σχηματισμός του θερμοδυναμικά σταθερού 3N συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα την διευκόλυνση του ιοντισμού και ένταξης του πρώτου πεπτιδικού ατόμου αζώτου και την παραμπόδιση των υπολοίπων [23], [28].



Εικόνα 12: Το επικρατών 3Ν σύμπλοκο Cu²⁺ με πεπτίδια που περιλαμβάνουν ιστιδίνη στη θέση 2 της αμινοξικής αλληλουχίας [28]

Τα πεπτίδια που περιέχουν ιστιδίνη στη θέση-3 (αλληλουχίες X-Y-His-) σχηματίζουν τα πιο θερμοδυναμικά σταθερά σύμπλοκα με μεταλλικά ιόντα. Συγκεκριμένα, παρατηρείται παράλληλη ένταξη των Ν-τελικής αμινομάδας, αμιδικού ατόμου Ν του πρώτου πεπτιδικού δεσμού, του αμιδικού ατόμου Ν του δεύτερου πεπτιδικού δεσμού και τέλος του ιμιδαζολικού ατόμου Ν_{im} (N3) της ιστιδίνης (εικόνα 13). Το προκύπτον 4Ν σύμπλοκο (NH₂, 2N⁻, N_{im}) χαρακτηρίζεται από μεγάλη θερμοδυναμική σταθερότητα, ως αποτέλεσμα της ύπαρξης δύο 5-μελων και ενός 6μελούς χηλικών δακτυλίων. Ουσιαστικά είναι το μοναδικό χημικό είδος στο διάλυμα σε τιμές pH>6. [23], [27]-[31].



Εικόνα 13: Το επικρατών 4Ν σύμπλοκο Cu²⁺ με πεπτίδια που περιλαμβάνουν ιστιδίνη στη θέση 3 της αμινοξικής αλληλουχίας [28]

Τέλος, όταν η ιστιδίνη βρίσκεται στη C-τελική θέση ή σε ενδιάμεση θέση που απέχει αρκετά από το άμινο τελικό άκρο και το τελευταίο δεν είναι διαθέσιμο (προστατευμένο, π.χ ακέτυλο παράγωγο) αναμένεται να ακολουθείται η πορεία α-β-γδ, όπως φαίνεται στην εικόνα 14. Πιο συγκεριμένα η αρχική ένταξη πραγματοποιείται στο Ν₃ του ιμιδαζολίου ακολουθούμενη από την διαδοχική αποπρωτονίωση-ένταξη αμιδικών ατόμων δοτών προς το N-τελικό άκρο εως ότου επέλθει ο κορεσμός της σφαίρας ένταξης στο ισημερινό επίπεδο.



Εικόνα 14: Πορεία συμπλοκοποίησης πεπτιδίων που περιλαμβάνουν ιστιδίνη σε ενδιάμεση ή Cτελική θέση και Ν-τελικό άκρο προστατευμένο [22]

4 Μοτίβο ATCUN

4.1 Δομή ATCUN

Κατά τη δεκαετία του 1960, αρχικά στην πρωτεΐνη HSA(Human Serum Albumin) και έπειτα σε πολλές άλλες πρωτεΐνες όπως η BSA(Bovine Serum Albumin) και η εψιδίνη(Hepcidin-25), βρέθηκε ένα συγκεκριμένο δομικό μοτίβο που σχετίζεται με την αλληλουχία των αμινοξέων στο Ν-τελικό άκρο[31]. Το μοτίβο αυτό ονομάζεται **ATCUN** και είναι μια δομική περιοχή των πρωτεϊνών όπου για αυτή τόσο ο δισθενής χαλκός Cu(II) αλλά και το δισθενές νικέλιο Ni(II) παρουσιάζουν εξαιρετική συγγένεια. Το μοτίβο ATCUN περιλαμβάνει [32]:

- 1. Μια ελεύθερη αμινομάδα στο τελικό άκρο,
- 2. Ένα κατάλοιπο ιστιδίνης(His) στην τρίτη θέση της αμινοξικής ακολουθίας και,
- 3. Δυο ενδιάμεσα πεπτιδικά άτομα αζώτου.

Δηλαδή έχει την παρακάτω δομή, όπου Χ,Ζ οποιοδήποτε αμινοξύ:

NH₂-Xxx-Zzz-His (XZH)

Το μοτίβο ATCUN έχει βρεθεί σε πολλές ανθρώπινες πρωτεΐνες και ένζυμα. Η μελέτη και η κατανόηση του ρόλου του σε βιολογικά συστήματα κρίθηκε απαραίτητη. Προς την κατεύθυνση αυτή, η σύνθεση μοντέλων του και η μελέτη των αλληλεπιδράσεων τους με μεταλλικά ιόντα παρείχε σημαντικές πληροφορίες. [31], [32]

4.2 Βιολογικός ρόλος

Η δέσμευση μεταλλικών ιόντων στο άκρο ATCUN έχει παρατηρηθεί σε πολλές πρωτεΐνες ή βιολογικά σχετιζόμενα πεπτίδια, γεγονός που διαδραματίζει αξιοσημείωτο ρόλο στην ομοιόσταση των μετάλλων υπό φυσιολογικές συνθήκες. Τέτοια παραδείγματα είναι:

HSA(Human Serum Albumin): είναι πρωτεΐνη που συμμετέχει στη μεταφορά χαλκού στο αίμα, ενώ διαδραματίζει ρόλο στην ομοιόστασή του στον άνθρωπο μέσω της δέσμευσης του στο μοτίβο ATCUN [33]

21

- <u>Histatin</u>: είναι πεπτίδιο που ανήκει στην κατηγορία των AMP's, παρουσιάζει δηλαδή αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η ένταξη του με μεταλλικά ιόντα Cu(II) οδηγεί σε ενίσχυση της αντιμικροβιακής δράσης. [34]
- <u>Hepcidin-25(Εψιδίνη-25</u>): είναι πεπτίδιο με την βοήθεια του οποίου ρυθμίζεται μεταξύ άλλων, η εξωκυττάρια ποσότητα σιδήρου. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι η δέσμευση δισθενών ιόντων χαλκού στο άκρο ATCUN είναι υπεύθυνη για την ομοιόσταση του σιδήρου στα θηλαστικά [33]

4.3 Σχεδιασμός συνθετικών παραγώγων ATCUN

Οι βασικές παράμετροι που λαμβάνονται υπόψιν για τον σχεδιασμό μοτίβων ATCUN είναι η στερεοχημεία, η θέση στην αλληλουχία αλλά και το φορτίο των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων που περιλαμβάνουν. Η αρχή που ακολουθείται για το σχεδιασμό τους είναι η εισαγωγή διάφορων αμινοξέων με ποικίλους συνδυασμούς στην πρώτη και δεύτερη θέση στην αλληλουχίας H₂N-X-X-His. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι παράπλευρες ομάδες των αμινοξέων που προηγούνται της ιστιδίνης(His) επηρεάζουν σημαντικά τη δράση και τη συγγένεια δέσμευσης του μετάλλου αλλά δεν συμμετέχουν άμεσα στην ένταξή του. [32], [35]

Έτσι, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν διάφορα συνθετικά παράγωγα ATCUN με εισαγωγή διαφορετικών αμινοξέων στην πρώτη και δεύτερη θέση της αμινοξικής αλληλουχίας χρησιμοποιώντας:

- i. Το πιο απλό αμινοξύ Gly
- ii. Υδρόφοβα και αρωματικά αμινοξέα (Phe και Tyr)
- iii. Υδρόφιλα και ουδέτερα αμινοξέα (Asn και Thr)
- iv. Υδρόφιλα και αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (Val και Asp)
- v. Υδρόφιλα και θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Arg και Lys)
- vi. Αλλαγή από L- σε D- αμινοξέα

Εν συνεχεία μελετήθηκε η αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με αυτά. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η προσθήκη υδρόφιλων και θετικά φορτισμένων αμινοξέων, όπως η Lys και η Arg, στην πρώτη και δεύτερη θέση του μοτίβου ATCUN ενισχύει τη συγγένεια δέσμευσης των δισθενών μετάλλων και ιδιαίτερα του χαλκού(II), ενώ η εισαγωγή αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων, όπως το Asp και το Glu, οδηγεί σε μειωμένη συγγένεια του μετάλλου. Επιπλέον, ογκώδεις και υδρόφοβες παράπλευρες ομάδες των αμινοξικών καταλοίπων στις θέσεις 1 και 2 ενισχύουν έμμεσα την την θερμοδυναμική σταθερότητα των σχηματιζόμενων συμπλόκων. [31], [32], [35]

4.4 Αλληλεπίδραση ATCUN με μεταλλικά ιόντα

Η ένταξη των μεταλλικών ιόντων στο μοτίβο ATCUN γίνεται με συγκεκριμένο τρόπο (με το τερματικό άτομο Ν, δύο πεπτιδικά άτομα Ν⁻ και το N_{im} του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης), σχηματίζοντας σύμπλοκα με επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Παρόλο που τα κύρια μεταλλοιόντα που αλληλεπιδρούν ισχυρά με πεπτίδια τύπου ATCUN είναι ο Cu(II) και το Ni(II), έχει παρατηρηθεί ίδιου τύπου ένταξη και με άλλα όπως αυτά του Au(III), Pd(II) και Co(II). Τα δυο πρώτα όμως στερούνται βιολογικής σημασίας ένω για το τελευταίο απαιτείται υψηλή τιμή pH. [29]-[31]

Ακολουθώντας την ανακάλυψη του μοτίβου ΑΤCUN στην HSA, η έρευνα επικεντρώθηκε στην μελέτη αλληλεπίδρασης του δισθενούς χαλκού με αυτό, και στη συνέχεια με μοτίβα ΑTCUN άλλων πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2) δίνονται επιλεγμένα θερμοδυναμικά δεδομένα που αφορούν τη σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου Cu(II)-ATCUN για διάφορα πεπτιδικά άκρα τέτοιου τύπου: Πίνακας 2: Σταθερές σχηματισμού συμπλόκων του δισθενούς χαλκού με πρωτεΐνες-πεπτίδια τύπου ATCUN [31]

Πεπτίδιο	Αλληλουχία δέσμευσης Cu"	Σταθερά σχηματισμού Log ^c K _{7.4}		
HSA	DAH	12.0		
MDH-NH ₂	MDH	13.1		
Αβ ₄₋₁₆	RFH	13.5		
HP2 N _{term}	RTH	13.8		
MNH-NH ₂	MNH	14.5		
Hepcidin N-term	DTH	14.7		

Η σταθερά σχηματισμού των συμπλόκων Cu(II)-ATCUN κυμαίνεται μεταξύ 12<Log^cK_{7.4} <15, ανάλογα με την αλληλουχία των αμινοξέων στο άκρο ATCUN. Έως σήμερα, το 4Ν σύμπλοκο του μοτίβου ATCUN της εψιδίνης με το δισθενή χαλκό είναι το πιο θερμοδυναμικά σταθερό με σταθερά σχηματισμού σε φυσιολογικές τιμές pH που σχεδόν αγγίζει το 15(Log^cK_{7.4}=14,7). [31]

5 Εψιδίνη-25

5.1 Δομή και λειτουργία εψιδίνης

Η εψιδίνη-25 (H25) είναι μια πεπτιδική ορμόνη που αποτελείται από 25 αμινοξέα (DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT) και είναι πλούσια σε κατάλοιπα κυστεϊνης. Η κύρια λειτουργία της είναι η ομοιόσταση του σιδήρου στα θηλαστικά, ελέγχοντας την εξαγωγή του στην κυκλοφορία του αίματος μέσω της φεροπορτίνης (υποδοχέας του σιδήρου). Περιέχει 4 δισουλφιδικούς δεσμούς που σταθεροποιούν ιδιαίτερα τη δομή της αλλά δεν παίζουν ρόλο στη βιολογική της λειτουργία. [36], [37], [38]

Επιπρόσθετα, το Ν-τελικό άκρο αποτελείται από 6 αμινοξέα DTHFPI (ασπαρτικό, θρεονίνη, ιστιδίνη, φαινυλαλανίνη, προλίνη και ισολευκίνη), ενώ παράλληλα περιέχει το DTH ως μοτίβο ATCUN, όπως φαίνεται στην εικόνα 15. Η αφαίρεση του τελευταίου ή απλώς η αντικατάσταση του κατάλοιπου ιστιδίνης με κάποιο μη αρωματικό αμινοξύ, έχει ως αποτέλεσμα τη δραματική απώλεια της βιολογικής λειτουργίας της εψιδίνης. [38], [39], [40], [41]



Εικόνα 15: Αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης εψιδίνης(hepcidin-25), το Ν-τελικό άκρο(πράσινο) και το άκρο ΑΤCUN(κόκκινο). [41]

Ο κύριος ρόλος της εψιδίνης είναι η ρύθμιση της εξαγωγής του σιδήρου από τα κύτταρα (μέσω της σύνδεσής της στη φερροπορτίνη) στο πλάσμα και στο εξωκυτταρικό υγρό. Η σχέση της με το σίδηρο είναι αμφίδρομη, δηλαδή η ομοιόστασή της ρυθμίζεται από τα ποσοστά σιδήρου στον οργανισμό. Η περίσσεια σιδήρου διεγείρει την παραγωγή εψιδίνης με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η απορρόφηση του σιδήρου από τη διατροφή. Αντίθετα, η λειτουργία της εψιδίνης καταστέλλεται λόγω έλλειψης σιδήρου, επιτρέποντας έτσι την αυξημένη απορρόφηση του σιδήρου από τη διατροφή και την αναπλήρωση των αποθεμάτων του στις αποθήκες σιδήρου του οργανισμού. [42], [43], [44].

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η εψιδίνη-25 των θηλαστικών πιθανώς κατέχει και άλλους βιολογικούς ρόλους (π.χ αντιμικροβιακές ιδιότητες). Παρόλα αυτά, δεν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως κατά πόσο η δέσμευση του Cu(II) στο μοτίβο ATCUN που περιλαμβάνει ενισχύει τις τελευταίες. Από την άλλη μπορεί να αποκλειστεί ο ρόλος της ως μεταφορέα ιόντων Cu(II) καθώς η ισχυρή της αλληλεπίδραση που αποδείχθηκε πολύ πρόσφατα [44] υποδεικνύει ότι το σύμπλοκο της υφίσταται ως ξεχωριστική οντότητα στο πλάσμα.

5.2 Δέσμευση ιόντων Cu(II) στο άκρο ATCUN της εψιδίνης

Η δέσμευση του δισθενούς χαλκού στο μοτίβο ΑΤCUN της εψιδίνης λαμβάνει χώρα όπως έχει περιγραφεί στην ενότητα στην οποία συζητήθηκε ο τρόπος ένταξης πεπτιδίων που φέρουν το πιο πάνω μοτίβο. Το 4Ν σύμπλοκο (NH₂, 2N⁻, N_{im}) που σχηματίζεται και περιλαμβάνει δύο 5-μελείς και έναν 6-μελή χηλικούς δακτυλίους χαρακτηρίζεται από μεγάλη θερμοδυναμική σταθερότητα. Μάλιστα, μόλις το 2023 υπολογίστηκε η σταθερά σχηματισμού του σε φυσιολογική τιμή pH, η οποία βρέθηκε ίση με ^cK_{7.4}= 4<u>+</u>2.10¹⁴.[44] Με βάση πειραματικά δεδομένα NMR και θεωρητικούς υπολογισμούς προτάθηκε η δομή που φαίνεται στην εικόνα 16 [37], [42]:

26



Εικόνα 16: Απεικόνιση του σχηματιζόμενου 4Ν συμπλόκου στο μοτίβο ΑΤCUN της εψιδίνης [42]
6 Εφαρμογές συμπλόκων πεπτιδίων τύπου ATCUN-Cu(II) στη βιολογία και ιατρική

Ολοκληρώνοντας το θεωρητικό μέρος της διατριβής, θα αναφερθούμε εν συντομία σε μερικές εφαρμογές των συμπλόκων πεπτιδίων που φέρουν το μοτίβο ATCUN με τα ιόντα Cu(II) στην βιολογία και την ιατρική. Ο στόχος μας είναι να καταδειχθεί η σπουδαιότητα της μελέτης-βελτιστοποίησης των θερμοδυναμικών παραμέτρων που τα χαρακτηρίζουν.

6.1 Διάσπαση βιομορίων

Τα σύμπλοκα μετάλλων(Cu,Ni)-πεπτιδίων που περιλαμβάνουν το αμινοξύ ιστιδίνη κυρίως στην 2^η και λιγότερο στην 3^η θέση της αλληλουχίας από το Ν-τελικό άκρο, μπορούν να δράσουν καταλυτικά όσον αφορά την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες με τη σειρά τους οδηγούν στην οξειδωτική προσβολή-βλάβη ή πλήρη καταστροφή του DNA. Με βάση αυτή την αρχή έχει επιχειρηθεί ο σχεδιασμός τεχνητών νουκλεασών (σύμπλοκα Cu(II), Ni(II)-πεπτιδίων ATCUN) που στοχεύουν κυρίως στο DNA και RNA, για θεραπευτικούς σκοπούς.

Οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (·OH) που παράγονται παρουσία του συμπλόκου Cu(II), H₂O₂ και ασκορβικού, αποσπούν ένα άτομο υδρογόνου από ένα άτομο άνθρακα της δεοξυριβόζης παράγοντες νέες ρίζες του σακχάρου, με τελικό αποτέλεσμα την σχάση του ενός ή/και των δυο κλώνων του DNA (εικόνα 17). Βάσει της ίδιας αρχής, μπορούν να σχεδιαστούν κατάλληλα σύμπλοκα τύπου ATCUN ως τεχνητές πρωτεάσες. [29], [31], [45], [46], [47].



Εικόνα 17: Μηχανισμός σχάσης του DNA μέσω του σχηματισμού ελευθέρων ριζών υδροξυλίου που παράγονται παρουσία του συμπλόκου Μ^{II}-ATCUN, ασκορβικού οξέος και υπεροξειδίου του υδρογόνου. [31]

6.2 Εφαρμογές με βάση τη φωταύγεια

Ένας άλλος τομέας εφαρμογής των συμπλόκων τύπου ΑΤCUN είναι ως βιοαισθητήρες που βασίζονται στο φαινόμενο της φωταύγειας (φθορισμού). Συνήθως ένα μόριο αυτού του τύπου αποτελείται από δυο τμήματα, το φθοροφόρο (ή χρωμοφόρο) και αυτό που προκαλεί απόσβεση του φθορισμού (μοτίβο ATCUN). Οι συγκεκριμένοι αισθητήρες σχεδιάζονται και λειτουργούν ανάλογα με τις απαιτήσεις της βιολογικής αντίδρασης που μελετάται. Διακρίνουμε δυο περιπτώσεις: στην πρώτη το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η εμφάνιση φθορισμού από κάποιο μη φθορίζον σύστημα(turn-on φαινόμενο), ενώ στο δεύτερο η απόσβεση φθορισμού από ένα ήδη φθορίζον σύστημα(turn off φαινόμενο). [31], [48]

Η ένταξη του δισθενούς χαλκού (Cu²⁺) σε κάποιο μοτίβο ATCUN, οδηγεί σε turnoff φαινόμενο λόγω του παραμαγνητικού χαρακτήρα του. Για παράδειγμα, η αλβουμίνη (BSA) περιέχει στη δομή της αφενός μεν το αμινοξύ τρυπτοφάνη ως χρωμοφόρο (φθοροφόρο) αλλά και ένα μοτίβο ATCUN (DTH). Λόγω της τρυπτοφάνης, είναι πιθανή η εκπομπή φθορισμού, ο οποίος όμως αποσβένεται κατά την ένταξη του μετάλλου. Αυτή η αρχή έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη αισθητήρων/ανιχνευτών μεταλλικών ιόντων (chemosensors), την βιοαπεικόνιση (bioimaging) και την ανίχνευση της δράσης ορισμένων ενζύμων [31].

Ο σχηματισμός μίας αλληλουχίας ATCUN μπορεί επίσης να προκύψει και από τη δράση των πρωτεασών. Οι πρωτεάσες είναι ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών μίας πρωτεΐνης. Έτσι, σε περίπτωση που από αυτή τη διάσπαση προκύψει μία αλληλουχία με ελεύθερη Ν-τελική αμινομάδα και ιστιδίνη στη θέση 2 ή 3 ως προς αυτήν, είναι δυνατή η αποτελεσματική ένταξη του Cu(II). Η ενζυμική δράση αυτών των ενζύμων μπορεί να αξιολογηθεί μέσω μεταβολών της έντασης φθορισμού [31], [48].

Πιο συγκεκριμένα, πριν την προσθήκη μιας πρωτεάσης, στο υπόστρωμα (πρωτεΐνη) μπορεί να ενσωματωθεί ένα χρωμοφόρο με δυνατότητα διέγερσης και εκπομπής φθορισμού. Η ενσωμάτωση αυτή λαμβάνει χώρα στην πλευρική αλυσίδα ενός αμινοξέος που γειτνιάζει με ένα μοτίβο ATCUN. Ακολουθεί η προσθήκη Cu(II) και της πρωτεάσης οπότε προκύπτει ένα πεπτίδιο που φέρει το άκρο ATCUN, το οποίο δεσμευόμενο με τον Cu(II) προκαλεί απόσβεση του εκπεμπόμενου φωτός (turn-off φαινόμενο). Αντίθετα, σε περίπτωση που υφίσταται ήδη σύμπλοκο Cu(II) με ένα άκρο ATCUN και στην αμινοξική αλληλουχία έχει ενσωματωθεί κάποιο χρωμοφόρο σε ένα αμινοξύ (συνήθως σε μεγάλη απόσταση από την θέση ένταξης του Cu(II)), τότε δεν εκπέμπεται φως λόγω της ύπαρξης του παραμαγνητικού Cu(II). Ωστόσο, σε περίπτωση που μία πρωτεάση δράσει έτσι ώστε να διασπάσει τον κατάλληλο πεπτιδικό δεσμό και να αποδεσμευτεί το αμινοξύ που φέρει το χρωμοφόρο από την υπόλοιπη αλληλουχία, παρατηρείται εκπομπή φωτός (turn-on φαινόμενο), (εικόνα 28) [31]:



Εικόνα 18: Μεθοδολογία αξιολόγησης ενζυμικής δράσης πρωτεασών με βάση τον φθορισμό και αξιοιοποίησης της ισχυρής αλληλεπίδρασης Cu(II)-μοτίβων ATCUN [31]

6.3 Ενίσχυση αντιμικροβιακής δράσης

Τα αντιμικροβιακά πεπτίδια (Antimicrobial Peptides, AMPs) είναι πρωτείνες μικρού μοριακού βάρους που αποτελούνται από 10 έως 50 αμινοξέα, με ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών κατά βακτηρίων, ιών και μυκητών. Όσον αφορά τη δομή τους, περιέχουν κυρίως βασικά αμινοξέα με υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες και φέρουν θετικό φορτίο. Η αντιμικροβιακή τους δράση οφείλεται στο φορτίο και τον υδρόφοβο χαρακτήρα τους, γεγονός που επιτρέπει να αλληλεπιδρούν εκλεκτικά με το αρνητικό φορτίο που φέρουν οι κυτταρικές μεμβράνες και τα κυτταρικά τοιχώματα των παθογόνων μικροοργανισμών [49], [50], [51].

Μεγάλος αριθμός αντιμικροβιακών πεπτιδίων φέρει τη δομή ΑΤCUN στην αλληλουχία, με αποτέλεσμα την ένταξη των μεταλλικών ιόντων με κυρίαρχο το δισθενή χαλκό. Τα ιόντα Cu(II) μπορούν να ενισχύσουν τη δράση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων, αφού έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που οδηγούν στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών, οι οποίες στη συνέχεια πραγματοποιούν οξειδωτική προσβολή της κυττατικής μεμβράνης ή των τοιχωμάτων των παθογόνων μικροοργανισμών (εικόνα 19). Χαρακτηριστικά παραδείγματα

αποτελούν το πεπτίδιο histatin, η βασική πρωτεϊνη του σάλιου του ανθρώπινου οργανισμού [49], [50], [51].



Εικόνα 19: Μηχανισμός δράσης AMP's που περιέχουν μοτίβα ATCUN απουσία μεταλλικών ιόντων (Α) και παρουσία αυτών (Β). [31]

6.4 Δέσμευση και απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων

Η μεγάλη θερμοδυναμική σταθερότητα των συμπλόκων Cu(II)-XYH- (ATCUN) μπορεί επίσης να αξιοποιηθεί προς την κατεύθυνση απομάκρυνσης της περίσσειας του μεταλλου σε ποικίλες παθολογικές καταστάσεις. Συνέπεια της παραπάνω αποτελεσματικής δέσμευσης του μετάλλου είναι και η καταστολή της οξειδοαναγωγικής ενεργότητας του ζεύγους Cu(II)/Cu(I) ως προς την παραγωγή βλαβερών ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). [28], [31], [46]

7 Στόχος της εργασίας

Στη συγκεκριμένη εργασία, αποφασίσαμε να συνθέσουμε δυο νέα πεπτίδια τροποποιώντας δύο αμινοξέα του Ν-τελικού άκρου της εψιδίνης. Ο λόγος αυτής της τροποποίησης είναι η προσπάθεια για βελτιστοποίηση των θερμοδυναμικών παραμέτρων των σχηματιζόμενων συμπλόκων με Cu(II), δηλαδή η αύξηση της δεσμευτικής τους ικανότητας έναντι του δισθενούς χαλκού σε σχέση με την αντίστοιχη της εψιδίνης.

Πιο συγκεκριμένα, το N-τελικό άκρο της εψιδίνης περιλαμβάνει την αμινοξική αλληλουχία H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CoNH₂. Έτσι, αντί για ασπαρτικό (Asp) στη θέση 1 και θρεονίνη (Thr) στη θέση 2, αποφασίστηκε να συντεθεί το πρώτο πεπτίδιο με αργινίνη (Arg) ως πρώτο αμινοξύ και λυσίνη (Lys) ως δεύτερο, και το δεύτερο πεπτίδιο με ασπαραγίνη (Asn) ως πρώτο και αργινίνη (Arg) ως δεύτερο αμινοξύ. Η επιλογή των αμινοξέων δεν είναι τυχαία, αλλά βασίζεται σε βιβλιογραφικά δεδομένα που υποδεικνύουν ποια αμινοξικά κατάλοιπα, στις αντίστοιχες θέσεις του μοτίβου, είναι πιθανόν να οδηγήσουν στη σύνθεση συμπλόκων με μεγάλη θερμοδυναμική σταθερότητα.

Όσον αφορά το πρώτο πεπτίδιο, η ύπαρξη των καταλοίπων Arg και Lys στις θέσεις 1 και 2 αντίστοιχα, αναμένεται να οδηγήσει στη μείωση της τιμής pK_α ιοντισμού του αμιδικού πρωτονίου του πεπτιδικού δεσμού μέσω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με το οξυγόνο, ενισχύοντας έτσι τη συγγένεια δέσμευσης του Cu(II) σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (εικόνα 20Α και 20Β). Σχετικά με το δεύτερο πεπτίδιο, η ύπαρξη του καταλοίπου Asn στη θέση 1, αναμένεται να οδηγήσει σε μικρότερη τιμή της pK_α ιοντισμού της πρωτονιωμένης α-αμινομάδας (μεγαλύτερη βασικότητα), άρα πιο ισχυρή ένταξη με το ιόν Cu(II). Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται βιβλιογραφικά (εικόνα 20Γ) στο σχηματισμό δεσμού Η μεταξύ της Ν-τελικής αμινομάδας και της αμιδικής παράπλευρης ομάδας του Asn. Επιπρόσθετα, η παρουσία της Arg στη θέση 2 προβλέπεται να έχει το αποτελέσμα που αναφέρθηκε για το πρώτο



Εικόνα 20: Α: Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσης αργινίνης-καρβονυλικού οξυγόνου του 1^{ου} πεπτιδικού δεσμού Β: Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσης λυσίνης-καρβονυλικού οξυγόνου του 1^{ου} πεπτιδικού δεσμού και Γ: Σχηματισμός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της Ν-τελικής αμινομάδας και της αμιδικής ομάδας του καταλοίπου Asn [28]

Θα ακολουθήσει η ποτενσιομετρική και φασματοσκοπική μελέτη των πεπτιδίων παρουσία Cu(II) με σκοπό την εξαγωγή των θερμοδυναμικών παραμέτρων (τιμές pK_α, σταθερές σχηματισμού συμπλόκων). Συνεπώς, θα διαπιστωθεί κατά πόσο οι προτεινόμενες αλλαγές στην αμινοξική αλληλουχία οδηγούν στα αναμενόμενα, βάσει βιβλιογραφίας, αποτελέσματα. Εν συνεχεία, θα συγκριθεί η δεσμευτική ικανότητα του ιόντος Cu(II) τόσο έναντι των πεπτιδίων που προτείναμε όσο και με το αντίστοιχο της εψιδίνης, το οποίο όπως αναφέραμε διαθέτει την μεγαλύτερη σταθερά σχηματισμού μέχρι σήμερα.

8 Πειραματική πορεία

8.1 Σύνθεση πεπτιδίων

Η σύνθεση των πεπτιδικών μοντέλων αποτελεί το πρώτο βήμα της πειραματικής πορείας της παρούσας εργασίας και στηρίχθηκε στις αρχές της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση κατά Merrifield με βάση την Fmoc/tBu στρατηγική [20-21]. Ως στερεό υπόστρωμα (ρητίνη) χρησιμοποιήθηκε η Rink Amide ή (4-[2',4'-διμεθοξυ-φαινυλ-(9φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ)αμινομεθυλ]-φαινοξυ)-ρητίνη.

Τα προστατευμένα αμινοξέα που χρησιμοποιήθηκαν για την πεπτιδική σύνθεση δίνονται στον πίνακα 3:

Προστατευμένο αμινοξύ	MB (g/mol)
Fmoc-Ile-OH	353,4
Fmoc-Pro-OH	337,4
Fmoc-Phe-OH	387,4
Fmoc-His(Mtt)-OH	633,7
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,6
Fmoc-Arg(pbf)-OH	648,6
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596,7

Πίνακας 3: Προστατευμένα αμινοξέα πεπτιδικής σύνθεσης και το μοριακό τους βάρος.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πεπτιδικής σύνθεσης είναι:

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

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

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύζευξη των αμινοξέων είναι:

- ο <u>Διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο</u> (DIC, Fluka, Germany),
- <u>1-Υδροοξυβενζοτριαζόλιο</u> (HOBt, Neosystem-Strasburg, Germany) ως βοηθητικό πυρηνόφιλο για τη σύζευξη των αμινοξέων.

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

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

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή του test Kaiser είναι:

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

Στο πρώτο στάδιο της πεπτιδικής σύνθεσης έγινε η διόγκωση των κόκκων της ρητίνης με διαδοχικές εκπλύσεις της με DMF και DCM ώστε να επιτευχθεί η όσο το δυνατόν καλύτερη σύζευξη της με το πρώτο αμινοξύ. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν δύο προσθήκες διαλύματος πιπεριδίνης 20% σε DMF. Κατά την πρώτη έκπλυση, διάρκειας 5 min, απομακρύνονται τα καρβοκατιόντα που μπορεί να σχηματίζονται ενώ κατά τη δεύτερη έκπλυση, διάρκειας 10 min, αποκόβεται και απομακρύνεται η Fmoc προστατευτική ομάδα της ρητίνης. Έπειτα, με διαδοχικές εκπλύσεις με DMF και DCM, η Fmoc αποκόπηκε και ο έλεγχος αποκοπής έγινε με test Kaiser(θετικό). [52]

Στο δεύτερο στάδιο της πεπτιδικής σύνθεσης πραγματοποιήθηκε η σύζευξη του πρώτου αμινοξέος (Fmoc-Ile-OH) χρησιμοποιώντας τριπλάσια αναλογία του προστατευμένου αμινοξέος και των αντιδραστηρίων σύζευξης ως προς τη ρητίνη, δηλαδή μοριακή αναλογία αμινοξύ/HOBt/DIC/ρητίνη=3/3/3/1. Το προστατευμένο αμινοξύ, το HOBt και το DIC διαλύθηκαν σε μείγμα DMF/DCM 1:1 σε παγόλουτρο για περίπου 20 min υπό ανάδευση και στη συνέχεια το διάλυμα σύζευξης προστέθηκε στην ρητίνη. Η αντίδραση διήρκησε περίπου 3h υπό ανάδευση. Με το πέρας της αντίδρασης, έγιναν διαδοχικές εκπλύσεις με DMF και DCM και η επιτυχής σύζευξη του αμινοξέος ελέγχθηκε με test Kaiser(αρνητικό). [20], [21] Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία, έγινε η προσθήκη των επόμενων αμινοξέων έως την ιστιδίνη (Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Phe-OH και Fmoc-His(Mtt)-OH). Κάθε σύζευξη και αποκοπή ελέγχθηκε με test Kaiser.

Στη συνέχεια, η προκύπτουσα πεπτιδορητίνη χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη. Στο πρώτο μέρος έγινε προσθήκη λυσίνης και αργινίνης με την ίδια διαδικασία που ακολουθήσαμε προηγουμένως, ενώ στο δεύτερο μέρος εντάχθηκαν τα αμινοξέα αργινίνη και ασπαραγίνη. Έπειτα, έγινε αποκοπή της Fmoc προστατευτικής ομάδας της αργινίνης και ασπαραγίνης αντίστοιχα με διάλυμα πιπεριδίνης 20% σε DMF. Έτσι, λήφθηκαν δυο πεπτιδορητίνες με ελεύθερο N-τελικό άκρο.

Στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο της πεπτιδικής σύνθεσης, έγινε η αποκοπή κάθε πεπτιδίου από τη ρητίνη, και η απομάκρυνση των προστατευτικών ομάδων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, με διάλυμα TFA/H₂O/TIS το οποίο προστέθηκε μαζί με την πεπτιδορητίνη σε σφαιρική φυάλη υπό ανάδευση για περίπου 4h. Ακολούθησε διήθηση σε ειδικό ηθμό από την οποία το διήθημα ήταν το μείγμα TFAπεπτιδίου και στον ηθμό απομονώθηκε η ρητίνη σε στερεή μορφή. [20], [21], [53]

Για την τελική απομόνωση των πεπτιδίων και εξάτμιση του TFA, χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστήρας (flash evaporator). Η διαδικασία εξάτμισης επαναλήφθηκε τέσσερις φορές προσθέτοντας διάλυμα DCM/εξάνιο 1:1 στο υπόλειμμα, για να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή απομάκρυνση του TFA. Στη συνέχεια το κάθε πεπτίδιο καταβυθίστηκε με προσθήκη ψυχρού διαιθυλαιθέρα και τα αιωρήματα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη μέχρι το επόμενο πρωί. Ακολούθησε διήθηση σε ειδικό ηθμό και εκπλύσεις με ψυχρό διαιθυλαιθέρα. Τέλος, τα στερεά (πεπτίδια) που απομονώθηκαν διαλύθηκαν σε υδατικό διάλυμα TFA 10⁻²M και το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδικά φιαλίδια για τη λιοφυλοποίηση. Παρακάτω (εικόνα 21) παρουσιάζεται συνοπτικά η πορεία της πεπτιδικής σύνθεσης [20], [21], [52],



Εικόνα 21:: Συνοπτική αναπαράσταση της πορείας της πεπτιδικής σύνθεσης [54]

Το test Kaiser που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της ποσοτικής απομάκρυνσης της Fmoc ομάδας αλλά και για την επιτυχή σύζευξη των αμινοξέων μεταξύ τους, βασίζεται στην αντίδραση της νινυδρίνης με την πρωτοταγή αμινομάδα των αμινοξέων (εικόνα 22). Συγκεκριμένα, σε μια μικρή ποσότητα πεπτιδορητίνης (ελάχιστοι κόκκοι) προστέθηκαν τέσσερις σταγόνες από το κάθε αντιδραστήρια για το test Kaiser και το μείγμα τέθηκε σε βρασμό για 1min. Παρουσία ελεύθερης αμινομάδας όλοι οι κόκκοι της πεπτιδορητίνης χρωματίστηκαν μπλε-μωβ (επιτυχής αποκοπή Fmoc), και το test Kaiser χαρακτηρίστηκε θετικό. Απουσία ελεύθερης αμινομάδας οι κόκκοι παρέμειναν λευκοί(επιτυχής σύζευξη αμινοξέων), και το test Kaiser χαρακτηρίστηκε αρνητικό(εικόνα 23) [55], [56]:



Εικόνα 22: Η αντίδραση νινυδρίνης παρουσία ελεύθερης αμινομάδας που οδηγεί στο σχηματισμό ιώδους συμπλόκου [55]



Εικόνα 23: Απεικόνιση test Kaiser απουσία αμινοξέος (άγχρωμο), παρουσία αμινοξέος (μωβ) και παρουσία προλίνης (καφέ-κίτρινο) [56]

8.2 Χαρακτηρισμός πεπτιδίων

Για τον χαρακτηρισμό των πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες φυσικοχημικές-φασματοσκοπικές τεχνικές i) Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR (Nuclear Magnetic Resonance) και ii) Φασματομετρία μάζας ESI-MS (ElectroSpray Ionization Mass Spectometry). Όσον αφορά τον χαρακτηρισμό των συστημάτων Cu(II)-πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν ποτενσιομετρικές τεχνικές και η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

8.2.1 Φασματοσκοπία NMR

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο οι πυρήνες των ατόμων εντός μαγνητικού πεδίου απορροφούν (διέγερση) και επανεκπέμπουν (αποδιέγερση) ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Όταν οι πυρήνες των ορισμένων ατόμων τοποθετηθούν εντός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου, διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Αυτό συμβαίνει διότι οι <u>ενεργοί</u> πυρήνες στο NMR συμπεριφέρονται σαν μαγνήτες, αφού διαθέτουν spin (ιδιοπεριστροφή). [57]

Απουσία μαγνητικού πεδίου, τα πυρηνικά spin των ατόμων προσανατολίζονται τυχαία. Μόλις, όμως, βρεθούν εντός ισχυρού μαγνητικού πεδίου αποκτούν αρχικά συγκεκριμένους προσανατολισμούς και στη συνέχεια μπορούν να απορροφήσουν ενέργεια στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, που είναι ικανή να προκαλέσει τη διέγερσή τους σε μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση με ταυτόχρονη αλλαγή της φοράς του πυρηνικού spin. (εικόνα 24). [58], [59]



Εικόνα 24: (α)απουσία μαγνητικού πεδίου η κατεύθυνση των spin είναι τυχαία(εκφυλισμένες καταστάσεις spin), (β)εφαρμογή ενός ισχυρού εξωτερικού πεδίου Β₀ που προκαλεί άρση του εκφυλισμού με spin=+1/2 και spin=-1/2 και (γ)η ενεργειακή διαφορά αυξάνεται με την αύξηση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου [60]

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα εργαλεία ταυτοποίησης χημικών ενώσεων και χρησιμοποιείται ευρέως από τους τομείς της Χημείας, Ιατρικής και Βιολογίας. Ο άνθρακας και το υδρογόνο είναι τα κυριότερα στοιχεία που απαρτίζουν τις βιολογικές ενώσεις, οπότε οι κυριότεροι πυρήνες που χρησιμοποιούνται στο NMR είναι το ¹Η και το ισότοπο ¹³C. Επομένως, μέσω αυτής της φασματοσκοπικής τεχνικής, αναφορικά με τα πεπτίδια και τις πρωτείνες, καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση των αμινοξέων μιας αλληλουχίας, η σειρά με την οποία συνδέονται μεταξύ τους, η μελέτη της δευτεροταγούς δομής τους αλλά και η πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλα βιολογικά μόρια που καταλήγουν σε δομικές αλλαγές. [58], [59], [61]

Εκτός από τη φασματοσκοπία NMR σε μια διάσταση, ακόμη πιο χρήσιμες πληροφορίες παρέχουν και οι τεχνικές NMR δύο διαστάσεων(2D-NMR), με τις οποίες παρέχονται πιο ασφαλή στοιχεία για τη δομή μιας ένωσης. Στη φασματοσκοπία 2D-NMR μπορεί να μελετηθεί ο συσχετισμός μεταξύ ίδιων πυρήνων όπως στο ομοπυρηνικό ¹H-¹H, αλλά και στο διαφορετικών πυρήνων όπως στο ετεροπυρηνικό ¹H-¹³C. Για την εξαγωγή ασφαλέστερων και αξιόπιστων αποτελεσμάτων, καθίσταται

αναγκαίος ο συνδυασμός της λήψης φασμάτων NMR μιας διάστασης και 2D-NMR δύο διαστάσεων. [58], [59], [60], [61], [62]

Για την παρούσα εργασία, πιο συγκεκριμένα λήφθηκαν τα εξής φάσματα NMR:

- ¹Η NMR μίας διάστασης,
- ¹³C NMR μίας διάστασης,
- ¹H-¹H COSY (Correlated Spectroscopy) NMR, το οποίο αποτελεί ένα ομοπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων και βοηθά στην ταυτοποίηση του συσχετισμού των γειτονικών πυρήνων ¹Η σε απόσταση το πολύ ως τέσσερις δεσμούς (δεσμική συγγένεια),
- ¹H-¹H ROESY (Rotating frame Overhause Effect Spectroscopy) NMR, το οποίο αποτελεί ένα ομοπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων και βοηθά στην ταυτοποίηση του συσχετισμού πυρήνων ¹Η που έχουν χωρική συγγένεια μεταξύ τους με βάση τη διαμόρφωση στον χώρο της ένωσης στην οποία ανήκουν, με μέγιστη χωρική απόσταση ανίχνευσης συσχετισμού τα 5Å,
- ¹H-¹H TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) NMR, το οποίο αποτελεί ένα ομοπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων που περιλαμβάνει όλους τους συσχετισμούς των spin των πυρήνων ¹H, που ανήκουν στο ίδιο σύστημα spin (π.χ τα άτομα Η ενός αμινοξέος),
- ¹H-¹³C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) NMR, το οποίο αποτελεί ένα ετεροπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων που περιλαμβάνει τους συσχετισμούς μεταξύ των πυρήνων ¹³C με τα ¹H που συνδέονται άμεσα μεταξύ τους (ένας δεσμός), βοηθώντας στην ταυτοποίηση όλων των ανθράκων εκτός των τεταρτοταγών που δε συνδέονται με κάποιο υδρογόνο, και
- ¹H-¹³C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) NMR, το οποίο αποτελεί ένα ετεροπυρηνικό φάσμα NMR δύο διαστάσεων που περιλαμβάνει τους συσχετισμούς των πυρήνων ¹³C και ¹H που χωρίζονται μεταξύ τους με δύο ή τρεις δεσμούς, επιτρέποντας έτσι και την ταυτοποίηση των τεταρτοταγών ατόμων άνθρακα που δεν ανιχνεύονται στο HSQC. [58], [59], [60], [61], [62]

8.2.1.1 Πειραματική πορεία φασματοσκοπίας NMR

Η λήψη των φασμάτων NMR μίας και δύο διαστάσεων (¹H, ¹³C, TOCSY, ROESY, HSQC και HMBC) των συντιθέμενων πεπτιδικών μοντέλων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του οργάνου Bruker Avance συχνότητας συντονισμού ¹H 500.13 MHz. Τα πεπτίδια διαλύθηκαν σε μίγμα H₂O:D₂O 9:1 v/v (για την εμφάνιση των σημάτων των αμιδικών πρωτονίων), η συγκέντρωσή των πεπτιδίων ήταν 5mM, η τιμή pH 2,5 και η θερμοκρασία καταγραφής 298K.

8.2.2 Φασματομετρία μάζας ESI-MS

Η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι η πιο δημοφιλής μέθοδος ταυτοποίησης και χαρακτηρισμού πεπτιδίων. Παρέχει μεγάλη ευαισθησία, εξειδίκευση και ταχύτητα στην ανάλυση των πεπτιδικών μορίων. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου αυτής βασίζεται στη μετατροπή των ενώσεων σε ιόντα, μετά την εξάτμισή τους, και στον επακόλουθο διαχωρισμό των ιόντων ανάλογα με τον λόγο της μάζας τους προς το φορτίο τους(m/z). Για τον ιονισμό της ένωσης χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές, με πιο σημαντική για την ανάλυση πεπτιδίων και πρωτεϊνών τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI). [63], [64]

Κατά τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό, το εξεταζόμενο διάλυμα εισέρχεται σε έναν τριχοειδή σωλήνα ψεκασμού (Εικόνα 25α) στο οποίο εφαρμόζεται ένα εξωτερικό δυναμικό περίπου 2,5-4kV. Εξαιτίας του υψηλού δυναμικού, δημιουργείται ένα νέφος (spray) από μικροσκοπικά φορτισμένα σωματίδια (εικόνα 25β) τα οποία συρρικνώνονται και διασπώνται επαναλαμβανόμενα μέχρι να σχηματιστούν ιόντα αέριας φάσης (εικόνα 25γ) μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Τα ιόντα αυτά, περνούν στο φασματόμετρο μάζας (εικόνα 25δ), όπου διαχωρίζονται και καταγράφονται ανάλογα με το λόγο m/z. διαχωρίζονται. [63], [64], [65], [66], [67], [68]



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση λειτουργίας φασματόμετρου μάζας [65]

8.2.2.1 Πειραματική πορεία φασματομετρίας μάζας ESI-MS

Τα φάσματα μάζας λήφθηκαν σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας (LC) συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας μάζας (high-resolution mass spectrometry, HRMS), εξοπλισμένο με γραμμική παγίδα ιόντων και τροχιακό αναλυτή μάζας Orbitrap, της εταιρίας Thermo Scientific. Για τις αναλύσεις, εγχύθηκαν αραιά (10⁻⁵ M) διαλύματα (H₂O:CH₃CN 1:1 v/v) των πεπτιδίων και το σύστημα λειτούργησε στην τεχνική του θετικού ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI). Για την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων και την εξαγωγή των θεωρητικών φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Xcalibur[™] 2.1.1 (Thermo Fisher Scientific).

8.2.3 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού(UV-Vis)

Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis Spectroscopy) είναι ίσως η πιο ευρέως διαδεδομένη τεχνική όσον αφορά το χαρακτηρισμό των σύμπλοκων ενώσεων μετάλλων-πεπτιδίων, αφού παρέχει εύκολα, άμεσα και αποτελεσματικά τις απαιτούμενες πληροφορίες. Βασίζεται δε στις ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων της εξωτερικής στιβάδας του μετάλλου, που παρατηρούνται κατά την απορρόφηση ακτινοβολίας ορατού. Το πλήθος αυτών των μεταπτώσεων, η τιμή της ενέργειας που αυτές πραγματοποιούνται, η ένταση και το εύρος των ταινιών απορρόφησης στα φάσματα, παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη φύση των ατόμων δοτών των υποκαταστατών στο σύμπλοκο και τη γεωμετρία του. [69], [70]

Το φάσμα του ορατού εκτείνεται σε μήκος κύματος μεταξύ 380nm και 780nm, ενώ το φάσμα του υπεριώδους σε μήκος κύματος μεταξύ 10nm και 380nm. Οι κυριότερες ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις που παρατηρούνται είναι οι εξής:

- d-d μεταπτώσεις ή μεταπτώσεις μεταλλικού κέντρου (Metal-Center transition, MC): Οι d-d μεταπτώσεις περιλαμβάνουν την διέγερση των ηλεκτρονίων από τα αδεσμικά t_{2g} τροχιακά του μετάλλου στα αντιδεσμικά e*_g (Εικόνα 26). Οι μεταπτώσεις λαμβάνουν χώρα μόνο μεταξύ των d τροχιακών του μετάλλου και εμφανίζονται στην ορατή περιοχή του φάσματος, λόγω της άρσης του εκφυλισμού των d τροχιακών.
- 2. Μεταφορά φορτίου από το μέταλλο προς τον υποκαταστάτη (Metal to Ligand Charge Transfer, MLCT): Αυτού του είδους οι μεταπτώσεις περιλαμβάνουν τη διέγερση ηλεκτρονίων από τα κατειλημμένα d τροχιακά των μετάλλων προς τα διαθέσιμα για ηλεκτρόνια αντιδεσμικά τροχιακά των υποκαταστατών (π*) (Εικόνα 26). Οι συγκεκριμένες ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μπορεί να θεωρηθεί ότι έχουν ως αποτέλεσμα την οξείδωση του μεταλλικού ιόντος (που «χάνει» ηλεκτρόνια) με ταυτόχρονη αναγωγή του υποκαταστάτη (που «δέχεται» ηλεκτρόνια). Γι' αυτόν τον λόγο χαρακτηρίζονται και μεταπτώσεις μποραίς μεταφοράς φορτίου (Charge Transfer transitions). Οι MLCT μεταπτώσεις παρατηρούνται πολύ συχνά λόγω της μικρής διαφοράς ενέργειας μεταξύ των τροχιακών-δοτών ηλεκτρονίων του μετάλλου και των τροχιακών-δεκτών ηλεκτρονίων του υποκαταστάτη.
- 3. Μεταφορά φορτίου από τον υποκαταστάτη προς το μέταλλο (Ligand to Metal Charge Transfer, LMCT): Αυτή η κατηγορία ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων περιλαμβάνει τη διέγερση ηλεκτρονίων από κατειλημμένα τροχιακά των υποκαταστατών (σ ή π) προς τα d τροχιακά του μεταλλικού ιόντος (t_{2g} ή e_g) (Εικόνα 26). Όπως γίνεται αντιληπτό, σε αυτήν την περίπτωση το μέταλλο δέχεται ηλεκτρόνια, οπότε ανάγεται, ενώ οι υποκαταστάτες δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να οξειδώνονται. Οι LMCT μεταπτώσεις είναι

λιγότερο πιθανές από τις MLCT, ενώ εντοπίζονται κυρίως στην υπεριώδη περιοχή λόγω υψηλής ενέργειας.

4. Ενδοσυστημική μετάπτωση μεταξύ των υποκαταστατών (Intraligand transition ή Ligand-Centered transition, IL ή LC): Οι συγκεκριμένες ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις πραγματοποιούνται μεταξύ τροχιακών που προέρχονται αποκλειστικά από τους υποκαταστάτες (Εικόνα 26). Πιο συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια μεταβαίνουν από κάποιο δεσμικό τροχιακό των υποκαταστατών (σ ή π) προς κάποιο αντιδεσμικό τροχιακό υψηλότερης ενέργειας, επίσης, των υποκαταστατών (σ* ή π*). Τέτοιου τύπου μεταβάσεις δεν επηρεάζουν την οξειδωτική βαθμίδα του μετάλλου. Οι ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μεταξύ των τροχιακών των υποκαταστατών εμφανίζονται κυρίως στην υπεριώδη (UV) περιοχή του φάσματος. [71], [72], [73], [74], [75], [76]



Εικόνα 26: Απλοποιημένο ενεργειακό διάγραμμα μοριακών τροχιακών ενός οκταεδρικού μονοπυρηνικού συμπλόκου στο οποίο απεικονίζονται οι πιθανές ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις διέγερσης κατά την απορρόφηση ακτινοβολίας. [77]

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

 $A = \log (I_0/I) = \varepsilon \cdot C \cdot I(1), \mu \varepsilon$

Α = απορρόφηση,

I = ένταση εξερχόμενης από το δείγμα ακτινοβολίας

I₀ = ένταση εισερχόμενης ακτινοβολίας στο δείγμα,

ε = συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας (cm⁻¹ M⁻¹),

C = συγκέντρωση ουσίας που απορροφά (M),

I = μήκος οπτικής διαδρομής ακτινοβολίας (cm).

Οι τιμές του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας (ε) είναι ουσιαστικά μέτρο του επιτρεπτού ή μη μιας ηλεκτρονιακής μετάπτωσης με βάση τους κανόνες επιλογής και παρέχουν γεωμετρικές πληροφορίες για τα σύμπλοκα. Σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά τη φύση των ατόμων-δοτών των υποκαταστατών παρέχει η τιμή λ_{max} η οποία αντιστοιχεί στο μήκος κύματος στο οποίο μεγιστοποιείται η απορρόφηση (Α). Συγκεκριμένα, για τα σύμπλοκα ιόντων Cu(II) με άτομα-δότες πεπτιδική φύσης έχει προταθεί η εξής εμπειρική εξίσωση (Prenesti) [78] υπολογισμού της τιμής λ_{max}:

 $\lambda_{max}(nm) = 10^3 / [0.294(C=O/H_2O) + 0.346(COO^-) + 0.434(N_{im}) + 0.460(NH_2) + 0.494(N^-)]$ (2)

όπου C=O/H₂O αντιστοιχεί σε καρβονυλικό οξυγόνο, μόριο νερού ή υδροξύλιο, COO⁻ αντιστοιχεί σε καρβοξυλικό οξυγόνο, N_{im} σε ημιδαζολικό άτομο αζώτου, NH₂ σε άζωτο αμινομάδας και N⁻ σε αποπρωτονιωμένο άζωτο πεπτιδικού δεσμού.

Από τη μελέτη μεγάλου πλήθους συμπλόκων Cu(II)-πεπτιδίων με διαφορετικά άτομα δότες είναι δυνατή η θεωρητική πρόβλεψη της σφαίρας ένταξης του Cu(II) στο ισημερινό επίπεδο. Η αντικατάσταση των μορίων νερού από άτομα οξυγόνου και κυρίως αζώτου στη σφαίρα ένταξης του Cu(II) προκαλεί υψιχρωμική (κυανή) μετατόπιση της τιμής λ_{max} (πίνακας 4) [78], [79]: *Πίνακας 4:* Εφαρμογή της εμπειρικής εξίσωσης Prenesti υπολογισμού λ_{max} σε σύμπλοκα με διάφορα άτομα δότες Ο και Ν.

Άτομα δότες	λ _{max}	
1NH₂, 3O (C=O ή και H₂O)	747	
1NH₂, 1N⁻, 2O (C=O ή και H₂O)	651	
1NH ₂ , 1N ⁻ , 1N _{im} , 1O (H ₂ O) - 3N	600	
σύμπλοκα με ιστιδίνη στη θέση 2	000	
1NH ₂ , 2N ⁻ , 1Ο (C=Ο ή H ₂ O)	576	
1NH ₂ , 1N ⁻ , 1N _{im} , 1O (OH ⁻) - 3N	567	
σύμπλοκα με ιστιδίνη στη θέση 2	507	
1NH ₂ , 2N ⁻ , 1N _{im} - 4N	526	
σύμπλοκα με ιστιδίνη στη θέση 3	530	
1NH₂, 3N⁻ - 4N σύμπλοκα	517	

Τα d⁹ σύμπλοκα του δισθενούς χαλκού Cu(II) υφίσταται παραμόρφωση Jahn-Teller (εικόνα 27), στην πλειονότητα των περιπτώσεων με επιμήκυνση των αξονικών δεσμών.



Εικόνα 27: Ενεργειακό διάγραμμα d τροχιακών για (α) τετραγωνικά παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία με ελαφρά βράχυνση των δεσμών σε αξονική θέση και (β) τετραγωνικά παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία με επιμήκυνση των δεσμών σε αξονική θέση [80]

Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ερμηνευθεί με τη βοήθεια του παρακάτω διαγράμματος (εικόνα 28):



Εικόνα 28: Ενεργειακό διάγραμμα d τροχιακών ενός ηλεκτρονίου στην περίπτωση (1) οκταεδρικής γεωμετρίας (2) τετραγωνικά παραμορφωμένης με ελαφρά επιμήκυνση των δεσμών στην αξονική θέση (3) τετραγωνικά παραμορφωμένης με μεγάλη επιμήκυνση των δεσμών στην αξονική θέση και παράλληλη ισχυροποίηση των δεσμών στο ισημερινό επίπεδο (4) επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία.

Πιο συγκεκριμένα, στα σύμπλοκα Cu(II), λόγω τετραγωνικής παραμόρφωσης (Jahn-Teller) αίρεται ο εκφυλισμός των t_{2g} και e_g και θεωρητικά αναμένονται τρεις ταινίες απορροφησης (αντί μιας). Αυτές αντιστοιχούν στις μεταπτώσεις dxz,dyz στο dx²y², dxy στο dx²-y² και dz² στο dx²-y². Η πρώτη αφορά την μεγαλύτερη ενεργειακά μετατόπιση, άρα αντιστοιχεί στο μικρότερο μήκος κύματος (κυανή περιοχή του φάσματος). Καθώς το μήκος δεσμού Cu(II)-υποκαταστατών αυξάνεται στην αξονική θέση (η αλληλεπίδραση εξασθενεί), η αλληλεπίδραση στο ισημερινό επίπεδο αυξάνει. Αυτό σταθεροποιεί περισσότερο τα τροχιακά με χαρακτήρα z (μείωση ενέργειας) και αποσταθεροποιεί εκείνα με χαρακτήρα x,y (αύξηση ενέργειας). Η ενεργειακή διαφορά dxz,dyz-dx²-y² αυξάνει και η ταινία παρουσιάζεται σε μικρότερο μήκος κύματος. [11], [12], [80], [81]

8.2.3.1 Πειραματική πορεία φασματοσκοπίας UV-Vis

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

8.3 Ποτενσιομετρία

Η ποτενσιομετρία ανήκει στην κατηγορία των ηλεκτροχημικών τεχνικών ανάλυσης μέσω της οποίας προσδιορίζεται η διαφορά δυναμικού ηλεκτροχημικών στοιχείων σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος. Η μετρούμενη διαφορά δυναμικού αναπτύσσεται μεταξύ ενός ηλεκτροδίου με γνωστό δυναμικό το οποίο δεν εξαρτάται από τη φύση του διαλύματος στο οποίο θα τοποθετηθεί (ηλεκτρόδιο αναφοράς) κι ενός ηλεκτροδίου το οποίο καθώς εμβαπτίζεται στο προς μελέτη διάλυμα, αναπτύσσει δυναμικό ανάλογα με την ενεργότητα συγκεκριμένου χημικού είδους (ενδεικτικό ηλεκτρόδιο). Το πλέον χρησιμοποιούμενο ηλεκτρόδιο είναι το εκλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντων το οποίο ουσιαστικά ταυτίζεται με το ηλεκτρόδιο ενός κοινού πεχαμέτρου όταν μετράται η ενεργότητα των ιόντων Η⁺. Η μέτρηση της διαφοράς δυναμικού λαμβάνει χώρα συναρτήσει του όγκου προστιθέμενης βάσης ή οξέος γνωστής συγκέντρωσης. [82], [83], [84], [85]

Σε περίπτωση που το διάλυμα στο οποίο εμβαπτίζεται το ηλεκτρόδιο είναι το διάλυμα ενός πεπτιδίου ή ενός μίγματος πεπτιδίου-μετάλλοϊόντος, τότε με την προσθήκη βάσης, γνωστής συγκέντρωσης, είναι δυνατή η εξαγωγή πληροφοριών θερμοδυναμικής φύσης μέσω της μέτρησης της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου.

Έτσι, η ποτενσιομετρία είναι μία από τις πιο σημαντικές και απλές μεθόδους προσδιορισμού των τιμων pK_α των όξινων/βασικών ομάδων ενός πεπτιδίου (υποκαταστάτη). Επιπρόσθετα στην περίπτωση του συστήματος μετάλλου-πεπτιδίου προσδιορίζεται το πλήθος, η στοιχειομετρία και οι σταθερές σχηματισμού των σχηματιζόμενων συμπλόκων στην μετρήσιμη κλίμακα pH. [86], [87], [88]

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

 $[M(H_2O)_6]^{+2} + L \rightarrow [M(H_2O)_5L]^{+2} + H_2O (3),$

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

 $M + L \leftrightarrow ML \ \mu \epsilon \ Kf_1 = [ML]/[M][L](5)$ $ML + L \leftrightarrow ML_2 \ \mu \epsilon \ Kf_2 = [ML_2]/[ML][L] (6)$ $ML_2 + L \leftrightarrow ML_3 \ \mu \epsilon \ Kf_3 = [ML_3]/[ML_2][L] (7)$ $ML_{n-1} + L \leftrightarrow ML_n \ \mu \epsilon \ Kf_n = [ML_n]/[ML_{n-1}][L] (8)$

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

$$M + L \leftrightarrow ML \ \mu\epsilon \ \beta_1 = Kf_1 = [ML]/[M][L] (9)$$

$$M + 2L \leftrightarrow ML_2 \ \mu\epsilon \ \beta_2 = [ML_2]/[M][L]^2 = Kf_1 \cdot Kf_2 (10)$$

$$M + 3L \leftrightarrow ML_3 \ \mu\epsilon \ \beta_3 = [ML_3]/[M][L]^3 = Kf_1 \cdot Kf_2 \cdot Kf_3 (11)$$

$$M + nL \leftrightarrow ML_n \ \mu\epsilon \ \beta_n = [ML_n]/[M][L]^n = Kf_1 \cdot Kf_2 \cdot Kf_3 \cdot ... \cdot Kf_{n-1} \cdot Kf_n (12)$$

Άρα, αφού $\beta_n = K_n \cdot K_{n-1} \cdot K_{n-2} \cdot ... \cdot K_1$, προκύπτουν και οι εξής σχέσεις:

$$log\beta_{n} = logK_{n} + logK_{n-1} + logK_{n-2} + ... + logK_{1}$$
(13)
$$logK_{n} = log\beta_{n} - log\beta_{n-1}$$
(14)

Σε ισορροπίες που περιλαμβάνουν p μεταλλικά ιόντα (M), q πρωτόνια (H⁺) και r υποκαταστάτες (L) η χημική εξίσωση συμπλοκοποίησης μπορεί να γραφεί ως:

$$pM + qH + rL \rightarrow M_pH_qL_r$$
 (15)

οπότε η ολική σταθερά σχηματισμού γράφεται ως:

$$\beta_{p,q,r} = [M_p H_q L_r] / [M]^p [H]^q [L]^r (16)$$

Επιπλέον, η αντίδραση συμπλοκοποίησης ενός μετάλλου (Μ) με έναν υποκαταστάτη (L) ουσιαστικά θα μπορούσε να περιγραφεί ως ανταγωνισμός μεταξύ των Μ και Η⁺ για την κατάληψη των ίδιων θέσεων (άτομα δότες) του L όπως απεικονίζεται στην παρακάτω εξίσωση:

$$M^{a+} + H_nL \leftrightarrow [MH_iL]^{(a-n+j)} + (n-j)H^+ (17)$$

Η σταθερά ισορροπίας παρόμοιων αντιδράσεων συμβολίζεται ως Κ* και ονομάζεται σταθερά σχηματισμού διορθωμένη ως προς την κατάσταση πρωτονίωσης του υποκαταστάτη. Οι τιμές των σταθερών Κ* μπορούν εύκολα να προκύψουν από τις σταθερές σχηματισμού:

$$\log K^* = \log \beta (MH_iL) - \log \beta (H_nL)$$
 (18)

και καθιστούν εύκολη τη σύγκριση της θερμοδυναμικής σταθερότητας συμπλόκων που υιοθετούν την ίδια σφαίρα ένταξης αλλά σχηματίζονται με υποκαταστάτες με διαφορετική κατάσταση πρωτονίωσης (π.χ H₃L, HL')

Με βάση τις ολικές σταθερές σχηματισμού και τις γνωστές αρχικές συγκεντρώσεις μετάλλου–πεπτιδίου, μπορεί να σχεδιαστεί το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (συμπλόκων) συναρτήσει των τιμών pH του διαλύματος (εικόνα 29). Το τελευταίο παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη θερμοδυναμική σταθερότητα των συμπλόκων και ιδίως αυτών που σχηματίζονται σε φυσιολογική τιμή pH. Επιπλέον είναι χρήσιμο κατά το χαρακτηρισμό του συστήματος αφού για την καταγραφή οποιουδήποτε φάσματος χρησιμοποιούνται οι τιμές pH στις οποίες μεγιστοποιείται η συγκέντρωση κάθε συμπλόκου. [86], [87], [88], [89]



Εικόνα 29: Παράδειγμα διαγράμματος κατανομής στο οποίο παριστάνεται το μοριακό κλάσμα των ιόντων Cu⁺² (% Cu⁺²) συναρτήσει της τιμής pH [89]

8.3.1 Πειραματική πορεία ποτενσιομετρίας

Για τις ποτενσιομετρικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε ποτενσιόμετρο τύπου Molspin συνδεδεμένο με αυτόματη προχοΐδα και ηλεκτρόδιο υάλου Ag/AgCl. Το ποτενσιόμετρο ήταν συνδεδεμένο και πλήρως ελεγχόμενο από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία της ποτενσιομετρικής μελέτης ήταν τα εξής:

- ο Πρότυπο διάλυμα Cu(NO₃)₂6H₂O γνωστής περιεκτικότητας σε Cu⁺²(1g Cu⁺²L⁻¹) της Sigma-Aldrich,
- Πρότυπο διάλυμα ΚΟΗ 0,1Μ, ως βάση τιτλοδότησης,
- Πρότυπο διάλυμα HNO₃ 0,1M, για τη ρύθμιση της οξύτητας των διαλυμάτων,
- Πρότυπο διάλυμα KNO₃, για τη ρύθμιση της ιοντικής ισχύος.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 298 Κ και τα διαλύματα είχαν ιοντική ισχύ 0,1 Μ (ρύθμιση με χρήση KNO₃). Η πειραματική πορεία απαρτίζεται από τα εξής στάδια:

 Βαθμονόμηση ηλεκτροδίου υάλου: Για τη βαθμονόμηση του ηλεκτροδίου υάλου πραγματοποιήθηκε ογκομέτρηση πρότυπου διαλύματος-μίγματος 0,1mL HNO₃ 0,1M, 2,25mL KNO₃ 0,1M και 0,25mL H₂O με πρότυπο διάλυμα KOH 0,1M, υπό ροή αερίου αργού και με συνεχή μαγνητική ανάδευση. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού (Glee), έτσι ώστε να προσδιοριστούν οι τιμές E⁰ και S της τροποποιημένης εξίσωσης Nerst για το ηλεκτρόδιο υάλου η οποία είναι η εξής:

 $E = E^0 - S pH (19)$

με Ε = δυναμικό ηλεκτροδίου,

 E^0 = δυναμικό ηλεκτροδίου όταν το pH = 0,

S = κλίση του ηλεκτροδίου (mV/pH).

- 2. Προσδιορισμός logβ και pK_α για τα πεπτιδικά μοντέλα: Αρχικά, παρασκευάστηκαν stock διαλύματα των καθαρών πεπτιδίων συγκέντρωσης πεπτιδίου περίπου 5mM σε τελικό όγκο 5mL. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν ογκομετρήσεις 2mmol καθαρών πεπτιδίων και όγκου 2mL ιοντικής ισχύος 0,1 M (KNO₃) στους 25°C με πρότυπο διάλυμα KOH 0,1 M, υπό ροή αερίου αργού και με συνεχή μαγνητική ανάδευση.
- 3. Προσδιορισμός logβ και pK_α για τα σύμπλοκα πεπτιδίων-Cu(II): Πραγματοποιήθηκαν ογκομετρήσεις μιγμάτων πεπτιδίων συγκέντρωσης 1.1 mM και ιόντων Cu(II) συγκέντρωσης 1.0 mM (ιοντικής ισχύος 0,1 M KNO₃) στους 25°C με πρότυπο διάλυμα KOH 0,1 M, υπό ροή αερίου αργού και με συνεχή μαγνητική ανάδευση. Στη συνέχεια, τα πειραματικά δεδομένα που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με την βοήθεια κατάλληλου λογισμικού (Hyperquad)[90]. Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν το πλήθος, την στοιχειομετρία και τις ολικές σταθερές σχηματισμού των σχηματιζόμενων συμπλόκων.

9 Αποτελέσματα

9.1 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H2N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH2

Η σύνθεση του πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (σχήμα 1) πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές πεπτιδικής σύνθεσης κατά Merrifield με την Fmoc/tBu στρατηγική [21] και ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας (HR-ESI-MS) σε συνδυασμό με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).



Σχήμα 1: Η δομή του πεπτιδίου H_2N -Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CON H_2

Στο φασματογράφημα μάζας (σχήμα 2), το σύμπλεγμα κορυφών που αντιστοιχεί σε τιμή m/z=796.4952 amu αποδίδεται στο μοριακό ιόν [L+H⁺]⁺. Επιπλέον, εμφανίζονται και συμπλέγματα κορυφών σε τιμές m/z=398,7509 amu και m/z= 266.1697 amu που αποδίδονται στα μοριακά ιόντα [L+2H⁺]²⁺ και [L+3H⁺]³⁺ αντίστοιχα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα θεωρητικά υπολογιζόμενα φασματογραφήματα μάζας βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία τόσο από άποψη μάζας και όσο και ισοτοπικής κατανομής με τα πειραματικά.



Σχήμα 2: Φάσματα HR-ESI-MS του πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (πάνω πειραματικό, κάτω: θεωρητικά υπολογιζόμενα)

Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ λήφθηκαν τα φάσματα NMR ¹H (σχήμα 3), ¹H-¹H COSY (σχήμα 4), ¹H-¹H TOCSY (σχήμα 5), ¹H-¹H ROESY (σχήμα 6), ¹H-¹³C HSQC (σχήμα 7), ¹H-¹³C HMBC (σχήμα 8) σε διαλύματα H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298 K. Οι αποδόσεις των κορυφών συντονισμού ¹H παρέχονται στον πίνακα 5.



Σχήμα 3: Φάσμα ¹Η NMR για το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 4: Φάσμα 2D ¹H-¹H COSY NMR για το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 5: Φάσμα 2D¹H-¹H TOSCY NMR για το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 6: Φάσμα 2D¹H-¹H ROESY NMR για το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 7: Φάσμα 2D¹H-¹³C HSQC NMR για το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 8: Φάσμα 2D ¹H-¹³C HMBC NMR για το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)

	αH	βН	δН	γCH₂	2H(im)	4H(im)	NH	εNH	CONH ₂
Arg	4.15	1.53 1.68	2.85	1.28	-	-	8.68		-
Lys	4.09	1.74 1.77	1.76	1.44	-	-	8.10	7.16	-
His	4.79	3.06 3.10	-	-	7.63	7.05	8.32	-	-
Phe	4.57	2.99 3.09	-	-	-	-	8.47	-	-
Pro	4.39	2.16 2.23	3.61	2.85	-	-	-	-	-
lle	4.40	1.82	0.82	0.89 1.12	-	-	8.00	-	-
terminal CONH ₂	-	-	-	-	-	-	-	_	7.05(cis) 7.60(trans)

Πίνακας 5: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η (δ, ppm) για το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (pH=2,5 και T=298K)

9.2 Ποτενσιομετρική μελέτη του πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ και της αλληλεπίδρασής του με το ιόν Cu(II)

9.2.1 Προσδιορισμός τιμών log β και pK_α του ελεύθερου πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂

Το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ περιλαμβάνει τέσσερις ομάδες ικανές να ιοντιστούν στην περιοχή 3-12. Για αυτό το λόγο μπορεί να συμβολιστεί και ως L'H₄. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες που μπορούν να ιοντιστούν είναι η N-τελική αμινομάδα (NH₂), το άτομο N₃ του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης (N_{im}), η ε-αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης (ε-NH₃⁺-Lys) και η ομάδα γουανιδίνης της αργινίνης (ε-NH₂⁺). Η αντίδραση για τον σχηματισμό των πρωτονιωμένων σωματιδίων είναι:

$$H + nL' \leftrightarrow H_nL'$$
 (20)

Οι ολικές σταθερές πρωτονίωσης β υπολογίζονται ως εξής:

 $\beta(L'H_n) = [L'H_n] / [H]^n[L']$ (21)

Οι τιμές pK_α υπολογίζονται ως εξής:

$$pK_{\alpha}(L'H_n) = \log\beta(L'H_n) - \log\beta(L'H_{n-1}) (22)$$

Στον Πίνακα 6 συνοψίζονται τα αποτελέσματα υπολογισμού των τιμών logβ και pK_α, ενώ στο σχήμα 9 παρατίθενται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (πρωτονιωμένων και μη μορφών) του πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂.

Πίνακας 6: Ολικές σταθερές πρωτονίωσης (logβ) και οι τιμές pK₀ των χαρακτηριστικών ομάδων του
πεπτιδίου H2N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CoNH2 (T=298 K, I=0,1M KNO3)

Σχηματιζόμενο σωματίδιο	Logβ()*	pK _α	Χαρακτηριστική ομάδα
L'H4	35,00(1)	5,96	N₃(im)-His
L'H ₃	29,04(1)	7,08	terminal-NH ₂
L'H ₂	21,96(1)	9,99	NH ₃ ⁺ -Lys
L'H	11,97(1)	11,98	ϵ -NH ₂ ⁺ -Arg

*Τυπική απόκλιση: 10-2



Σχήμα 9: Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων για το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (C=1mM)

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα κατανομής (σχήμα 9), αρχικά το πεπτίδιο βρίσκεται στην πλήρως πρωτονιωμένη του μορφή, L'H₄. Με την αύξηση του pH πραγματοποιείται αποπρωτονίωση του ιμιδαζολικού αζώτου της ιστιδίνης με τιμή pK_α=5,96 που βρίσκεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικές τιμές άλλων πεπτιδίων με ιστιδίνη στη θέση 3 της αλληλουχίας (pK_α=5,98-6,03) [91]. Ακολουθεί ο ιοντισμός της N τελικής αμινομάδας του πεπτιδίου με τιμή pK_α=7,08. Η παραπάνω τιμή βρίσκεται εντός του εύρους τιμών pK_α που έχουν υπολογιστεί για την ίδια ομάδα σε πεπτίδια τύπου ATCUN (6,83-8,18) [28],[91]. Με περαιτέρω αύξηση του pH λαμβάνει χώρα η αποπρωτονίωση της ε-αμινομάδας της λυσίνης (pK_α=9,99), που συνάδει με αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές (pK_α=9,4-10,6) [91]-[94]. Τέλος, λαμβάνει χώρα και η αποπρωτονίωση της ε-NH₂⁺ γουνιδομάδας της αργινίνης με τιμή pK_α=11,98, η οποία βρίσκεται πολύ κοντά με τιμές pK_α της βιβλιογραφίας για τον ίδιο τύπο ιοντισμού (pK_α=11,48-12,50) [94]-[95].

9.2.2 Ποτενσιομετρική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂

Για την μελέτη αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CoNH₂ με τα ιόντα Cu(II) πραγματοποιήθηκαν ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις σε υδατικά διαλύματα Cu(II)/πεπτιδίου. Η μοριακή αναλογία Cu(II):πεπτιδίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν περίπου ίση με 1:1,3.

Στον πίνακα 7 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν όσον αφορά τις τιμές των ολικών σταθερών σχηματισμού logβ και τις αντίστοιχες τιμές pK_α, ενώ στο σχήμα 10 παρατίθεται το αντίστοιχο διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (συμπλόκων) συναρτήσει της τιμής pH.

Πίνακας 7: Ολικές σταθερές σχηματισμού logβ των συμπλόκων Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ και τιμές pK_a (T=298K, I=0.1M KNO₃)

Σχηματιζόμενα σύμπλοκα	Logβ()*	pK _α **
CuL'H	24,88(3)	-
CuL′	21,28(4)	3,60
CuL'H ₋₁	10,98(1)	10,29
CuL'H ₋₂	-0,27(1)	11,26

*Τυπική απόκλιση: 10⁻², ** Για την αντίδραση CuLH_n \leftrightarrow CuLH_{n-1} + H⁺


Σχήμα 10: Διάγραμμα κατανομής συμπλόκων Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (1:1,3) σε εύρος pH=3-12 (T=298K, I=0.1M KNO₃)

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα κατανομής (σχήμα 10), η αλληλεπίδραση των ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο αρχίζει από αρκετά χαμηλές τιμές pH, περίπου 3.5, και συνεχίζεται μέχρι pH=12. Το προτεινόμενο μοντέλο περιλαμβάνει τέσσερα σωματίδια στοιχειομετρίας 1:1. Διακρίνεται επιπλέον, πως το σύμπλοκο CuL' υφίσταται σε ένα πολύ μεγάλο εύρος pH (περίπου pH=3,5-12).

9.3 Φασματοσκοπική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂

Τα φάσματα ορατού του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου σε μοριακή αναλογία 1:1,3 καταγράφηκαν σε τιμές pH οι οποίες αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής κάθε σωματιδίου (σχήμα 10) και δίνονται στο σχήμα 11. Στον Πίνακα 8 παρατίθενται τα φασματοσκοπικά δεδομένα (λ_{max}, ε).



Σχήμα 11: Φάσματα υπεριώδους ορατού μιγμάτων Cu(II):H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ που καταγράφηκαν στις αναγραφόμενες τιμές pH

Πίνακας 8: Φασματοσκοπικά	δεδομένα	ορατού	(λ _{max} ,	ε) τ	ου	συστήματος	Cu(II)-πεπτιδίου	H₂N-Arg-
Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH ₂								

рН	λ _{max} (nm)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)
4,3	518	62,6
7	517	101,1
10,5	516	108
12	516	116,8

9.4 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων για το σύστημα Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂

Λαμβάνοντας υπ΄ όψιν το διάγραμμα κατανομής των σχηματιζόμενων συμπλόκων (σχήμα 10), παρατηρούμε πως το πεπτίδιο αλληλεπιδρά με τα ιόντα χαλκού ξεκινώντας από πολύ χαμηλές τιμές pH(\cong 3,5). Το πρώτο σωματίδιο που σχηματίζεται σε εύρος pH=3,5-6 είναι στοιχειομετρίας CuL'H. Από φασματοσκοπικής άποψης δε μπορούμε να εξάγουμε κάποιο συμπέρασμα για τον τρόπο ένταξης, καθώς είναι χαμηλής συγκέντρωσης και η καμπύλη κατανομής επικαλύπτεται από την αντίστοιχη του συμπλόκου CuL'. Παρόλα αυτά η τιμή logK* που υπολογίστηκε για αυτό (-9,87) είναι συγκρίσιμη με τιμές που χαρακτηρίζουν ένταξη τύπου 3N {1NH₂, N⁻, 1N_{im}}, όπως για παράδειγμα στο πεπτίδιο H₂N-Arg-Arg-His-Gly₅-CONH₂. [91]

Με περαιτέρω αύξηση του pH παρατηρείται ο σχηματισμός του συμπλόκου στοιχειομετρίας CuL' το οποίο επικρατεί αποκλειστικά στις τιμές pH=3,5-11,5. Η τιμή λ_{max} στο φάσμα απορρόφησης (517 nm) συμφωνεί απόλυτα με τη θεωρητική που προκύπτει από την εξίσωση Prenesti (517 nm) για σφαίρα ένταξης 4N τύπου ATCUN {1NH₂, 2N⁻, 1N_{im}}. Από την άλλη τόσο η τιμή pK_α=3,60 (που αντιστοιχεί στην μετάβαση από CuL'H σε CuL') βρίσκεται σε συμφωνία με την βιβλιογραφική (pK_α=3,73) για το αντίστοιχο σύμπλοκο Cu(II)-H₂N-Arg-Arg-His-Gly₅-CONH₂, όσο και η τιμή logK*=-13,72 που υπολογίστηκε, είναι σχεδόν ίδια με αυτή που αναφέρθηκε (logK*=-13,57) για τον ίδιο τύπο ένταξης 4N {1NH₂, 2N⁻, 1N_{im}} [91].

Το επόμενο σύμπλοκο που σχηματίζεται σε περιοχή pH=8-12 είναι στοιχειομετρίας CuLH₋₁. Το φάσμα απορρόφησής του χαρακτηρίζεται από μια ευρεία ταινία με μέγιστο σε τιμή λ_{max} ίδια με το προηγούμενο 4N σύμπλοκο. Συνεπώς ο τρόπος ένταξης παραμενει ο ίδιος. Από την άλλη, η τιμή pK_α που συνοδεύει τον σχηματισμό του (10.29) θα πρέπει να αποδοθεί στην ε-αμινομάδα της Lys καθώς είναι παραπλήσια της τιμής που υπολογίστηκε (pK_α=9,99) για την ίδια ομάδα στο μη συμπλοκοποιημένο πεπτίδιο.

Τέλος, σε πολύ αλκαλικά διαλύματα λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός του συμπλόκου CuL'H₋₂ (pH=9,5-12). Οι τιμές λ_{max} για τα CuL'H₋₁ και CuL'H₋₂ είναι σχεδόν ίδιες (πίνακας 8), οπότε ο τρόπος ένταξης πιθανώς δεν αλλάζει. Ακολουθώντας την ίδια λογική με το προηγούμενο συμπλοκο, η τιμή pK_α που υπολογίστηκε για τον σχηματισμό του CuL'H₋₂ από το από το CuL'H₋₁ (11,26) αποδίδεται στον ιοντισμό (χωρίς ένταξη) της γουανιδομάδας της Arg (pK_α στο ελεύθερο πεπτίδιο = 11,98).

9.5 Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου H2N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH2

Η σύνθεση του πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (σχήμα 12) πραγματοποιήθηκε με βάση τις αρχές πεπτιδικής σύνθεσης κατά Merrifield με την Fmoc/tBu στρατηγική [21] και ταυτοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας (HR-ESI-MS) σε συνδυασμό με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).



Σχήμα 12: Η δομή του πεπτιδίου H2N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH2

Στο φασματογράφημα μάζας (σχήμα 13), το σύμπλεγμα κορυφών που αντιστοιχεί σε τιμή m/z=782.4427 amu αποδίδεται στο μοριακό ιόν [L+H⁺]⁺, ενώ εμφανίζεται ένα ακόμη σύμπλεγμα κορυφών σε τιμή m/z=391.7250 που αποδίδεται στο μοριακό ιόν [L+2H⁺]²⁺. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα θεωρητικά υπολογιζόμενα φασματογραφήματα μάζας βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία τόσο από άποψη μάζας και όσο και ισοτοπικής κατανομής με τα πειραματικά.



Σχήμα 13: Φάσματα μάζας HR-ESI-MS για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (πάνω πειραματικό, κάτω: θεωρητικά υπολογιζόμενα)

Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του πεπτιδίου λήφθηκαν τα φάσματα NMR ¹H (σχήμα 14), ¹H-¹H COSY (σχήμα 15), ¹H-¹H TOCSY (σχήμα 16), ¹H-¹H ROESY (σχήμα 17), ¹H-¹³C HSQC (σχήμα 18), ¹H-¹³C HMBC (σχήμα 19), ¹³C (σχήμα 20), ¹³C-APT (σχήμα 21) σε διαλύματα H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298 Κ. Οι αποδόσεις των κορυφών συντονισμού ¹H παρέχονται στον πίνακα 9.



Σχήμα 14: Φάσμα ¹Η-NMR για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 15: Φάσμα 2D ¹H-¹H COSY NMR για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 16: Φάσμα 2D ¹H-¹H TOSCY NMR για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 17: Φάσμα 2D¹H-¹H ROESY NMR για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 18: Φάσμα 2D ¹H-¹³C HSQC NMR για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 19: Φάσμα 2D ¹H-¹³C HMBC NMR για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 20: Φάσμα ¹³C-NMR για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)



Σχήμα 21: Φάσμα ¹³C-APT(Attached Proton Test) για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (H₂O:D₂O 9:1 v/v, T=298K)

	αH	βН	δН	γCH₂	2H(im)	4H(im)	δNH₂	NH	εNH	CONH ₂
Asn	4.84	2.82 3.10	-	-	-	-	6.99 7.63	8.22	-	-
Arg	4.37	1.75 1.85	3.32	1.67	-	-	-	8.25	7,16	-
His	4.60	3.01 3.10	-	-	7.03	6.95	-	8.47	-	-
Phe	4.84	2.80 3.09	-	-	-	-	-	8.23	-	-
Pro	4.38	2.19 2.85	3.51	2.22	-	-	-	-	-	-
lle	4.00	1.76	0.85	1.20 1.47	-	-	-	8.10	-	-
terminal CONH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.96(cis) 7.63(trans)

Πίνακας 9: Χημικές μετατοπίσεις ¹Η (δ, ppm) για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (pH=2,5 και T=298K)

- 9.6 Ποτενσιομετρική μελέτη του πεπτιδίου H2N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH2 και της αλληλεπίδρασής του με το ιόν Cu(II)
- 9.6.1 Προσδιορισμός τιμών log β και pK_α του ελεύθερου πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂

Το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ περιλαμβάνει τρεις ομάδες ικανές να ιοντιστούν στην περιοχή pH 3-12. Για αυτό το λόγο μπορεί να συμβολιστεί και ως LH₃. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες αυτές είναι η N-τελική αμινομάδα (NH₂), το άτομο N₃ του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης (N_{im}) και η ομάδα γουανιδίνης της αργινίνης (ε-NH₂⁺).

Στον Πίνακα 10 συνοψίζονται τα αποτελέσματα υπολογισμού των τιμών logβ και pK_α, ενώ στο σχήμα 22 παρατίθενται το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (πρωτονιωμένων και μη μορφών) του πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂.

Πίνακας 10: Ολικές σταθερές πρωτονίωσης (logβ) και τιμές pKa των χαρακτηριστικών ομάδων του πεπτιδίου H2N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH2 (T=298 K, I=0,1M KNO3)

Σχηματιζόμενο σωματίδιο	Logβ()*	pKα	Χαρακτηριστική ομάδα
LH ₃	24,65(2)	6,02	N₃(Im)-His
LH ₂	18,63(2)	6,92	terminal-NH ₂
LH	11,71(1)	11,7	ε-NH ₂ +-Arg

*Τυπική απόκλιση: 10-2



Σχήμα 22: Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (C=1mM)

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα κατανομής (σχήμα 22), αρχικά το πεπτίδιο βρίσκεται στην πλήρως πρωτονιωμένη του μορφή, LH₃. Με την αύξηση του pH πραγματοποιείται αποπρωτονίωση του ιμιδαζολικού αζώτου (N₃) της ιστιδίνης με τιμή pK_α=6,02, που βρίσκεται σε συμφωνία με βιβλιογραφικές τιμές (pK_α=5,98-6,03) [91]. Ακολουθεί ο ιοντισμός της N-τελικής αμινομάδας του πεπτιδίου με τιμή pK_α=6,92. Η παραπάνω τιμή βρίσκεται εντός του εύρους τιμών pK_α που έχουν υπολογιστεί για την ίδια ομάδα σε πεπτίδια τύπου ATCUN (6,83-8,18). [28], [91] Τέλος, λαμβάνει χώρα η αποπρωτονίωση της ε-NH₂⁺ γουνιδομάδας της αργινίνης με τιμή pK_α=11,7, που συνάδει με αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές (pK_α=11,48-12,5). [94], [95]

9.6.2 Ποτενσιομετρική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Prolle-CONH₂

Η ποτενσιομετρική μελέτη του συστήματος Cu(II)- H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ πραγματοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα με μοριακή αναλογία Cu(II):πεπτιδίου 1:1,3, ενώ η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Hyperquad [90]. Με το πρόγραμμα αυτό, ουσιαστικά προσομοιώνονται οι πειραματικές καμπύλες ογκομέτρησης με θεωρητικά υπολογιζόμενες που προκύπτουν από τις συνθήκες των πειραμάτων και τις προβλέψεις σχετικά με το πλήθος, τη στοιχειομετρία και τις σταθερές σχηματισμού των αναμενόμενων συμπλόκων συναρτήσει της τιμής pH.

Στον πίνακα 11 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν αναφορικά με τις τιμές των ολικών σταθερών σχηματισμού logβ και οι αντίστοιχες τιμές pK_α, ενώ στο σχήμα 23 παρατίθεται το αντίστοιχο διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (συμπλόκων) συναρτήσει της τιμής pH.

Πίνακας 11: Ολικές σταθερές σχηματισμού logβ των συμπλόκων Cu(II) με το πεπτίδιο H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ και τιμές pK_a (T=298K, I=0.1M KNO₃)

Σχηματιζόμενο σύμπλοκο	Logβ()*	pK _α **
CuL	15,11(2)	-
CuLH ₋₁	11,65(1)	3,46
CuLH-2	0,72(1)	10,93

*Τυπική απόκλιση: 10^{-2} , ** Για την αντίδραση CuLH_n \leftrightarrow CuLH_{n-1} + H⁺



Σχήμα 23: Διάγραμμα κατανομής συμπλόκων του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ σε εύρος pH=3-12

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα κατανομής (σχήμα 23), η αλληλεπίδραση των ιόντων Cu(II) με το πεπτίδιο αρχίζει από αρκετά χαμηλές τιμές pH, περίπου 3.5, και συνεχίζεται μέχρι pH=12. Το προτεινόμενο μοντέλο περιλαμβάνει τρία σωματίδια στοιχειομετρίας 1:1. Διακρίνεται επιπλέον, πως το σύμπλοκο CuLH₋₁ υφίσταται σε ένα πολύ μεγάλο εύρος pH (περίπου pH=3,5-12).

9.7 Φασματοσκοπική μελέτη του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂

Τα φάσματα ορατού του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου σε μοριακή αναλογία 1:1,3 καταγράφηκαν σε τιμές pH οι οποίες αντιστοιχούν στο μέγιστο των καμπυλών κατανομής κάθε σωματιδίου (σχήμα 23) και δίνονται στο σχήμα 24. Στον Πίνακα 12 παρατίθενται τα φασματοσκοπικά δεδομένα (λ_{max}, ε).



Σχήμα 24: Φάσματα υπεριώδους-ορατού μιγμάτων Cu(II):H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ (1:1,3) που καταγράφηκαν στις αναγραφόμενες τιμές pH

Πίνακας 12: Φασματοσκοπικά δεδομένα ορατού (λ_{max} , ε) του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂

рН	λ _{max} (nm)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)
4	517	35,8
7	517	113,4
12	517	124,8

9.8 Επεξεργασία πειραματικών δεδομένων για σύστημα Cu(II)-πεπτιδίου H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂

Λαμβάνοντας υπ΄ όψιν το διάγραμμα κατανομής των σχηματιζόμενων σωματιδίων (σχήμα 23), διαπιστώνεται η ύπαρξη τριών συμπλόκων στην κλίμακα pH=3-12. Το πρώτο εξ΄ αυτών, στοιχειομετρίας CuL σχηματίζεται σε εύρος pH=3-5,5, ενώ το μέγιστο κατανομής του εντοπίζεται σε pH=4. Ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός του δεν είναι εφικτός λόγω της χαμηλής του συγκέντρωσης και της επικάλυψης της καμπύλης κατανομής του από την αντίστοιχη του συμπλόκου CuLH₋₁. Παρόλα αυτά η τιμή logK* (-9.54) που το χαρακτηρίζει είναι συγκρίσιμη με τιμές που αποδίδονται σε ένταξη τύπου 3N {NH₂, N⁻, N_{im}, H₂O}, παραδείγματος χάριν στα πεπτίδια τύπου ATCUN H₂N-Asn-Asn-His-Gly₅-CONH₂ (logK*= -9,21) [91] και DP1 (logK*= -9,75) [96].

Περαιτέρω αύξηση του pH οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου στοιχειομετρίας CuLH₋₁. Το μεγάλο εύρος ύπαρξης (pH=3,5-12) υποδεικνύει την πολύ μεγάλη θερμοδυναμική του σταθερότητα. Η τιμή λ_{max} που καταγράφηκε στο φάσμα απορρόφησης (517 nm) και αντιστοιχεί σε τιμή pH=7 βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με τη θεωρητική τιμή που υπολογίζεται από την εξίσωση Prenesti για ένταξη 4N {1NH₂, 2N⁻, 1N_{im}} τύπου ATCUN. Η τιμή pK_α μετάβασης από CuL σε CuLH₋₁ (3,46) είναι σχεδόν ίδια με την αντίστοιχη (pK_α=3,40) για το πεπτίδιο H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ [97], και διαφέρει ελάχιστα από αυτή που υπολογίστηκε για το H₂N-Asn-Asn-His-Gly₅-CONH₂ (3,77). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω τιμές αποδίδονται στον ιοντισμό και ένταξη του δεύτερου πεπτιδικού ατόμου αζώτου σε σύμπλοκα Cu(II) με πεπτίδια τύπου ATCUN και προφανώς όσο μικρότερες είναι τόσο πιο απολεσματικά εντάσσεται το μεταλλοϊόν.

Περνώντας τώρα στην σύγκριση των τιμών logK* που χαρακτηρίζουν 4Ν ένταξη του παραπάνω τύπου, αρχικά διαπιστώνουμε ότι η υπολογισθείσα τιμή για το υπό μελέτη πεπτίδιο (-13,00) βρίσκεται εντός του εύρους των βιβλιογραφικά αναφερόμενων τιμών [91]. Παράλληλα, η τιμή αυτή είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πεπτιδίου με Thr στη θέση 2 (H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂), για το οποίο logK*=-13,52 [97], αλλά και του πεπτιδίου της εψιδίνης-25 (logK*=-13,82) [37]. Λαμβάνοντας υπόψην τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα πως το εν λόγω σύμπλοκο είναι το πιο θερμοδυναμικά σταθερό. Μπορούμε λοιπόν με σχετική ασφάλεια να υποθέσουμε ότι τόσο το κατάλοιπο Asn στη θέση 1 όσο και αυτό στη θέση 2 (Arg) συνδυαστικά οδήγησαν σε αυτό το επιθυμητό αποτέλεσμα.

79

Το τελευταίο σύμπλοκο που σχηματίζεται, στοιχειομετρίας CuLH₋₂ πιθανότατα υιοθετεί τον ίδιο τύπο ένταξης με το προηγούμενο (4N) καθώς η τιμή λ_{max} που καταγράφεται στο φάσμα ορατού δεν μεταβάλλεται σε σχέση με την αντίστοιχη του CuLH₋₁. Η μόνη διαφορά στα δυο σύμπλοκα εντοπίζεται στην κατάσταση πρωτονίωσης της γουανιδομάδας του καταλοίπου Arg. Συγκεκριμένα η τιμή pK_α που αντιστοιχεί στην αντίδραση σχηματισμού του συμπλόκου CuLH₋₂ από το CuLH₋₁ (10,93) θα πρέπει να αποδοθεί στην παραπάνω ομάδα. Σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή για τον ίδιο τύπο ιοντισμού στο ελεύθερο πεπτίδιο (11,71), αναδεικνύει μια σημαντική διαφορά η οποία όμως θα πρέπει να είναι αποτέλεσμα της συμπλοκοποίησης.

10 Συμπεράσματα

Έχοντας υπόψιν μας το μεγάλο πλήθος εφαρμογών των συμπλόκων Cu(II) πεπτίδια τύπου ATCUN(Amino Terminal Copper and Nickel binding), επιχειρήσαμε να μελετήσουμε τους παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα δέσμευσης του μεταλλικού ιόντος σε αυτά. Στόχος μας ήταν η βελτιστοποίηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας και συγγένειας δέσμευσης του μετάλλου του ήδη μελετημένου εξαπετιδίου της εψιδίνης (H₂N-Asp-Thr-His-Pro-Phe-Ile-CONH₂). Το συγκεκριμένο αναφέρεται στη βιβλιογραφία [37], [44] ως ο πιο αποτελεσματικός υποκαταστάτης πεπτιδικού τύπου, για τον δισθενή χαλκό έως σήμερα.

Εργαζόμενοι προς αυτήν την κατεύθυνση, αποφασίσαμε να συνθέσουμε τα πεπτίδια H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ και H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂, και να μελετήσουμε την αλληλεπίδρασή τους με τα ιόντα Cu(II). Τα πεπτίδια αυτά διαφέρουν από την εψιδίνη, ως προς το πρώτο και δεύτερο αμινοξύ του N-τελικού άκρου. Πιο συγκεκριμένα, στη θέση του ασπαρτικού και θρεονίνης, το πρώτο πεπτίδιο φέρει αργινίνη και λυσίνη αντίστοιχα, ενώ το δεύτερο ασπαραγίνη και αργινίνη. Η απόφαση για τις παραπάνω τροποποιήσεις βασίστηκε στη βιβλιογραφική διαπίστωση πως το μεν αμινοξύ Asn στην θέση 1 οδηγεί σε μεγαλύτερη βασικότητα της N-τελικής αμινομάδας, τα δε αμινοξέα Arg, Lys στις θέσεις 1 και 2 της αμινοξικής αλληλουχίας αναμένεται να οδηγήσουν σε μείωση των τιμών pK_α ιοντισμού της αμιδικής ομάδας (πεπτιδικός δεσμός). Συνέπεια των δυο παραπάνω φαινομένων είναι πιθανότητα η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα δέσμευσης των ιόντων Cu(II) προς σχηματισμό του κλασικού 4N συμπλόκου τύπου ATCUN. [28]

Αρχικά έλαβε χώρα η σύνθεση των πεπτιδικών μοντέλων (σύνθεση σε στερεή φάση κατά Marriefield [21]) και στη συνέχεια ο χαρακτηρισμός τους (χρήση φασματομετρίας μάζας HR-ESI-MS και φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις των πεπτιδίων απουσία και παρουσία ιόντων δισθενούς χαλκού, ενώ από τα δεδομένα που προέκυψαν, προσδιορίστηκε το πλήθος, η στοιχειομετρία και η θερμοδυναμική

81

σταθερότητα (τιμές logβ* και pK_α) των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Για την επιβεβαίωση της προτεινόμενης σφαίρας ένταξης του μετάλλου, όπως υποδεικνύεται από την επεξεργασία των θερμοδυναμικών δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία UV-Vis.

Ύστερα, λοιπόν, από κατάλληλη επεξεργασία των δεδομένων, παρατίθεται στο σχήμα 25, η προτεινόμενη σφαίρα ένταξης του σχηματιζόμενου 4Ν συμπλόκου του δισθενούς χαλκού με τα δύο πεπτίδια, που περιλαμβάνει το Ν-τερματικό άζωτο (-NH₂, δύο πεπτιδικά άτομα αζώτου (2N⁻) και το άζωτο (N₃) του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης (N_{im}). Για το πρώτο πεπτίδιο (H₂N-RKHFPI-CONH₂) στη θέση 1 της αμινοξικής αλληλουχίας βρίσκεται η αργινίνη και στη θέση 2 η λυσίνη, ενώ για το δεύτερο (H₂N-NRHFPI-CONH₂) στη θέση 1 η ασπαραγίνη και στη θέση 2 η αργινίνη.



 $R1 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH R2 = -(CH_2)_4 - NH_2 Arg - Lys - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = NH Asn - Arg - R1 = -CH_2CONH_2 R2 = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2) = -(CH_2)_3 - NH - C(NH_2)_3 - NH$

Σχήμα 25: Σχηματική αναπαράσταση της πιθανής δομής του 4Ν συμπλόκου που σχηματίζεται κατά την αλληλεπίδραση των πεπτιδίων (1° πεπτίδιο: H₂N-RKHFPI-CONH₂, 2° πεπτίδιο: H₂N-NRHFPI-CONH₂) με το ιόν Cu(II). Στο σχήμα εμφανίζονται τα άτομα δότες, η προέλευσή τους (αμινοξικά κατάλοιπα) και οι χηλικοί δακτύλιοι που σχηματίζονται.

Για να διαπιστωθεί η επίδραση της αλλαγής των αμινοξέων στις τιμές pK_{α} των ελεύθερων αμινομάδων των πεπτιδίων και του N₃(im) της ιστιδίνης, παρατίθεται ο πίνακας 13, στον οποίο συνοψίζονται οι εν λόγω τιμές τόσο για τα συντιθέμενα πεπτίδια όσο και για τα ήδη μελετημένα Hepcidin-25 [37], H₂N-RRHG₅-CONH₂, H₂N-NNHG₅-CONH₂ [91] και H₂N-NTHFPI-CONH₂ [97].

Πίνακας	13: Σύγκριση	τιμών pK _a των	πεπτιδίων	H ₂ N-RKHFP-CONH ₂	και H ₂ N-NRHFP-CON	Η2 με τα
πεπτίδια	ι Hepcidin-25, Ι	H₂N-RRHG₅-CON	NH2, H2N-NN	HG5-CONH2 και H2N	-NTHFPI-CONH₂.	

Πεπτίδιο →	H₂N-RKHFPI-	H₂N-NRHFPI-	H ₂ N-NTHFPI-	Hepcidin-	H₂N-RRHG₅-	H ₂ N-NNHG ₅ -
X.O. * ↓	CONH ₂	CONH ₂	CONH ₂ [97]	25 [37]	CONH ₂ [91]	CONH ₂ [91]
N₃(im)-His	5,96	6,02	6,05	6,47	5,91	5,91
terminal-NH ₂	7,08	6,92	6,82	7,67	7,09	6,83

*Χ.Ο.=Χαρακτηριστική ομάδα

Όσον αφορά την τιμή pK_α της N-τελικής αμινομάδας, μικρότερες τιμές παρατηρούνται για τα πεπτίδια που φέρουν την Asn στην πρώτη θέση. Αυτό ισχύει και για το δικό μας (H₂N-NRHFPI-CONH₂, pK_α=**6.92**), επιβεβαιώνοντας την βιβλιογραφική εκτίμηση της επίδρασης του συγκεκριμένου καταλοίπου στην εν λόγω τιμή. Από την άλλη και για το πεπτίδιο H₂N-RKHFPI-CONH₂, η τιμή pK_α της ίδιας ομάδας διαφέρει μόνο 0,16 λογαριθμικές μονάδες σε σχέση με την αντίστοιχη του πεπτιδίου που περιλαμβάνει την Asn στην πρώτη θέση. Τέλος, διαπιστώνεται ότι οι τιμές pK_α που αντιστοιχούν στην ομάδα N₃(im) της His δεν παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή. Από τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα ότι τόσο η παρουσία της Asn στην πρώτη θέση όσο και της Arg αναμένεται να οδηγήσουν σε αύξηση της βασικότητας της Ν-τελικής ομάδας και κατ' επέκταση μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα αρχικής δέσμευσης του ιόντος Cu(II).

Εν συνεχεία, στον πίνακα 14 που ακολουθεί, παρατίθενται οι τιμές pK_{α} που αντιστοιχούν στον ιοντισμό-ένταξη του 2^{ου} αμιδικού (πεπτιδικού) ατόμου αζώτου τόσο για τα σύμπλοκα χαλκού με τα πεπτίδια που συνθέσαμε όσο και τα ήδη μελετημένα Cu(II)-Hepcidin-25 [37], Cu(II)-H₂N-RRHG₅-CONH₂, Cu(II)-H₂N-NNHG₅-CONH₂ [91] και Cu(II)-H₂N-NTHFPI-CONH₂ [97]. Η σύγκριση θα αναδείξει την επίδραση των αμινοξικών καταλοίπων Arg και Lys σε αυτές.

Πίνακας 14: Σύγκριση τιμών pK₀ ιοντισμού-ένταξης του 2^{ου} πεπτιδικού ατόμου αζώτου για τα σύμπλοκα Cu(II)-πεπτιδίων H₂N-RKHFP-CONH₂ και H₂N-NRHFP-CONH₂ και των Cu(II)-Hepcidin-25, Cu(II)-H₂N-RRHG₅-CONH₂, Cu(II)-H₂N-NNHG₅-CONH₂ και Cu(II)-H₂N-NTHFPI-CONH₂.

Σωματίδιο→	Cu(II)-H₂N-	Cu(II)-H₂N-	Cu(II)-H₂N-	Cu(II)-	Cu(II)-H₂N-	Cu(II)-H₂N-
	RKHFPI-	NRHFPI-	NTHFPI-	Hepcidin-	RRHG₅-CONH₂	NNHG₅-
μκα Ψ	CONH ₂	CONH₂	CONH ₂[97]	25 [37]	[91]	CONH ₂ [91]
ρΚ _α (2 ^{ου} ιοντισμού)	3,60	3,46	3,40	4,47	3,73	3,77

Μελετώντας τον παραπάνω πίνακα, διαπιστώνουμε ότι οι μικρότερες τιμές ανήκουν στα πεπτίδια που συνθέσαμε (με μόνη εξαίρεση το H₂N-NTHFPI-CONH₂ [97], με pK_α=3,40 έναντι των τιμών 3,46 και 3,60). Μάλιστα οι παραπάνω είναι πολύ μικρότερες από την αντίστοιχη της εψιδίνης (4,47). Από την άλλη, παρατηρούμε ότι αντικατάσταση της Thr στη θέση 2 με Arg (πεπτίδια H₂N-NTHFPI-CONH₂ [97] και H₂N-NRHFPI-CONH₂) δεν επέφερε σημαντική αλλαγή στην τιμή pK_α ενώ η αντικατάσταση της Asn στη θέση 2 με Arg (πεπτίδια H₂N-NNHG₅-CONH₂ [91] και H₂N-NRHFPI-CONH₂) οδηγεί σε μείωση κατά 0,3 περίπου λογαριθμικές μονάδες. Από τις παραπάνω παρατηρήσεις συνάγεται το συμπέρασμα ότι η παρουσία των καταλοίπων Arg και Lys στη θέση 2 οδηγεί σε μείωση της τιμής pK_α ιοντισμού του δεύτερου αμιδικού (πεπτιδικού) ατόμου αζώτου άρα και σε ποιο ισχυρή αλληλεπίδραση με το ιόν Cu(II).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η σύγκριση της θερμοδυναμικής σταθερότητας των 4N {NH₂, 2N⁻, N_{im}} συμπλόκων τύπου ATCUN που σχηματίζονται με τα πεπτίδια που συνθέσαμε (H₂N-RKHFPI-CONH₂ και H₂N-NRHFPI-CONH₂) καθώς και με τα ήδη μελετημένα Hepcidin-25 [37] και H₂N-NTHFPI-CONH₂ [97]. Στον Πίνακα 15, παρατίθονται οι τιμές logK* για τα παραπάνω σωματίδια: Πίνακας 15: Τιμές logK* των 4Ν τύπου ATCUN συμπλόκων των συστημάτων Cu(II)-H₂N-RKHFPI-CONH₂, Cu(II)-H₂N-NRHFPI-CONH₂, Cu(II)-Hepcidin-25 και Cu(II)-H₂N-NTHFPI-CONH₂.

Σωματίδιο	Cu(II)-H2N-RKHFPI- CONH2	Cu(II)-H2N- NRHFPI-CONH2	Hepcidin Cu(II)-H ₂ N-DTHFPI- CONH ₂ [37]	Cu(II)-H ₂ N-NTHFPI- CONH ₂ [97]
logK*	-13,72	-13,00	-13,82	-13,52

Από τα δεδομένα του πίνακα 15 προκύπτει το συμπέρασμα πως (i) η παρουσία του καταλοίπου Asn στη θέση 1 οδηγεί σε πιο θερμοδυναμικά σταθερά 4Ν σύμπλοκα (λιγότερο αρνητικές τιμές logK*) (ii) η χρήση της αλληλουχίας Asn-Arg στο πεπτίδιο που συνθέσαμε έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό του πιο σταθερού 4Ν συμπλόκου Cu(II) τύπου ATCUN μέχρι σήμερα (logK*= -13,00).

Έχοντας υπόψη τα παραπάνω, μπορούμε να προχωρήσουμε και στη σύγκριση της δεσμευτικής ικανότητας των πεπτιδίων έναντι των ιόντων Cu(II) συναρτήσει της τιμής pH. Αξιοποιώντας, λοιπόν, τα θερμοδυναμικά δεδομένα, στο σχήμα 26 (διάγραμμα ανταγωνισμού), απεικονίζεται το ποσοστό δέσμευσης του Cu(II) από τα συντιθέμενα πεπτίδια της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, σε ένα υποθετικό σύστημα που περιέχει και τα δύο σε ισομοριακή αναλογία.



Σχήμα 26: Διάγραμμα κατανομής ενός υποθετικού συστήματος που περιέχει τα δύο συντιθέμενα πεπτίδια και Cu(II) σε ισομοριακή αναλογία (C=1mM)

Μελετώντας το παραπάνω διάγραμμα, καθίσταται εμφανές πως το πεπτίδιο H₂N-NRHFPI-CONH₂ είναι πολύ πιο αποτελεσματικός υποκαταστάτης για το δισθενή χαλκό σε όλη την μετρήσιμη κλίμακα pH. Αυτό θα πρέπει να αποδοθεί κυρίως στην ύπαρξη της Asn στην θέση 1 η οποία καθιστά το N-τελικό άτομο αζώτου αρκετά πιο βασικό.

Στο διάγραμμα ανταγωνισμού (σχήμα 27), προχωράμε σε παρόμοια σύγκριση μεταξύ των συστημάτων Cu(II)-H₂N-NRHFPI-CONH₂ της παρούσας διατριβής και του Cu(II)- H₂N-NTHFPI-CONH₂ που έχει και αυτό μελετηθεί στο εργαστήριό μας [97].



Σχήμα 27: Διάγραμμα κατανομής ενός υποθετικού συστήματος που περιέχει τα πεπτίδια H₂N-NRHFPI-CONH₂ , H₂N-NTHFPI-CONH₂ και Cu(II) σε ισομοριακή αναλογία (C=1mM)

Το παραπάνω διάγραμμα επιβεβαιώνει το συμπέρασμα στο οποίο καταλήξαμε κατά την σύγκριση των τιμών logK* που αντιστοιχούν στα 4N σύμπλοκα για τα δυο πεπτίδια (δείτε πίνακα 15 και σχετικά σχόλια πιο πάνω). Η διαφορά της δεσμευτικής ικανότητας έναντι του ιόντος Cu(II) είναι αρκετά μεγάλη σε όλη την κλίμακα pH με νικητή το πεπτίδιο που φέρει Arg στη θέση 2. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι για το πεπτίδιο με Thr στη θέση 2, έχουν υπολογιστεί τιμές pK_α μικρότερες (πίνακες 13,14) τόσο για τον ιοντισμό της N-τελικής αμινομάδας όσο και του 2^{ου} αμιδικού (πεπτιδικού δεσμού). Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι θα αναμέναμε το αντίθετο αποτέλεσμα (πιο αποτελεσματική δέσμευση στο H₂N-NTHFPI-CONH₂ έναντι του H₂N-NRHFPI-CONH₂). Κατά συνέπεια είναι πολύ πιθανό ότι η θερμοδυναμική σταθερότητα του 4N συμπλόκου και κατ' επέκταση και η δεσμευτική ικανότητα των πεπτιδίων έναντι του ιόντος Cu(II) εξαρτώνται και από άλλους παράγοντες που πρέπει να διερευνηθούν.

Τέλος, στο διάγραμμα ανταγωνισμού (σχήμα 28), απεικονίζεται το ποσοστό δέσμευσης του Cu(II) από τα πεπτίδια που συνθέσαμε σε σχέση με τα πεπτίδια H₂N-NTHFPI-CONH₂ [97] και H₂N-DTHFPI-CONH₂ [37].



Σχήμα 28: Διάγραμμα κατανομής ενός υποθετικού συστήματος που περιέχει τα δύο συντιθέμενα πεπτίδια H₂N-NRHFPI-CONH₂ και H₂N-NTHFPI-CONH₂ καθώς και τα H₂N-DTHFPI-CONH₂, H₂N-RKHFPI-CONH₂ και Cu(II) σε ισομοριακή αναλογία (C=1mM)

Σε αυτό το διάγραμμα θα εστιάσουμε στη δεσμευτική ικανότητα σε φυσιολογική τιμή pH (7,4-7,5). Παρατηρούμε ότι το H₂N-NRHFPI-CONH₂ είναι ανώτερο όλων, ενώ τα για τα υπόλοιπα η δεσμευτική ικανότητα είναι λίγο πολύ η ίδια. Επιβεβαιώνεται για μια ακόμη φορά πως ο συνδυασμός των Asn-Arg στις δυο πρώτες θέσεις της αμινοξικής αλληλουχίας οδηγεί τόσο σε μεγαλύτερη θερμοδυναμική σταθερότητα του 4N συμπλόκου όσο και σε μεγαλύτερη δεσμευτική ικανότητα έναντι του ιόντος Cu(II), ειδικά σε φυσιολογική τιμή pH που παρουσιάζει ενδιαφέρον για εφαρμογές σε βιολογικά συστήματα.

Αξιοποιώντας το σύνολο των δεδομένων μας καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως οι δυο πεπτιδικοί υποκαταστάτες τύπου ATCUN που προτείναμε, συνθέσαμε και μελετήσαμε είναι πολύ αποτελεσματικοί όσον αφορά τη δέσμευση των ιόντων Cu(II). Εξ' αυτών το πεπτίδιο H₂N-NRHFPI-CONH₂ παρουσιάζει την καλύτερη δεσμευτική ικανότητα έναντι του δισθενούς χαλκού σε όλη τη μετρήσιμη κλίμακα pH όπως και τη μεγαλύτερη μέχρι σήμερα τιμή logK* για το σχηματιζόμενο 4N σύμπλοκο.

Τα παραπάνω κρίνουν το εγχείρημα της παρούσας εργασίας απολύτως επιτυχημένο, δίνοντας τη δυνατότητα για περαιτέρω βελτιστοποίηση των παραγόντων που οδηγούν σε αυξημένη θερμοδυναμική σταθερότητα 4Ν συμπλόκων Cu(II) με πεπτίδια που φέρουν ελεύθερη Ν-τελική αμινομάδα και κατάλοιπο ιστιδίνης στη θέση 3. Θεωρούμε πως το 4Ν σύμπλοκο του H₂N-NRHFPI-CONH₂ με το δισθενή χαλκό θα μπορούσε να αξιοποιηθεί σε χημικές/βιολογικές εφαρμογές, μια κατεύθυνση που αναμένεται να κινηθούμε μελλοντικά.

11 Περίληψη

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία μελετήσαμε την αλληλεπίδραση του δισθενούς χαλκού Cu(II) με τα πεπτίδια τύπου ATCUN H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ και H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂. Ο στόχος μας ήταν να διερευνήσουμε την επίδραση της αλλαγής των δυο πρώτων αμινοξικών καταλοίπων όσον αφορά την δεσμευτική ικανότητα των πεπτιδίων έναντι του Cu(II). Ως πεπτίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το πεπτιδικό μοντέλο της Hepcidin-25 (H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂), για το οποίο έχει αναφερθεί ότι είναι ο πιο αποτελεσματικός πεπτιδικού τύπου υποκαταστάτης Cu(II) σε φυσιολογική τιμή pH [37], [44] καθώς και το H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ που μελετήθηκε στο παρελθόν από την ερευνητική μας ομάδα [97]. Για την επίτευξη του στόχου μας αρχικά συντέθηκαν, καθαρίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν πλήρως τα πεπτιδικά μοντέλα. Εν συνεχεία ακολούθησε η μελέτη αλληλεπίδρασης των ιόντων Cu(II) με τα παραπάνω χρησιμοποιώντας ποτενσιομετρικές και φασματοσκοπικές (UV-Vis) τεχνικές.

Τα δύο συντιθέμενα πεπτίδια αλληλεπιδρούν πολύ ισχυρά με τα ιόντα Cu(II) όπως αναμένονταν. Το επικρατών 4Ν σύμπλοκο και στις δυο περιπτώσεις υιοθετεί ένταξη τύπου ATCUN (σφαίρα ένταξης αποτελούμενη από την Ν-τελική αμινομάδα το άτομο Ν₃ του ιμιδαζολικού δακτυλίου του καταλοίπου His και δυο αμιδικού τύπου δότες). Όσον αφορά την δεσμευτική τους ικανότητα έναντι του ιόντος Cu(II) βρέθηκε ότι και τα δυο δεσμεύουν ικανοποιητικά το ιόν Cu(II), με το φέρον την αλληλουχία Asn-Arg στο Ν-τελικό άκρο να είναι το πιο αποτελεσματικό. Σύγκριση της δεσμευτικής του ικανότητας έναντι παρόμοιων ήδη μελετημένων πεπτιδικών μοντέλων το ανέδειξε ως τον καλύτερο πεπτιδικού τύπου υποκαταστάτη Cu(II) μέχρι σήμερα.

Τα αποτελέσματα της εργασίας υποδεικνύουν πως υπάρχει δυνατότητα για περαιτέρω βελτιστοποίηση των παραγόντων που οδηγούν σε αυξημένη θερμοδυναμική σταθερότητα 4Ν συμπλόκων Cu(II) τύπου ATCUN με τελικό στόχο την αποτελεσματική χρήση τους σε βιολογικές/ιατρικές εφαρμογές.

90

Abstract

In this thesis, we studied the interaction of Cu(II) with ATCUN-type peptides H₂N-Asn-Arg-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂ and H₂N-Arg-Lys-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂. Our aim was to investigate the effect of varying the first two amino acid residues on the binding affinity of these peptides towards Cu(II). We used the peptide model of Hepcidin-25 (H₂N-Asp-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂), known to be the most efficient peptide-type Cu(II) ligand at physiological pH, [37], [44] as a reference. Additionally, we included H₂N-Asn-Thr-His-Phe-Pro-Ile-CONH₂, previously studied by our group [97], for comparison.

To achieve our goal, the model peptides were synthesized, purified, and fully characterized. We then studied the interaction of Cu(II) ions with these peptides using potentiometric and spectroscopic (UV-Vis) techniques. As expected, both synthesized peptides exhibited strong interaction with Cu(II) ions. The dominant 4N complexes formed in both cases adopted an ATCUN-binding type, with the Cu(II) coordination sphere comprising the N-terminal amino group, the N3 atom of the imidazole ring of the His residue, and two amide-type donors.

In terms of binding affinity towards the Cu(II) ion, both peptides demonstrated strong binding, with the peptide featuring the Asn-Arg sequence at the N-terminus being the most effective. When compared to similar previously studied peptide models, this peptide emerged as the best peptide-type Cu(II) ligand to date. Our results suggest that there is potential for further optimization of factors that enhance the thermodynamic stability of 4N Cu(II) complexes of the ATCUN type, ultimately aiming for their effective use in biological and medical applications.

12. Βιβλιογραφία

[1] Petrucci, Herring, Medura and Bissonnette, General Chemistry: Principles and Modern Applications, vol. Twelfth Edition , Global Edition, **2023**, pp. 1-30.

[2] F. A. Cotton, "Transition metal," Encyclopedia Britannica.

[3] V. L. Pecoraro and Z. Guo, Bioinorganic chemistry and homogeneous biomimetic inorganic catalysis, vol. Comprehensive Inorganic Chemistry III, Elevesier, **2013**.

[4] J. F. B. Mercer, R. Dringen and I. F. Scheiber, "Metabolism and functions of copper in brain," *Prog Neurobiol*, vol. 116, pp. 22-57, **2014**.

[5] P. Verwilst, K. Sunwoo and J. S. Kim, "The role of copper ions in pathophysiology and fluorescent sensors for the detection thereof," *Chemical Communications*, vol. 51, no. 26, pp. 5556-5571, **2015**.

[6] Y. H. Hung, A. I. Bush and R. A. Cherny, "Copper in the brain and Alzheimer's disease," *J Biol Inorg Chem*, vol. 15, no. 1, pp. 61-76, **2010**.

[7] J. Chen, Y. Jiang, H. Shi, Y. Peng, X. Fan and C. Li, "The molecular mechanism of copper metabolism and its role in human diseases," *Pflungers Arch*, vol. 472, no. 10, pp. 1415-1429, **2020**.

[8] Χαβιάρα. Α., "Σύνθεση και μελέτη της δομής και της βιοδραστικότητας σύμπλοκων ενώσεων του Cu(II) με πολυαμίνες, θειαζολικά, ιμιδαζολικά και τριαζολικά ligands. Διερεύνηση της σχέσης δομής-δραστικότητας," Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, **2006**.

[9] M. Bost, S. Houdart, M. Oberli, E. Kalonji, J. F. Huneau and I. Margaritis, "Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues," *Journal pf Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 35, pp. 107-115, **2016**.

[10] M. E. Caetano, F. M. Netto, M. T. Bertoldo-Pacheco, A. Alegria and A. Cilla, "Peptide-metal complexes: obtention and role in increasing bioavailability and decreasing the pro-oxidant effect of minerals," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 61, no. 9, pp. 1470-1489, **2021**.

[11] J. Cornadie, "Jahn-Teller effect in high spin d4 and d9 octahedral metal-complexes," *Inorganica Chem Acta*, vol. 486, pp. 193-199, **2019**.

[12] S. M. A. Halcrow and M. A. Halcrow, "Jahn–Teller distortions in transition metal compounds, and their importance in functional molecular and inorganic materials," *Chem Soc Rev*, vol. 42, no. 4, pp. 1784-1795, **2013**.

[13] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba and T. Kowalik-Jankowska, "Specific structure-stability relations in metallopeptides," *Coord Chem Rev*, vol. 184, no. 1, pp. 319-346, **1999**.

[14] J. J. Gooding, D. B. Hibbert and W. Yang, "Electrochemical Metal Ion Sensors. Exploiting Amino Acids and Peptides as Recognition Elements," *Sensors*, vol. 1, no. 3, pp. 75-90, **2001**.

[15] R. M. K., "Amino acid | Definition, Structure, & Facts," [Online]. Available: https://www.britannica.com/science/amino-acid.

[16] "What are amino acids?," [Online]. Available: https://www.ajinomoto.com/aminoacids/what-are-amino-acids.

[17] H. Li., "Conformations of amino acids characterized by theoretical spectroscopy," PhD Thesis, School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, **2014**.

[18] C. Halioua, "Getting Things into Cells, Pt. 1: Peptides," [Online]. Available: https://medium.com/@celinehh/getting-things-into-cells-pt-1-peptides-b9a4d2f41182#.

[19] S. Maude , L. R. Tai, R.P.W. Davies, B. Liu, S.A. Harris, P.J. Kocienski, A. Aggeli., "Peptide synthesis and self-assembly," *Top Curr Chem*, vol. 310, pp. 27-69, **2012**.

[20] Amblard M., Fehrentz J. A., Martinez J. and Subra G., "Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis," *Mol Biotechnol*, vol. 33, no. 3, pp. 239-254, **2006**.

[21] Merrifield R. B., "Solid Phase Peptide Synthesis: I. The Synthesis of a Tetrapeptide," *J Am Chem Soc,* vol. 85, no. 14, pp. 2149-2154, **1963**.

[22] I. Sóvágó and K. Osz, "Metal ion selectivity of oligopeptides," *Dalton Transactions,* vol. 32, pp. 3841-3854, **2006**.

[23] I. Sóvágó, K. Várnagy, N. Lihi and Á. Grenács, "Coordination properties of peptides containing histidyl residues," *Coord Chem Rev,* Vols. 327-328, pp. 43-54, **2016**.

[24] I. Sóvágó, C. Kállay and K. Várnagy, "Peptides as complex agents: Factors infuencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes," *Coorf Chem Rev,* vol. 256, no. 19-20, pp. 2225-2233, **2012**.

[25] I. Sóvágó and K. Burger, "Metal complexes of peptides and derivatives," in *Biocoordination Chemistry*, Chichester, Ellis Horwood, **1999**.

[26] C. G. Ágoston, T. K. Jankowska and I. Sóvágó, "Potentiometric and NMR studies on palladium(II) complexes of oligoglycines and related ligands with non-co-ordinating side chains," *J Chem Soc,* pp. 3295-3302, **1999**.

[27] P. Tsiveriotis and N. Hadjiliadis, "Studies on the interaction of histidyl containing peptides with palladium(II) and platinum(II) complex ions," *Coord Chem Rev,* Vols. 190-192, pp. 171-184, **1999**.

[28] P. Gonzalez, K. Bossa, E. Stefaniak, C. Hureau, L. Raibaut, W. Bal and P. Faller, "N-Terminal Cu-Binding Motifs (Xxx-Zzz-His, Xxx-His) and Their Derivatives: Chemistry, Biology and Medicinal Applications," *Chemistry*, vol. 24, no. 32, pp. 8029-8041, **2018**.

[29] S. L. Best, T. K. Chattopadhyay, M. I. Djuran, R. A. Palmer, P. J. Sadler, I. Sóvágó and K. Varnagy, "Gold(III) and palladium(II) complexes of glycylglycyl-L-histidine: crystal structures of [AuIII(Gly-Gly-L-His-H₋₂)]Cl·H₂O and [PdII(Gly-Gly-L-His-H₋₂)]·1.5H₂O and His(εNH) deprotonation," *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 15, pp. 2587–2596, **1997**.

[30] M. Wienken, B. Lippert, E. Zangrando and L. Randaccio, "Gold(III) Glycyl-L-Histidine Dipeptide Complexes: Preparation and X-Ray Structures of Monomeric and Cyclic Tetrameric Species," *Inorg Chem*, vol. 31, no. 11, pp. 1983-1985, **1992**.

[31] B. K. Maiti, N. Govil, T. Kundu and J. J. G. Moura, "Designed Metal-ATCUN Derivatives: Redox- and Non-redox-Based Applications Relevant for Chemistry, Biology, and Medicine," *iScience*, vol. 23, no. 12, 101792, **2020**.

[32] R. Sankararamakrishnan, S. Verma and S. Kumar, "ATCUN-like metal-binding motifs in proteins: identification and characterization by crystal structure and sequence analysis," *Proteins*, vol. 58, no. 1, pp. 211-221, **2005**.

[33] S. E. Conklin, E. C. Bridgman, Q. Su and P. Riggs-Gel, "Specific Histidine Residues Confer Histatin Peptides with Copper-Dependent Activity against Candida albicans," *Biochemistry*, vol. 56, no. 32, pp. 4244-4255, **2017**.

[34] C. Harford and B. Sarkar, "Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties," *Acc Chem Res*, vol. 30, no. 3, pp. 123-130, **1997**.

[35] R. I. Lehrer and T. Ganz, "Defensins of vertebrate animals," *Curr Opin Immunol,* vol. 14, no. 1, pp. 96-102, **2002**.

[36] J.B Jordan, L. Poppe, M. Haniu, T. Arvedson, R. Syed, V. Li, H. Kohno, H. Kim, P.D. Schnier, T.S Harvey, L.P Miranda, J. Cheetham, B. J Sasu., "Hepcidin revisited, disulfide connectivity, dynamics, and structure," *J Biol Chem*, vol. 284, no. 36, pp. 24155-24167, **2009**.

[37] D. Płonka and W. Bal, "The N-terminus of hepcidin is a strong and potentially biologically relevant Cu(II) chelator," *Inorganica Chim Acta*, vol. 472, pp. 76-81, **2018**.

[38] C. A. Álvarez, F. Guzmán, C. Cárdenas and S. H. Marsh, "Antimicrobial activity of trout hepcidin," *Fish Shellfish Immunol*, vol. 41, no. 1, pp. 93-101, **2014**.

[39] G. Maisetta, R. Petruzzelli, F.-L. Brancatisano,, S. Esin, A. Vitali, M. Campa and G. Batoni, "Antimicrobial activity of human hepcidin 20 and 25 against clinically relevant bacterial strains: effect of copper and acidic pH," *Peptides(N.Y.)*, vol. 31, no. 11, pp. 1995-2002, **2010**.

[40] H. N. Hunter, D. Bruce Fulton, T. Ganz and H. J. Vogel, "The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis," *J Biol Chem*, vol. 277, no. 40, pp. 37597-37603, **2002**.

[41] I. M. Abbas, M. Vranic , H. Hoffmann, A. H. El-Khatib, M. Montes-Bayón, H. M. Möller and M. G. Weller, "Investigations of the Copper Peptide Hepcidin-25 by LC-MS/MS and NMR," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, pp. 2271-2287, **2018**.

[42] E. Nemeth and T. Ganz, "he Role of Hepcidin in Iron Metabolism," *Acta Haematol,* vol. 122, no. 2-3, p. 78, **2009**.

[43] Ganz. T., "Hepcidin and Its Role in Regulating Systemic Iron Metabolism," *Hematology Am Soc. Hematol Educ Program*, vol. 1, pp. 29-35, **2006**.

[44] D. Płonka, M. D. Wiśniewska, J. Ziemska-Legięcka, M. Grynberg and W. Bal, "The Cu(II) affinity constant and reactivity of Hepcidin-25, the main iron regulator in human blood," *J Inorg Biochem*, vol. 248, 112364, **2023**.

[45] E. Kimoto, H. Tanaka, J. Gyotoku, F. Morishige and L. Pauling, "Enhancement of antitumor activity of ascorbate against Ehrlich ascites tumor cells by the copper: glycylglycyl histidine complex," *Amer. Assoc. for Cancer Reaserch*, vol. 43, no. 2, pp. 824-828, **1983**.

[46] P. Zhou, J. Zhang, Y. Zhang, Y. Liu, J. Liang, B. Liu and W. Zhang, "Generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radical resulting from oxygen-dependent oxidation of L-ascorbic acid via copper redox-catalyzed reactions," *RSC Adv*, vol. 6, no. 45, pp. 38541-38547, **2016**.

[47] Y. Jin and J. A. Cowan, "Cellular activity of Rev response element RNA targeting metallopeptides," *J Biol Inorg Chem*, vol. 12, no. 5, pp. 637-644, **2007**.

[48] A. Gurung, A. Sharma, S. Bhutia and S. Dahal, "Detection of cobalt(II) and copper(II) selectively using versatile fluorochemosensors in parts per trillion level in aqueous solution," *The Pharmaceutical and Chemical Journal*, vol. 3, no. 1, pp. 149-153, **2016**.

[49] S. Melino, C. Santone, P. Di Nardo and B. Sakar, "istatins: salivary peptides with copper(II)and zinc(II)-binding motifs: perspectives for biomedical applications," *FEBS J*, vol. 281, no. 3, pp. 657-672, **2014**.

[50] J. Portelinha, S. S. Duay, S. I. Yu, K. Heilemann, M. Daben, J. Libardo, S. A. Juliano, J. L. Klassen and A. M. Angeles-Boza, "Antimicrobial Peptides and Copper(II) Ions: Novel Therapeutic Opportunities," *Chem Rev*, vol. 121, no. 4, pp. 2648-2712, **2021**.

[51] L. J. Zhang and R. L. Gallo, "Antimicrobial peptides," *Curr Biol*, vol. 26, no. 1, pp. 14-19, **2016**.

[52] R. Behrendt, P. White and J. Offer, "Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis," *J Pept Sci*, vol. 22, no. 1, pp. 4-27, **2016**.

[53] M. Bodanszky, "In search of new methods in peptide synthesis. A review of the last three decades," *Int J Pept Protein Res,* vol. 25, no. 5, pp. 449-474, **1985**.

[54] E. Denton, "What is solid phase peptide synthesis?," [Online]. Available: https://www.biotage.com/blog/what-is-solid-phase-peptide-synthesis.

[55] S. Jeong, Y. Jeon, J. Mun, H. Liang, K. Chung, P. Yi, B. S. An and S. Seo, "Ninhydrin Loaded Microcapsules for Detection of Natural Free Amino Acid," *Chemosensors*, vol. 11, no. 1, p. 49, **2023**.

[56] "Ninhydrin Test- Definition, Principle, Procedure, Result, Uses," [Online]. Available: https://microbenotes.com/ninhydrin-test/.

[57] D. R. Klein, "Organic Chemistry Fourth Edition", John Wiley & Sons, 2020.

[58] Επικ. Καθηγητής Δ. Γεωργιαδης, "ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΑΘΗΜΑ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΙΙ: ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ," ΕΚΠΑ, Τμήμα Χημείας, [Online]. Available: https://slideplayer.gr/slide/11952858/.

[59] R. Ishima and D. A. Torchia, "Protein dynamics from NMR," *Nat Struct Biol*, vol. 7, no. 9, pp. 740-743, **2000**.

[60] G. Wider, S. Macura, A. Kumar, R. R. Ernst and K. Wüthrich, "Homonuclear twodimensional ¹H NMR of proteins. Experimental procedures," *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 56, no. 2, pp. 207-234, **1984**.

[61] Bax. A., "Two-dimensional NMR and protein structure," *Annu Rev Biochem*, vol. 58, pp. 223-256, **1989**.

[62] W. Jahnke and H. Widmer, "Protein NMR in biomedical research," *Cell Mol Life Sci*, vol. 61, no. 5, pp. 580-599, **2004**.

[63] "Protein Analysis using Electrospray Ionization Mass Spectroscopy," [Online]. Available: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Physical_Methods_in_Chemistr y_and_Nano_Science_%28Barron%29/07%3A_Molecular_and_Solid_State_Structure/7.08%3A _Protein_Analysis_using_Electrospray_Ionization_Mass_Spectroscopy.

[64] B. Domon and R. Aebersold, "Mass spectrometry and protein analysis," Science," *Science*, vol. 312, no. 5771, pp. 212-217, **2006**.

[65] H. Awad, M. M. Khamis and A. El-Aneed, "Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization," *Appl Spectrosc Rev*, vol. 50, no. 2, pp. 158-175, **2015**.

[66] V. B. Di Marco and G. G. Bombi, "Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in the study of metal–ligand solution equilibria," *Mass Spectrom Rev*, vol. 25, no. 3, pp. 347-379, **2006**.

[67] G. Di Natale, "A survey of different approaches using ESI Mass Spectrometry for the characterization of metal binding sites in amyloid peptide fragments," *Smart eLab*, vol. 16, pp. 8-9, **2021**.

[68] E. Tobolkina, "New analytical tools combining gel electrophoresis and mass spectrometry," PhD Thesis, Federal Polytechnic School of Lausanne, **2014**.

[69] H. Sigel and R. B. Martin, "Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands," *Chem Rev,* vol. 82, no. 4, pp. 385-426, **1982**.

[70] A. Kotynia, B. Wiatrak, W. Kamysz, D. Neubauer, P. Jawień and A. Marciniak, "Cationic peptides and their Cu(II) and Ni(II) complexes: Coordination and biological characteristics," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 21, p. 12028, **2021**.

[71] Σ. Α. Ντανατσίδης, «Σύνθεση και μελέτη της δομής και της βιολογικής δράσης σύμπλοκων ενώσεων του δισθενούς μαγγανίου με ligands υποκατεστημένες σαλικυλαλδεϋδες,» Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, **2018**.

[72] V. Balzani, A. Juris, M. Venturi, S. Campagna and S. Serroni, "Luminescent and Redox-Active Polynuclear Transition Metal Complexes," *Chem Rev*, vol. 96, no. 2, pp. 759-833, **1996**.

[73] Förster H, "UV/Vis spectroscopy" In: Karge HG, Weitkamp J (eds) Characterization I. Molecular sieves – science and technology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 337–426, **2004.**

[74] A. J. Lees, "Luminescence Properties of Organometallic Complexes," *Chem Rev,* vol. 87, no. 4, pp. 711-743, **1987**.

[75] J. R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition", Springer, 2006.

[76] G. A. Grosby, "Spectroscopic Investigations of Excited States of Transition-Metal Complexes," *Acc Chem Res,* vol. 8, no. 7, pp. 231-238, **1975**.

[77] M. Denis, "Electrochemical and photochemical studies of some remarkable ruthenium complexes," Master Thesis, University Joseph Fourier, Grenoble, **2017**.

[78] E. Prenesti, P. G. Daniele, M. Prencipe and G. Ostacoli, "Spectrum–structure correlation for visible absorption spectra of copper(II) complexes in aqueous solution," *Polyhedron,* vol. 18, no. 25, pp. 3233-3241, **1999**.

[79] Δ. Κυριάκου, "Μελέτη της αλληλεπίδρασης των ιόντων Cu(II) με πεπτιδικά μοντέλα της τπρωτεϊνης. Συνεισφορά στη διευκρίνιση του ρόλου τους στη νόσο Alzheimer," Μεταπτυχιακή Διατριβή, ΔΠΜΣ Ιατρική Χημεία, Πανεπιστήμιο Ιωαννίων, **2018**.

[80] Hamzah K., "Jahn-Teller Distortion: The Stability Phenomenon," [Online]. Available: https://psiberg.com/jahn-teller-distortion/?utm_content=cmp-true.

[81] A. Karadağ., "Preparation, spectra and thermal properties of two novel cyano-bridged complexes: Crystal structure of one-dimensional copper(II)/palladium(II)," *Zeitschrift fur Kristallographie*, vol. 222, no. 1, pp. 39-45, **2007**.

[82] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler and S. R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, Ninth Edition, Brooks/Cole: Cengage Learning, **2014.**

[83] C. Kállay, Z. Nagy, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis and I. Sóvágó, "Thermodynamic and structural characterization of the copper(II) complexes of peptides containing both histidyl and aspartyl residues," *Bioinorg Chem Appl*, vol. 2007, **2007**.

[84] Ζαβιτσάνος. Κ., "Αλληλεπίδραση των ιόντων Ni(ii) και Cu(ii) με πεπτιδικά μοντέλα της ιστόνης H2B: μελέτη των μηχανισμών τοξικότητας και καρκινογένεσης που προκαλούνται από μεταλλικά ιόντα," Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, **2009**.

[85] H. Kozłowski, T. Kowalik-Jankowska and M. Jezowska-Bojczuk, "Chemical and biological aspects of Cu²⁺ interactions with peptides and aminoglycosides," *Coord Chem Rev*, vol. 249, no. 21-22, pp. 2323-2334, **2005**.

[86] M. Lukács, G. Szunyog, Á. Grenács, N. Lihi, C. Kállay, G. Di Natale, T. Campagna, V. Lanza, G. Tabbi, G. Pappalardo, I. Sóvágó and K. Várnagy, "Copper(II) Coordination Abilities of the Tau Protein's N-Terminus Peptide Fragments: A Combined Potentiometric, Spectroscopic and Mass Spectrometric Study," *Chempluschem*, vol. 84, no. 11, pp. 1697-1708, **2019**.

[87] M. Raics, D. Sanna, I. Sóvágó, and C. Kállay, "Copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of hexapeptides containing separate aspartyl and histidyl residues," *Inorganica Chim Acta*, vol.

426, pp. 99-106, **2015**.

[88] I. Turi, D. Sanna, E. Garribba, G. Pappalardo and I. Sóvágó, "The effect of non-coordinating side chains on the metal binding affinities of peptides of histidine," *Polyhedron*, vol. 62, pp. 7-17, **2013**.

[89] A. Dobosz, N. M. Dubarenko, I. Fritsky, T. Głowiak, A. Karaczyn, H. Kozłowski, T. Y. Sliva and J. Swiatek-Kozłowska, "N-bonding of the hydroxamic function in nickel(II) and copper(II) complexes with 2-(hydroxyimino)propanohydroxamic acid," *Journal of Chemical Society,* no. 5, pp. 743-749, **1999**.

[90] P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, "Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs," *Talanta*, vol. 43, no. 10, pp. 1739-1753, **1996**.

[91] T. Miyamoto , Y. Fukino, S. Kamino, M. Ueda and S. Enomoto, "Enhanced stability of Cu²⁺– ATCUN complexes under physiologically relevant conditions by insertion of structurally bulky and hydrophobic amino acid residues into the ATCUN motif," *Dalton Transactions,* vol. 45, no. 23, pp. 9436-9445, **2016**.

[92] C. A. Damante, K. Ösz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Grasso, G. Impellizzeri, E. Rizzarelli and I. Sóvágó, "The metal loading ability of beta-amyloid N-terminus: a combined potentiometric and spectroscopic study of copper(II) complexes with beta-amyloid(1-16), its short or mutated peptide fragments, and its polyethylene glycol (PEG)-ylated analogue," *Inorg Chem*, vol. 47, no. 20, pp. 9669-9683, **2008**.

[93] W. Bal, M. Jezowska-Bojczuk and S. Kasprazak, "Binding of nickel(II) and copper(II) to the N-terminal sequence of human protamine HP2," *Chem Res Toxicol*, vol. 10, no. 8, pp. 906-914, **1997**.

[94] R. L. Thurlkill, G. R. Grimsley, J. M. Scholtz and C. N. Pace, "pK values of the ionizable groups of proteins," *Protein Sci,* vol. 15, no. 5, pp. 1214-1218, **2006**.

[95] D. Wyrzykowski, B. Pilarski, L. Chmurzyński and J. Makowska, "Acidic-basic properties Acidic-basic properties of arginine-rich peptide fragments derived from the human Pin1 protein," *J Mol Liq*, vol. 312, p. 112279, **2020**.

[96] M. Peana, E. Gumienna-Kontecka, F. Piras, M. Ostrowska, K. Piasta, K. Krzywoszynska, S. Medici, and M-A. Zoroddu.,"Exploring the Specificity of Rationally Designed Peptides Reconstituted from the Cell-Free Extract of Deinococcus radiodurans toward Mn(II) and Cu(II),," *Inorg Chem*, vol. 59, no. 7, pp. 4661-4684, **2020**.
[97] Σ. Δασκάλου, "Σχεδιασμός και σύνθεση μικρών πεπτιδίων τύπου ATCUN (Amino Terminal Cu and Ni binding)Διερεύνηση της δεσμευτικής τους ικανότητας έναντι των ιόντων Cu(II)," Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίων, Τμήμα Χημείας, **2022**.