

Αρ. εισ.: 103 4



A

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

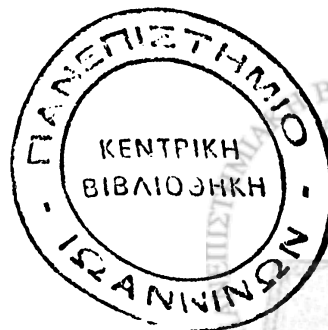
124

Αλληλεπιδράσεις Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} με 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορική
θειαμίνη (HETPP) και πυροφωσφορική θειαμίνη (TRP).
Μηχανισμός ενζυμικής δράσης των ενζύμων θειαμίνης.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Γεράσιμος Ν. Μαλανδρίνος
Χ Η Μ Ι Κ Ο Σ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε κατά την χρονική περίοδο 1995-2000 στο εργαστήριο Ανόργανης και Γενικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Το θέμα της διατριβής μου ανατέθηκε απ' τον καθηγητή Ανόργανης και Γενικής Χημείας κ. Ν. Χατζηλιάδη τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την υπόδειξη του θέματος, το αμείωτο ενδιαφέρον και τη συνεχή του επίβλεψη και συμπαράσταση.

Ευχαριστίες οφείλω και στον καθηγητή Ανοργάνου Χημείας κ. Ιωάννη Τσαγκάρη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής.

Τη λέκτορα κ. Μαρία Λουλούδη, μέλος επίσης της τριμελούς μου επιτροπής ευχαριστώ θερμά για τις χρήσιμες υποδείξεις, την ενθάρρυνση και τις πολύτιμες συμβουλές της τόσο κατά την διάρκεια των πειραμάτων όσο και κατά το στάδιο συγγραφής της διατριβής.

Η συνεργασία μου με τον επίκουρο καθηγητή κ. Ι. Πλακατούρα υπήρξε επίσης άριστη και τον ευχαριστώ για τις συμβουλές του σε θέματα που σχετίζονται με τα ερευνητικά του ενδιαφέροντα.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης στους καθηγητή κ. Κ. Δραΐνα και τη λέκτορα κ. Α. Κούκου για την βοήθεια που μου προσέφεραν στα βιολογικά πειράματα που περιλαμβάνονται σ' αυτή τη διατριβή, καθώς και στον επίκουρο καθηγητή κ. Ι. Δεληγιαννάκη για την καταγραφή των φασμάτων EPR και την πολύτιμη βοήθειά του κατά την ερμηνεία τους.

Οι συμβουλές σε θέματα πεπτιδικής σύνθεσης του καθηγητή Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών κ. Γ. Σταυρόπουλου υπήρξε επίσης πολύτιμη και τον ευχαριστώ θερμά.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές I.S. Butler και I. Sovago των πανεπιστημίων Mc-Gill, Μόντρεαλ, Καναδά και Debrecen Ουγγαρίας αντίστοιχα, για την υποδοχή και τη φιλοξενία τους κατά τη διάρκεια επισκέψεών μου στα εργαστήριά τους.

Ευχαριστώ επίσης τους φίλους και συναδέλφους κ.κ Α. Φιλιππόπουλο, Π. Τσιβεριώτη, Ε. Κατσαρού, Κ. Ντόντη, Μ. Μυλωνά, Α. Μύαρη, Χ. Κολοκύθα και Μ. Τσιούρη καθώς και τους Β. Μούση, Α. Κονίδη, Α. Τασιόπουλο, Ε. Τόλη και Β. Ντόκορου για την άριστη συνεργασία και τις εποικοδομητικές συζητήσεις μαζί τους κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων της οποίας υπήρξα υπότροφος, καθώς και την Γ.Γ.Ε.Τ και την Ε.Ε για την οικονομική ενίσχυση που μου παρείχαν μέσω διάφορων ερευνητικών προγραμμάτων.

Ιωάννινα, Οκτώβριος 2000



ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ

- I. ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ
- II. ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΥΧΕΡΕΣΤΙΑ
- III. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΡΘΡΩΝ

στους γονείς μου Νίκο και Δανάη

- A. ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ
- B. ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΥΧΕΡΕΣΤΙΑ
- C. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΡΘΡΩΝ

- IV. ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ
- 1. ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ
- 2. ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΥΧΕΡΕΣΤΙΑ
- 3. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΡΘΡΩΝ

- 5. ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ
- 6. ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΥΧΕΡΕΣΤΙΑ
- 7. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΡΘΡΩΝ

- 8. ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ
- 9. ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΥΧΕΡΕΣΤΙΑ
- 10. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΡΘΡΩΝ

- 11. ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ
- 12. ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΥΧΕΡΕΣΤΙΑ
- 13. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΡΘΡΩΝ

- 14. ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ
- 15. ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΥΧΕΡΕΣΤΙΑ
- 16. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΡΘΡΩΝ

- 17. ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ
- 18. ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΥΧΕΡΕΣΤΙΑ
- 19. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΡΘΡΩΝ

- 20. ΕΠΙΣΤΡΟΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ
- 21. ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΥΧΕΡΕΣΤΙΑ
- 22. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΑΡΘΡΩΝ



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελίδα
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
I. Ιστορική αναδρομή. Βιολογική σημασία.	1
II. Χημικές ιδιότητες σε υδατικά διαλύματα.	2
III. Καταλυτική δράση της θειαμίνης.	5
A. <u>Ενζυμική κατάλυση.</u>	5
B. <u>Μη ενζυμική κατάλυση.</u>	6
Γ. <u>Μηχανισμοί που προτάθηκαν.</u>	7
IV. Ρόλος των διαφόρων τμημάτων του μορίου της θειαμίνης στην κατάλυση.	11
A. <u>2-μέθυλο-4-άμινο πυριμιδίνη.</u>	11
B. <u>4-μέθυλο θειαζόλιο και πυροφωσφορική ομάδα.</u>	23
Γ. <u>Μεταλλικά ιόντα.</u>	27
V. Μεταλλικά σύμπλοκα θειαμίνης και παραγώγων της.	28
VI. Ενζυμικά συστήματα.	34
A. <u>Γενικά.</u>	34
B. <u>Εισαγωγικά στοιχεία για τα ενζυμικά συστήματα θειαμίνης.</u>	37
Γ. <u>Μελέτη των ενζύμων PDC και TK.</u>	41
I. Πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (PDC).	41
1. Γενικά στοιχεία.	41
2. Περιγραφή δομής.	43
3. Μελέτες που αφορούν το ρόλο των αμινοξέων που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο.	47
4. Αλλοστερική ενεργοποίηση.	55
5. Τελικά συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό καταλυτικής δράσης στο ένζυμο γPDC.	57
II. Τρανσκετολάση (TK).	62
1. Γενικά στοιχεία.	62
2. Περιγραφή δομής.	65



3. Μελέτες του ρόλου των αμινοξέων που εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο.	69
4. Τελικά συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό καταλυτικής δράσης της τρανσκετολάσης.	73 *
B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	76
I. Γενικά.	76
II. Επιλογή των μετάλλων.	77
III. Επιλογή των υποκαταστατών.	79
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	81
I. Μελέτη της αλληλεπίδρασης Cd^{2+} , Zn^{2+} και Cu^{2+} με την HETPP.	81
A. Κρυσταλλική δομή της 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορικής θειαμίνης (HETPP).	81
B. Σύνθεση των συμπλόκων.	85
Γ. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων στην στερεά φάση.	87
I. Φάσματα IR και Raman.	87
II. Φάσματα ^{13}C -CP MAS NMR.	99
Δ. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων σε διάλυμα.	109
I. Φασματοσκοπία 1H -NMR.	109
II. Φασματοσκοπία ^{13}C -NMR.	114
III. Φασματοσκοπία ^{31}P -NMR.	122
IV. Φασματοσκοπία ^{113}Cd -NMR.	128
V. Μελέτες διαμόρφωσης. Φάσματα 1H - 1H ROESY και 1H - 1H NOESY NMR.	130
VI. Φασματοσκοπία μάζας με την τεχνική electron spray (ES-MS).	132
VII. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).	134
VIII. Ποτενσιομετρία.	136
E. Τελικά συμπεράσματα απ' τη μελέτη αλληλεπίδρασης των Cd^{2+} , Zn^{2+} και Cu^{2+} με την HETPP.	144



Π. Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκων της TPP με τα ιόντα Cd²⁺ και Zn²⁺. Αλληλεπίδραση του αποενζύμου της yPDC με σύμπλοκα της HETPP και TPP.	146
A. <u>Σύνθεση των συμπλόκων.</u>	146
B. <u>Χαρακτηρισμός των συμπλόκων στη στερεά φάση.</u>	148
I. Φασματοσκοπία IR και Raman.	148
Γ. <u>Χαρακτηρισμός των συμπλόκων σε διάλυμα.</u>	156
I. Φασματοσκοπία ¹H-NMR.	156
II. Φασματοσκοπία ¹³C-NMR.	159
III. Φασματοσκοπία ³¹P-NMR.	164
IV. Φασματοσκοπία ¹¹³Cd-NMR.	169
V. Ποτενσιομετρία.	170
VI. Μελέτες αλληλεπίδρασης των συμπλόκων της HETPP και TPP με το αποένζυμο της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (yPDC).	176
Δ. <u>Τελικά συμπεράσματα απ' τη μελέτη αλληλεπίδρασης των Zn²⁺, Cd²⁺ με την TPP.</u>	179
III. Μικτά σύμπλοκα Zn(II), Cd(II) με την HETPP και το πενταπετίδιο Asp-Asp-Asp-Lys-Ile.	181
A. <u>Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.</u>	181
B. <u>Αλληλεπίδραση των Zn(II) και Cd(II) με το πεπτίδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.</u>	187
Γ. <u>Αλληλεπίδραση των συμπλόκων K₂{[M(LH)Cl₂]₂} (M= Zn,Cd) (L= HETPP) με το πεπτίδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.</u>	199
I. Γενικά.	199
II. ¹H-NMR.	199
III. ¹³C-NMR.	205
IV. ³¹P-NMR.	211
V. ¹¹³Cd-NMR.	213
VI. Μελέτες διαμόρφωσης. Φάσματα ¹H-¹H NOESY NMR.	214
Δ. <u>Τελικά συμπεράσματα απ' τη μελέτη των μικτών συστημάτων.</u>	216
IV. Μικτά σύμπλοκα Cu(II) με την HETPP και το πεπτίδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.	219



	σελίδα
A. <u>Αλληλεπίδραση Cu(II) με το πενταπεπτίδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile. ...</u>	219
B. <u>Αλληλεπίδραση Cu(II) με το πενταπεπτίδιο και την HETPP.</u>	226
Γ. <u>Εφαρμογή των φασματοσκοπιών ESEEM και 2D-HYSCORE</u> <u>για την απόδειξη της δομής των M₂C₂, MA και MAC</u> <u>(M= Cu(II), C= HETPP, A= Asp-Asp-Asn-Lys-Ile).</u>	230
Δ. ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	235
Ε. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	239
I. Αντιδραστήρια και υλικά.	239
II. Σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων.	239
III. Μεθοδοι αναλύσεων και όργανα.	241
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	247
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	259
SUMMARY	263



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1,10-phen	1,10-φαινανθρολίνη
1D	φασματοσκοπία μιας διάστασης (γενικά)
2D	φασματοσκοπία δυο διαστάσεων (γενικά)
$A_{ }$, A_{\perp}	παράγοντες υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης (αξονική συμμετρία)
ADH	αλκοολική δεϋδρογονάση
ADP	αδενόσινο διφωσφορικό οξύ
A_{iso}	παράγοντας ισοτροπικής υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης
Ala	αλανίνη
Asn	ασπαραγίνη
Asp	ασπαρτικό οξύ
ATP	αδενόσινο τριφωσφορικό οξύ
B:	βάση
Boc	τριτοταγής βουτυλόξυ-καρβόνυλο ομάδα
br	ευρεία (κορυφή)
Bu ¹	τριτοταγής βούτυλο ομάδα
CP	διασταυρούμενη πόλωση (cross polarization)
CPB	$p\text{-ClC}_6\text{H}_4\text{-C=CHCOCOOH}$
CW	συνεχόμενου κύματος (continuous wave) φασματοσκοπία
Cys	κυστεΐνη
DCC	δίκλυκο-έξυλο-καρβοδιμίδιο
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DHETPP	α,β -διϋδροξυ-αΐθυλ-πυροφωσφορική θειαμίνη
DMSO	διμέθυλο σουλφοξείδιο
e^2qQ/h	παράγοντας τετραπολικής αλληλεπίδρασης
EPR	ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός
ESEEM	διαμόρφωση της ηχούς των ηλεκτρονικών spin (φασματοσκοπία)
ES-MS	φασματοσκοπία μάζας με την τεχνική electron spray (ES)
Et_2O	διαίθυλ αιθέρας.
EtOH	αιθανόλη
FAD	φλάβινο-αδενίνο-δινουκλεοτίδιο
FADH_2	η ανηγμένη μορφή του FAD



far-IR	μακρινό υπέρυθρο (400-10 cm ⁻¹)
Fmoc	9-φλουορενυλόξυ καρβόνυλο ομάδα
FT-IR	φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT)
g _i , g _l	παράγοντες g (αξονική συμμετρία)
Gln	γλουταμίνη
Glu	γλουταμικό οξύ
Gly	γλυκίνη
HBOTH	2-(α-ύδροξυ-βένζυλ) οξυθειαμίνη
HBT	2-(α-ύδροξυ-βένζυλ) θειαμίνη
HBTMP	2-(α-ύδροξυ-βένζυλ) μονοφωσφορική θειαμίνη
HBTPP	2-(α-ύδροξυ-βένζυλ) πυροφωσφορική θειαμίνη
HBTPPH	η μονοπρωτονιωμένη μορφή της HBTPP
HCMT	2-(α-ύδροξυ-κυκλοέξυλ-μέθυλ) θειαμίνη
HET	2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) θειαμίνη
HETPP	2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορική θειαμίνη
HETPPH	η μονοπρωτονιωμένη μορφή της HETPP
His	ιστιδίνη
HoBt	1-ύδροξυ-βένζο-τριαζόλιο
HMBC	heteronuclear multiple bond connectivity (φασματοσκοπία)
HMQC	heteronuclear multiple quantum correlation (φασματοσκοπία)
HYSCORE	φασματοσκοπία συσχετισμού υπέρλεπτων υποσταθμών
ID	διακοπτόμενη αποσύζευξη
Ile	ισολευκίνη
in vitro	στο εργαστήριο
in vivo	στη φύση (σε βιολογικά συστήματα)
J	σταθερά σύζευξης
K _{cat}	καταλυτική σταθερά
kDa	kiloDaltons
K _m	σταθερά Michaelis-Menten
Leu	λευκίνη
Lip(SH) ₂	η ανηγμένη μορφή του δίδρο-λιποϊκού οξέως
LipS ₂	δίδρο-λιποϊκό οξύ
LT	2-(α-λάκτυλ) θειαμίνη
LTPP	2-(α-λάκτυλ) πυροφωσφορική θειαμίνη



Lys	λυσίνη
M	μέταλλο (γενικά)
m/z	μάζα/φορτίο
MAS	magic angle spinning (περιστροφή υπό τη “μαγική” γωνία)
Me ₂ CO	ακετόνη
MeOH	μεθανόλη
MES	2-(N-μορφολίνο)-αίθυλο-σουλφονικό οξύ
mid-IR	μέσο υπέρυθρο (4000-200 cm ⁻¹)
MLEV	Malcom Levitt
NAD	νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο
NADH ₂	η ανηγμένη μορφή του NAD
n-BuOH	1-βουτανόλη
NMR	πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (φασματοσκοπία)
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (φασματοσκοπία)
NQR	πυρηνικός τετραπολικός συντονισμός (φασματοσκοπία)
O-Th	οξυθειαμίνη
PDC	πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση
PDH	πυροσταφυλική δεϋδρογονάση
Phe	φαινυλαλανίνη
pK _a	-logK _a
POX	πυροσταφυλική οξειδάση
Q	τετραπολική ροπή
Raman	φασματοσκοπία Raman
ROESY	Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
s	ισχυρή ταινία
Ser	σερίνη
sh	ώμος (σε ταινία)
T	παράγοντας ανισοτροπικής υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης
T1	χρόνος αποκατάστασης σπίν-πλέγματος
TA	τρανσαλδολάση
TFE	1,1,1-τρίφθορο-αιθανόλη
Th	θειαμίνη



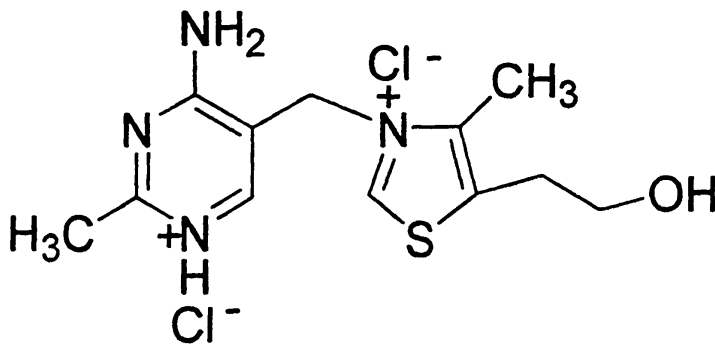
ThDP	πυροφωσφορική θειαμίνη
ThH	η μονοπρωτονιωμένη μορφή της θειαμίνης (th)
thiochrome	θειόχρωμα
ThS	φορμάμιδο-θειόλη
TK	τρανσκετολάση
TL	χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TMP	μονοφωσφορική θειαμίνη
TMS	τετραμέθυλο σιλάνιο
TOCSY	total correlation spectroscopy (φασματοσκοπία)
TPP	πυροφωσφορική θειαμίνη
TPPH	η μονοπρωτονιωμένη μορφή της TPP
Tpr	τρυπτοφάνη
TSP	τριμέθυλο-σίλυλ-προπανικό οξύ
TT	θειαζολονική θειαμίνη
Tyr	τυροσίνη
UV	υπεριώδους (φασματοσκοπία)
Vis	ορατού (φασματοσκοπία)
w	ασθενής ταινία
yPDC	πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση που απομονώνεται από ζύμη
yTK	τρανσκετολάση που απομονώνεται από ζύμη
zPDC	πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση απ' το μύκητα <i>Z. Mobilis</i>
β	ολική σταθερά σχηματισμού
δ	χημική μετατόπιση
$\Delta W_{1/2}$	το εύρος μιας κορυφής στο μισό του ύψους της
$\epsilon\pi$	επικάλυψη (κορυφών)
ευρ	ευρεία (κορυφή)
λ_{\max}	μήκος κύματος στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση
ν_1	η συχνότητα συντονισμού Lamor ενός πυρήνα



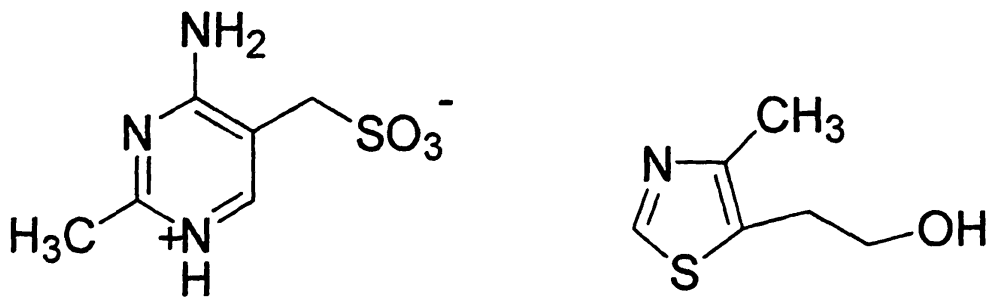
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. Ιστορική αναδρομή. Βιολογική σημασία.

Η θειαμίνη ή βιταμίνη B₁ (σχήμα 1) απομονώθηκε απ' το φλοιό ρυζιού με τη μορφή του υδροχλωρικού της άλατος το 1926 απ' τους Jansen και Donath [1]. Δέκα χρόνια αργότερα ο Williams και οι συνεργάτες του [2] μπόρεσαν να ανιχνεύσουν τα βασικά τμήματα του μορίου της θειαμίνης χάρη σε ένα τυχαίο περιστατικό. Συγκεκριμένα, διαβίβασαν αέριο SO₂ σε ένα διάλυμα της βιταμίνης με σκοπό να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη βακτηριδίων. Σύντομα καταβυθίστηκε ένα λευκό ίζημα το οποίο αποδείχθηκε ότι ήταν το πυριμιδινικό τμήμα του μορίου έχοντας τη σουλφομάδα συνδεδεμένη με τη μεθυλενική ομάδα, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του μορίου παρέμενε στην υδατική φάση (σχήμα 2). Η μοριακή της δομή προσδιορίστηκε τελικά με κρυσταλλογραφία ακτίνων X απ' τους Kraut και Reed το 1962 [3].



Σχήμα 1: Υδροχλωρική θειαμίνη (ThCl.HCl).

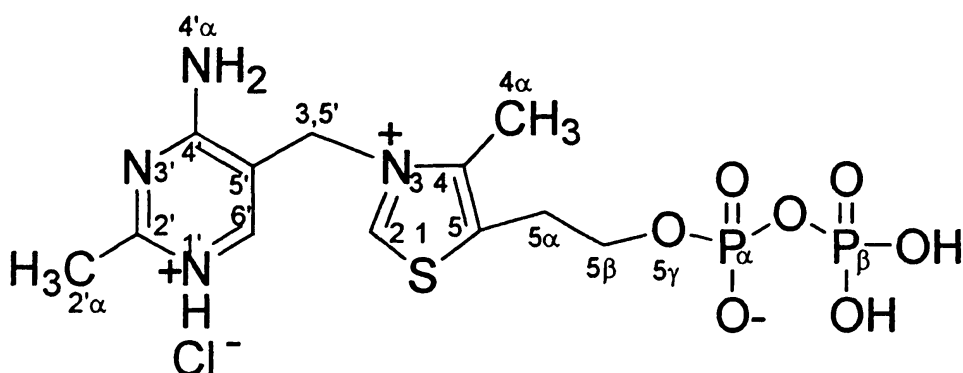


Σχήμα 2: Τα δύο προϊόντα του πειράματος του Williams.

Η θειαμίνη είναι απαραίτητη σε όλους τους έμβιους οργανισμούς. Η βιολογικά ενεργή μορφή της είναι ο διφωσφορικός (ή πυροφωσφορικός εστέρας) (σχήμα 3) ο οποίος σχηματίζεται κατά την αντίδραση της βιταμίνης με το ATP [4]. Με την παραπάνω μορφή συμμετέχει ως



συνένζυμο σε ένα πλήθος ενζυμικών αντιδράσεων που καταλύουν τον μεταβολισμό των υδατανθράκων [5]. Συγκεκριμένα η TPP καταλύει τις αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης των α-κετοοξέων καθώς και το σχηματισμό ή την αποσύνθεση των α-κετολών. Όλες αυτές οι αντιδράσεις έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό: το σχηματισμό ενός άκυλο καρβανιόντος R-CO⁻. Έλλειψη της προκαλεί ένα πλήθος διαταραχών του νευρικού συστήματος όπως η ασθένεια beri-beri (λόγω της συσσώρευσης πυροσταφυλικού οξέος στο αίμα), την ασθένεια του Wernicke και άλλες [6]. Επίσης ο αλκοολισμός προκαλεί την έλλειψη της απ' τον οργανισμό με αποτέλεσμα νευρολογικές και καρδιακές διαταραχές (σύνδρομο του Korsakoff) [7]. Έτσι καθιερώθηκε, στις βιομηχανικά αναπτυσσόμενες κοινωνίες να προστίθεται ως συμπλήρωμα στα τρόφιμα.



Σχήμα 3: Η βιολογικά ενεργή μορφή της θειαμίνης -πυροφωσφορική θειαμίνη- (TPP.HCl).

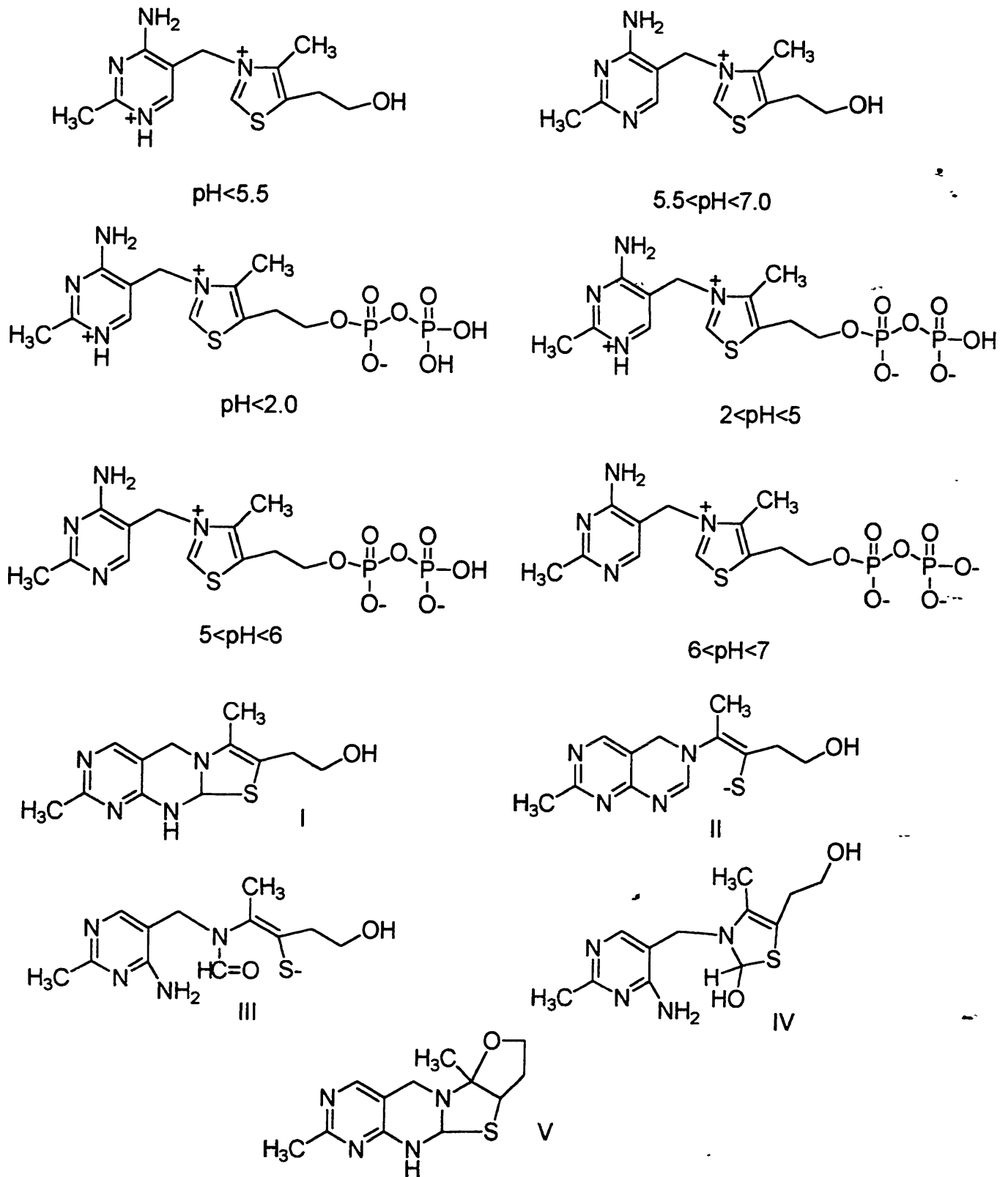
II. Χημικές ιδιότητες σε υδατικά διαλύματα.

Η δομή τόσο του μορίου της θειαμίνης όσο και των παραγώγων της εξαρτάται απ' το pH. Έτσι, σε όξινα και ουδέτερα διαλύματα βρίσκεται σε μία ή περισσότερες καταστάσεις πρωτονίωσης. Το ζήτημα σχετικά με ποιο άτομο αζώτου του πυριμιδινικού δακτυλίου πρωτονιώνεται κατά την αντίδραση της θειαμίνης με HCl, λύθηκε βασιζόμενο σε μελέτες ¹⁵N-NMR οπότε αποδείχθηκε ότι ήταν το N(1') [8]. Επιπλέον ποτενσιομετρικές και NMR μελέτες της TPP και παραγώγων της [9,10] διευκρίνισαν πλήρως τις διάφορες μορφές που λαμβάνει συναρτήσει του pH, καθώς και τις σταθερές ιονισμού όλων των όξινων ομάδων. Έτσι η απλή θειαμίνη υφίσταται ως δικατιόν σε ισχυρά όξινα διαλύματα, ενώ σε pH>5.5 αποπρωτονιώνεται το N(1') της πυριμιδίνης. Η πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP), μπορεί να υφίσταται ως μονοκατιόν,



εσωτερικό άλας (zwitterion), μονοανιόν, ή διανιόν. Οι περιοχές pH στις οποίες συμβαίνει αυτό δίνονται στο σχήμα 4 μαζί με τους αντίστοιχους μοριακούς τύπους. Σε αλκαλικά διαλύματα το μόριο της θειαμίνης υφίσταται ενδομοριακή αμινόλυση και υδρόλυση σχηματίζοντας ένα πλήθος πολυκυκλικών και μη προϊόντων. Έτσι, σε pH=11 η 4^α αμινομάδα αντιδρά με τον C(2) του θειαζολίου σχηματίζοντας το τρικυκλικό προϊόν διυδροθειόχρωμα (I, σχήμα 4). Επιπλέον υδρόλυση οδηγεί σε καταστροφή του θειολικού δακτυλίου και σχηματισμό της 5,6-δύδρο-πυρίμιδο[4,5-d]-πυριμιδίνης στην οποία οφείλεται το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα μετρίως αλκαλικών διαλυμάτων θειαμίνης (II, σχήμα 4) [11]. Ακολούθως, ένα νέο προϊόν σχηματίζεται μιας και ο θειαζολικός δακτύλιος υδρολύεται προς τη φορμάμιδο-θειόλη (III, σχήμα 4) [11]. Η αντίδραση αυτή γίνεται σε δυο στάδια: α) με την επίδραση ενός ισοδυνάμου βάσεως σχηματίζεται αρχικά η ψευδοβάση (IV σχήμα 4), ενώ β) επίδραση ενός δεύτερου ισοδυνάμου βάσεως προκαλεί το άνοιγμα του θειαζολικού δακτυλίου και το σχηματισμό του προϊόντος III. Αυτό μπορεί να οξειδωθεί εύκολα σε δισουλφίδιο και μ'αυτή τη μορφή χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο της βιταμίνης B₁ [12]. Αυτό οφείλεται στο ότι λόγω του ουδέτερου χαρακτήρα του, διαπερνά πιο εύκολα την κυτταρική μεμβράνη απ' ό τι η ίδια η θειαμίνη [13]. Τέλος το τετρακυκλικό προϊόν (V, σχήμα 4) σχηματίζεται κατά την προσθήκη της ύδροξυ-αίθυλ πλευρικής αλυσίδας στο ενάμινο τμήμα του μορίου I σχηματίζοντας έναν τετραϋδροφουρανικό δακτύλιο [14]. Όλες οι παραπάνω αντιδράσεις, είναι αντιστρεπτές σε αλκαλικό περιβάλλον και το αρχικό μόριο της θειαμίνης επανασηματίζεται με την προσθήκη οξέος.





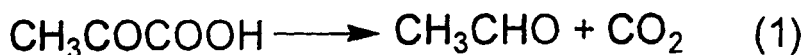
Σχήμα 4: Μοριακοί τύποι θειαμίνης και TPP συναρτήσει του pH υδατικών τους διαλυμάτων.



III. Καταλυτική δράση της θειαμίνης.

A. Ενζυμική κατάλυση.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω η TPP αποτελεί το συνένζυμο σε ένα πλήθος ενζυμικών συστημάτων που καταλύουν κυρίως το μεταβολισμό των υδατανθράκων. Ονομάστηκε δε και συνκαρβοξυλάση (cocarboxylase) επειδή βρέθηκε πρώτα ότι αποτελεί το συνένζυμο της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (PDC). Το ένζυμο αυτό όπως θα δούμε και στο αντίστοιχο κεφάλαιο με τα ένζυμα που ακολουθεί, καταλύει την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακεταλδεΐδη και CO₂,



γεγονός που παρατηρήθηκε πρώτα απ' τους Lohmann και Schuster [15,16]. Το πυροσταφυλικό μπορεί επίσης να υποστεί αυτοοξειδοαναγωγή



προς γαλακτικό και οξικό οξύ (αντίδραση 2) ή να καρβοξυλιωθεί προς οξαλοξικό οξύ [17]. Σύμφωνα με τον Baerog και τους συνεργάτες του όλες αυτές οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα λόγω της ενεργοποίησης του πυροσταφυλικού οξέος απ' την πυροφωσφορική θειαμίνη [18].

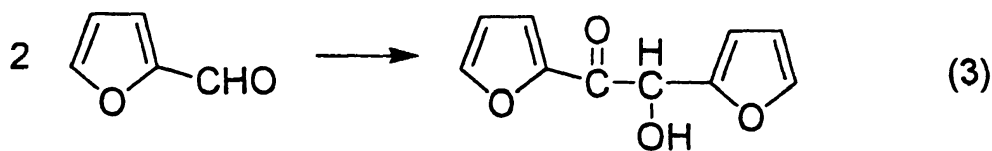
Αργότερα αποδείχθηκε ότι η TPP αποτελούσε συνένζυμο και ενός πλήθους άλλων σημαντικών ενζύμων, τόσο για το μεταβολισμό των υδατανθράκων όσο και για την παραγωγή ενέργειας στους ζώντες οργανισμούς μέσω βιολογικών οξειδώσεων. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα ένζυμα τρανσκετολάση (TK) και τρανσαλδολάση (TA), τα οποία συμμετέχουν στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών, ο οποίος είναι μια εναλλακτική οδός για τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Το πυροσταφυλικό που παράγεται κατά την γλυκολυτική πορεία μετατρέπεται κυρίως σε ακετύλο-συνένζυμο Α (CH₃CO-S-CoA) με τη βοήθεια ενός πολυενζυμικού συστήματος, μέρος του οποίου είναι και το ένζυμο δεϋδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος (PDH) που έχει επίσης ως συνένζυμο την TPP. Στη δεύτερη κατηγορία (παραγωγής ενέργειας) ανήκει το πολυενζυμικό σύστημα δεϋδρογονάση του α-κετογλουταρικού οξέος, το οποίο καταλύει την οξείδωση του α-κετογλουταρικού σε ηλεκτρυλο-συνένζυμο Α στον κύκλο του Krebs. Αυτός αποτελεί την κύρια πηγή υδρογονοκατιόντων που απαιτούνται για τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας [5].



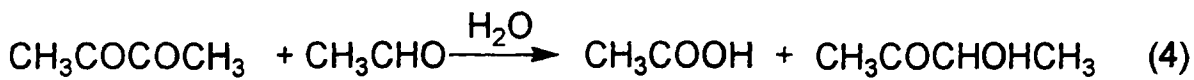
Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τη δομή, τις ιδιότητες καθώς και το μηχανισμό ενζυμικής δράσης τρανσκετολάσης και πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης θα αναφερθούν στο τελευταίο μέρος του κεφαλαίου της εισαγωγής μαζί με μια σύντομη περιγραφή των αντιδράσεων που καταλύουν τα υπόλοιπα προαναφερθέντα ένζυμα.

B. Μη ενζυμική κατάλυση.

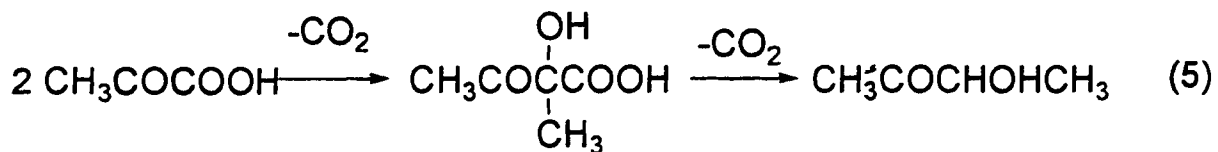
Η θειαμίνη όπως και άλλα θειαζολικά ιόντα βρέθηκε [19] ότι καταλύουν την συμπύκνωση της φουρφουράλης σε φουροΐνη σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



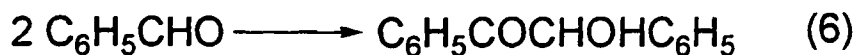
Η καταλυτική δράση της θειαμίνης αποδείχθηκε επίσης στις αντιδράσεις μετατροπής του διακετυλίου σε οξικό και ακετοΐνη παρουσία ακεταλδεύδης [20].



Το πυροσταφυλικό οξύ μπορεί επίσης να αποκαρβοξυλιωθεί μέσω ενός ενδιάμεσου, του α-ακετογαλακτικού οξέος, προς ακετοΐνη παρουσία θειαμίνης όπως διαπίστωσαν οι Koffler και Krampitz [21].



Παρόμοια καταλυτική δράση της θειαμίνης όπως εκείνης της αντίδρασης (5) διαπίστωσε και ο Breslow [22] στην αντίδραση συμπύκνωσης της βενζαλδεύδης σε βενζοΐνη.

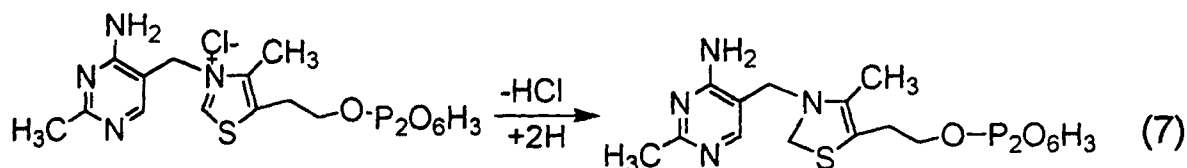


Το γεγονός ότι η θειαμίνη μόνη της μπορούσε να καταλύσει αντιδράσεις ανάλογες μ' αυτές που καταλύει το ένζυμο πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός ενζυμικής και μη ενζυμικής κατάλυσης πρέπει να είναι κοινός [23].

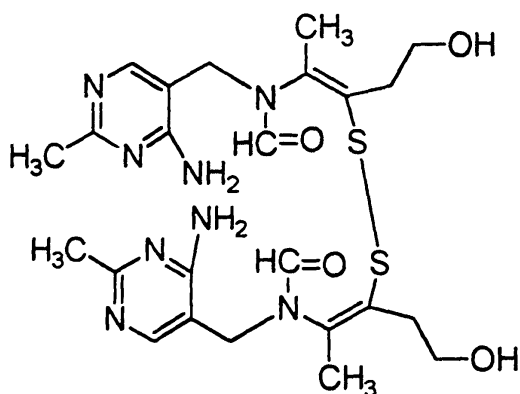


Γ. Μηχανισμοί που προτάθηκαν.

Βασιζόμενος στο γεγονός ότι η θειαμίνη μπορεί να υδρογονωθεί παρουσία μέλανος Pt, ο Lippman [24] πρότεινε ότι οι καταλυτικές της ιδιότητες πρέπει να οφείλονται σε ένα αντιστρεπτό οξειδοαναγωγικό σύστημα του τύπου:

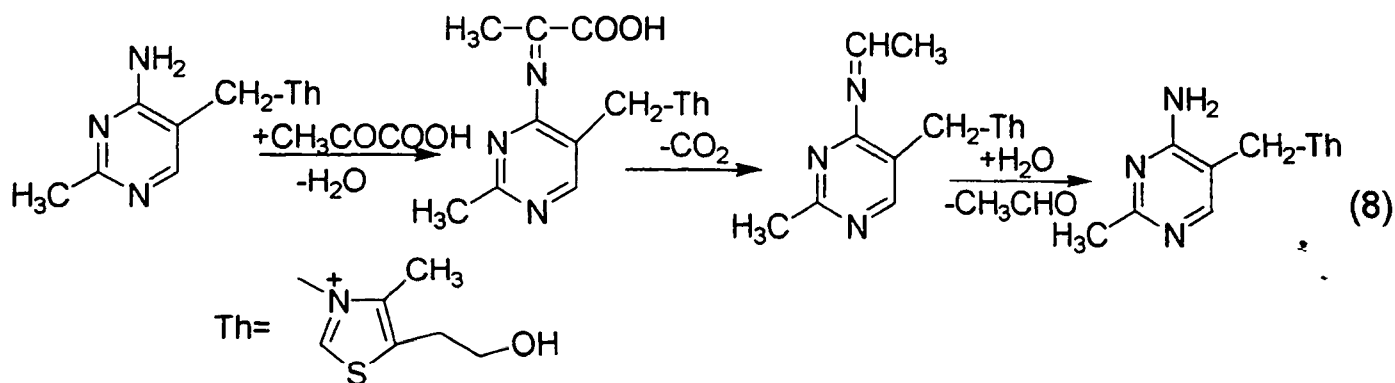


Ο Zima και Williams [25] πρότειναν και αυτοί έναν ανάλογο μηχανισμό ο οποίος όμως στηρίζονταν στην υδρόλυση της θειαμίνης προς φορμαμιδοθειόλη III (σχήμα 4) και στη μετέπειτα οξείδωσή της προς το δισουλφίδιο:

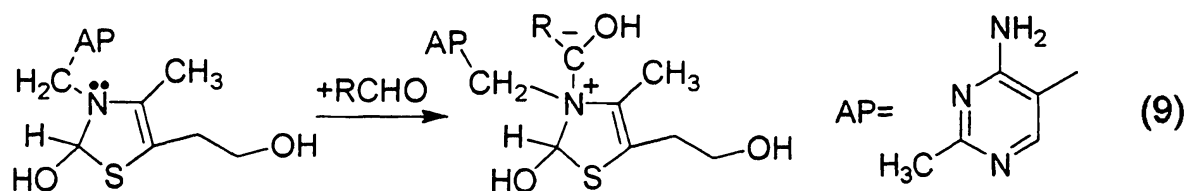


Όπως έχει ήδη αναφερθεί το δισουλφίδιο και όλα τα άλλα προϊόντα υδρόλυσης μετατρέπονται ξανά σε θειαμίνη με προσθήκη οξέος. Έτσι η θειαμίνη σύμφωνα με την παραπάνω πρόταση θα μπορούσε να δράσει ως οξειδοαναγωγικό σύστημα παρόμοιο μ' αυτό της κυστεΐνης-κυστίνης.

Το γεγονός της αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος από πρωτοταγείς αμίνες μέσω σχηματισμού βάσεων Schiff, οδήγησαν τον Langebeck [26] πρώτα και τους Wisner και Valenta [27] αργότερα, να προτείνουν έναν ανάλογο μηχανισμό (8). Αυτός περιελάμβανε πρώτα το σχηματισμό βάσεως του Schiff με τη συμμετοχή της 4'-NH₂ του πυριμιδινικού δακτυλίου και του καρβονυλικού άνθρακα του πυροσταφυλικού και ακολούθως αποκαρβοξυλίωση και υδρόλυση του προϊόντος προς ακεταλδεύδη και θειαμίνη. Το γεγονός όμως ότι η θειαμίνη δεν ήταν ικανή να σχηματίσει βάση του Schiff, λόγω του ασθενούς βασικού χαρακτήρα της εξωκυκλικής αμινομάδας, απέδειξε ότι ο μηχανισμός αυτός δεν μπορούσε να ισχύει.



Αργότερα ο Mizuhara και οι συνεργάτες του [28,29] παρατήρησαν ότι η θειαμίνη μπορούσε να καταλύει τις αντιδράσεις σχηματισμού ακετοΐνης από πυροσταφυλικό οξύ καθώς και τη μετατροπή διακετυλίου και ακεταλδεΐδης προς οξικό οξύ και ακετοΐνη, σε μέτρια αλκαλικά διαλύματα (pH=8.5). Πρότειναν λοιπόν ότι αυτό μπορούσε να επιτευχθεί με το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου στο οποίο το καρβονυλικό άτομο του υποστρώματος να συνδέεται με το τριτοταγές άτομο αζώτου της ψευδοβάσης (IV, σχήμα 4) όπως φαίνεται παρακάτω (9):

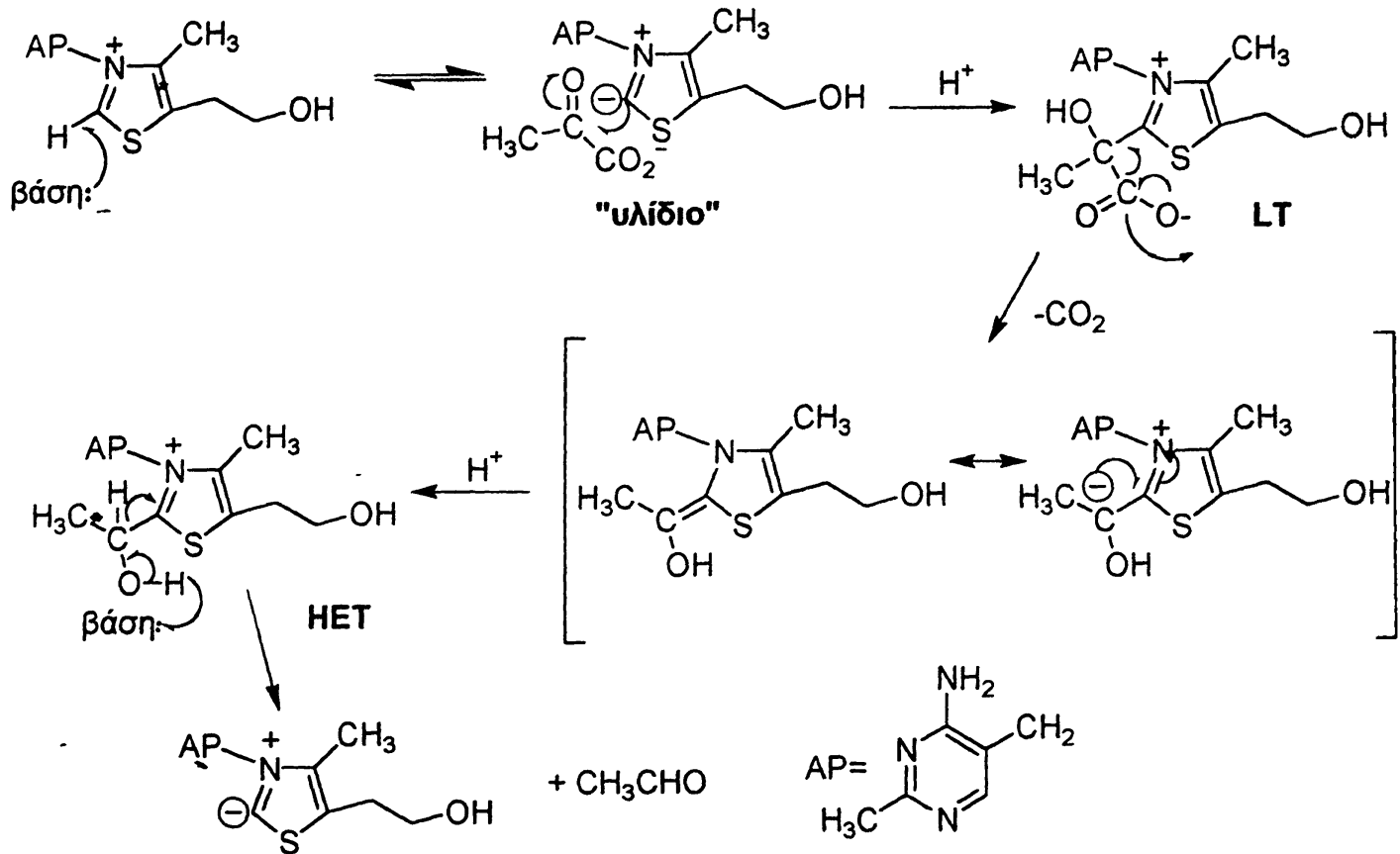


Και ο μηχανισμός αυτός όμως γρήγορα εγκαταλείφθηκε καθώς η ποσότητα της παραπάνω ψευδοβάσης είναι μικρή σε οποιαδήποτε τιμή pH [13].

Τροποποιώντας τον παραπάνω μηχανισμό ο Breslow [30] υποστήριξε ότι το σημείο σύνδεσης του υποστρώματος (πυροσταφυλικού) με τη θειαμίνη είναι η μεθυλενική ομάδα που γεφυρώνει τους δυο δακτυλίους του μορίου. Πειράματα δευτερίωσης όμως [31] απέδειξαν ότι τα άτομα υδρογόνου της ομάδας αυτής δεν ανταλλάσσονται με δευτέριο, γεγονός που διαπιστώθηκε και από τον ίδιο τον Breslow λίγο αργότερα, μαζί με την παρατήρηση ότι το άτομο υδρογόνου του C(2) του θειαζολίου είναι αυτό που ανταλλάσσεται ταχέως. Το συμπέρασμα αυτό τον οδήγησε [22] να διατυπώσει τον μέχρι σήμερα αποδεκτό μηχανισμό καταλυτικής δράσης της θειαμίνης, ο οποίος για την περίπτωση αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος, παρουσιάζεται στο σχήμα 5.

Τα στάδια αυτού του μηχανισμού έχουν ως εξής: Αρχικά με την επίδραση μιας βάσης (σχήμα 5) αποσπάται το H του C(2) του θειαζολίου σχηματίζοντας ένα καρβανιόν το λεγόμενο "υλίδιο". Στη συνέχεια ακολουθεί πυρηνόφιλη προσβολή του υλιδίου στον καρβονυλικό άνθρακα του πυροσταφυλικού σχηματίζοντας το πρώτο ενδιάμεσο προϊόν την 2-(α-λάκτυλ) θειαμίνη (LT).

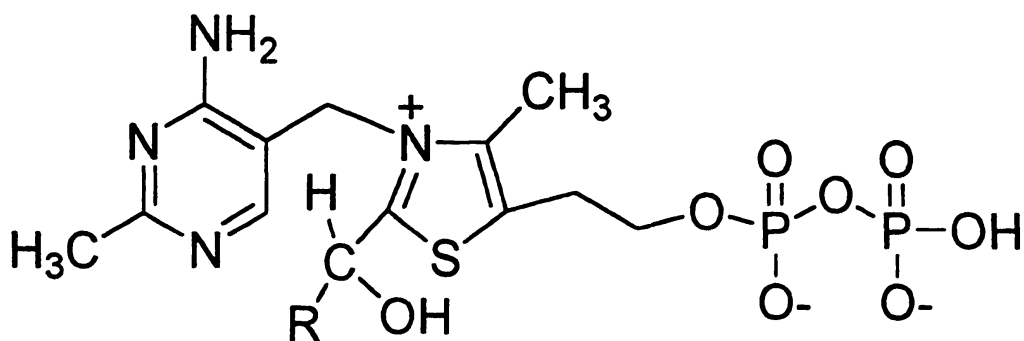




Σχήμα 5: Ο μηχανισμός καταλυτικής δράσης της θειαμίνης που προτάθηκε απ' τον Breslow.

Απελευθέρωση CO₂ έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καρβανιόντος το οποίο βρίσκεται σε συντονισμό με την ταυτομερή του εναμίνη. Πρωτονίωση οδηγεί στο σχηματισμό ενός σταθερού και απομονώσιμου ενδιάμεσου, της 2-(α-ύδροξυ-αιθυλ) θειαμίνης (HET). Τα παράγωγα αυτά, τα οποία φέρουν μια ύδροξυ-άλκυλ-ομάδα στη θέση 2 του θειαζολίου, ονομάστηκαν απ' τον Breslow παράγωγα "ενεργού αλδεύδης" καθώς μπορούν να δράσουν ως μεταφορείς αλδευδικών ομάδων κατ' αναλογία με το ακέτυλο συνένζυμο Α (ενεργό οξικό-μεταφορά και απόδοση ακέτυλο-ομάδων) και την S-αδενόσυλ-μεθειονίνη (ενεργό μεθύλιο-μεταφορά και απόδοση μεθυλομάδων-) σε βιοχημικές αντιδράσεις. Η πλήρης δομή των παραγώγων "ενεργού αλδεύδης" δίνεται στο σχήμα 6. Στο επόμενο βήμα, με την επίδραση μιας βάσης, αποσπάται το υδροξυλικό πρωτόνιο του παραγώγου που οδηγεί στην απελευθέρωση ακεταλδεύδης και που έχει σαν αποτέλεσμα την αναγέννηση του μορίου της θειαμίνης.



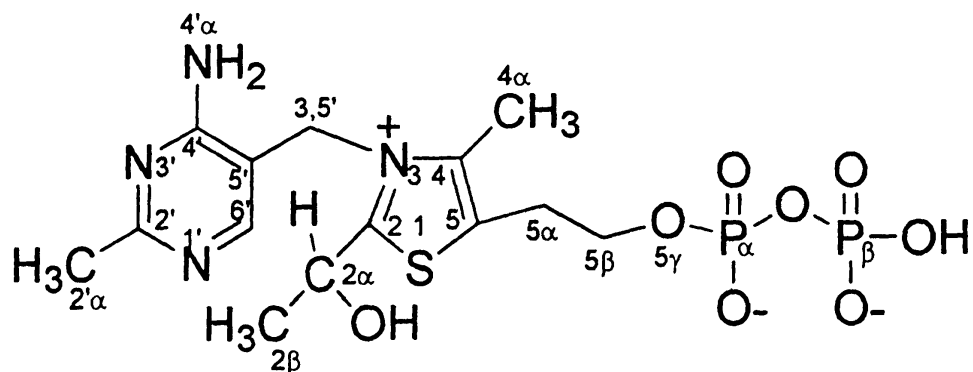


Σχήμα 6: Παράγωγα “ενεργού αλδεύδης” της θειαμίνης (R= άλκυλο ή φαίνυλο-ομάδα).

Ο μηχανισμός αυτός επιβεβαιώθηκε τα επόμενα χρόνια από πολλούς ερευνητές. Η πιο άμεση απόδειξη της ορθότητας των απόψεων του Breslow ήταν η ανίχνευση και απομόνωση απ’ τους Hozler και Beaucamp [32,33] της 2-(α-ύδροξυ-αιθυλ) πυροφωσφορικής θειαμίνης (HETPP) (σχήμα 7). Συγκεκριμένα αυτοί προσέθεσαν στο ένζυμο πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση πυροσταφυλικό οξύ επισημασμένο με ¹⁴C στη θέση 2. Μετά τη διακοπή της αντίδρασης μπόρεσαν να ανιχνεύσουν το προαναφερθέν παράγωγο “ενεργού αλδεύδης” επισημασμένο με ¹⁴C στον C(2 α).

Οι Karlson και Brown [34] πέτυχαν και αυτοί επίσης την απομόνωση της HETPP απ’ το ίδιο ενζυμικό σύστημα, ενώ η επιτυχής σύνθεση και μελέτη των αντιδράσεων της 2-(α-λάκτυλ) και 2-(α-ύδροξυ-αιθυλ) θειαμίνης [35,36] αποτέλεσαν μια επιπλέον απόδειξη της ορθότητας του προτεινόμενου απ’ τον Breslow μηχανισμού. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με την γενική αποδοχή αυτού του μηχανισμού περίπου μισού αιώνα τώρα, υπάρχουν ακόμα πολλά ερωτηματικά σχετικά με τον ακριβή ρόλο των διαφόρων τμημάτων του μορίου της θειαμίνης καθώς και τον ρόλο των μεταλλικών ιόντων τα οποία είναι απαραίτητα για την ενζυμική και μη ενζυμική δράση της θειαμίνης. Με τα ανοικτά αυτά ερωτήματα θα ασχοληθούμε αμέσως μετά.





Σχήμα 7: Δομή της 2-(α-ύδροξυ-αιθυλ) πυροφωσφορικής θειαμίνης (HETPP).

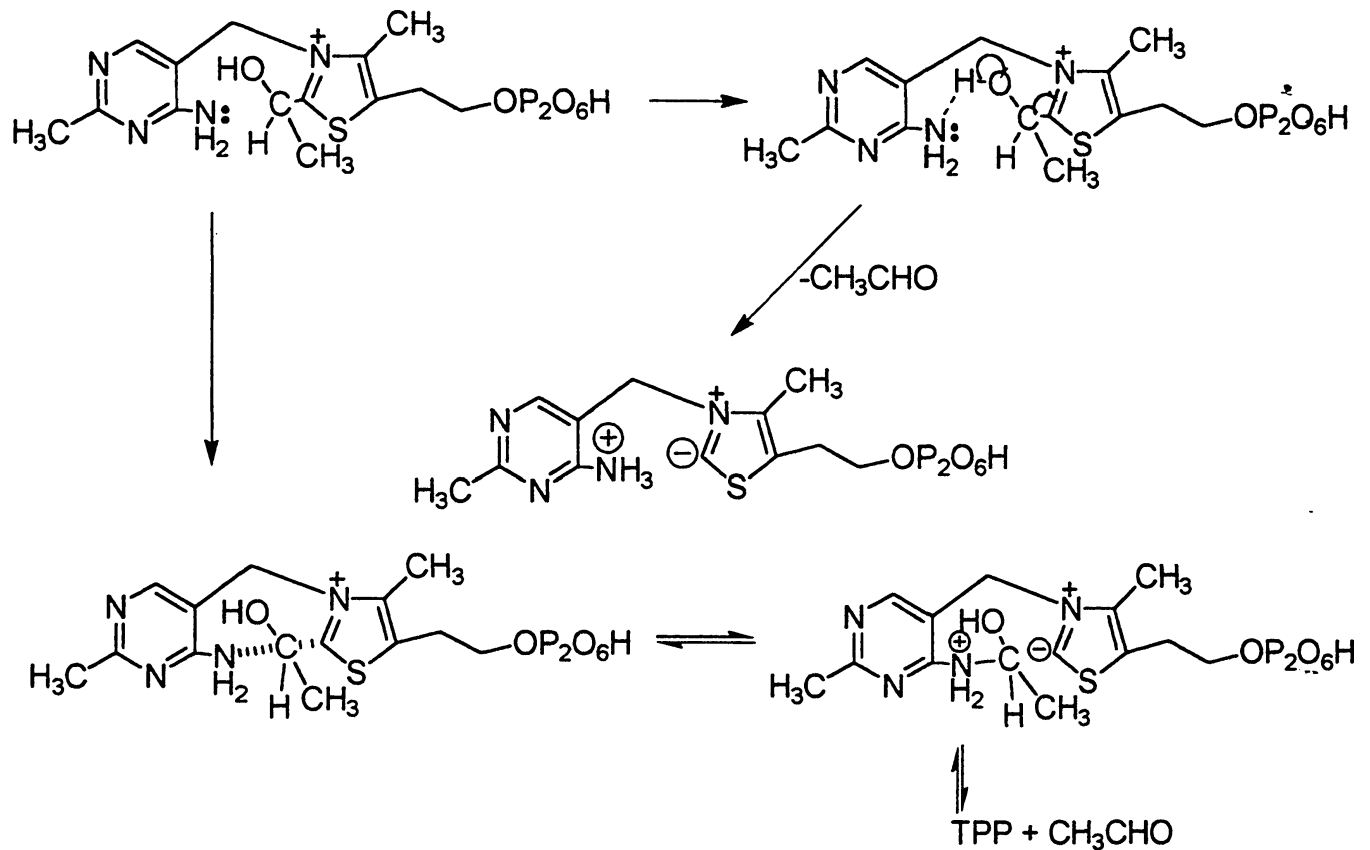
IV. Ρόλος των διαφόρων τμημάτων του μορίου της θειαμίνης στην κατάλυση.

A. 2-μέθυλο-4-άμινο πυριμιδίνη.

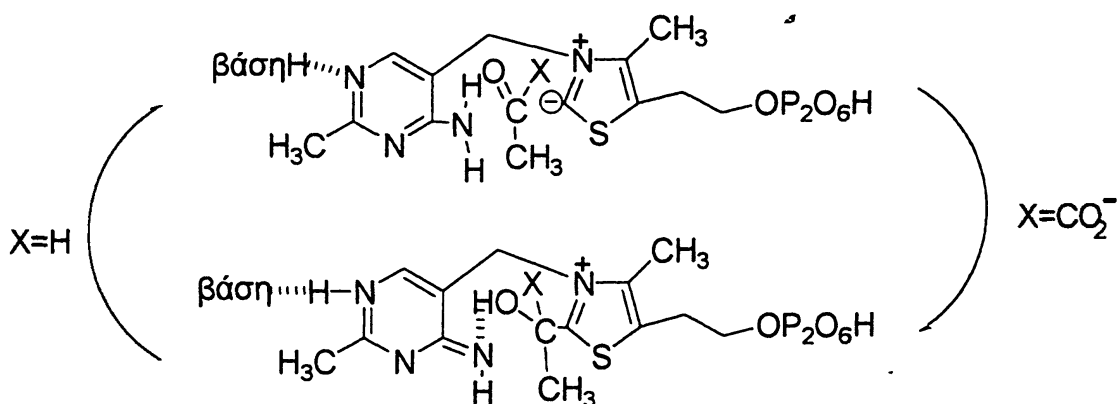
Ο Schellenberger [37] βασιζόμενος σε μελέτες με ενώσεις μοντέλα συμπέρανε ότι η θέση σύνδεσης της πρωτεΐνης με τη θειαμίνη ήταν το N(1') του μορίου και ότι αυτό ήταν δυνατό με τη μεσολάβηση των μεταλλικών ιόντων. Επίσης κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η 4'α-NH₂ της πυριμιδίνης μπορεί να δράσει ως πρωτονιοδέκτης (βάση κατά Lewis) αποπρωτονιώνοντας την ομάδα -O(2α)H της “ενεργού αλδεύδης” έχοντας ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση CH₃CHO. Ο μηχανισμός που πρότεινε με συμμετοχή της αμινομάδας ως βάσεως κατά Lewis δίνεται στο σχήμα 8. Αντιθέτως οι Jordan και Mariam [38] διαπίστωσαν ότι η αμινομάδα της πρωτονιωμένης στο N(1') θειαμίνης δρά ως πρωτονιοδότης (οξύ κατά Lewis) κατά την καταλυτική δράση. Αργότερα ο Schellenberger πάλι [39] διορθώνοντας το μηχανισμό που είχε προτείνει υποστήριξε ότι η 4'α-NH₂ του μορίου λαμβάνει μέρος τόσο στη σύνδεση του υποστρώματος (πυροσταφυλικού) με τη θειαμίνη όσο και στην απελευθέρωση ακεταλδεύδης μέσω του σχηματισμού ενός δεσμού υδρογόνου του τύπου H(4'α)N...HO(2α) όπως φαίνεται στο σχήμα 9. Έτσι, κατά το σχηματισμό του ενδιάμεσου μεταφέρεται ένα άτομο H απ' την αμινομάδα στο άτομο O(2α) του πυροσταφυλικού, με αποτέλεσμα αυτή να μετατρέπεται σε ίμινο-ομάδα και να σχηματίζεται ο προαναφερθείς δεσμός υδρογόνου H(4'α)N...HO(2α) δρώντας η 4'α-NH₂ ως οξύ. Κατά το στάδιο απελευθέρωσης της CH₃CHO το άτομο H της υδροξυλομάδας 2α μεταφέρεται στην ίμινο ομάδα μετατρέποντάς την σε άμινο-ομάδα ξανά, δρώντας τώρα αυτή ως βάση. Απ' την άλλη το N(1')



παίζει ουσιαστικό ρόλο αφού είναι αποπρωτονιωμένο στην άμινο-κατάσταση του μορίου και πρωτονιωμένο στην ίμινο-μορφή.



Σχήμα 8: Μηχανισμός παρέμβασης της 4'-NH₂ στον καταλυτικό κύκλο σύμφωνα με τον Schellenberger.

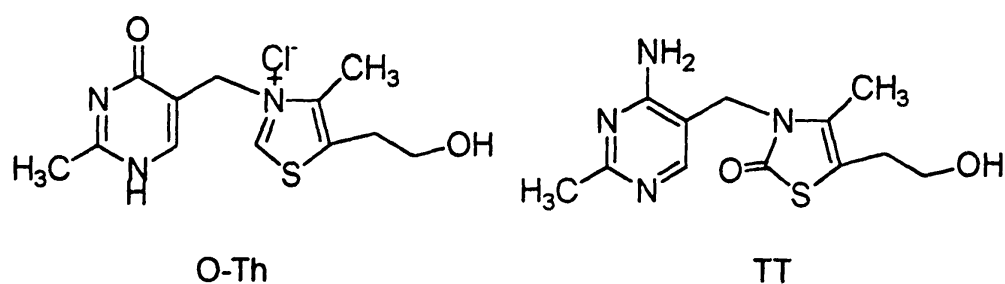


Σχήμα 9: Ο διορθωμένος μηχανισμός του Schellenberger.



Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα [37] για να λάβει χώρα η αλληλεπίδραση $\text{HN}\dots\text{HQ}(2\alpha)$ θα πρέπει η μεθυλομάδα του θειαζολίου να βρίσκεται σε πολύ κοντινή απόσταση με το άτομο $\text{H-C}(6')$ της πυριμιδίνης. Το γεγονός αυτό προϋποθέτει μια κατάλληλη διεύθετηση των αρωματικών δακτυλίων πυριμιδίνης και θειαζολίου η οποία γίνεται δυνατή με τη βοήθεια της πρωτεΐνης [39].

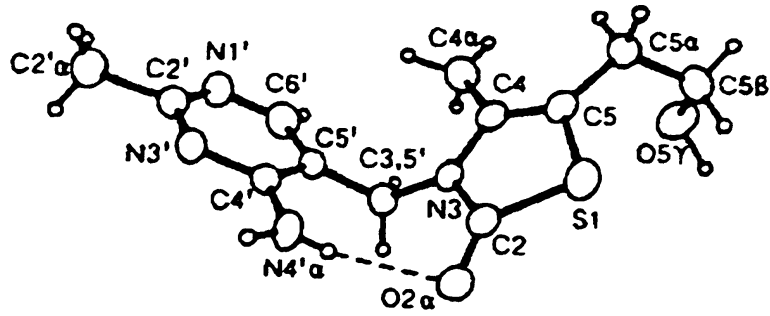
Ο σχετικός προσανατολισμός των δυο αυτών δακτυλίων σύμφωνα με τον Sax και τους συνεργάτες του [40], καθορίζεται απ' τις διεδρες γωνίες $\Phi_P=\text{N}(3)\text{-C}(3,5')\text{-C}(5')\text{-C}(4')$ και $\Phi_T=\text{C}(5')\text{-C}(3,5')\text{-N}(3)\text{-C}(2)$ έχοντας θετικές τιμές κατά την φορά των δεικτών του ρολογιού. Ανάλογα με τις τιμές των γωνιών αυτών η θειαμίνη και τα παράγωγά της, μπορούν να υιοθετούν τρεις διαφορετικές διαμόρφώσεις. Την F διαμόρφωση όταν $\Phi_P=0^\circ$ και $\Phi_T=\pm 90^\circ$, την S διαμόρφωση όταν $\Phi_P=\pm 100^\circ$ και $\Phi_T=\pm 150^\circ$ και την V διαμόρφωση όταν $\Phi_P=\pm 90^\circ$ και $\Phi_T=\pm 90^\circ$. Απ' αυτές η πρώτη είναι συνηθισμένη στα μη υποκατεστημένα στον C(2) παράγωγα της θειαμίνης, η δεύτερη στα C(2)-υποκατεστημένα παράγωγα, ενώ η τελευταία έχει βρεθεί κυρίως σε ενζυμικά συστήματα που κρυσταλλώθηκαν χωρίς την παρουσία υποστρώματος [41-46], ενώ βρέθηκε λιγότερες φορές σε παράγωγα θειαμίνης όπως η οξυθειαμίνη (O-Th) [47,48] και η θειαζολονική θειαμίνη (TT) [49]. Οι δομές αυτών των παραγώγων δίνονται στο σχήμα 10 ενώ η κρυσταλλική δομή της τελευταίας (TT) στο σχήμα 11 απ' όπου και φαίνεται ότι η $4\alpha\text{-CH}_3$ του θειαζολίου προσεγγίζει το άτομο C(6')-H της πυριμιδίνης, ενώ η V διαμόρφωση σταθεροποιείται λόγω της $\text{N}(4'\alpha)\text{H}\dots\text{O}(2\alpha)$ αλληλεπίδρασης.



Σχήμα 10: Δομές της οξυθειαμίνης (O-Th) και της θειαζολονικής θειαμίνης (TT).

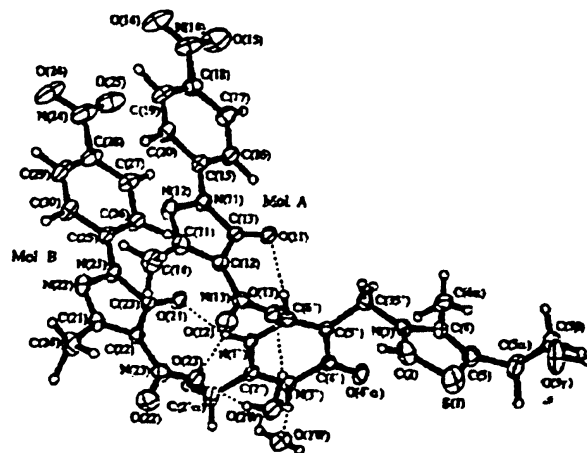
Πρόσφατα λύθηκαν κρυσταλλικές δομές της μορφής $(\text{O-Th})\text{X}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ενός άλατος της οξυθειαμίνης με πικρολονικά ανιόντα καθώς και του συμπλόκου της με Pt, $\text{Pt}(\text{O-Th})\text{Cl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, όπου $\text{X}=\pi\text{κρολονικό ανιόν.}$ [50]. Στην πρώτη περίπτωση το μόριο υιοθετεί μια νέα διαμόρφωση την V' με $\Phi_T = -63.1^\circ$ και $\Phi_P = -54.7^\circ$ ενώ στη δεύτερη τη γνωστή V-διαμόρφωση [50].



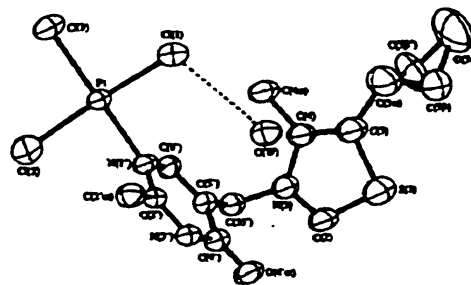


Σχήμα 11: Κρυσταλλική δομή της θειαζολονικής θειαμίνης (TT).

Η διαφορά της V' απ' την V διαμόρφωση έγκειται στο εξής: στην πρώτη, η O(4'a) όξο-ομάδα του πυριμιδινικού δακτυλίου και η 4-CH₃ του θειαζολίου βρίσκονται στην ίδια πλευρά του επιπέδου που ορίζεται από τα άτομα N(3)-C(3,5')-C(5') του μορίου, ενώ στη δεύτερη καταλαμβάνουν αντίθετες πλευρές. Αυτό φαίνεται καθαρά στο σχήμα 12 όπου παρατίθενται οι κρυσταλλικές δομές της πικρολονικής θειαμίνης και του συμπλόκου της με Pt.



A



B

Σχήμα 12: Κρυσταλλικές δομές της πικρολονικής θειαμίνης (A) και του συμπλόκου της με Pt (B).



Ο προταθείς απ' τον Schellenberger μηχανισμός [37,39] προϋποθέτει την ύπαρξη της V διαμόρφωσης στην οποία η 4'α-NH₂ πλησιάζει το άτομο C(2) του θειαζολίου. Η F διαμόρφωση προϋποθέτει τη γειτνίαση του ατόμου H-C(2) με τον C(5') του πυριμιδινικού δακτυλίου, ενώ στην S το άτομο H-C(6') πλησιάζει το άτομο N(3) του θειαζολίου. Μελέτες μοριακής μηχανικής στα μόρια της θειαμίνης, λάκτυλ-θειαμίνης, 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) θειαμίνης και σε παράγωγα τους απ' τον W.Shin και τους συνεργάτες του [51], υποδεικνύουν ότι οι F και S διαμορφώσεις έχουν χαμηλότερη ενέργεια σε σχέση με τη V μορφή που έχει υψηλότερη ενέργεια και πολύ μικρή πιθανότητα ύπαρξης σε διάλυμα ή σε κρυσταλλικά στερεά. Παρόλα αυτά και για τα δυο ενδιάμεσα του καταλυτικού κύκλου της θειαμίνης (LT και HETPP) προτείνεται η V διαμόρφωση με καθοριστικό δομικό χαρακτηριστικό τον ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου του τύπου N(4'α)H₂...O(2α). Προτείνεται ότι ο δεσμός αυτός αποτελεί τον κύριο παράγοντα σταθεροποίησης τόσο των μεταβατικών καταστάσεων, όσο και των καταστάσεων που προηγούνται αυτών, καθ' όλη τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου.

Ο μηχανισμός του Schellenberger ενώ συμφωνεί τόσο με τα κρυσταλλογραφικά [41-46] όσο και με άλλα χημικά δεδομένα [38,52,53] δε λαμβάνει ωστόσο υπόψη το γεγονός ότι για το σχηματισμό της HETPP απ' το καρβανιόν ή την εναμίνη (σχήμα 5) απαιτείται η παρουσία ενός επιπλέον οξέος. Οι παραπάνω ερευνητές πρότειναν λοιπόν ένα μηχανισμό στον οποίο η 4'α-NH₂ δεν δρά ως οξύ ή βάση, αλλά αντί αυτού συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου του τύπου N(4'α)H₂...O(2α) σε όλα τα στάδια του καταλυτικού κύκλου όπως προαναφέρθηκε [51]. Όλα τα ενδιάμεσα προτείνεται να υιοθετούν την V διαμόρφωση, ακόμα και εκείνα που είναι υποκατεστημένα στον C(2), ενώ το ρόλο των βάσεων και των οξέων που απαιτούνται προτείνεται ότι παίζουν όξινια η βασικά αμινοξέα που βρίσκονται κοντά στην TPP στο ενεργό κέντρο των ενζύμων.

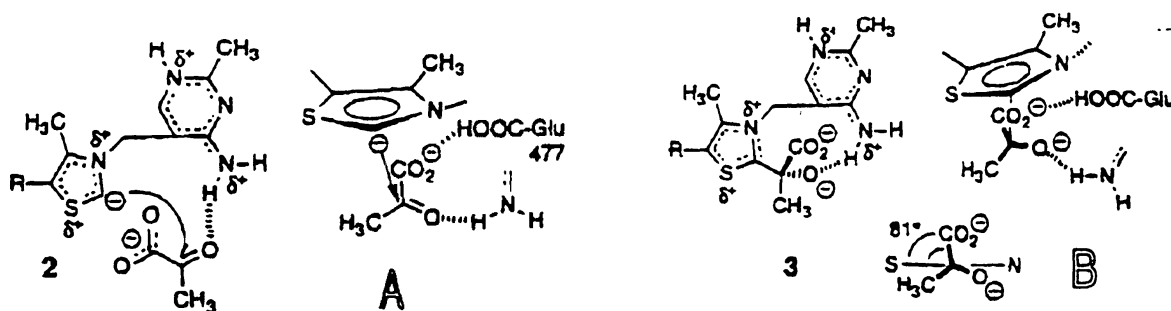
Είναι γνωστό ότι η PDC καταλύει το σχηματισμό της 2-(α-λάκτυλ) πυροφωσφορικής οξυθιαμίνης καθώς και του προϊόντος αποκαρβοξυλίωσης αυτής, 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορικής οξυθιαμίνης, αλληλεπιδρώντας με πυροφωσφορική οξυθιαμίνη και πυροσταφυλικό οξύ, αλλά η αντίδραση δεν προχωρά παραπέρα και δεν απελευθερώνεται ακεταλδεύδη [37]. Αυτά τα πειραματικά δεδομένα αποδόθηκαν στο γεγονός του σχηματισμού ισχυρού δεσμού υδρογόνου του τύπου O(4'α)...H-O(2α) στα παράγωγα “ενεργού αλδεύδης” της οξυθιαμίνης. Η σταθεροποίηση λοιπόν που προσφέρει αυτός ο δεσμός είναι τέτοια ώστε δεν επιτρέπει σε μια βάση να αποσπάσει το H-O(2α) και έτσι να απελευθερωθεί CH₃CHO [37]. Αν η



υπόθεση αυτή αληθεύει, τότε ένας ισχυρός δεσμός HN(4'a)...O(2a) (μοντέλο Schellenberger) θα μπορούσε να αναστέλλει παρά να καταλύει την ενζυμική πορεία.

Παρόμοιου είδους μελέτες απ' τους Friedemann και Brietkopf καταλήγουν στο ίδιο συμπέρασμα, ότι δηλαδή τα περισσότερα σταθερά διαμορφωμερή υιοθετούν την V διαμόρφωση που σταθεροποιείται με σχηματισμό του προαναφερθέντος δεσμού υδρογόνου και που εντοπίζεται σε όλα τα ενδιάμεσα [54]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω οι Washabaugh και Jencks [55] υπέδειξαν ότι η 4'a-NH₂ δεν συμμετέχει σε ενδομοριακού τύπου κατάλυση. Τόσο αυτές όμως όσο και οι προηγούμενες μελέτες μοριακής μηχανικής, περιορίζονται στην αέρια, υγρή ή στερεά φάση, αγνοώντας παντελώς την επίδραση του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος στη σταθερότητα και τη διαμόρφωση των σωματιδίων που σχηματίζονται. Μια σχετικά πρόσφατη μελέτη στην οποία ο παράγοντας αυτός λαμβάνεται υπόψη, πραγματοποιήθηκε απ' τους M.Lobell και D.H.G Crout [56], χρησιμοποιώντας δεδομένα απ' την κρυσταλλική δομή της PDC. Αυτοί κατέληξαν στα εξής συμπεράσματα:

1°. Πυρηνόφιλη προσβολή του υλιδίου (2) στο μόριο του πυροσταφυλικού οξέος η οποία γίνεται σε ένα επίπεδο κάθετο προς αυτό του δεσμού C=O (σχήμα 13), οδηγεί στο σχηματισμό ενός ενδιαμέσου (3) το οποίο είναι πολύ ασταθές λόγω του ότι φέρει διπλό αρνητικό φορτίο. Στη σταθεροποίησή του συμβάλλουν δυο δεσμοί υδρογόνου, ο πρώτος μεταξύ του πρώην καρβονυλικού O του πυροσταφυλικού και της 4'a-NH₂ και ο δεύτερος μεταξύ του καρβοξυλίου του ενδιαμέσου και του ατόμου υδρογόνου του γ-καρβοξυλίου του Glu-477.

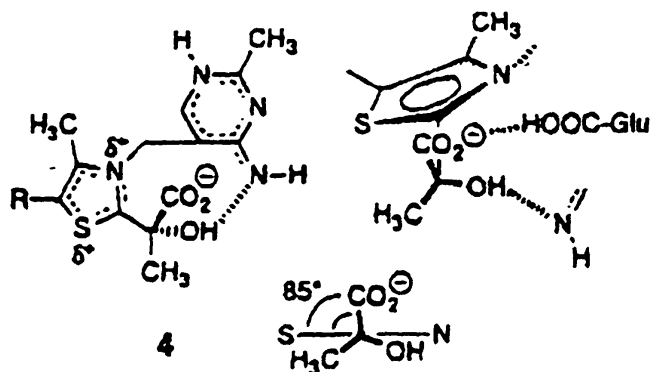


Σχήμα 13: A: Σχηματισμός και B: διαμόρφωση του πρώτου ενδιαμέσου (3) της καταλυτικής δράσης της θειαμίνης [56].

2°. Στο επόμενο στάδιο η μεταφορά ενός ατόμου υδρογόνου απ' την 4'a-NH₂ στο αρνητικά φορτισμένο άτομο ⁻O-C(2a) έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό της 2-(α-λάκτυλ) θειαμίνης (LT) (4), στην οποία η καρβοξυλική ομάδα είναι σχεδόν κάθετη στο επίπεδο του θειαζολικού δακτυλίου

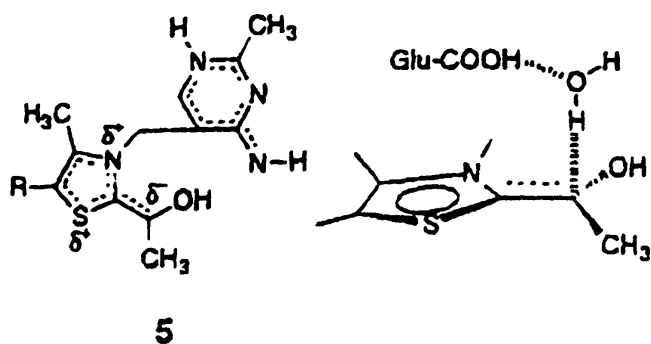


(δεδρη γωνία 85°) (σχήμα 14), όπως περίπου και στο ενδιάμεσο 3 (δεδρη γωνία 81° , σχήμα 13). Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό για την πορεία της κατάλυσης και θα συζητηθεί παρακάτω. Και σ' αυτή την περίπτωση το ενδιάμεσο (4) σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου του τύπου Glu(477)-COOH... $^{\ominus}$ O₂C-ομάδας του λάκτυλ παραγώγου και HN(4'α)(ίμινο)...HO(2α).



Σχήμα 14: Σταθεροποίηση και διαμόρφωση της 2-(α-λάκτυλ) θειαμίνης (4) [56].

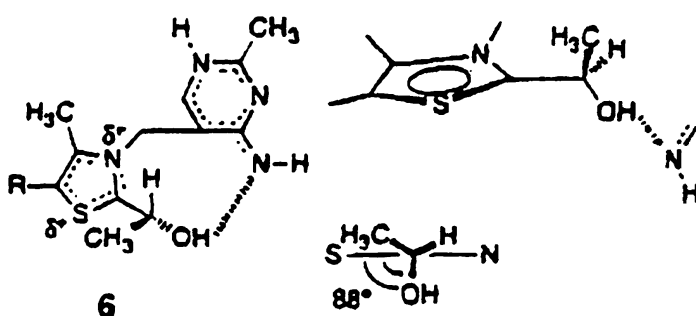
3°. Αποκαρβοξυλίωση της 2-(α-λάκτυλ) θειαμίνης (4) απαιτεί τη μεταφορά $2e^-$ πάνω στον C(2α) και οδηγεί στον σχηματισμό του καρβανιόντος-εναμίνης (5) (σχήμα 15). Πρωτονίωση τους οδηγεί στο σχηματισμό της ΗΕΤΡΡ (6) που σταθεροποιείται λόγω του δεσμού υδρογόνου HN(4'α)(ίμινο)...HO(2α) (σχήμα 16). Σε αντίθεση με τη θεωρία του Schellenberger στην οποία προτείνεται ότι η 4'α-NH₂ δρά ως οξύ για το σχηματισμό της ΗΕΤΡΡ [37,39,57] στην παρούσα μελέτη υποστηρίζεται ότι αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ενός μορίου H₂O, η οξύτητα του οποίου έχει αυξηθεί λόγω αλληλεπίδρασής του με το το γ-καρβοξύλιο του Glu477 (σχήμα 15).



Σχήμα 15: Δομή και διαμόρφωση του καρβανιόντος-εναμίνης (5) [56].

Ο λόγος απόκλεισης της παραπάνω υπόθεσης του Schellenberger είναι το ότι η 4'α-NH₂-ομάδα παραμένει αποπρωτονιωμένη και βρίσκεται ως 4'α-NH-ομάδα μετά το σχηματισμό του λάκτυλ παραγώγου. Η 4'α-NH-ομάδα δεν είναι προσβάσιμη από μόρια του διαλύτη, ούτε γειτνιάζει με όξινες ομάδες, γεγονός που καθιστά μάλλον αδύνατη την επαναπρωτονίωση της.

4°. Τέλος, ο ισχυρός δεσμός υδρογόνου HN(ίμινο)...HO(2α) έχει σαν αποτέλεσμα τον ιονισμό του ατόμου O(2α), την πρωτονίωση της 4'α-ίμινο ομάδας και τη συνακόλουθη απελευθέρωση ακεταλδεϋδης. Σε όλα τα παραπάνω στάδια το μόριο της θειαμίνης προτείνεται ότι διατηρεί τη V διαμόρφωση, έχοντας την HO(2α) ομάδα σχεδόν κάθετη στο θειαζολικό δακτύλιο με διεδρη γωνία 88°.

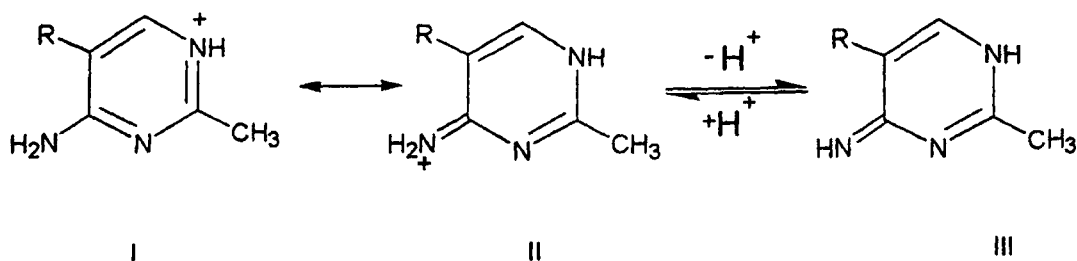


Σχήμα 16: Διαμόρφωση και τρόπος σταθεροποίησης της HETPPP (6) [56].

Αυτές οι προτάσεις βέβαια δεν συμφωνούν με πολλά πειραματικά δεδομένα που προέρχονται κυρίως από τις κρυσταλλικές δομές παραγώγων θειαμίνης υποκατεστημένων στον C(2), οι οποίες βρίσκονται στην S διαμόρφωση και παρουσιάζουν ισχυρή HO(2α)...S(1) αλληλεπίδραση [58].

Συνεχίζοντας, τίθεται το ερώτημα αν συμμετέχει η 4'α-NH₂ στο σχηματισμό του “υλιδίου” (σχήμα 5, σελίδα 9). Ένα απ’ τα κοινά χαρακτηριστικά όλων των κρυσταλλικών δομών ενζύμων θειαμίνης είναι η ύπαρξη δεσμού υδρογόνου μεταξύ του ατόμου N(1') της πυριμιδίνης και του γ-καρβοξυλίου ενός μορίου γλουταμικού (Glu) [41-46]. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό της δομής I και της μορφής συντονισμού της II (σχήμα 17) με πρωτονιωμένη την ίμινο-ομάδα. Μελέτες σε N(1')-άλκυλο-4-άμινο-πυριμιδίνες έδειξαν ότι το pK_a της 4'α-NH₂ αυξάνει από 5.7 στην 4'-άμινο πυριμιδίνη σε 12.2 στο N(1')-μέθυλο ανάλογο [59]. Ανάλογη συμπεριφορά αναμένεται και όταν το N(1') είναι πρωτονιωμένο ή ίσως μεταλλωμένο.

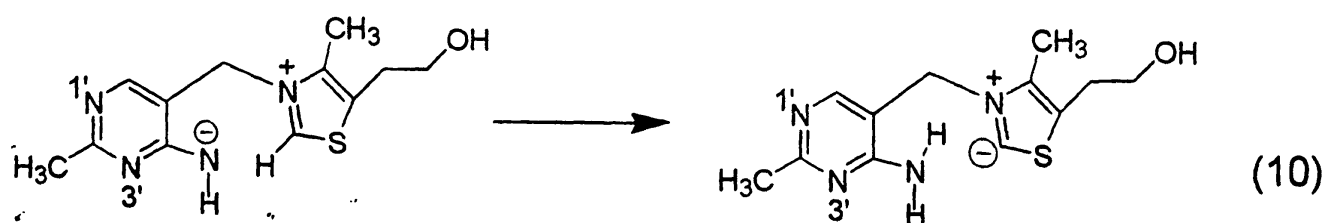




Σχήμα 17: Αναμενόμενες δομές του πρωτονιωμένου και αποπρωτονιωμένου πυριμιδινικού δακτυλίου.

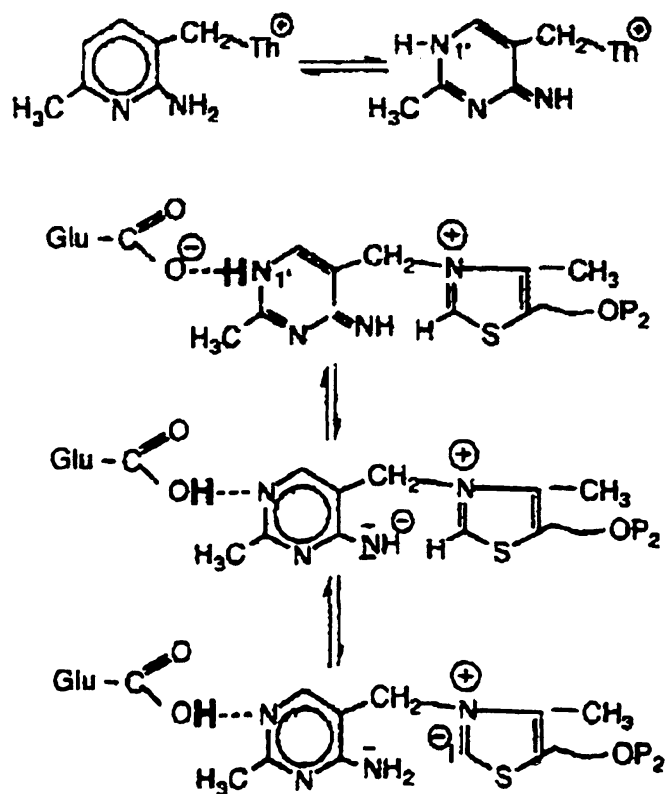
Παρόλα αυτά στο υδρόφοβο περιβάλλον της πρωτεΐνης οι δομές I και II αποσταθεροποιούνται, ενώ ευνοείται η δομή III. Το pK_a αναμένεται να αλλάζει τώρα προς την αντίθετη κατεύθυνση. Μελέτες απ' τον Jordan και τους συνεργάτες του, έδειξαν ότι η πρωτονίωση του ατόμου N(1') οδηγεί σε σωματίδια που παρουσιάζουν pK_a της 4'-αμινομάδας περίπου 7.8 [52]. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και απ' τις πολύ πρόσφατες μελέτες μοριακής μηχανικής των R. Friedemann και H. Neef, σε ένα πλήθος πρωτονιωμένων και μη, άμινο και ίμινο μορφών της θειαμίνης [60]. Στην αέρια φάση η θειαμίνη είναι μεν σταθερότερη απ' τις ίμινο- ταυτομερείς μορφές της, αλλά η ενεργειακή διαφορά είναι μικρή και έτσι αναμένεται ότι ένα N(1')-ίμινο ταυτομερές θα μπορούσε να σταθεροποιηθεί μέσω αλληλεπιδράσεων με το πρωτεϊνικό περιβάλλον. Όσον αφορά την βασικότητα/οξύτητα της 4'-NH₂ βρέθηκε ότι πρωτονίωση στα άτομα N(1') ή N(3') μειώνει το μήκος δεσμού C(4')-N(4'a), ενώ πιθανή αποπρωτονίωση της 4'-αμινομάδας απαιτεί πολύ λιγότερη ενέργεια στα N(1') και N(3') πρωτονιωμένα παράγωγα απ' ότι στα αποπρωτονιωμένα. Τα παραπάνω υποδεικνύουν αυξημένη οξύτητα της 4'-NH₂ επιβεβαιώνοντας πολλά προηγούμενα δεδομένα [38, 61].

Θα πρέπει να σημειωθεί τέλος, ότι ο σχηματισμός του υλιδίου απαιτεί 83 KJ/mol λιγότερη ενέργεια απ' ότι η αποπρωτονίωση της 4'-αμινομάδας, ενώ η ενέργεια ενεργοποίησης E_{act} για την αντίδραση (10),



βρέθηκε ότι είναι 20 KJ/mol στην αέρια φάση. Επιπλέον η ενέργεια αυτή θα μπορούσε να μειωθεί κατά πολύ λόγω αλληλεπίδρασης του μορίου της θειαμίνης με το αποένζυμο και/ή το υπόστρωμα, έχοντας ως αποτέλεσμα τελικά η αντίδραση να ευνοείται.

Ο Schellenberger [62] λαμβάνοντας υπόψην του τόσο αυτά, όσο και δεδομένα προσδιορισμού σταθερών ταχύτητας ανταλλαγής του H-C(2) με δευτέριο (D), για την TPP εντός και εκτός ενός πλήθους ενζυμικών συστημάτων [63], κατέληξε τελικά σε ένα μηχανισμό για το σχηματισμό του υλιδίου με συμμετοχή της 4'α-αμινομάδας (σχήμα 18).



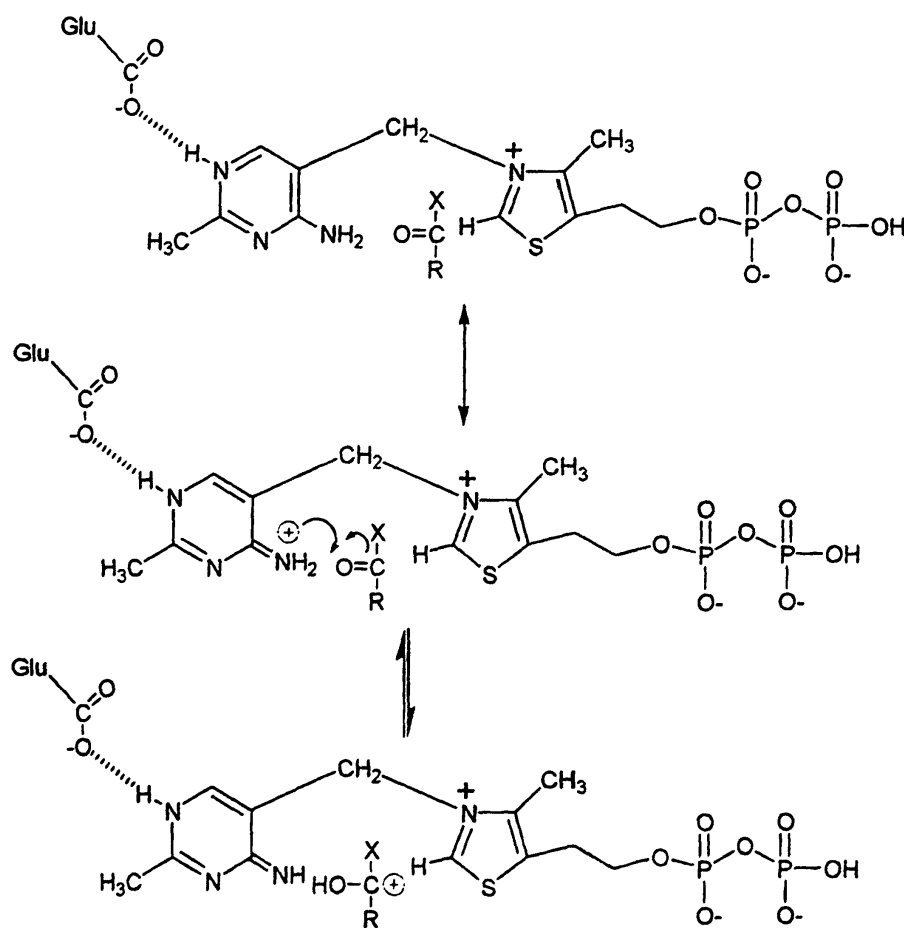
Σχήμα 18: Μηχανισμός σχηματισμού του υλιδίου σύμφωνα με τον Schellenberger [62].

Προτείνεται λοιπόν, ότι το συνένζυμο βρίσκεται όχι μόνο στην V διαμόρφωση όταν αλληλεπιδρά με το αποένζυμο, αλλά και στην ταυτομερή ίμινο μορφή III (σχήμα 17), για τους λόγους που έχουν ήδη αναφερθεί. Έτσι είναι δυνατή η απόσπαση του ατόμου του υδρογόνου H-N(1') απ' την πρωτεΐνη (γλουταμικό ανιόν σε υδρόφοβο περιβάλλον), με αποτέλεσμα την μεταφορά αρνητικού φορτίου πάνω στο N(4'α). Αυτό γίνεται με τη σειρά του αρκετά βασικό ώστε να προκαλέσει τον ιονισμό του C(2), που με απόσπαση υδρογόνου οδηγεί τελικά στο σχηματισμό του



“υλιδίου”. Έτσι εξηγούνται και οι μεγάλες διαφορές (3-4 τάξεις μεγέθους) στην ταχύτητα ανταλλαγής C(2)-H/D μεταξύ της ελεύθερης TPP και της ενζυμικά συνδεδεμένης TPP.

Ο ίδιος [64] προτείνει και ένα συνοπτικό μηχανισμό δράσης του αμινοπυριμιδινικού τμήματος, παρουσία του υποστρώματος ο οποίος παρουσιάζεται στο σχήμα 19. Συγκεκριμένα, προτείνει ότι πρωτονίωση του ατόμου N(1') από την καρβοξυλική ομάδα ενός γειτονικού γλουταμικού οξέος, προκαλεί μεγάλη μείωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του δακτυλίου με αποτέλεσμα την αύξηση της οξύτητας της 4'-αμινομάδας. Αυτή με τη σειρά της μεταφέρει ένα H⁺ στο καρβονυλικό οξυγόνο του υποστρώματος οδηγώντας στην παραγωγή ενός καρβοκατιόντος, το οποίο εν συνεχεία μπορεί να δράσει ως ένα πολύ αποτελεσματικό ηλεκτρόφιλο αντιδραστήριο ιονίζοντας τον C(2) του θειαζολίου.



Σχήμα 19: Προτεινόμενος μηχανισμός με συνδυαστική δράση αμινομάδας/ιμινομάδας και υποστρώματος για το σχηματισμό του “υλιδίου” [64].

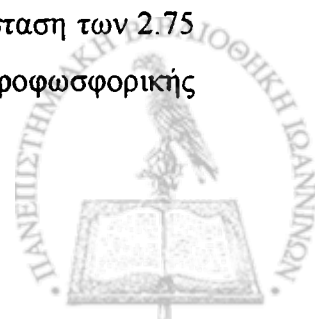
Η 2'-μεθυλομάδα της πυριμιδίνης και η μεθυλενομάδα που ενώνει τους δυο δακτυλίους του μορίου, προτείνεται ότι παίζουν και αυτές σημαντικό ρόλο. Η πρώτη πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με υδρόφοβα τμήματα του αποενζύμου, αφού αντικατάστασή της με άλλες πολικές ομάδες έχει ως αποτέλεσμα αυτά τα παράγωγα θειαμίνης να παρουσιάζουν μικρή συγγένεια ως προς το αποένζυμο και πολύ μικρότερη καταλυτική δράση [65]. Η δεύτερη είναι σημαντική για τη διατήρηση της γεωμετρίας του μορίου, αφού αντικατάστασή της οδηγεί σε απόλυτη καταστροφή της ενζυμικής δραστηριότητας [66]. Τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώθηκαν άλλωστε και πρόσφατα [41-46]



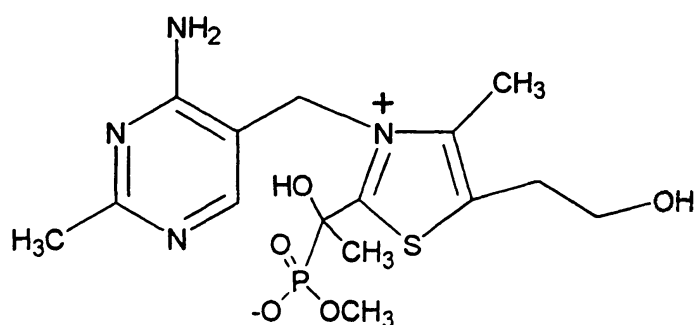
B. 4-μέθυλο θειαζόλιο και πυροφωσφορική ομάδα.

Η καταλυτική δράση της θειαμίνης επικεντρώνεται όπως έχουμε πει στο άτομο C(2) του θειαζολικού δακτυλίου αφού εκεί συνδέεται το υπόστρωμα με το συνένζυμο. Οι κατάλληλες θερμοδυναμικές (pK_a) καθώς και κινητικές ιδιότητές του (μεγάλη ταχύτητα απόσπασης του υδρογόνου H-C(2) κάτω από κατάλληλες συνθήκες), καθιστούν τον C(2) ως το πιο ικανό άτομο του μορίου της θειαμίνης για να επιτελέσει τον καταλυτικό της ρόλο. Εύλογα τίθεται το ερώτημα λοιπόν ποιά δομικά χαρακτηριστικά του δακτυλίου είναι υπεύθυνα για τις ιδιότητες αυτές. Ο Haake και οι συνεργάτες του [13,67,68] συμπέραναν ότι το θειαζολικό ιόν είναι καλύτερος καταλύτης απ' το μίδαζολικό ή οξαζολικό και αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι το υλίδιο σταθεροποιείται με συμμετοχή των 3d τροχιακών του ατόμου S. Επιπρόσθετα ο Hogg [69] πρότεινε ότι το άτομο S της TPP μπορεί να χρησιμοποιήσει τα κενά 3d τροχιακά του για να σταθεροποιήσει το αρνητικό φορτίο της μεταβατικής κατάστασης που εντοπίζεται πάνω στο O(2α), οδηγώντας στο σχηματισμό της "ένεργου αλδεύδης". Αυτό γίνεται μέσω της αλληλεπίδρασης $\delta^+S \dots O(2\alpha)^{\delta-}$, ενώ απέδωσε στην πολικότητα του δεσμού $\delta^+C(2)-S(1)^{\delta+}$ το σωστό προσανατολισμό του διπόλου $\delta^+C=O^{\delta-}$ του πυροσταφυλικού οξέος. Τελικά ο μηχανισμός που πρότεινε είναι ουσιαστικά ο ίδιος με εκείνον του Breslow (σχήμα 5), με τη διαφορά ότι σε κάθε στάδιο της καταλυτικής δράσης το άτομο O(2α) υποδεικνύεται ότι αλληλεπιδρά με το άτομο S(1) του δακτυλίου, σταθεροποιώντας έτσι όλα τα ενδιάμεσα.

Στις κρυσταλλικές δομές των βρωμιούχου 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ)-3,4-διμέθυλο θειαζολίου, 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) θειαμίνης [40], 2-(α-ύδροξυ-α-βένζυλ) θειαμίνης (HBT) [70], 2-(α-ύδροξυ-βένζυλ) οξυθειαμίνης (HBOTh) [71] και πρόσφατα των 2-(α-ύδροξυ-βένζυλ) μονοφωσφορικής θειαμίνης (HBTMP) [72] και 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορικής θειαμίνης (HETPP) [73] εντοπίζεται μικρή απόσταση μεταξύ του ατόμου S(1) και του O(2α) της τάξης των 2.7-2.9 Å υποδηλώνοντας ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ενώ παράλληλα τα μόρια υιοθετούν την S διαμόρφωση. Η παραπάνω λοιπόν αλληλεπίδραση συνεπάγεται μειωμένη τιμή pK_a ($pK_a=12$) του υδροξυλικού πρωτονίου H-O(2α) [74]. Μετά τον ιονισμό του, η αλληλεπίδραση αυτή γίνεται ακόμα ισχυρότερη, λόγω του καθαρού αρνητικού φορτίου που εντοπίζεται πάνω στο άτομο O(2α) και ως εκ τούτου σταθεροποιείται περαιτέρω το σύστημα. Σε τέτοιου είδους ισχυρή αλληλεπίδραση αποδίδεται κατά τον Hogg η μη απελευθέρωση ακεταλδεύδης του συστήματος οξυθειαμίνης-πυροσταφυλικού-PDC, όπως έχουμε ήδη αναφέρει πιο πάνω. Αναλυτικότερα η απόσταση των 2.75 Å S(1)-O(2α) που παρατηρείται στη δομή της της 2-(α-ύδροξυ-βένζυλ) πυροφωσφορικής



οξυθειαμίνης υποδεικνύει τόσο ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των ατόμων, έτσι που ο ιονισμός του υδροξυλικού πρωτονίου H-O(2α) δεν λαμβάνει χώρα και έτσι δεν απελευθερώνεται CH₃CHO, αν και τότε θα έπρεπε να συμβαίνει το αντίθετο. Τα παραπάνω δεδομένα έρχονται σε συμφωνία με τις απόψεις του Hogg, παρόλο το γεγονός ότι στην κρυσταλλική δομή ενός αναλόγου της λάκτυλ-θειαμίνης, του αιθυλεστέρα της φώσφο-λάκτυλ-θειαμίνης (σχήμα 20) η αλληλεπίδραση αυτή απουσιάζει, αφού η φωσφονική ομάδα είναι κάθετη στο επίπεδο του θειαζολικού δακτυλίου [75].



Σχήμα 20: Δομή της φώσφο-λάκτυλ-θειαμίνης (PLT).

Ο R. Kluger [76] υποστήριξε ότι αυτό οφείλεται στο μεγάλο μέγεθος αυτής της ομάδας και έτσι αναγκάζεται να λάβει αυτή τη διαμόρφωση, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι στερεοχημικές απώσεις μεταξύ αυτής και της ομάδας C(3,5') που ενώνει τους δυο δακτυλίους. Ανάλογη κατάσταση αναμένεται και για την LT όπως αναλύεται αμέσως παρακάτω. Συγκεκριμένα, αποκαρβοξυλίωση της όπως έχουμε πεί έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταφορά ενός ζεύγους ηλεκτρονίων πάνω στον C(2α). Η σταθεροποίηση του καρβαγιόντος που προκύπτει είναι δυνατή μέσω επικάλυψης του p τροχιακού του C(2α) που περιέχει τα δυο ηλεκτρόνια, με το π-αρωματικό σύστημα του θειαζολικού δακτυλίου. Απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί αυτό όμως είναι το p-τροχιακό να βρίσκεται σε επίπεδο κάθετο σε σχέση μ' αυτό του δακτυλίου, ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη επικάλυψη των τροχιακών 2p και 3d. Για να ελαχιστοποιηθεί η ενέργεια που συνεπάγεται πιθανή αλλαγή διαμόρφωσης, θα πρέπει τόσο η LT όσο και η μεταβατική κατάσταση που οδηγεί σ' αυτή να παρουσιάζουν ίδιο προσανατολισμό του καρβοξυλίου σε σχέση με το θειαζολικό δακτύλιο. Με τον τρόπο αυτό ο σχηματισμός των διαφόρων ενδιάμεσων της καταλυτικής δράσης, δεν θα συνοδεύεται από αλλαγές διαμόρφωσης και άρα η απαιτούμενη ενέργεια σχηματισμού τους θα είναι η ελάχιστη δυνατή.



Η αρχή αυτή “της ελάχιστης κίνησης και μέγιστης αλληλεπικάλυψης των τροχιακών” του R. Kluger [76], επιβεβαιώνεται από μελέτες μοριακής μηχανικής των Friedemann και Brietkopf [54], οι οποίοι αφενός μεν συμπέραναν ότι το καρβοξύλιο αναμένεται να είναι κάθετο στο επίπεδο του θειαζολίου στην LT, αφετέρου το ότι ο δεσμός C(2α)-COO[•] παρουσιάζει σημαντική τάση οδηγώντας έτσι σε απώλεια CO₂ κατά το επόμενο στάδιο. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξαν παρόμοιες μελέτες μοριακής μηχανικής των M. Lobell και D.H.G Crout [56] (σχήματα 13-16). Απ’ τις προβολές κατά Newman που παρατίθενται στα παραπάνω σχήματα φαίνεται η σχεδόν κάθετη διευθέτηση του καρβοξυλίου σε σχέση με το επίπεδο του θειαζολίου, ενώ ακόμα και η πυρηνόφιλη προσβολή του υλιδίου στον καρβονυλικό άνθρακα του πυροσταφυλικού γίνεται έτσι ώστε να προκύπτει αυτός ο προσανατολισμός. Πρέπει να υπενθυμίσουμε εδώ ότι η διαμόρφωση όλων των ενδιάμεσων προτάθηκε να είναι η V, σε αντίθεση με την S που υποδεικνύει ο μηχανισμός του Hogg [69].

Περνώντας τώρα σε ένα άλλο αδιευκρίνιστο μηχανιστικό σημείο του καταλυτικού κύκλου της θειαμίνης, αναφέραμε ότι σύμφωνα με το μηχανισμό του Breslow [22] απώλεια CO₂ απ’ την LT οδηγεί σε ένα καρβανιόν που βρίσκεται σε συντονισμό με την ταυτομερή του μορφή, την εναμίνη. Τίθεται λοιπόν το ερώτημα ποιά απ’ τα δυο είναι εκείνο που επικρατεί. Ο ίδιος υποστήριξε ότι το καρβανιόν σταθεροποιείται μέσω σχηματισμού της επίπεδης εναμίνης, σε αντίθεση με τον Schellenberger [39] ο οποίος πρότεινε ότι το καρβανιόν μάλλον αναπαριστά καλύτερα το υψηλής ενέργειας ενδιάμεσο. Η υπόθεση του Breslow επιβεβαιώθηκε πρόσφατα απ’ τους Friedemann και Brietkopf [54], οι οποίοι βασιζόμενοι σε θεωρητικές μελέτες βρήκαν ότι το μήκος δεσμού C(2)-C(2α) μειώνεται από 1.53 σε 1.36 Å κατά την αποκαρβοξυλίωση της LT ευνοώντας έτσι το σχηματισμό της εναμίνης. Σε αντίθεση με αυτό, έρχεται το γεγονός ότι αύξηση της τάξης δεσμού C(2)-C(2α) προκαλεί πρόωρο τερματισμό του καταλυτικού κύκλου, κάτι που παρατηρήθηκε σε υποστρώματα με υποκατεστημένα στυρένια στη θέση της μεθυλομάδας του πυροσταφυλικού οξέος. Η παρουσία λοιπόν ενός εκτεταμένου συζυγιακού συστήματος δρά ως αναστολέας στην περαιτέρω καταλυτική πορεία [77-79].

Πρέπει να ανφέρουμε εδώ ότι μόλις το 1999 [80], η εναμίνη ανιχνεύθηκε κατά τη διάρκεια της ενζυμικής κατάλυσης, επιβεβαιώνοντας έτσι τις αρχικές απόψεις του Breslow. Στο σημείο αυτό όμως θα επανέλθουμε παρακάτω. Παίρνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω δεδομένα, ο Schellenberger [62] πρότεινε ότι οι πραγματικές δομές του ενεργού ενδιάμεσου πρέπει να βρίσκονται μάλλον κάπου ενδιάμεσα μεταξύ καρβανιόντος και εναμίνης.



Τέλος, όσον αφορά τις θερμοδυναμικές ιδιότητες (pK_a) τόσο του θειαζολικού δακτυλίου της θειαμίνης, όσο και των C(2)-υποκατεστημένων παραγώγων της, βρέθηκε ότι ενώ το pK_a που αντιστοιχεί στον ιονισμό του C(2) είναι 16.9-18.9 [81] στο ελεύθερο συνένζυμο, ένας ακριβής προσδιορισμός του εντός κάποιου ενζύμου δεν έχει καταστεί ακόμη δυνατός. Μια πρώτη προσπάθεια σ' αυτό το πεδίο, αποτελεί η διερεύνηση αλλαγής ή όχι της χημικής μετατόπισης-του ^{13}C , επισημασμένου με ^{13}C στον C(2) μορίου πυροφωσφορικής θειαμίνης, εντός του ενζύμου PDC κάνοντας χρήση φασματοσκοπίας ^{13}C -NMR [63]. Βρέθηκε λοιπόν ότι η χημική μετατόπιση δεν αλλάζει πριν και μετά την σύνδεση με το αποένζυμο άρα το υδρογόνο H-C(2) δεν δίσταται. Αυτό δηλώνει ότι σημασία στην εκκίνηση της καταλυτικής δράσης δεν έχει τόσο η οξύτητα αυτής της ομάδας, όσο η μεγάλη ταχύτητα απόσπασης του πρωτονίου, ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος με το μόριο της TPP. Ήδη έχει αναφερθεί αύξηση τεσσάρων τάξεων μεγέθους περίπου όσον αφορά την ταχύτητα ανταλλαγής του H-C(2) με δευτέριο, για το ελεύθερο συνένζυμο και για το συνένζυμο εντός πολλών ενζυμικών συστημάτων [63].

Το pK_a για τον ιονισμό του H-C(2α) βρέθηκε 15.4 για τα C(2α)-ύδροξυ-βένζυλο θειαζολικά άλατα σε H_2O [82,83] και μεγαλύτερο του 15 για τα C(2α)-ύδροξυ-αίθυλο θειαζολικά άλατα σε μίγματα $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ [84]. Σε καθαρό DMSO η τιμή pK_a αναφέρεται ότι είναι 12.5 για το πρώτο και 14 για το δεύτερο, αποδιδόμενη στον ίδιο τύπο ιονισμού [85]. Παρόλα αυτά, εντός του ενζύμου η εναμίνη μπορεί να σχηματιστεί και σε pH 6.0 γεγονός που υποδεικνύει την πολύ σημαντική επίδραση του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος [80].

Ερχόμενοι στον πιθανό ρόλο της 4-μεθυλομάδας του θειαζολίου, αναμένεται να είναι ο ίδιος μ' αυτόν της 2'- CH_3 . Αλληλεπιδρώντας με υδρόφοβα τμήματα του αποενζύμου συνεισφέρει στη σύνδεση του με το συνένζυμο [65,86].

Ολοκληρώνοντας τέλος, έχει αποδειχθεί ότι το πυροφωσφορικό ανιόν και κυρίως πυροφωσφορικοί εστέρες αναλόγων θειαμίνης συνδέονται με το αποένζυμο σε κάποιο βαθμό και η έκταση αυτής της σύνδεσης αυξάνει όσο τα ανάλογα πλησιάζουν τη δομή της TPP. Αντίθετα, η απλή θειαμίνη (Th) ακόμα και σε κατάσταση κορεσμού δεν συνδέεται με το αποένζυμο της PDC [87]. Τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν σε δυο συμπεράσματα: 1^ο. Δεσμοί υδρογόνου ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης και θειαμίνης παίζουν δευτερεύοντα ρόλο όσον αφορά τη ικανότητα σύνδεσής της. 2^ο. Η πυροφωσφορική ομάδα είναι αυτή που κυρίως ευθύνεται για τη σταθερή σύνδεση αποενζύμου-TPP. Αυτό εξάλλου το υποστηρίζουν και οι πρόσφατες σχετικά κρυσταλλικές δομές ενζυμικών συστημάτων θειαμίνης [41-46].



Γ. Μεταλλικά ιόντα.

Η παρουσία μεταλλικών ιόντων Mg(II) και Ca(II) είναι απαραίτητη για την ενζυμική δράση της θειαμίνης *in vivo*, ενώ *in vitro* και άλλα ιόντα όπως αυτά των Co(II), Zn(II), Fe(II), Ni(II) και Cd(II) μπορούν να αντικαταστήσουν αυτά του Mg(II) και Ca(II) παρουσιάζοντας όμως σχετικά μικρότερη δραστικότητα [88,89]. Η εκλεκτικότητα των ενζύμων ως προς το μεταλλικό ιόν διαφέρει. Έτσι για την PDC και την TK αυτή είναι μικρή, ενώ για την πυροσταφυλική δευδρογονάση (PDH) και την πυροσταφυλική οξειδάση (POX) είναι πολύ μεγαλύτερη [37]. Όπως προκύπτει από μελέτες σε ενζυμικά συστήματα, ο ρόλος των μεταλλικών ιόντων συνίσταται τουλάχιστον στη σταθερή σύνδεση της πυροφωσφορικής ομάδας του συνενζύμου με το αποένζυμο. Αυτή γίνεται δυνατή μέσω ιονικών αλληλεπιδράσεων των μεταλλικών ιόντων με τις παράπλευρες αλυσίδες αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που περιβάλλει την πυροφωσφορική ομάδα, όπως αυτές του ασπαρτικού οξέως (Asp) και της ασπαραγίνης (Asn) [90], με ταυτόχρονη αλληλεπίδραση αυτών των μεταλλικών ιόντων και με την πυροφωσφορική ομάδα της θειαμίνης.

Παρόλα αυτά ο ρόλος των δισθενών μεταλλικών ιόντων δεν είναι ακόμη απόλυτα ξεκαθαρισμένος, τόσο κατά τη μη ενζυμική όσο και κατά την ενζυμική δράση της θειαμίνης, αφού ιδιαίτερα στην τελευταία περίπτωση δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες για το τι ακριβώς συμβαίνει κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου. Με το θέμα της αλληλεπίδρασης μεταλλικών ιόντων με τη θειαμίνη και παράγωγά της θα ασχοληθούμε στο αμέσως επόμενο κεφάλαιο.



V. Μεταλλικά σύμπλοκα θειαμίνης και παραγώγων της.

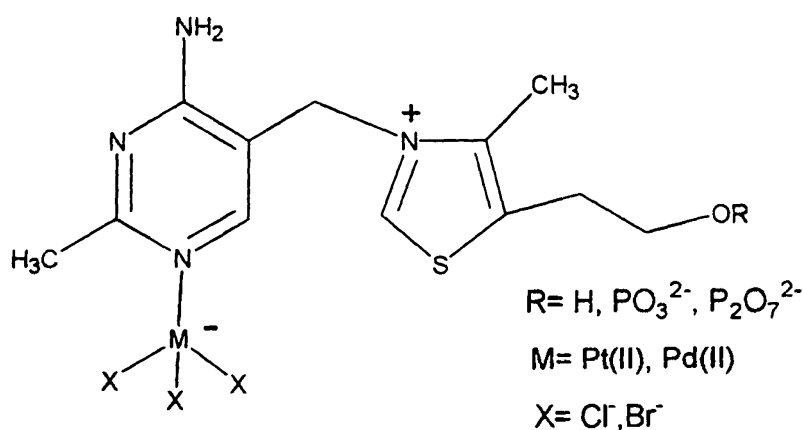
Όπως έχουμε ήδη αναφέρει ο Schellenberger [37], βασιζόμενος στο γεγονός ότι οι 4-άμινο πυριμιδίνες πρωτονιώνονται εκλεκτικά στη θέση N(1'), συμπέρανε ότι η σύνδεση του μεταλλικού ιόντος με το συνένζυμο θα πρέπει να γίνεται σ' αυτή τη θέση. Λίγα χρόνια αργότερα, ο H. Grande και οι συνεργάτες του [91] χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία NMR, βρήκαν ότι κατά την αλληλεπίδραση Mn(II) με την TPP το μέταλλο συνδέεται με την πυροφωσφορική ομάδα. Παρόμοιου είδους μελέτες απ' τους White και Drago [92] που αφορούσαν αλληλεπίδραση της TPP με τα ιόντα Co(II) και Ni(II), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα μεταλλοϊόντα συνδέονται με το N(1') της πυριμιδίνης καθώς και την πυροφωσφορική ομάδα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν απ' τον Gallo και τους συνεργάτες του [93,94] οι οποίοι όμως πρότειναν ότι το Ni(II) συνδέεται με το N(1') όχι άμεσα αλλά έμμεσα μέσω ενός μορίου H₂O.

Αν και τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την άμεση αλληλεπίδραση των μεταλλοϊόντων με το N(1') και/ή την πυροφωσφορική ομάδα, προσπάθειες απομόνωσης τέτοιων συμπλόκων στη στερεά φάση υπήρξαν ανεπιτυχείς για πολλά χρόνια. Τα στερεά προϊόντα που απομονώνονταν ήταν πάντα ιονικά άλατα της μορφής [MX₄]²⁻[thH]₂⁺ ή [MX₄]²⁻[th]₂⁺ ή [MX₃]₂⁻[thH]₂²⁺ όπου thH=η πρωτονιωμένη στο N(1') θειαμίνη, M=Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), U(IV) και X=Cl, Br [95-100]. Παραδείγματα τέτοιων αλάτων βρίσκουμε και στην πρόσφατη βιβλιογραφία, όπως αυτά των [thH][SnMe₂(H₂O)Cl₃]Cl [101], [thH][SnPh₂Cl₄].H₂O [101], [thH]₂[Sb₄Cl₁₆].2CH₃CN [102], [thH][Pt^(II)(SCN)₄].3H₂O [103], [thH][Pt^(IV)(SCN)₆].H₂O [103], [O-thH]X₂.2H₂O, [O-thH][Pt^(IV)Cl₆] [50] και [O-thH]₂[V₁₀O₂₈H₂].8H₂O, [50] όπου X=πικρολονικό ανιόν και O-thH η πρωτονιωμένη μορφή της οξυθειαμίνης.

Η πρώτη κρυσταλλική δομή θειαμίνης-Cd(II) λύθηκε απ' τον Richardson και τους συνεργάτες του, αλλά αποδείχθηκε ότι δεν υπήρχε απευθείας δεσμός μετάλλου-υποκαταστάτη. Αντί αυτού προέκυψε το ιονικό άλας της μορφής [thH]₂²⁺[CdCl₄]²⁻ [99]. Ο σχηματισμός τέτοιων ενώσεων αποδόθηκε στο καθαρό θετικό φορτίο που εντοπίζεται στο άτομο N(3) του θειαζολίου σε συνδυασμό με τη χαμηλή τιμή pK_a του ατόμου N(1'). Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα σε οποιαδήποτε τιμή pH στην οποία η θειαμίνη δεν υδρολύεται (pH=2-7), αυτή να έχει χαρακτήρα μόνο- ή δικατιόντος.

Η πρώτη επιτυχής σύνθεση μεταλλικών συμπλόκων θειαμίνης και παραγώγων της (TPP και TMP (μονοφωσφορική θειαμίνη)) επιτεύχθηκε απ' τον N. Χατζηλιάδη και τους συνεργάτες του



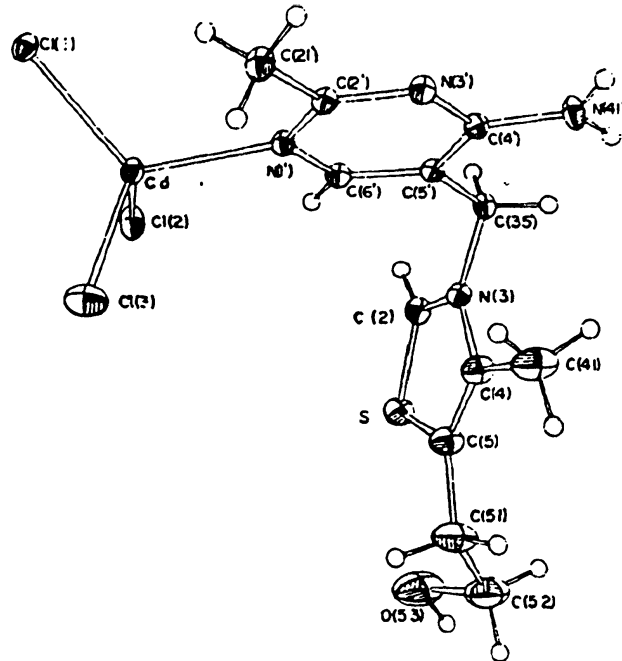


Σχήμα 21: Δομή των συμπλόκων που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση Pt(II), Pd(II) με Th, TMP και TPP.

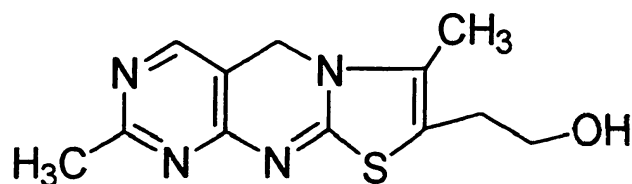
[104,105] και είχαν δομή εσωτερικών αλάτων (zwitterions)(σχήμα 21). Η θειαμίνη συνδέονταν με τα ιόντα Pt(II) και Pd(II) μέσω του N(1') σε pH=3.5, ενώ ο εύκολος σχηματισμός τους αποδόθηκε στη μεγάλη ισχύ των δεσμών Pt-N και Pd-N. Το 1981 ο Cramer και οι συνεργάτες του πέτυχαν να συνθέσουν το σύμπλοκο Cd(th)Cl₃ και να επιλύσουν την κρυσταλλική του δομή. Η δομή αυτή παρουσιάζεται στο σχήμα 22, και αποτελεί την πρώτη κρυσταλλική δομή ενός πραγματικού μεταλλικού συμπλόκου θειαμίνης [106]. Οι ίδιοι ερευνητές λίγο αργότερα, επέλυσαν και την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Pt(th)Cl₃ [107] επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των N. Χατζηλιάδη και των συνεργατών του.

Ακολούθησε η επίλυση πολλών δομών μεταλλικών συμπλόκων θειαμίνης και παραγώγων της, όπως των Cu^(I)(th)Cl₂ [108], Rh₂(CH₃COO)₄(TMP)₂·1.5H₂O [109], Zn(th)Cl₃·0.4H₂O [110], Cu^(I)(th)Br₂ [111], Co(th)Cl₃·0.4H₂O [112], Zn(th)Br₃·0.2H₂O [112], Zn(th)(SCN)₃ [113] Cd(th)(SCN)₃ [113], [Cu(TPPH)(1,10-phen)(H₂O)][NO₃]₂ [114], [Mn(th)Cl₂(H₂O)₂]₂[th]₂Cl₄·2H₂O [115], [Cu^(II)₂(thiochrome)₂(ClO₄)₂]_n [116], [Pt(dmsO)(th)Cl₂][Ph₄B] [117], και πρόσφατα αυτές των [Cd(th)Cl₃]₂·2H₂O [118], [Cd(th)₂Cl₄] [119], [Cu^(III)(thiochrome)]Cl₂ [120], [TlMe₂(ThS)]·3H₂O [121] και Pt(O-Th)Cl₃·H₂O [50], όπου 1,10-phen=1,10-φαινανθρολίνη, thiochrome = ένα τρικυκλικό παράγωγο οξείδωσης της θειαμίνης (σχήμα 23) και ThS = η φορμάμιδο-θειόλη που προκύπτει κατά την υδρόλυση της θειαμίνης (σχήμα 4, III, σελίδα 4). Στα περισσότερα απ' αυτά τα σύμπλοκα η σύνδεση του μεταλλοϊόντος γίνεται μέσω του N(1') ενός ή περισσότερων μορίων θειαμίνης, εκτός των περιπτώσεων του [Cu(TPPH)(1,10-phen)(H₂O)][NO₃]₂ [114] με ένταξη μόνο μέσω της πυροφωσφορικής ομάδας, του Cd(Th)(SCN)₃ [113] με ένταξη του ατόμου O(5γ) της ύδροξυ-αίθυλ αλυσίδας, του [Mn(th)Cl₂(H₂O)₂]₂[th]₂Cl₄·2H₂O [115] στο οποίο το ιόν Mn(II) εντάσσεται μέσω

του N(1') ενός μορίου θειαμίνης και ενός O(5γ) ενός δεύτερου μορίου θειαμίνης και τέλος του [TlMe₂(ThS)]. 3H₂O [121] στο οποίο το μέταλλο εντάσσεται μέσω της σουλφιδρυλομάδας και του καρβονυλικού οξυγόνου.



Σχήμα 22: Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Cd(Th)Cl₃ [106].



Σχήμα 23: Δομή του θειοχρώματος (thiochrome).

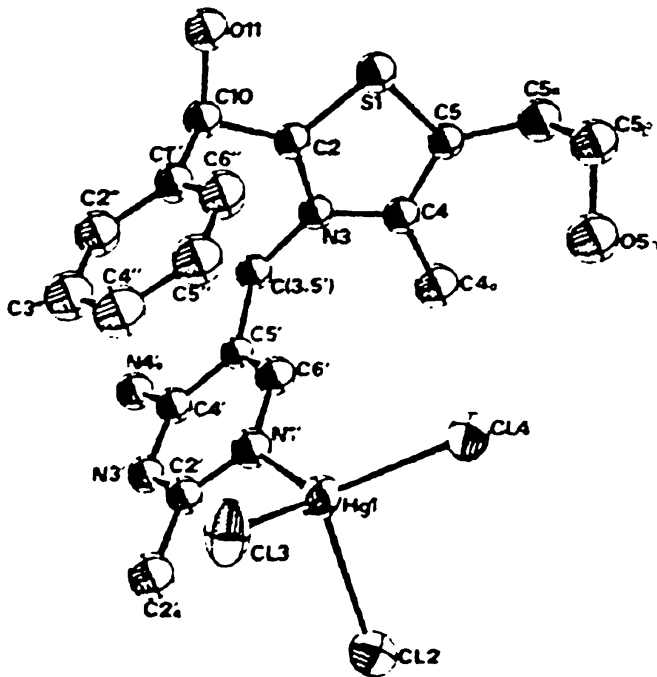
Εξάλλου τελευταία, μελέτες EPR και ποτενσιομετρίας στα συστήματα VO(IV)-TPP και VO(IV)-TMP καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι εντάσσεται μόνο η διφωσφορική ή η μονοφωσφορική ομάδα με το ιόν VO²⁺ διδοντικά ή μονοδοντικά αντίστοιχα [122].

Η γεωμετρία που εντοπίζεται γύρω απ' τα μεταλλοκατιόντα είναι κυρίως ψευδοτετραεδρική [106,110,112,113,120], οκταεδρική [109,119], επίπεδη τριγωνική [108,111], επίπεδη τετραγωνική [50,107,117] και τέλος σε μια περίπτωση αυτή της παραμορφωμένης τετραγωνικής πυραμίδας [114]. Όσον αφορά τις διαμορφώσεις της θειαμίνης, παρατηρείται κυρίως η F διαμόρφωση και λιγότερο η S, όπως αναμένονταν εξάλλου, ενώ η V παρουσιάζεται μια φορά μόνο, στο σύμπλοκο



του Pt με οξυθειαμίνη [50] (σχήμα 12 (B), σελίδα 14). Ανεξάρτητα όμως των παρατηρούμενων F ή S διαμορφώσεων όλα σχεδόν τα σύμπλοκα παρουσιάζουν ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό: Την ισχυρή αλληλεπίδραση του S(1) με το άτομο O(5γ) της παράπλευρης αλυσίδας. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στο μερικό εντοπισμό θετικού φορτίου πάνω στο άτομο S, γεγονός που συμφωνεί με τις θεωρητικές προβλέψεις του Jordan [123]. Η S(1)...O(5γ) αλληλεπίδραση θα πρέπει εξάλλου να διευκολύνει το σχηματισμό αυτών των ενώσεων λόγω του μερικού απεντοπισμού του θετικού φορτίου του N(3) του θειαζολικού δακτυλίου.

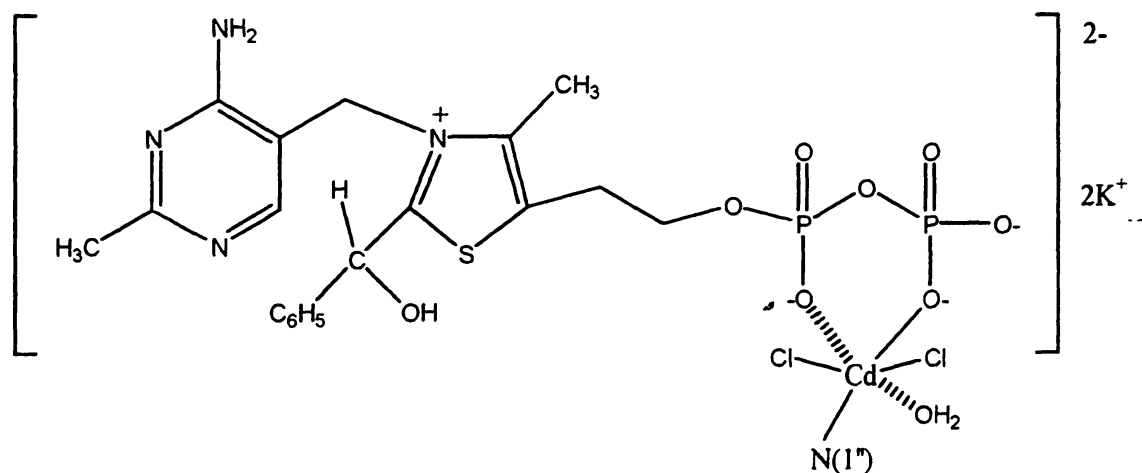
Αξιοποιώντας τόσο αυτά όσο και δομικά δεδομένα απ' τις κρυσταλλικές δομές παραγώγων "ενεργού αλδεύδης" [40,70,71] κύριο χαρακτηριστικό των οποίων είναι η ισχυρή S(1)...O(2α) αλληλεπίδραση, η ερευνητική ομάδα μας συμπέρανε ότι η αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων με παράγωγα "ενεργού αλδεύδης" θα ήταν πολύ πιο εύκολη λόγω εσωτερικής εξουδετέρωσης του φορτίου του θειαζολίου. Το συμπέρασμα αυτό αποδείχθηκε σωστό και μόλις το 1990 παρασκευάστηκε το σύμπλοκο Hg(HBT)Cl₃ και λύθηκε η κρυσταλλική του δομή, η οποία αποτέλεσε την πρώτη δομή συμπλόκου μετάλλου μ' αυτά τα παράγωγα (σχήμα 24) [124]. Το μόριο υιοθετεί και εδώ την S διαμόρφωση ενώ η ενδομοριακή απόσταση S(1)...O(2α) είναι της τάξης των 2.79 Å.



Σχήμα 24: Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Hg(HBT)Cl₃ [124].

Ο εύκολος σχηματισμός των ενώσεων αυτών λόγω ακριβώς της εσωτερικής εξουδετέρωσης του φορτίου, επέτρεψε στο εργαστήριο μας την εκτεταμένη μελέτη και χαρακτηρισμό τους με διάφορες τεχνικές. Έτσι συντέθηκαν και μελετήθηκαν σύμπλοκα του τύπου $M(\text{HBT})\text{Cl}_3$ και $M(\text{HCMT})\text{Cl}_3$ όπου $\text{HCMT} = 2$ - $(\alpha$ -ύδροξυ-κυκλοέξυλ-μέθυλ) θειαμίνη και $M = \text{Hg}(\text{II}), \text{Zn}(\text{II}), \text{Cd}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Ni}(\text{II})$ [124-128], $\text{HgL}_2\text{Cl}_2, \text{MLCl}_2, M(\text{LH})\text{Cl}_3$ [72] όπου $\text{L} = 2$ - $(\alpha$ -ύδροξυ-βένζυλ) μονοφωσφορική θειαμίνη (HBTMP) και $M = \text{Zn}(\text{II}), \text{Cd}(\text{II})$ καθώς και των $\{\text{K}[\text{Zn}(\text{HBTPP})\text{Cl}_2]\}_n, \{\text{K}_2[\text{Cd}(\text{HBTPP})\text{Cl}_2]\}_n, \text{K}_2[\text{Hg}(\text{HBTPP})_2\text{Cl}_2]$ και $\text{Zn}(\text{HBTPP})_2\text{Cl}_2$ όπου $\text{HBTPP} = 2$ - $(\alpha$ -ύδροξυ-βένζυλ) πυροφωσφορική θειαμίνη [129]. Λύθηκαν οι κρυσταλλικές δομές των $\text{Hg}(\text{HBT})\text{Cl}_3$ [124], $\text{Zn}(\text{HCMT})\text{Cl}_3$ [125] και $\text{Hg}(\text{HBTMP})_2\text{Cl}_2$ [72] ενώ πολύ πρόσφατα αυτές των $\text{Cd}(\text{HBT})\text{X}_3, \text{Hg}_2\text{X}_5(\text{HBT}),$ και $\text{Pt}(\text{HBT})(\text{NO}_3)_3$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$) απ' τον Αοκί και τους συνεργάτες του [130].

Στις παραπάνω περιπτώσεις η ένταξη του μεταλλοϊόντος λαμβάνει χώρα μέσω του ατόμου $\text{N}(1')$ αλλά και μέσω των φωσφορικών ομάδων όπου αυτές είναι παρούσες (σχήμα 25). Εξαιρέση αποτελεί το σύμπλοκο $\text{Zn}(\text{HBTPP})_2\text{Cl}_2$ στο οποίο το μέταλλο εντάσσεται μόνο μέσω της πυροφωσφορικής ομάδας της HBTPP γιατί το $\text{N}(1')$ είναι πρωτονιωμένο και το HgL_2Cl_2 , όπου εκεί αλληλεπιδρά μόνο το άτομο $\text{N}(1')$ με το μεταλλικό ιόν [72,129].



Σχήμα 25: Προτεινόμενη μοριακή δομή του συμπλόκου $\{\text{K}_2[\text{Cd}(\text{HBTPP})\text{Cl}_2]\}_n$ με ένταξη μέσω των $\text{N}(1')$ και της πυροφωσφορικής ομάδας. Το άτομο $\text{N}(1'')$ ανήκει σε άλλο μόριο HBTPP .

Η μελέτη των κρυσταλλικών δομών των μεταλλικών συμπλόκων παραγώγων “ενεργού αλδεϋδης” αποκαλύπτει δυο κοινά τους χαρακτηριστικά: Τα μόρια υιοθετούν την S διαμόρφωση η



οποία διατηρείται και στη στερεά φάση και σε διάλυμα [128,129] και παρουσιάζουν ισχυρή S(1)...O(2α) αλληλεπίδραση. Τα παραπάνω δεδομένα δεν έρχονται σε συμφωνία με τις απόψεις του Schellenberger περί επικράτησης της V διαμόρφωσης [37,39], ενώ ενισχύουν τον μηχανισμό του Hogg [69] και το σημαντικό ρόλο της S διαμόρφωσης κατά την καταλυτική δράση. Απ' την άλλη, η V διαμόρφωση δεν μπορεί να αγνοηθεί καθώς είναι η μοναδική που υιοθετείται σε κρυσταλλωμένα ενζυμικά συστήματα [41-46], απουσία βέβαια υποστρώματος.

Ένα αξιοσημείωτο γεγονός που παρατηρείται σε όλα τα σύμπλοκα θειαμίνης ή “ενεργού αλδεύδης” αφορά την δεσμική απόσταση των ατόμων C(4')-N(4'α) η οποία είναι μεγαλύτερη στα σύμπλοκα ενώ παρουσιάζεται μικρότερη στους πρωτονιωμένους υποκαταστάτες. Έτσι το μήκος δεσμού σχετίζεται άμεσα με τη βασικότητα της (4'α)-αμινομάδας και την ικανότητά της να δράσει ως οξύ ή βάση κατά Lewis. Απ' τις δομές συντονισμού της πυριμιδίνης (σχήμα 17, σελίδα 19) η II αποσταθεροποιείται κατά τη συμπλοκοποίηση αφού το μήκος δεσμού C(4')-N(4'α) πλησιάζει σχεδόν αυτό ενός κανονικά απλού δεσμού C-N, ενώ ευνοείται περισσότερο κατά την πρωτονίωση. Το φαινόμενο αυτό είναι ανεξάρτητο απ' τη διαμόρφωση, το μεταλλικό ιόν ή το φορτίο του [58]. Έχουμε όμως ήδη αναφέρει ότι σε ένα υδρόφοβο πρωτεϊνικό περιβάλλον ένας φορτισμένος πυριμιδινικός δακτύλιος αποσταθεροποιείται ευνοώντας τον σχηματισμό της ίμινο (III-σχήμα 17, σελίδα 19) μορφής. Έτσι τελικά η μεγαλύτερη αποσταθεροποίηση που προκαλεί ο συμπλοκοποιημένος πυριμιδινικός δακτύλιος σε σχέση με τον πρωτονιωμένο στην μορφή II μπορεί να μεταφράζεται στον ακόμα πιο εύκολο σχηματισμό της ίμινο-μορφής III εντός του ενζύμου. Μ' αυτή την ίμινο-μορφή προτείνεται ότι το συνένζυμο αλληλεπιδρά με το αποένζυμο σύμφωνα με μια πρόσφατη πρόταση του Schellenberger [62] και ο ίσως ευκολότερος σχηματισμός της παρουσία μεταλλικών ιόντων να αποδίδει μια ακόμη ιδιότητα σ' αυτά όσον αφορά την συνενζυμική δράση της θειαμίνης.

Το σημαντικότερο πάντως συμπέρασμα απ' τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταλλικών ιόντων-θειαμίνης και παραγώγων της, είναι ο ευκολότερος σχηματισμός και σταθεροποίηση των συμπλόκων “ενεργού αλδεύδης” λόγω της S(1)...O(2α) αλληλεπίδρασης. Έτσι αφενός μεν διεκολύνεται η συμπλοκοποίηση λόγω του μερικού απεντοπισμού του θετικού φορτίου του N(3) του θειαζολικού δακτυλίου, αφετέρου διευκολύνεται και ο ιονισμός του O(2α) σταθεροποιώντας παράλληλα την S διαμόρφωση. Για τους λόγους αυτούς προτάθηκε απ' το εργαστήριο μας ότι κατά την ενζυμική δράση τα μεταλλικά ιόντα επεμβαίνουν πιθανότατα μετά το σχηματισμό του παραγώγου “ενεργού αλδεύδης”.



VI. Ενζυμικά συστήματα.

A. Γενικά.

Πριν προχωρήσουμε στη μελέτη ενζυμικών συστημάτων θειαμίνης κρίνεται σκόπιμο να αναφερθούμε σε ορισμένες βασικές αρχές βιοχημείας και ενζυμολογίας έτσι ώστε να γίνονται πλήρως κατανοητά τα συμπεράσματα που θα εκτεθούν αμέσως μετά.

Τα ένζυμα είναι καταλύτες που βρίσκονται στους ζωντανούς οργανισμούς είναι δηλαδή βιοκαταλύτες. Αποτελούνται από πολυπεπτιδικά τμήματα που διατάσσονται κατά ένα ορισμένο τρόπο στο χώρο έτσι ώστε το κάθε ένζυμο να επιτελεί την αντίδραση ή τις αντιδράσεις για τις οποίες είναι εξειδικευμένο. Αυτή είναι και η κύρια διαφορά του απ' τους ανόργανους καταλύτες. Κάθε ένζυμο καταλύει διαφορετικού τύπου αντιδράσεις και ίσως αυτός είναι ο κύριος λόγος της θαυμαστής οργάνωσης που παρατηρούμε στους ζωντανούς οργανισμούς. Πολλές φορές για την καταλυτική τους δράση είναι απαραίτητη η παρουσία μιας ή περισσοτέρων χαμηλού μοριακού βάρους οργανικών ενώσεων που λέγονται συνένζυμα. Το σύμπλοκο συνενζύμου και ενζύμου (που λέγεται αποένζυμο σ' αυτή την περίπτωση) ονομάζεται ολοένζυμο και σχηματίζεται ή διασπάται σύμφωνα με την αντίδραση:

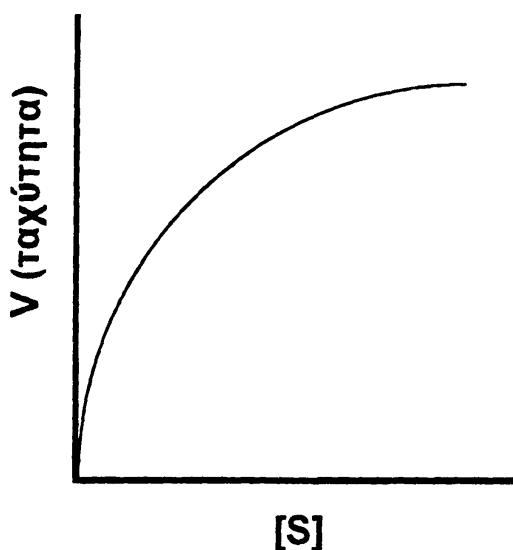


Τα κυριότερα συνένζυμα που θα απαντήσουμε κατά τη μελέτη αυτή είναι το νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (NAD), το φλάβινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (FAD), το συνένζυμο A (HSCoA), το λιποϊκό οξύ (LipS₂) και φυσικά την πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP). Τα συνένζυμα είναι αυτά που πολλές φορές αντιδρούν με το υπόστρωμα (η ουσία που μετασχηματίζεται με τη δράση των ενζύμων) και σ' αυτή την περίπτωση το αποένζυμο παίζει το ρόλο του φορέα του συνενζύμου. Η δράση πολλών ενζύμων ενεργοποιείται και από άλλες ουσίες που ονομάζονται ενεργοποιητές. Αυτοί είτε βοηθούν στη διατήρηση της διαμόρφωσης του ενζύμου στην ενεργό του μορφή, είτε συνδεόμενοι αντιστρεπτά με κάποιο συστατικό του ενζυμικού συστήματος συμβάλλουν στη δημιουργία του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος ή ενζύμου-συνενζύμου. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν μεταλλικά ιόντα όπως αυτά των Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ κ.α.

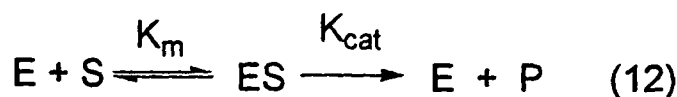
Η καταλυτική δράση των ενζύμων επηρεάζεται από παράγοντες όπως η ιονική ισχύ, το pH, και η θερμοκρασία. Κάθε ένζυμο έχει ένα συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασίας και pH στο οποίο παρουσιάζει το βέλτιστο της δραστηρότητάς του ως βιοκαταλύτης. Εκτός αυτών των ορίων το



ένζυμο απενεργοποιείται ή/και καταστρέφεται. Ο σημαντικότερος όμως παράγοντας απ' τον οποίο εξαρτάται η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος. Αν παραστήσουμε γραφικά την ταχύτητα της αντίδρασης (V) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$ προκύπτει μια καμπύλη, περίπου σαν αυτή του σχήματος 26. Μαθηματικά είναι μια ορθογώνια υπερβολή και παρατηρούμε ότι η ταχύτητα πλησιάζει χωρίς όμως να φτάσει σε μια μέγιστη τιμή που ονομάζεται V_{max} . Σε χαμηλές λοιπόν συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα εξαρτάται απ' αυτή, ενώ σε υψηλές είναι ανεξάρτητη. Οι Michaelis και Menten πρότειναν ότι για να δράσει ένα ένζυμο E πρέπει να δημιουργήσει με το υπόστρωμα S ένα σύμπλοκο ES το οποίο είτε μπορεί να διασπαστεί και πάλι στα συστατικά του, είτε να δώσει τα προϊόντα P της αντίδρασης και να απελευθερώσει το ένζυμο όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση (12).



Σχήμα 26: Γραφική παράσταση μεταβολής της ταχύτητας V μιας ενζυμικής αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης $[S]$ του υποστρώματος.



$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (13)$$

Στην πρώτη περίπτωση η σταθερά K_m ονομάζεται σταθερά Michaelis και ουσιαστικά είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ES , ενώ στη δεύτερη η K_{cat} ή καταλυτική σταθερά, μας υποδηλώνει το χρόνο που απαιτείται για ένα μόριο ενζύμου να μετατρέψει ένα μόριο



υποστρώματος σύμφωνα με την αντίδραση. Μονάδες της δε είναι αντίστροφος χρόνος (sec^{-1} ή min^{-1}). Η K_m ισούται με την συγκέντρωση του υποστρώματος στο μισό της μέγιστης ταχύτητας και αυτό αποδεικνύεται απ' την εξίσωση Michaelis-Menten (13) θέτοντας $V=V_{\max}/2$. Η εξίσωση αυτή συνδέει την ταχύτητα V της ενζυμικής αντίδρασης με τη σταθερά K_m , τη συγκέντρωση του υποστρώματος $[S]$ καθώς και τη μέγιστη ταχύτητα V_{\max} . Η V_{\max} δίνεται και απ' τη σχέση (14) όπου $[E_t]$ είναι η συνολική συγκέντρωση του ενζύμου.

$$V_{\max} = K_{\text{cat}} [E_t] \quad (14)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (15)$$

Η σταθερά Michaelis αποτελεί ένα μέτρο της συγγένειας του ενζύμου προς το υπόστρωμα του. Όσο πιο μικρή είναι η K_m τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια αυτή, ή αλλιώς τόσο μικρότερη είναι η απαίτηση του ενζύμου σε υπόστρωμα ώστε να κορεστεί μ' αυτό. Οι τιμές V_{\max} και K_m μπορούν να προσδιοριστούν πειραματικά με βάση την εξίσωση των Lineweaver και Burk (15) και η οποία προκύπτει με αντιστροφή της εξίσωσης Michaelis-Menten για αυτό και ονομάζεται εξίσωση του διπλού αντιστρόφου. Είναι της μορφής $y = \beta + ax$ και ορίζει μια ευθεία γραμμή. Εάν ως τεταγμένη ορίσουμε τις τιμές $1/V$ και ως τετημημένη τις τιμές $1/[S]$ τότε η τεταγμένη επί την αρχή θα μας δώσει την τιμή της $1/V_{\max}$. Η K_m μπορεί να βρεθεί είτε απ' την κλίση της ευθείας που ισούται με K_m/V_{\max} , είτε επεκτείνοντας την ευθεία έως ότου συναντήσουμε την τετημημένη. Τότε θα ισχύει $1/V=0$ και απ' την εξίσωση (15) προκύπτει ότι $-1/[S]=1/K_m$. Οι τιμές της K_{cat} και K_m είναι μεγάλης σημασίας και ο λόγος τους καθορίζει την εξειδίκευση του ενζύμου ως προς ένα υπόστρωμα.

Ουσίες που αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων ονομάζονται ενζυμικοί αναστολείς ή παρεμποδιστές. Διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και μη αντιστρεπτούς, ενώ οι τελευταίοι μπορεί να είναι συναγωνιστικοί ή μη συναγωνιστικοί ανάλογα με το πόσο ισχυρά συνδέονται με το ένζυμο. Μια άλλη ειδική κατηγορία τέτοιων ενώσεων είναι και οι αλλοστερικοί τροποποιητές. Διαφέρουν απ' τους αναστολείς στο ότι μπορούν και να ενεργοποιήσουν εκτός από το να αναστείλουν την ενζυμική δράση. Ο αλλοστερικός τροποποιητής δεσμεύεται αμφίδρομα στο αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου το οποίο μπορεί να βρίσκεται όχι μόνο μακριά απ' το ενεργό του κέντρο (το σημείο εκείνο του ενζύμου στο οποίο επιτελούνται οι καταλυτικές διεργασίες) αλλά και σε διαφορετική

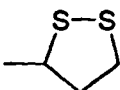
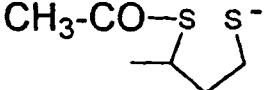


υπομονάδα. Ως αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης η δομή του ενζύμου υφίσταται μια μικρή τροποποίηση και η οποία με τη σειρά της επηρεάζει τη λειτουργικότητα του θετικά ή αρνητικά [5].

B. Εισαγωγικά στοιχεία για τα ενζυμικά συστήματα θειαμίνης.

Η πυροφωσφορική θειαμίνη όπως έχουμε αναφέρει χρησιμοποιείται ως συνένζυμο ενζύμων που καταλύουν τη διάσπαση ή το σχηματισμό δεσμών C-C. Αντιδρά αποκλειστικά με υποστρώματα της μορφής R-CO-X όπου η ομάδα X (π.χ CO₂ ή R-CHO) αντικαθίσταται ενζυμικά από ένα άλλο σωματίδιο Y (ΠΙΝΑΚΑΣ 1). Μεταξύ αυτών που έχουν μελετηθεί καλύτερα μέχρι σήμερα είναι α) η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (PDC) που καταλύει τη μετατροπή του CH₃COCO₂⁻ σε CH₃CHO (X=CO₂⁻, Y=H), β) η τρανσκετολάση (TK) που μετατρέπει HOCH₂COCHOHR₁ ενώσεις σε HOCH₂COCHOHR₂ (X=R₁CHO, Y=R₂CHO), γ) η πυροσταφυλική οξειδάση (POX) που καταλύει τη μετατροπή του πυροσταφυλικού σε CH₃CO-OPO₃²⁻ (X=CO₂⁻, Y=PO₄³⁻) και δ) οι δεϋδρογονάσες των α-οξοοξέων όπως το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης (PDH) που μετατρέπει το πυροσταφυλικό σε ένα παράγωγο δισουλφιδίου (X=CO₂⁻, Y= ένα κυκλικό δισουλφίδιο γνωστό ως λιποϊκό οξύ (LipS₂)). Στην ίδια κατηγορία επίσης ανήκει και η α-κετογλουταρική δεϋδρογονάση.

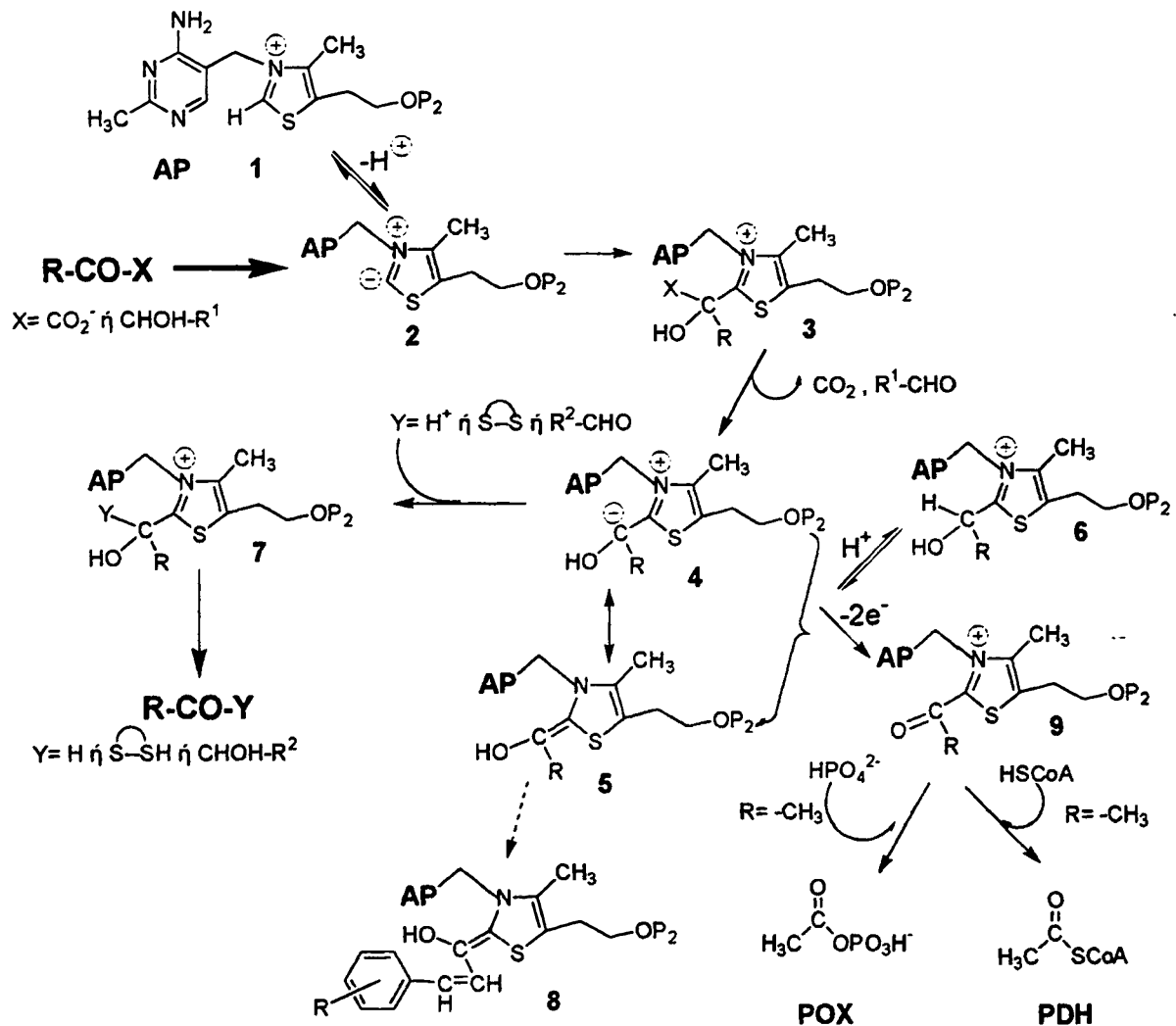
ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Ένζυμα θειαμίνης, υποστρώματα (R-CO-X) και προϊόντα τους (R-CO-Y).

Ένζυμο	R-CO-X	Y	R-CO-Y	X
PDC	CH ₃ -CO-CO ₂ ⁻	H ⁺	CH ₃ -CO-H	CO ₂
TK	CH ₂ OH-CO-CHOH-R ₁	R ² -CHO	CH ₂ OH-CO-CHOH-R ²	R ¹ -CHO
POX	CH ₃ -CO-CO ₂ ⁻	FAD+2H ⁺ +PO ₄ ³⁻	CH ₃ -CO-OPO ₃ ²⁻	CO ₂
PDH	CH ₃ -CO-CO ₂ ⁻		CH ₃ -CO- 	CO ₂

Στο σχήμα 27 παρουσιάζεται η γενική πορεία όλων αυτών των αντιδράσεων. Τα σωματίδια 1-6 μας είναι ήδη γνωστά και σχηματίζονται σε όλα τα ενζυμικά συστήματα του παραπάνω τύπου.



Μετά το σχηματισμό του καρβανιόντος-εναμίνης όμως (σωματίδια 4,5) η προσθήκη της ομάδας Y είναι αυτή που καθορίζει την εξειδίκευση του κάθε ενζύμου και άρα και τα προϊόντα R-CO-Y που θα σχηματιστούν (σωματίδιο 7). Πρέπει να σημειωθεί εξάλλου ότι στα οξειδωτικά ένζυμα θειαμίνης (PDH και POX) το καρβανιόν-εναμίνη υφίσταται οξείδωση παράγοντας το ακέτυλο παράγωγο 9, το οποίο με τη σειρά του αλληλεπιδρά είτε με φωσφορικά ιόντα είτε με το συνένζυμο A παράγοντας τα υψηλής ενέργειας προϊόντα ακέτυλο φωσφορικό και ακέτυλο συνένζυμο A. Ενώ η ομάδα Y καθορίζει λοιπόν την εξειδίκευση του ενζύμου ως προς έναν ορισμένο τύπο αντίδρασης, η ομάδα R προσδιορίζει το υπόστρωμα.



Σχήμα 27: Γενική πορεία αντιδράσεων που ακολουθούνται κατά την καταλυτική δράση των ενζύμων θειαμίνης [62].



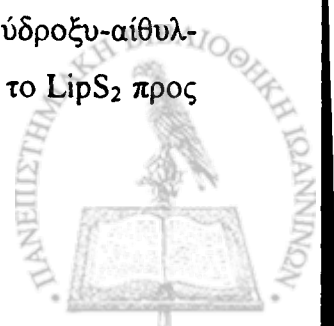
Μεταλλικά ιόντα όπως αυτά του Mg^{2+} , Ca^{2+} και Mn^{2+} είναι απαραίτητα για την ενζυμική δράση. Γενικά τα παραπάνω ιόντα μπορούν να αντικατασταθούν από άλλα δισθενή μεταλλικά ιόντα (εκτός απ' αυτά που αντιδρούν εύκολα με τις σουλφιδρυλομάδες όπως Cu^{2+} ή Hg^{2+}), όμως σε ορισμένες περιπτώσεις τα προκύπτοντα ένζυμα δείχνουν μειωμένη ικανότητα για σύνδεση με την TPP. Υπενθυμίζουμε ότι τα μέταλλα δρουν ως γέφυρα που ενώνει το συνένζυμο με το αποένζυμο [64].

Παρακάτω θα ασχοληθούμε με τη μελέτη των ενζύμων PDC και TK, που είναι ίσως δυο απ' τα σημαντικότερα ένζυμα θειαμίνης και τα οποία έχουν μελετηθεί εκτενέστερα. Πριν προχωρήσουμε όμως, θα αναφερθούμε περιληπτικά και στις αντιδράσεις που καταλύουν τα οξειδωτικά ένζυμα θειαμίνης, πυροσταφυλική οξειδάση (POX), πυροσταφυλική δεϋδρογονάση (PDH) και α-κετογλουταρική δεϋδρογονάση.

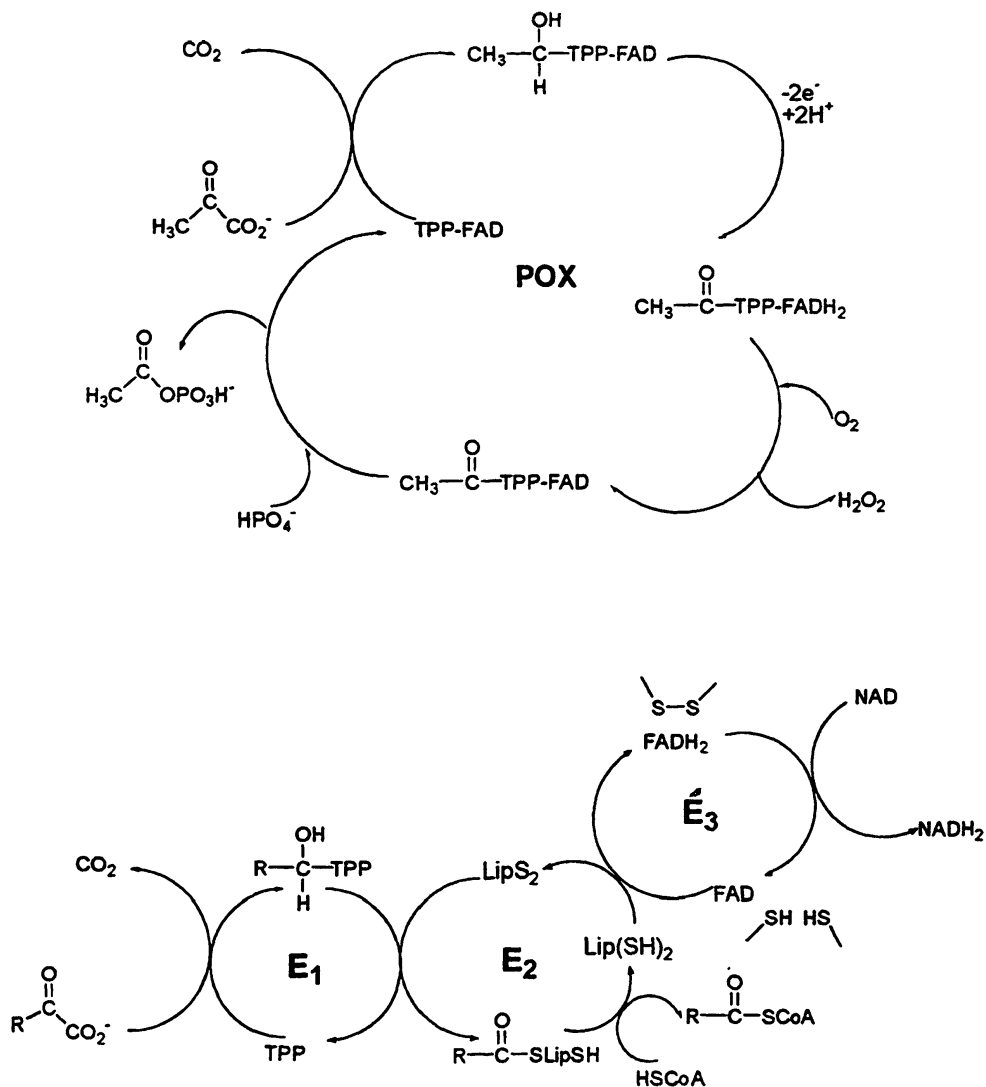
Η πυροσταφυλική οξειδάση λοιπόν, αποτελεί ένα σημαντικό ένζυμο για την αερόβια ανάπτυξη των γαλακτοβακτηριδίων. Το ένζυμο καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού σε ακέτυλο-φωσφορικό. Η ενέργεια που ελευθερώνεται αποθηκεύεται μερικά στο προϊόν και χρησιμοποιείται απ' το ένζυμο οξική κινάση έτσι ώστε να μετατρέψει τη διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) σε τριφωσφορική (ATP) [43]. Για την καταλυτική δράση του ενζύμου αυτού απαιτούνται η TPP, ένα μεταλλικό ιόν ($Mg(II)$ ή $Mn(II)$) και το συνένζυμο FAD. Η γενική πορεία των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα φαίνονται στο σχήμα 28. Αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οδηγεί στο σύμπλεγμα ενζύμου-HETPP-FAD. Εν συνεχεία μεταφορά $2e^-$ απ' το FAD στο παράγωγο "ενεργού αλδεϋδης" οδηγεί στην οξειδωσή του σε ακέτυλο-παράγωγο με ταυτόχρονη αναγωγή του FAD σε $FADH_2$. Ακολουθεί η αναγέννηση του FAD απ' το $FADH_2$ με αναγωγή ενός μορίου οξυγόνου σε H_2O_2 . Σε ένα τελικό στάδιο το ακέτυλο-παράγωγο αντιδρά με ανόργανα φωσφορικά και έτσι ελευθερώνεται το προϊόν και αναγεννάται το ολοένζυμο.

Ο μηχανισμός καταλυτικής δράσης των υπολοίπων δυο ενζύμων είναι πιο περίπλοκος. Και τα δυο αποτελούν τμήματα πολυενζυμικών συστημάτων. Η πυροσταφυλική δεϋδρογονάση είναι τμήμα ενός πολυενζυμικού συστήματος που μετατρέπει το πυροσταφυλικό οξύ σε ακέτυλο-συνένζυμο Α κατά τη γλυκόλυση. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει τρία ένζυμα. Την PDH με συνένζυμο την TPP (E1 τμήμα), μια τρανσακετυλάση του διυδρολιποϊκού οξέος με συνένζυμο το λιποϊκό οξύ ($lipS_2$) (E2 τμήμα) και μια δεϋδρογονάση του διυδρολιποϊκού οξέος με συνένζυμο το FAD (E3 τμήμα). Περιληπτικά οι αντιδράσεις έχουν ως εξής:

Το πυροσταφυλικό οξύ αντιδρά με την TPP στο E1 τμήμα σχηματίζοντας το ύδροξυ-αίθυλ-παράγωγο που γνωρίζουμε ελευθερώνοντας CO_2 . Εν συνεχεία αυτό οξειδώνεται απ' το $lipS_2$ προς



το ακέτυλο-παράγωγο με ταυτόχρονη αναγωγή του LipS_2 σε διυδρολιπικό (Lip(SH)_2). Τέλος με επίδραση του συνενζύμου A (HSCoA) σχηματίζεται το $\text{CH}_3\text{CO-S-CoA}$. Το τμήμα E3 του συστήματος αναλαμβάνει την αναγέννηση του λιπικού με οξείδωση του Lip(SH)_2 απ' ένα μόριο FAD , ενώ το FADH_2 που προκύπτει οξειδώνεται ξανά σε FAD από ένα μόριο NAD . Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο λειτουργεί και το πολυενζυμικό σύστημα δεϋδρογονάση του α-κετογλουταρικού οξέος, το οποίο καταλύει τη μετατροπή του α-κετογλουταρικού σε ηλεκτρυλο-συνένζυμο A στον κύκλο του Krebs [5].



$\text{R} = -\text{CH}_3$, πυροσταφυλική δεϋδρογονάση (PDH), E1 τμήμα

$\text{R} = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, α-κετογλουταρική δεϋδρογονάση, E1 τμήμα

Σχήμα 28: Γενική πορεία αντιδράσεων που καταλύουν τα ένζυμα POX και PDH.



Γ. Μελέτη των ενζύμων PDC και TK.

Ι. Πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (PDC).

1. Γενικά στοιχεία.

Η πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση είναι το απλούστερο μη οξειδωτικό ένζυμο θειαμίνης και καταλύει τη διάσπαση του πυροσταφυλικού σε ακεταλδεύδη (16):



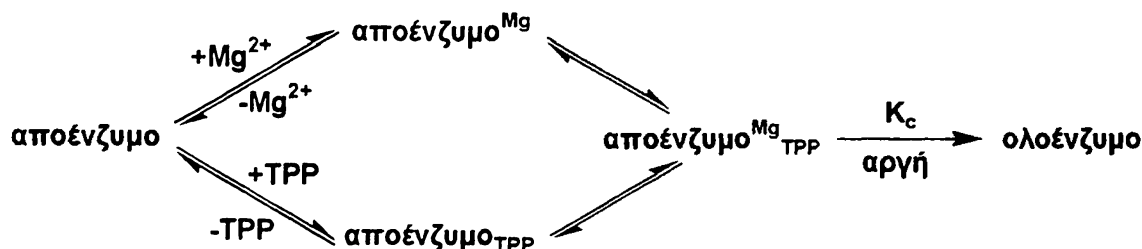
Αυτή η καταλύομενη απ' την PDC αντίδραση, αποτελεί το στάδιο κλειδί κατά την αλκοολική ζύμωση αφού η παραγόμενη ακεταλδεύδη ανάγεται εν συνεχεία σε αιθανόλη.

• Η PDC ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε εκχυλίσματα ζύμης το 1911 απ' τους Neuberger και Karczag [131]. Το ένζυμο είναι ευρύτατα διαδεδομένο στους μύκητες και τα ανώτερα φυτά, βρίσκεται σχετικά σπάνια στα προκαρυωτικά κύτταρα ενώ είναι τελείως απών στα ζώα. Απ' τους πιο σημαντικότερους μύκητες στους οποίους έχει βρεθεί είναι ο *Saccharomyces cerevisiae* και ο *S. uvarum* [132-135], ενώ στα προκαρυωτικά κύτταρα βρίσκεται κυρίως σ' αυτά των *Z. mobilis* [136,137] και *Clostridium botulinum* [138]. Οι πιο εκτεταμένες πάντως μελέτες έχουν γίνει στην PDC που απομονώνεται από ζύμη ζυθοποιίας (*S. Cerevisiae*) καθώς και σ' αυτή απ' το βακτήριο *Z. mobilis*. Το τελευταίο είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο και χρησιμοποιείται ευρύτατα σε τροπικές περιοχές για την παρασκευή αλκοολούχων ποτών μέσω ζύμωσης [139]. Εδώ θα ασχοληθούμε κυρίως με την PDC από ζύμη (yPDC), αναφορά όμως θα γίνει και για την PDC απ' το βακτήριο *Z. mobilis* (zPDC).

Η yPDC είναι ένα τετραμερές ένζυμο με μοριακό βάρος περίπου 250 kDa το οποίο απαιτεί την παρουσία TPP και ιόντων Mg^{2+} ώστε να δράσει καταλυτικά. Σε υδατικό διάλυμα και στην περιοχή pH=6.8-8.3 αποκαθίσταται μια ισορροπία μεταξύ διμερών και τετραμερών μορφών αν και μόνο τα τετραμερή είναι καταλυτικά ενεργά [140]. Σε χαμηλότερο pH συμπεριλαμβανομένου και αυτού στο οποίο παρουσιάζεται το μέγιστο της ενζυμικής δραστηριότητας (6.2) είναι παρόντα μόνο τα τετραμερή, ενώ σε τιμές μεγαλύτερες του 8.0 η δράση του ενζύμου αναστέλλεται λόγω της αποδέσμευσης των TPP και Mg^{2+} . Κάτω απ' αυτές τις συνθήκες, δηλαδή pH μεγαλύτερο του 8, η yPDC διασπάται σε διμερή [140] ενώ η πιο σταθερή zPDC διατηρεί την τετραμερή της δομή ακόμα και απουσία του συνενζύμου [141]. Η απώλεια καταλυτικής δραστηριότητας ως αποτέλεσμα της αποδέσμευσης του συνενζύμου σε pH>8.0 είναι αντιστρεπτή και έτσι το ολόενζυμο μπορεί να επανασχηματιστεί και να ανακτήσει τη δραστηριότητά του σε τιμές pH κοντά στο 6.0. Οι Diefenbach και Duggleby [142] πρότειναν ένα μοντέλο για την



επανενεργοποίηση του αποενζύμου zPDC απ' την TPP και το ιόν Mg^{2+} και το οποίο είναι παρόμοιο μ' αυτό που πρότειναν οι Schellenberger και Hubner [143] για την yPDC. Συγκεκριμένα προτείνεται ότι αρχικά είτε η TPP είτε το ιόν Mg^{2+} συνδέεται αντιστρεπτά με το αποένζυμο. Ακολουθεί μια αργή ημιαντιστρεπτή σύνδεση του δεύτερου συμπαραγόνα (Mg^{2+} ή TPP αντίστοιχα) έτσι ώστε να σχηματιστεί ενεργό ολοένζυμο. Οι διεργασίες αυτές παρουσιάζουν έναν υψηλό βαθμό συνεργατικότητας, έτσι ώστε η παρουσία τους ενός συμπαραγόνα να αυξάνει πάρα πολύ την τάση σύνδεσης του δεύτερου. Το παραπάνω μοντέλο παρουσιάζεται στο σχήμα 29.



Σχήμα 29: Μοντέλο επανασχηματισμού του ολοενζύμου απ' το αποένζυμο της PDC και τους συμπαραγόντες TPP και Mg^{2+} [142].

Η αντικατάσταση του ιόντος Mg^{2+} από Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} και Zn^{2+} οδηγεί σε ένζυμα που διατηρούν μεγάλο μέρος της δραστηρότητάς τους [88,144]. Μελέτες επανασχηματισμού του ολοενζύμου χρησιμοποιώντας παράγωγα της TPP και πυροφωσφορικούς εστέρες θειαζολικών ενώσεων απέδειξαν ότι τόσο η πυροφωσφορική ομάδα όσο και ο πυριμιδινικός δακτύλιος είναι απαραίτητοι για τον σχηματισμό του ενεργού τετραμερούς [87].

Ενώ η zPDC εμφανίζει ομαλές κινητικές ιδιότητες κατά Michaelis-Menten οι υπόλοιπες PDC συμπεριλαμβανομένου και της yPDC δίνουν σιγμοειδείς καμπύλες μεταβολής της ταχύτητας συναρτήσεως του υποστρώματος, αντί ορθογώνιας υπερβολής (σχήμα 26, σελίδα 35). Αυτό είναι χαρακτηριστικό ενζύμων που μπορούν να ρυθμιστούν αλλοστερικά [5]. Πράγματι είναι γνωστό ότι η yPDC περιέχει τουλάχιστον δυο διάκριτες περιοχές στις οποίες μπορεί να λάβει χώρα η σύνδεση του υποστρώματος [37,145], μια καταλυτική και μια ρυθμιστική. Η ρυθμιστική περιοχή έχει σχέση με αλλοστερική ενεργοποίηση μέσω του υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα πιστεύεται ότι το υπόστρωμα (πυροσταφυλικό) συνδέεται στη ρυθμιστική περιοχή και μ' αυτόν τον τρόπο προκαλεί μια αντιστρεπτή αλλαγή διαμόρφωσης οδηγώντας στο πλήρως ενεργοποιημένο ένζυμο. Υποστρώματα όπως το αμίδιο του πυροσταφυλικού οξέος και το κετομαλονικό οξύ μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν την yPDC. Η ενεργοποίηση αυτή συνοδεύεται από αλλαγή των



κινητικών ιδιοτήτων του ενζύμου αφού η γραφική παράσταση $V = f([S])$ μετατρέπεται σε υπερβολή [146]. Επιπρόσθετα προτάθηκε [147] ότι το αμίδιο προκαλεί δομικές αλλαγές στα διμερή με αποτέλεσμα το τετραμερές που προκύπτει να έχει λιγότερο συμπαγή δομή. Θα πρέπει να σημειωθεί πάντως ότι και απουσία του αλλοστερικού ενεργοποιητή η yPDC είναι ένα τέλειο λειτουργικά ένζυμο.

Όσον αφορά την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα η yPDC μπορεί να αποκαρβοξυλιώσει ένα μεγάλο πλήθος υποστρωμάτων στα οποία η μέθυλο-ομάδα του πυροσταφυλικού έχει αντικατασταθεί με μια μεγαλύτερη άλκυλο, άρυλο ή γενικότερα με μια περισσότερο υποκατεστημένη ομάδα [148]. Μπορεί να αποκαρβοξυλιώσει ακόμα και το γλυοξυλικό οξύ αλλά το προκύπτον προϊόν, η φορμαλδεύδη, προκαλεί σταδιακή και μη αντιστρεπτή απενεργοποίηση του ενζύμου [149]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω η zPDC αντιδρά με πιο περιορισμένο εύρος υποστρωμάτων. Έτσι, αποκαρβοξυλιώνει εύκολα το 2-κετοβουτυρικό οξύ, δείχνει μειωμένη δραστικότητα για το 2-κετοβαλερικό οξύ ενώ με το 2-κετοϊσοβαλερικό δεν αντιδρά καθόλου.

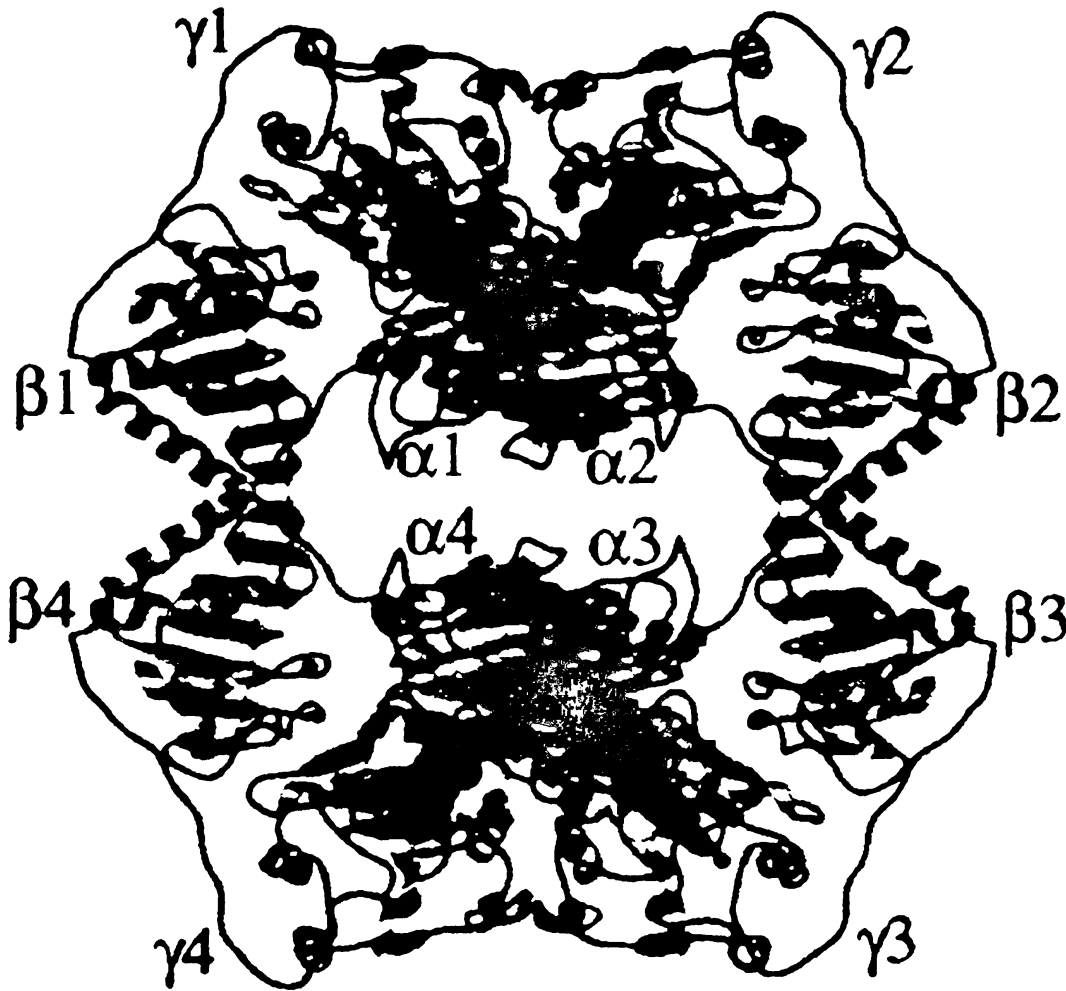
Τέλος ο προσδιορισμός της αμινοξικής αλληλουχίας στις πρωτεϊνικές αλυσίδες ενός πλήθους ενζύμων θειαμίνης συμπεριλαμβανομένων και των PDC αποκάλυψε ένα κοινό δομικό μοτίβο που πιστεύεται ότι συμμετέχει στην σύνδεση της TPP [150]. Αποτελείται απ' την αλληλουχία -Gly-Asp-Gly- X_{24} -Asn-Asn- (όπου X =οποιοδήποτε αμινοξύ) και ο ακριβής ρόλος του θα συζητηθεί παρακάτω.

2. Περιγραφή δομής.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η yPDC είναι ένα τετραμερές. Κάθε υπομονάδα του αποτελείται από μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα 563 αμινοξέων η οποία διπλώνει σε τρία διάκριτα και περίπου ισομεγέθη τμήματα τα οποία ονομάζονται α , β και γ σύμφωνα με τη σχετική τους τοποθέτηση κατά μήκος του άξονα N-τελικό άκρο-C-τελικό άκρο κάθε υπομονάδας. Το β -τμήμα είναι πιο εύκαμπτο σχετικά από τα α και γ , ενώ τα τελευταία περιέχουν αμινοξέα τα οποία ευθύνονται για τη σύνδεση της TPP με το ένζυμο. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ δυο υπομονάδων οδηγούν στο σχηματισμό διμερών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα μεταξύ αμινοξέων που βρίσκονται στα α ή γ τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας κάθε υπομονάδας, ενώ οι θέσεις σύνδεσης της TPP εντοπίζονται στην περιοχή μεταξύ των δυο υπομονάδων. Έτσι το πρώτο ενεργό κέντρο σχηματίζεται με αλληλεπίδραση της TPP με το α -τμήμα της 1^{ης} υπομονάδας και το γ -τμήμα της 2^{ης}, ενώ το δεύτερο ενεργό κέντρο με αλληλεπίδραση του γ -τμήματος της 1^{ης} υπομονάδας με το



α-τμήμα της 2^{ης}. Επειδή ακριβώς τα α και γ τμήματα δεν είναι εύκαμπτα το διμερές είναι σχετικά σταθερό και δεν διασπάται εύκολα ενώ το συνένζυμο συνδέεται ισχυρά μ' αυτά. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των β-τμημάτων των υπομονάδων δυο διμερών οδηγούν στο σχηματισμό του τετραμερούς ενζύμου. Το γεγονός ότι τα β-τμήματα κάθε υπομονάδας είναι εύκαμπτα έχει σαν αποτέλεσμα ένα ασθενώς συνδεδεμένο τετραμερές το κέντρο του οποίου είναι αρκετά ανοικτό και προσβάσιμο στο διαλύτη όπως φαίνεται και στο σχήμα 30 [151].



Σχήμα 30: Δομή τετραμερούς του ενζύμου γPDC [151].

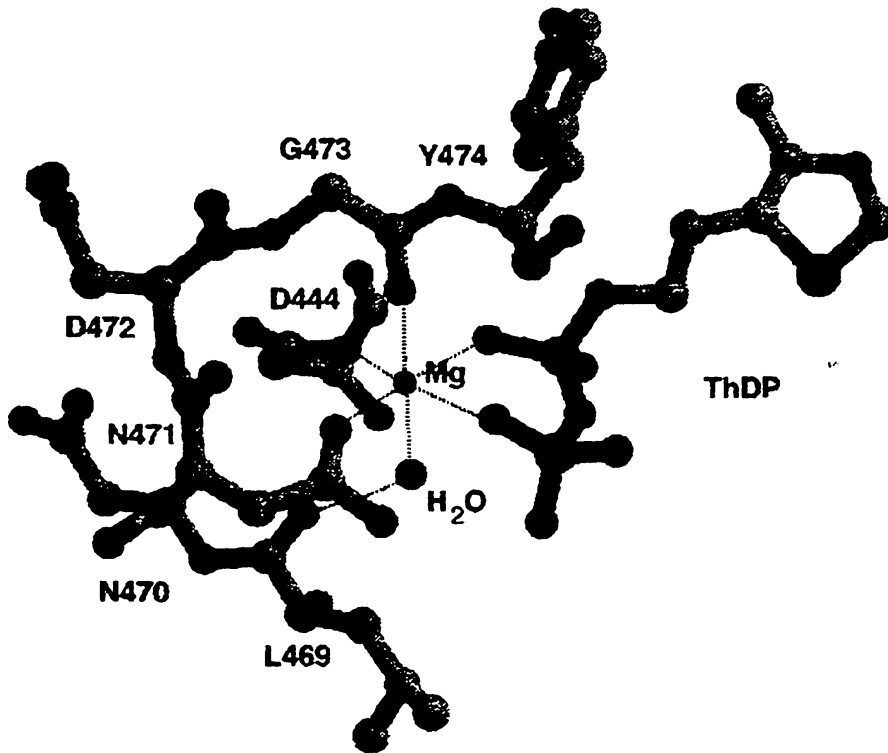
Τα μόρια της TPP όπως είπαμε, βρίσκονται μεταξύ δυο υπομονάδων έτσι ώστε το διφωσφορικό άκρο να αλληλεπιδρά με αμινοξέα του γ-τμήματος μιας υπομονάδας ενώ το αμινοπυριμιδινικό τμήμα συνδέεται με το ίδιο γ-τμήμα καθώς και το α-τμήμα μιας άλλης



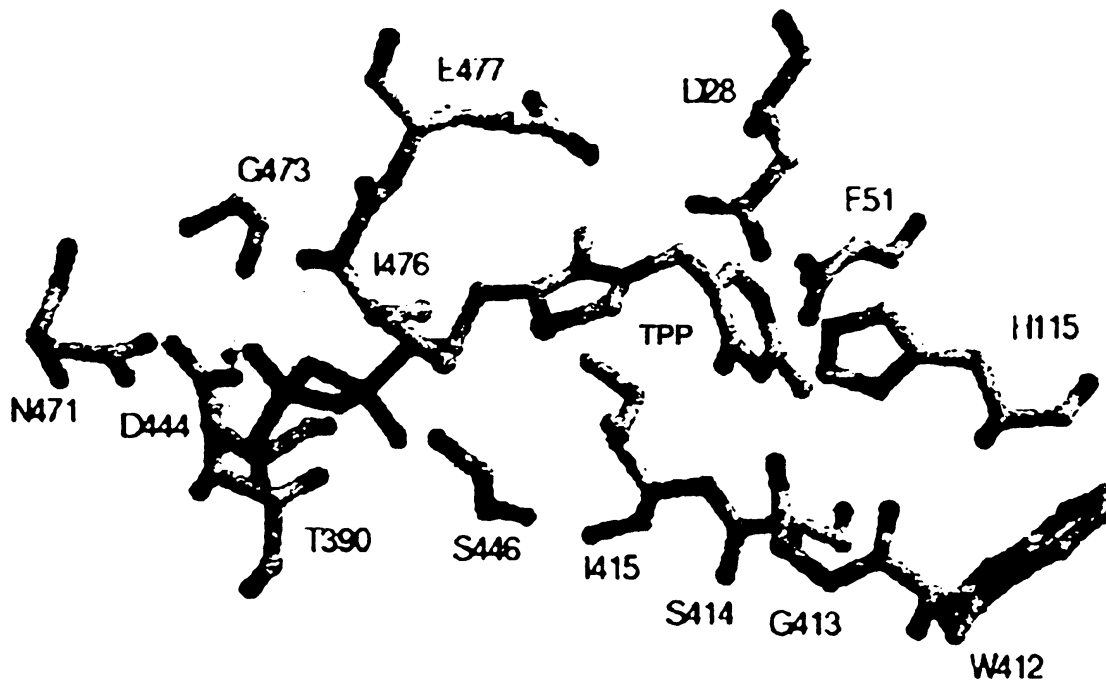
υπομονάδας. Η σύνδεση της διφωσφορικής ομάδας επιτυγχάνεται κυρίως μέσω δυο δεσμών με ένα οκταεδρικό ενταγμένο ιόν Mg^{2+} το οποίο καλύπτει τη σφαίρα ένταξής του με άτομα O της παράπλευρης αλυσίδας του Asp-444 και της Asn-471, του καρβονυλικού οξυγόνου της Gly-473 και ενός μορίου H_2O , το οποίο αλληλεπιδρά με το καρβονυλικό οξυγόνο της Leu-469 [151] (σχήμα 31). Υπενθυμίζουμε εδώ ότι τα αμινοξέα Asp-444 και Asn-471 αποτελούν μέρος ενός δομικού μοτίβου 30 αμινοξέων το οποίο είναι κοινό σε ένα πλήθος ενζύμων θειαμίνης [150]. Η σπουδαιότητά του όσον αφορά την σύνδεση της TPP με το αποένζυμο εξετάστηκε και αποδείχθηκε στα ένζυμα PDC [46,152], TK [41] και POX [43,153]. Απ' την άλλη ο αμινοπυριμιδινικός δακτύλιος σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του N(1') και της παράπλευρης αλυσίδας του Glu-51 της α-υπομονάδας καθώς και μεταξύ του N(4'a) και του καρβονυλικού οξυγόνου της Gly-413 της γ-υπομονάδας. Τέλος, ένας ασθενέστερος δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται μεταξύ του N(3') και του πεπτιδικού αζώτου της Ile-415 της γ-υπομονάδας (σχήμα 32). Το συνένζυμο περιβάλλεται με τέτοιο τρόπο απ' το πρωτεϊνικό τμήμα του ενζύμου έτσι ώστε μόνο τα άτομα N(4'a), C(2) και S(1) είναι προσβάσιμα από μόρια διαλύτη. Η διαμόρφωση του είναι η V με $\Phi_T = 95.5^\circ$ και $\Phi_P = -65.9^\circ$.

Η διαμόρφωση αυτή θα πρέπει να σταθεροποιείται απ' το πρωτεϊνικό περιβάλλον του ενζύμου και συγκεκριμένα απ' τους τρεις δεσμούς υδρογόνου με το αμινοπυριμιδινικό τμήμα που αναφέρθηκαν νωρίτερα, καθώς και απ' την παρουσία μιας ογκώδους υδρόφοβης αλυσίδας, αυτής της Ile-415 (στην γ-υπομονάδα) η οποία εντοπίζεται μεταξύ των δυο αρωματικών δακτυλίων της TPP [151]. Ο ρόλος της θα συζητηθεί αργότερα. Οι δεσμοί υδρογόνου της πρωτεΐνης με το αμινοπυριμιδινικό τμήμα, η V-διαμόρφωση, η ύπαρξη ενός υδρόφοβου αμινοξέος που παρεμβάλλεται μεταξύ των δυο δακτυλίων της TPP καθώς και η παρουσία του δομικού μοτίβου που προαναφέραμε αποτελούν κοινά δομικά χαρακτηριστικά όλων των ενζύμων θειαμίνης των οποίων λύθηκε η κρυσταλλική δομή [90]. Συνοπτικά αναφέρεται ότι οι αλληλεπιδράσεις που αφορούν το διφωσφορικό τμήμα του συνενζύμου φαίνονται στο σχήμα 31, εκείνες που αφορούν το αμινοπυριμιδινικό τμήμα παρουσιάζονται στο σχήμα 32, ενώ η συνολική δομή του ενεργού κέντρου της γPDC παρουσιάζεται στο σχήμα 33.

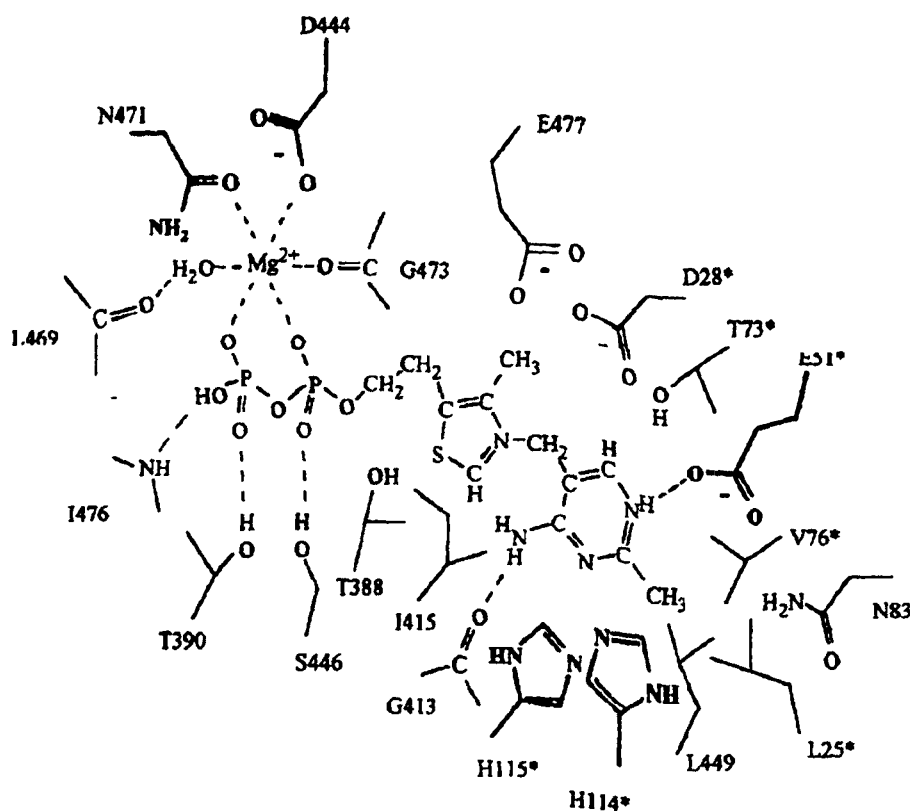




Σχήμα 31: Αλληλεπιδράσεις γPDC με την πυροφωσφορική ομάδα της TPP [151].



Σχήμα 32: Αλληλεπιδράσεις γPDC με το αμινοπυριμιδινικό τμήμα της TPP [151].



Σχήμα 33: Δομή ενεργού κέντρου της γ PDC. Τα αμινοξέα με αστερίσκο ανήκουν σε διαφορετική υπομονάδα του ενζύμου [46].

3. Μελέτες που αφορούν το ρόλο των αμινοξέων που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο.

Η γνώση της αμινοξικής αλληλουχίας των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των ενζύμων PDC επέτρεψε στους ερευνητές να αντικαταστήσουν πολλά αμινοξέα και να μελετήσουν έτσι το ρόλο που παίζουν αυτά είτε στη σύνδεση της TPP και του Mg^{2+} , είτε στην καταλυτική δράση, είτε στην αλλοστερική ενεργοποίηση. Αυτές οι μελέτες ονομάζονται μελέτες μεταλλαζογένεσης σε κατευθυνόμενη θέση (site-directed mutation studies) ενώ τα ένζυμα που προκύπτουν κατόπιν αλλαγής κάποιων αμινοξέων σε σχέση με το φυσικό ένζυμο ονομάζονται μεταλλαγμένα ένζυμα (mutant enzymes). Η σύγκριση των κινητικών ιδιοτήτων τους (K_m , K_{cat} , K_m/K_{cat} , $K_m/K_{cat} = f(pH)$) καθώς και μελέτες μοριακής μηχανικής μεταξύ αυτών και του φυσικού ενζύμου οδηγεί σε πολύτιμα συμπεράσματα τα οποία παρατίθενται αμέσως.

► Σύνδεση συνενζύμου-αποενζύμου (Asp444, Asn471).

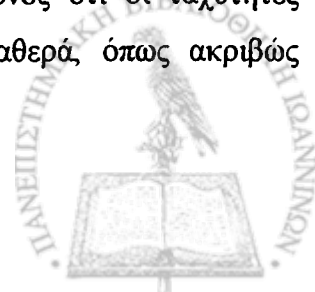
Έχουμε αναφέρει πολλές φορές τη σπουδαιότητα του δομικού μοτίβου των 30 αμινοξέων της μορφής -Gly-Asp-Gly- X_{24} -Asn-Asn- για τη σύνδεση της TPP. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε με αντικατάσταση του Asp444 με γλυκίνη, θρεονίνη ή ασπαραγίνη. Τα προκύπτοντα μεταλλαγμένα ένζυμα ήταν ανενεργά και μη ικανά να ενσωματώσουν το συνένζυμο έστω και αν αυτό βρισκόταν παρόν σε υψηλές συγκεντρώσεις [154]. Το γεγονός ότι το Mg(II) έχει άμεσο δεσμό με το Asp-444 καθιστά προφανή το λόγο γιατί σ' αυτή τη θέση είναι απαραίτητη η ύπαρξη αρνητικού φορτίου.

Αντικατάσταση της Asn-471 (στο τέλος αυτού του μοτίβου) με γλουταμίνη οδηγεί επίσης σε ένα ανενεργό ένζυμο, ενώ αντικατάστασή της με ασπαρτικό έχει ως αποτέλεσμα ένα μερικά ενεργό ένζυμο. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι σ' αυτή τη θέση το μήκος της παράπλευρης αλυσίδας του αμινοξέος είναι πιο σημαντικό απ' το φορτίο [154].

► Ρόλος των Glu51, Trp392, Asp28, Glu477 (yPDC) / Asp27, Glu473 (zPDC).

Έχει ήδη αναφερθεί ότι το Glu-51 συμμετέχει στο σχηματισμό της 4'α-ίμινο ταυτομερούς μορφής του αμινοπυριμιδινικού δακτυλίου η οποία με τη σειρά της συμμετέχει στην απόσπαση του H-C(2) του θειαζολικού δακτυλίου. Η αντικατάσταση του με άλλα αμινοξέα οδηγεί σε μεταλλαγμένα ένζυμα στα οποία η K_{cat} είναι πολύ μικρότερη απ' ότι στο φυσικό ένζυμο. Εδώ παρατηρείται ένα σημαντικό φαινόμενο. Αντικατάσταση του Glu-51 με ουδέτερα αμινοξέα όπως η Trp [155] οδηγεί σε δραματική μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου στο 0.04%. Δεδομένου όμως του καθοριστικού ρόλου αυτού του αμινοξέος, η ύπαρξη δραστηριότητας έστω και σε πολύ μικρό ποσοστό δεν ήταν αναμενόμενη. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη του Kemp και των συνεργατών του [63] ότι το Glu-51 αυξάνει την ταχύτητα ανταλλαγής του πρωτονίου του C(2) με τον δευτεριωμένο διαλύτη.

Πολύ πρόσφατα ο K. Tittmann και οι συνεργάτες του [156] μελέτησαν την επίδραση που είχε η αλλαγή της Trp392 με μεθειονίνη ή γλουταμίνη, στην ταχύτητα ανταλλαγής του H-C(2) με δευτέριο στο ένζυμο zPDC. Η Trp392 βρίσκεται μεν στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου της zPDC [44] αλλά δεν αλληλεπιδρά άμεσα με το συνένζυμο. Παρόλα αυτά, τα μεταλλαγμένα ένζυμα δίνουν τιμές K_{cat} της τάξης των 8.5 sec^{-1} και 3.6 sec^{-1} αντίστοιχα, μικρότερες απ' αυτή του φυσικού ενζύμου (17 sec^{-1}). Το πιο σημαντικό συμπέρασμα όμως είναι το γεγονός ότι οι ταχύτητες ανταλλαγής C(2)-H/D είναι πολύ μεγαλύτερες απ' την καταλυτική σταθερά, όπως ακριβώς



συμβαίνει και στο φυσικό ένζυμο. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι α) ο ιονισμός του H-C(2) δεν είναι το αργό και καθοριστικό στάδιο στην συνολική ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης και β) ο μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο λαμβάνει χώρα η απόσπαση του H-C(2) πρέπει να είναι κοινός με τον ιονισμό της ομάδας H-O(2α) που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ακεταλδεΐδης.

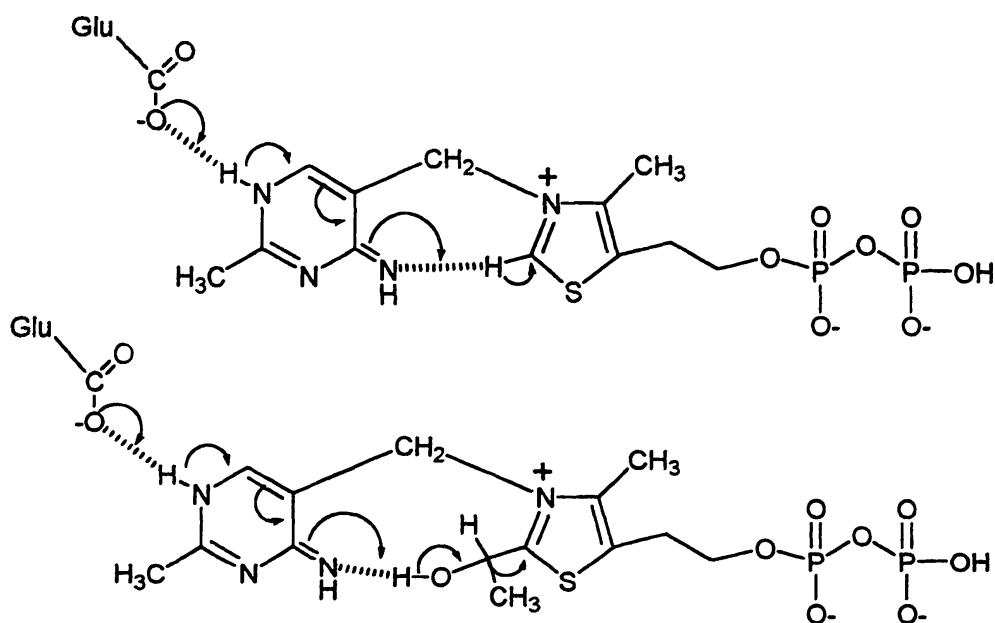
Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν και την επίδραση του pH στην ταχύτητα ανταλλαγής C(2)-H/D στο φυσικό ένζυμο. Βρέθηκε ότι η ταχύτητα αυτή αυξάνει με την άνοδο του pH και καταλαμβάνει μια σταθερή τιμή σε pH=5-6 [156]. Δεδομένου του ρόλου του Glu-50 (ή Glu-51 στην yPDC) στη δημιουργία και σταθεροποίηση της ίμινο-ταυτομερούς μορφής του πυριμιδινικού δακτυλίου, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι μια ομάδα με pK_a περίπου 5, σε αποπρωτονιωμένη μορφή συμμετέχει επίσης στο μηχανισμό απόσπασης του πρωτονίου απ' τον C(2). Τόσο η παράπλευρη αλυσίδα του γλουταμικού όσο και το άτομο N(1') της πυριμιδίνης μπορούν να θεωρηθούν το ίδιο κατάλληλα για το ρόλο αυτό [156].

Ξεκινάμε λοιπόν απ' την ίμινο μορφή με την οποία πιστεύεται ότι το συνένζυμο αλληλεπιδρά με το αποένζυμο [62]. Αποπρωτονίωση του N(1') απ' την παράπλευρη αλυσίδα του γλουταμικού οδηγεί σε αυξημένη βασικότητα του ίμινο αζώτου καθιστώντας το ικανό να αποπρωτονιώσει τόσο το άτομο C(2) όσο και το άτομο O(2α) στο στάδιο απελευθέρωσης του προϊόντος [156]. Τα παραπάνω συμπεράσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 34.

Συνεχίζοντας, τα αμινοξέα Asp28 και Glu477 βρίσκονται όχι μόνο κοντά στα άτομα N(4'α) και C(2) αλλά πιθανόν και κοντά στον C(2α) καθώς και στο καρβοξύλο-τμήμα του συνδεδεμένου με την TPP πυροσταφυλικού οξέος, δηλαδή το καρβοξύλιο της λάκτυλ-θειαμίνης. Για τους παραπάνω λόγους η αντικατάστασή τους με άλλα θα έδινε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό καταλυτικής δράσης εντός του ενζύμου. Εξάλλου, ο σημαντικός καταλυτικός ρόλος του Glu-477 έχει ήδη συζητηθεί με βάση μελέτες μοριακής μηχανικής [56].

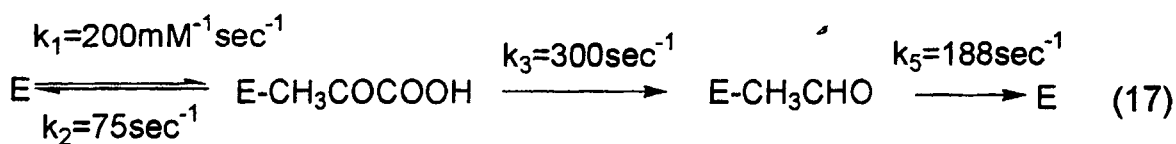
Πράγματι η αντικατάσταση του Glu-477 με Trp, Asn και Asp, του Asp28 με Ala και Asn, οδηγεί σε μεταλλαγμένα ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν εξαιρετικά μικρές τιμές της K_{cat} [157]. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα αμινοξέα αυτά πρέπει να συμμετέχουν στην όλη καταλυτική πορεία.





Σχήμα 34: Επίδραση της παράπλευρης αλυσίδας του Glu στη βασικότητα του ίμινο αζώτου και την αποπρωτονίωση των O(2α) και C(2) [156].

Πολύ πρόσφατα ο A.K. Chang και οι συνεργάτες του [158] αντικατέστησαν τα αμινοξέα Asp27 και Glu473 στην zPDC (τα ανάλογα των Asp28 και Glu477 στην γPDC) και παρατήρησαν ότι ενώ οι τιμές K_m για την σύνδεση του πυροσταφυλικού είναι οι ίδιες με το φυσικό ένζυμο, η % ενεργότητα όπως εξάγεται απ' τιμές K_{cat} είναι πολύ μικρή στα μεταλλαγμένα ένζυμα. Λαμβάνοντας υπόψη τα γεγονότα αυτά καθώς και το μηχανισμό του καταλυτικού κύκλου της zPDC (17) του S. Sun και των συνεργατών του [159] κατέληξαν στα εξής συμπεράσματα:



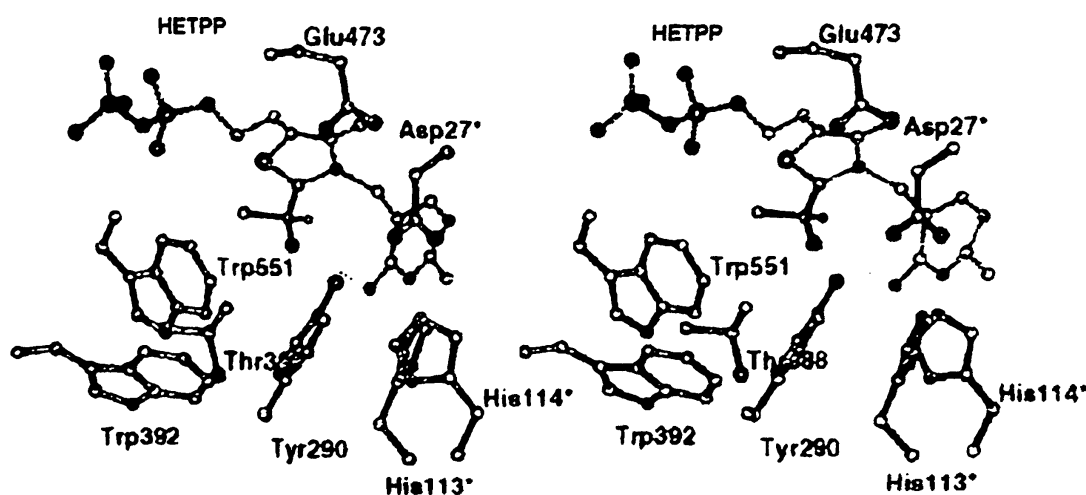
$$K_{cat} = k_3 k_5 / (k_3 + k_5) \quad K_m = (k_2 k_5 + k_3 k_5) / (k_1 k_3 + k_1 k_5)$$

Η τιμή της K_{cat} επηρεάζεται τόσο απ' την k_3 (αποκαρβοξυλίωση) όσο και απ' την k_5 (απελευθέρωση ακεταλδεΐδης). Δεδομένου όμως ότι η τιμή της K_m η οποία επηρεάζεται κυρίως απ' την k_5 παραμένει περίπου σταθερή στα μεταλλαγμένα ένζυμα, υποδεικνύει ότι οι μεταλλαξογενέσεις επηρεάζουν μόνο το στάδιο της αποκαρβοξυλίωσης δηλαδή τη σταθερά k_3 . Άρα τα αμινοξέα αυτά, δηλαδή Asp27 και Glu473, πρέπει να συμμετέχουν σ' αυτό το στάδιο του καταλυτικού κύκλου.



Ο καθοριστικός ρόλος του ασπαρτικού και του γλουταμικού που βρίσκονται κοντά στο μόριο της θειαμίνης αναδύθηκε και από μελέτες μοριακής μηχανικής στο ένζυμο zPDC απ' την D. Dobritzsch και τους συνεργάτες της όπως ήδη αναφέρθηκε [44]. Οι παραπάνω ερευνητές χρησιμοποίησαν παραμέτρους απ' την κρυσταλλική δομή της zPDC και εφάρμοσαν κατάλληλες μεθόδους μοριακής μηχανικής ώστε να μελετήσουν τις αλληλεπιδράσεις των δυο βασικών ενδιάμεσων της καταλυτικής δράσης, δηλαδή της LTPP και HETPP με τα παραπάνω αμινοξέα στο ενεργό κέντρο. Βρέθηκε ότι από στερεοχημικής πλευράς τα μόρια μπορούν να βρίσκονται στην καταλυτική κοιλότητα του ενζύμου και επιπλέον στην περίπτωση της HETPP τα άτομα του πρώην υποστρώματος περιβάλλονται απ' τις παράπλευρες αλυσίδες των πιο πάνω αμινοξέων καθώς και των Trp290 και Thr388 (σχήμα 35).

Έχουμε ήδη αναφέρει τη σπουδαιότητα του Glu477 (Glu473 στην zPDC) όπως προέκυψε από μελέτες μοριακής μηχανικής των Lobell και Crout [56]. Υπενθυμίζουμε ότι η πρωτονιωμένη παράπλευρη αλυσίδα του Glu477 παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην αρχή του καταλυτικού κύκλου όταν το πυροσταφυλικό ενώνεται στην TPP, επίσης στην αποκαρβοξυλίωσή του, όσο και στην απελευθέρωση της ακεταλδεΐδης, σταθεροποιώντας το αρνητικό φορτίο που αναπτύσσεται στα ενδιάμεσα και στις μεταβατικές καταστάσεις που προηγούνται αυτών των σταδίων. Υποδεικνύεται ότι στην zPDC επιπλέον του Glu473 η παράπλευρη ομάδα της Tyr290 συνεισφέρει σ' αυτή τη σταθεροποίηση.



Σχήμα 35: Αλληλεπιδράσεις HETPP με αμινοξέα που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου zPDC όπως προκύπτουν από μελέτες μοριακής μηχανικής [44].



► Ρόλος των His114, His115 (yPDC) / His113, His114 (zPDC).

Τα αμινοξέα His114 και His115 βρίσκονται και αυτά κοντά στην TPP στο ενεργό κέντρο. (σχήμα 33, σελίδα 47). Όσον αφορά τον πιθανό τους ρόλο, ο G. Schenk και οι συνεργάτες του [160] διαπίστωσαν ότι για το ένζυμο zPDC ο λόγος K_{cat}/K_m παρουσιάζει μέγιστο σε μια τιμή pH περίπου 6.4. Η τιμή αυτή θα μπορούσε να ταυτίζεται με το pK_a του ιμιδαζολικού δακτυλίου μιας ιστοιδίνης, η οποία θα πρέπει να είναι πρωτονιωμένη ώστε να συνδέεται πιο εύκολα το υπόστρωμα. Επιπλέον, οι ίδιοι αντικατέστησαν την His113 του ίδιου ενζύμου (His114 στην yPDC) καθώς και την His114 (His115 στην yPDC) με άλλα αμινοξέα και παρατήρησαν ότι η πρώτη μετάλλαξη οδηγεί σε ανενεργό ένζυμο, το οποίο όμως διατηρεί την ικανότητά του να δεσμεύει τους συμπαραγόντες (TPP και Mg^{2+}). Επιπλέον το μεταλλαγμένο ένζυμο μπορεί να αλληλεπιδράσει με την HETPP και να απελευθερώσει ακεταλδεΐδη, υποδεικνύοντας ότι η His113 (ή His114 στην yPDC) εμπλέκεται στον καταλυτικό κύκλο μέχρι και την αποκαρβοξυλίωση. Τέλος, η δεύτερη μετάλλαξη οδηγεί σε ένα ένζυμο που δεν διαφέρει και πολύ απ' το αντίστοιχο φυσικό αν εξαιρέσουμε βέβαια την μείωση της δραστητικότητάς του κατά 60% [160]. Μελέτες μόλις το 1998, έδειξαν ότι η His114 (His115 στην yPDC) μπορεί να εμπλέκεται στην ενζυμική διαδικασία, καθορίζοντας την κατάλληλη διευθέτηση των ενδιάμεσων της καταλυτικής δράσης στο ενεργό κέντρο μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου [161].

Και άλλες μελέτες μεταλλαξογένεσης έγιναν με σκοπό να διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος αυτών των ιστοιδινών. Έτσι αντικατάσταση της His114 (His115 στην yPDC) με Gln έχει σαν αποτέλεσμα πολύ μικρή αλλαγή στην K_m και 67% μικρότερη δραστητικότητα σε σχέση πάντα με το φυσικό ένζυμο, ενώ η αντικατάσταση της His113 (His114 στην yPDC) με Gln αναστέλλει τελείως την ενζυμική δράση [162]. Προτείνεται ότι η αλληλεπίδραση των ατόμων αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της His113 με την παράπλευρη αλυσίδα του Asp27 σταθεροποιούν το θετικό φορτίο του δακτυλίου της. Αυτή με τη σειρά της επηρεάζει το pK_a της His114 έτσι ώστε ο δακτύλιος της να βρίσκεται στη μη ιονισμένη μορφή. Το ιμιδαζόλιο της His114 βρίσκεται πολύ κοντά στο άτομο N(4'a) και παρουσία θετικού φορτίου πάνω σ' αυτό δεν ευνοεί το μηχανισμό απόσπασης πρωτονίου αφού σε κάποια στιγμή η 4'a-αμινομάδα θα φέρει επίσης θετικό φορτίο. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τις προτάσεις του G. Schenk και των συνεργατών του [160].



Όπως φαίνεται άλλωστε στο σχήμα 35 οι δυο ιστιδίνες εντοπίζονται κοντά και στο ενδιάμεσο, της ενζυμικής δράσης HETPP, σύμφωνα με μελέτες μοριακής μηχανικής στο ένζυμο zPDC, υποδεικνύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τον σημαντικό καταλυτικό τους ρόλο.

Τέλος αντικατάσταση και των δυο ιστιδινών στο μόριο της γPDC (His114 και His115) με Phe οδηγεί όχι μόνο σε ένζυμο με μικρότερη δραστικότητα αλλά αναστέλλει επίσης την αλλοστερική ενεργοποίηση απ' το υπόστρωμα [157]. Απ' την κρυσταλλική δομή του ενζύμου γνωρίζουμε ότι ένα απ' τα άτομα αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της His115 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την καρβόνυλο ομάδα της Trp412. Το γεγονός αυτό θα συζητηθεί αργότερα.

► Εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα.

Μέσα απ' τις μελέτες που έχουν παρατεθεί μέχρι στιγμής ένα ερώτημα που δεν έχει θιχθεί είναι το ποιός παράγοντας καθορίζει την εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα. Από πολλές ερευνητικές ομάδες έχει προταθεί ότι το ενεργό κέντρο είναι αδιαπέραστο κατά τη διάρκεια της καταλυτικής δράσης [163-165]. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μιας ομάδας 8 αμινοξέων (105-112 στην zPDC και 106-113 στην γPDC) τα οποία σχηματίζουν ένα είδος βρόγχου ο οποίος φράσσει το ενεργό κέντρο [160]. Η εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα λοιπόν πιστεύεται πως καθορίζεται απ' την αποτελεσματικότητα αυτού του φράγματος.

► Σταθεροποίηση και ρόλος της V διαμόρφωσης.

Όπως έχουμε αναφέρει, ένα ενδιαφέρον δομικό χαρακτηριστικό του ενζύμου γPDC είναι η ύπαρξη της V-διαμόρφωσης για το μόριο του συνενζύμου. Σαν αποτέλεσμα αυτής της διαμόρφωσης τα άτομα C(2) και N(4'a) βρίσκονται αρκετά κοντά (3.4Å). Σ' αυτή την απόσταση όμως είναι πολύ απίθανο να βρίσκονται συνδεδεμένα δυο άτομα υδρογόνου στο N(4'a) και ένα στον C(2). Αν συνέβαινε αυτό τότε η απόσταση μεταξύ ενός ατόμου υδρογόνου της ομάδας N(4'a)H₂ και του H-C(2) θα ήταν μόνο 1.9 Å, πολύ πιο μικρή δηλαδή απ' την αποδεκτή απόσταση Van der Waals [151]. Το γεγονός αυτό που απορρέει απ' την V διαμόρφωση, σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση του Glu-51 με τον πυριμιδινικό δακτύλιο [61,140,152] αποτελούν τους παράγοντες που ευνοούν την σύνδεση της TPP με το αποένζυμο στην γνωστή ίμινο ταυτομερή μορφή. Εν συνεχεία η απόσπαση του πρωτονίου απ' τον C(2) είναι εύκολη λόγω των παραπάνω φαινομένων



καθώς και της σωστής διεύθεσης της ίμινο ομάδας ως προς τον άξονα του δεσμού C(2)-H, η οποία επιτυγχάνεται μέσω δεσμού υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο της Gly413 [151].

Ποιοί είναι όμως οι παράγοντες που σταθεροποιούν την V διαμόρφωση της TPP εντός του ενζύμου; Εκτός απ' τους τρεις δεσμούς υδρογόνου που εντοπίζονται στο αμινοπυριμιδινικό τμήμα, έχει αναφερθεί επίσης ότι η παράπλευρη αλυσίδα της Ile415 συνεισφέρει στη σταθεροποίηση αυτή. Η αντικατάσταση της Ile415 με Val και Thr στο ένζυμο yPDC έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση των τιμών της K_{cat} καθώς και τη μετατόπιση της τιμής pH στην οποία το ένζυμο παρουσιάζει το μέγιστο της καταλυτικής δράσης, προς πιο αλκαλικές περιοχές (στο φυσικό ένζυμο pH=6.2) [166]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η Ile415 παρέχει τη βέλτιστη σταθεροποίηση των μεταβατικών καταστάσεων και ευθύνεται επίσης για τον σωστό προσανατολισμό των ιονισμένων ομάδων των αμινοξέων που συμμετέχουν στον καταλυτικό κύκλο.

Μελέτες μοριακής μηχανικής τόσο στο φυσικό ένζυμο, όσο και σε τρία μεταλλαγμένα ένζυμα (αντικατάσταση Ile415 με Val, Gly και Ala) από τον F. Guo και τους συνεργάτες του [166] κατέληξαν στα παρακάτω συμπεράσματα. Μείωση της ανθρακικής αλυσίδας στη θέση 415 έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ισχύος των δεσμών υδρογόνου μεταξύ της πρωτεΐνης (yPDC) και της αμινοπυριμιδίνης και ακολούθως την αύξηση της απόστασης N(4'a)-C(2). Για να μειωθεί λοιπόν η ελευθερία διαμόρφωσης και να διατηρηθεί η V διαμόρφωση με τη μικρή απόσταση μεταξύ των N(4'a) και C(2) (που είναι απαραίτητη για τον ιονισμό του H-C(2)) απαιτείται μια παράπλευρη αλυσίδα στη θέση 415 μεγαλύτερη απ' αυτή της θρεονίνης. Η επιπλέον μεθυλομάδα της ισολευκίνης σε σχέση με τη βαλίνη αυξάνει τον υδρόφοβο χαρακτήρα του ενεργού κέντρου. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται μειωμένη διηλεκτρική σταθερά τού ενεργού κέντρου η οποία με της σειρά της επιδρά στη μείωση των ενεργειών ενεργοποίησης όλων των σταδίων των καταλυτικών αντιδράσεων συμπεριλαμβανομένου ίσως και του ιονισμού του H-C(2).

Στον παραπάνω προτεινόμενο μηχανισμό παρατηρήθηκαν επίσης ισχυρές αλληλεπιδράσεις τύπου Van der Waals μεταξύ της 4-μεθυλομάδας του θειαζολίου και της γ-μεθυλομάδας της Ile415. Αυτή η αλληλεπίδραση απουσιάζει τελείως στο μεταλλαγμένο με βαλίνη στη θέση 415 ένζυμο. Η επιπλέον μεθυλομάδα λοιπόν όχι μόνο αυξάνει τον υδρόφοβο χαρακτήρα του ενεργού κέντρου, αλλά αυξάνει επίσης την τάση του συνενζύμου να ενωθεί με το αποένζυμο και μειώνει τέλος και άλλο την ελευθερία περιστροφής των δεσμών του συνενζύμου 'παγώνοντας' κατά κάποιο τρόπο την ενεργή V- διαμόρφωση [166].



Είναι γνωστό ότι εντός της γPDC η ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης είναι 10^{12} φορές μεγαλύτερη σε σύγκριση με την ίδια αντίδραση που καταλύει η TPP μόνη της [167]. Οι τρεις δεσμοί υδρογόνου της αμινοπυριμιδίνης καθώς και το δομικό μοτίβο που συμβάλλει στην σύνδεση της TPP (-Gly-Asp-Gly-X₂₄-Asn-Asn-) επαρκούν για τη διατήρηση της V διαμόρφωσης ακόμα και απουσία της Ile-415. Η παρουσία βέβαια της ογκώδους παράπλευρης αλυσίδας της Ile415 αυξάνει την καταλυτική δραστηριότητα αλλά ακόμα και απουσία αυτής το ένζυμο διατηρεί μεγάλο μέρος της δραστηριότητάς του.

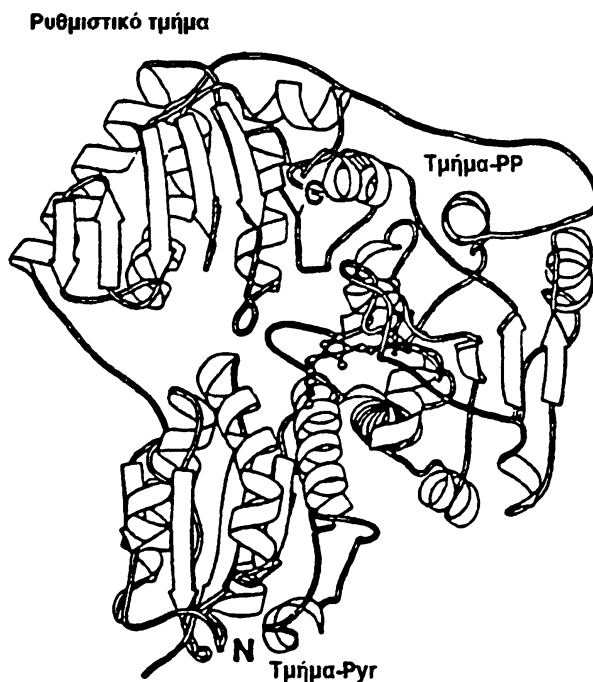
Γιατί η φύση λοιπόν επέλεξε μια διαμόρφωση η οποία απουσία του ενζύμου είναι ενεργειακά λιγότερο σταθερή; Οι λόγοι της ύπαρξης αυτής της διαμόρφωσης καθώς και της Ile-415 θα πρέπει να αναζητηθούν α) στην ανάγκη γειτνίασης των ατόμων C(2) και N(4'α) ώστε να επιταχυνθεί η αποπρωτονίωση του C(2) και β) στην μείωση της ελευθερίας διαμόρφωσης έτσι ώστε να 'παγώσει' η ενεργός διαμόρφωση. Ο πιο σημαντικός λόγος πάντως, πρέπει να είναι ο πρώτος. Μια τελευταία συνέπεια που απορρέει απ' την V διαμόρφωση είναι το γεγονός ότι όταν το άτομο H του C(2) μεταφερθεί στο ίμινο N(4'α) ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ του Glu51 και του N(1') εξασθενεί οδηγώντας έτσι σε ένα περισσότερο εύκαμπτο V διαμορφωμερές [166].

4. Αλλοστερική ενεργοποίηση.

Έχουμε αναφέρει ότι η κάθε υπομονάδα της γPDC περιέχει τουλάχιστον δυο διάκριτες περιοχές στις οποίες μπορεί να λάβει χώρα η σύνδεση του υποστρώματος [37,145,168], μια καταλυτική και μια ρυθμιστική όπως φαίνεται στο σχήμα 36.

Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται η αλλοστερική ενεργοποίηση κατά την σύνδεση του υποστρώματος στο ρυθμιστικό κέντρο αποτέλεσε αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας από πολλές ομάδες [169-174]. Χρησιμοποιήθηκε πλήθος τεχνικών όπως κατευθυνόμενη μεταλλαξογένεση, φασματοσκοπίες FT-IR και NMR, προσδιορισμός ισοηλεκτρικών σημείων και άλλες. Το πιο σημαντικό γεγονός όμως το οποίο έδωσε το έναυσμα για υποθέσεις σχετικά με το μηχανισμό αυτό, ήταν η ένδειξη ότι τα προϊόντα αποκαρβοξυλίωσης ενώσεων του τύπου $p\text{-ClC}_6\text{H}_4\text{-CH=CHCOCOOH}$ (CPB) οι οποίες κανονικά απενεργοποιούν το ένζυμο μπορούν να συνδεθούν με τη σουλφιδρυλομάδα της Cys221. Το γεγονός αυτό αποδείχθηκε εμμέσως χρησιμοποιώντας επισημασμένη με τρίτιο CPB ($[3\text{-}^3\text{H}]\text{-CPB}$) οπότε το ισότοπο βρέθηκε συνδεδεμένο στην σουλφιδρυλομάδα της Cys221 [171].





Σχήμα 36: Δομή της υπομονάδας της yPDC όπου διακρίνονται το τμήμα σύνδεσης του πυροφωσφορικού και πυριμιδινικού άκρου της TPP (τμήματα PP και Pyr αντίστοιχα) καθώς και η ρυθμιστική περιοχή [168].

Ακολούθησαν πολλές μελέτες αντικατάστασης τόσο της Cys221 όσο και αμινοξέων που πιστεύονταν ότι αλληλεπιδρούν μ' αυτήν ώστε να διαπιστωθεί κατά πόσο επηρεάζουν ή μη την αλλοστερική ρύθμιση. Τα αποτελέσματα όλων αυτών των προσπαθειών έχουν ως εξής (σχήμα 37) [157]. Η αλληλεπίδραση της Cys221 με το πυροσταφυλικό (μέσω πυρηνόφιλης προσβολής της σουλφιδρυλομάδας στην κέτο ομάδα του πυροσταφυλικού) οδηγεί στην σύνδεση του υποστρώματος μ' αυτήν. Η δέσμευση όμως του πυροσταφυλικού στην Cys221 του β-τμήματος της υπομονάδας οδηγεί σε μετατόπιση της His92 του α-τμήματος λόγω απώσεων Van der Waals. Αυτή με τη σειρά της μετατοπίζει την πεπτιδική αλυσίδα στην οποία είναι συνδεδεμένο το Glu91. Η μετατόπιση αυτή έχει επίδραση στον τρόπο με τον οποίο το Glu91 αλληλεπιδρά με τον δακτύλιο της Trp412 στο γ-τμήμα της υπομονάδας. Η τελευταία όμως σχηματίζει δεσμό υδρογόνου χρησιμοποιώντας το καρβονυλικό της οξυγόνο, με το δακτύλιο της His115. Μετακίνηση όλης αυτής της αλυσίδας επηρεάζει τελικά την Gly413 το καρβονυλικό άτομο της οποίας συνδέεται με δεσμό υδρογόνου με το άτομο N(4'a). Άρα τελικά αποδεικνύεται ότι ο σωστός προσανατολισμός του δεσμού αυτού είναι το γεγονός που ευθύνεται για την ενεργοποίηση του ενζύμου απ' το



υπόστρωμα [157]. Υπενθυμίζουμε εδώ ότι αυτός ο δεσμός είναι υπεύθυνος επίσης για τη σωστή διεύθυνση της 4'α-ίμινο ομάδας ως προς τον άξονα του δεσμού H-C(2) ώστε να διευκολύνεται ο ιονισμός του ατόμου του υδρογόνου.



Σχήμα 37: Τρόπος επικοινωνίας του ρυθμιστικού (αλλοστερικού κέντρου) με το ενεργό κέντρο του ενζύμου γPDC [151].

5. Τελικά συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό καταλυτικής δράσης στο ένζυμο γPDC.

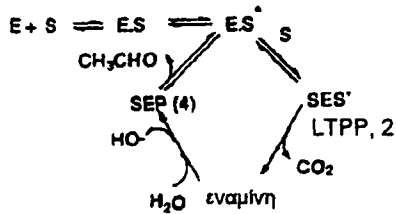
Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα και έχοντας υπόψη το μηχανισμό ενζυμικής δράσης της γPDC που πρότειναν ο F. Guo και οι συνεργάτες του [166] (σχήμα 38) καταλήγουμε στα παρακάτω συμπεράσματα.

α) Προσθήκη του πυροσταφυλικού στο ρυθμιστικό τμήμα οδηγεί στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο ES⁺ μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος (σχήμα 38, I). Εν συνεχεία για το σχηματισμό του υλιδίου έχουν προταθεί τρεις μηχανισμοί. Είτε το υλίδιο σχηματίζεται πριν απ' την προσβολή του υποστρώματος με τον τρόπο που πρότεινε ο Schellenberger (σχήμα 18, σελίδα 20)



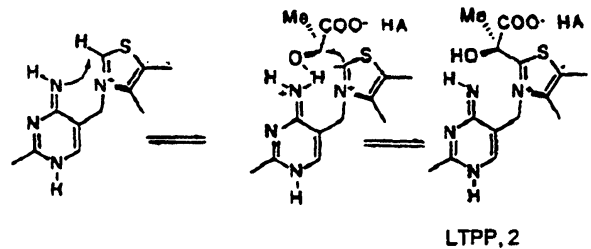
[62], είτε σχηματίζεται μεν πρώτα αλλά πολύ γρήγορα δεσμεύεται απ' το υπόστρωμα (σχήμα 38, ΠΑ), είτε λαμβάνει χώρα ταυτόχρονος ιονισμός του H-C(2) και σχηματισμός της LTPP (σχήμα 38, ΠΒ).

I. Ενεργοποίηση στη θέση Cys221.
Προσθήκη πυροσταφ. οξέος

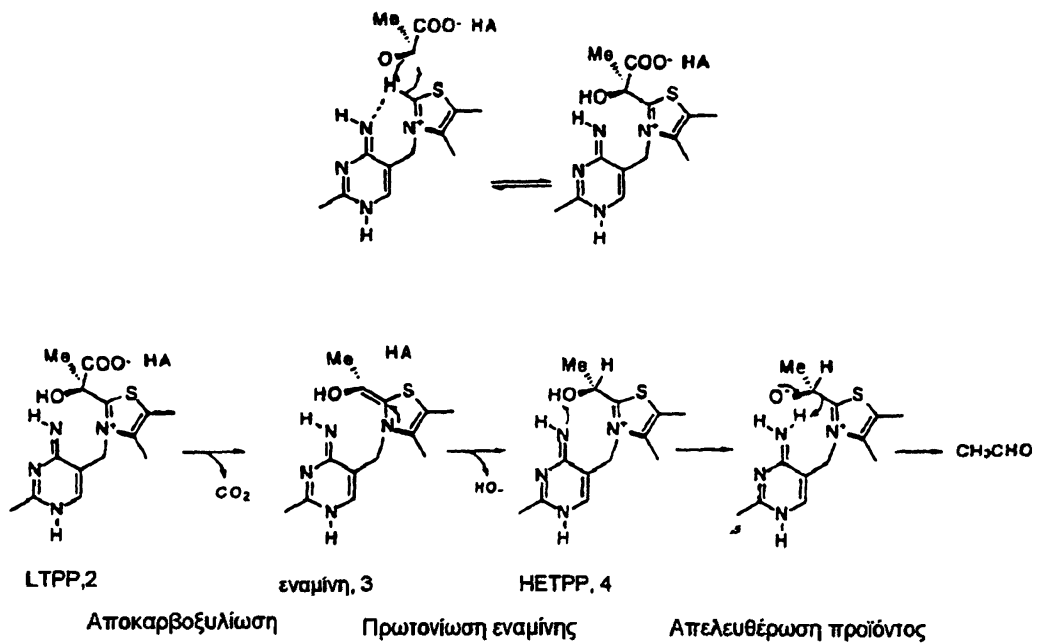


II. Προσθήκη πυροσταφ. οξέος στο ενεργοποιημένο ένζυμο

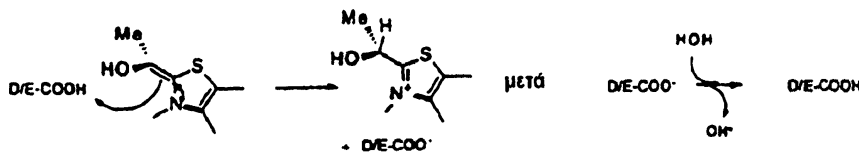
A. Σχηματισμός υλιδίου και πυρηνόφιλη προσβολή πυροσταφαιλικού



B. Ταυτόχρονος σχηματισμός υλιδίου και προσθήκη πυροσταφαιλικού



Τρόπος παραγωγής υδροξυλίου



Σχήμα 38: Μηχανισμός καταλυτικής δράσης της γPDC σύμφωνα με τον Guo και τους συνεργάτες του [166].



Ένα ερώτημα που τίθεται είναι ποιός απ' τους παραπάνω μηχανισμούς σχηματισμού του υλιδίου είναι αυτός που ακολουθείται. Σε μια σχετικά πρόσφατη ερευνητική εργασία προτείνεται ο τελευταίος σύγχρονος μηχανισμός [175] αλλά λίγο αργότερα [62, 176] βρέθηκε ότι i) τόσο στο ενεργοποιημένο ένζυμο όσο και απουσία υποστρώματος, ο θειαζολικός δακτύλιος δεν έχει ιονιστεί, ii) ο ιονισμός της ομάδας H-C(2) μπορεί να είναι το αργό και καθοριστικό στάδιο για την ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης απουσία ενεργοποίησης, ενώ στο ενεργοποιημένο ένζυμο η ταχύτητα ανταλλαγής αυτού του πρωτονίου με δευτέριο είναι πολύ μεγαλύτερη απ' την K_{cat} .

Συγκεκριμένα, η ταχύτητα αυτή είναι τώρα τρεις φορές μεγαλύτερη απ' ότι στο μη ενεργοποιημένο ένζυμο με αποτέλεσμα το στάδιο αυτό πλέον να μην είναι το καθοριστικό για την συνολική ταχύτητα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το αποτέλεσμα της ενεργοποίησης στην yPDC είναι μια μεγάλη αύξηση στην ταχύτητα ανταλλαγής του C(2)-H με δευτέριο. Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώθηκε και με παρόμοιου τύπου μελέτες στην zPDC η οποία όπως έχουμε πεί δεν ενεργοποιείται απ' το υπόστρωμα. Η ταχύτητα ανταλλαγής απουσία του υποστρώματος βρέθηκε πολύ μεγαλύτερη απ' την K_{cat} για κάθε ενεργό κέντρο του ενζύμου. Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί εδώ ότι αυτές οι ταχύτητες ανταλλαγής δεν αντανακλούν μόνο την μεγαλύτερη ταχύτητα αποπρωτονίωσης αλλά και την ευκολότερη πρόσβαση της βάσης που προκαλεί αυτόν τον ιονισμό μαζί με την πηγή πρωτονίων (το διαλύτη).

Το Glu51 παίζει βέβαια καθοριστικό ρόλο στο σχηματισμό του υλιδίου. Εκτός απ' τη συνεισφορά του στη σταθεροποίηση της ίμινο-ταυτομερούς μορφής με την οποία το συνένζυμο αλληλεπιδρά με το αποένζυμο, αυξάνει επίσης τη βασικότητα του N(4'a) ώστε ο ιονισμός του H-C(2) να γίνεται πιο εύκολα. Ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του γ-καρβοξυλίου του Glu51 και του N(1') είναι ο παράγοντας που προκαλεί τα δυο παραπάνω φαινόμενα [62,63,155].

Τα αμινοξέα Asp28, His114 και His115 πιστεύεται ότι συμμετέχουν εμμέσως σ' αυτό το στάδιο του καταλυτικού κύκλου. Υπενθυμίζουμε ότι η παράπλευρη ομάδα του Asp28 σταθεροποιεί το θετικό φορτίο του ιμιδαζολίου της His114 η οποία με τη σειρά της επηρεάζει το pK_a της His115 ώστε να βρίσκεται στη μη ιονισμένη μορφή. Ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της τελευταίας βρίσκεται κοντά στο N(4'a) και η πιθανή ύπαρξη θετικού φορτίου σ' αυτόν δεν θα ευνοούσε την απόσπαση του πρωτονίου απ' τον C(2) αφού το N(4'a) αποκτά και αυτό θετικό φορτίο σε κάποιο στάδιο του καταλυτικού κύκλου [160,162].

Η Gly413 συμμετέχει και αυτή εμμέσως στο σχηματισμό του υλιδίου καθορίζοντας τη σωστή διεύθυνση της ίμινο-ομάδας ως προς τον άξονα του δεσμού H-C(2). Αυτό επιτυγχάνεται με σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλικού της οξυγόνου και της HN(4'a) ομάδας.



Με βάση όλα τα παραπάνω στοιχεία προτείνεται τελικά ότι η N(4'α) ίμινο-ομάδα αποσπά το πρωτόνιο απ' τον C(2) μεταφέροντάς το ταυτόχρονα στο αλκοξείδιο που σχηματίζεται απ' την πυρηνόφιλη προσβολή του πυροσταφυλικού στην TPP, ώστε να εξουδετερωθεί το ένα απ' τα δυο αρνητικά φορτία του ενδιάμεσου και να αποφευχθούν ανεπιθύμητες στεरिकές παρεμποδίσεις. Το δεύτερο αρνητικό φορτίο, αυτό του κάρβοξυ-τμήματος της LTPP (σωματίδιο 2, σχήμα 38), μπορεί να εξουδετερωθεί μέσω σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με το Asp28, Glu477 ή την Tyr290 (HA, σχήμα 38) [44,56,157,158].

β) Εν συνεχεία ακολουθεί αποκαρβοξυλίωση της LTPP οπότε παράγεται το καρβανιόν-εναμίνη (σχήμα 38). Για το στάδιο αυτό προτείνεται [166] ότι δεν απαιτείται συμμετοχή του πρωτεϊνικού τμήματος του ενζύμου, αν εξαιρέσουμε βέβαια την απαιτούμενη χαμηλή διηλεκτρική σταθερά εντός του ενεργού κέντρου ως αποτέλεσμα της ύπαρξης της υδρόφοβης αλυσίδας της Ile415 [44].

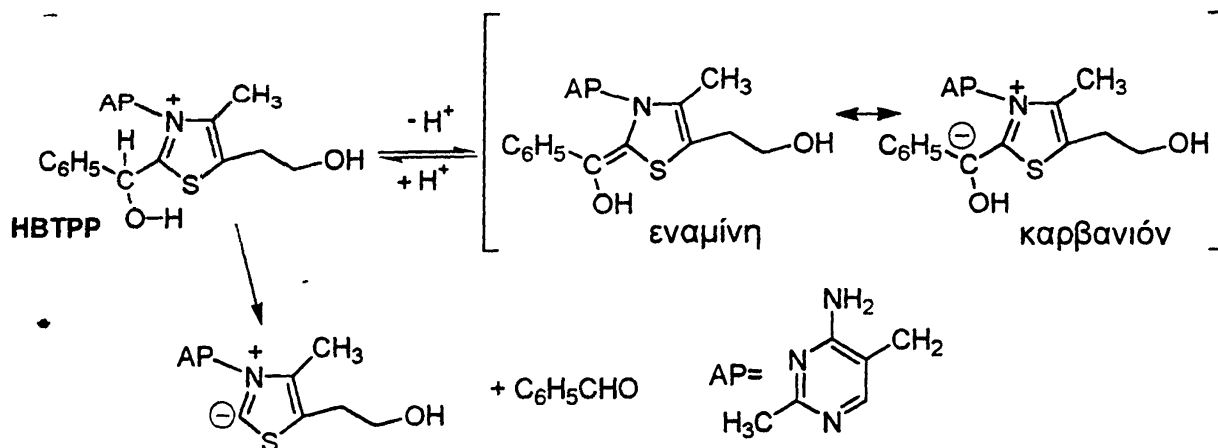
Η εναμίνη που παράγεται κατά την αποκαρβοξυλίωση έχει παρατηρηθεί τόσο σε μη ενζυμικά συστήματα, και συγκεκριμένα στα 2-(α-μέθοξυ-βένζυλ) θειαζολικά άλατα [177] όσο και σε ενζυμικά [78,79,178]. Στην τελευταία περίπτωση ενώσεις του τύπου $X-C_6H_4-CH=CHCOCO_2H$ οι οποίες θεωρούνται απενεργοποιητές της PDC, κατά την αποκαρβοξυλίωση μετατρέπονται σε εναμίνες (σωματίδιο 8, σχήμα 27, σελίδα 38), οι οποίες λόγω της εκτεταμένης συζυγίας απορροφούν στην ορατή περιοχή του ηλεκτομαγνητικού φάσματος και μπορούν να παρατηρηθούν φασματοφωτομετρικά.

Μόλις κατά την περασμένη χρονιά [80,179] έγινε δυνατή η άμεση παρατήρηση της εναμίνης που σχηματίζεται κατά την αλληλεπίδραση της μεταλλαγμένης στη θέση 91 (αντικατάσταση Glu91 με Asp) γPDC με HBTPP, επιβεβαιώνοντας τις αρχικές απόψεις του Breslow σχετικά με την ύπαρξη της εναμίνης ως πιο σταθερού ενδιάμεσου σε σχέση με το καρβανιόν [180]. Η μεταλλαξογένεση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της K_{cat} κατά τέσσερις τάξεις μεγέθους σε σύγκριση με το φυσικό ένζυμο, με αποτέλεσμα η όλη καταλυτική πορεία να είναι πιο αργή και να επιτρέπει την παρατήρηση της εναμίνης εμμέσως, μέσω της απορρόφησής της στα 380nm. Η προσθήκη της HBTPP στο αποένζυμο της μεταλλαγμένης γPDC οδηγεί ταυτόχρονα στο σχηματισμό της εναμίνης λόγω του ιονισμού του H-C(2α) και στη διάσπαση της HBTPP σε TPP και βενζαλδεύδη (σχήμα 39).

Βρέθηκε λοιπόν ότι η εναμίνη μπορεί να σχηματιστεί ακόμα και σε pH=6.0, που με τη σειρά του υποδεικνύει ότι το πρωτεϊνικό περιβάλλον επιφέρει μείωση του pK_a ιονισμού του H-



C(2a) κατά εννέα τάξεις μεγέθους. Αυτό αμέσως μεταφράζεται σε μια επιτάχυνση της ενζυμικής αντίδρασης κατά έναν παράγοντα 10^9 .



Σχήμα 39: Μηχανισμός σχηματισμού της εναμίνης κατά την αλληλεπίδραση του αποενζύμου της γ PDC με την HBTPP [80].

Ο παράγοντας που επιφέρει αυτή τη δραματική αλλαγή προτείνεται ότι είναι η χαμηλή διηλεκτρική σταθερά του ενεργού κέντρου ως συνέπεια της V διαμόρφωσης [80]. Για τη μέτρηση της διηλεκτρικής σταθεράς εντός του ενεργού κέντρου χρησιμοποιήθηκε το πυροφωσφορικό θειόχρωμα του οποίου η ακτινοβολία φθορισμού εξαρτάται απ' το διαλυτικό μέσο. Με σύγκριση του λ_{max} της ακτινοβολίας αυτής εντός της γ PDC και συγκρίνοντας την τιμή με τιμές που προκύπτουν απ' την διάλυση της ουσίας σε μια σειρά πρωτοταγών αλκοολών βρέθηκε ότι στο ενεργό κέντρο η τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς είναι πράγματι χαμηλή (περίπου $\epsilon=13-15$).

γ) Σε αντίθεση με το προηγούμενο βήμα η πρωτονίωση του καρβανιόντος-εναμίνης γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου και συγκεκριμένα είτε απ' την παράπλευρη αλυσίδα ενός όξινο αμινοξέος, όπως αυτά των Asp28 και Glu477 είτε από ένα μόριο H_2O (σχήμα 38). Η αποπρωτονιωμένη μορφή του οξέος επαναπροσλαμβάνει το πρωτόνιο από ένα μόριο νερού ελευθερώνοντας ένα ιόν υδροξυλίου [166].

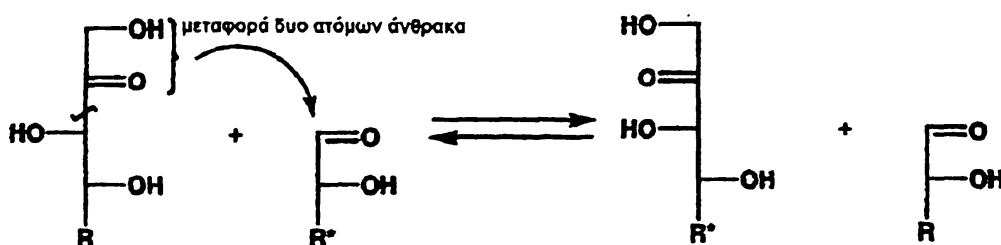
δ) Τέλος για την απελευθέρωση του προϊόντος είναι υπεύθυνη πάλι η 4'α-ίμινο ομάδα η οποία αποσπά το πρωτόνιο απ' την ομάδα H-O(2a) (σχήμα 38). Στο τελευταίο αυτό στάδιο του καταλυτικού κύκλου συμμετέχουν ξανά τα αμινοξέα Asp28, Glu477, His114 και His115 ο ρόλος των οποίων είναι ο ίδιος όπως και στον ιονισμό του C(2).



Π. Τρανσκετολάση (TK).

1. Γενικά στοιχεία.

Το ένζυμο τρανσκετολάση (TK) καταλύει την μεταφορά μιας διϋδροξυ-αίθυλο ομάδας από μια φωσφορική κετόζη σε μια φωσφορική αλδόζη (σχήμα 40).



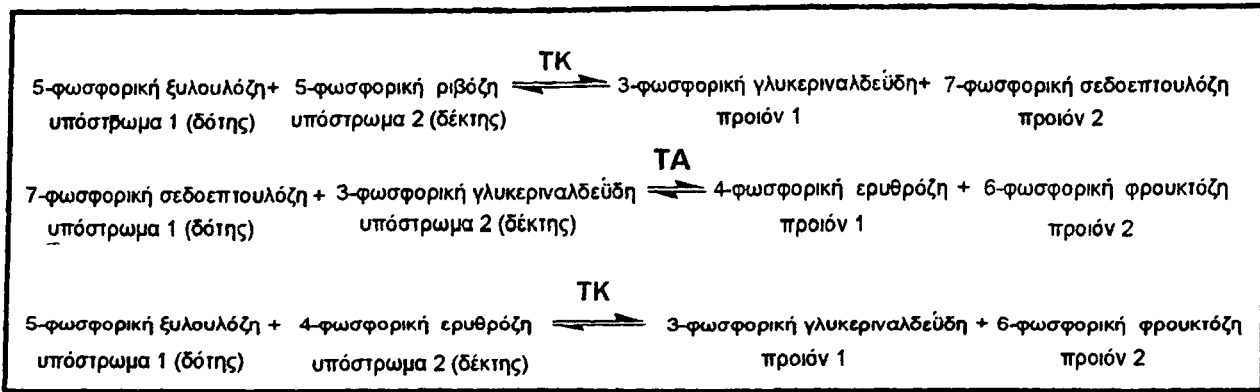
Σχήμα 40: Γενικό σχήμα των αντιδράσεων που καταλύει η τρανσκετολάση.

Η τρανσκετολάση συμμετέχει στο μη οξειδωτικό τμήμα του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών (ΚΦΠ), όπου μαζί με το ένζυμο τρανσαλδολάση (ΤΑ), αποτελούν τον συνδετικό κρῖκο του ΚΦΠ με τη γλυκόλυση. Στα φυτά και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια η TK συμμετέχει στον κύκλο του Calvin ο οποίος έχει σαν αποτέλεσμα την αναγέννηση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης από το 3-φωσφορογλυκερινικό οξύ [5].

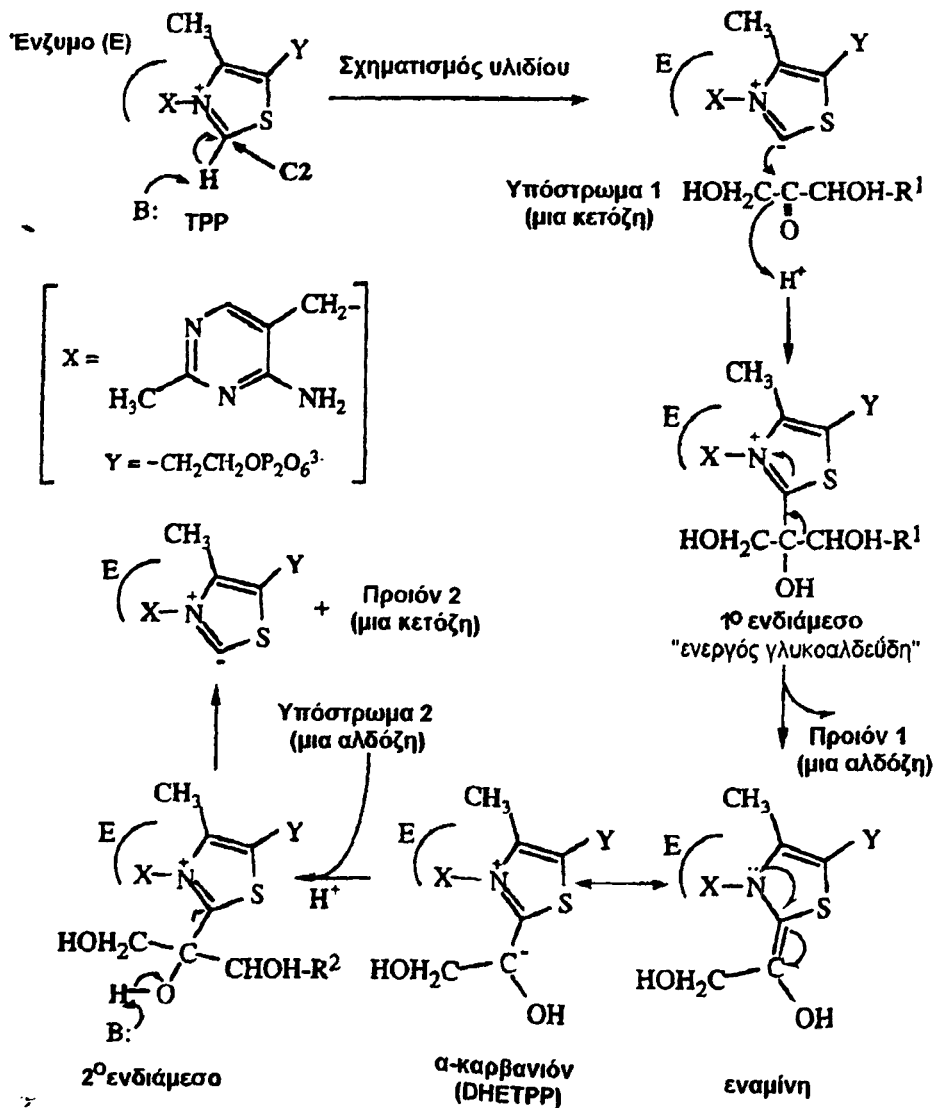
Πιο συγκεκριμένα, η TK καταλύει την μετατροπή της 5-φωσφορικής-D-ξυλουλόζης, και 5-φωσφορικής-D-ριβόζης σε 3-φωσφορική-D-γλυκεριναλδεύδη και 7-φωσφορική-D-σεδοεπτουλόζη. Είναι γνωστό ότι και τα δυο ένζυμα μαζί (ΤΑ και TK) καταλύουν τον σχηματισμό των προϊόντων 6-φωσφορική-D-φρουκτόζη και 4-φωσφορική-D-ερυθρόζη. Η τελευταία αποτελεί ένα σημαντικό υπόστρωμα για την βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων. Επιπλέον η TK καταλύει την μετατροπή της 5-φωσφορικής-D-ξυλουλόζης και 4-φωσφορικής-D-ερυθρόζης σε 3-φωσφορική-D-γλυκεριναλδεύδη και 6-φωσφορική-D-φρουκτόζη (σχήμα 41).

Η τρανσκετολάση λοιπόν, δρά ως μεταφορέας μιας μονάδας δυο ανθράκων με την βοήθεια της TPP ("ενεργός γλυκοαλδεύδη", το 1^ο ενδιάμεσο στο σχήμα 42), ενώ η τρανσαλδολάση μεταφέρει μια μονάδα τριών ανθράκων μέσω του σχηματισμού μιας βάσεως Schiff καθώς δεν απαιτεί συμπράγοντα (συνένζυμο) όπως η TK. Το σάκχαρο το οποίο προσφέρει αυτές τις δυο ή τρεις μονάδες άνθρακα είναι πάντα μια κετόζη (δότης) ενώ αυτό που τις παραλαμβάνει είναι μια αλδόζη (δέκτης). Στο σχήμα 42 παρουσιάζεται ο γενικός μηχανισμός δράσης της TK.





Σχήμα 41: Αντιδράσεις που καταλύουν τα ένζυμα τρασκετολάση (TK) και τρανσαλδολάση (TA).



Σχήμα 42: Γενικός μηχανισμός δράσης της TK (B:= βάση) [181].

Με τον τρόπο αυτό και ανάλογα με τις μεταβολικές ανάγκες του κάθε οργανισμού, ο κύκλος των φωσφορικών πεντοζών παρέχει είτε υποστρώματα για περαιτέρω βιοσύνθεση, ή μεταβολίτες για την διεργασία της γλυκόλυσης [181].

Η ΤΚ έχει απομονωθεί από διάφορες πηγές όπως απ' την ζύμη αρτοποιίας [182], από ανθρώπινα λευκά αιμοσφαίρια [183], από ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια [184], από το βακτήριο *E. Coli* [185], κ.α. Οι περισσότερες φυσικοχημικές και κινητικές μελέτες πάντως, έχουν επικεντρωθεί στο ένζυμο που απομονώνεται από τα ανθρώπινα κύτταρα [186], το μύκητα *S. Cerevisiae* [187-189] καθώς και το βακτήριο *E. Coli* [185].

Η εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, παρουσιάζεται μικρότερη σε τρανσκετολάσες από ζύμες, φυτά και βακτήρια ενώ είναι μεγαλύτερη σ' αυτές των θηλαστικών. Έτσι στην πρώτη περίπτωση σαν σάκχαρα δότες χρησιμοποιούνται η 5-φωσφορική-D-ξυλουλόζη, 7-φωσφορική-D-σεδοεπτουλόζη, 6-φωσφορική-D-φρουκτόζη, 4-φωσφορική-D-ερυθρόζη, η φωσφορική διυδροξυακετόνη, η διυδροξυακετόνη και το ύδροξυ-πυροσταφυλικό οξύ. Σαν σάκχαρα δέκτες χρησιμοποιούνται η 5-φωσφορική-D-ριβόζη, 3-φωσφορική-D-γλυκεριναλδεύδη, 4-φωσφορική-D-ερυθρόζη και η γλυκοαλδεύδη [190]. Στη δεύτερη περίπτωση, της τρανσκετολάσης από θηλαστικά, τα σάκχαρα δότες περιλαμβάνουν την 5-φωσφορική-D-ξυλουλόζη, 6-φωσφορική-D-φρουκτόζη και 7-φωσφορική-D-σεδοεπτουλόζη ενώ δέκτες την 5-φωσφορική-D-ριβόζη, 4-φωσφορική-D-ερυθρόζη και 3-φωσφορική-D-γλυκεριναλδεύδη [183].

Στην μελέτη αυτή θα ασχοληθούμε κυρίως με την τρανσκετολάση (γTK) που απομονώνεται από ζύμη αρτοποιίας (απ' το μύκητα *S. Cerevisiae*). Το ένζυμο αυτό είναι ένα ομοδιμερές με μοριακό βάρος κάθε υπομονάδας του διμερούς περίπου 74 kDa, ενώ κάθε υπομονάδα περιέχει ένα μόριο TPP και ένα ιόν Ca^{2+} [41,42]. Παρόλο που η κρυσταλλογραφική μελέτη του ενζύμου αποδεικνύει ότι και οι δυο θέσεις σύνδεσης της TPP στα ενεργά κέντρα είναι οι ίδιες, κινητικές μελέτες (προσδιορισμός K_m) αποδεικνύουν την μη κινητική ισοδυναμία των δυο ενεργών κέντρων με αποτέλεσμα η σύνδεση του πρώτου μορίου TPP να επιδρά αρνητικά στη σύνδεση του δεύτερου [191]. Αυτή η συνεργατικότητα είχε αποδοθεί στην πιθανή ύπαρξη ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου το οποίο συνδέει τα δυο ενεργά κέντρα μεταξύ τους [42]. Οι παραπάνω κινητικές μελέτες ενισχύουν την υπόθεση αυτή.

Τόσο η σταθερότητα, όσο και η τάση σύνδεσης των συμπαραγόντων (TPP και μεταλλικό ιόν) είναι πολύ μεγαλύτερη σε τρανσκετολάσες που απομονώνονται από κύτταρα θηλαστικών απ' ότι σ' αυτές που απομονώνονται από φυτά, μύκητες ή βακτήρια [180]. Η βέλτιστη τιμή pH στην



οποία παρουσιάζεται το μέγιστο της καταλυτικής δράσης είναι περίπου η ίδια για όλες τις τρανσκετολάσες, $\text{pH}=7.5-7.7$ [180].

Η απομάκρυνση των TPP και Ca^{2+} απ' το ολοένζυμο της γTK γίνεται κάτω από σχετικά ασθενείς αλκαλικές συνθήκες παράγοντας το αποένζυμο. Για την επαναδημιουργία του ολοενζύμου είναι απαραίτητη η παρουσία τόσο της TPP όσο και δισθενών μεταλλικών ιόντων [192]. Η ταχύτητα επανασχηματισμού του ολοενζύμου σε σχέση με το χρησιμοποιούμενο μεταλλικό ιόν αυξάνει κατά τη σειρά $\text{Ni}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$ ενώ η καταλυτική του δραστηριότητα παραμένει η ίδια [192]. Τέλος τα ιόντα του Zn^{2+} και Cu^{2+} δεν μπορούν να επανενεργοποιήσουν το ένζυμο [193].

• Οι τρανσκετολάσες σε αντίθεση με την πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα βιοσυνθέσεων σε βιομηχανική κλίμακα, όπως για παράδειγμα στη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων L-Phe, L-Trp και L-Tyr χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τη D-γλυκόζη. Τα αμινοξέα αυτά εν συνεχεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για την σύνθεση πολυπλοκότερων χημικών ουσιών. Μια σημαντική χρήση της TK ως βιοκαταλύτη είναι η στερεοεξειδίκευση που παρουσιάζει στη σύνθεση του δεσμού άνθρακα-άνθρακα. Συγκεκριμένα, η TK μπορεί να χρησιμοποιήσει ένα ευρύ φάσμα αλδευδών ως υποστρώματα, παρουσιάζει όμως μεγαλύτερη εξειδίκευση για αυτά που περιέχουν μια α-ύδροξυ ομάδα διαμόρφωσης 2R. Τα τελικά προϊόντα είναι κετόζες με θρέο-διαμόρφωση (3S, 4R). Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας ως βιοκαταλύτη την TK από σπανάκι και ως υποστρώματα την 2,3-διυδροξυβουτυραλδεύδη και το ύδροξυ-πυροσταφυλικό οξύ λαμβάνονται ως προϊόντα 6-δέοξυ-D-φρουκτόζη και 6-δέοξυ-L-σορβόζη. Τα τελευταία αποτελούν τις πρώτες ύλες για την σύνθεση της 2,5-διμέθυλο-4-ύδροξυ-3(2H)-φουρανόνης, μιας ουσίας με άρωμα καραμέλας που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων [180].

2. Περιγραφή δομής.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω η τρανσκετολάση που απομονώνεται απ' το μύκητα *S. Cerevisiae* (γTK) είναι ένα διμερές με συνολικό μοριακό βάρος περίπου 128kDa. Υπήρξε το πρώτο ένζυμο θειαμίνης που μπόρεσε να κρυσταλλωθεί και η επίλυση της δομής του παρείχε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο σύνδεσης της TPP σ' αυτά τα ένζυμα καθώς έριξε κάποιο φως στο μηχανισμό της καταλυτικής δράσης [41,42].

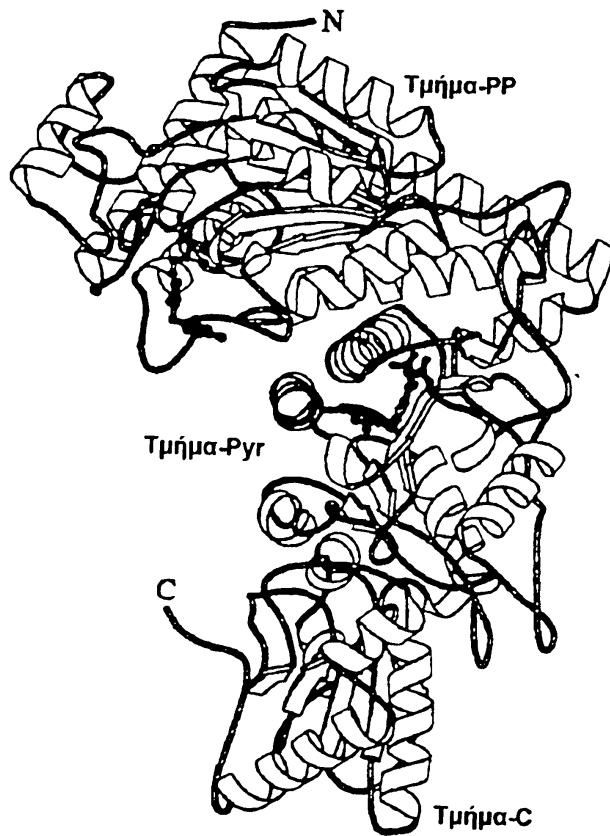


Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τρία τμήματα. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα του N-τελικού άκρου (ή τμήματος PP) αποτελείται από 320 αμινοξέα, ενώ το κεντρικό τμήμα (ή τμήμα P_{ΥΓ}) από τα αμινοξέα 323-538. Τα τμήματα αυτά ονομάζονται PP ή P_{ΥΓ} γιατί είναι υπεύθυνα για την σύνδεση της πυροφωσφορικής ομάδας ή του πυριμιδινικού δακτυλίου της TPP αντίστοιχα (σχήμα 43). Τέλος το C-τελικό τμήμα αποτελείται απ' τα αμινοξέα 539-680 και το χαρακτηριστικό του είναι ότι δεν συμμετέχει καθόλου στην σύνδεση του συνενζύμου [194].

Το διμερές (σχήμα 44) σχηματίζεται μέσω ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των τμημάτων P_{ΥΓ} και PP των δυο υπομονάδων, ενώ τα δύο μόρια του συνενζύμου και τα δύο ιόντα Ca²⁺ βρίσκονται στην περιοχή μεταξύ των δυο υπομονάδων έτσι ώστε το καθένα να αλληλεπιδρά με αμινοξέα απ' το τμήμα -PP της μιας υπομονάδας και με αμινοξέα απ' το τμήμα-P_{ΥΓ} της άλλης (σχήμα 45) [194]. Το χαρακτηριστικό της διαχωριστικής περιοχής μεταξύ των δυο υπομονάδων είναι ότι αυτή περιέχει έναν ορισμένο αριθμό καναλιών και κοιλοτήτων οι οποίες δεν είναι προσβάσιμες από μόρια του διαλύτη. Τα κανάλια αυτά περιέχουν πολλά μόρια γλουταμικού οξέος (Glu418, Glu162, Glu167) που στην ουσία δημιουργούν ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου, στο οποίο εμπλέκονται και τα μόρια της TPP μέσω των N(1'). Οι παράπλευρες αλυσίδες των Glu πρέπει να είναι πρωτονιωμένες ακόμα και σε υψηλό pH αφού περιβάλλονται απ' την πρωτεΐνη και είναι τελείως απομονωμένες απ' το διαλύτη. Έχει προταθεί ότι ο ρόλος αυτού του δικτύου συνίσταται στη μεταφορά πρωτονίων μεταξύ των δυο ενεργών κέντρων έτσι ώστε το κάθε μόριο TPP να 'αισθάνεται' την κατάσταση στην οποία βρίσκεται το άλλο [194]. Παρόλα αυτά κατά τη διάρκεια της κατάλυσης δεν έχει παρατηρηθεί συνεργατική συμπεριφορά των δυο ενεργών κέντρων, παρά μόνο κατά την διαδικασία σχηματισμού του ολοενζύμου [194].

Η δομή του αποενζύμου είναι περίπου παρόμοια μ' αυτή του ολοενζύμου [195]. Η μόνη διαφορά έγκειται στην ύπαρξη δυο πεπτιδικών αλυσίδων (187-198 και 383-393) οι οποίες παρουσιάζονται πιο ευκίνητες στο αποένζυμο απ' ότι στο ολοένζυμο. Με μελέτες κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης των αμινοξέων αυτών των αλυσίδων αποδείχθηκε ότι κατά το σχηματισμό τῶν ολοενζύμου αυτές διπλώνουν γύρω απ' τα μόρια του συνενζύμου θωρακίζοντας τα απ' το διαλύτη [196]. Σημαντικός είναι και ο ρόλος του Glu162 αφού έχει αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητο για τη δημιουργία των σταθερών διμερών μορφών της γTK [196].

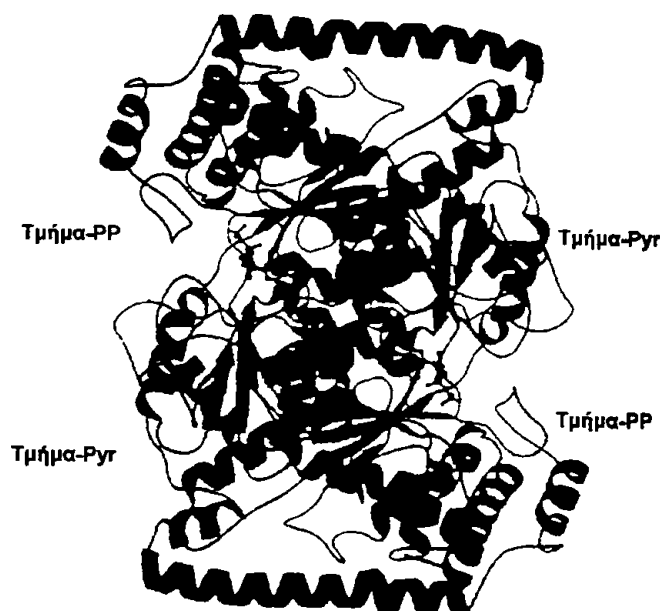




Σχήμα 43: Δομή υπομονάδας της γ TK. Διακρίνονται τα τμήματα-PP, Pyr και C καθώς και τα δυο μόρια του συνεχζύμου [194].



Σχήμα 44: Δομή του διμερούς της γ TK [194].



Σχήμα 45: Αλληλεπιδράσεις των δυο μορίων TPP με τα τμήματα PP και Pyr των δυο υπομονάδων [194].

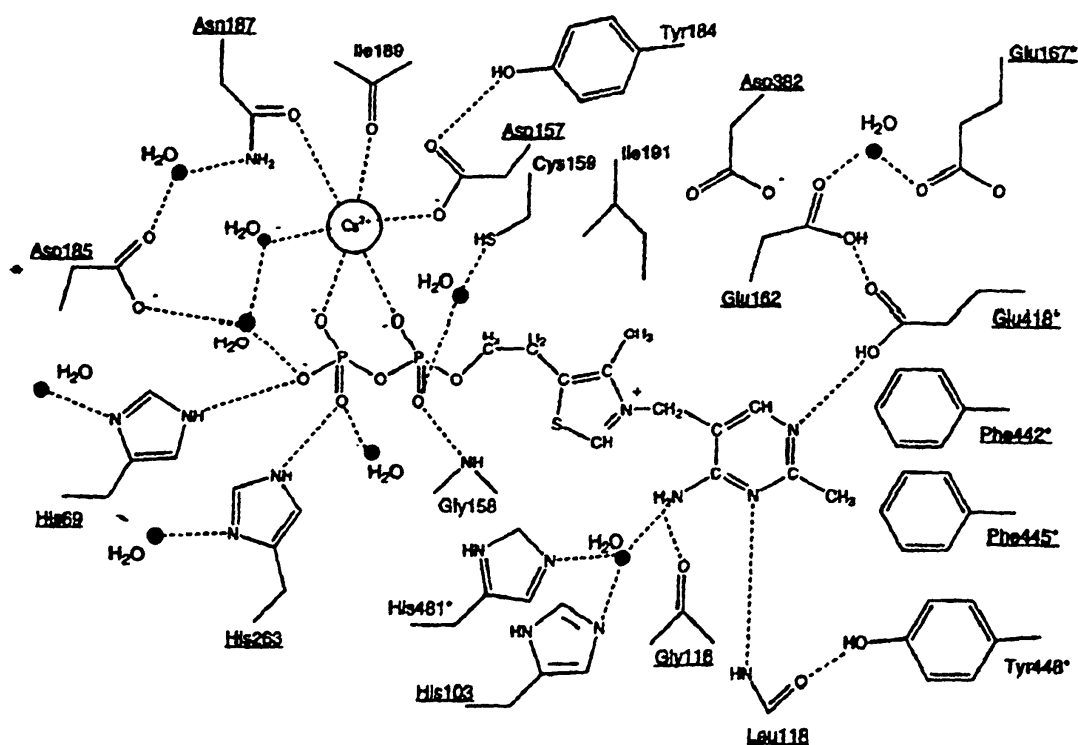
Το συνένζυμο (TPP) όπως έχουμε πεί, περιβάλλεται απ' την πρωτεΐνη με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε το μόνο άτομο του μορίου που είναι προσβάσιμο απ' το διαλύτη στο ενεργό κέντρο να είναι ο C(2) του θειαζολίου. Η διαμόρφωση της TPP είναι και εδώ η V, γεγονός που συνεπάγεται μια απόσταση της τάξης των 3.1 Å μεταξύ των ατόμων C(2) και N(4'α). Στο επόμενο σχήμα (σχήμα 46) παρουσιάζεται η δομή του ενεργού κέντρου της γTK [194].

Η πυροφωσφορική ομάδα αλληλεπιδρά με το ένζυμο είτε έμμεσα μέσω δεσμών υδρογόνου είτε άμεσα μέσω του οκταεδρικά ενταγμένου ιόντος Ca^{2+} . Οι επιπλέον θέσεις ένταξης του ιόντος Ca^{2+} καταλαμβάνονται απ' τις παράπλευρες αλυσίδες των Asp157 και Asn187, από το καρβονυλικό οξυγόνο της Ile189 και από ένα μόριο H_2O . Τα δυο πρώτα αμινοξέα αποτελούν μέρος του κοινού δομικού μοτίβου όλων των ενζύμων θειαμίνης που εμπλέκονται στην σύνδεση της TPP.

Ο θειαζολικός δακτύλιος αλληλεπιδρά (υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις) με αμινοξέα και των δυο υπομονάδων. Κοντά σ' αυτόν βρίσκεται η παράπλευρη αλυσίδα του Asp382 το οποίο εκτός απ' τη συμμετοχή του στη σταθεροποίηση της κλειστής μορφής των αλυσίδων που διπλώνουν γύρω απ' την TPP στο ολοένζυμο, πιστεύεται ότι εξουδετερώνει επίσης μερικά το θετικό φορτίο του N(3) του θειαζολίου [194]. Ο πυριμιδινικός δακτύλιος βρίσκεται εντός ενός υδρόφοβου θυλακίου που σχηματίζεται από τις παράπλευρες αλυσίδες των Phe442, Phe445 και Tyr448 ενώ παράλληλα αλληλεπιδράσεις συσώρευσης (stacking interactions) παρατηρούνται μεταξύ του



φαινυλικού δακτυλίου της Phe445 και του πυριμιδινικού δακτυλίου [194]. Δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του N(4'a) και του καρβονυλικού οξυγόνου της Gly116, του N(3) και του πεπτιδικού αζώτου της Leu118 και τέλος μεταξύ του N(1') και του Glu418 [41,42].



Σχήμα 46: Δομή ενεργού κέντρου της γTK. Τα αμινοξέα με αστερίσκο ανήκουν σε διαφορετική υπομονάδα του ενζύμου [194].

3. Μελέτες του ρόλου των αμινοξέων που εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο.

Απ' την κρυσταλλική δομή της γTK διαπιστώνεται ότι κανένα αμινοξύ δεν βρίσκεται αρκετά κοντά στο άτομο C(2) ώστε να δράσει ως βάση αποσπώντας το πρωτόνιο. Ο σχηματισμός του υλιδίου ως εκ τούτου θα πρέπει να γίνεται με τη βοήθεια του N(4'a). Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της παράπλευρης αλυσίδας του Glu418 και του N(1') είναι απαραίτητος για το σχηματισμό της ίμινο ταυτομερούς μορφής του πυριμιδινικού δακτυλίου όπως έχουμε δει σε ανάλογη περίπτωση στο ένζυμο γPDC. Η 4'a-αμινομάδα μετατρέπεται σε ίμινο ομάδα και είναι αυτή που αποσπά το πρωτόνιο. Ισχυρή ένδειξη για τη σπουδαιότητα αυτού του δεσμού έδωσαν μελέτες αντικατάστασης του Glu418 με Gln ή Ala. Τα μεταλλαγμένα ένζυμα που προέκυψαν ενώ είχαν συγκρίσιμες τιμές K_m σε σχέση με το φυσικό ένζυμο η καταλυτική τους δραστηριότητα ήταν κατά

πολύ μικρότερη (2% και 0.1% αντίστοιχα) [187]. Επομένως το αμινοξύ αυτό εμπλέκεται στη διεργασία της κατάλυσης και όχι στην σύνδεση του συνενζύμου. Έγιναν μετρήσεις της σταθεράς ταχύτητας ανταλλαγής του υδρογόνου H-C(2) στο φυσικό ένζυμο, στο μεταλλαγμένο με Ala στη θέση 481, καθώς και σε ένζυμα που περιείχαν ως συνένζυμο την απαμινωμένη μορφή της TPP ή ένα παράγωγο της TPP στο οποίο το N(1') απουσιάζει και έδωσαν τα εξής συμπεράσματα [176]:

α) Στο φυσικό ένζυμο η ταχύτητα αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη απ' την καταλυτική σταθερά K_{cat} υποδεικνύοντας ότι ο σχηματισμός υλιδίου δεν είναι το αργό και καθοριστικό στάδιο της συνολικής ταχύτητας.

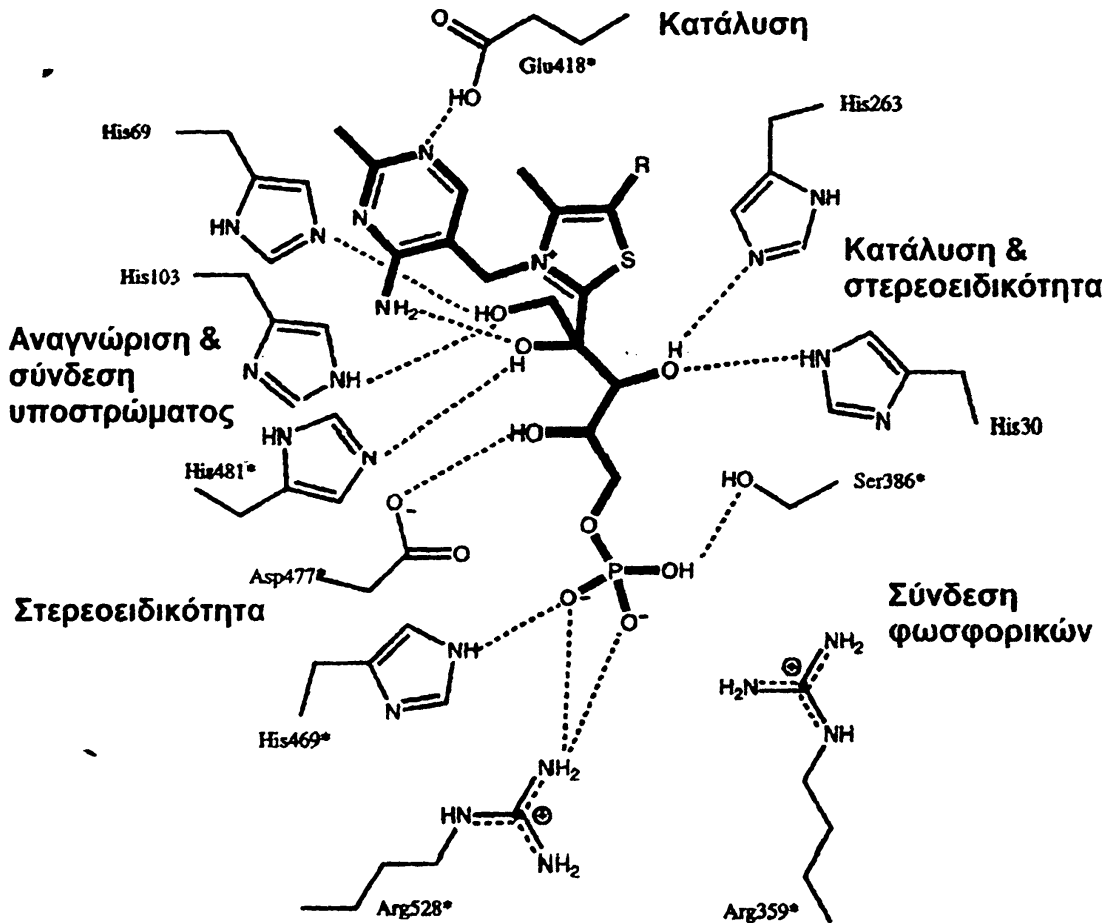
β) Τόσο στο μεταλλαγμένο ένζυμο όσο και σ' αυτά που προέρχονται με ανάμιξη του αποενζύμου με τα παραπάνω παράγωγα της TPP οι ταχύτητες ανταλλαγής ήταν πολύ μικρές (στις δυο τελευταίες περιπτώσεις μικρότερες και απ' την αντίστοιχη της TPP απουσία ενζύμου) αποδεικνύοντας την αναγκαιότητα και του δεσμού υδρογόνου Glu418...N(1') και την σπουδαιότητα των N(1') και N(4'α).

Οι ταχύτητες ανταλλαγής H/D αντανακλούν τουλάχιστον στην περίπτωση της TPP, μόνο την επίδραση του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος και όχι την πιο εύκολη πρόσβαση (μέσω του διαλύτη) της βάσης που αποσπά το πρωτόνιο καθώς κρυσταλλογραφικές μελέτες τόσο σε μεταλλαγμένα ένζυμα, όσο και σ' αυτά που περιέχουν ανάλογα του συνενζύμου, απέδειξαν ότι δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές διαμόρφωσης [187, 197].

Πολύ σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά το ρόλο των αμινοξέων του ενεργού κέντρου στην όλη καταλυτική διεργασία έδωσε επίσης η επίλυση της κρυσταλλικής δομής του μικτού συμπλέγματος του ολοενζύμου της γTK με το υπόστρωμα-δέκτη (προϊόν), την 4-φωσφορική ερυθρόζη. Πιο συγκεκριμένα το ολοένζυμο αναμείχθηκε με το υπόστρωμα-δότη, την 6-φωσφορική φρουκτόζη, η ενζυμική σχάση της οποίας κατά την διεργασία της κρυστάλλωσης είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή της 4-φωσφορικής ερυθρόζης και τη συγκράτηση της στο ενεργό κέντρο [198]. Είναι η πρώτη κρυσταλλική δομή στην οποία ένα ολοένζυμο θειαμίνης κρυσταλλώνει μαζί και το προϊόν της καταλυτικής πορείας, αν και το τελευταίο δεν βρίσκεται συνδεδεμένο με τον C(2) του θειαζολίου αλλά απλώς συγκρυσταλλώθηκε με την TPP στο ενεργό κέντρο.

Βασιζόμενοι σ' αυτή την δομή οι G. Schneider και Y. Lindqvist [194] πρότειναν ένα μοντέλο σύνδεσης του πραγματικού ενδιάμεσου της καταλυτικής διεργασίας του παρόντος συστήματος και το οποίο παρουσιάζεται στο επόμενο σχήμα (σχήμα 47).





Σχήμα 47: Προτεινόμενος τρόπος σύνδεσης του υποστρώματος δότη, της 4-φωσφορικής ερυθρόζης με το ενεργό κέντρο της γ TK [194].

Ξεκινώντας απ' τα αμινοξέα His69 και His103 παρατηρούμε ότι αλληλεπιδρούν με την υδροξυλομάδα του ατόμου C(1) του υποστρώματος σταθεροποιώντας με τον τρόπο αυτό το ενδιάμεσο. Αντικατάστασή τους με Ala οδηγεί σε μεταλλαγμένα ένζυμα στα οποία ενώ οι τιμές K_m είναι οι ίδιες με το φυσικό ένζυμο όσον αφορά το υπόστρωμα-δέκτη την 5-φωσφορική ριβόζη, οι αντίστοιχες τιμές για το υπόστρωμα δότη, την 5-φωσφορική-ξυλουλόζη παρουσιάζονται σημαντικά αυξημένες. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ως πιο πιθανό ρόλο αυτών των αμινοξέων την αναγνώριση και σταθερή σύνδεση του υποστρώματος δότη μέσω δεσμών υδρογόνου.

Είναι γνωστό ότι η τρανσκετολάση μπορεί να χρησιμοποιήσει ως υπόστρωμα-δότη και το υδροξυ-πυροσταφυλικό οξύ ($\text{HOCH}_2\text{COCO}_2\text{H}$) [199] ενώ δεν μπορεί να κάνει το ίδιο με το πυροσταφυλικό. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην αναγνώριση του υδροξυλίου του δότη απ' τις παράπλευρες ομάδες των δυο ιστιδινών. Αντικατάστασή τους με υδρόφοβα αμινοξέα έχει ως αποτέλεσμα την μερική αναγνώριση και χρήση του πυροσταφυλικού ως υποστρώματος [193].



Τέλος η σημαντική μείωση της καταλυτικής δραστικότητας ως αποτέλεσμα των παραπάνω μεταλλαξογενέσεων, αποδίδει και καταλυτικό ρόλο σ' αυτά τα αμινοξέα. Το πιο πιθανό είναι να συνεισφέρουν στη διατήρηση της βέλτιστης διευθέτησης του υποστρώματος και των ενδιάμεσων.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 47 οι παράπλευρες ομάδες των αμινοξέων Arg359, Arg528 και His469 βρίσκονται πολύ κοντά στη φωσφορική ομάδα του υποστρώματος και αλληλεπιδρούν μ' αυτή. Αντικατάστασή τους με αλανίνη οδηγεί σε μεταλλαγμένα ένζυμα τα οποία ενώ παρουσιάζουν συγκρίσιμες τιμές K_{cat} σε σχέση με το φυσικό ένζυμο, οι τιμές K_m για φωσφορικά υποστρώματα όπως η 5-φωσφορική ριβόζη παρουσιάζονται σημαντικά αυξημένες [198]. Οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα αμινοξέα αυτά ευθύνονται για τη σταθερή σύνδεση της φωσφορικής ομάδας του υποστρώματος και ερμηνεύουν το γεγονός γιατί μη φωσφορικά σάκχαρα δεν αποτελούν καλά υποστρώματα για το ένζυμο [194].

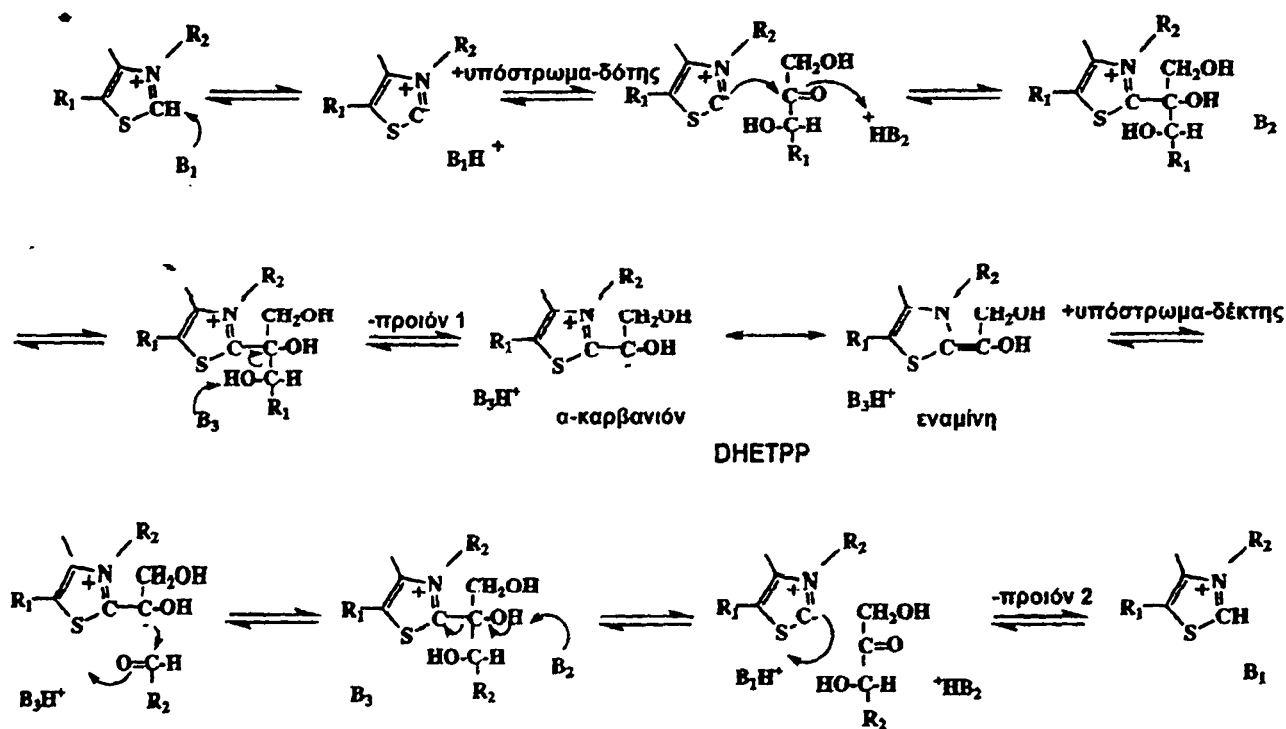
Η τρανσκετολάση μπορεί να αντιδράσει με μια ευρεία ποικιλία υποστρωμάτων που περιέχουν έναν σκελετό ανθράκων από 3 μέχρι 7 άτομα. Το γεγονός αυτό πρέπει να οφείλεται στην αρχιτεκτονική του καναλιού σύνδεσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Πιο συγκεκριμένα, το καρβόνυλο άκρο του υποστρώματος πρέπει να πλησιάσει το άτομο C(2) του θειαζολίου ή τον α-άνθρακα του ενδιάμεσου δϋδροξυ-αίθυλ-TPP (DHETPP). Λόγω των διαφορών στο μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, η θέση της φωσφορικής ομάδας θα είναι και αυτή διαφορετική κάθε φορά. Παρόλα αυτά η ύπαρξη των αμινοξέων που ευθύνονται για την σύνδεσή της στην είσοδο του καναλιού, διευκολύνει την προσέγγιση του υποστρώματος ανεξάρτητα απ' το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. Επιπλέον οι εύκαμπτες παράπλευρες ομάδες των δυο μορίων αργινίνης μπορούν να κινηθούν κατάλληλα ώστε το υπόστρωμα να προσαρμοστεί στο ενεργό κέντρο [194].

Ένα άλλο σημαντικό αμινοξύ που εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο είναι το Asp477. Αυτό βρίσκεται μεταξύ της θέσης σύνδεσης των φωσφορικών του υποστρώματος και του C(2) της TPP και σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την α-ϋδροξυ-ομάδα της 4-φωσφορικής ερυθρόζης (σχήμα 47). Όπως αναφέρθηκε στην αρχή της μελέτης αυτής οι αντιδράσεις που καταλύουν οι τρανσκετολάσες παρουσιάζουν στερεοεξειδίκευση. Συγκεκριμένα το ένζυμο δείχνει μεγαλύτερη προτίμηση για υποστρώματα-δότες με D-θρέο διαμόρφωση και υποστρώματα-δέκτες με C(2)-D διαμόρφωση [199]. Αντικαθιστώντας το Asp477 με Ala ή χρησιμοποιώντας μια σειρά υποστρωμάτων με C(2)-L διαμόρφωση βρέθηκε ότι οι τιμές K_{cat}/K_m παρουσιάζονται πολύ μειωμένες τόσο στο μεταλλαγμένο ένζυμο όσο και στο φυσικό. Τα δεδομένα αυτά αποδίδουν ως πιο πιθανό ρόλο αυτού του αμινοξέος τον προσδιορισμό της εναντιοεκλεκτικότητας στην τρανσκετολάση [200].



4. Τελικά συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό καταλυτικής δράσης της τρανσκετολάσης.

Οι G. Schneider και Y. Lindqvist βασιζόμενοι σε μελέτες όπως αυτές που εκτέθηκαν πιο πάνω, πρότειναν έναν μηχανισμό για την καταλυτική δράση της τρανσκετολάσης ο οποίος παρουσιάζεται στο σχήμα 48 [194]. Το πρώτο μέρος της καταλυτικής αντίδρασης συνίσταται στην σχάση του δεσμού C(2)-C(3) του υποστρώματος-δότη με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας αλδόζης (προϊόν 1) και του α-καρβανιόντος (ή της εναμίνης) της α,β-διύδροξυ-αίθυλ πυροφωσφορικής θειαμίνης (DHETPP).



Σχήμα 48: Προτεινόμενος μηχανισμός καταλυτικής δράσης της τρανσκετολάσης [194].

Στο δεύτερο μέρος το υποστρώμα-δέκτης υφίσταται πυρηνόφιλη προσβολή απ' το καρβανιόν της DHETPP με αποτέλεσμα την παραγωγή μιας κετόζης, της οποίας ο ανθρακικός σκελετός έχει αυξηθεί κατά δυο άτομα άνθρακα.

Ποιά αμινοξέα του ενεργού κέντρου συμμετέχουν σ' αυτές τις διεργασίες; Η βάση που αποσπά το πρωτόνιο απ' τον C(2) (B₁ σχήμα 48) είναι η 4'α-ίμινο ομάδα της TPP. Η ταχύτητα της αντίδρασης αποπρωτονίωσης επιταχύνεται τόσο λόγω της V διαμόρφωσης με τα άτομα C(2) και



N(4'α) να βρίσκονται κοντά (3.1Å), όσο και λόγω της πρωτονίωσης του N(1') απ' το Glu418, σταθεροποιώντας την ίμινο ταυτομερή μορφή του πυριμιδινικού δακτυλίου.

Μετά τη δημιουργία του υλιδίου ακολουθεί πυρηνόφιλη προσβολή του στον καρβόνυλο άνθρακα του υποστρώματος-δότη. Κατά την αντίδραση αυτή παράγεται ένα αλκοξείδιο το αρνητικό φορτίο του οποίου πρέπει να σταθεροποιηθεί. Τον ρόλο αυτό μπορούν να τον αναλάβουν δυο ομάδες. Είτε η φορτισμένη θετικά 4'α-ίμινο ομάδα είτε η παράπλευρη αλυσίδα της His481.

Μελέτες προσδιορισμού της αμινοξικής αλληλουχίας πολλών ενζύμων τρανσκετολάσης [201] έδειξαν ότι το αμινοξύ αυτό δεν διατηρείται στη θέση 481, γεγονός που υποδεικνύει μάλλον τη μη συμμετοχή του στην καταλυτική αντίδραση. Παρόλο ότι η His481 δεν συμμετέχει άμεσα στην καταλυτική αντίδραση, έχει μια μικρή συνεισφορά στην σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης όπως υπέδειξαν μελέτες κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης στο ένζυμο yTK [202]. Συνοψίζοντας, οι βάσεις B₁ και B₂ του σχήματος 48 είναι η 4'α-ίμινο ομάδα.

Στο επόμενο βήμα απαιτείται η απόσπαση πρωτονίου απ' την ομάδα C(3)-OH του υποστρώματος-δότη. Για στερεοχημικούς λόγους αυτό δεν είναι δυνατό να επιτευχθεί απ' την ίμινο ομάδα. Οι παράπλευρες αλυσίδες των His30 και His263 βρίσκονται πολύ κοντά στην C(3)-ύδροξο ομάδα και σχηματίζουν μ' αυτήν δεσμούς υδρογόνου όπως φαίνεται στο σχήμα 47.

Τόσο οι κρυσταλλογραφικές όσο και οι μελέτες κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης σ' αυτές τις θέσεις υποδεικνύουν ότι τα αμινοξέα αυτά μπορούν να αναλάβουν το ρόλο πρωτονιοδότη ή πρωτονιοδέκτη (βάση B₃-σχήμα 48). Έχει προταθεί μάλιστα ότι κατά τη διάρκεια αυτού του τμήματος της κατάλυσης δρουν συνεργατικά [202]. Πιο συγκεκριμένα, το ιμιδαζόλιο της His263 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την πυροφωσφορική ομάδα της TPP και έτσι το δεύτερο άτομο αζώτου του δακτυλίου το οποίο δεν είναι πρωτονιωμένο στο pH της αντίδρασης, pH=7.6, έχει την κατάλληλη διευθέτηση ώστε να αποσπάσει το πρωτόνιο απ' την ομάδα HO-C(3). Η His30 επιταχύνει την απόσπαση αυτή σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με το άτομο οξυγόνου της παραπάνω ομάδας (σχήμα 47) με αποτέλεσμα α) το βέλτιστο προσανατολισμό αυτής της ομάδας και β) τη σταθεροποίηση του αρνητικού φορτίου που αναπτύσσεται κατά τη μεταβατική κατάσταση [202].

Το αποτέλεσμα της απόσπασης αυτής είναι η δημιουργία του καρβανιόντος ή της εναμίνης της DHETPP, η οποία είναι και το κύριο ενδιάμεσο της καταλυτικής δράσης της τρανσκετολάσης. Πρόσφατα έχει αποδειχθεί ότι η DHETPP μπορεί να δράσει ως υπόστρωμα δότης στην yTK, και μάλιστα η ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης είναι η ίδια μ' αυτή των φυσικών υποστρωμάτων [203,204]. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι όπως και στην περίπτωση της yPDC, ο σχηματισμός



του καρβανιόντος ή της εναμίνης δεν είναι το αργό και καθοριστικό στάδιο για τη συνολική αντίδραση. Η απελευθέρωση του προϊόντος 1 (σχήμα 48) και η ακόλουθη προσβολή του καρβανιόντος στο υπόστρωμα-δέκτη προϋποθέτει ότι το ενεργό κέντρο θα είναι εύκολα προσβάσιμο απ' το διαλύτη. Με βάση τη λογική αυτή, δεν έχει εξηγηθεί ακόμα μέχρι σήμερα το πώς το ένζυμο σταθεροποιεί το καρβανιόν ή την εναμίνη, έτσι ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη αντίδραση πρωτονίωσής τους που θα προκαλούσε και τον τερματισμό της καταλυτικής δράσης [205].

Ολοκληρώνοντας, η προσβολή του καρβανιόντος στο υπόστρωμα-δέκτη παράγει ένα αλκοξείδιο το οποίο σταθεροποιείται (πρωτονιώνεται) απ' την φορτισμένη θετικά παράπλευρη ομάδα της His263. Τα δυο τελευταία στάδια του καταλυτικού μηχανισμού (αποπρωτονίωση της ομάδας HO-C(2) του προϊόντος, αποδέσμευσή του και αναγέννηση της TPP) ακολουθούν τον ίδιο μηχανισμό όπως και τα αρχικά στάδια, με συμμετοχή της 4'α-ίμινο ομάδας στο ρόλο του πρωτονιοδέκτη ή πρωτονιοδότη αντίστοιχα [194].



B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

I. Γενικά.

Όπως αναφέραμε ήδη, τα τελευταία 60 χρόνια τόσο ο μηχανισμός της μη ενζυμικής όσο και ο μηχανισμός της ενζυμικής κατάλυσης έχει διερευνηθεί σε μεγάλο βαθμό. Στην τελευταία περίπτωση η επίλυση των κρυσταλλικών δομών ενζυμικών συστημάτων που περιείχαν είτε την TPP συνδεδεμένη [41-46] είτε το σύμπλεγμα ολοενζύμου-προϊόντος [198], συνέβαλαν κατά πολύ στον εμπλουτισμό των γνώσεων μας σχετικά με τον καταλυτικό μηχανισμό και ειδικότερα το ρόλο κάθε τμήματος του συνενζύμου σ' αυτόν.

Παρόλα αυτά, θα πρέπει να επισημάνουμε ότι οι μελέτες αυτές περιορίζονται στην κατάσταση του ενζύμου είτε στην αρχή είτε στο τέλος της καταλυτικής δράσης. Πιο συγκεκριμένα, τα ένζυμα αυτά ποτέ δεν κρυσταλλώθηκαν παρουσία ενός ενδιάμεσου της καταλυτικής πορείας, ούτε έχει βρεθεί τρόπος παρατήρησης των ενδιαμέσων αυτών όσον αφορά τη σταθερότητα και τη διαμόρφωσή τους κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου. Έτσι, προσπάθειες κρυστάλλωσης του ολοενζύμου παρουσία ενός υποστρώματος οδηγεί είτε ξανά στο ίδιο το ολοένζυμο, είτε στην απλή συγκρυστάλλωσή του με το τελικό προϊόν της καταλυτικής αντίδρασης όπως έγινε τελευταία [198]. Όσον αφορά την έμμεση παρατήρηση των ενδιαμέσων, αυτό έχει επιτευχθεί μόνο στην περίπτωση της εναμίνης [78-80,177-179]. Τα μόνα συμπεράσματα που υπάρχουν σχετικά με την διαμόρφωση και τη σταθερότητα των ενδιαμέσων κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου προέρχονται από μελέτες μοριακής μηχανικής οι οποίες κατά περίπτωση μπορούν να θεωρηθούν προσεγγιστικές μόνο.

Ο ρόλος των διαφόρων τμημάτων της TPP στην κατάλυση έχει διερευνηθεί με επιτυχία. Είναι επίσης γνωστό ότι η παρουσία μεταλλικών ιόντων όπως αυτά των Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} είναι απαραίτητη τόσο για την ενζυμική όσο και για τη μη ενζυμική καταλυτική δράση. Μέχρι σήμερα έχει προταθεί ότι ο μοναδικός ρόλος των μεταλλικών ιόντων συνίσταται στην σταθερή σύνδεση του συνενζύμου με το αποένζυμο [64,88,89,192,193,195]. Δεν μπορούμε όμως να αποκλείσουμε και πιθανό καταλυτικό τους ρόλο αφού το τί ακριβώς συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ενζυμικής δράσης δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

Από μελέτες μοριακής μηχανικής και κρυσταλλογραφικά δεδομένα πρωτεϊνών απουσία υποστρώματος όπως προαναφέρθηκαν, προτείνεται ότι η διαμόρφωση τόσο της TPP όσο και των ενδιαμέσων της καταλυτικής δράσης εντός των ενζύμων θειαμίνης πρέπει να είναι η V. Σε



αντίθεση με τα παραπάνω, όλα σχεδόν τα παράγωγα ή σύμπλοκα “ενεργού αλδεϋδης” της θειαμίνης υιοθετούν την S διαμόρφωση. Αυτά τα παράγωγα ή σύμπλοκα “ενεργού αλδεϋδης” αν και αποτελούν καλά μοντέλα των ενδιάμεσων της καταλυτικής διεργασίας, αγνοούν όμως τον σημαντικό παράγοντα που είναι το πρωτεϊνικό περιβάλλον του ενζύμου. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι τόσο ο ρόλος των δισθενών μεταλλικών ιόντων όσο και η διαμόρφωση που υιοθετεί η TPP κατά τη διάρκεια της ενζυμικής δράσης είναι σημεία που δεν είναι απόλυτα ξεκαθαρισμένα.

Τα τελευταία 10 χρόνια η ερευνητική μας ομάδα έχει ασχοληθεί με αλληλεπιδράσεις μεταλλικών ιόντων με παράγωγα “ενεργού αλδεϋδης” της θειαμίνης. Το κυριότερο συμπέρασμα απ’ τις μελέτες αυτές είναι ο ευκολότερος σχηματισμός αυτών των συμπλόκων και το γεγονός ότι διατηρούν την S διαμόρφωση και στη στερεά φάση και σε διάλυμα [58,72,120,124-129]. Για τους παραπάνω λόγους προτάθηκε ότι τα μεταλλικά ιόντα πιθανόν να επεμβαίνουν μετά τον σχηματισμό των παραγώγων “ενεργού αλδεϋδης” κατά την ενζυμική δράση. Συνεχίζοντας τις προσπάθειες μας σ’ αυτό το πεδίο συνθέσαμε και μελετήσαμε σύμπλοκα της 2-(α-υδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορικής θειαμίνης (HETPP) με Cu^{2+} , Zn^{2+} και Cd^{2+} , σύμπλοκα της πυροφωσφορικής θειαμίνης (TPP) με Zn^{2+} και Cd^{2+} καθώς και μικτά σύμπλοκα του τύπου HETPP- M^{2+} -Asp-Asp-Asn-Lys-Ile (M= Cu, Zn, Cd). Οι λόγοι επιλογής τόσο των συγκεκριμένων μεταλλοϊόντων όσο και των υποκαταστατών παραθέτονται αμέσως μετά.

II. Επιλογή των μετάλλων.

Η αναγκαιότητα της ύπαρξης μεταλλικών ιόντων κατά την καταλυτική διεργασία έχει ήδη συζητηθεί. Τα ιόντα Cd^{2+} και Zn^{2+} ανήκουν στην II_b ομάδα του περιοδικού συστήματος και η ηλεκτρονιακή τους δομή της εξωτερικής στοιβάδας είναι η $(n-1)d^{10} ns^2$. Τα d τροχιακά τους είναι λοιπόν συμπληρωμένα και για αυτό το λόγο μοιάζουν ως προς τις ιδιότητές τους με αυτά των αλκαλικών γαιών (Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra) με ηλεκτρονιακή δομή ns^2 . Έτσι, οι ιονικές ακτίνες των Zn^{2+} και Cd^{2+} (των 0.74 και 0.95 Å αντίστοιχα) είναι αρκετά συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες των Mg^{2+} και Ca^{2+} (των 0.72 και 1.00 Å αντίστοιχα) για την περίπτωση οκταεδρικής ένταξης. Η οξειδωτική βαθμίδα των παραπάνω στοιχείων είναι μόνο η +2 με αριθμό ένταξης πιο συχνά 4 (τετραεδρική γεωμετρία) αλλά και 6 (οκταεδρική γεωμετρία) [206]. Η απουσία σταθεροποίησης λόγω πεδίου υποκαταστατών, λόγω των πλήρη d τροχιακών έχει ως αποτέλεσμα τον πιο εύκολο σχηματισμό συμπλόκων τετραεδρικής γεωμετρίας.



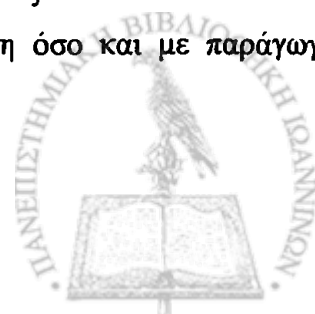
Ο Ζη είναι ένα σημαντικό βιολογικά μέταλλο. Στον ανθρώπινο οργανισμό βρίσκεται σε ποσότητα 1-2 gr και είναι απαραίτητος για την καταλυτική δράση πολλών ενζυμικών συστημάτων. Τα κυριότερα απ' αυτά είναι η καρβοξυπεπτιδάση Α, η ινσουλίνη και η ανθρακική ανυδράση. Το πρώτο καταλύει τη διάσπαση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των τροφών σε απλά αμινοξέα, το δεύτερο εμπλέκεται στη ρύθμιση των επιπέδων του σακχάρου του αίματος ενώ το τρίτο είναι υπεύθυνο για την μετατροπή του HCO_3^- σε CO_2 κατά την αναπνοή [207].

Το Cd^{2+} είναι τοξικό για τους ζωντανούς οργανισμούς. Συσσωρεύεται κυρίως στους νεφρούς και το ήπαρ ενώ ένα απ' τα κύρια χαρακτηριστικά της χρόνιας δηλητηρίασης από κάδμιο είναι η ευθραυστότητα των οστών, ως αποτέλεσμα της αντικατάστασης του Ca^{2+} από το Cd^{2+} [207]. Έχει προταθεί ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου του με τη θειαμίνη είναι ένας απ' τους παράγοντες που πιθανόν να εμπλέκονται στην πρόληψη της δηλητηρίασης απ' αυτό [99,106]. Τόσο ο Zn^{2+} όσο και το Cd^{2+} μπορούν να ενεργοποιήσουν την γPDC στη θέση του Mg^{2+} [88,144], ενώ τα ιόντα Zn^{2+} δεν ενεργοποιούν την γTK στη θέση του Ca^{2+} [192,193].

Η χημεία του ιόντος Cu^{2+} διαφέρει σημαντικά απ' αυτήν των Cd^{2+} και Zn^{2+} . Η πιο σταθερή οξειδωτική του βαθμίδα είναι η +2 ενώ και αυτές των +1 και +3 έχουν βρεθεί επίσης σε βιολογικά συστήματα [207]. Λόγω της ηλεκτρονιακής του δομής d^9 το ιόν του Cu^{2+} υφίσταται την επίδραση του φαινομένου Jahn-Teller με αποτέλεσμα τα σύμπλοκα του να παρουσιάζουν παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία. Πιο συχνή είναι η τετραγωνικά παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία, ενώ σε πολλές περιπτώσεις έχει ανιχνευθεί και αυτή της τριγωνικής διπυραμίδας με αριθμό ένταξης 5 [204].

Όπως ο Zn^{2+} έτσι και ο Cu^{2+} είναι ένα σημαντικό βιολογικά ιόν. Στον οργανισμό συμμετέχει κυρίως σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και πιο συγκεκριμένα στο κυτόχρωμα aa_3 (οξειδάση του κυτοχρώματος). Ο χαλκός απαντάται ως συστατικό δυο κυρίως πρωτεϊνών της σερούλοπλασμίνης και της αλβουμίνης οι οποίες φαίνεται ότι δρουν ως μεταφορείς του στην οξειδάση του κυτοχρώματος. Η σερούλοπλασμίνη καταλύει επίσης την οξείδωση του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C). Επιπρόσθετα ο Cu^{2+} μαζί με τον Zn^{2+} είναι συστατικά του ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση το οποίο καταστρέφει την τοξική ανιονική ρίζα O_2^- (ρίζα υπεροξειδίου) που παράγεται κατά την αναγωγή του O_2 στην αναπνευστική αλυσίδα [5,207].

Ο Cu^{2+} δεν μπορεί να αντικαταστήσει τα ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} στα ένζυμα θειαμίνης, γεγονός που οφείλεται στην αντίδρασή του με τις σουλφιδρυλομάδες των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Παρόλα αυτά οι αλληλεπιδράσεις του τόσο με τη θειαμίνη όσο και με παράγωγα



“ενεργού αλδεύδης” σε υδατικά διαλύματα, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον. Έχει αποδειχθεί ότι τόσο η θειαμίνη όσο και η ΗΒΤ αντιδρά με τον Cu(II) σε υδατικά διαλύματα. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των αντιδράσεων είναι η μερική ή ολική αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I) ενώ η θειαμίνη και τα παράγωγά της οξειδώνονται ολικά ή μερικά σε θειόχρωμα. Κατά περίπτωση έχουν απομονωθεί σύμπλοκα Cu(I) με θειαμίνη ή σύμπλοκα Cu(II) με θειόχρωμα [108,111,120]. Τόσο η θειαμίνη όσο και το ιόν Cu^{2+} είναι παρόντα σε βιολογικά συστήματα. Οξείδωσή της θα οδηγούσε σε καταστροφή της δράσης της ως συνένζυμο, ενώ μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί με ποιο μηχανισμό εμποδίζεται αυτή η οξείδωση.

Συνοψίζοντας τους λόγους επιλογής των μεταλλικών ιόντων Cd^{2+} , Zn^{2+} και Cu^{2+} στην παρούσα μελέτη, μπορούμε να πούμε ότι τα δυο πρώτα επελέγησαν λόγω α) των ομοιοτήτων τους με τα βιολογικά ενεργά ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} , β) του γεγονότος ότι μπορούν να ενεργοποιήσουν τα ένζυμα γPDC και γTK και γ) λόγω της βιολογικής σπουδαιότητας του ιόντος Zn^{2+} . Τέλος οι μελέτες της αλληλεπίδρασης του Cu^{2+} με θειαμίνη ή παράγωγά της παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη διευκρίνιση του μηχανισμού παρεμπόδισης της οξείδωσής της στο ενζυμικά ανενεργό θειόχρωμα.

III. Επιλογή των υποκαταστατών.

Σύμφωνα με τον μηχανισμό που προτάθηκε απ' τον Breslow [22] (σχήμα 5, σελίδα 9), η 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορική θειαμίνη (HETPP) αποτελεί το σταθερό ενδιάμεσο μετατροπής του πυροσταφυλικού σε ακεταλδεύδη. Το μόριο αυτό προκύπτει από την πρωτονίωση της εναμίνης ή του καρβανιόντος και έχει απομονωθεί κατά την ενζυμική μετατροπή του πυροσταφυλικού σε CH_3CHO [32-34].

Ενώ μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί αντιδράσεις άλλων παραγώγων “ενεργού αλδεύδης” όπως αυτές των ΗΒΤ, ΗCMT, ΗΒTMP και ΗΒTPP με Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pt^{2+} και Hg_2X_2 ($\text{X}=\text{Cl}, \text{Br}$) [72,120,124-129], δεν υπάρχει καμμία αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία για ανάλογες μελέτες με την HETPP, η οποία είναι και το πραγματικό ενδιάμεσο της ενζυμικής δράσης της θειαμίνης, άρα πραγματικά είναι πολύ σημαντικό βιολογικά μόριο. Απ' την άλλη, μελέτες στις οποίες να έχουν απομονωθεί στερεά μεταλλικά σύμπλοκα της TPP περιορίζονται σε δυο μόνο περιπτώσεις [104,105,114].



Η επιτυχής σύνθεση, απομόνωση και μελέτη συμπλόκων της HETPP και της TPP με Cd^{2+} , Zn^{2+} και Cu^{2+} θα μπορούσε να δώσει πολύ σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά τη σταθερότητα των σωματιδίων που σχηματίζονται και να αποδείξει ή όχι τον ευκολότερο σχηματισμό των συμπλόκων της HETPP σε σχέση με τα αντίστοιχα της TPP. Επιπλέον μπορούν να προσδιοριστούν τόσο ο τρόπος ένταξης των μεταλλοϊόντων όσο και η διαμόρφωση που υιοθετούν τα δυο αυτά σημαντικά βιολογικά μόρια. Η αλληλεπίδραση του Cu^{2+} με την HETPP εκτός απ' τα παραπάνω θα μπορούσε επιπρόσθετα να δώσει απαντήσεις σχετικά με το αν το πραγματικό αυτό ενδιάμεσο μπορεί να οξειδωθεί σε θειόχρωμα ή όχι. Οι παρατηρήσεις αυτές μπορούν να επεκταθούν και σε βιολογικά συστήματα στα οποία η HETPP είναι παρούσα, βοηθώντας έτσι στη διευκρίνιση του μηχανισμού που αποτρέπει την οξείδωση της θειαμίνης σε θειόχρωμα. Τέλος χρησιμοποιώντας τα παραπάνω σύμπλοκα ως συνένζυμα για το αποένζυμο της γPDC μπορούν να γίνουν μελέτες που θα ρίξουν κάποιο φως τόσο στο ρόλο των μεταλλικών ιόντων, όσο και στην ενεργό διαμόρφωση των υποκαταστατών κατά την καταλυτική διεργασία. Υπενθυμίζεται ότι έχει προταθεί απ' την ερευνητική μας ομάδα ότι τα μεταλλικά ιόντα επεμβαίνουν μετά το σχηματισμό των παραγώγων "ενεργού αλδεύδης" κατά την ενζυμική δράση και η S διαμόρφωση είναι πολύ σημαντική για την όλη πορεία της κατάλυσης [58]. Όπως θα δούμε αργότερα η υπόθεση αυτή ενισχύεται απ' τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί για τον προσδιορισμό της διαμόρφωσης της HETPP τόσο εντός ενζυμικών συστημάτων, όσο και εκτός αυτών, έχουν χρησιμοποιηθεί μελέτες μόνο μοριακής μηχανικής οι οποίες αν και θεωρούνται αξιόπιστες, είναι παρόλα ταύτα προσεγγιστικές [44,51,56, 60].

Σε μια προσπάθεια να μιμηθούμε ένα τμήμα τού ενεργού κέντρου του ενζύμου τρανσκετολάση και να μελετήσουμε την επίδρασή του στη σταθερότητα και τη διαμόρφωση της HETPP συνθέσαμε το πενταπεπτίδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile. Το τελευταίο αποτελεί την περιοχή 185-189 του ενζύμου γTK και όπως έχουμε ήδη αναφέρει η Asn187 και η Ile189 συμμετέχουν στην σύνδεση της πυροφωσφορικής ομάδας της TPP με το ένζυμο άμεσα, μέσω ενός οκταεδρικού ενταγμένου ιόντος Ca^{2+} [41,42] (σχήμα 46, σελίδα 69).

Η επιτυχής σύνθεση και μελέτη μικτών συμπλόκων του τύπου HETPP- M^{2+} -Asp-Asp-Asn-Lys-Ile ($\text{M} = \text{Cu}, \text{Zn}, \text{Cd}$) τα οποία αποτελούν αξιόπιστα μοντέλα του ενεργού κέντρου γύρω απ' την περιοχή της πυροφωσφορικής ομάδας, αναμένεται να δώσει σημαντικά συμπεράσματα που θα αφορούν τόσο τον τρόπο ένταξης των συμπλόκων της HETPP με το πεπτίδιο, όσο και την διαμόρφωση της.

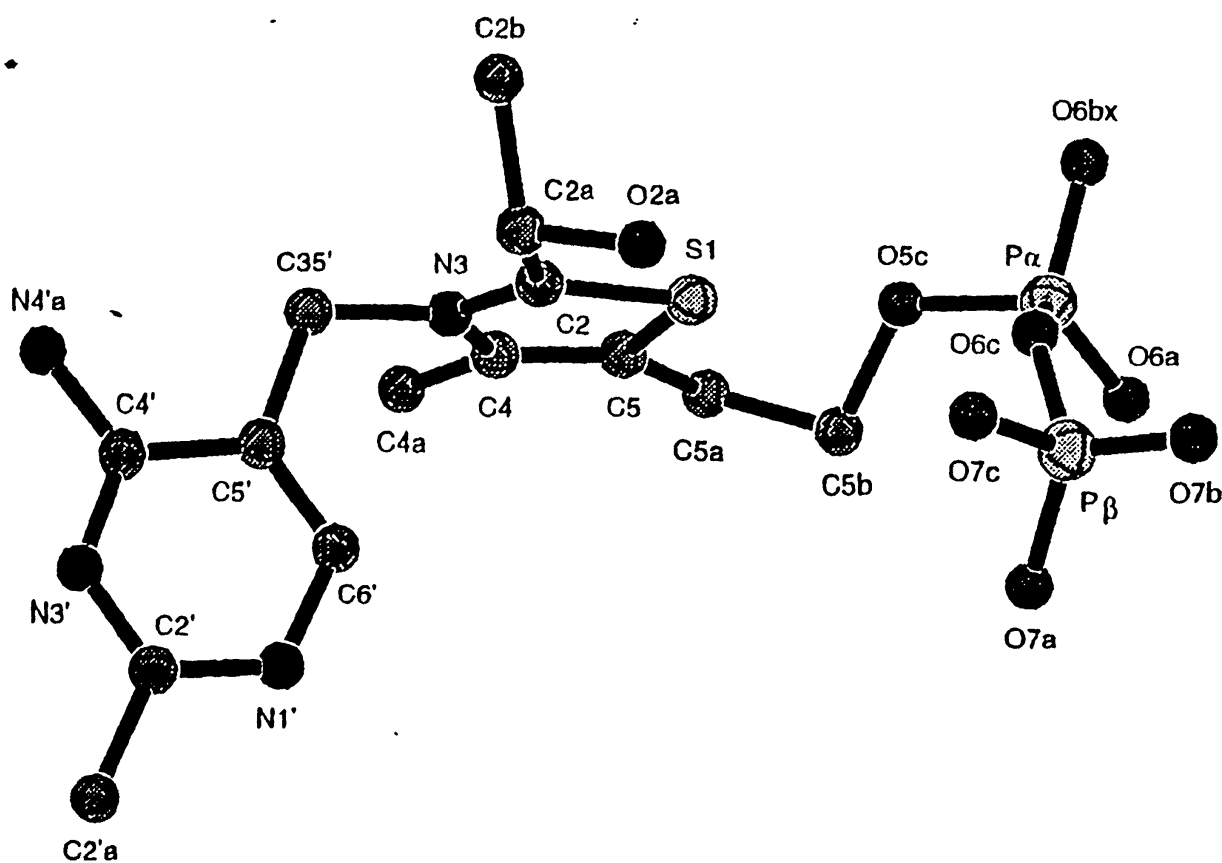


Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

I. Μελέτη της αλληλεπίδρασης Cd^{2+} , Zn^{2+} και Cu^{2+} με την HETPP.

A. Κρυσταλλική δομή της 2-(α -υδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορικής θειαμίνης (HETPP).

Η κρυσταλλική δομή της HETPP δίνεται στο επόμενο σχήμα (σχήμα 49).



Σχήμα 49: Κρυσταλλική δομή της HETPP.

Κατάλληλοι κρύσταλλοι για την επίλυση της δομής αναπτύχθηκαν με αργή διάχυση ακετόνης σε αραιό υδατικό διάλυμα του υποκαταστάτη ($\text{pH}=3.0$). Όπως έχει αναφερθεί και στην εισαγωγή τόσο η TPP όσο και τα παράγωγά της έχουν δομή εσωτερικών αλάτων (zwitterions) σ' αυτό το pH. Έτσι λοιπόν και η HETPP στην παρούσα δομή βρέθηκε να έχει δομή αμφολύτη. Ένα απ' τα δυο θετικά φορτία εντοπίζεται στο $\text{N}(1')$ της πυριμιδίνης ενώ το άλλο στο $\text{N}(3)$ του



θειαζολίου. Τελικά το διπλά θετικό φορτίο εξουδετερώνεται απ' το διπλά αρνητικό φορτίο της πυροφωσφορικής ομάδας. Η κατάσταση ιονισμού του μορίου εξάγεται απ' τα μήκη δεσμών C(4')-N(4'a), P(α)-O(6) και P(β)-O(7), απ' το μέγεθος της γωνίας C(2')-N(1')-C(6') και συμφωνεί βέβαια με την απαίτηση περί ηλεκτρικής ουδετερότητας του μορίου. Χαρακτηριστικά μήκη και γωνίες δεσμών δίνονται στους πίνακες 2 και 3.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Μήκη δεσμών της ΗΕΤΡΡ (Å).

S(1) - C(2)	1.697 (17)	S(1) - C(5)	1.768 (23)
P(α) - O(5c)	1.596 (19)	P(α) - O(6bx)	1.473 (15)
P(α) - O(6c)	1.585 (13)	P(α) - O(6a)	1.467 (10)
P(β) - O(6c)	1.576 (11)	P(β) - O(7c)	1.556 (15)
P(β) - O(7a)	1.527 (19)	P(β) - O(7b)	1.325 (27)
O(2a) - C(2a)	1.447 (28)	O(5c) - C(5b)	1.508 (25)
N(1') - C(2')	1.329 (22)	N(1') - C(6')	1.391 (20)
N(3') - C(2')	1.283 (18)	N(3') - C(4')	1.341 (19)
N(3) - C(2)	1.305 (29)	N(3) - C(4)	1.384 (22)
N(3) - C(3,5')	1.494 (23)	N(4'a) - C(4')	1.326 (18)
C(2b) - C(2a)	1.477 (31)	C(2) - C(2a)	1.505 (25)
C(2') - C(2'a)	1.530 (22)	C(4') - C(5')	1.465 (23)
C(4) - C(4a)	1.494 (33)	C(4) - C(5)	1.348 (25)
C(5a) - C(5)	1.477 (22)	C(5a) - C(5b)	1.491 (27)
C(5') - C(6')	1.316 (20)	C(5') - C(3,5')	1.518 (23)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Γωνίες δεσμών της ΗΕΤΡΡ.

C(2) - S(1) - C(5)	89.6(10)	O(5c) - P(α) - O(6bx)	103.6(8)
O(5c) - P(α) - O(6c)	103.7(8)	O(6bx) - P(α) - O(6c)	104.0(10)
O(5c) - P(α) - O(6a)	110.5(11)	O(6bx) - P(α) - O(6a)	121.3(8)
O(6c) - P(α) - O(6a)	112.0(6)	O(6c) - P(β) - O(7c)	102.8(7)
O(6c) - P(β) - O(7a)	111.8(11)	O(7c) - P(β) - O(7a)	108.9(10)
O(6c) - P(β) - O(7b)	111.3(11)	O(7c) - P(β) - O(7b)	105.4(17)
O(7a) - P(β) - O(7b)	115.6(12)	P(α) - O(5c) - C(5b)	119.4(10)
P(α) - O(6c) - P(β)	139.9(8)	C(2') - N(1') - C(6')	119.3(12)
C(2') - N(3') - C(4')	122.3(14)	C(2) - N(3) - C(4)	115.3(15)
C(2) - N(3) - C(3,5')	122.6(14)	C(4) - N(3) - C(3,5')	122.0(18)
S(1) - C(2) - N(3)	112.8(12)	S(1) - C(2) - C(2a)	119.6(15)
N(3) - C(2) - C(2a)	127.5(15)	N(1') - C(2') - N(3')	122.7(14)
N(1') - C(2') - C(2'a)	118.5(13)	N(3') - C(2') - C(2'a)	118.6(15)
O(2a) - C(2a) - C(2b)	102.7(19)	O(2a) - C(2a) - C(2)	110.3(13)
C(2b) - C(2a) - C(2)	111.7(16)	N(3') - C(4') - N(4'a)	120.2(13)
N(3') - C(4') - C(5')	116.2(13)	N(4'a) - C(4') - C(5')	123.1(14)



N(3) - C(4) - C(4a)	118.9(16)	N(3) - C(4) - C(5)	111.8(18)
C(4a) - C(4) - C(5)	129.3(16)	C(5) - C(5a) - C(5b)	115.7(16)
C(4') - C(5') - C(6')	119.3(14)	C(4') - C(5') - C(3,5')	115.7(13)
C(6') - C(5') - C(3,5')	125.0(15)	S(1) - C(5) - C(4)	110.6(12)
S(1) - C(5) - C(5a)	121.3(14)	C(4) - C(5) - C(5a)	128.1(18)
O(5c) - C(5b) - C(5a)	103.1(13)	N(1') - C(6') - C(5')	119.6(15)
N(3) - C(3,5') - C(5')	112.1(12)		

Πιο συγκεκριμένα, πρωτονίωση στο N(1') επηρεάζει τόσο το μήκος του δεσμού C(4')-N(4'a) όσο και το μέγεθος της γωνίας C(2')-N(1')-C(6') [58]. Έτσι, στις πρωτονιωμένες μορφές της θειαμίνης (στο N(1')) το μήκος δεσμού C(4)-N(4'a) κυμαίνεται μεταξύ 1.31-1.34 Å ενώ η γωνία C(2')-N(1')-C(6') μεταξύ 118-121° [58]. Στην παρούσα δομή το μήκος δεσμού C(4)-N(4'a) είναι 1.326 Å ενώ η γωνία C(2')-N(1')-C(6') είναι 119.3° συμφωνώντας απόλυτα με τα παραπάνω δεδομένα. Η κατάσταση ιονισμού της πυροφωσφορικής ομάδας προκύπτει απ' τα μήκη δεσμών P-O. Σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα [208] υποδεικνύει ότι και στα δυο άτομα φωσφόρου, P_α και P_β, έχει ιονιστεί μια ομάδα P-OH.

Το μόριο υιοθετεί την S-διαμόρφωση, χαρακτηριστικό των C(2)-υποκατεστημένων παραγώγων της θειαμίνης [58], με διεδρες γωνίες $\Phi_T = -90.8^\circ$ και $\Phi_P = -178.6^\circ$. Το αρνητικό φορτίο στην τελευταία υποδεικνύει ότι η αίθυλ-πυροφωσφορική ομάδα στον C(5) και η 4'a-NH₂ διευθετούνται έτσι ώστε να βρίσκονται προς την ίδια πλευρά του θειαζολικού δακτυλίου (syn διαμόρφωση) [209]. Ένα απ' τα χαρακτηριστικά της S-διαμόρφωσης είναι η μικρή σχετικά απόσταση των S(1) και O(2a) [58]. Στην παρούσα δομή η ενδομοριακή απόσταση S(1)...O(2a) είναι της τάξης των 2.898 Å, γεγονός που υποδεικνύει την ισχυρή, ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπίδραση μεταξύ των S(1) και O(2a) η οποία με τη σειρά της σταθεροποιεί την S-διαμόρφωση [40]. Η απόσταση αυτή δεν είναι η μικρότερη που έχει παρατηρηθεί [58]. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς το άτομο S(1) αλληλεπιδρά και με το O(5c). Η ενδομοριακή απόσταση S(1)...O(5c) είναι της τάξης των 2.923 Å. Οι δυο παραπάνω αλληλεπιδράσεις έχουν σαν αποτέλεσμα την εξουδετέρωση του μερικά θετικά φορτισμένου ατόμου S(1) [58].

Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση S(1)...O(2a) επηρεάζει και την διαμόρφωση της πλευρικής ανθρακικής αλυσίδας του C(2). Έτσι στην περίπτωση της HET.HCl [40] η διεδρη γωνία S(1)-C(2)-C(2a)-O(2a) είναι 20.6° και -21.10° στην παρούσα δομή της HETPP, ενώ οι ενδομοριακές αποστάσεις S(1)...O(2a) είναι 2.901 Å και 2.898 Å αντίστοιχα. Το αρνητικό πρόσημο της διεδρης γωνίας στην δομή της HETPP υποδηλώνει διαφορετική διευθέτηση του



ατόμου O(2a), πιθανόν για να αποφευχθούν ανεπιθύμητες στερικές παρεμποδίσεις λόγω της παρουσίας της ογκώδους πυροφωσφορικής ομάδας.

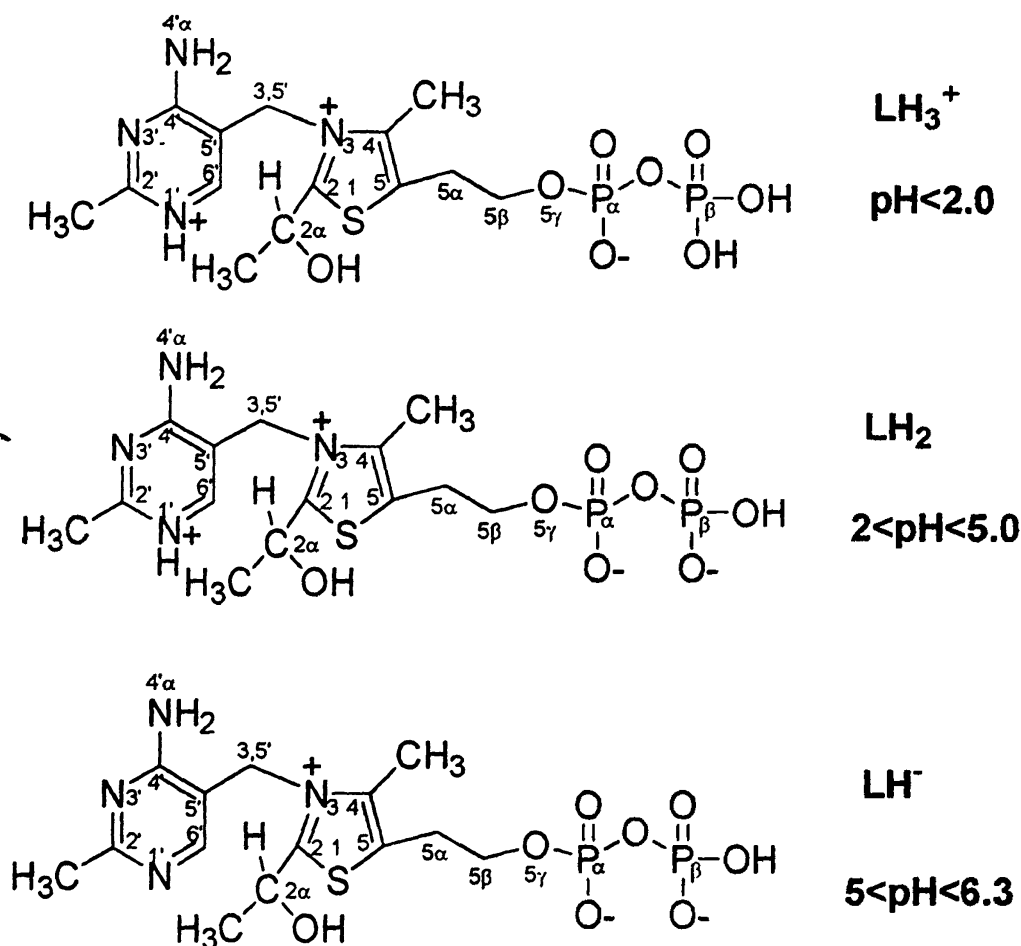
Η διαμόρφωση της ύδροξυ-αίθυλ-πυροφωσφορικής αλυσίδας του C(5) δεν καθορίζεται τελείως τυχαία [86]. Έτσι σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα η diedρη γωνία $\Phi_{5a} = S(1)-C(5)-C(5a)-C(5b)$ παίρνει τιμές από $3^\circ-105^\circ$ ενώ για την $\Phi_{5b} = C(5)-C(5a)-C(5b)-O(5c)$ το εύρος τιμών είναι μικρότερο και κυμαίνεται από 10° ως $\pm 60^\circ$. Έχει παρατηρηθεί ότι η γειτνίαση των ατόμων S(1) και O(5c) επιβάλλει την παρουσία μιας diedρης γωνίας $\Phi_{5b} = \pm 60^\circ$ [58]. Στην περίπτωση της HETPP $\Phi_{5a} = 22.75^\circ$, $\Phi_{5b} = -73.39^\circ$ με ισχυρή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση S(1)...O(5c) της τάξης των 2.923 Å.

Γενικά υπάρχουν δυο διάκριτες διαμορφώσεις της πυροφωσφορικής ομάδας. Έτσι, στην κρυσταλλική δομή π.χ της TPP.HCl [209] η ομάδα αυτή διπλώνει και πλησιάζει το θειαζολικό δακτύλιο. Αντιθέτως στην κρυσταλλική δομή της ουδέτερης μορφής της TPP (zwitterion) [208], η πυροφωσφορική ομάδα εκτείνεται μακριά απ' το θειαζολικό δακτύλιο, σε μια πιο "ανοικτή" διαμόρφωση. Εναλλαγή μεταξύ αυτών των δυο διαμορφώσεων γίνεται με περιστροφή του O(5c) γύρω απ' τον άξονα του δεσμού O(5c)-P(α) καθώς και με περιστροφή του P(α) γύρω απ' τον άξονα του δεσμού P(α)-O(6c) [208]. Απ' τις τιμές των diedρων γωνιών $\Phi_{5b} = C(5b)-O(5c)-P(\alpha)-O(6a) = 39.2^\circ$ και $\Phi_{5e} = O(5c)-P(\alpha)-O(6c)-P(\beta) = 11.7^\circ$ εξάγεται το συμπέρασμα ότι η πυροφωσφορική ομάδα υιοθετεί την "εκτεταμένη" διαμόρφωση. Το γεγονός ότι αυτή η "εκτεταμένη" διαμόρφωση υιοθετείται τόσο στην παρούσα δομή όσο και στην αντίστοιχη δομή της TPP [208], δεν ενισχύει την υπόθεση ότι η πυροφωσφορική ομάδα πλησιάζει το θειαζολικό δακτύλιο για να ελαχιστοποιηθεί η απόσταση μεταξύ των θετικά και αρνητικά φορτισμένων τμημάτων του μορίου [209].



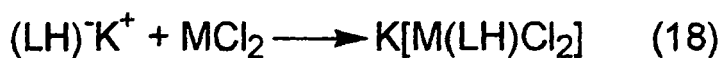
B. Σύνθεση των συμπλόκων.

Έχει ήδη αναφερθεί ότι η TPP και τα παράγωγά της υφίστανται σε διαφορετικές καταστάσεις πρωτονίωσης ανάλογα με το pH του διαλύματός τους (σχήμα 4, σελίδα 4). Έτσι και η HETPP μπορεί να βρίσκεται είτε θετικά φορτισμένη ως μονοκατιόν (LH_3^+), είτε σε ουδέτερη μορφή (zwitterion, LH_2), είτε σε μονοανιονική μορφή (LH^-) (σχήμα 50) [10].

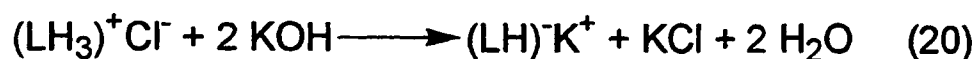


Σχήμα 50: Μοριακοί τύποι της HETPP συναρτήσεως του pH υδατικών της διαλυμάτων.

Τα σύμπλοκα της HETPP με Cd, Zn και Cu συντέθηκαν αναμιγνύοντας τα χλωρίδια των μετάλλων με τον υποκαταστάτη σε μεθανολικά διαλύματα ή μίγμα μεθανόλης/αιθανόλης 2/3στην περίπτωση του συμπλόκου του Cu, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (18,19) ($M = Zn, Cd$):



Η μονοανιονική μορφή του υποκαταστάτη $(LH)^-$ παρασκευάστηκε *in situ* πριν την προσθήκη του μετάλλου, με αντίδραση της μονοκατιονικής μορφής της HETPP $(LH_3)^+Cl^-$ με προσθήκη δυο ισοδυνάμων μεθανολικού ή αιθανολικού KOH (20).



Συντέθηκε επίσης το σύμπλοκο του Zn, $Zn(LH_3)Cl_3$, με την HETPP με τον ίδιο τρόπο, χρησιμοποιώντας όμως τον υποκαταστάτη στην ουδέτερη του μορφή LH_2 .

Στον επόμενο πίνακα (ΠΙΝΑΚΑΣ 4) δίνονται τα αποτελέσματα των στοιχειακών αναλύσεων C,H,N,S και μετάλλου (Cd, Zn, Cu) για τα τέσσερα σύμπλοκα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Δεδομένα στοιχειακών αναλύσεων των συμπλόκων.

	%C		%H		%N		%S		%M	
	Θεωρ.	Πειρ.	Θεωρ.	Πειρ.	Θεωρ.	Πειρ.	Θεωρ.	Πειρ.	Θεωρ.	Πειρ.
$\{Kcd(LH)Cl_2\}_n$	24.4	24.0	3.1	3.3	8.1	7.8	4.6	4.5	16.3	16.5
$\{KZn(LH)Cl_2\}_n$	26.2	26.2	3.3	3.8	8.7	8.6	5.0	5.0	10.2	10.3
$Zn(LH_3)Cl_3 \cdot H_2O$	25.5	25.9	3.8	4.0	8.5	8.5	4.9	5.0	—	—
$\{Cu(LH)Cl \cdot H_2O\}_n$	28.3	28.4	4.1	4.0	9.4	9.3	5.4	5.2	10.7	10.6



Γ. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων στην στερεά φάση.

I. Φάσματα IR και Raman.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα υπερύθρου (IR) και Raman μαζί με τις αποδόσεις των κυριότερων ταινιών συμπλόκων και υποκαταστάτη σε διάφορες καταστάσεις πρωτονίωσης (σχήματα 51-58) δίνονται στους πίνακες 5 και 6.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Φασματοσκοπικά δεδομένα IR (4000-200 cm^{-1}).

	Απόδοση ταινιών									
	$\nu(\text{OH})$	$\nu(\text{NH}_2)$	$\nu(8\alpha)$ + δNH_2	$\nu(8\alpha)$	$\nu(8\beta)$	$\nu(\text{P}=\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{O}) +$ $\nu(\text{P}-\text{O}-\text{C})$	$\nu(\text{P}-\text{O}) +$ $\nu(\text{P}-\text{O}-\text{P})$	$\delta(\text{P}-\text{O})$	$\nu(\text{M}-\text{Cl})$
$(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$	3359br	3211	1662s, 1622s	1657s	1537s	1233s	1057	1002	509	—
LH_2	3350br	3210	1661s, 1624s	1655s	1539m	1229s	1111s, 1061s	912s, 996	518	—
$(\text{LH})\text{K}^+$	3345br	3209	1654s, 1601s	1600s	1567s	1231s	1111, 1062	911, 956	522	—
$\{\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2\}_n$	3341br	3217	1659s, 1634sh	1616s	1549s	1218s	1100, 1062sh	1062sh, 1009	540	—
$\{\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2\}_n$	3346br	3215	1661s, 1624s	1626s	1539s	1217s	1153sh, 1099	1063, 937	552	—
$\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3342br	3214	1662s, 1621s	1659s	1537m	1222s	1059, 1109s,br	926s	521	—
$\{\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}\}_n$	3332	3205	1657s, 1624s	1623s	1541m	1210sh	1092, 1058	1003sh, 927m	553	298, 276w

s=ισχυρή ταινία, m=μέτρια, w=ασθενής, br=ευρεία, sh=ώμος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Φασματοσκοπικά δεδομένα Raman (4000-100 cm^{-1}).

	Απόδοση ταινιών					
	$\nu(8\alpha)$	$\nu(8\beta)$	$\nu(\text{P}=\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{O})+\nu(\text{P}-\text{O}-\text{C})$	$\nu(\text{M}-\text{Cl})$	$\nu(\text{M}-\text{N})$
$(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$	1653	1600	1292	1104	—	—
LH_2	1654	1600	1293	1074, 1108	—	—
$(\text{LH})\text{K}^+$	1600	1562	1287	1073, 1108	—	—
$\{\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2\}_n$	1640, 1600	1556w	1242	1103	261	184
$\{\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2\}_n$	1642, 1600	1544w	1255	1105	296	180
$\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1600	1599	1293	1106	293	—



Στην περιοχή $4000-2000\text{ cm}^{-1}$ στο IR παρατηρούνται οι δονήσεις τάσης της αμινομάδας $\nu(\text{NH}_2)$, οι δονήσεις $\nu(\text{OH})$ των ομάδων $-\text{OH}$ των μορίων ή του νερού εφυδάτωσης καθώς και η $\nu(\text{C-H})$ [127]. Στο Raman αντίστοιχα παρατηρείται μόνο μια ευρεία και ισχυρή ταινία που εντοπίζεται και στα σύμπλοκα και στον υποκαταστάτη στα $2930-2970\text{ cm}^{-1}$ και αποδίδεται στις δονήσεις τάσης $\nu(\text{C-H})$ των αλειφατικών ομάδων των μορίων ($-\text{CH}_3$ και $-\text{CH}_2-$). Η απουσία μετατόπισης των ταινιών $\nu(\text{OH})$ και $\nu(\text{NH}_2)$ του υποκαταστάτη παρουσία των ιόντων $\text{Cd}(\text{II})$, $\text{Zn}(\text{II})$ και $\text{Cu}(\text{II})$ υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει δεσμός μεταξύ των παραπάνω ομάδων και των μετάλλων.

Στην περιοχή $2000-1400\text{ cm}^{-1}$ στα φάσματα IR παρατηρούνται η δόνηση τάσης $\text{C}=\text{N}$ του πυριμιδινικού δακτυλίου ($\nu(8a)$), η δόνηση κάμψης της αμινομάδας $\delta(\text{NH}_2)$, καθώς και η δόνηση τάσης της πυριμιδίνης $\nu(8b)$. Οι δυο πρώτες τις περισσότερες φορές συζεύγνυνται και έτσι για την απόδοση των ταινιών είναι απαραίτητη η δευτερίωση ώστε η $\delta(\text{NH}_2)$ να μετατοπιστεί προς χαμηλότερες συχνότητες [127]. Έτσι μετά τη δευτερίωση των ενώσεών μας η δόνηση $\nu(8a)$ εντοπίζεται στα 1657 cm^{-1} για τον πρωτονιωμένο στο $\text{N}(1')$ υποκαταστάτη $(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$, LH_2 , ενώ στα 1600 , 1616 και 1626 cm^{-1} για τον αποπρωτονιωμένο στο $\text{N}(1')$ υποκαταστάτη, το σύμπλοκο $[\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$ και το σύμπλοκο $[\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$, ακολουθώντας τη σειρά $\text{H}^+ > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ σε απόλυτη συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα [127]. Η ίδια δόνηση για το σύμπλοκο $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_n$ παρουσιάζεται στα 1623 cm^{-1} ενώ για το $\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$ στα 1659 cm^{-1} , πολύ κοντά στην τιμή για τον πρωτονιωμένο υποκαταστάτη. Αντίστοιχη συμπεριφορά της δόνησης $\nu(8a)$ παρουσιάζεται και στα φάσματα Raman.

Παράλληλα και η δόνηση $\nu(8b)$ της πυριμιδίνης επηρεάζεται απ' την πρωτονίωση ή την συμπλοκοποίηση. Έτσι στο IR, στις πρωτονιωμένες μορφές του υποκαταστάτη $(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$ και LH_2 εμφανίζεται στα 1537 και 1539 cm^{-1} αντίστοιχα, ενώ στον $(\text{LH})\text{K}^+$ και τα σύμπλοκα $[\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$, $[\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$ και $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_n$ στα 1567 , 1549 , 1539 και 1541 cm^{-1} αντίστοιχα. Στο σύμπλοκο $\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$ η $\nu(8b)$ εντοπίζεται στα 1537 cm^{-1} . Ίδια συμπεριφορά της $\nu(8b)$ παρουσιάζεται και στα φάσματα Raman.

Η μετατόπιση των ταινιών $\nu(8a)$ και $\nu(8b)$ στον ελεύθερο υποκαταστάτη $(\text{LH})\text{K}^+$ και στα σύμπλοκα $[\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$, $[\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$, $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_n$ υποδεικνύει ότι τα μεταλλοϊόντα αλληλεπιδρούν με το $\text{N}(1')$ της πυριμιδίνης, ενώ κατ' αντιστοιχία στο σύμπλοκο $\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$ το γεγονός ότι οι συχνότητες αυτών των δυο ταινιών ταυτίζονται με τις αντίστοιχες των $(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$ και LH_2 υποδηλώνει ότι το $\text{N}(1')$ είναι πρωτονιωμένο.

Στην περιοχή $1400-1200\text{ cm}^{-1}$ και στο IR και στο Raman εντοπίζεται η δόνηση τάσης $\nu(\text{P}=\text{O})$ καθώς και οι δονήσεις $\nu(\text{C-O})$, $\nu(\text{P-O-C})$, $\nu(\text{P-O})$ και $\nu(\text{P-O-P})$ [72,210]. Απ' αυτές οι



τέσσερις τελευταίες επικαλύπτονται ή συζεύγνυνται μεταξύ τους και έτσι δεν μπορούν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την πιθανότητα συμπλοκοποίησης ή όχι της πυροφωσφορικής ομάδας. Αντιθέτως στα φάσματα IR, η $\nu(\text{P}=\text{O})$ εντοπίζεται στα $1229\text{-}1231\text{ cm}^{-1}$ για τον υποκαταστάτη $(\text{LH}_3)^-\text{Cl}^-$, LH_2 , $(\text{LH})\text{K}^+$ και στα 1218 , 1217 , 1210 cm^{-1} για τα σύμπλοκα $[\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$, $[\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$, και $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_n$ αντίστοιχα, υποδεικνύοντας καθαρή αλληλεπίδραση των μεταλλικών ιόντων και με την πυροφωσφορική ομάδα. Η μείωση της ενέργειας (cm^{-1}) που εμφανίζει η δόνηση αυτή στα σύμπλοκα, αποδίδεται στην μείωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του δεσμού $\text{P}=\text{O}$ λόγω της συμπλοκοποίησης της πυροφωσφορικής ομάδας [72]. Η ίδια δόνηση $\nu(\text{P}=\text{O})$ στο σύμπλοκο $\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$ εντοπίζεται στα 1222 cm^{-1} , τιμή υψηλότερη μεν απ' τις αντίστοιχες των υπόλοιπων συμπλόκων, αλλά μικρότερη απ' αυτή του υποκαταστάτη. Και σ' αυτή την περίπτωση λοιπόν δεν μπορούμε να αποκλείσουμε μια ασθενή το λιγότερο αλληλεπίδραση του $\text{Zn}(\text{II})$ με τη διφωσφορική ομάδα. Στο Raman η δόνηση $\nu(\text{P}=\text{O})$ εντοπίζεται στα 1292 , 1287 , 1242 , 1255 και 1293 cm^{-1} για τον $(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$, $(\text{LH})\text{K}^+$ και τα σύμπλοκα $[\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$, $[\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$ και $\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$ αντίστοιχα, οδηγώντας στα ίδια συμπεράσματα.

Μια επιπλέον ένδειξη της συμπλοκοποίησης της πυροφωσφορικής ομάδας προκύπτει απ' την σύγκριση της συχνότητας που εμφανίζεται η δόνηση κάμψης $\delta(\text{P}-\text{O})$ στον υποκαταστάτη και στα σύμπλοκα. Η δόνηση αυτή αναμένεται να επηρεάζεται τόσο κατά την πρωτονίωση της πυροφωσφορικής ομάδας όσο και κατά τη συμπλοκοποίηση [10,72,73,210]. Έτσι η $\delta(\text{P}-\text{O})$ εμφανίζεται στα 509 cm^{-1} στον $(\text{LH}_3)^-\text{Cl}^-$ ενώ εμφανίζεται στα 522 cm^{-1} στον LHK^+ (όπου η ομάδα $\text{P}_\beta\text{-OH}$ έχει αποπρωτονιωθεί). Στα σύμπλοκα $[\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$, $[\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$ και $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_n$ εμφανίζεται στα 540 , 552 και 553 cm^{-1} αντίστοιχα γεγονός που υποδεικνύει για μια ακόμη φορά την αλληλεπίδραση των ιόντων με την πυροφωσφορική ομάδα. Ακόμα και στο σύμπλοκο $\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$ παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση της τάξης των 12 cm^{-1} (σε σχέση με τον LH_3^+Cl^-), ένδειξη ασθενέστερης αλληλεπίδρασης του $\text{Zn}(\text{II})$ με τη διφωσφορική ομάδα.

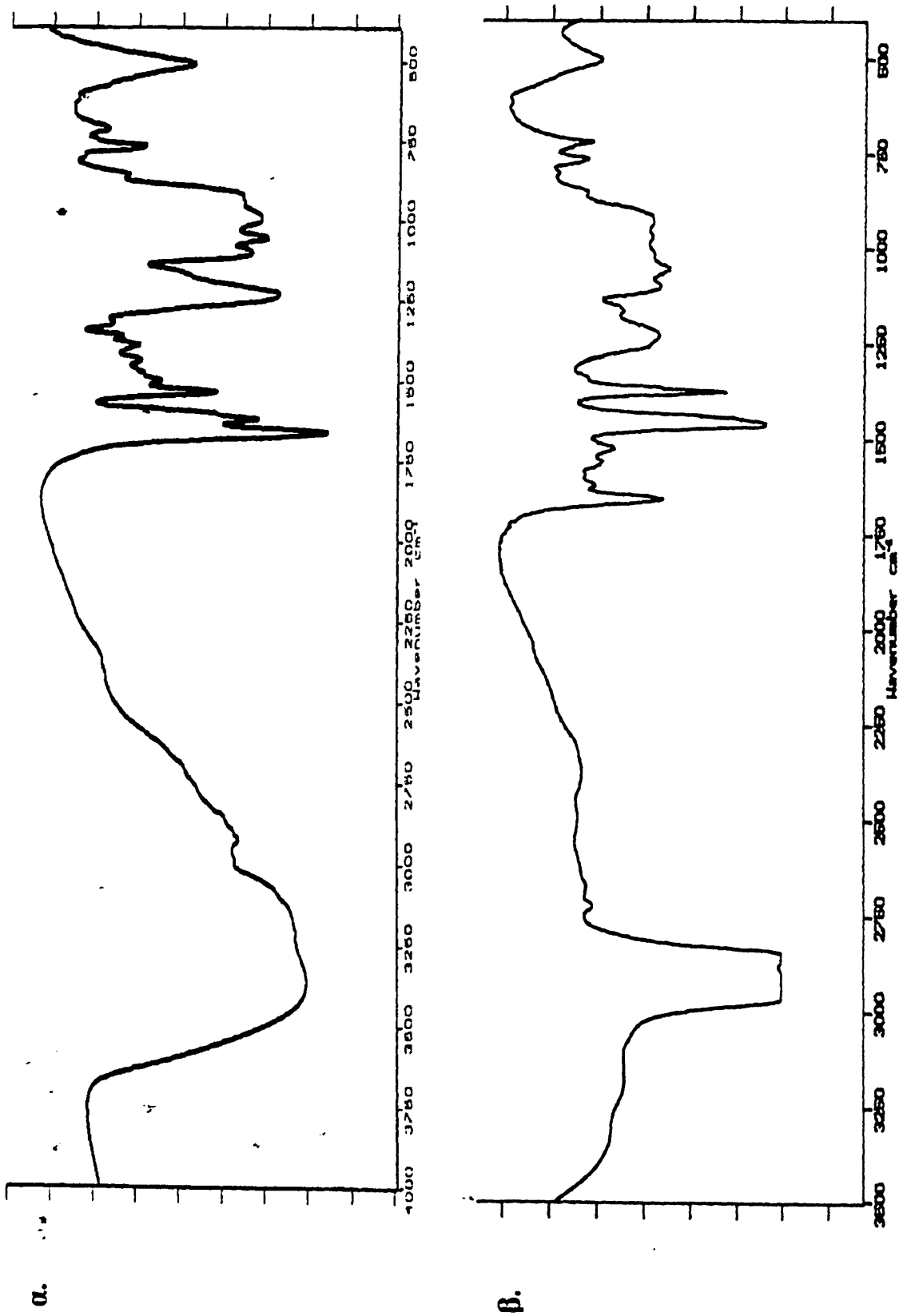
Τέλος στα φάσματα IR και Raman εντοπίστηκαν επιπλέον οι δονήσεις τάσης $\nu(\text{M}-\text{Cl})$ ($260\text{-}290\text{ cm}^{-1}$) και $\nu(\text{M}-\text{N})$ ($180\text{-}185\text{ cm}^{-1}$) (όπου $\text{M} = \text{Cu}, \text{Zn}, \text{Cd}$).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι στα μεν σύμπλοκα $[\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$, $[\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$ και $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_n$ τα μεταλλικά ιόντα εντάσσονται μέσω του $\text{N}(1')$ και της πυροφωσφορικής ομάδας, ενώ στην ένωση $\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$ το $\text{N}(1')$ είναι πρωτονιωμένο και το ιόν Zn^{2+} αλληλεπιδρά ασθενώς με την διφωσφορική ομάδα. Για το λόγο αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί και ως ιονικό άλας του τύπου $[\text{ZnCl}_3]^-[\text{LH}_3]^+$. Λαμβάνοντας υπόψη τέλος τα δεδομένα των στοιχειακών αναλύσεων και το γεγονός της παράλληλης ένταξης των $\text{N}(1')$ και διφωσφορικής

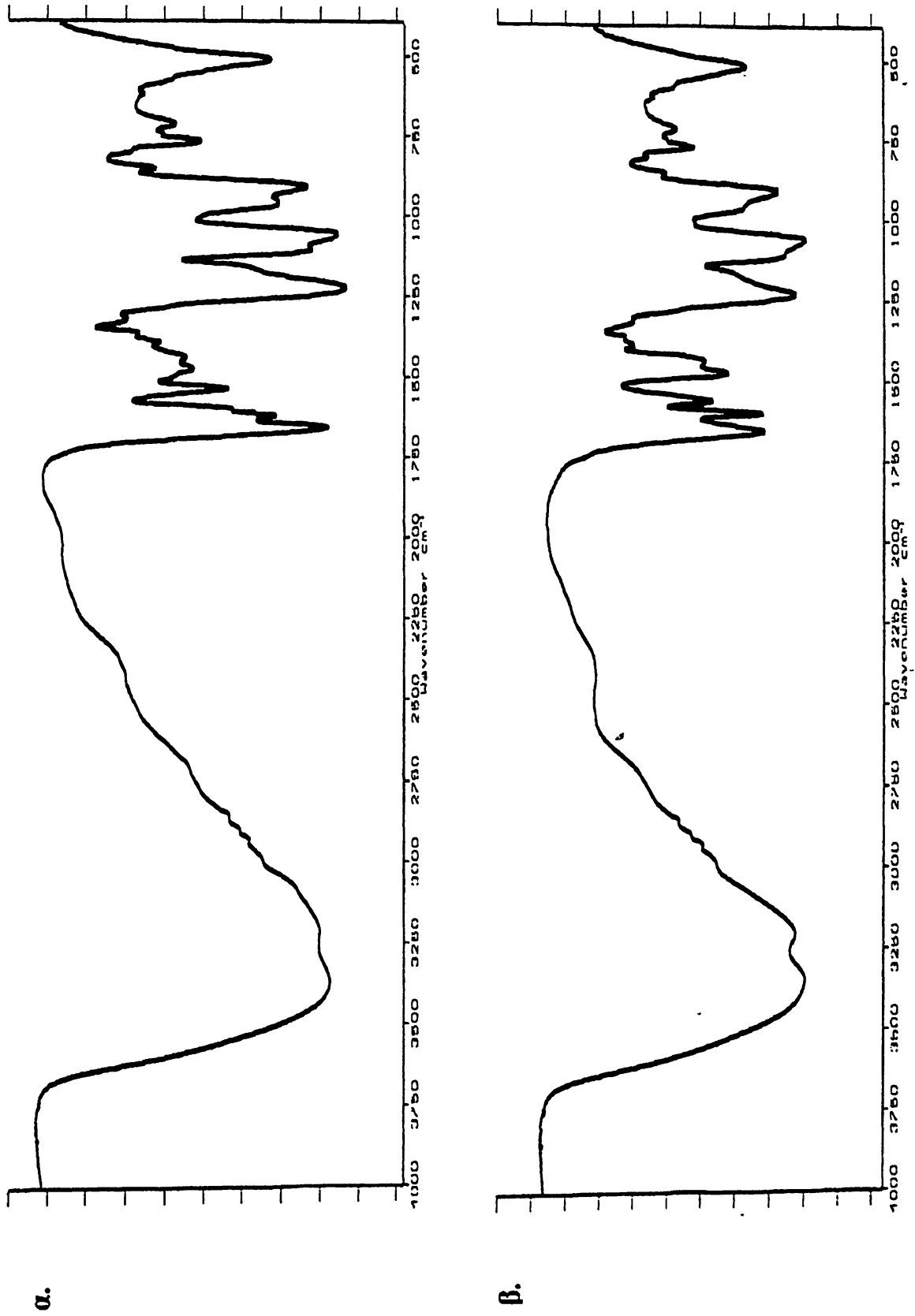


ομάδας μπορούμε να υποθέσουμε ότι λόγω του μεγάλου μεγέθους του μορίου της HETPP είναι μάλλον απίθανο τα άτομα δότες στα σύμπλοκα να προέρχονται απ'το ίδιο μόριο HETPP. Αποδίδουμε λοιπόν σ' αυτά δομές τουλάχιστον διμερών, της μορφής $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M= Zn, Cd$) και $[Cu(LH)Cl]_2$. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας ES-MS που ακολουθούν.

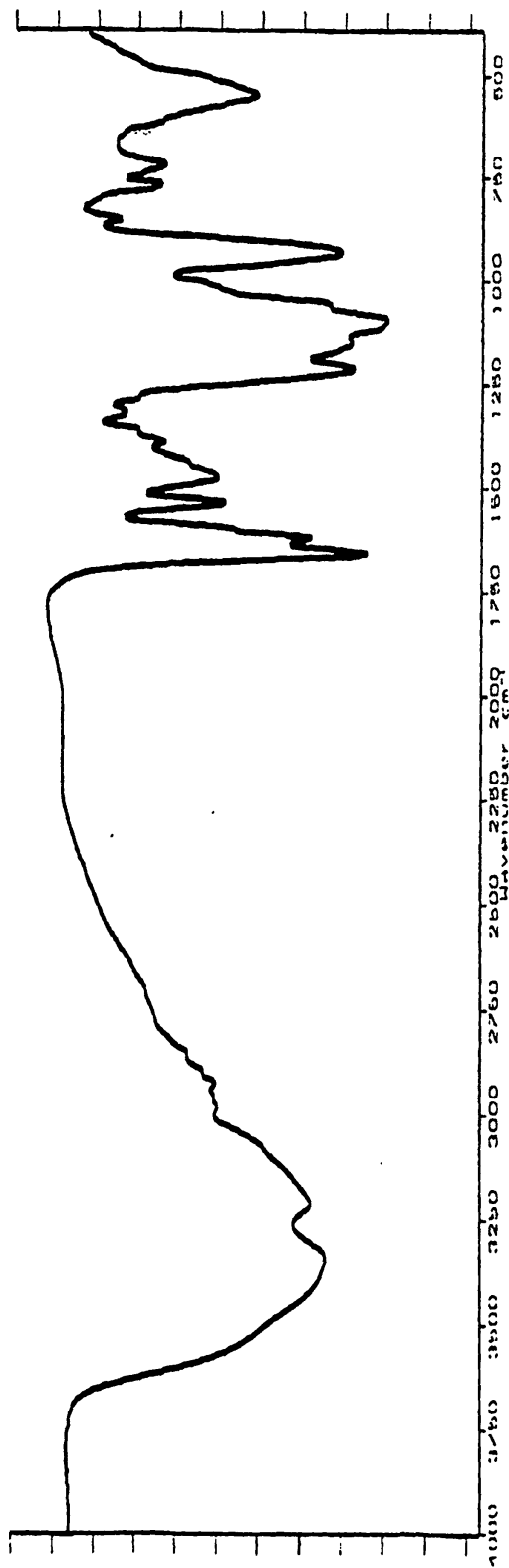
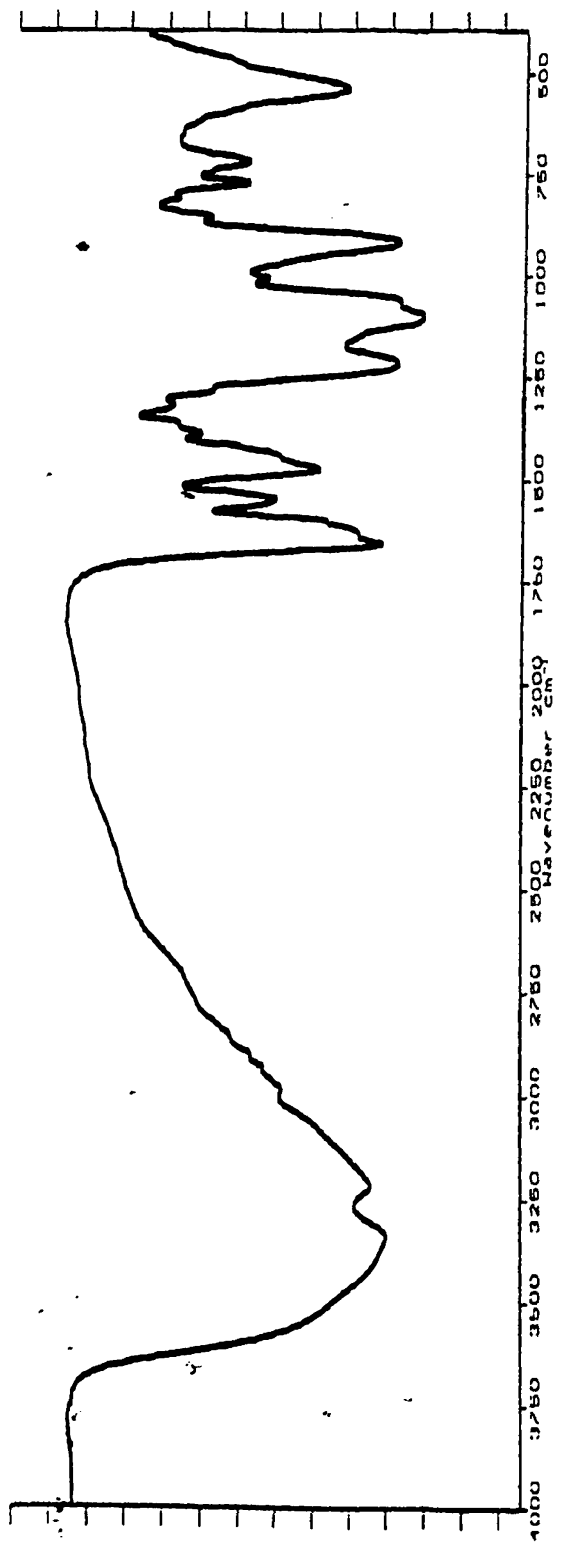




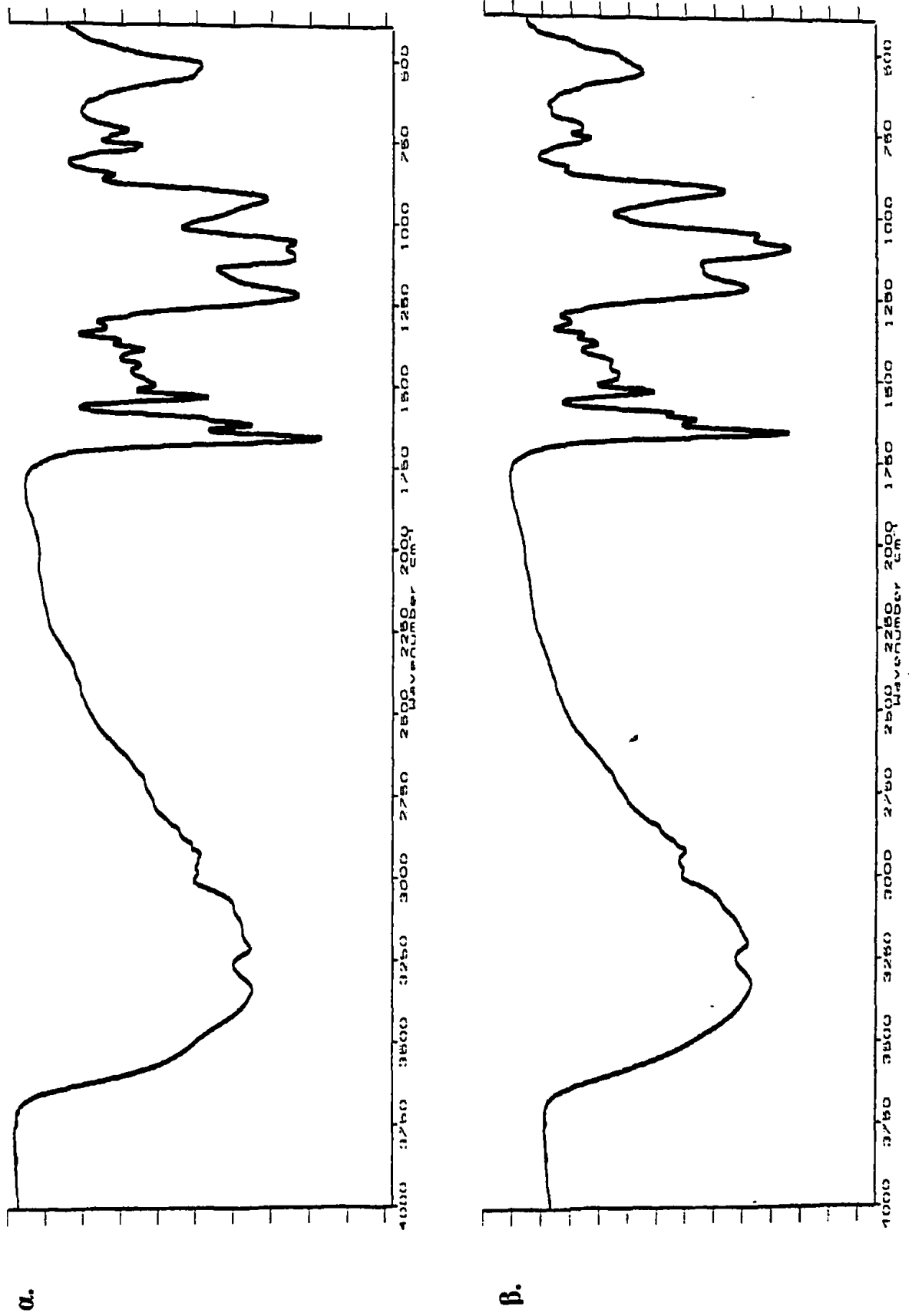
Σχήμα 51: Φάσματα IR της α) HETPP στην μονοκατιονική της μορφή $(LH_3)^+ Cl^-$ και β) της δευτεριωμένης HETPP στην ίδια μορφή.



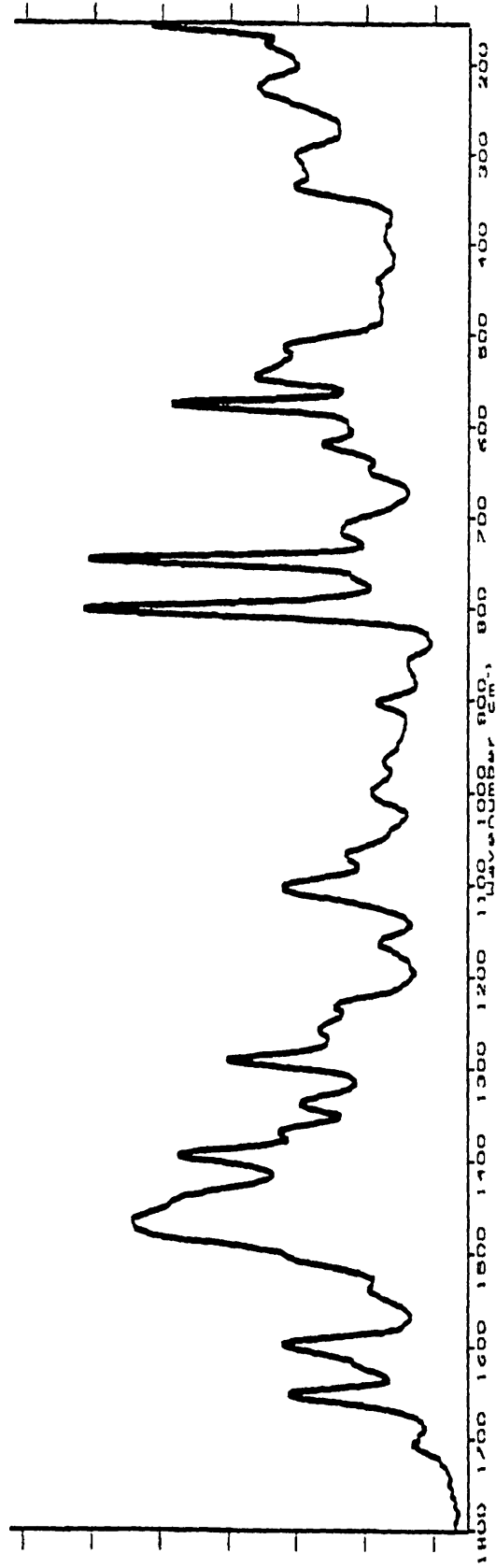
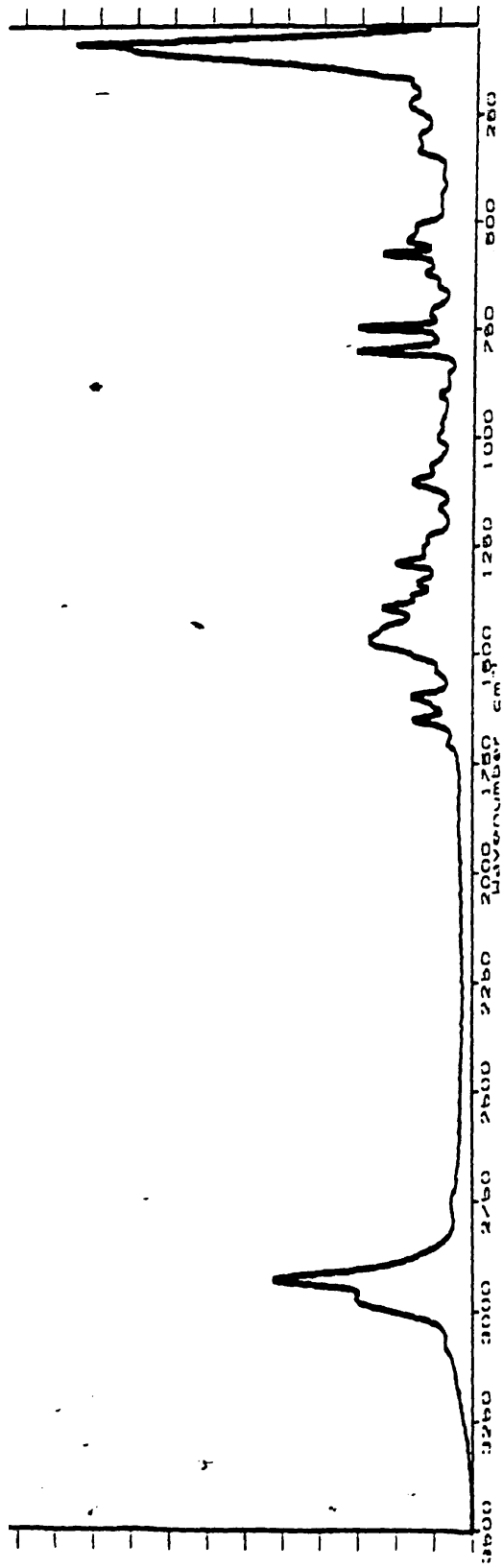
Σχήμα 52: Φάσματα IR της HETPP α) στην ουδέτερη μορφή (LH₂) και β) στην μονοανιονική της μορφή (LH)⁻K⁺.



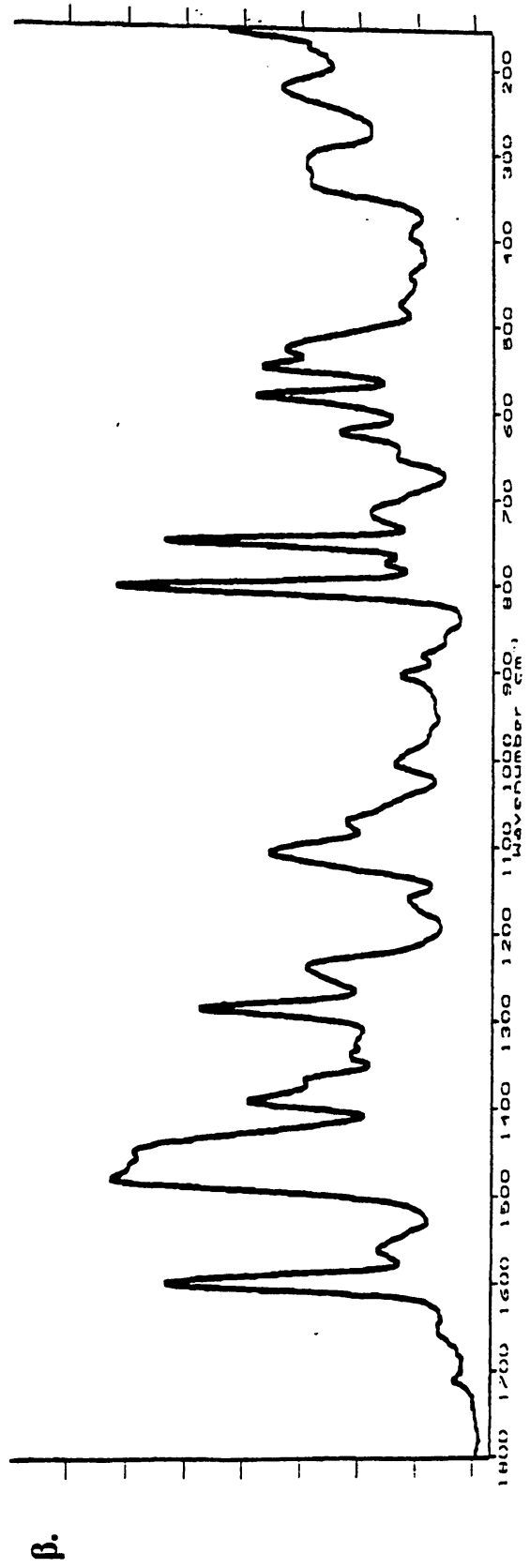
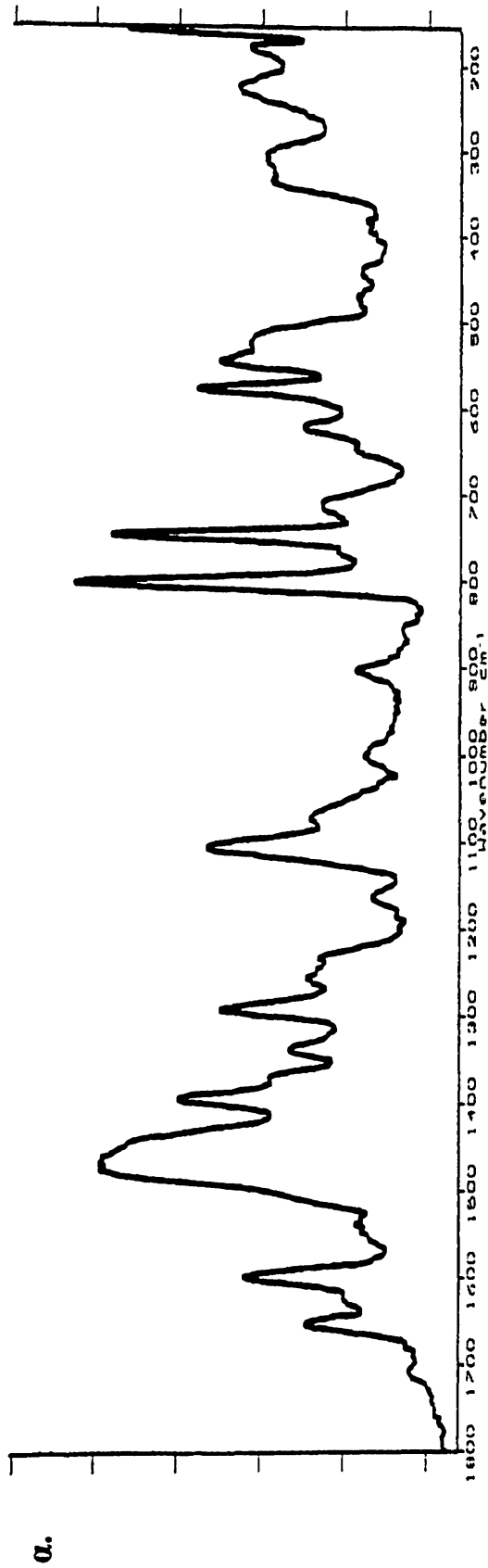
Σχήμα 53: Φάσματα IR των συμπλόκων α) $[\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$ και β) $[\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$.



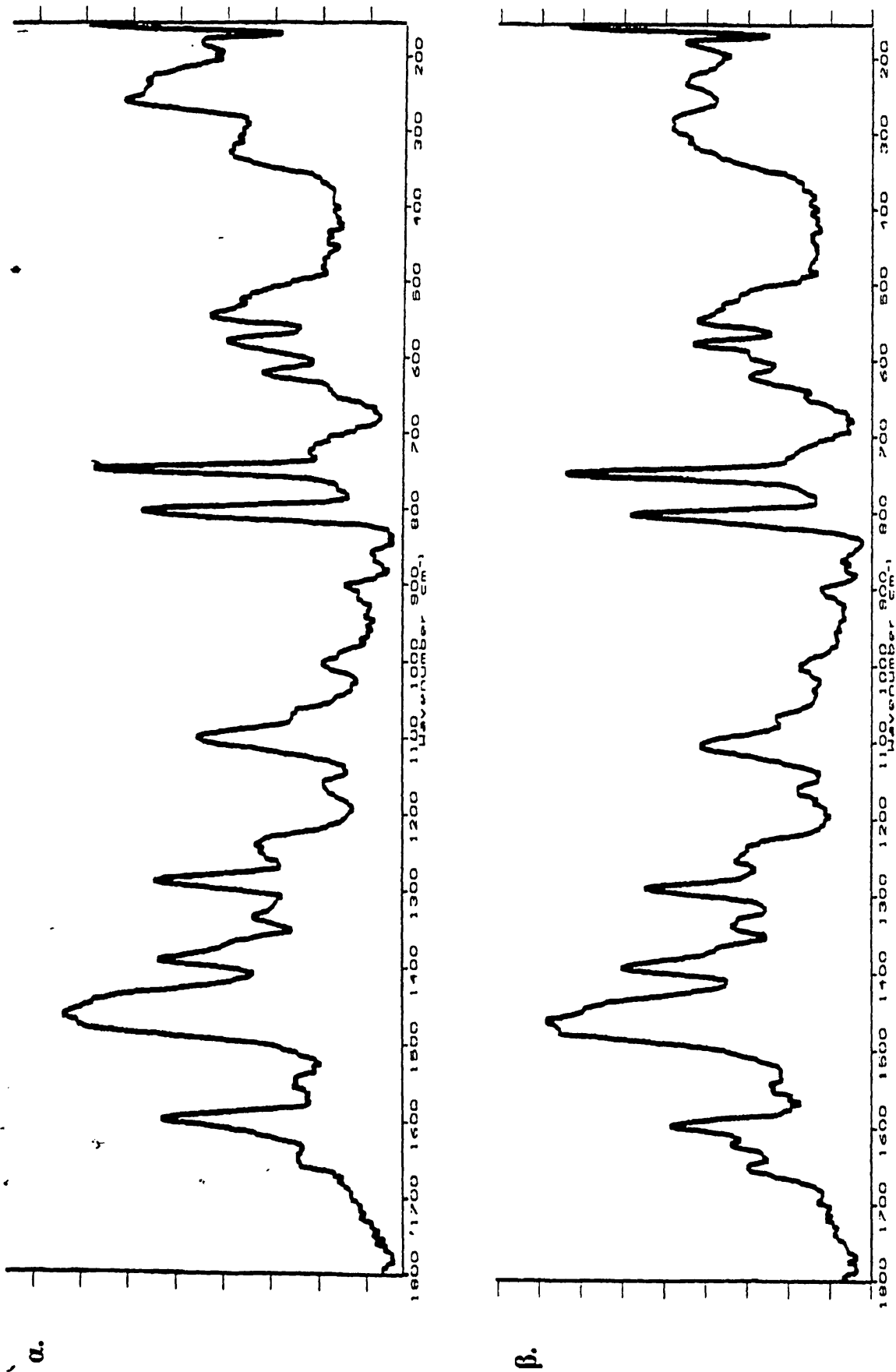
Σχήμα 54: Φάσματα IR των συμπλόκων α) $Zn(LH_3)Cl_3$ και β) $[Cu(LH)Cl]_n$.



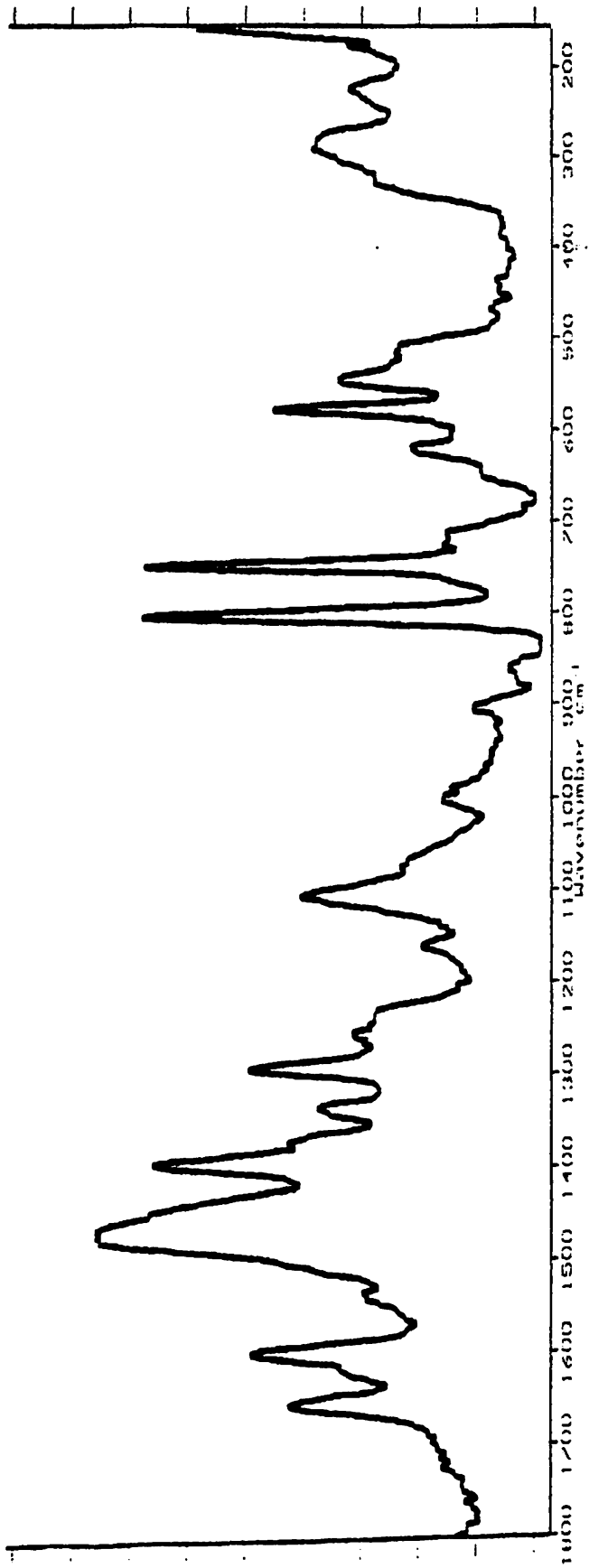
Σχήμα 55: Φάσματα Raman της HETPP στην μονοκατιονική της μορφή (LH₃)⁺Cl⁻: α) περιοχή 3500-200 cm⁻¹ β) περιοχή 1800-200 cm⁻¹.



Σχήμα 56: Φάσματα Raman της HETPP α) στην ουδέτερη της μορφή (LH_2) και β) στην μονοανιονική της μορφή (LH) K^+ .



Σχήμα 57: Φάσματα Raman των συμπλόκων α) $[\text{KCd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$ και β) $[\text{KZn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_n$.



Σχήμα 58: Φάσμα Raman του συμπλόκου $Zn(LH_3)Cl_3$.

II. Φάσματα ^{13}C -CP MAS NMR.

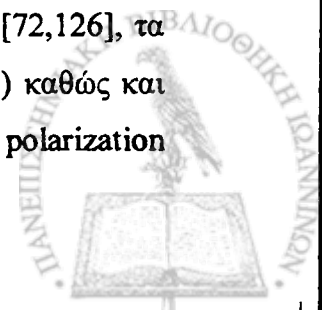
Τα φάσματα ^{13}C -NMR στη στερεά φάση μας παρέχουν σημαντικές πληροφορίες οι οποίες σε διαφορετική περίπτωση εξάγονται μόνο με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Σε αντίθεση με τα φάσματα ^{13}C -NMR σε διάλυμα, τα αντίστοιχα φάσματα στη στερεά φάση παρουσιάζουν πλατιές φασματικές γραμμές λόγω της χημικής ανισοτροπίας. Το εύρος των φασματικών γραμμών μπορεί να μειωθεί σημαντικά με χρήση των τεχνικών της διασταυρούμενης πόλωσης (cross polarization, CP) και της περιστροφής του δείγματος υπό "μαγική" γωνία (magic angle spinning, MAS) [212,213]. Στον επόμενο πίνακα (πίνακας 7) παραθέτονται τα δεδομένα ^{13}C -CP MAS NMR για τον υποκαταστάτη σε διαφορετικές καταστάσεις πρωτονίωσης καθώς και για τα σύμπλοκα Cd και Zn.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Χημικές μετατοπίσεις (δ , ppm) ^{13}C υποκαταστάτη και συμπλόκων στη στερεά φάση.

	$(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$	LH_2	$(\text{LH})^+\text{K}^+$	$\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$	$\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$	$\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$
C(2)	184.6, 177.9	183.7, 177.0	183.7	182.1, 176.6	181.9, 176.4	182.8, 175.9
C(2')	163.1	162.9	167.8	168.0	167.7	162.6
C(4')	163.1	162.9	161.6	161.6	162.6	162.6
C(4)	144.5	144.2	144.5	144.3	144.8	144.6
C(6')	141.0	142.0	151.4	151.9, 142.0, 147.0 ^a	150.9, 141.5 146.2 ^a	141.2
C(5)	134.5	134.4	134.5	133.9	134.1	134.0
C(5')	109.4	108.0	107.7	107.6	108.4	108.9
C(2 α)	66.0	65.6	65.8	65.7	66.0	66.1
C(5 β)	66.0	65.6	65.8	65.7	66.0	66.1
C(3,5')	48.3	48.3	49.1	48.8	48.6	48.3
C(5 α)	31.6	28.2	—	27.7	27.9	28.7
2 α -CH ₃	22.4	22.4	25.1	23.6	23.4	22.9
2'-CH ₃	22.4	22.4	25.1	23.6	23.4	22.9
4-CH ₃	12.5	12.5	12.1	12.7	23.2	13.2

^a=ο μέσος όρος των δυο τιμών.

Για τις αποδόσεις των ταινιών χρησιμοποιήθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα [72,126], τα αντίστοιχα δεδομένα απ' τα φάσματα ^{13}C -NMR σε διάλυμα (θα δοθούν παρακάτω) καθώς και πειράματα διασταυρούμενης πόλωσης-διακοπόμενης αποσύζευξης (cross polarization

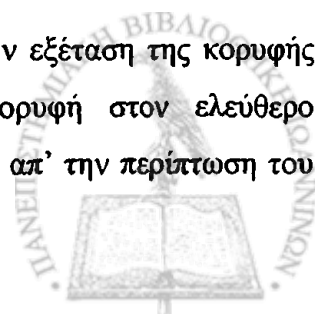


interrupted decoupling) στα οποία οι μεθινικοί και μεθυλενικοί άνθρακες εξαφανίζονται. Επίσης, όπου ήταν αναγκαίο χρησιμοποιήθηκαν και τα φάσματα που προκύπτουν απ' την αφαίρεση των φασμάτων διασταυρούμενης πόλωσης-διακοπτόμενης αποσύζευξης απ' τα κανονικά φάσματα ^{13}C -CP MAS NMR.

Το κύριο χαρακτηριστικό όλων των φασμάτων (σχήματα 59-64) είναι ότι παρουσιάζουν ευρείες φασματικές γραμμές της τάξης των 1-5 ppm. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στην έλλειψη κρυσταλλικότητας των στερεών και έχει ως αποτέλεσμα να μην μπορούν να διαχωριστούν οι κορυφές που οφείλονται στους C(5β)-C(2α), 2'-CH₃-2αCH₃ και C(2')-C(4) αφού επικαλύπτονται μεταξύ τους.

Επιπλέον, οι κορυφές των C(2) και C(6') σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζονται σαν μια ευρεία ταινία που σχάζεται σε μια ασύμμετρα διπλή κορυφή. Λαμβάνοντας υπόψη την απευθείας σύνδεση αυτών των δυο ατόμων άνθρακα με άτομα αζώτου, το παραπάνω φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί στην αλληλεπίδραση της τετραπολικής ροπής του πυρήνα του ^{14}N με το πυρηνικό spin του ^{13}C [214]. Οι παρατηρούμενες σχάσεις των κορυφών είναι 400-500 και ~700 Hz για τον C(2') και τον C(6') αντίστοιχα. Το μέγεθος της σχάσης αυτής εξαρτάται απ' την ένταση του εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου B και τη γεωμετρία του δεσμού ^{13}C - ^{14}N [214]. Έτσι, η σχάση του C_α της γλυκίνης, αλανίνης και βαλίνης βρέθηκε να είναι 100Hz, ενώ στην περίπτωση ενός πυρήνα ^{14}N με τετραπολικό παράγοντα $e^2qQ/h = 1.2 \text{ MHz}$ (Q=τετραπολική ροπή), B=3.53T και μήκος δεσμού C-N 1.487 Å η σχάση ήταν 66Hz [216]. Η παρατηρούμενη σχάση αναμένεται να αυξάνει με την αύξηση της σταθεράς τετραπολικής σύζευξης, την μείωση του μήκους δεσμού C-N ή την μείωση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου [216]. Οι τιμές του τετραπολικού παράγοντα e^2qQ/h βρέθηκαν (με χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού τετραπολικού συντονισμού (NQR)) ότι είναι 4.5 και 3.0 MHz για το N(1') της πυριμιδίνης και το άζωτο του ελεύθερου θειαζολίου αντίστοιχα [217] και είναι πολύ μεγαλύτερες απ' τις προηγούμενες περιπτώσεις [215,216]. Επιπλέον, τα μήκη δεσμών N(3)-C(2) και N(1')-C(6') όπως προκύπτουν απ' την κρυσταλλική δομή της HETPP, είναι 1.305 Å (διπλός δεσμός) και 1.391 Å (αρωματικός χαρακτήρας) αντίστοιχα. Αυτοί οι τύποι δεσμών αναμένονται να διατηρούνται και στα σύμπλοκα. Το μικρό μήκος τους οδηγεί σε ισχυρές συζεύξεις ^{13}C - ^{14}N οι οποίες σε συνδυασμό με τις μεγάλες τιμές του παράγοντα e^2qQ/h για το N(1') και το N(3) θα μπορούσαν να εξηγήσουν τις μεγάλες σχάσεις των κορυφών των C(2) και C(6') της τάξης των 500 και 700 Hz αντίστοιχα.

Η αλλαγή γεωμετρίας γύρω απ' το N(1') υποδεικνύεται απ' την εξέταση της κορυφής του C(6') η οποία ενώ παρουσιάζεται ως μια ευρεία απλή κορυφή στον ελεύθερο υποκαταστάτη, σχάζεται σε διπλή στα σύμπλοκα των Cd και Zn εκτός απ' την περίπτωση του



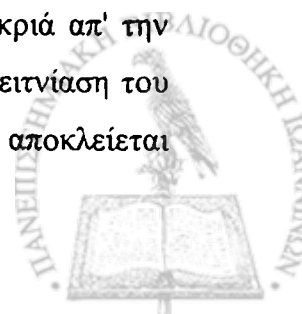
συμπλόκου $Zn(LH_3)Cl_3$ στο οποίο το $N(1')$ είναι πρωτονιωμένο. Το φαινόμενο της σχάσης αναμένεται να παρουσιάζεται και στους $C(2')$ και $C(4')$ που συνδέονται επίσης άμεσα με τα $N(3')$ και $N(4'a)H_2$ αντίστοιχα, αλλά δεν μπορεί να παρατηρηθεί λόγω αλληλεπικάλυψης των σημάτων τους.

Οι κορυφές των ανθράκων που αναμένεται να επηρεάζονται απ' την πρωτονίωση ή τη συμπλοκοποίηση είναι αυτές που αποδίδονται σε άνθρακες γειτονικούς στο $N(1')$, δηλαδή αυτές των $C(6')$, $C(2')$ και $2'-CH_3$, καθώς και σε άνθρακες γειτονικούς στην πυροφωσφορική ομάδα, δηλαδή αυτές των $C(5\alpha)$ και $C(5\beta)$. Έτσι κατά την πρωτονίωση (σύγκριση $(LH)K^+$ με $(LH_3)^-Cl^-$) οι τιμές δ των $C(2')$ και $C(6')$ μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία κατά 4.6 και 10.4 ppm αντίστοιχα όπως αναμένονταν [118,126], ενώ σύγκριση των τιμών δ για τον $C(6')$ στα σύμπλοκα $K_2\{[Cd(LH)Cl_2]_2\}$ και $K_2\{[Zn(LH)Cl_2]_2\}$ σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του $(LH)^-K^+$, αποκαλύπτει μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία κατά 5.2 και 4.4 ppm αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι η συμπλοκοποίηση λαμβάνει χώρα στο $N(1')$ της HETPP, σε αντίθεση με το σύμπλοκο $Zn(LH_3)Cl_3$ για το οποίο παρατηρείται τιμή δ ίδια μ' αυτή του $(LH_3)^+Cl^-$ όπου το $N(1')$ είναι πρωτονιωμένο.

Οι παραπάνω μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία είναι αποτέλεσμα δυο αντίθετων φαινομένων με διαφορετική επίδραση στους γειτονικούς στο $N(1')$ άνθρακες ($C(6')$, $C(2')$, $2'-CH_3$). α) Της συμπλοκοποίησης στο $N(1')$ με αποτέλεσμα την μετατόπιση των συχνοτήτων των γειτονικών ανθράκων σε χαμηλότερα πεδία (αποπροστασία) και β) τον εντοπισμό του αρνητικού φορτίου του ιόντος $[O_2MCl_2]^{2-}$ ($M=Cd, Zn$, τα δυο άτομα O του ιόντος ανήκουν στην πυροφωσφορική ομάδα ενός άλλου μορίου HETPP) κοντά στο άτομο $N(1')$ προκαλώντας έτσι προστασία των $C(6')$, $C(2')$ και $2'-CH_3$ και άρα μετατόπιση των σημάτων τους προς υψηλότερα πεδία [211, 218-220]. Προφανώς το δεύτερο φαινόμενο εδώ υπερσχύει του πρώτου με αποτέλεσμα την τελική μετατόπιση προς υψηλά πεδία.

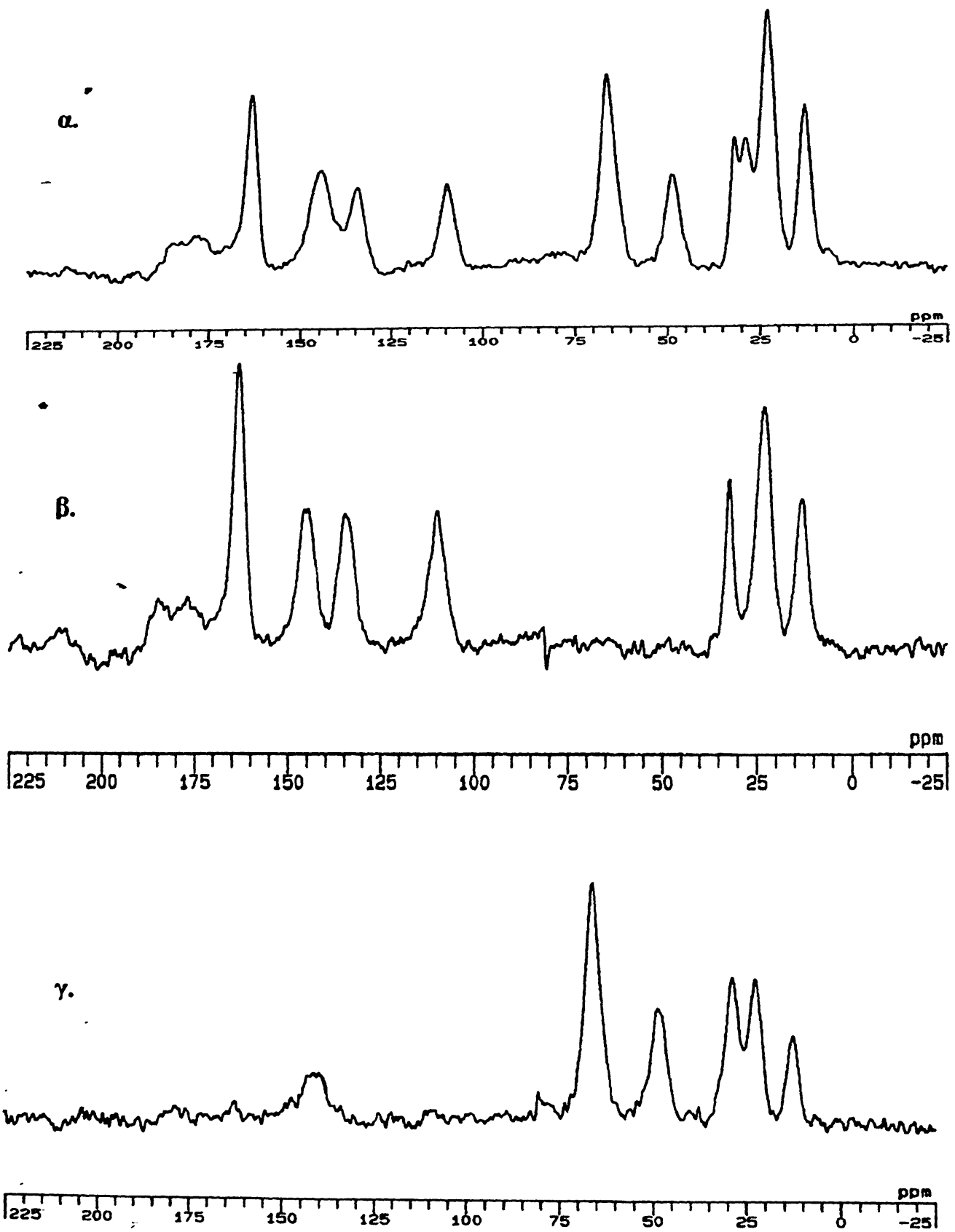
Λόγω της επικάλυψης των $2\alpha-CH_3$ και $2'-CH_3$ δεν μπορούν να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ υποκαταστάτη και συμπλόκων, ενώ το ίδιο πρόβλημα παρουσιάζεται και με την κορυφή του $C(5\beta)$ που επικαλύπτεται μ' αυτήν του $C(2\alpha)$.

Όσον αφορά την κορυφή του $C(5\alpha)$, ενώ δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθεί στην μονοανιωνική μορφή του υποκαταστάτη $(LH)^-K^+$ ώστε να συγκριθεί η τιμή της με τις αντίστοιχες των συμπλόκων, στην ένωση $Zn(LH_3)Cl_3$ παρουσιάζεται μετατοπισμένη κατά 3.9 ppm προς υψηλότερα πεδία. Δεδομένου του γεγονότος ότι ο $C(5\alpha)$ βρίσκεται μακριά απ' την πυροφωσφορική ομάδα, η παρατηρούμενη μετατόπιση μπορεί να οφείλεται στην γειννίαση του ογκώδους ανιόντος $[ZnCl_3]^-$ με την περιοχή της διφωσφορικής ομάδας, χωρίς να αποκλείεται και πιθανή αλληλεπίδραση μ' αυτή.



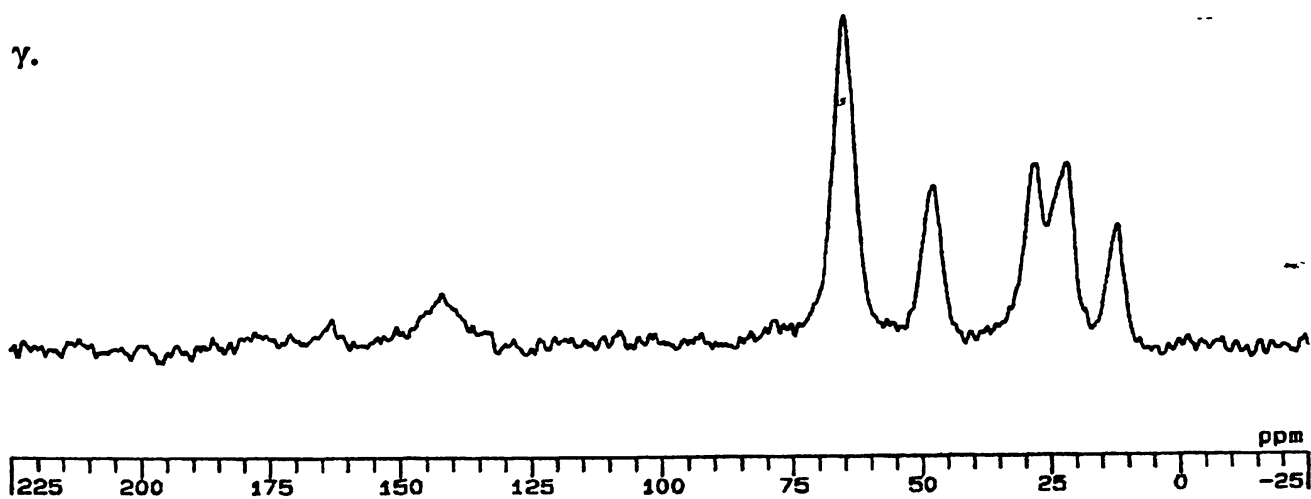
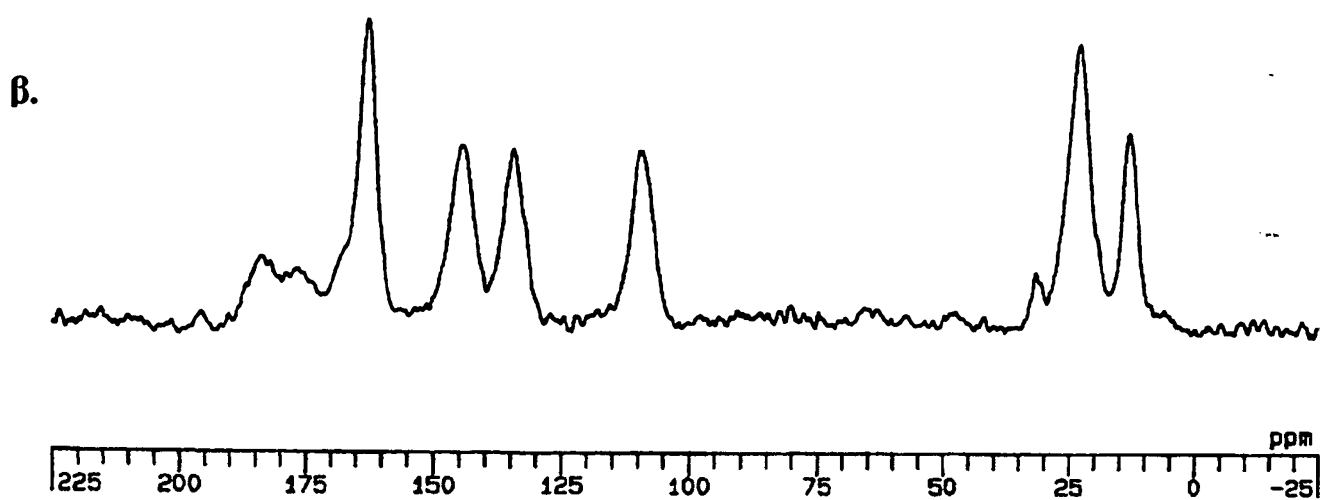
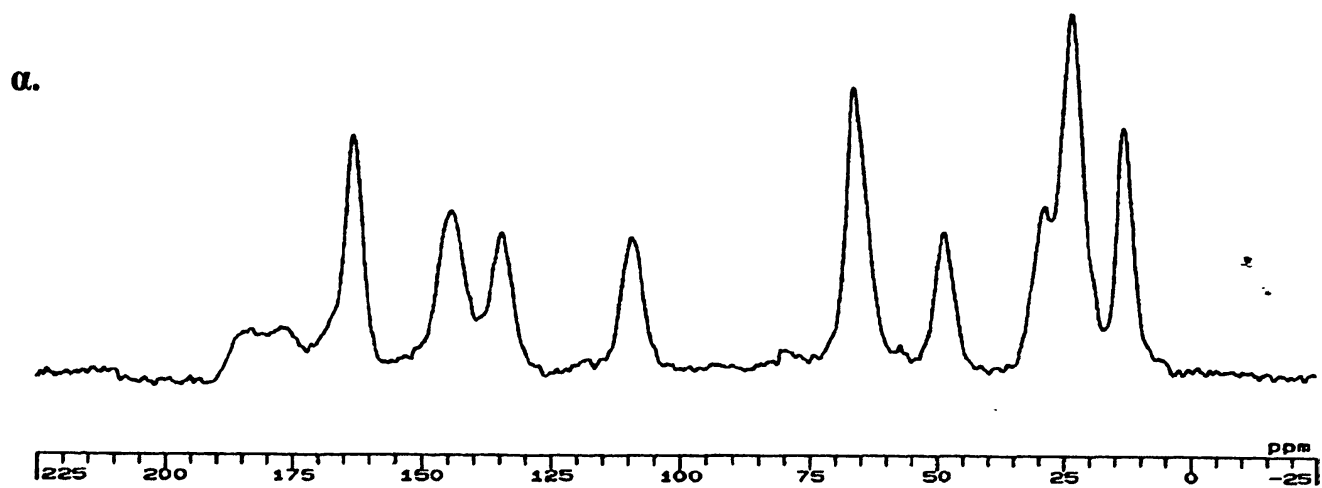
Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα καταλήγουμε στο συμπέρασμα της ένταξης του N(1') με τα μεταλλοϊόντα στα σύμπλοκα $K_2\{[Cd(LH)Cl_2]_2\}$ και $K_2\{[Zn(LH)Cl_2]_2\}$, ενώ στο $Zn(LH_3)Cl_3$ το N(1') είναι πρωτονιωμένο και το μεταλλικό ιόν πλησιάζει ή/και αλληλεπιδρά με την διφωσφορική ομάδα.





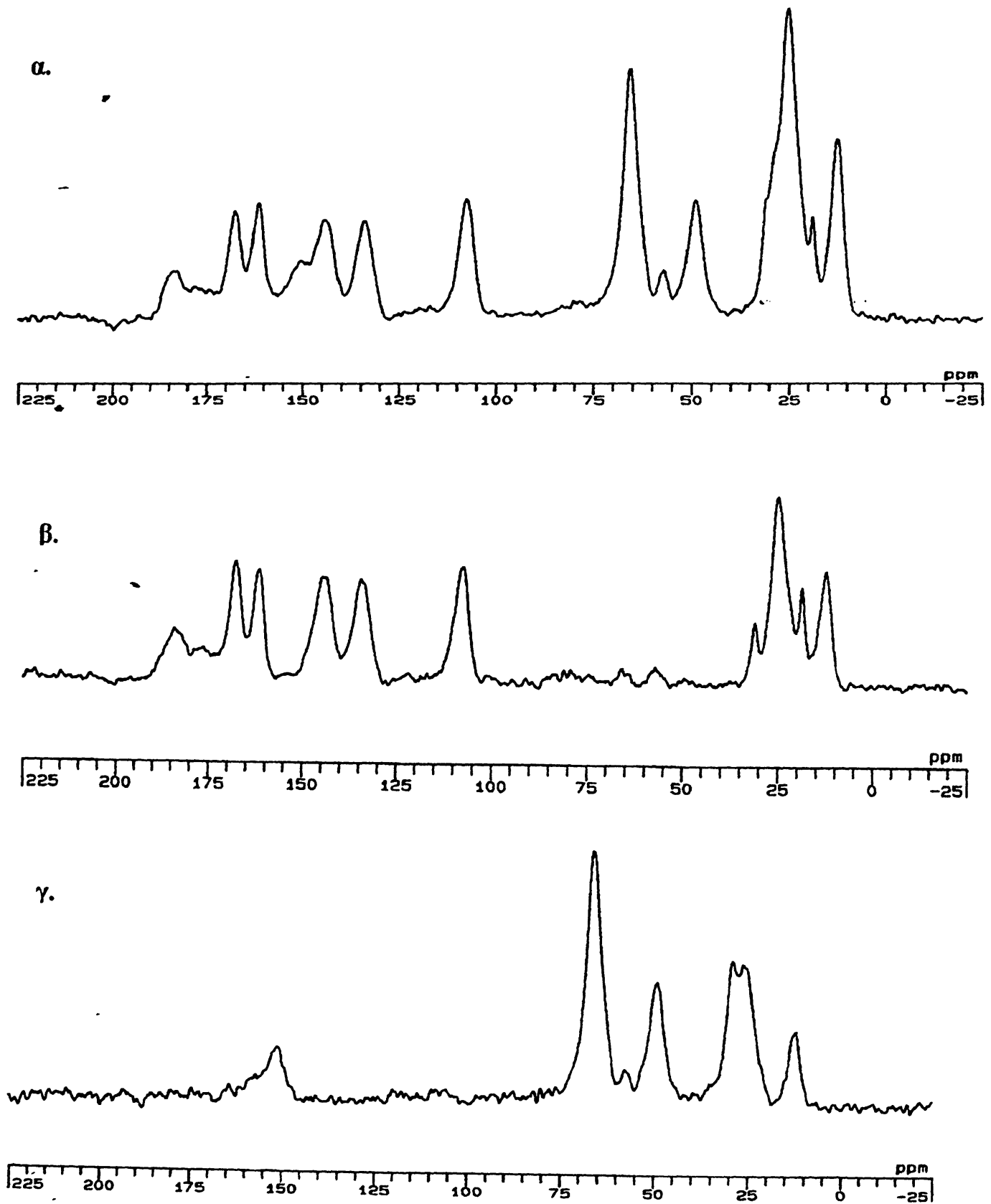
Σχήμα 59: Φάσματα ^{13}C -CP MAS NMR του $(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$: α) κανονικό φάσμα β) με την τεχνική CP-ID γ) φάσμα διαφοράς α-β.





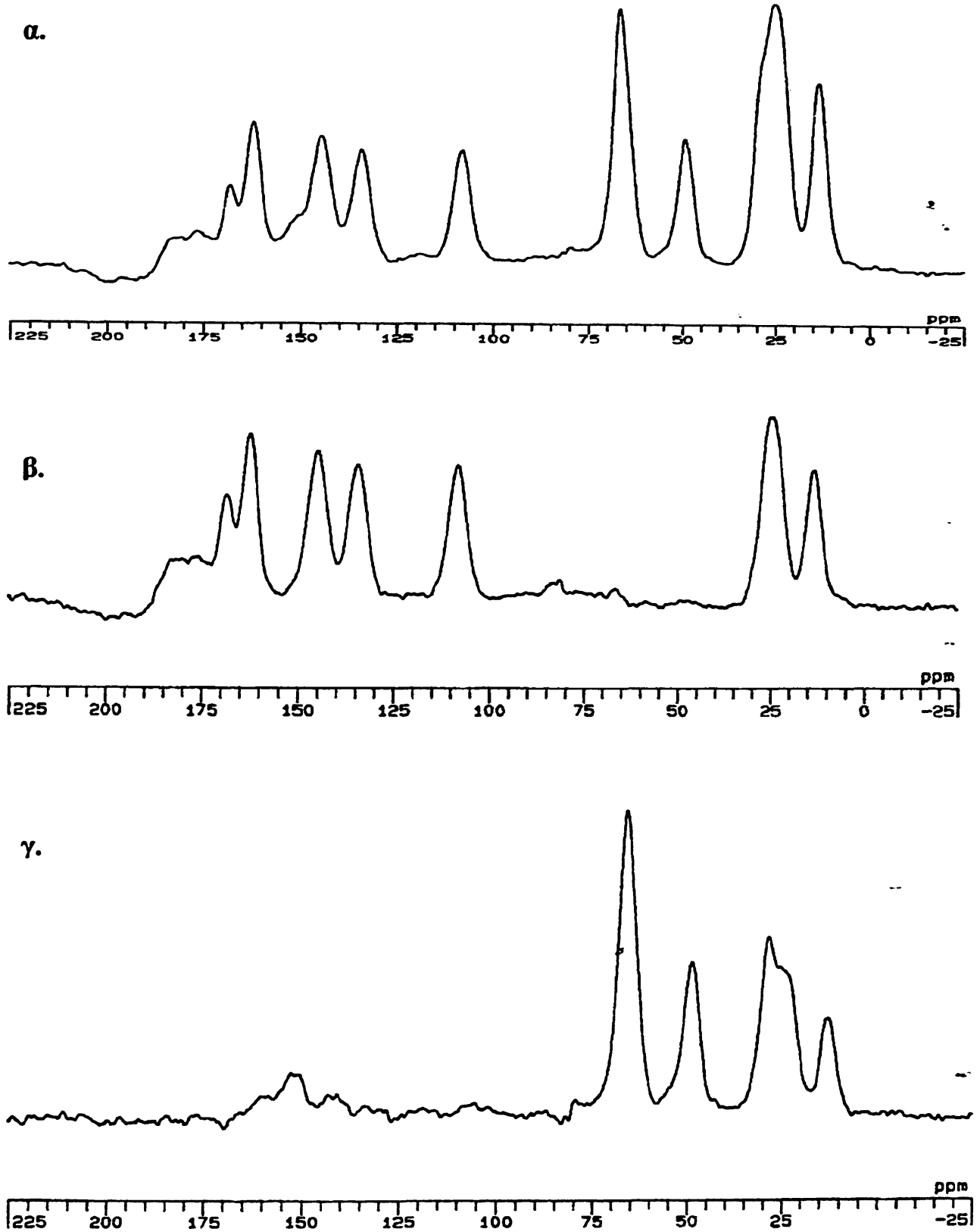
Σχήμα 60: Φάσματα ^{13}C -CP MAS NMR του LH_2 : α) κανονικό φάσμα β) με την τεχνική CP-ID γ) φάσμα διαφοράς α-β.





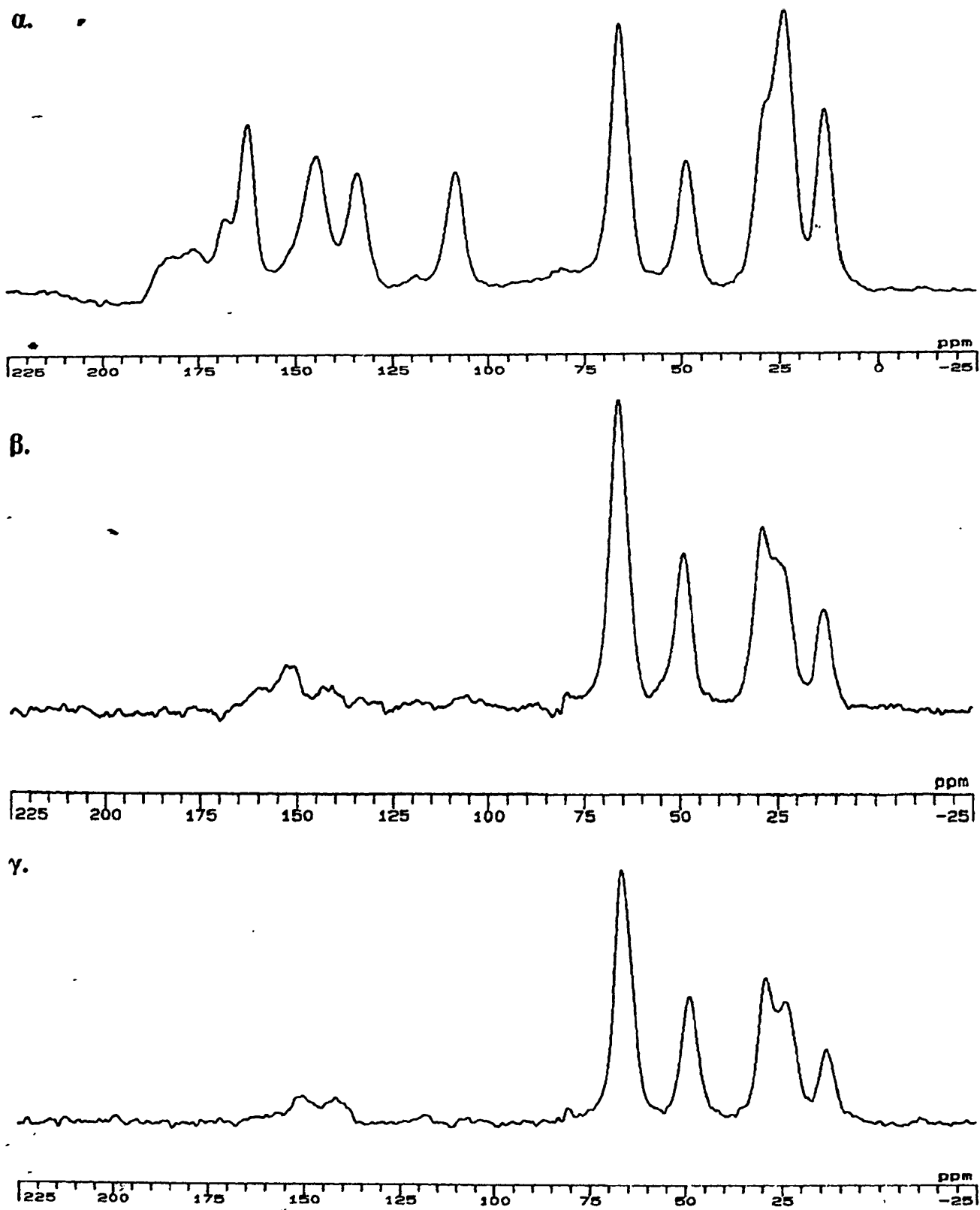
Σχήμα 61: Φάσματα ^{13}C -CP MAS NMR του $(\text{LH})\text{K}^+$: α) κανονικό φάσμα β) με την τεχνική CP-ID γ) φάσμα διαφοράς α-β.





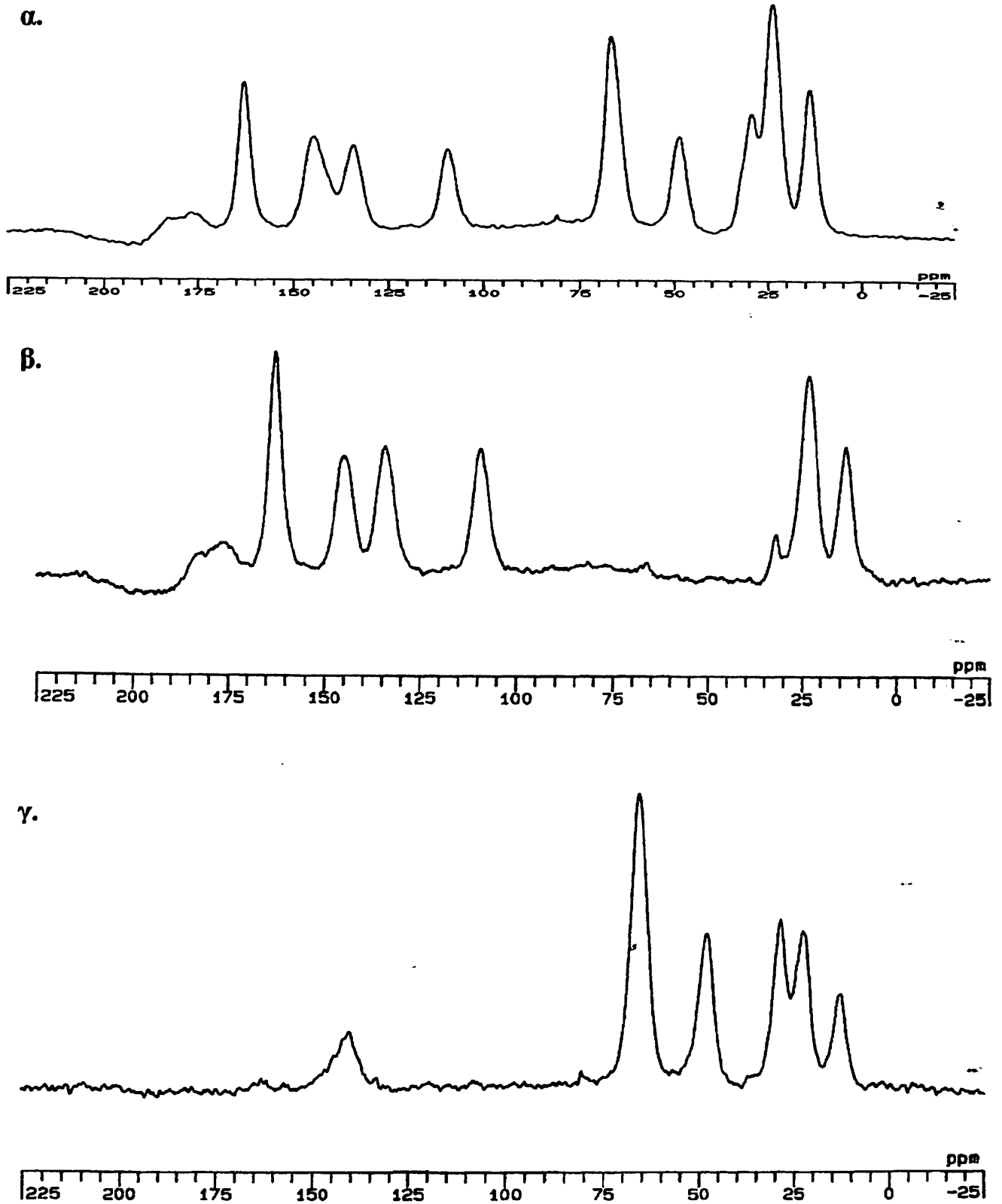
Σχήμα 62: Φάσματα ^{13}C -CP MAS NMR του συμπλόκου $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: α) κανονικό φάσμα β) με την τεχνική CP-ID γ) φάσμα διαφοράς α-β.





Σχήμα 63: Φάσματα ¹³C-CP MAS NMR του συμπλόκου $K_2\{[Zn(LH)Cl_2]_2\}$: α) κανονικό φάσμα β) με την τεχνική CP-ID γ) φάσμα διαφοράς α-β.





Σχήμα 64: Φάσματα ^{13}C -CP MAS NMR του συμπλόκου $\text{Zn}(\text{LH})_3\text{Cl}_3$: α) κανονικό φάσμα β) με την τεχνική CP-ID γ) φάσμα διαφοράς α-β.



Δ. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων σε διάλυμα.

Στο μέρος αυτό θα μελετήσουμε τη συμπεριφορά των συμπλόκων της HETPP σε διαλύματα D₂O και H₂O και θα εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τον τρόπο ένταξης των μεταλλικών ιόντων και τη διαμόρφωση του υποκαταστάτη σ' αυτά. Για τις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν φασματοσκοπίες ¹H, ¹³C, ³¹P, ¹¹³Cd-NMR, ¹H-¹H ROESY και ¹H-¹H NOESY NMR, ES-MS καθώς και ποτενσιομετρία.

I. Φασματοσκοπία ¹H-NMR.

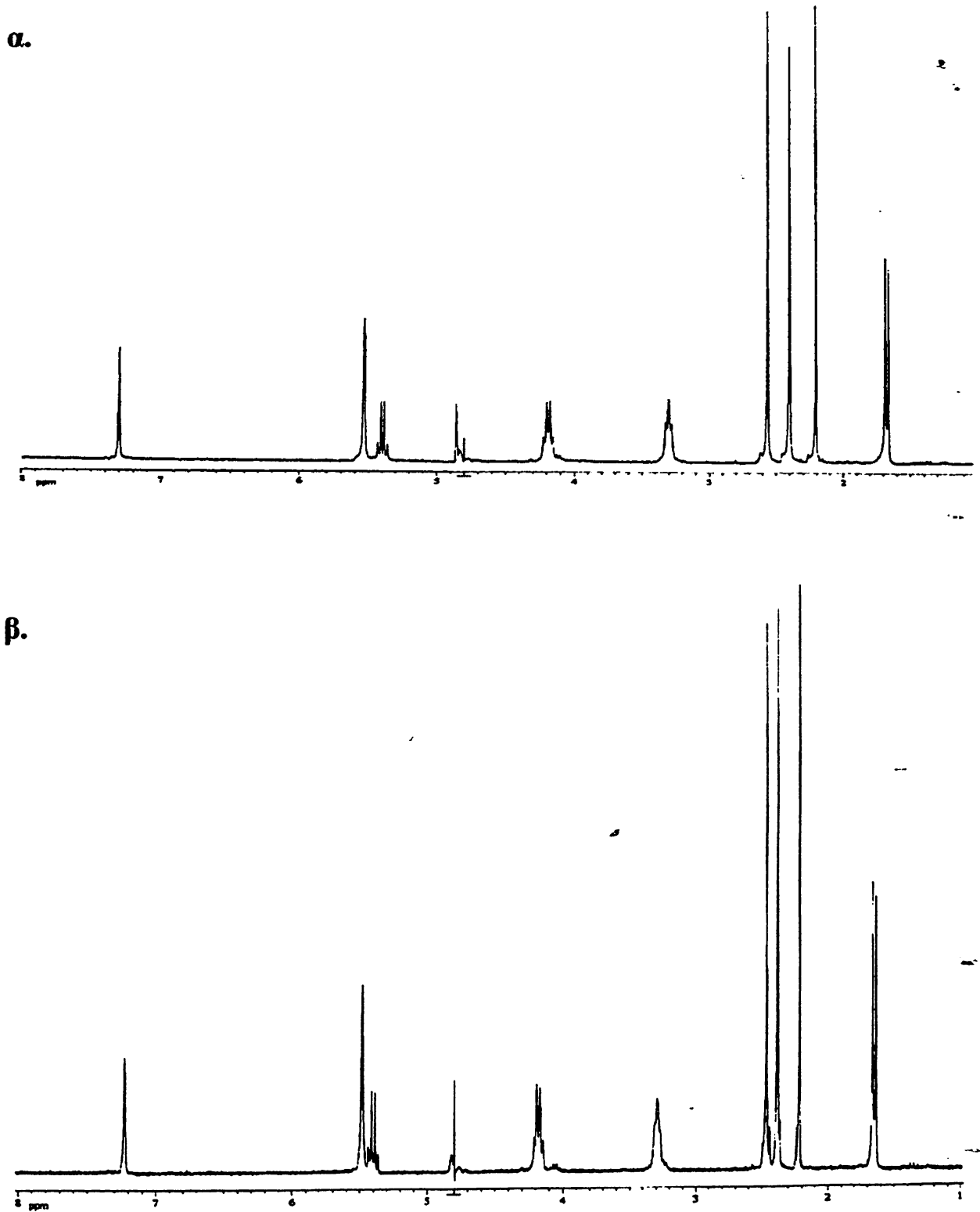
Τα δεδομένα που προκύπτουν απ' την ανάλυση των φασμάτων ¹H-NMR σε D₂O για τον υποκαταστάτη και τα σύμπλοκα δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 8).

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Χημικές μετατοπίσεις (δ, ppm) ¹H του υποκαταστάτη και των συμπλόκων σε διαλύματα D₂O.

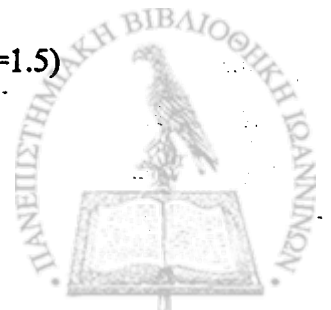
	H-C(6')	H ₂ C(3,5')	H-C(2α)	H ₂ C(5β)	H ₂ C(5α)	2'-CH ₃	4-CH ₃	2α-CH ₃
(LH ₃) ⁻ Cl ⁻ , pH=1.5	7.32	5.53	5.41	4.18	3.30	2.55	2.40	1.67
(LH) ⁺ K ⁺ , pH=6.0	7.22	5.48	5.40	4.19	3.29	2.45	2.38	1.65
K ₂ {[Cd(LH)Cl ₂] ₂ }	7.27	5.50	5.38	4.21	3.31	2.52	2.38	1.67
K ₂ {[Zn(LH)Cl ₂] ₂ }	7.14	5.51	5.39	4.21	3.32	2.54	2.37	1.67
Zn(LH ₃)Cl ₃	7.27	5.53	5.39	4.20	3.31	2.56	2.40	1.67

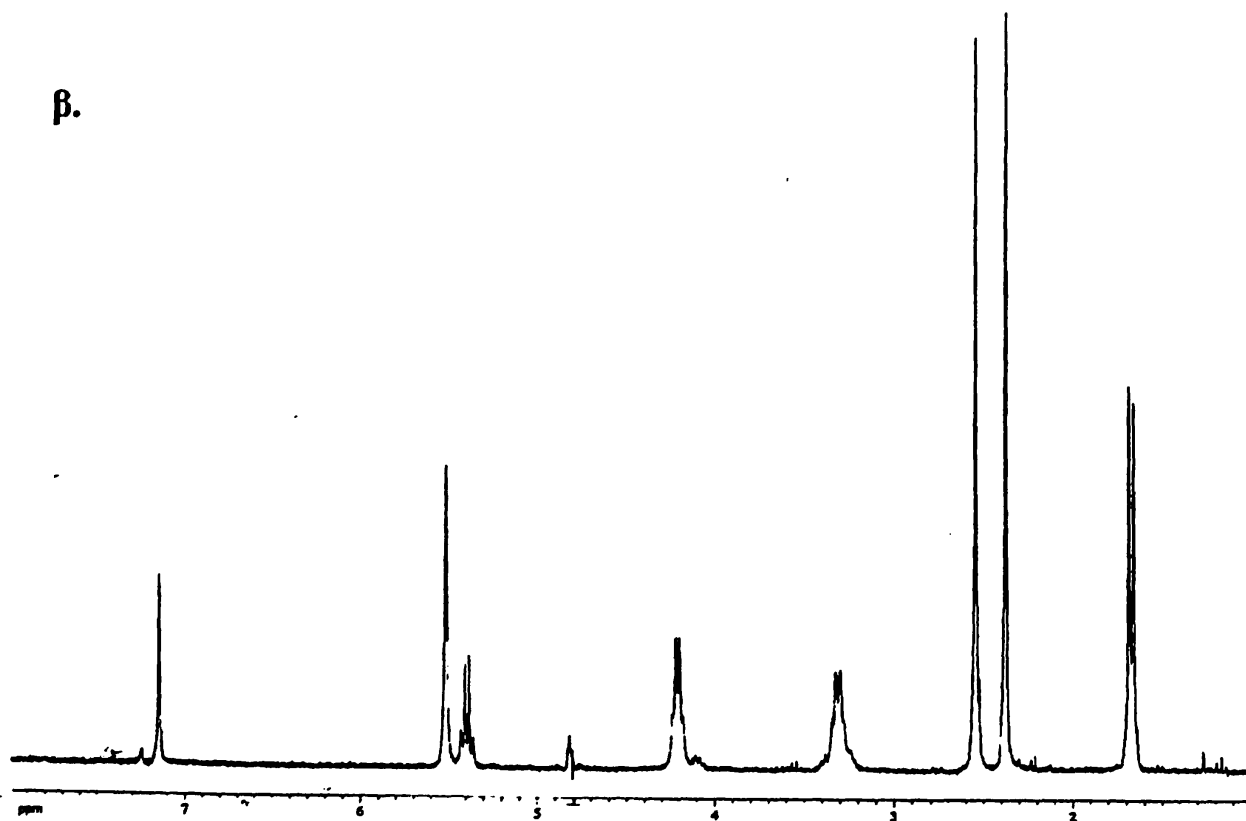
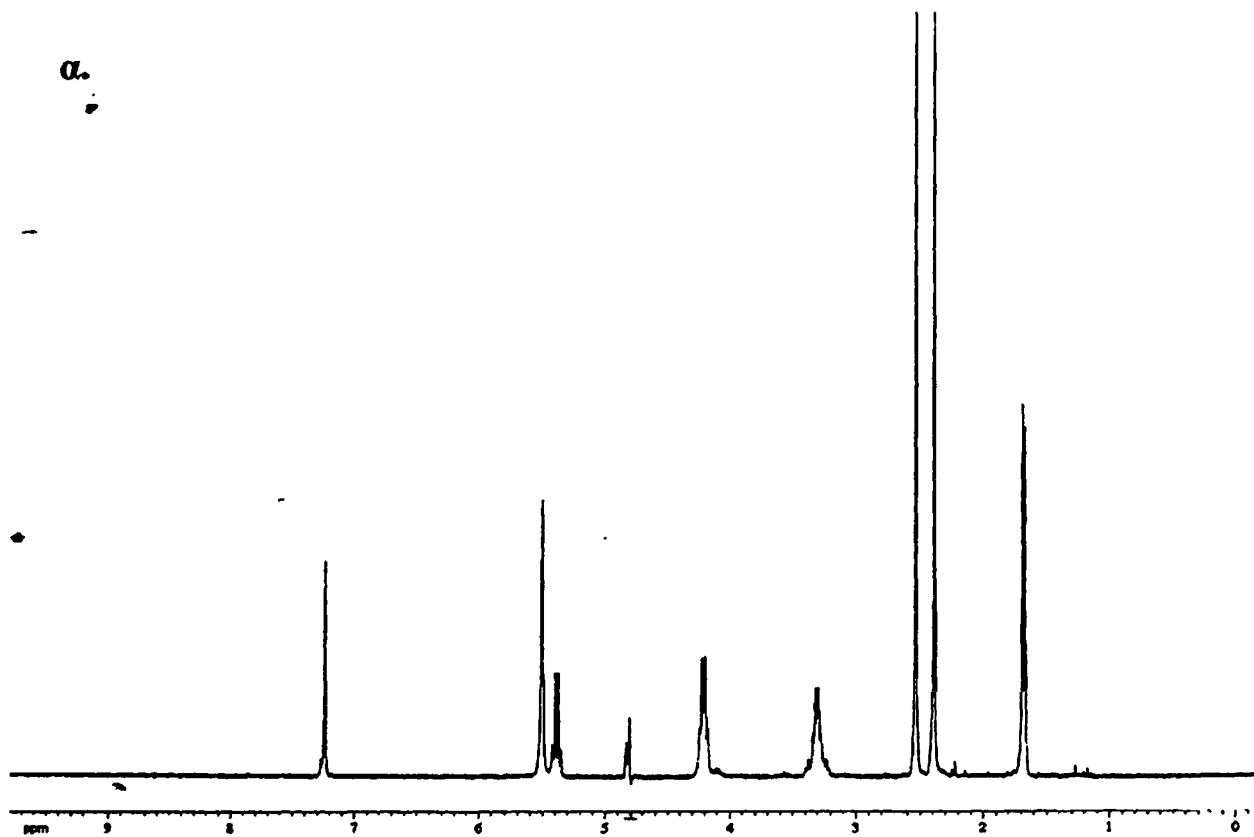
Κατά την πρωτονίωση του N(1') (σύγκριση (LH)⁺K⁺ με (LH₃)⁻Cl⁻) παρουσιάζεται μετατόπιση των τιμών δ του H-C(6') και 2'-CH₃ κατά 0.1 ppm σε χαμηλότερα πεδία λόγω εντοπισμού θετικού φορτίου πάνω στο άτομο N(1') [211]. Η συμπλοκοποίηση στη θέση αυτή προκαλεί μικρές μετατοπίσεις στα άτομα H-C(6') και 2'-CH₃ στην περίπτωση των συμπλόκων K₂{[Cd(LH)Cl₂]₂} και K₂{[Zn(LH)Cl₂]₂}. Το γεγονός αυτό πρέπει να οφείλεται στη δράση των δυο παραγόντων που αναφέρθηκαν και στην περίπτωση των φασμάτων ¹³C-CP MAS NMR (συμπλοκοποίηση: μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία - εντοπισμός αρνητικού φορτίου: μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία) [211, 218-220]. Εδώ μάλλον εξισοροπούνται οι δυο αυτοί παράγοντες με τελικό αποτέλεσμα τις πολύ μικρές διαφορές μεταξύ του υποκαταστάτη (LH)⁺K⁺ και των συμπλόκων. Για τον ίδιο λόγο ίσως δεν παρατηρούνται αλλαγές και στις χημικές μετατοπίσεις των H₂C(5α) και H₂C(5β), γεγονός που θα αποτελούσε ένδειξη ένταξης της πυροφωσφορικής ομάδας. Τέλος η πιθανή ταχεία ανταλλαγή των δυο ευκίνητων μεταλλοϊόντων

Cd(II) και Zn(II) με μόρια διαλύτη μπορεί να παίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Τα φάσματα ^1H -NMR της HETPP και των συμπλόκων της δίνονται στα σχήματα 65-67.



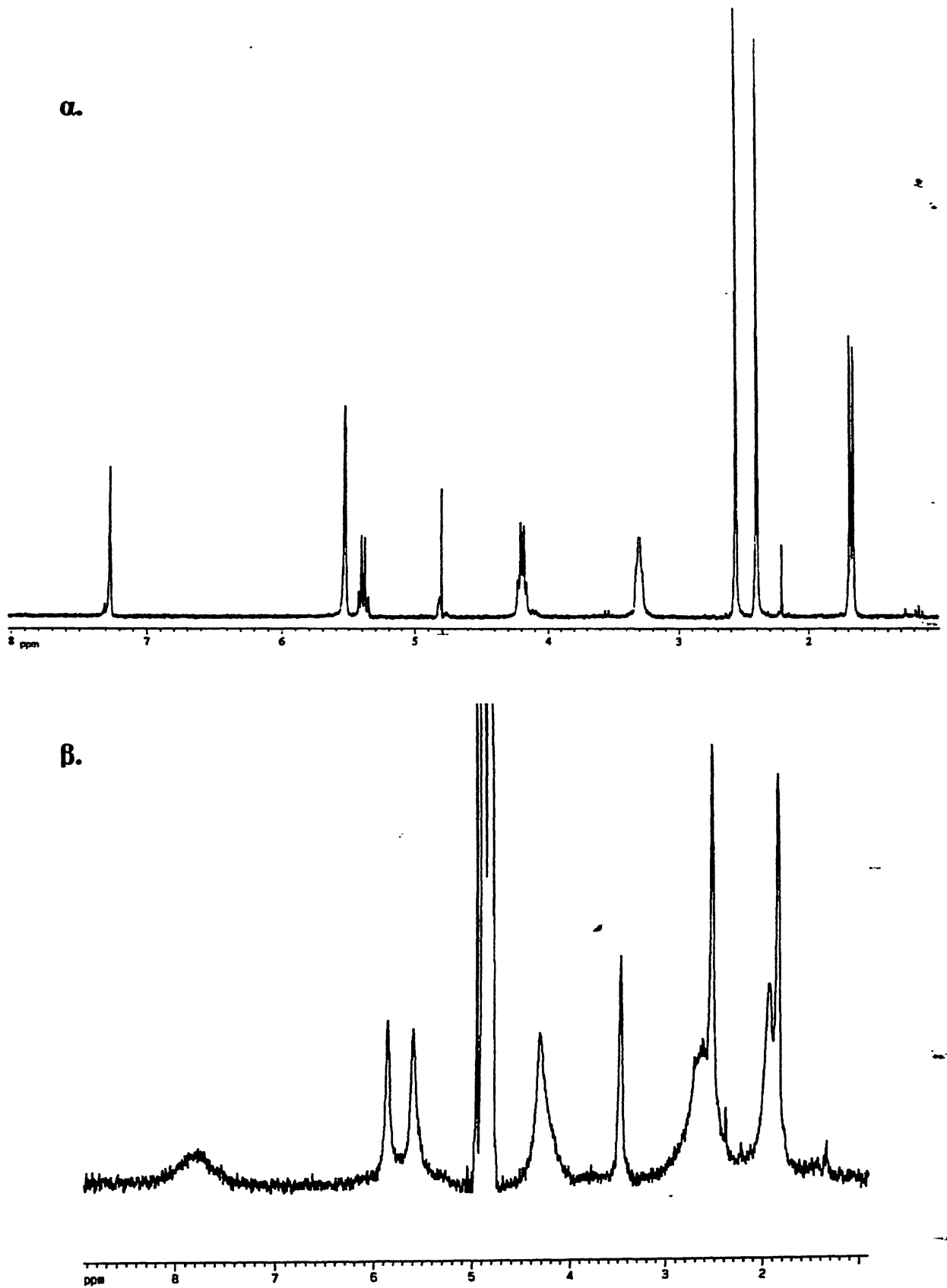
Σχήμα 65: Φάσματα ^1H -NMR σε διαλύματα D_2O : α) του $(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$ (pH=1.5)
β) του $(\text{LH})\text{K}^+$ (pH=6.0).





Σχήμα 66: Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των συμπλόκων σε διαλύματα D_2O : α) του $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$
β) του $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$.





Σχήμα 67: Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των συμπλόκων σε διαλύματα D_2O : α) του $\text{Zn}(\text{LH})_3\text{Cl}_3$
β) του $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_2$.



Είναι γνωστό ότι η παρουσία παραμαγνητικών ιόντων επηρεάζει πολύ τους χρόνους αποδιέγερσης πυρήνων όπως το πρωτόνιο ή ο φωσφόρος. Έτσι η παρουσία Cu(II) προκαλεί μεγάλη διεύρυνση ως και εξαφάνιση των φασματικών γραμμών των πυρήνων που βρίσκονται κοντά στο παραμαγνητικό κέντρο (Cu(II)). Αυτό οφείλεται στη σύζευξη διπόλου-διπόλου μεταξύ του μελετούμενου πυρήνα και του αζύζευκτου ηλεκτρονίου του Cu(II) οδηγώντας σε πολύ μικρούς χρόνους αποδιέγερσης και άρα σημαντική διεύρυνση των φασματικών γραμμών [221].

Έτσι στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_2$ (σχήμα 67β) η κορυφή που αντιστοιχεί στο H-C(6') είναι αυτή που επηρεάζεται περισσότερο. Πιο συγκεκριμένα μετατοπίζεται κατά 0.6 ppm προς χαμηλότερα πεδία, ενώ η διεύρυνσή της ($\Delta W_{1/2}$) είναι 144 Hz. Ανάλογα, η διεύρυνση της κορυφής του $\text{H}_2\text{C}(5\beta)$ είναι 48 Hz, ενώ η αντίστοιχη τιμή του 2'- CH_3 δεν μπορεί να προσδιοριστεί λόγω μερικής επικάλυψης της παραπάνω κορυφής με αυτή του 4- CH_3 . Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ένταξη και του N(1') και της πυροφωσφορικής ομάδας με το ιόν Cu(II).



II. Φασματοσκοπία ^{13}C -NMR.

Οι χημικές μετατοπίσεις ^{13}C μαζί με τις αποδόσεις των κορυφών δίνονται στον πίνακα 9. Για τις αποδόσεις των κορυφών χρησιμοποιήθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα [211] καθώς και πειράματα ^{13}C DEPT 135° NMR στα οποία οι κορυφές που οφείλονται σε μεθυλικές και μεθινικές ομάδες εμφανίζονται θετικές, αυτές που οφείλονται σε μεθυλενικές αρνητικές, ενώ δεν εμφανίζονται καθόλου οι κορυφές των τεταρτοταγών ανθράκων. Το pH διαλυμάτων του υποκαταστάτη σε D_2O ρυθμίστηκε με KOD.

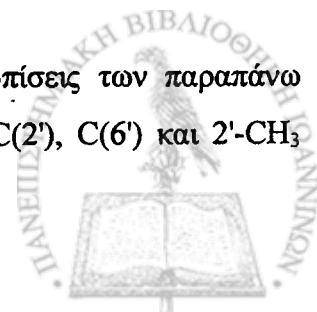
ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Χημικές μετατοπίσεις ^{13}C (δ , ppm) του υποκαταστάτη σε διάφορες τιμές pH και των συμπλόκων, σε διαλύματα D_2O .

	$(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$ pH=2.1	LH_2 pH=4.4	LH_2 pH=5.0	$(\text{LH})\text{K}^+$ pH=6.0	$\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ pH=5.0	$\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ pH=4.4	$\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$ pH=3.0
C(2)	181.5	181.1	181.4	181.3	181.4	181.5	181.4
C(2')	165.4	165.8	166.6	168.7	167.1	167.2	165.3
C(4')	164.7	164.6	164.2	163.5	163.7	164.0	164.5
C(4)	147.2	147.2	147.2	147.1	147.4	147.2	147.0
C(6')	141.9	142.9	145.0	149.7	147.2	145.6	141.9
C(5)	136.7	136.7	136.6	136.4	136.3	136.2	136.4
C(5')	111.7	111.6	111.2	110.5	110.7	111.0	111.4
C(2 α)	67.3	67.3	67.3	67.4	67.2	67.2	67.1
C(5 β)	67.7,67.3	67.6,67.6	67,6,67.6	67.5,67.4	67.8, 67.9	67.9, 67.9	67.6, 67.7
C(3,5')	49.5	49.6	49.7	50.0	49.6	49.6	49.4
C(5 α)	30.4,30.3	30.5,30.4	30.5,30.4	30.4,30.5	30.1, 30.2,	30.2, 30.2	30.2, 30.3
2 α -CH ₃	24.6	24.6	24.7	24.7	24.5	24.6	24.5
2'-CH ₃	23.6	23.9	24.4	25.7	25.3	24.9	23.6
4-CH ₃	14.1	14.1	14.1	14.1	13.9	14.0	13.9

Απ' την μελέτη των φασμάτων ^{13}C -NMR προκύπτουν τα εξής:

α) Σύγκριση των φασμάτων των $(\text{LH})\text{K}^+$ (pH=6.0) και LH_2 (pH=4.4) αποκαλύπτει ότι τα άτομα άνθρακα που βρίσκονται κοντά στο N(1') (C(2'), C(6') και 2'-CH₃) προστατεύονται (μετατόπιση των τιμών δ προς υψηλότερα πεδία). Το φαινόμενο αυτό που παρατηρείται κατά την αποπρωτονίωση του N(1') ($\text{pK}_a \sim 5.5$) [9] αποδίδεται σε φαινόμενα πόλωσης φορτίου και στο ρεύμα δακτυλίου του πυριμιδινικού τμήματος των μορίων [118].

β) Συμπλοκοποίηση στη θέση N(1') προκαλεί επίσης μετατοπίσεις των παραπάνω ανθράκων προς υψηλότερα πεδία. Συγκεκριμένα οι τιμές δ για τους C(2'), C(6') και 2'-CH₃



μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία κατά 1.5, 4.1 και 0.8 ppm αντίστοιχα στην περίπτωση του συμπλόκου $K_2\{[Zn(LH)Cl_2]_2\}$ και 1.6, 2.5, 0.4 ppm για το σύμπλοκο $K_2\{[Cd(LH)Cl_2]_2\}$ σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του υποκαταστάτη σε pH=6.0. Και σ' αυτή την περίπτωση οι μετατοπίσεις μπορούν να ερμηνευθούν ως αποτέλεσμα της αντίρροπης δράσης δυο φαινομένων. Δηλαδή απ' τη μια της συμπλοκοποίησης η οποία προκαλεί μετατόπιση σε χαμηλά πεδία και του εντοπισμού απ' την άλλη του αρνητικού φορτίου του ιόντος $[O_2MCl_2]^-$ κοντά στο N(1') με αποτέλεσμα την προστασία των γειτονικών ανθράκων (μετατόπιση προς υψηλά πεδία).

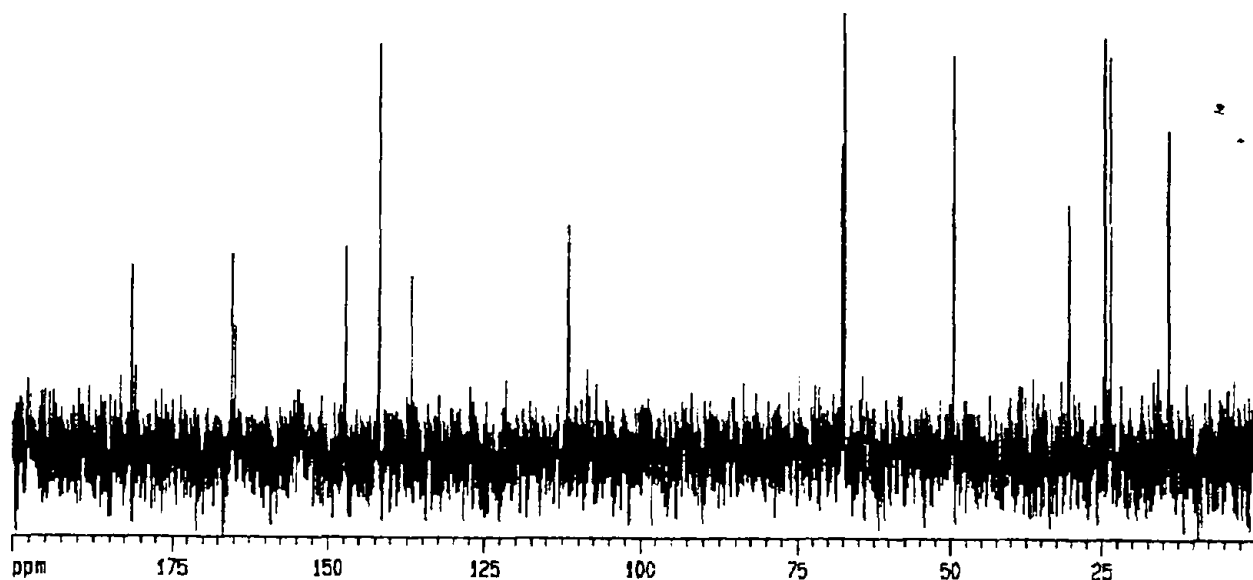
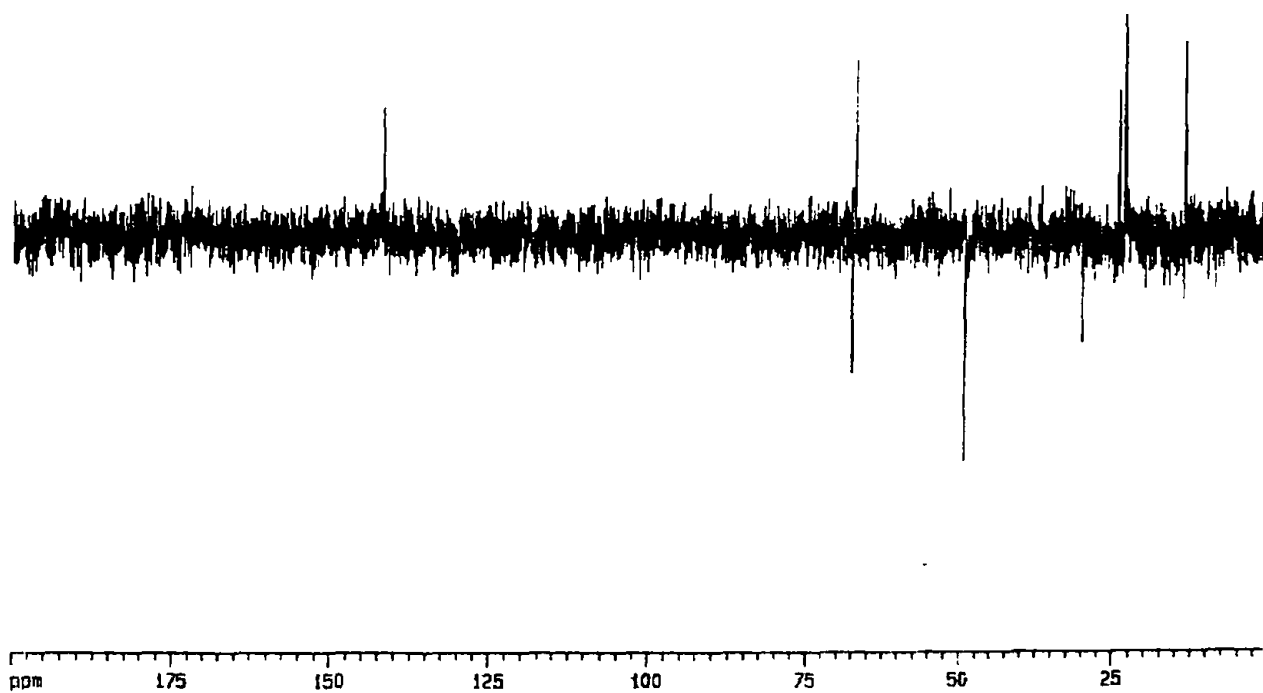
γ) Οι χημικές μετατοπίσεις των C(5α) και C(5β) που βρίσκονται πλησιέστερα στην πυροφωσφορική ομάδα δεν παρουσιάζουν μεταβολές κατά τη συμπλοκοποίηση. Το γεγονός ότι οι άνθρακες αυτοί εντοπίζονται σχετικά μακριά απ' τη θέση ένταξης του μεταλλοϊόντος στην πυροφωσφορική ομάδα (απόσταση 5 και 4 δεσμών αντίστοιχα), καθώς και η πιθανότητα μερικής διάσπασης των ασθενέστερων δεσμών μετάλλου-πυροφωσφορικών οξυγόνων σε διάλυμα, αποτελούν πιθανούς λόγους για το παραπάνω φαινόμενο, της μη μετατόπισης δηλαδή των τιμών δ των C(5α) και C(5β) στα σύμπλοκα.

δ) Οι τιμές δ των C(2'), C(6') και 2'-CH₃ στο σύμπλοκο $Zn(LH_3)Cl_3$ είναι ίδιες με τις αντίστοιχες του πρωτονιωμένου υποκαταστάτη $(LH_3)^+Cl^-$, ενισχύοντας επιπλέον τα προηγούμενα συμπεράσματά μας ότι το N(1') είναι πρωτονιωμένο στην ένωση αυτή.

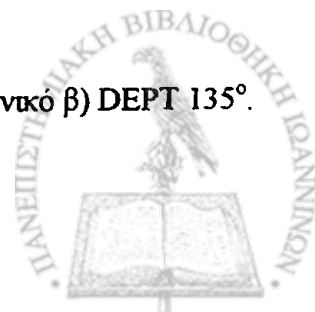
ε) Ένα τελευταίο φαινόμενο που παρατηρείται τόσο στα φάσματα των υποκαταστατών όσο και των συμπλόκων είναι ότι οι κορυφές των C(5α) και C(5β) εμφανίζονται ως ψευδοδιπλές. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται σε σταθεροποίηση της εύκαμπτης πυροφωσφορικής ομάδας σε δυο διαφορετικές διαμορφώσεις.

Στα σχήματα 68-73 παρουσιάζονται τα φάσματα ^{13}C και ^{13}C -DEPT 135° υποκαταστάτη και συμπλόκων.

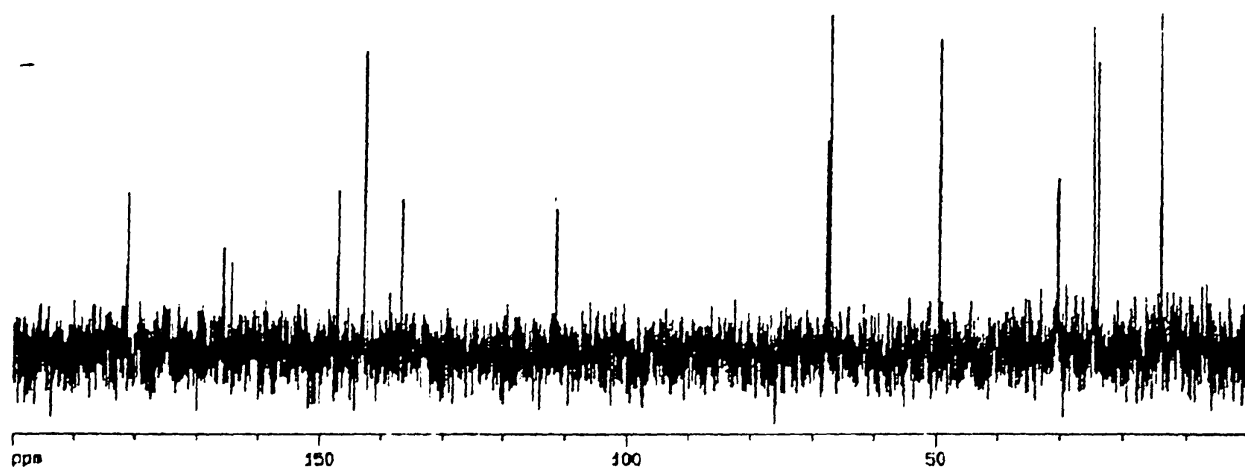


α.**β.**

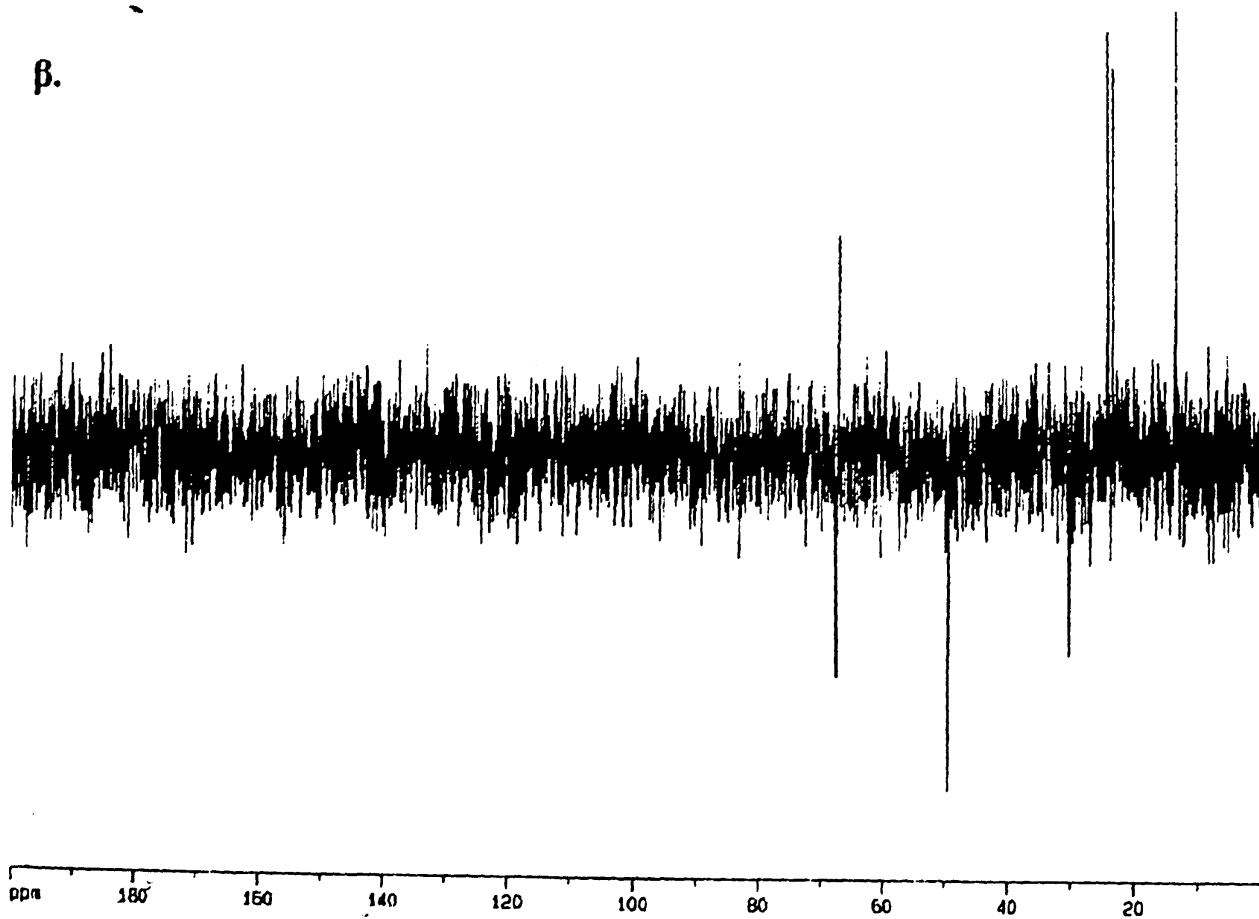
Σχήμα 68: Φάσματα ^{13}C -NMR σε D_2O του $(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$ (pH=2.1): α) κανονικό β) DEPT 135°.



α.

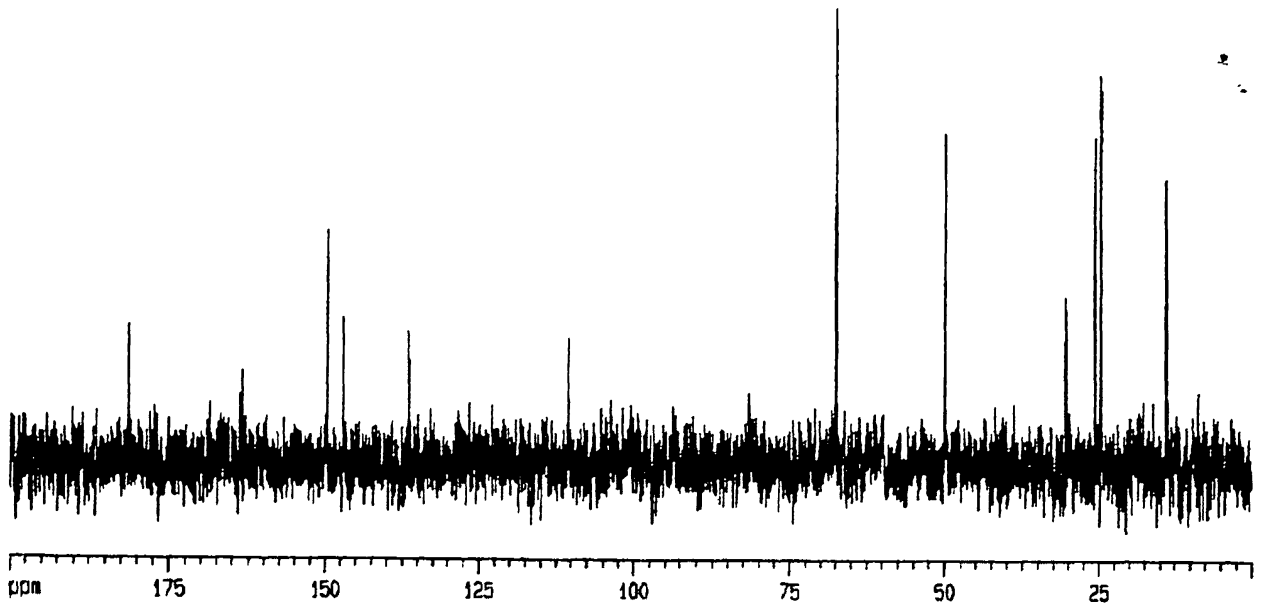
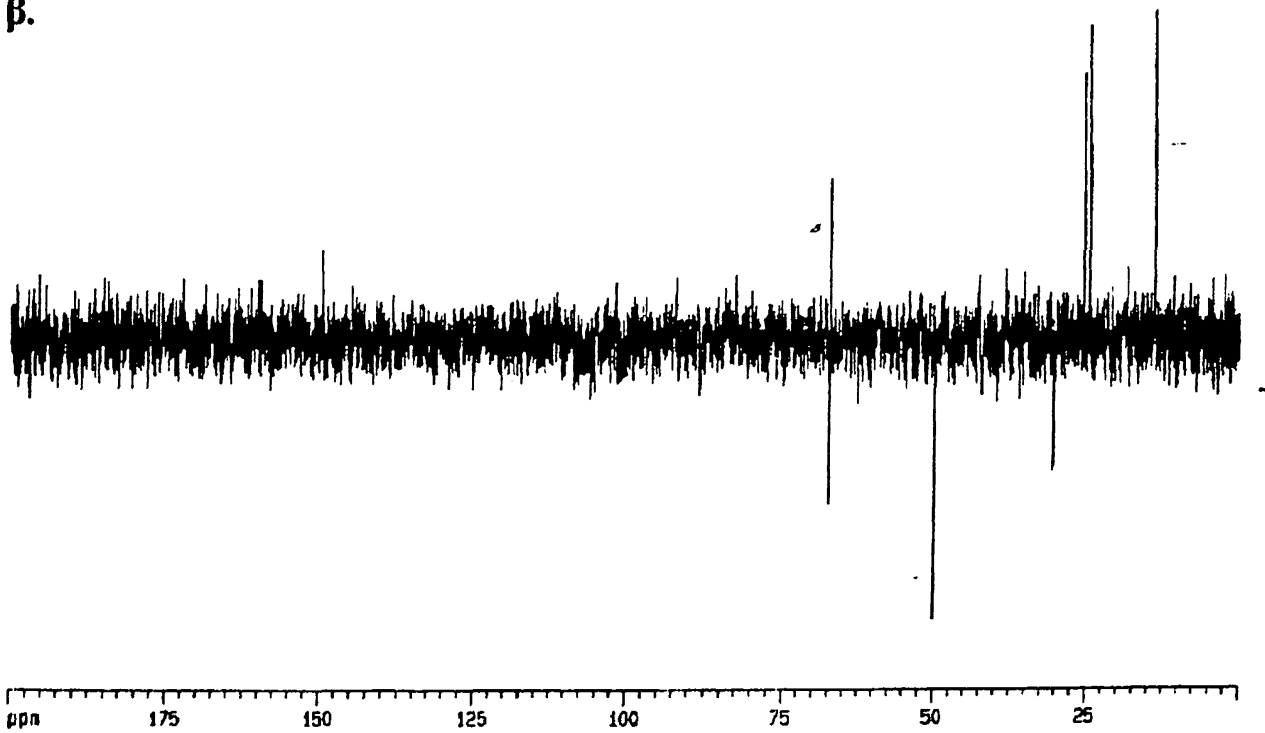


β.

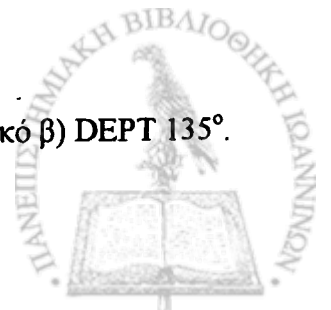


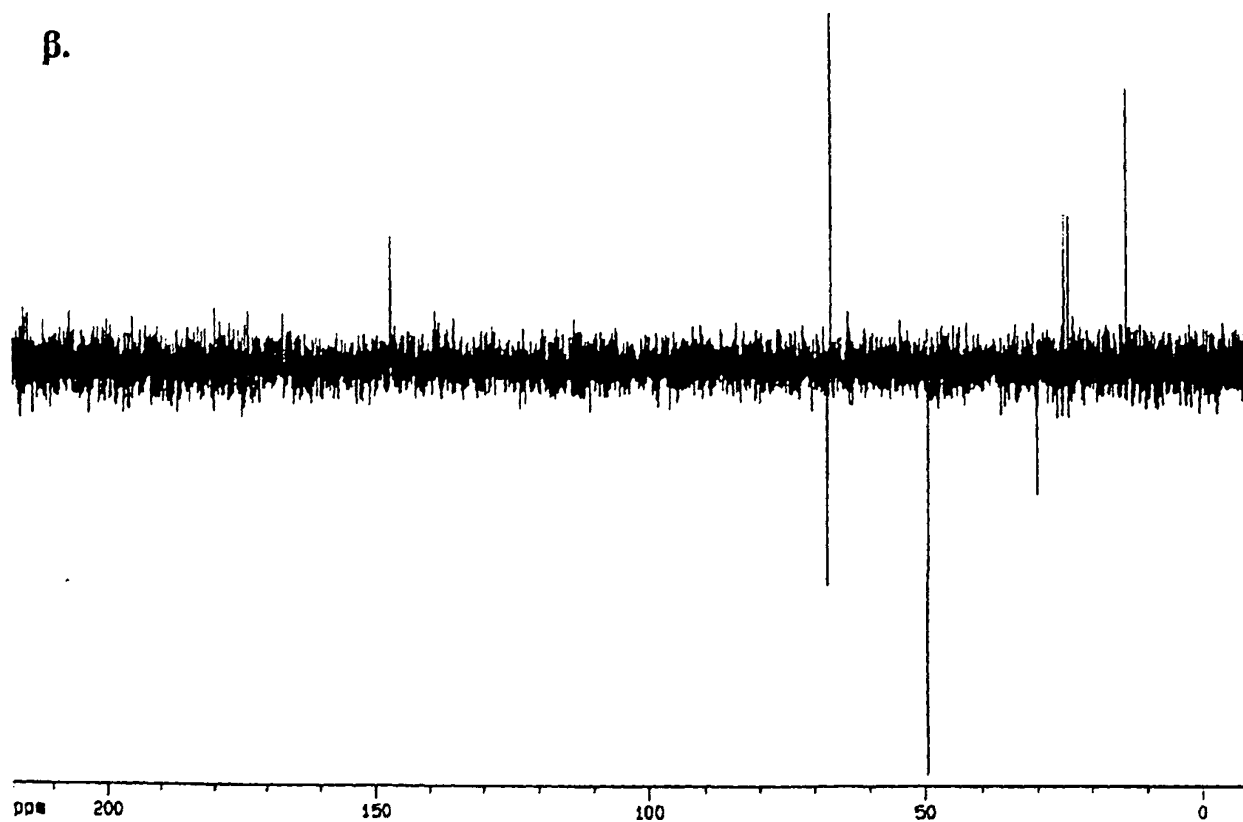
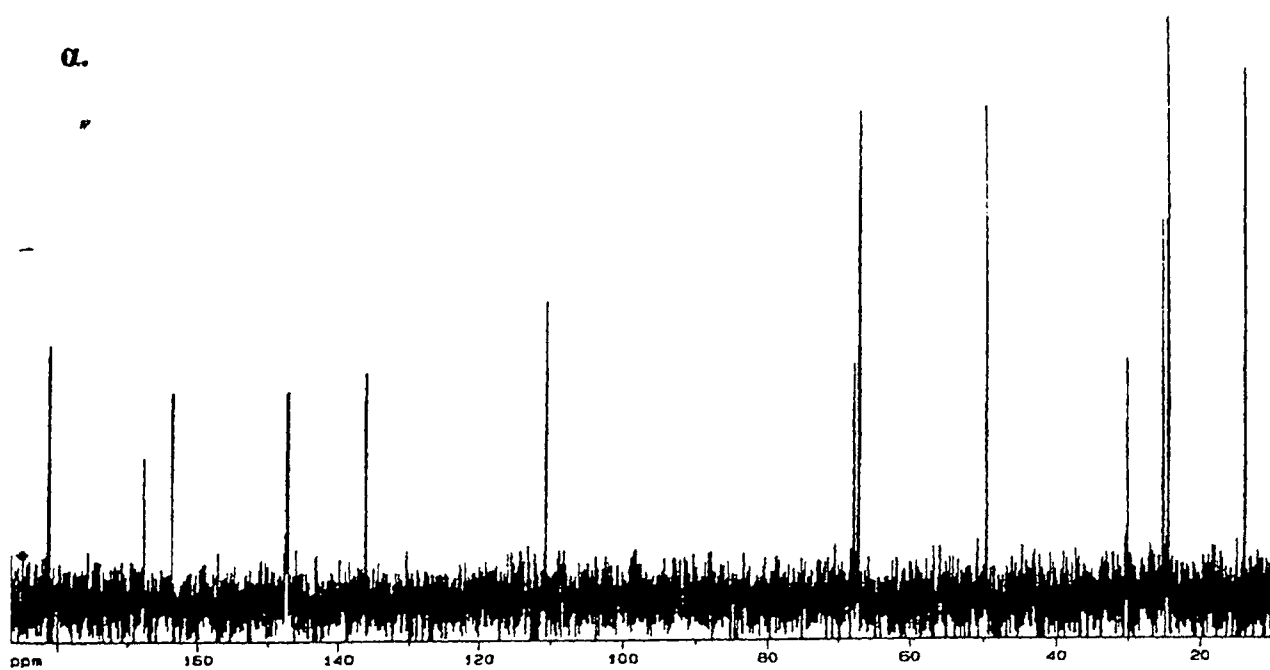
Σχήμα 69: Φάσματα ^{13}C -NMR σε D_2O του LH_2 ($\text{pH}=4.4$): α) κανονικό β) DEPT 135°



α.**β.**

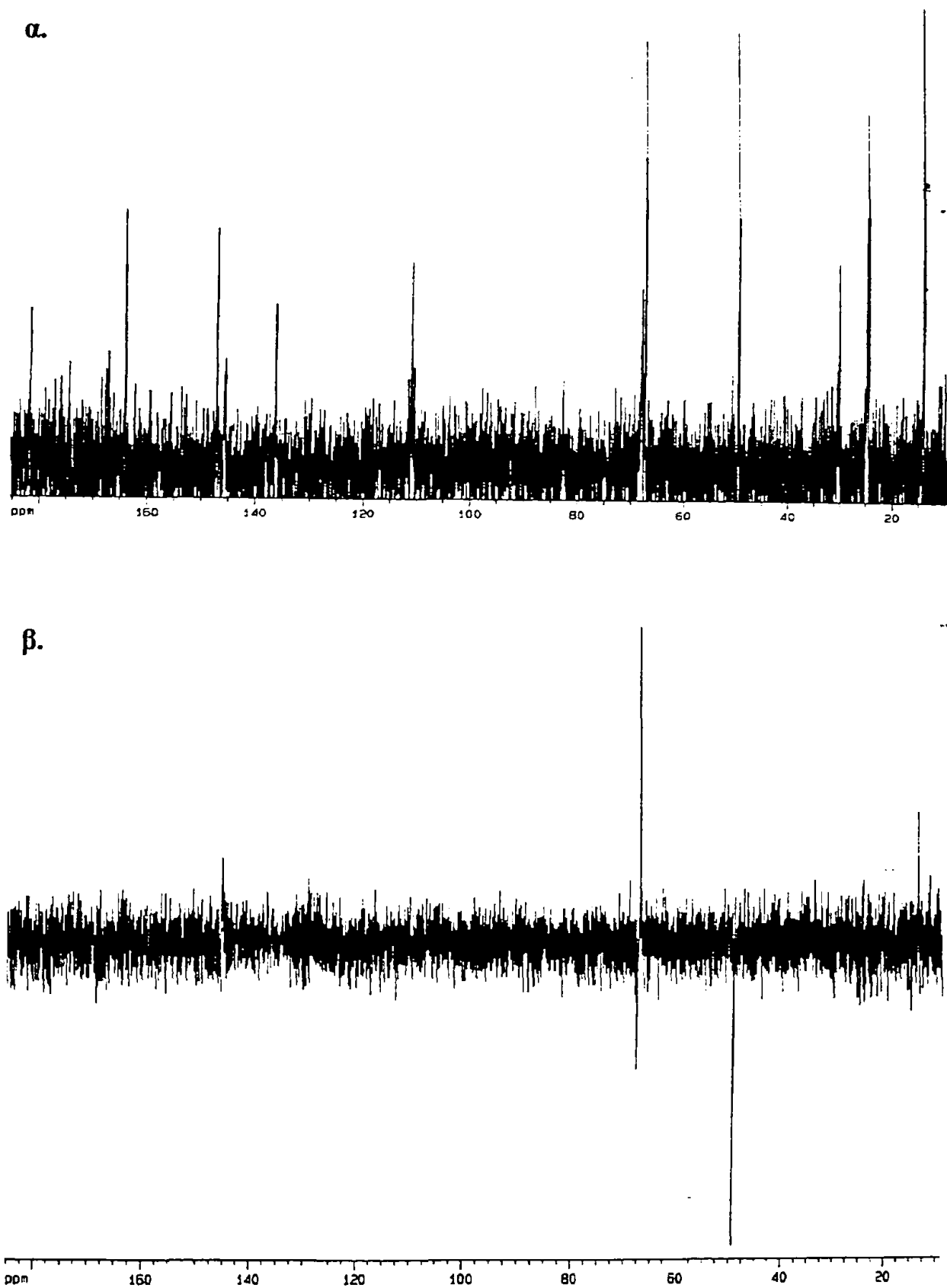
Σχήμα 70: Φάσματα ^{13}C -NMR σε D_2O του $(\text{LH})\text{K}^+$ (pH=6.0): α) κανονικό β) DEPT 135°.





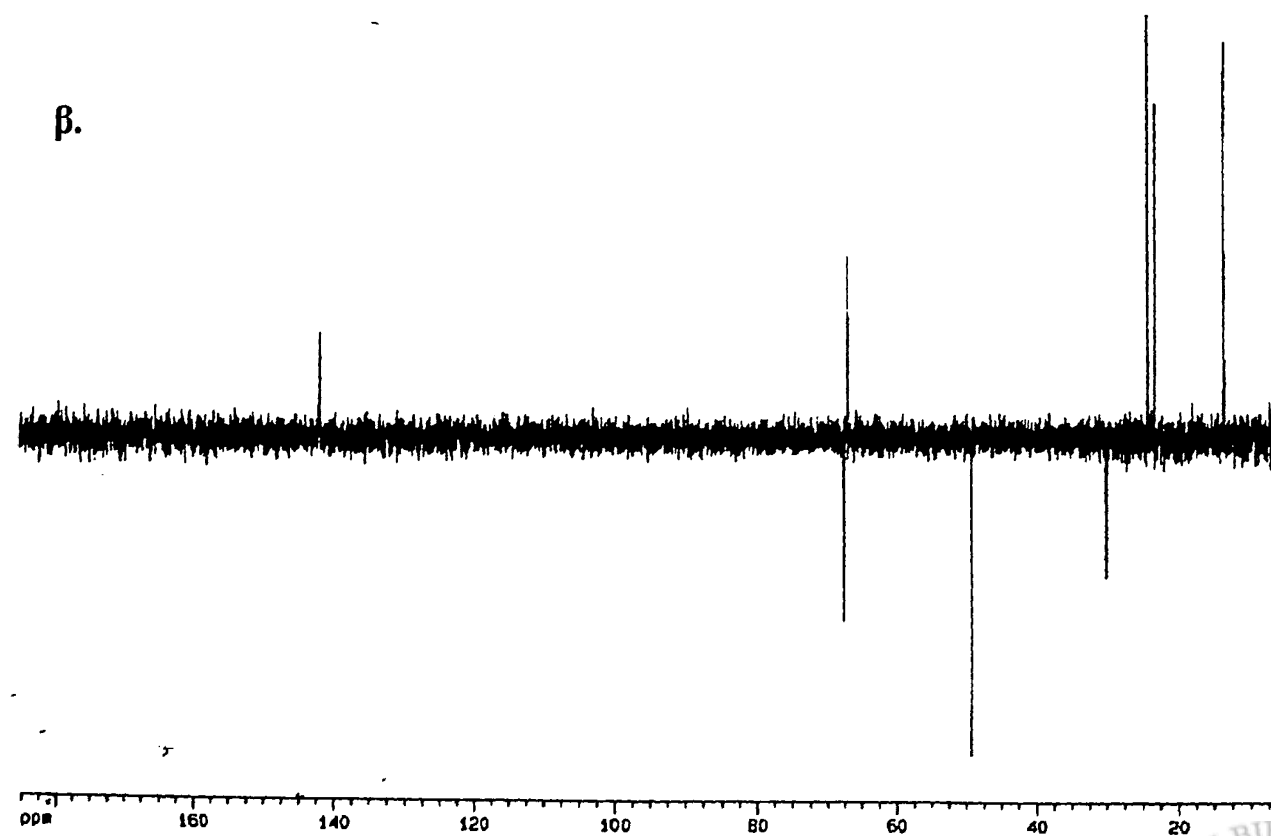
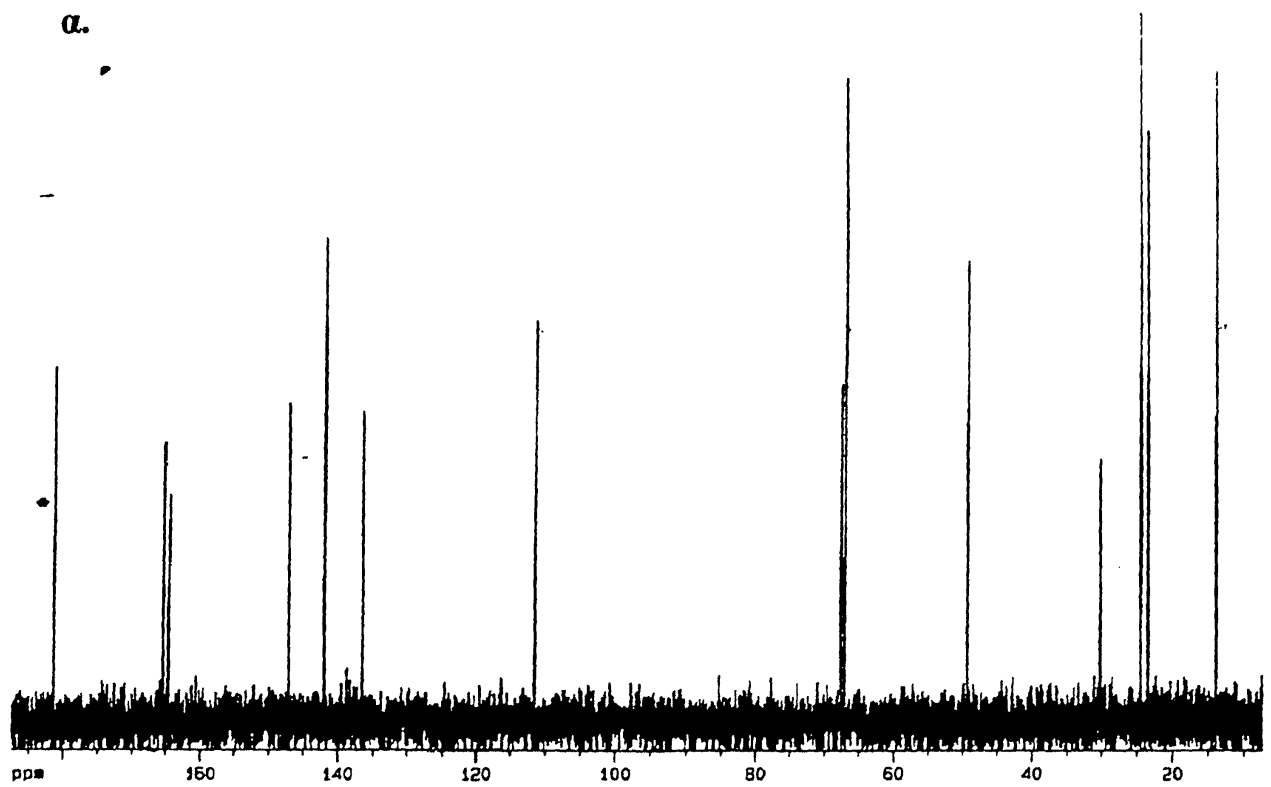
Σχήμα 71: Φάσματα ^{13}C -NMR σε D_2O του συμπλόκου $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: α) κανονικό
β) DEPT 135° .





Σχήμα 72: Φάσματα ^{13}C -NMR σε D_2O του συμπλόκου $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: α) κανονικό
β) DEPT 135° .





Σχήμα 73: Φάσματα ^{13}C -NMR σε D_2O του συμπλόκου $\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$: α) κανονικό
β) DEPT 135° .



III. Φασματοσκοπία ^{31}P -NMR.

Η φασματοσκοπία ^{31}P -NMR αποτελεί μια σημαντική τεχνική για την απόδειξη της συμμετοχής ή μη της διφωσφορικής ομάδας στη σφαίρα ένταξης του μετάλλου. Τα δεδομένα που προκύπτουν μετά την επεξεργασία των φασμάτων υποκαταστάτη και συμπλόκων (σχήματα 74-77) συνοψίζονται στον πίνακα 10.

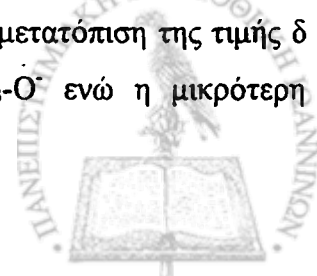
ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Χημικές μετατοπίσεις ^{31}P (δ , ppm) και σταθερές σύζευξης ($^2J_{\text{P}\alpha\text{-P}\beta}$, Hz) υποκαταστάτη και συμπλόκων σε διαλύματα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1.

	P_α	P_β	$\Delta\delta_{\text{P}\alpha}$	$\Delta\delta_{\text{P}\beta}$	$^2J_{\text{P}\alpha\text{-P}\beta}$
LH_2 , pH=2.5	-10.8	-10.2	—	—	20.2
LH_2 , pH=4.7	-10.7	-9.9	—	—	20.2
$(\text{LH})\text{K}^+$, pH=6.0	-10.6	-8.8	—	—	20.1
$\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$	-8.3	-4.8	+2.3	+4.0	16.5
$\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$	-9.0	-6.0	+1.6	+2.8	16.5
$\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$	-10.8	-8.8	+0.8	+1.4	17.8

$\Delta\delta = \delta_{\text{υποκαταστάτη}} - \delta_{\text{συμπλόκου}}$ όταν ο ελεύθερος και ο συμπλοκοποιημένος υποκαταστάτης βρίσκονται στην ίδια κατάσταση πρωτονίωσης.

Ξεκινώντας απ' τον ελεύθερο υποκαταστάτη LH_2 σε pH=2.5 παρατηρούμε ότι στο φάσμα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (με αποσύζευξη ^1H δηλαδή) εμφανίζονται δυο διπλές κορυφές όπως αναμένεται για ένα σύστημα spin AB. Η απόδοση των κορυφών που οφείλονται στο P_α ή στον P_β γίνεται εύκολα στο φάσμα ^{31}P -NMR χωρίς αποσύζευξη ^1H , αφού η κορυφή του P_α σχάζεται επιπλέον σε τριπλή λόγω της σύζευξης $^3J_{^{31}\text{P}-^1\text{H}}$ (σχήμα 74). Οι χημικές μετατοπίσεις των P_α και P_β παραμένουν αμετάβλητες στην περιοχή pH=2.5-4.7 καθώς η πυροφωσφορική ομάδα του υποκαταστάτη βρίσκεται στην ίδια κατάσταση πρωτονίωσης ως διανιόν. Με την άνοδο του pH στο 6.0 παρατηρείται μετατόπιση της τιμής δ του P_β κατά 1.2 ppm σε χαμηλότερα πεδία αφού πλησιάζουμε την τιμή pK_a (6.5) για ιονισμό και του δεύτερου -OH του P_β [9].

Σύγκριση των τιμών δ των P_α και P_β στα σύμπλοκα σε σχέση με εκείνες του υποκαταστάτη στην ίδια κατάσταση πρωτονίωσης αποκαλύπτει ότι στην περίπτωση των $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ και $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ οι συχνότητες των P_α και P_β μετατοπίζονται κατά 1.6, 2.3 και 2.8 και 4.0 ppm προς χαμηλότερα πεδία αντίστοιχα. Η μεγάλη μετατόπιση της τιμής δ του P_β αποτελεί καθαρή ένδειξη συμπλοκοποίησης της ομάδας $\text{P}_\beta\text{-O}^-$ ενώ η μικρότερη



μετατόπιση της τιμής του P_α υποδεικνύει ότι η ομάδα $P_\alpha-O$ είναι ασθενέστερα συνδεδεμένη [222,223].

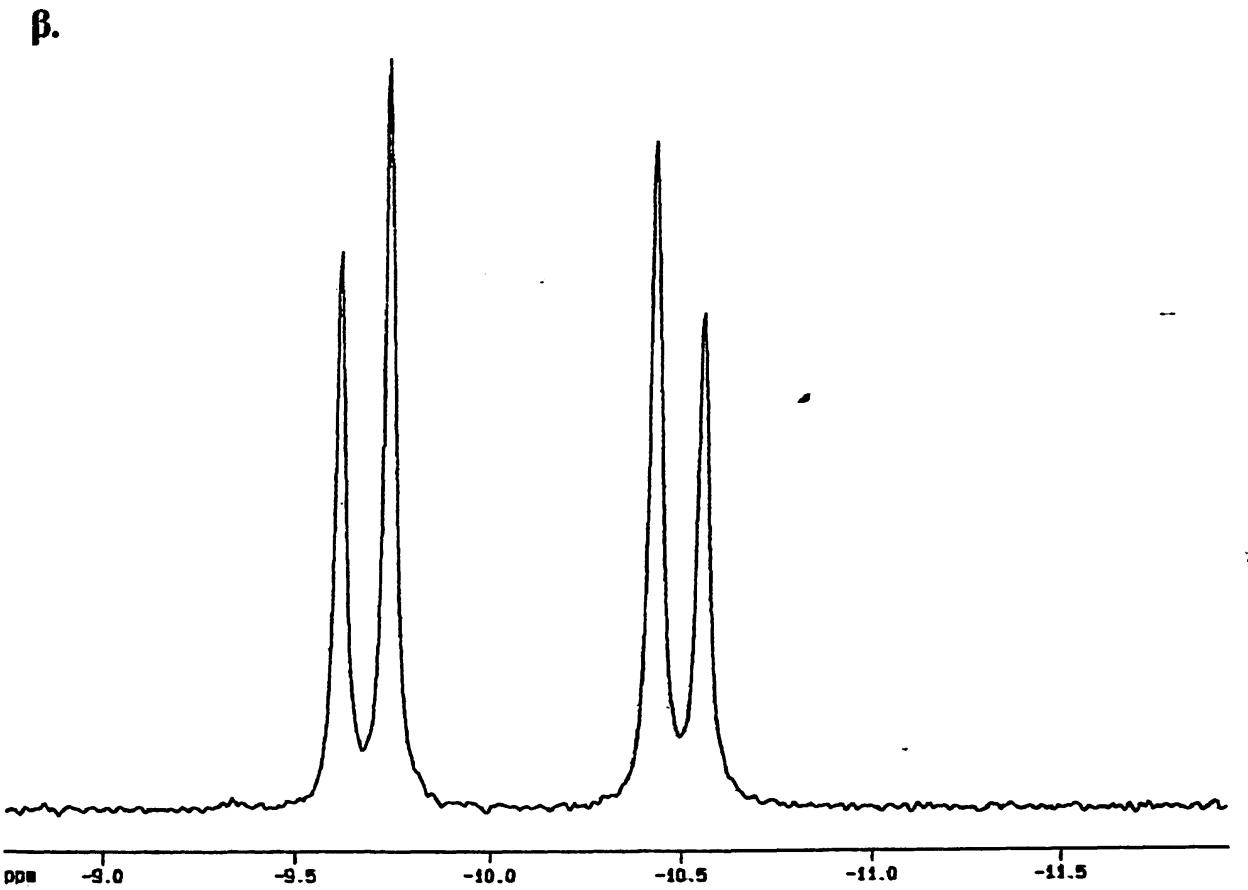
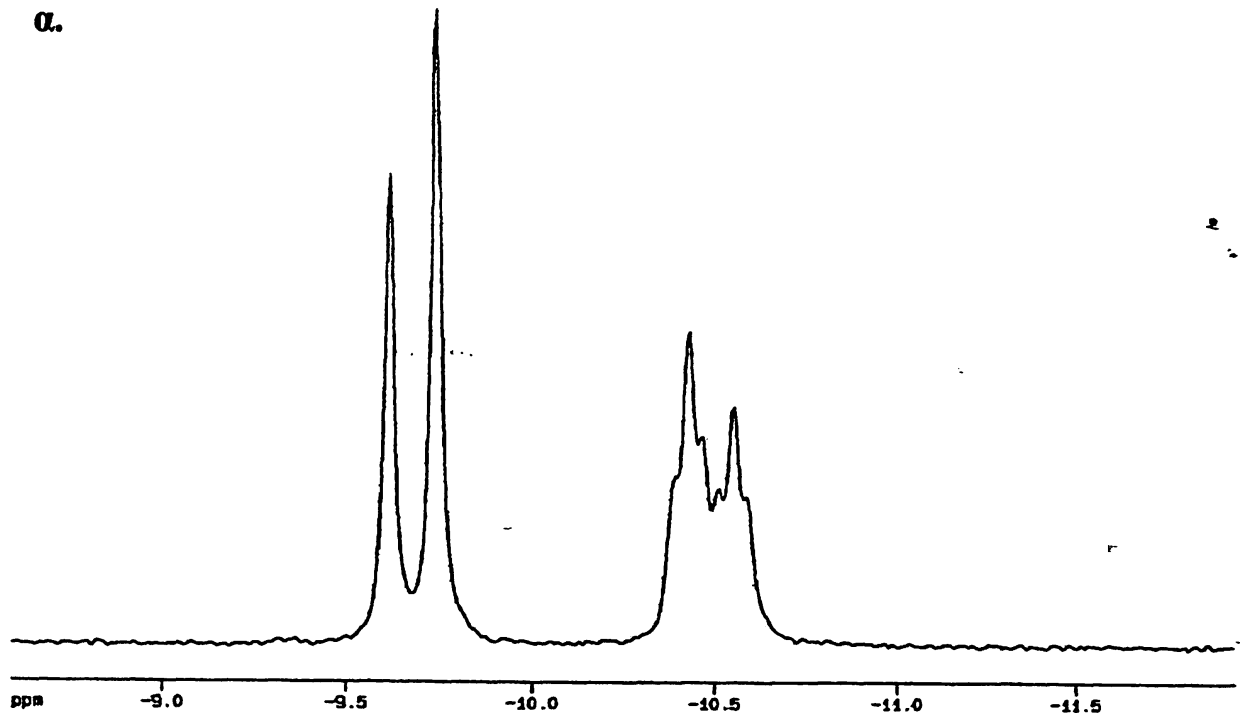
Το ερώτημα που τίθεται είναι αν υπάρχουν ενδείξεις για α,β -διδοντική (χηλική) ή β -μονοδοντική συμπεριφορά της πυροφωσφορικής ομάδας στα σύμπλοκά μας. Γενικά στην περίπτωση χηλικής ένταξης μιας οργανικής διφωσφορικής ομάδας σε ένα μεταλλικό ιόν προκύπτουν δυο ή περισσότερα στερεοϊσομερή [222,224]. Έτσι στο σύμπλοκο $Rh^{III}(HETPP)$ με χηλική συμπεριφορά της διφωσφορικής ομάδας, παρατηρούνται δυο ζεύγη διαστερεοϊσομερών όπως προκύπτει απ' τη μελέτη των φασμάτων $^{13}C-NMR$ και $^{31}P-NMR$. Στην περίπτωσή μας τέτοια διαστερεοϊσομερή, ακόμα και αν υπάρχουν, δεν παρατηρήθηκαν κατά τις παραπάνω φασματοσκοπικές μελέτες.

Οι τιμές δ των P_α και P_β στο σύμπλοκο $Zn(LH_3)Cl_3$ μετατοπίζονται προς χαμηλότερα πεδία κατά 0.8 και 1.4 ppm αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον υποκαταστάτη σε $pH=2.5$. Η μικρή αυτή μετατόπιση υποδεικνύει ότι ο Zn^{2+} αλληλεπιδρά ασθενώς με την πυροφωσφορική ομάδα, πιθανότατα μέσω μορίων H_2O .

Στο φάσμα $^{31}P-NMR$ του $[Cu(LH)Cl]_2$ δεν παρατηρείται καμιά κορυφή. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται προφανώς στην επίδραση του παραμαγνητικού ιόντος Cu^{2+} στον χρόνο αποδιέγερσης του πυρήνα του ^{31}P με αποτέλεσμα αυτός να μικραίνει πολύ, οι κορυφές να διευρύνονται ανάλογα και τελικά να εξαφανίζονται. Το γεγονός ότι δεν παρατηρείται διεύρυνση αλλά εξαφάνιση υποδεικνύει ότι το ιόν $Cu(II)$ αλληλεπιδρά πολύ ισχυρά και με τα δυο άτομα φωσφόρου.

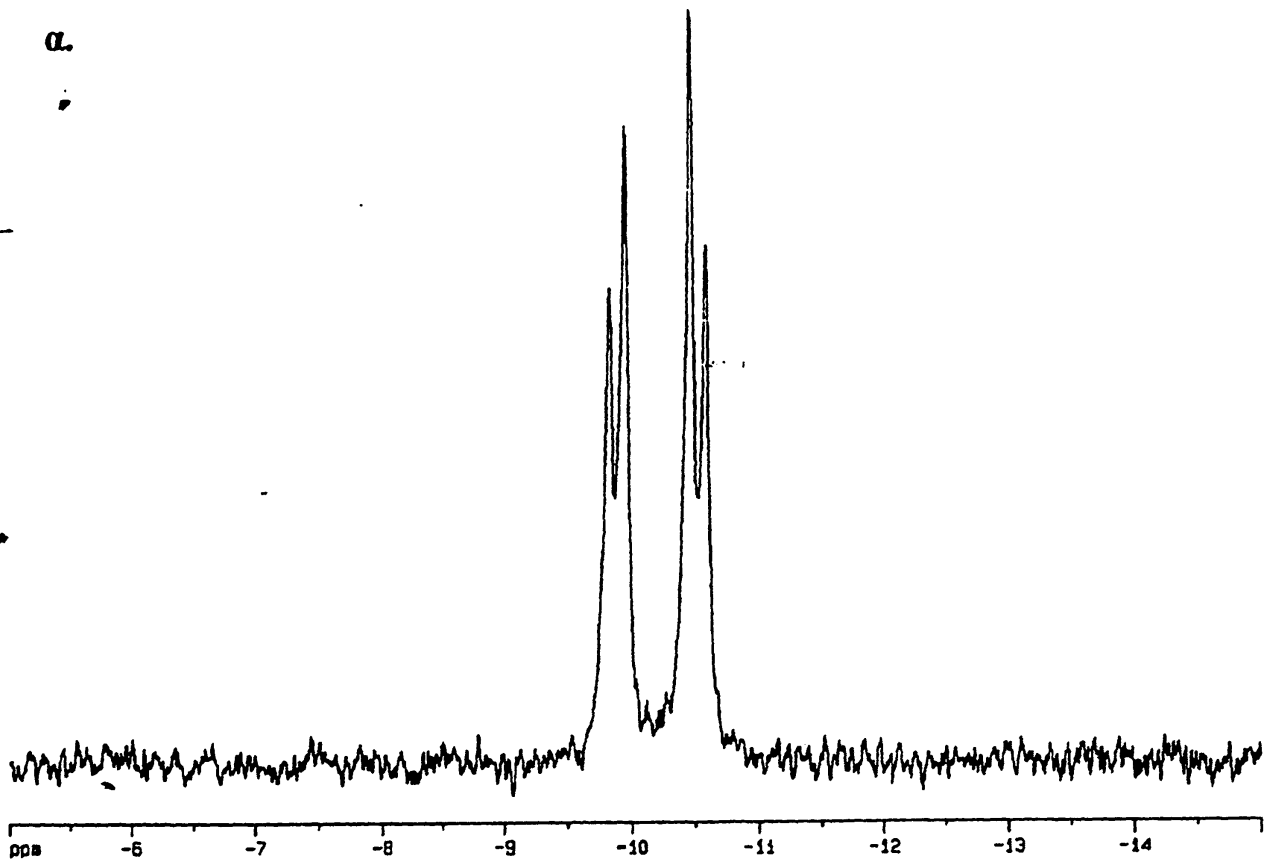
Τέλος εξετάζοντας τις σταθερές σύζευξης $^2J_{P_\alpha-P_\beta}$ ελεύθερου υποκαταστάτη και συμπλόκων παρατηρούμε ότι μειώνονται από 20 Hz στον υποκαταστάτη σε 16-17 Hz στα σύμπλοκα. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε καλή συμφωνία με τη βιβλιογραφία όπου και αναφέρεται ότι οι σταθερές σύζευξης $^2J_{P-P}$ μειώνονται κατά την ένταξη μεταλλικών ιόντων σε φωσφορικές ομάδες [222,225].



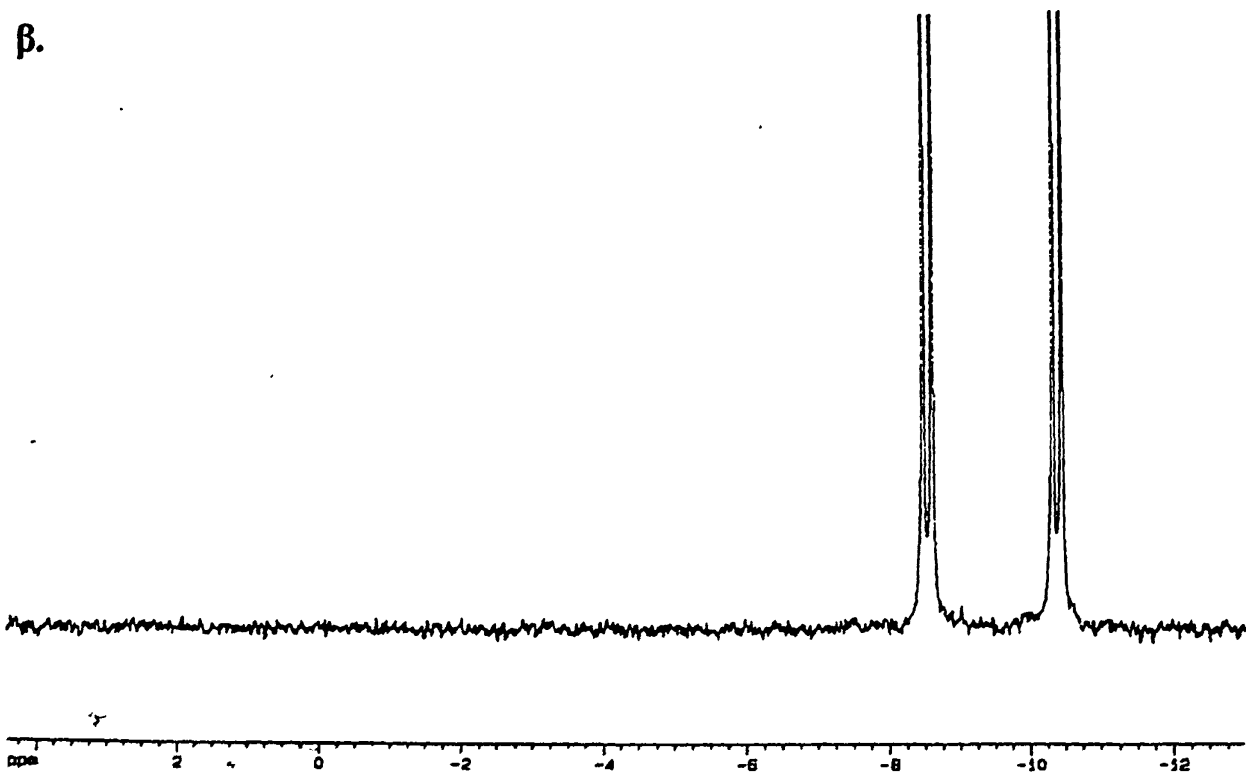


Σχήμα 74: Φάσματα ^{31}P -NMR του LH_2 σε D_2O ($\text{pH}=4.4$): α) χωρίς αποσύζευξη πρωτονίου
β) με αποσύζευξη πρωτονίου.



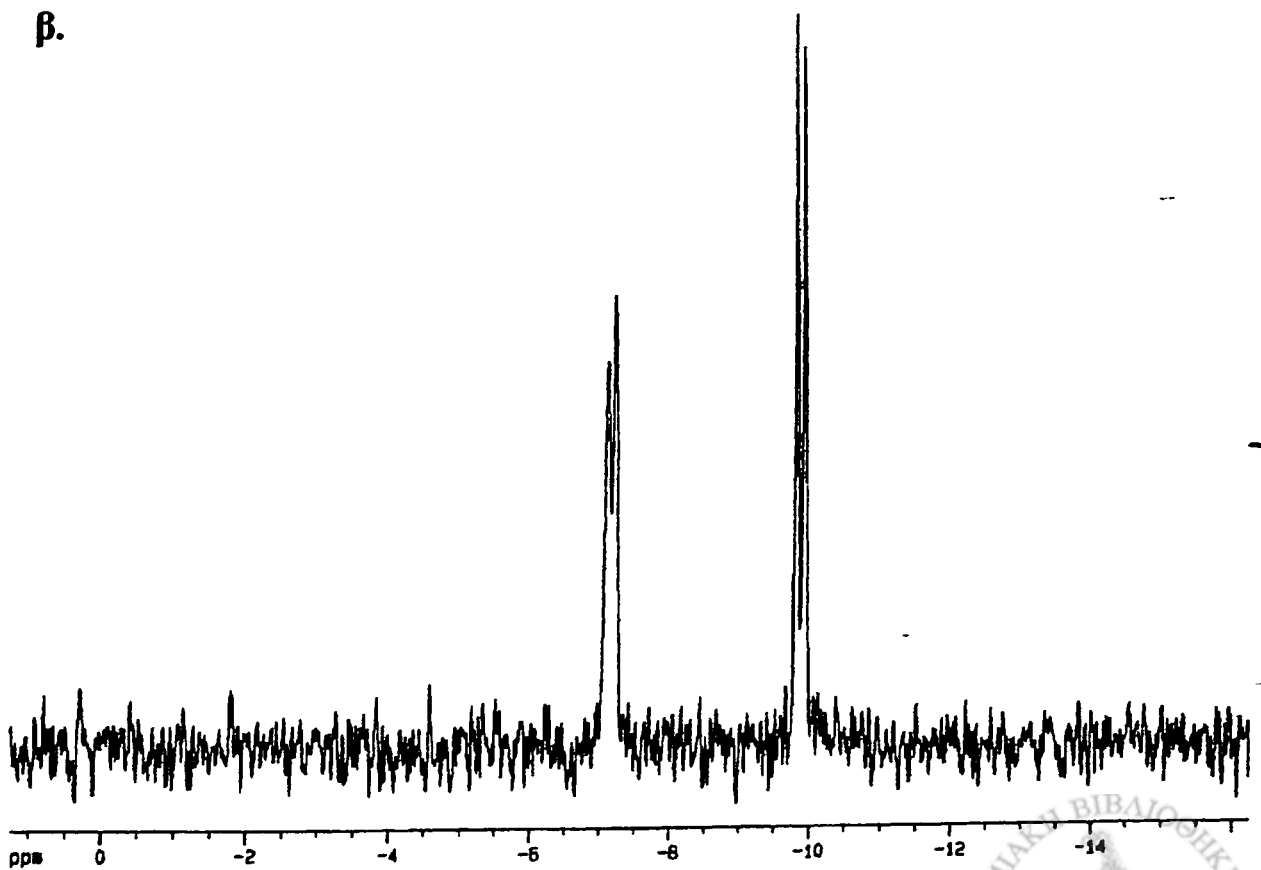
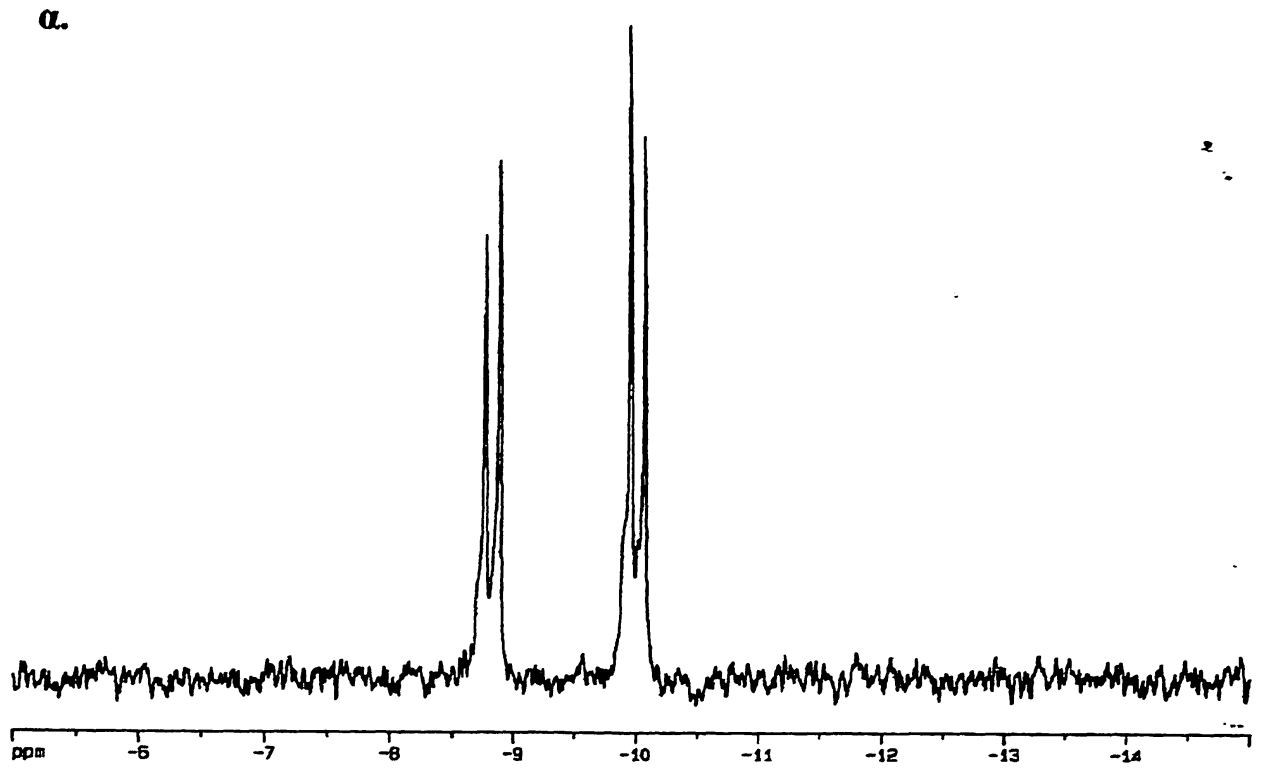


β.

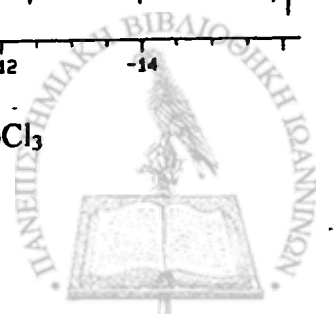


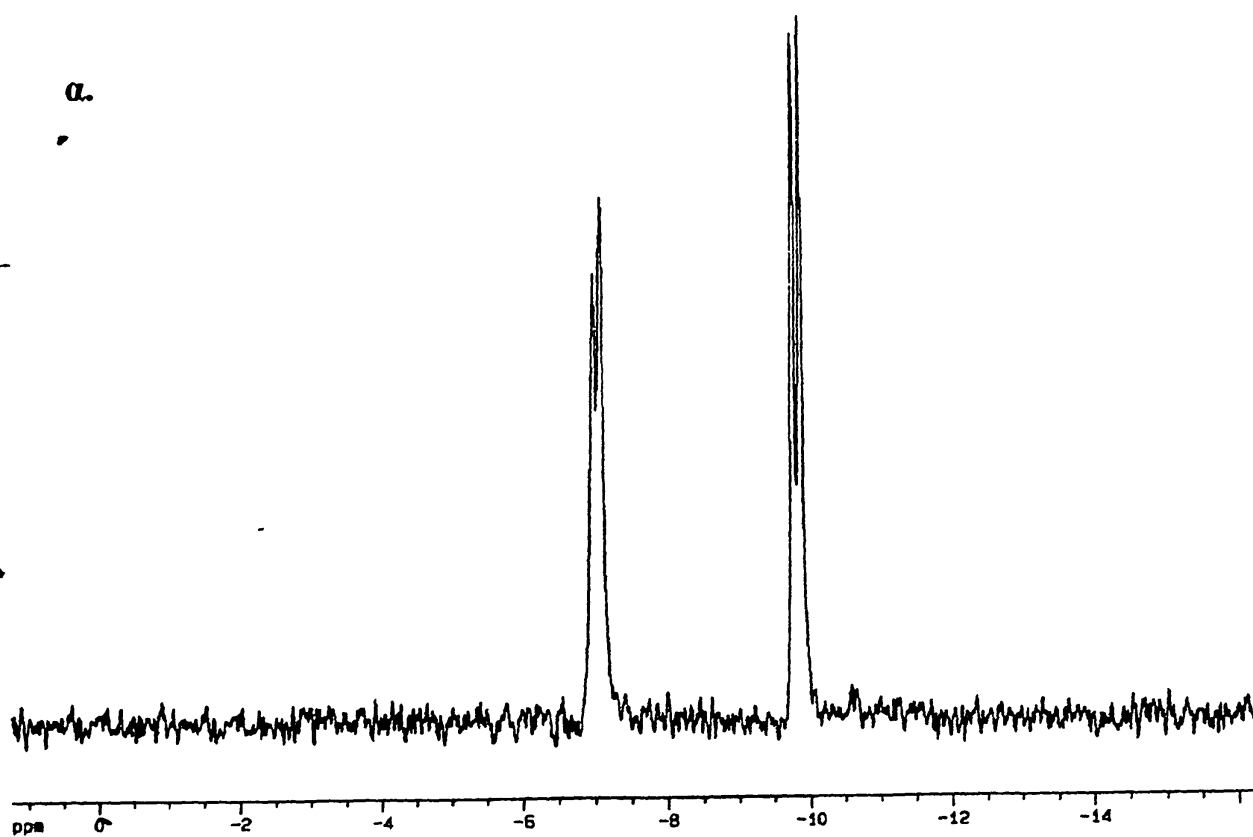
Σχήμα 75: Φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR σε D_2O : α) του $(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$ ($\text{pH}=2.5$)
β) του $(\text{LH})\text{K}^+$ ($\text{pH}=6.0$).



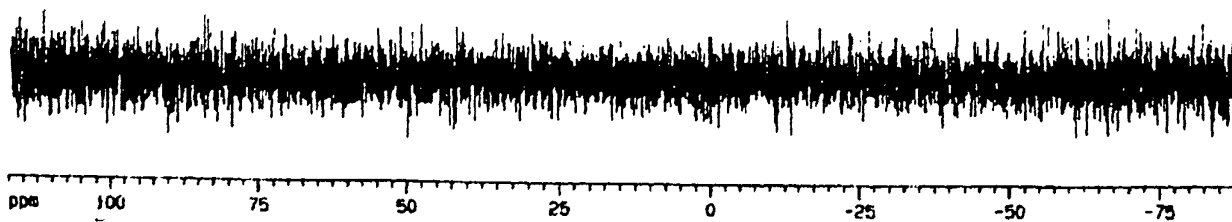


Σχήμα 76: Φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR των συμπλόκων σε D_2O : α) $\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$
β) $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$.





β.

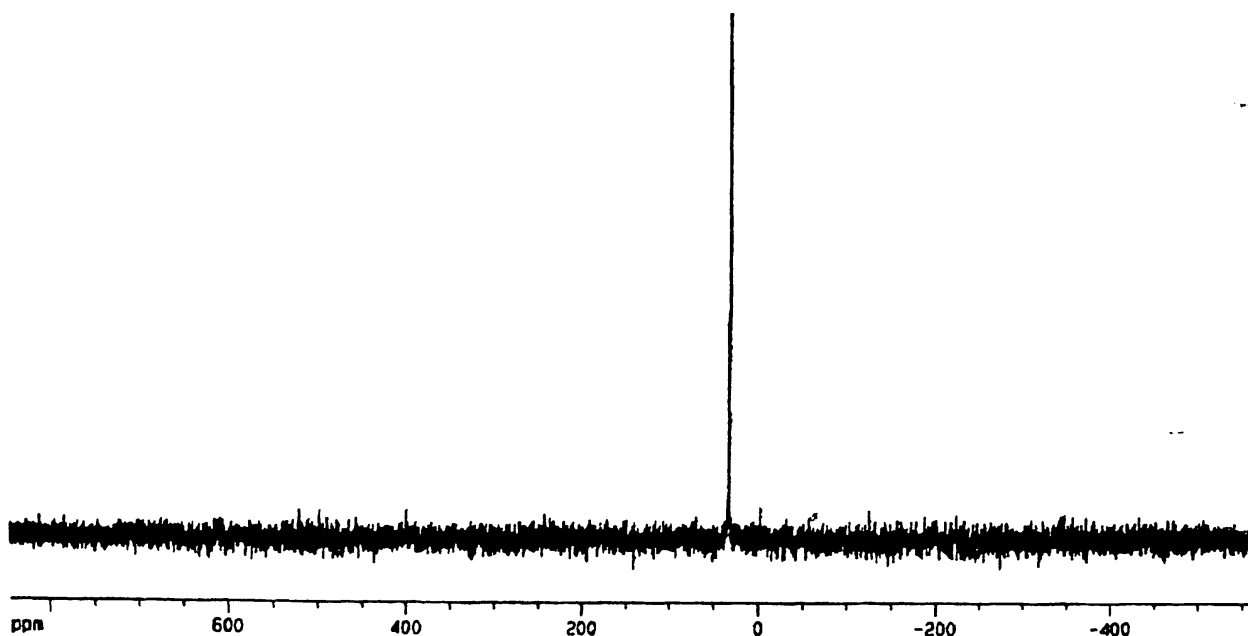


Σχήμα 77: Φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR των συμπλόκων σε D_2O : α) $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$
β) $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_2$.



IV. Φασματοσκοπία ^{113}Cd -NMR.

Η φασματοσκοπία ^{113}Cd -NMR έχει αποδειχθεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την διερεύνηση του περιβάλλοντος του μεταλλικού ιόντος σε μια ποικιλία ενώσεων όπως τα σύμπλοκα ή τα μεταλλοένζυμα. Το εύρος χημικής μετατόπισης του πυρήνα αυτού είναι 850 ppm και έχει αποδειχθεί ότι είναι ευαίσθητος στην αλλαγή του χημικού περιβάλλοντος γύρω απ' αυτόν [226]. Η χημική μετατόπιση του ^{113}Cd στο σύμπλοκο $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ σε διάλυμα D_2O βρέθηκε στα 31.5 ppm (εξωτερική αναφορά $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ 0.1M, σχήμα 78).



Σχήμα 78: Φάσμα ^{113}Cd -NMR του συμπλόκου $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ σε D_2O .

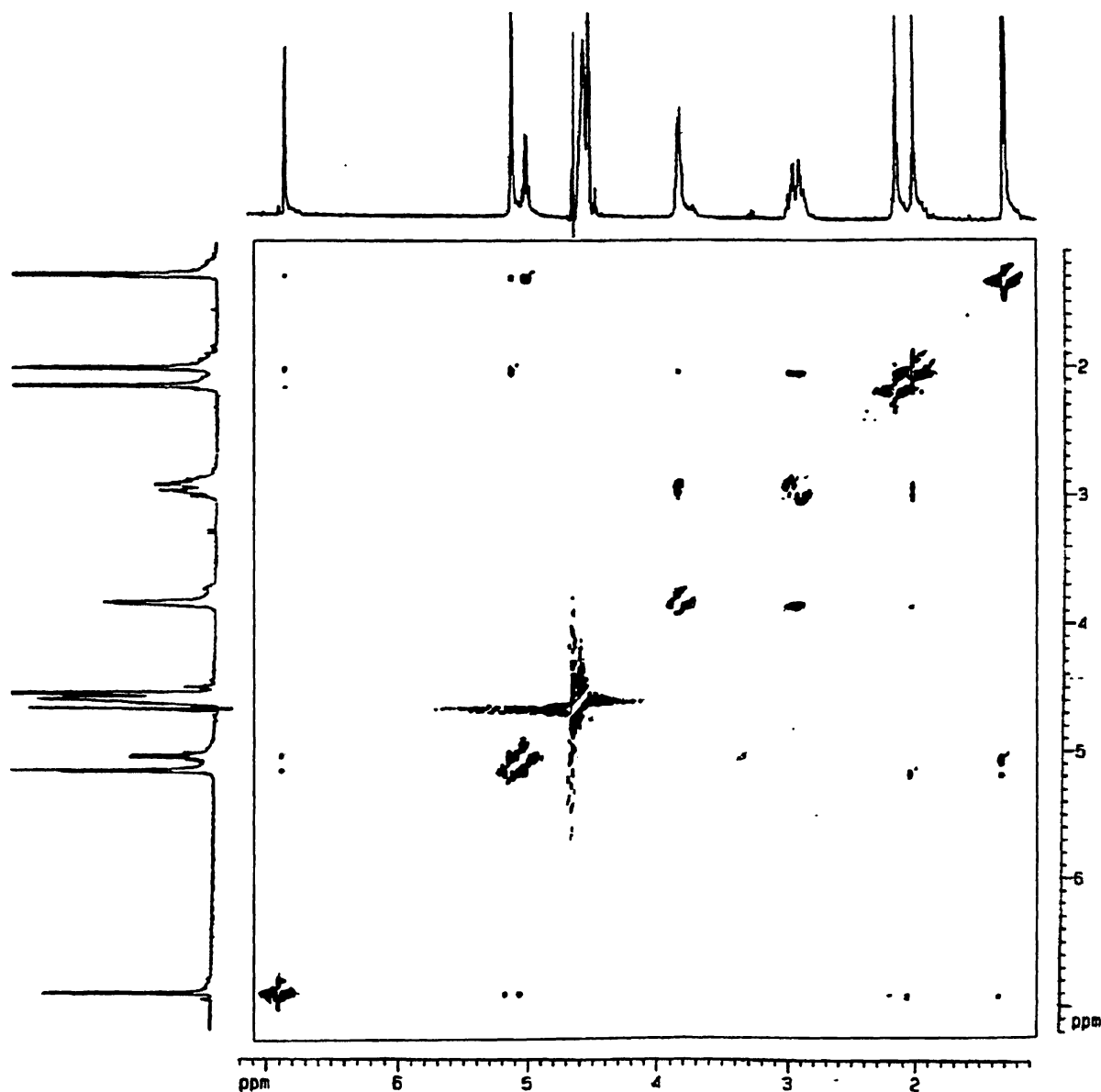
Η τιμή αυτή είναι αρκετά κοντά στην αντίστοιχη για το σύμπλοκο Cd (γλυκίνη) ($\delta=54$ ppm) όπου υποστηρίζεται χηλική ένταξη μέσω της $\alpha\text{-NH}_2$ και του καρβοξυλικού οξυγόνου της γλυκίνης [226]. Απ' την άλλη η συχνότητα του ^{113}Cd στα σύμπλοκα $[\text{Cd}(\text{th})\text{Cl}_3]_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (άτομα δότες 10 και 1N) και $[\text{Cd}(\text{th})_2\text{Cl}_4]$ (άτομα δότες 2N) παρατηρείται στα 74.4 και 100.3 ppm αντίστοιχα [118,119]. Χαρακτηριστικό των παραπάνω συμπλόκων θειαμίνης είναι το γεγονός ότι σε διάλυμα υφίστανται μερική χημική ανταλλαγή των ιόντων Cl^- με μόρια διαλύτη

[118,126]. Τέλος η τιμή δ του ^{113}Cd στη β αλβουμίνη που απομονώνεται από πλάσμα, είναι 24 ppm με ένταξη μέσω ενός ατόμου αζώτου και ατόμων οξυγόνου [226]. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η τιμή $\delta=31.5$ ppm του συμπλόκου μας μπορεί να αποδοθεί σε ένταξη του Cd^{2+} μέσω ενός ατόμου αζώτου (N(1')) και ατόμων οξυγόνου απ' την πυροφωσφορική ομάδα και το διαλύτη.



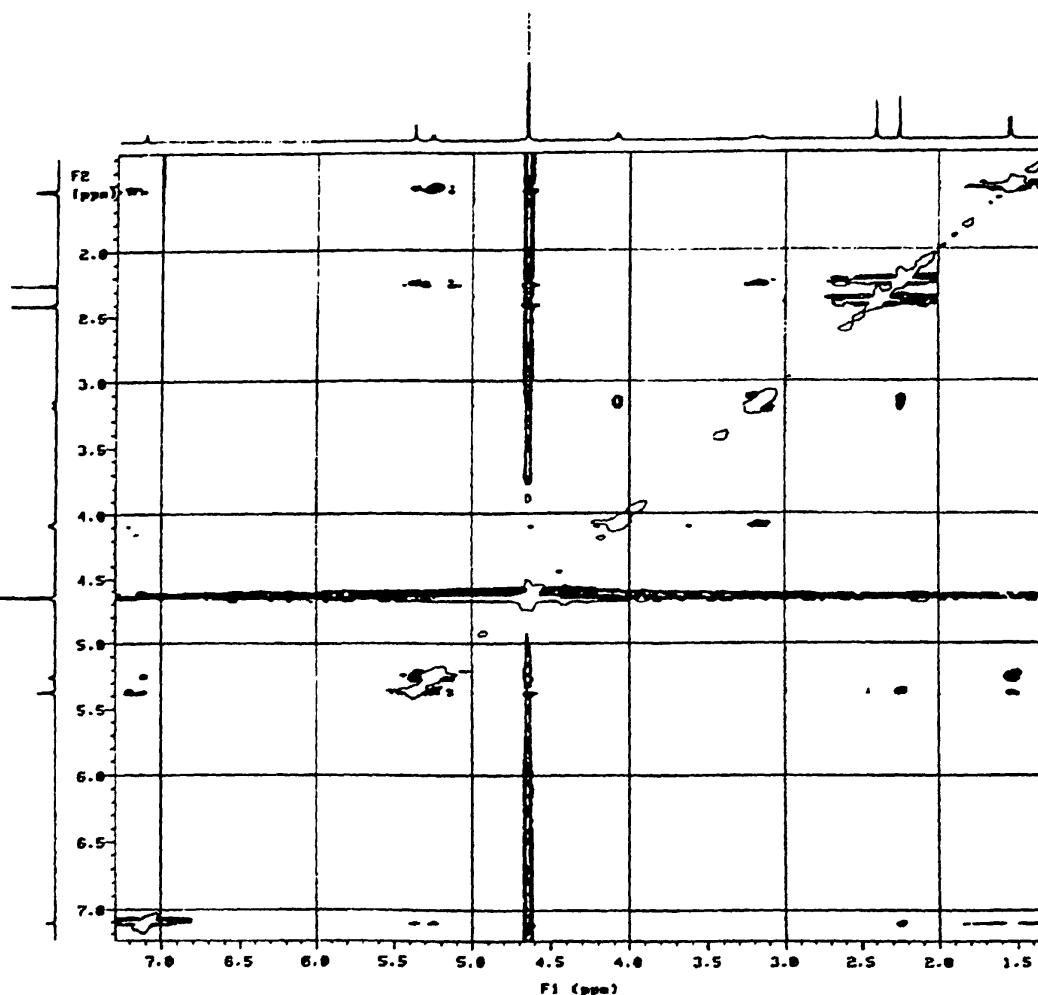
V. Μελέτες διαμόρφωσης. Φάσματα ^1H - ^1H ROESY και ^1H - ^1H NOESY NMR.

Σε μια προσπάθεια να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη διαμόρφωση του ελεύθερου καθώς και του συμπλοκοποιημένου υποκαταστάτη καταγράψαμε το φάσμα ^1H - ^1H ROESY NMR για τον ελεύθερο υποκαταστάτη σε διάλυμα D_2O (pH=6.0) και τα φάσματα ^1H - ^1H NOESY NMR για τα σύμπλοκα $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ και $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ σε διαλύματα D_2O επίσης. Τα φάσματα αυτά δίνονται στα σχήματα 79 και 80.



Σχήμα 79: Φάσμα ^1H - ^1H -ROESY NMR του $(\text{LH})\text{K}^+$ σε διάλυμα D_2O (pH=6.0).





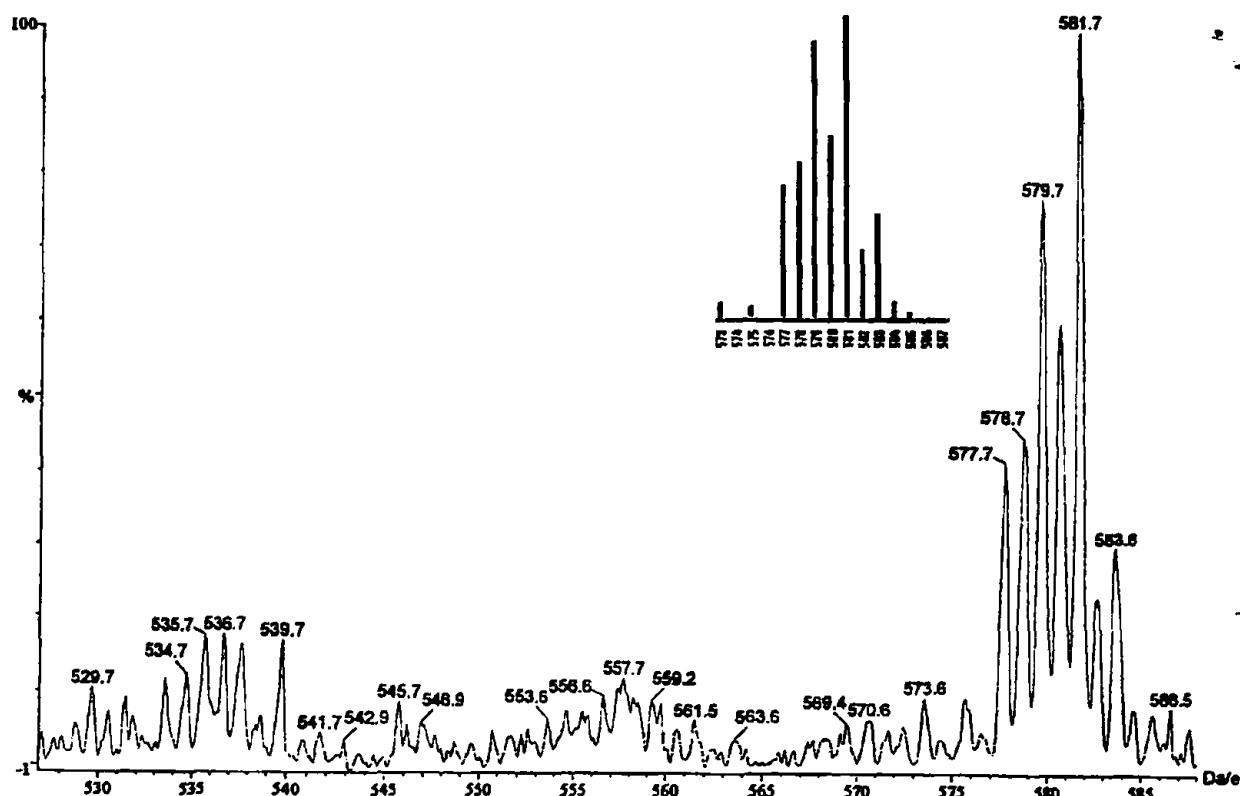
Σχήμα 80: Φάσμα ^1H - ^1H -NOESY NMR του συμπλόκου $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ σε διάλυμα D_2O .

Στο φάσμα ^1H - ^1H ROESY NMR του υποκαταστάτη οι κύριες κορυφές διασταύρωσης (crosspeaks) παρατηρούνται μεταξύ των πρωτονίων $\text{H-C}(6')/\text{H}_2\text{C}(3,5')$, $\text{H-C}(6')/\text{H-C}(2\alpha)$ και $\text{H-C}(6')/4\text{-CH}_3$. Απ' τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι το πρωτόνιο $\text{H-C}(6')$ κατευθύνεται προς το $\text{N}(3)$ του θειαζολικού δακτυλίου, ένα χαρακτηριστικό δομικό γνώρισμα της *S*-διαμόρφωσης [58]. Επιπλέον η ύπαρξη της κορυφής διασταύρωσης $\text{H-C}(6')/4\text{-CH}_3$ οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο θειαζολικός δακτύλιος έχει περιστραφεί κατά τον ίδιο τρόπο όπως και παρατηρείται στην κρυσταλλική δομή της HETPP (σχήμα 49, σελίδα 81). Στα φάσματα ^1H - ^1H NOESY NMR των δυο συμπλόκων παρατηρούνται ακριβώς οι ίδιες κορυφές διασταύρωσης. Συμπεραίνουμε έτσι τελικά ότι η *S* διαμόρφωση διατηρείται και σε διάλυμα όχι μόνο στον ελεύθερο υποκαταστάτη αλλά και στον συμπλοκοποιημένο με Cd και Zn .



VI. Φασματοσκοπία μάζας με την τεχνική electron spray (ES-MS).

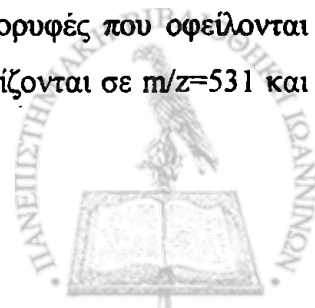
Στα σχήματα 81 και 82 παρουσιάζονται τα φάσματα ES-MS υδατικών διαλυμάτων των συμπλόκων $K_2\{[Cd(LH)Cl_2]_2\}$ και $K_2\{[Zn(LH)Cl_2]_2\}$ αντίστοιχα.

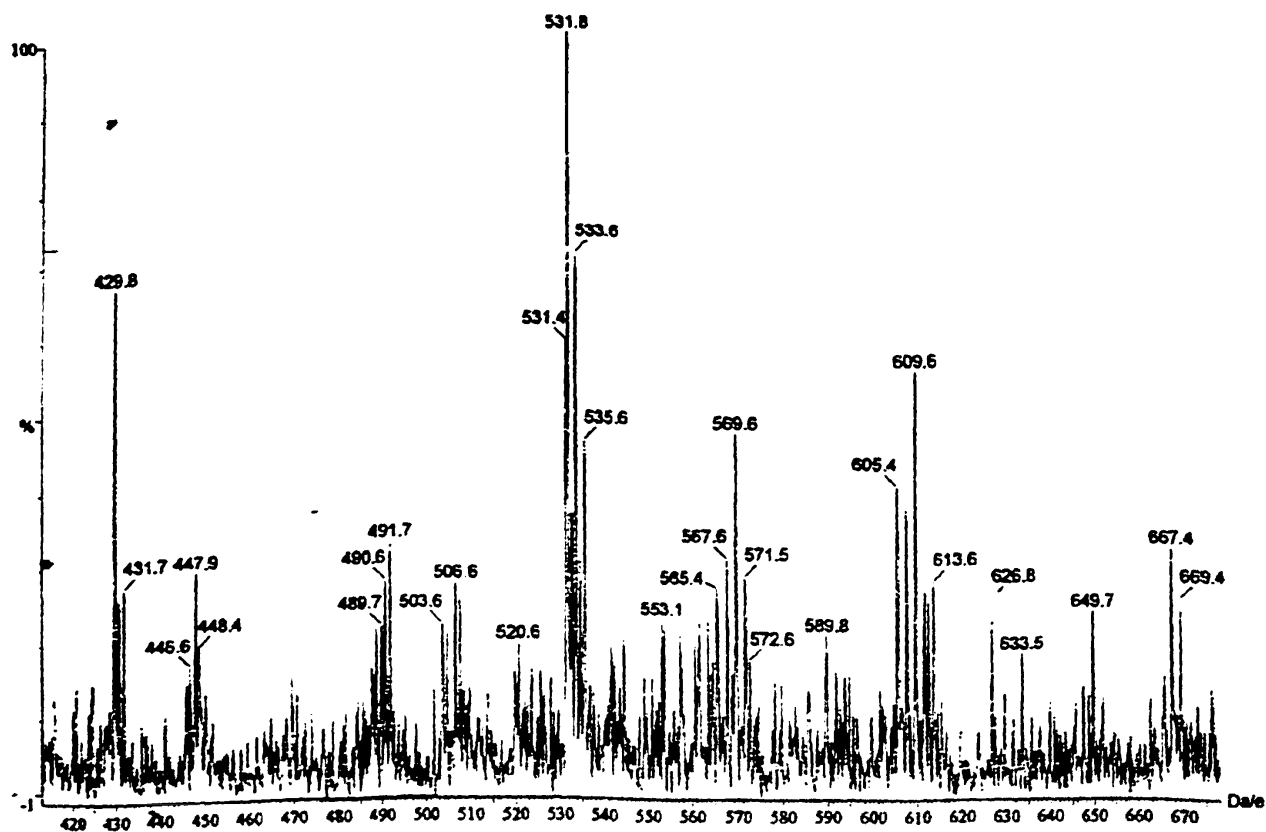


Σχήμα 81: Φάσμα ES-MS του συμπλόκου $K_2\{[Cd(LH)Cl_2]_2\}$ και θεωρητικά προβλεπόμενη ισοτοπική κατανομή για τις κορυφές με $m/z=581$ (επάνω μέρος).

Οι κορυφές (σχήμα 81) περίπου σε $m/z=581$ αντιστοιχούν στο μονομερές σωματίδιο $[Cd(LH)]^+$ ενώ οι κορυφές σε $m/z=536$ στο μονομερές $[Cd(LH)]^+$ μείον την ομάδα $-CH(OH)CH_3$. Το σωματίδιο που αντιστοιχεί σε $m/z=558$ είναι ένα δικατιόν όπως φαίνεται απ' την κατανομή της μάζας γύρω απ' την κεντρική κορυφή και αντιστοιχεί στο σωματίδιο $\{[Cd(LH)]^{2+}\}_2$ μείον την ομάδα $-CH(OH)CH_3$. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 81 η ισοτοπική κατανομή των παρατηρούμενων κορυφών σε $m/z=581$ συμφωνεί απόλυτα με τη θεωρητικά προβλεπόμενη για το σύμπλοκο $K_2\{[Cd(LH)Cl_2]_2\}$.

Αντίστοιχα, στο σύμπλοκο $K_2\{[Zn(LH)Cl_2]_2\}$ (σχήμα 82) οι κορυφές που οφείλονται στα μονομερή σωματίδια $[Zn(LH)]^+$ και $[Zn(LH)]^+ - CH(OH)CH_3$ εντοπίζονται σε $m/z=531$ και 486 αντίστοιχα.



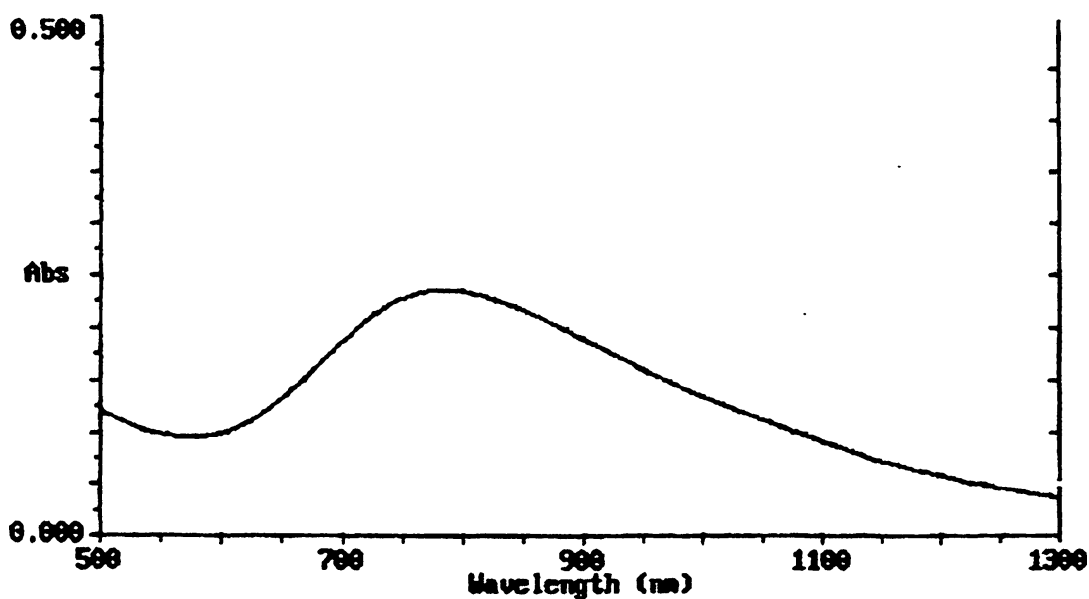


Σχήμα 82: Φάσμα ES-MS του συμπλόκου $K_2\{[Zn(LH)Cl_2]_2\}$.

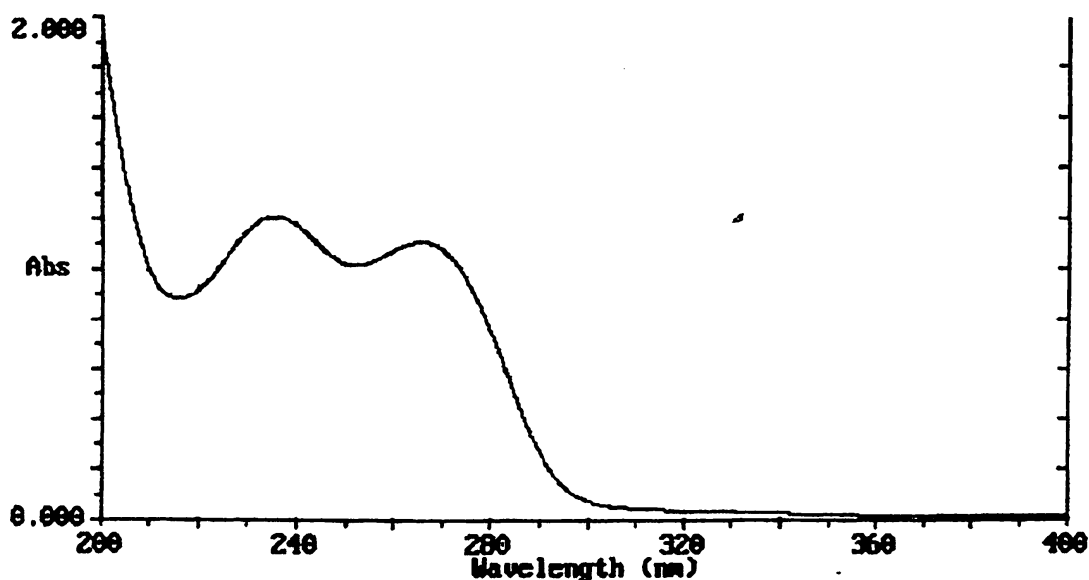
Τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν ότι τα σύμπλοκα είναι πραγματικά διμερή όπως είχαμε υποθέσει απ' την αρχή της παρούσης μελέτης και επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η ομάδα $CH_3CH(OH)-$ που προκύπτει απ' την προσθήκη του πυροσταφυλικού οξέος στον C(2) του θειαζολίου αποσπάται εύκολα. Το τελευταίο είναι μεγάλης σημασίας καθώς αποδεικνύεται ότι το σύστημα M(II)-HETPP (M= Zn, Cd) μπορεί να λειτουργήσει όπως τα ενζυμικά συστήματα ελευθερώνοντας την ομάδα που είναι συνδεδεμένη στον C(2) της θειαμίνης.

VII. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Τα φάσματα ορατού-υπεριώδους του συμπλόκου $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_2$ καταγράφηκαν σε υδατικό διάλυμα στην περιοχή 1300-200 nm (σχήματα 83-84).

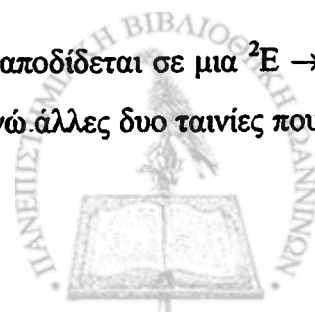


Σχήμα 83: Φάσμα ορατού του συμπλόκου $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_2$.



Σχήμα 84: Φάσμα υπεριώδους του συμπλόκου $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_2$.

Στα 784 nm (12755 cm^{-1}) παρατηρείται μια ευρεία ταινία που αποδίδεται σε μια ${}^2\text{E} \rightarrow {}^2\text{T}$ ηλεκτρονιακή μετάπτωση του ιόντος $\text{Cu}(\text{II})$ στο σύμπλοκο [211], ενώ άλλες δυο ταινίες που



παρατηρούνται στα 265.6 nm (37650 cm⁻¹) και 235.6 nm (42445 cm⁻¹) αποδίδονται σε π→π* μεταπτώσεις του πυριμιδινικού και θειαζολικού δακτυλίου αντιστοίχα [211].

Η ταινία που οφείλεται στην ²E → ²T μετάπτωση εμφανίζεται στα 814 nm (12285 cm⁻¹) στο ιόν [Cu(H₂O)₆]²⁺ [227], ενώ σε διάλυμα DMF του συμπλόκου Cu^{II}(thiochrome)Cl₂ παρατηρούνται ταινίες στα 11780 cm⁻¹ (²E → ²T μετάπτωση), 20410 cm⁻¹ (ταινία μεταφοράς φορτίου) και στα 27130 cm⁻¹ (ταινία θειοχρώματος) [120,211]. Στο παρών σύμπλοκο η επιπλέον ένταξη φωσφορικών οξυγόνων έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ενέργειας μετάπτωσης κατά 975 cm⁻¹ σε σχέση με το σύμπλοκο Cu^{II}(thiochrome)Cl₂.

Έχουμε ήδη αναφέρει ότι τόσο η θειαμίνη όσο και τα παράγωγά της αντιδρούν με τον Cu(II) σε υδατικά διαλύματα οδηγώντας σε μερική ή ολική αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I) ενώ η ίδια ή τα παράγωγά της οξειδώνονται ολικά ή μερικά σε θειόχρωμα [108,111,120]. Η παραγωγή θειοχρώματος συνεπάγεται καταστροφή της συνεχυσμικής δράσης της TPP *in vivo*. Η παρουσία αυτού του τρικυκλικού παραγωγού οξείδωσης της θειαμίνης μπορεί να ανιχνευθεί ακόμα και σε μικρές ποσότητες απ' την παρουσία μιας χαρακτηριστικής ταινίας στα 360-380 nm. Για πρώτη φορά λοιπόν παρατηρήθηκε ότι τόσο το στερεό σύμπλοκο [Cu(LH)Cl]₂ όσο και το διήτημα που απομονώνεται απ' την σύνθεση του παραπάνω συμπλόκου, δεν περιέχουν θειόχρωμα αφού η χαρακτηριστική ταινία στα 360-380 nm απουσιάζει απ' τα φάσματα. Η παρατήρηση αυτή είναι πολύ σημαντική και δείχνει ότι το σημαντικό βιολογικά μόριο της HETPP και ενδιάμεσο του καταλυτικού κύκλου της θειαμίνης δεν οξειδώνεται απ' το ιόν Cu²⁺ *in vitro* και πιθανόν το ίδιο να συμβαίνει και *in vivo*.



VIII. Ποτενσιομετρία.

Με τη μέθοδο αυτή έγινε δυνατός ο ακριβής προσδιορισμός τόσο των σταθερών ιονισμού της HETPP όσο και των συνολικών σταθερών σχηματισμού ($\log\beta$) (εξισώσεις 21,22) των σωματιδίων (συμπλόκων) που σχηματίζονται σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν $M(II)$ και HETPP σε μοριακή αναλογία 1:1 ($M= Cd,Zn,Cu$).



$$K_f = \frac{[M_2L_2H_n]^{(2+n)}}{[M^{2+}]^2 \cdot [L^{-}]^2 \cdot [H^{+}]^n} \quad (22)$$

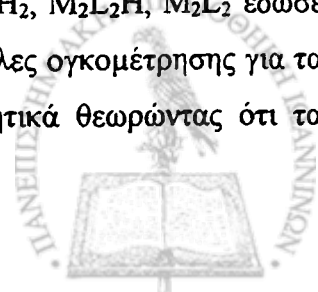
Οι τιμές $\log\beta$ δίνονται στον πίνακα 11 ενώ τα διαγράμματα κατανομής για τα συστήματα Cd(II)-HETPP και Zn(II)-HETPP παρουσιάζονται στα σχήματα 85,86.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Ολικές σταθερές σχηματισμού ($\log\beta$) των συστημάτων M(II)-HETPP ($M= Cd,Zn,Cu$). Σε παρέθεση οι τυπικές αποκλίσεις $\times 10^{-2}$.

Σύστημα	Log β (\pm τυπ.απόκλιση $\times 10^{-2}$)		
	$M_2L_2H_2$	M_2L_2H	M_2L_2
Cd(II)-HETPP	21.88(9)	16.57(10)	11.33(6)
Zn(II)-HETPP	21.62(6)	16.45(5)	11.01(3)
Cu(II)-HETPP	23.33(4)	18.65(4)	13.70(3)

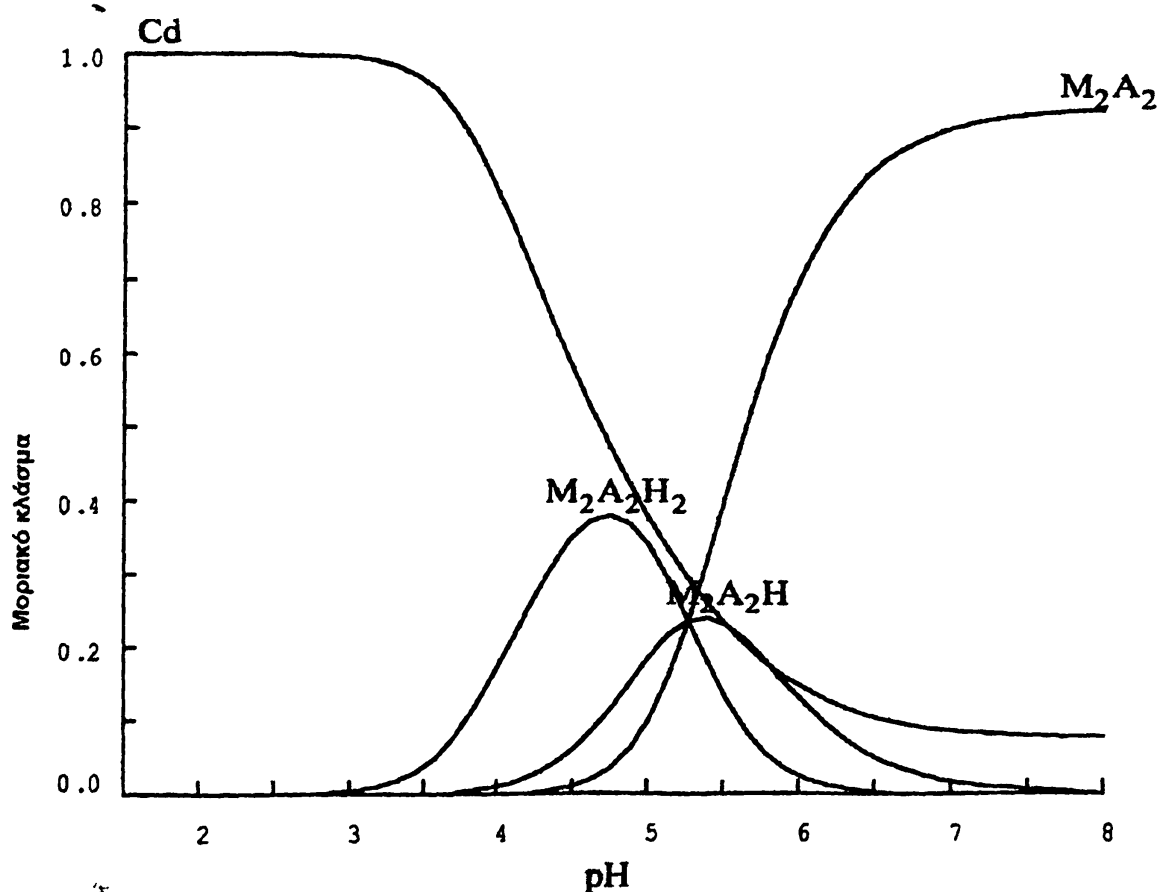
Οι σταθερές ιονισμού της HETPP προσδιορίστηκαν σε $pK_{a1}=5.21$ και $pK_{a2}=6.45$. Η πρώτη αντιστοιχεί στην αποπρωτονίωση του N(1') ενώ η δεύτερη στην αποπρωτονίωση της δεύτερης ομάδας -OH του P $_{\beta}$. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε καλή συμφωνία με τη βιβλιογραφία [9].

Για την προσομοίωση των πειραματικών καμπυλών ογκομέτρησης απαιτείται η επιλογή ενός κατάλληλου μοντέλου σωματιδίων. Απ' τα προηγούμενα δεδομένα και κυρίως απ' τα φάσματα ES-MS προέκυψε ότι τα ιόντα Cd^{2+} και Zn^{2+} σχηματίζουν σύμπλοκα με άμεσο δεσμό με την HETPP στα οποία αποδώσαμε μοριακούς τύπους διμερών ($K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$, ($M= Zn,Cd$)). Και εδώ λοιπόν η εισαγωγή του μοντέλου σωματιδίων $M_2L_2H_2$, M_2L_2H , M_2L_2 έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, οι πειραματικές καμπύλες ογκομέτρησης για τα συστήματα M^{2+} :HETPP 1:1 ($M=Cd,Zn$) προσομοιώνονται ικανοποιητικά θεωρώντας ότι τα



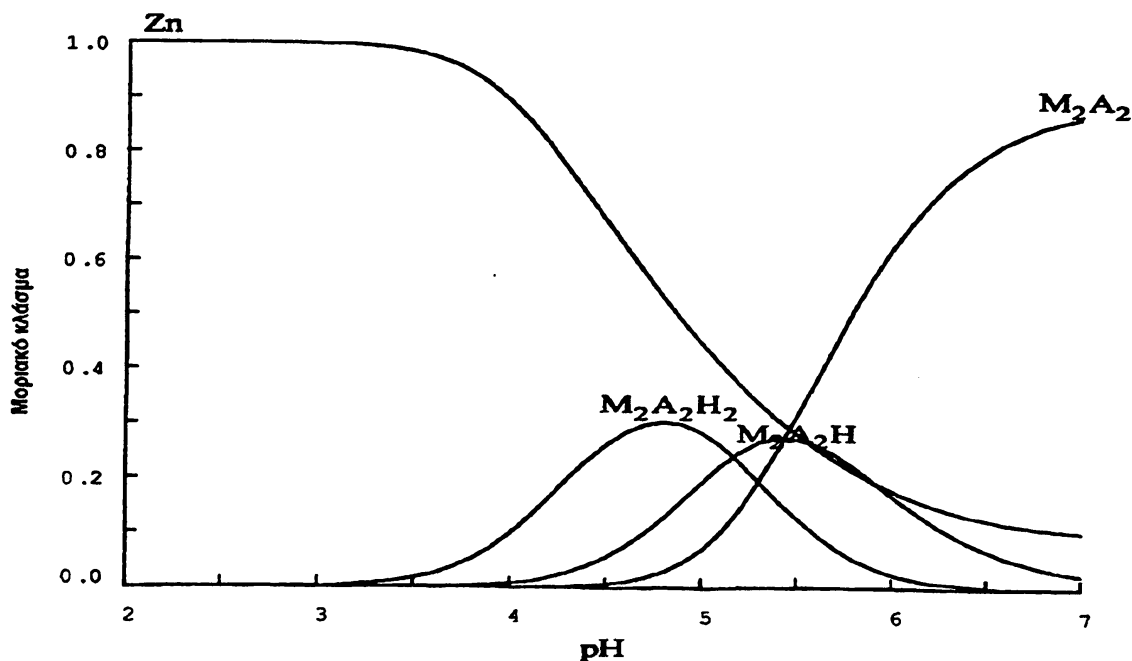
σωματίδια $M_2L_2H_2$ σχηματίζονται μεταξύ $pH=4.5-5.5$, τα σωματίδια M_2L_2H μεταξύ $pH=5.0-6.0$, ενώ τα σωματίδια M_2L_2 επικρατούν σε $pH>6.0$.

Όπως ακριβώς υποδείχθηκε τόσο απ' τα δεδομένα στη στερεά φάση όσο και σε διάλυμα, θεωρούμε ότι και εδώ στο σωματίδιο $M_2L_2H_2$ τα μεταλλοϊόντα εντάσσονται μέσω του $N(1')$ του πρώτου υποκαταστάτη και της ομάδας $P_\beta-O'$ του δεύτερου, ενώ η ομάδα $P_\alpha-O'$ θα πρέπει να εντάσσεται λιγότερο ισχυρά. Άνοδος του pH έχει σαν αποτέλεσμα την αποπρωτονίωση του δεύτερου υδροξυλίου του P_β ενός εκ των δυο συμπλοκοποιημένων υποκαταστατών, με αποτέλεσμα την παραγωγή των σωματιδίων M_2L_2H . Τελικά σε λίγο υψηλότερο pH αποπρωτονιώνεται η ίδια ομάδα και του δεύτερου υποκαταστάτη οδηγώντας στο σωματίδιο M_2L_2 του οποίου η συγκέντρωση φτάνει σε ένα μέγιστο σε $pH=7.0$ (σχήματα 85,86).



Σχήμα 85: Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του συστήματος $Cd(II):HETPP$ 1:1 ($A=HETPP$).





Σχήμα 86: Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του συστήματος Zn(II):HETPP 1:1 (A=HETPP).

Σε μια προσπάθεια να ενισχύσουμε πειραματικά τα παραπάνω καταγράψαμε σε διάφορες τιμές pH τα φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR υδατικών διαλυμάτων M^{2+} ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$) και HETPP σε μοριακή αναλογία 1:1. Τα αποτελέσματα επεξεργασίας αυτών των φασμάτων (σχήματα 87,88) συνοψίζονται στον πίνακα 12.

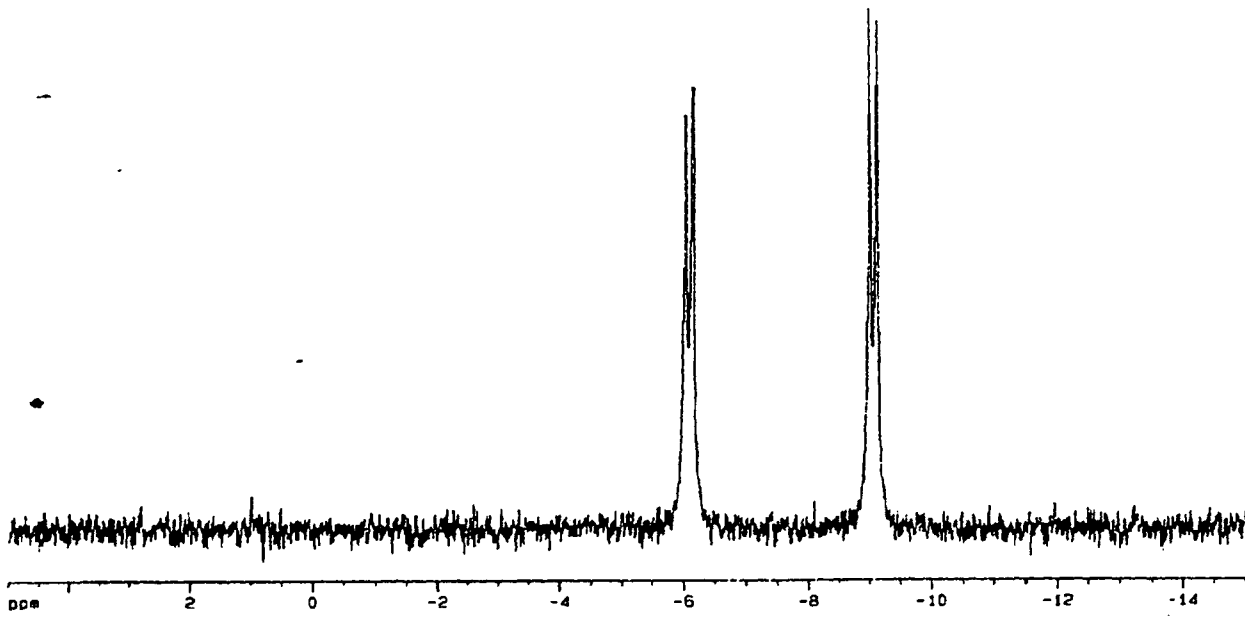
ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Χημικές μετατοπίσεις ^{31}P (δ ,ppm) των συστημάτων Cd(II), Zn(II):HETPP 1:1 σε διάφορες τιμές pH.

	P_α	P_β	$\Delta\delta_{P_\alpha}^*$	$\Delta\delta_{P_\beta}^*$	$\Delta\delta_{P_\alpha}^{**}$	$\Delta\delta_{P_\beta}^{**}$	$^2J_{P_\alpha-P_\beta}$
HETPP, pH=4.7	-10.7	-9.9	—	—			20.2
HETPP, pH=6.0	-10.6	-8.8	—	—	+0.1	+1.10	20.1
HETPP+Zn(II) 1:1 pH=4.8	-9.11	-6.28	+1.59	+3.62			16.3
HETPP+Zn(II) 1:1 pH=6.6	-8.83	-5.78	+1.77	+3.02	+0.28	+0.60	16.3
HETPP+Cd(II) 1:1 pH=4.8	-8.96	-6.06	+1.74	+3.84			17.3
HETPP+Cd(II) 1:1 pH=6.6	-7.81	-3.66	+2.79	+5.14	+1.05	+1.30	16.2

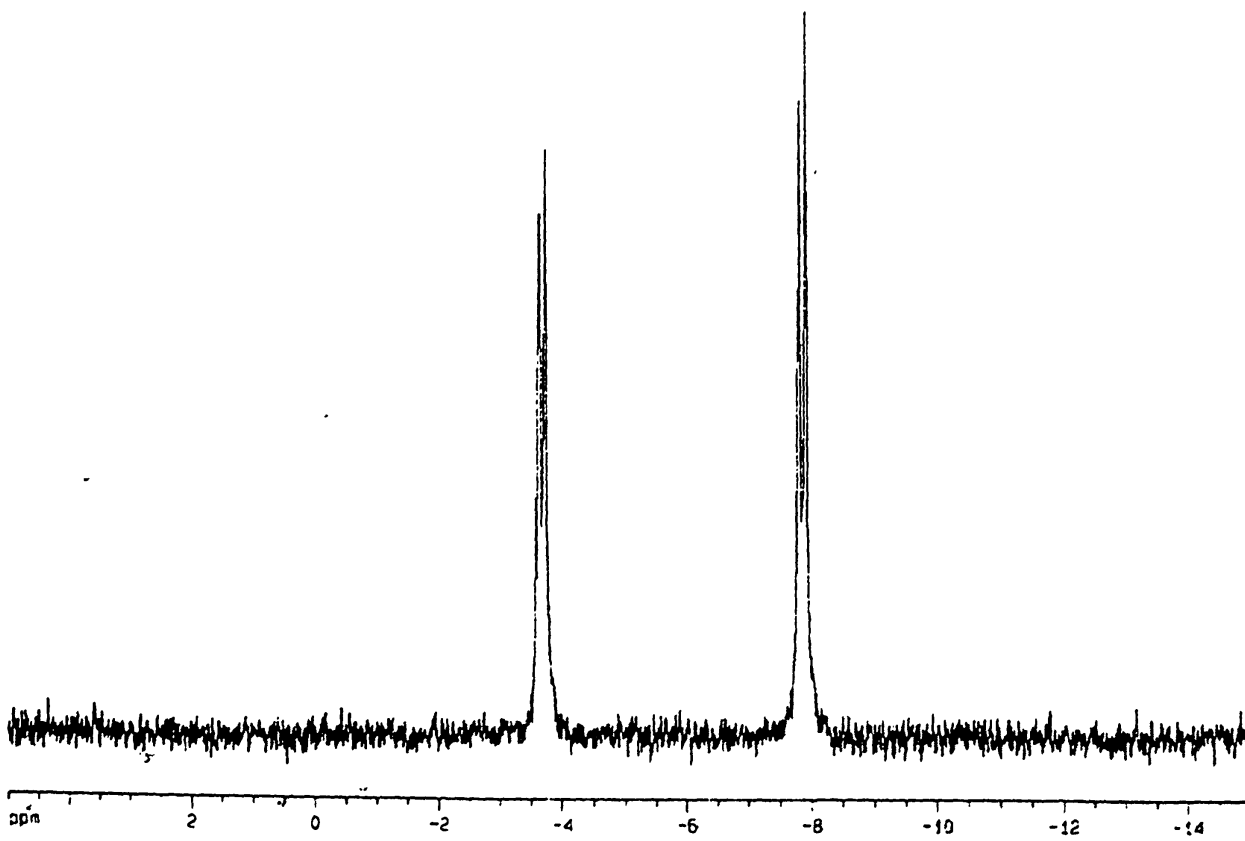
* Διαφορά σε (ppm) μεταξύ των τιμών δ του ελεύθερου υποκαταστάτη και των συστημάτων υποκαταστάτη και μετάλλου στην ίδια τιμή pH ($\Delta\delta = \delta_{\text{υποκαταστάτη}} - \delta_{\text{υποκαταστάτη+μετάλλου}}$).

** Διαφορά (σε ppm) μεταξύ των τιμών δ των υποκαταστατών ή των συστημάτων υποκαταστάτη-μετάλλου σε διαφορετικές τιμές pH ($\Delta\delta = \delta_{\text{υποκαταστάτη}(pH=6.0)} - \delta_{\text{υποκαταστάτη}(pH=4.8)}$ ή $\Delta\delta = \delta_{\text{υποκαταστάτη+μετάλλου}(pH=6.0)} - \delta_{\text{υποκαταστάτη+μετάλλου}(pH=4.8)}$).

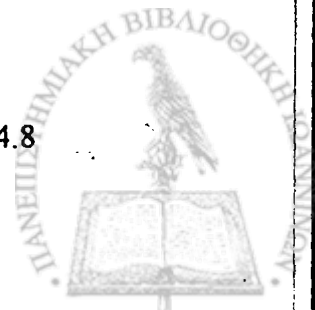
α.

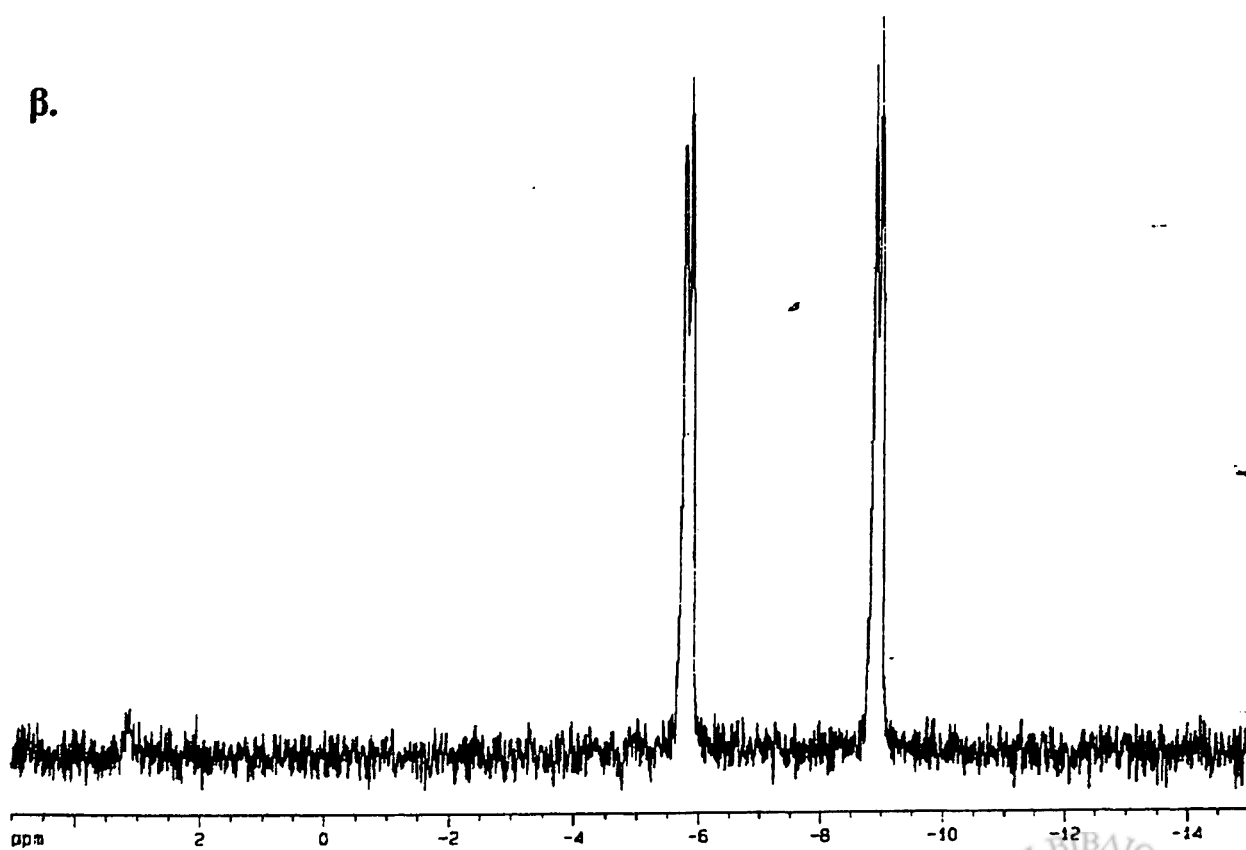
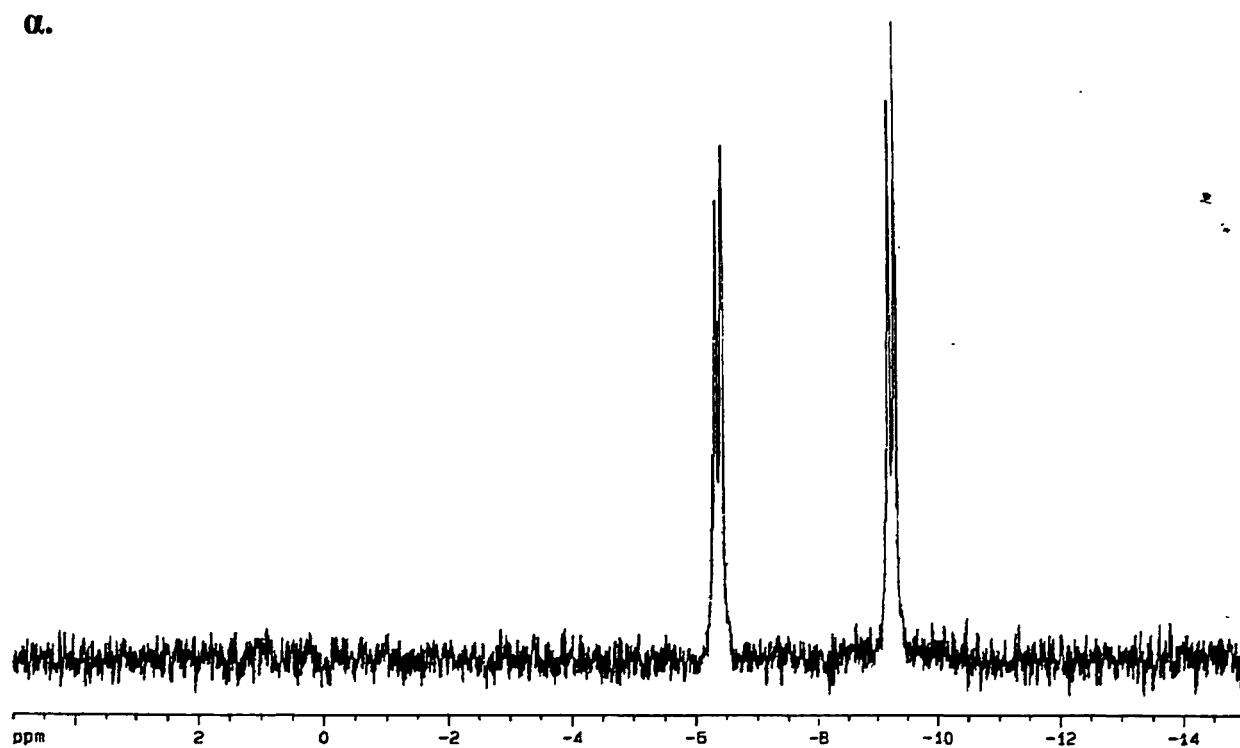


β.

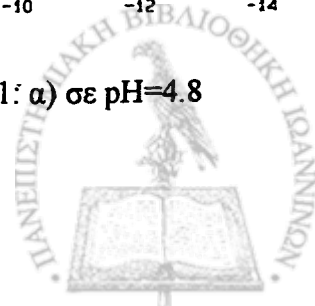


Σχήμα 87: Φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR του συστήματος Cd(II):HETPP 1:1: α) σε pH=4.8
β) σε pH=6.6.





Σχήμα 88: Φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR του συστήματος Zn(II):HETPP 1:1: α) σε pH=4.8
β) σε pH=6.6.



Κατά την άνοδο του pH από 4.7 σε 6.0 στον ελεύθερο υποκαταστάτη η τιμή δ για τον P_β μετατοπίζεται κατά 1.10 ppm σε χαμηλότερα πεδία γιατί πλησιάζουμε την τιμή $pK_a(6.45)$ αποπρωτονίωσης και της δεύτερης ομάδας P_β -OH. Στο σύστημα Zn(II)-HETPP σε pH=4.8 και 6.6 οι συχνότητες των P_α και P_β μετατοπίζονται προς χαμηλότερα πεδία κατά 1.59, 3.62 ppm και 1.77, 3.02 ppm αντίστοιχα.

Ομοίως στο σύστημα Cd(II)-HETPP οι αντίστοιχες μετατοπίσεις των P_α και P_β στις δυο παραπάνω τιμές pH είναι 1.74, 3.84 ppm και 2.79, 5.14 ppm αντίστοιχα προς χαμηλότερα πεδία. Τα παραπάνω φασματοσκοπικά δεδομένα βρίσκονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα δεδομένα των στερεών συμπλόκων $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M=Zn,Cd$) σε πρόσφατα παρασκευασμένα διαλύματά τους, για τα οποία υποστηρίξαμε ότι η διφωσφορική ομάδα εντάσσεται στο μεταλλικό ιόν κυρίως μέσω του P_β -O. Οι σταθερές $^2J_{P_\alpha-P_\beta}$ οι οποίες μειώνονται περνώντας απ' τον ελεύθερο υποκαταστάτη στα σύμπλοκα αποτελούν μια επιπλέον ένδειξη συμπλοκοποίησης των μεταλλικών ιόντων με τη διφωσφορική ομάδα [222,225].

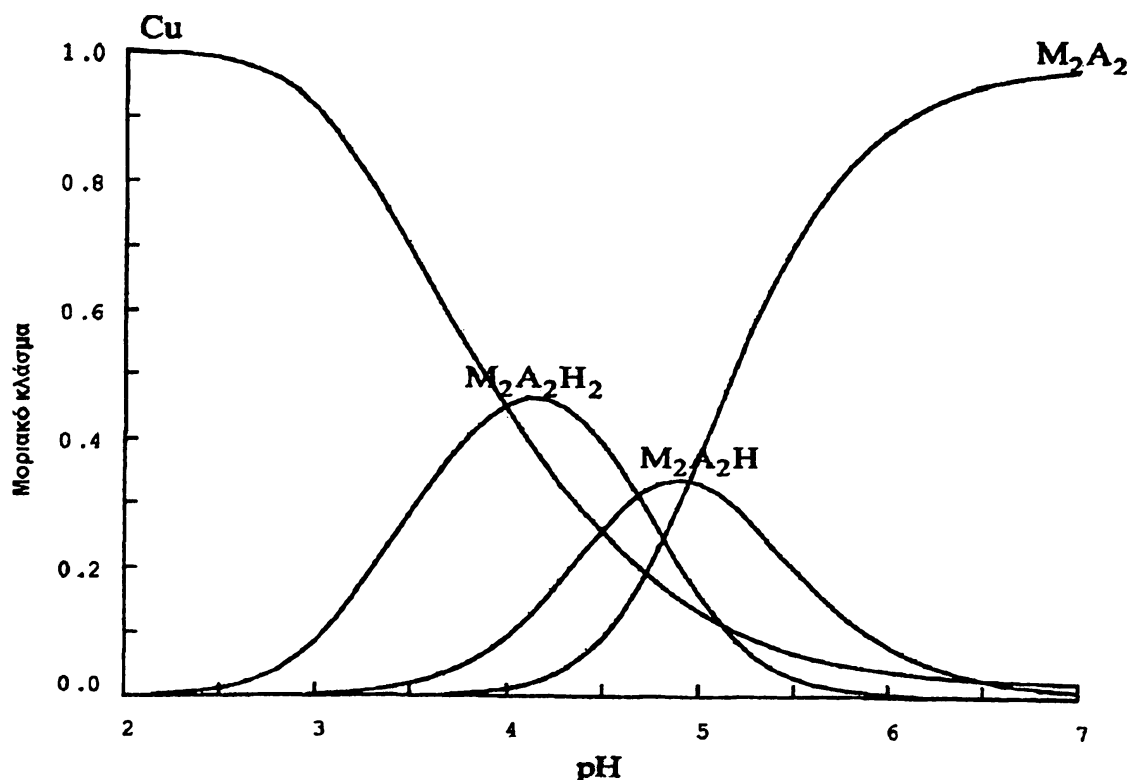
Συγκρίνοντας τις τιμές δ των P_α και P_β στα συστήματα Zn(II)-HETPP και Cd(II)-HETPP μεταξύ των τιμών pH=4.8 και 6.6 παρατηρούμε μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία κατά 0.28, 0.60 και 1.05, 1.30 ppm αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν το γεγονός ότι σε pH=4.8 η μια υδροξυλομάδα του P_β είναι πρωτονιωμένη και στα δυο μόρια υποκαταστάτη του σωματιδίου $M_2L_2H_2$, ενώ σε pH=6.6 έχει αποπρωτονιωθεί πλήρως δημιουργώντας το σωματίδιο M_2L_2 .

Όσον αφορά το σύστημα Cu(II):HETPP 1:1 οι πειραματικές καμπύλες ογκομέτρησης προσομοιώνονται ικανοποιητικά θεωρώντας ότι σχηματίζονται διμερή σύμπλοκα του ίδιου τύπου ($Cu_2L_2H_2$, Cu_2L_2H , Cu_2L_2) και ίδιας δομής όπως το στερεό προϊόν $[Cu(LH)Cl]_2$ που απομονώθηκε κατά την αντίδραση Cu^{2+} και HETPP σε διάλυμα MeOH:EtOH 2:3.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα κατανομής σωματιδίων (σχήμα 89), το σωματίδιο $Cu_2L_2H_2$ σχηματίζεται μεταξύ pH=2.5-5.5, το Cu_2L_2H μεταξύ pH=3.5-6.5, ενώ σε pH>6.5 επικρατεί το σωματίδιο Cu_2L_2 . Το μεγαλύτερο εύρος ύπαρξης των σωματιδίων αυτών σε σχέση με τα αντίστοιχα σωματίδια των συστημάτων M(II):HETPP 1:1 ($M=Cd,Zn$) αποτελεί έμμεση απόδειξη της μεγαλύτερης σταθερότητάς τους.

Στο σωματίδιο $Cu_2L_2H_2$ η ομάδα P_β -OH όμοια πρέπει να είναι πρωτονιωμένη και στα δυο μόρια του υποκαταστάτη L. Αυξάνοντας το pH η ομάδα αυτή του πρώτου μορίου υποκαταστάτη του διμερούς αποπρωτονιώνεται, παράγοντας το σωματίδιο Cu_2L_2H . Τελικά η αποπρωτονίωση πάλι της ίδιας ομάδας του δεύτερου όμως μορίου υποκαταστάτη οδηγεί στο σχηματισμό του σωματιδίου Cu_2L_2 , το οποίο είναι και το μοναδικό σε pH.6.5. Για την ενίσχυση των παραπάνω δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί φασματοσκοπία ^{31}P -NMR λόγω της

παρουσίας του παραμαγνητικού ιόντος Cu(II), οπότε οι μόνες ενδείξεις προέρχονται απ' τη χρήση φασματοσκοπίας EPR και ορατού (Vis). Τα δεδομένα αυτά δίνονται στον πίνακα 13.



Σχήμα 89: Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του συστήματος Cu(II):HETPP 1:1 (A=HETPP).

Η αποπρωτονίωση της ομάδας P_β-OH βέβαια, δεν μπορεί να ανιχνευθεί άμεσα μέσω των παραπάνω φασματοσκοπικών τεχνικών λόγω του ότι η δεύτερη υδροξυλομάδα του P_β δεν εντάσσεται στο μεταλλικό ιόν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Φασματοσκοπικά δεδομένα EPR και Vis για το σύστημα Cu(II):HETPP 1:1.

pH	επικρατών σωματίδιο	logβ	λ _{max} (nm)	ε (dm ⁻³ ·mol·cm ⁻¹)	g	A (G)	g _⊥	A _⊥ (G)
3.0			808	18.8	2.315	129	2.009	14
4.1	Cu ₂ L ₂ H ₂	23.44(4)	797	25.8	—	—	—	—
5.0	Cu ₂ L ₂ H	18.65(4)	787	32.8	—	—	—	—
6.5	Cu ₂ L ₂	13.70(3)	779	60.0	2.248	145	2.002	14

Έτσι σε $\text{pH}=3.0$ είναι παρόν μόνο το σωματίδιο $\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2$ σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση και με φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά $\lambda_{\text{max}}=808\text{nm}$, $g_{\parallel}=2.315$, $g_{\perp}=2.009$ και $A_{\parallel}=129\text{G}$, $A_{\perp}=14\text{G}$. Όπως εύκολα φαίνεται και απ' το σχήμα 89 το σωματίδιο $\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}$ συνυπάρχει με τα $\text{Cu}_2\text{L}_2\text{H}_2$ και Cu_2L_2 οδηγώντας σε μη ερμηνεύσιμο φάσμα EPR. Αντιθέτως σε $\text{pH}=6.5$ επικρατεί μόνο το σωματίδιο Cu_2L_2 με φασματοσκοπικές παραμέτρους $\lambda_{\text{max}}=779\text{nm}$, $g_{\parallel}=2.248$, $g_{\perp}=2.002$ και $A_{\parallel}=145\text{G}$, $A_{\perp}=14\text{G}$. Η κατά 29 nm υποχρωμική μετατόπιση στα φάσματα ορατού, σε συνδυασμό με τη μείωση του g_{\parallel} και την αύξηση του A_{\parallel} στα φάσματα EPR μεταξύ $\text{pH}=3.0$ και 6.5 αποδίδεται στην αύξηση της ενέργειας του πεδίου των υποκαταστατών γύρω απ' το ιόν Cu(II) [227,228], μιας και τώρα εντοπίζεται ένα επιπλέον αρνητικό φορτίο κοντά στο μεταλλικό ιόν λόγω της αποπρωτονίωσης της ομάδας $\text{P}_\beta\text{-OH}$.

Η διμερής δομή των συμπλόκων όμως, όπου τα δυο άτομα Cu(II) συμπλέκονται με το N(I) του ενός υποκαταστάτη και την πυροφωσφορική ομάδα του δεύτερου, ενισχύεται και απ' τη μη αγίχνευση σημάτων στο EPR που να οφείλονται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο ατόμων Cu(II) , αποδεικνύοντας έτσι ότι η μεταξύ τους απόσταση είναι μεγαλύτερη των 10 \AA .

Συγκρίνοντας τέλος τις ολικές σταθερές σχηματισμού ($\log\beta$) των τριών συστημάτων που μελετήσαμε προκύπτει ότι ο Cu(II) σχηματίζει πολύ σταθερότερα σύμπλοκα με την HETPP απ' ότι το Cd(II) ή ο Zn(II) αφού $\beta_{\text{Cu(II)-HETPP}}/\beta_{\text{Cd(II)-HETPP}} = 234$ και $\beta_{\text{Cu(II)-HETPP}}/\beta_{\text{Zn(II)-HETPP}} = 490$. Το γεγονός αυτό όπως είδαμε πιο πάνω, υποδεικνύεται και απ' το μεγαλύτερο εύρος ύπαρξης (περιοχή pH) των σωματιδίων του συστήματος Cu(II)-HETPP .



Ε. Τελικά συμπεράσματα απ' τη μελέτη αλληλεπίδρασης των Cd^{2+} , Zn^{2+} και Cu^{2+} με την HETPP.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

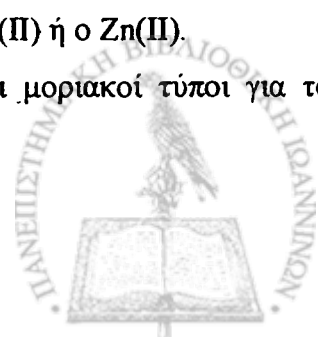
α) Κατά την αλληλεπίδραση της HETPP με τα ιόντα Cd^{2+} , Zn^{2+} και Cu^{2+} σε μεθανολικά ή μεθανολικά:αιθανολικά διαλύματα σχηματίζονται εύκολα σύμπλοκα μοριακού τύπου $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M= Zn, Cd$), $[Cu(LH)Cl]_2$ και $Zn(LH_3)Cl_3$. Στα διμερή σύμπλοκα τα μεταλλικά ιόντα εντάσσονται μέσω του N(1') του ενός υποκαταστάτη και την πυροφωσφορική ομάδα του δεύτερου. Απ' την πυροφωσφορική ομάδα, αλληλεπιδρά περισσότερο ισχυρά με το μεταλλικό ιόν η ομάδα $P_\beta-O^-$, η $P_\alpha-O^-$ είναι πιο χαλαρά συνδεδεμένη ενώ τέλος η δεύτερη υδροξυλομάδα του P_β παραμένει πρωτονιωμένη σε $pH=4.5-5.0$. Δεν παρατηρήθηκε στις παρούσες πειραματικές συνθήκες χηλική συμπεριφορά της διφωσφορικής ομάδας. Στο σύμπλοκο $Zn(LH_3)Cl_3$ παρατηρείται μια ασθενής αλληλεπίδραση της διφωσφορικής ομάδας με το ιόν Zn^{2+} ενώ το N(1') είναι πρωτονιωμένο. Για το λόγο αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί και ως ιονικό άλας της μορφής $[ZnCl_3][LH_3]^+$.

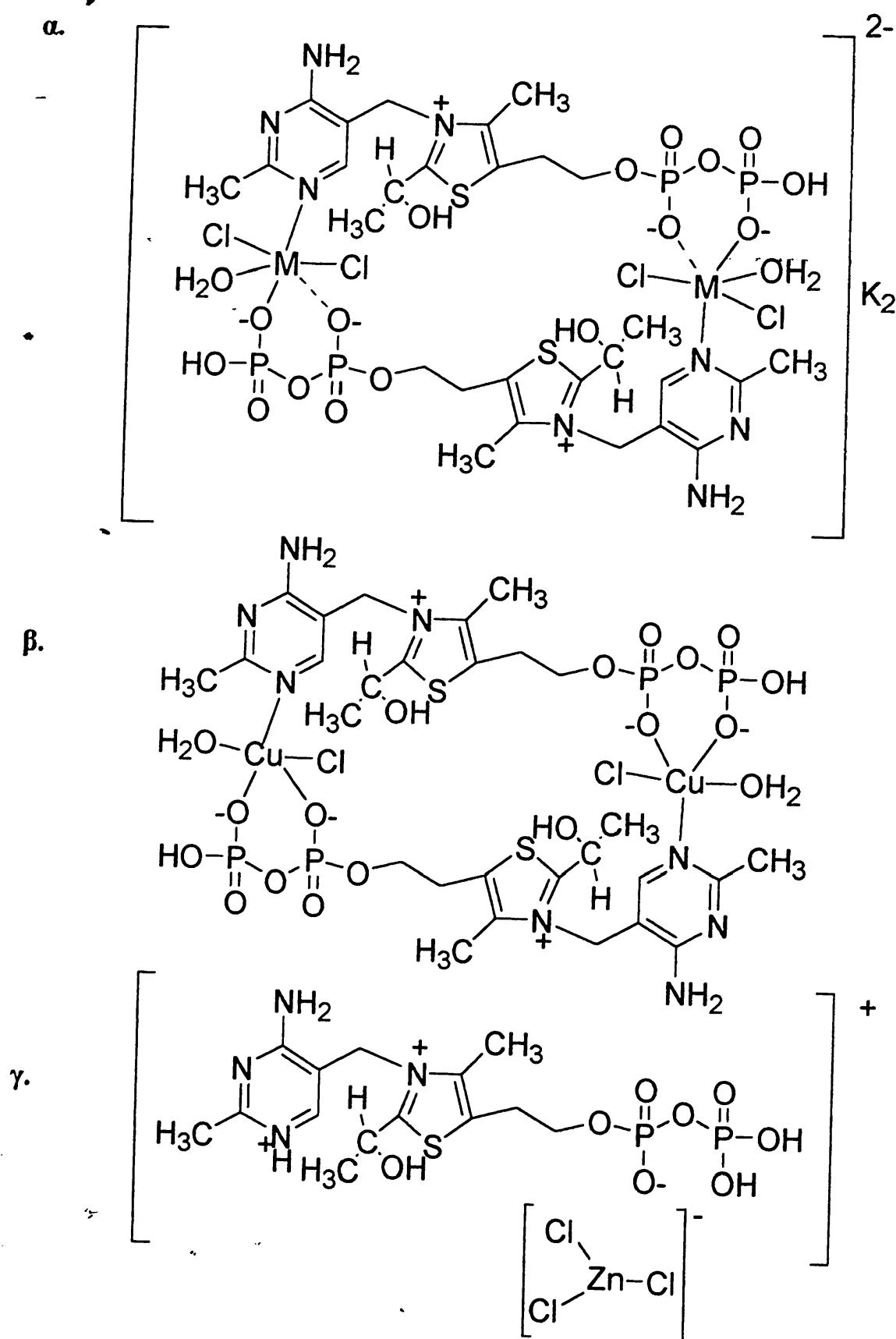
β) Στα σύμπλοκα $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M= Zn, Cd$) ο υποκαταστάτης υιοθετεί την S-διαμόρφωση στη στερεά φάση (όπως εξάλλου και ο ελεύθερος υποκαταστάτης HETPP) η οποία διατηρείται και σε διάλυμα. Αποδείχθηκε επίσης ότι τα παραπάνω σύμπλοκα αποτελούν καλά μοντέλα της ενζυμικής δράσης, καθώς ελευθερώνουν εύκολα την ομάδα $CH_3CH(OH)-$ απ' τον C(2) του θειαζολίου (φάσματα ES-MS).

γ) Η HETPP δεν οξειδώνεται σε θειόχρωμα κατά την αλληλεπίδραση της με ιόντα Cu(II). Σε αντίθεση με την HETPP η πρόδρομος ένωσή της, η TPP δηλαδή, οξειδώνεται σε κάποιο ποσοστό όπως υποδεικνύουν βιβλιογραφικά δεδομένα.

δ) Κατά την αλληλεπίδραση των Cd^{2+} , Zn^{2+} και Cu^{2+} με την HETPP σε υδατικά διαλύματα και σε μοριακή αναλογία 1:1 σχηματίζονται σωματίδια του τύπου $M_2L_2H_2$, M_2L_2H , M_2L_2 ($M=Cd, Zn, Cu$). Το σωματίδιο $M_2L_2H_2$ έχει την ίδια δομή μ' αυτή που αποδείχθηκε πιο πάνω για τα στερεά σύμπλοκα $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M= Zn, Cd$), ενώ τα M_2L_2H και M_2L_2 διαφέρουν μόνο στο ότι αποπρωτονιώνεται σταδιακά η δεύτερη (μη συμπλοκοποιημένη) ομάδα $P_\beta-OH$ των δυο υποκαταστατών. Τέλος όπως προέκυψε απ' την εξέταση των τιμών $\log\beta$ των σωματιδίων, ο Cu(II) σχηματίζει σταθερότερα σύμπλοκα με την HETPP απ' ότι το Cd(II) ή ο Zn(II).

Στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 90) παρουσιάζονται οι προτεινόμενοι μοριακοί τύποι για τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν.





Σχήμα 90: Προτεινόμενοι μοριακοί τύποι για τα σύμπλοκα: α) $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M = Zn, Cd$)
 β) $[Cu(LH)Cl]_2$ γ) $Zn(LH_3)Cl_3$ (πιθανόν ιονικό άλας).

II. Σύνθεση και χαρακτηρισμός συμπλόκων της TPP με τα ιόντα Cd^{2+} και Zn^{2+} .

Αλληλεπίδραση του αποενζύμου της γPDC με σύμπλοκα της HETPP και TPP.

Όπως έχουμε αναφέρει στο εισαγωγικό μέρος, μελέτες στις οποίες να έχουν απομονωθεί στερεά μεταλλικά σύμπλοκα της πυροφωσφορικής θειαμίνης (TPP) περιορίζονται σε δυο μόνο περιπτώσεις [104,105,114]. Στην ενότητα αυτή περιγράφεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός στερεών μεταλλικών συμπλόκων της TPP με τα ιόντα Cd(II) και Zn(II). Επιπλέον συγκρίνεται η συνενζυμική δράση, παρουσία του αποενζύμου της γPDC, τόσο αυτών όσο και των αντίστοιχων συμπλόκων της HETPP, στην αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος.

A. Σύνθεση των συμπλόκων.

Τα σύμπλοκα (εξίσωση 23) συντέθηκαν σε μεθανολικά διαλύματα κατ' ανάλογο τρόπο με τα αντίστοιχα της HETPP. Έτσι, προηγήθηκε εξουδετέρωση της κατιονικής μορφής του υποκαταστάτη $(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$ με δυο ισοδύναμα μεθανολικού KOH. Οι διάφορες μορφές πρωτονίωσης του υποκαταστάτη (μονοκατιονική $(\text{LH}_3)^+$, ουδέτερη (LH_2) , μονοανιονική $(\text{LH})^-$ και διανιονική L^{2-} καθώς και οι περιοχές pH που αυτές επικρατούν, παρουσιάστηκαν στο σχήμα 4, σελίδα 4.



Τα δεδομένα των στοιχειακών αναλύσεων (πίνακας 14) υποδεικνύουν ότι και τα δυο σύμπλοκα αντιστοιχούν στον εμπειρικό τύπο $[\text{M}(\text{LH})\text{Cl} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}]_n$ ($\text{M}=\text{Zn}, \text{Cd}$).

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Δεδομένα στοιχειακών αναλύσεων των συμπλόκων.

	%C		%H		%N		%S		%M	
	Θεωρ	Πειρ	Θεωρ	Πειρ.	Θεωρ	Πειρ	Θεωρ	Πειρ	Θεωρ	Πειρ
$[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]_n$	23.7	23.3	3.5	3.6	9.2	9.0	5.3	5.2	18.5	18.4
$[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]_n$	25.7	26.0	3.8	3.9	10.0	9.9	5.7	5.7	11.7	12.0

Είναι γνωστό ότι η απλή θειαμίνη και οι φωσφορικοί της εστέρες σχηματίζουν πολύ εύκολα ιονικά άλατα κατά την ανάμιξή τους με μεταλλικά ιόντα [95-105]. Αυτό αποδίδεται κυρίως στο καθαρό θετικό φορτίο που εντοπίζεται στο N(3) του θιαζολίου. Παράλληλα, αποπρωτονίωση του N(1') του υποκαταστάτη (το pK_a αυτής της θέσης-όπως προκύπτει από

ποτενσιομετρικές μελέτες [9,10]- είναι περίπου 5.02) οδηγεί ασφαλώς στον σχηματισμό και την απομόνωση "πραγματικών" συμπλόκων της TRP, με άμεσο δεσμό μετάλλου-TRP.



B. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων στη στερεά φάση.

I. Φασματοσκοπία IR και Raman.

Στους πίνακες 15 και 16 συνοψίζονται οι κυριότερες ταινίες που εμφανίζονται στα φάσματα IR και Raman του υποκαταστάτη και των συμπλόκων καθώς και οι αποδόσεις τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Φασματοσκοπικά δεδομένα IR (4000-100 cm^{-1}).

Αποδόσεις ταινιών	$(\text{L}'\text{H}_3)^+\text{Cl}^-$	$(\text{L}'\text{H})\text{K}^+$	$[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]_n$	$[\text{Zn}(\text{L}'\text{H})\text{Cl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]_n$
$\nu(\text{OH})$	—	3410s.br	3333s	3393s.br
$\nu(\text{NH}_2)$	—	—	3206w	3208w.br
$\nu(\text{C-H})$ αρωματικό	3169w	3197w	3077w	3082w
$\nu(\text{C-H})$ αλειφατικό	2985s.br	2962w	2961w	2956,2924m.2854
$\nu(8\alpha) + \delta\text{-NH}_2$	1685s.1652s.1630s	1654,1605s	1654s,1601w	1654s.1624w
$\nu(8\alpha)$	1660s	1600s	1640s	1650s
$\nu(8\text{b})$	1530m	1599m	1559m	1540m
$\nu(\text{P=O})$	1256br.1196	1233s	1220s	1223s
$\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{P-O-C})$	1103s.1061br	1117s.1066br	1095s.1059br	1104s.1063w
$\nu(\text{P-O}) + \nu(\text{P-O-P})$	1011s,990br,944br	956s,913br	914s	935s
$\delta(\text{P-O})$	470	522s	538s	544s
$\nu(\text{M-Cl})$	—	—	289m,254w	267w,290w
$\nu(\text{M-N})$	—	—	195w	188w

s=ισχυρή ταινία, m=μέτρια, w=ασθενής, br=ευρεία, sh=ώμος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Φασματοσκοπικά δεδομένα Raman (4000-100 cm^{-1}).

	$\nu(8\alpha)$	$\nu(8\text{b})$	$\nu(\text{M-Cl})$	$\nu(\text{M-N})$
$(\text{L}'\text{H}_3)^+\text{Cl}^-$	1655	1594	—	—
$(\text{L}'\text{H})\text{K}^+$	1598	1570	—	—
$[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]_n$	1654 1596	1555w	265w	181w
$[\text{Zn}(\text{L}'\text{H})\text{Cl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]_n$	1654 1596	1551w	287w,br	180w

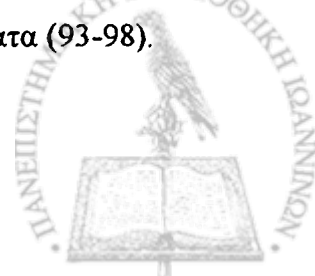
Οι αποδόσεις των ταινιών στηρίχθηκαν σε βιβλιογραφικά δεδομένα για παρόμοια συστήματα θειαμίνης [127] καθώς και στα αντίστοιχα δεδομένα για τα σύμπλοκα της HETPP. Έτσι στην περιοχή 4000-2000 cm^{-1} εντοπίζονται οι δονήσεις τάσης $\nu(\text{OH})$, $\nu(\text{NH}_2)$ $\nu(\text{C-H})$ (αρωματικό) και $\nu(\text{C-H})$ (αλειφατικό). Η $\nu(\text{OH})$ αποδίδεται σε δόνηση τάσης τόσο του νερού εφυδάτωσης

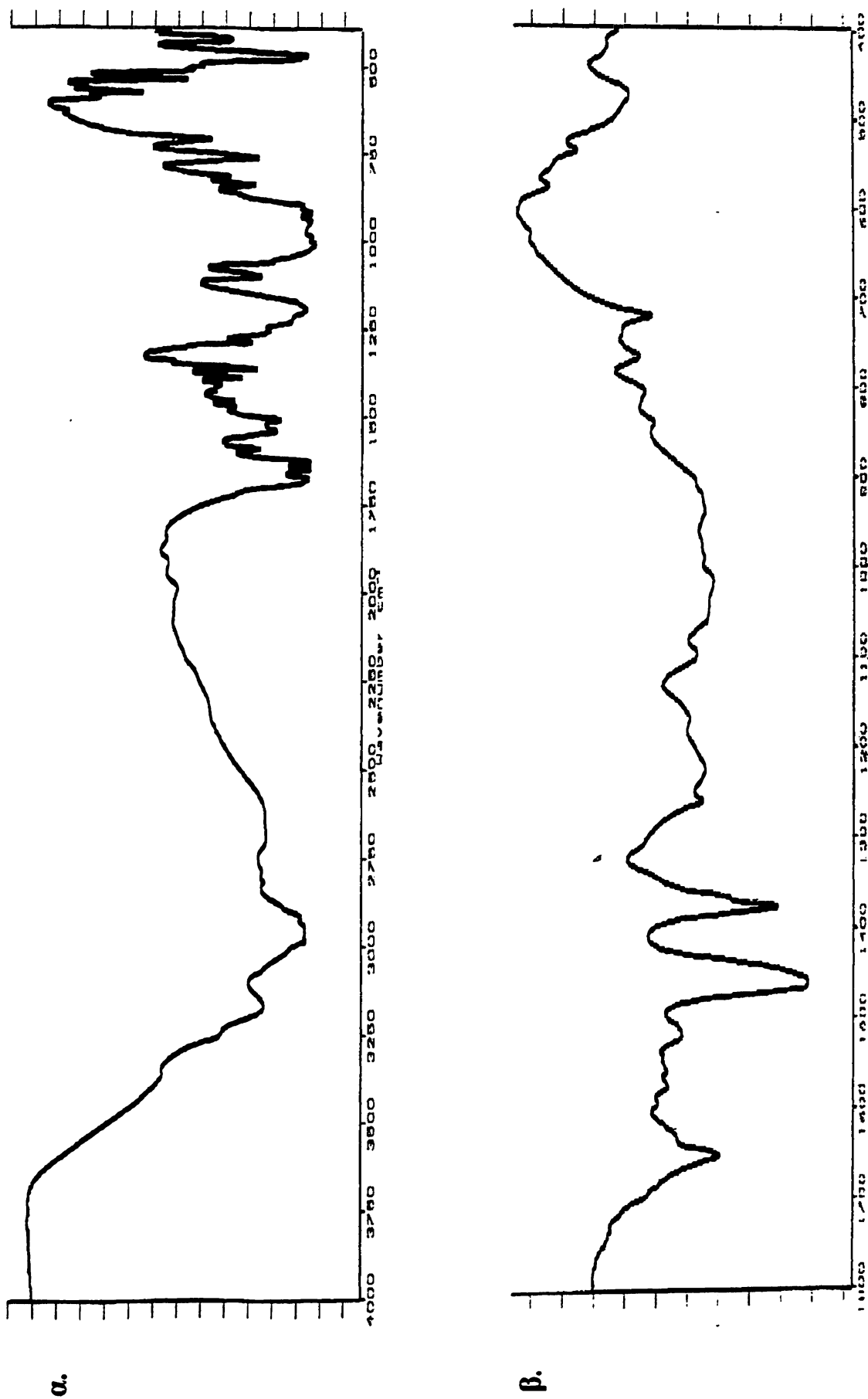
[229] όσο και των υδροξυλίων των μορίων. Παρατηρείται ότι η δόνηση $\nu(\text{C-H})$ (αρωματικό) μετατοπίζεται κατά 60 cm^{-1} περνώντας απ' τον ελεύθερο υποκαταστάτη στα σύμπλοκα $[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_n$ και $[\text{Zn}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_n$, ισχυροποιώντας το γεγονός της συμμετοχής του πυριμιδινικού δακτυλίου στη συμπλοκοποίηση [127].

Περνώντας στην περιοχή $2000-1300 \text{ cm}^{-1}$, εντοπίζονται η συνδυαστική δόνηση $\nu(8a)+\delta(\text{NH}_2)$ καθώς και η δόνηση $\nu(8b)$ του πυριμιδινικού δακτυλίου [127]. Πειράματα δευτερίωσης, επέτρεψαν τον διαχωρισμό και την εμφάνιση της ταινίας $\nu(8a)$ η συχνότητα της οποίας ακολουθεί τη σειρά $\text{H}^+ > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ στον πρωτονιωμένο υποκαταστάτη και τα σύμπλοκα όπως ακριβώς συμβαίνει και με τη σειρά των συμπλόκων της HETPP. Η ταινία που αποδίδεται στην $\nu(8b)$ επηρεάζεται επίσης απ' την πρωτονίωση ή την συμπλοκοποίηση. Η συχνότητά της αυξάνεται κατά 69 cm^{-1} κατά την αποπρωτονίωση του $\text{N}(1')$, ενώ μειώνεται κατά 40 και 59 cm^{-1} στα σύμπλοκα $[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_n$ και $[\text{Zn}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_n$, αντίστοιχα, σε σχέση με την συχνότητα της ίδιας ταινίας του αποπρωτονιωμένου στο $\text{N}(1')$ υποκαταστάτη $(\text{L}'\text{H})\text{K}^+$. Τα δεδομένα της περιοχής αυτής επιβεβαιώνουν την συμμετοχή του πυριμιδινικού δακτυλίου στη συμπλοκοποίηση, μέσω του $\text{N}(1')$. Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρείται και στα φάσματα Raman σ' αυτή την περιοχή.

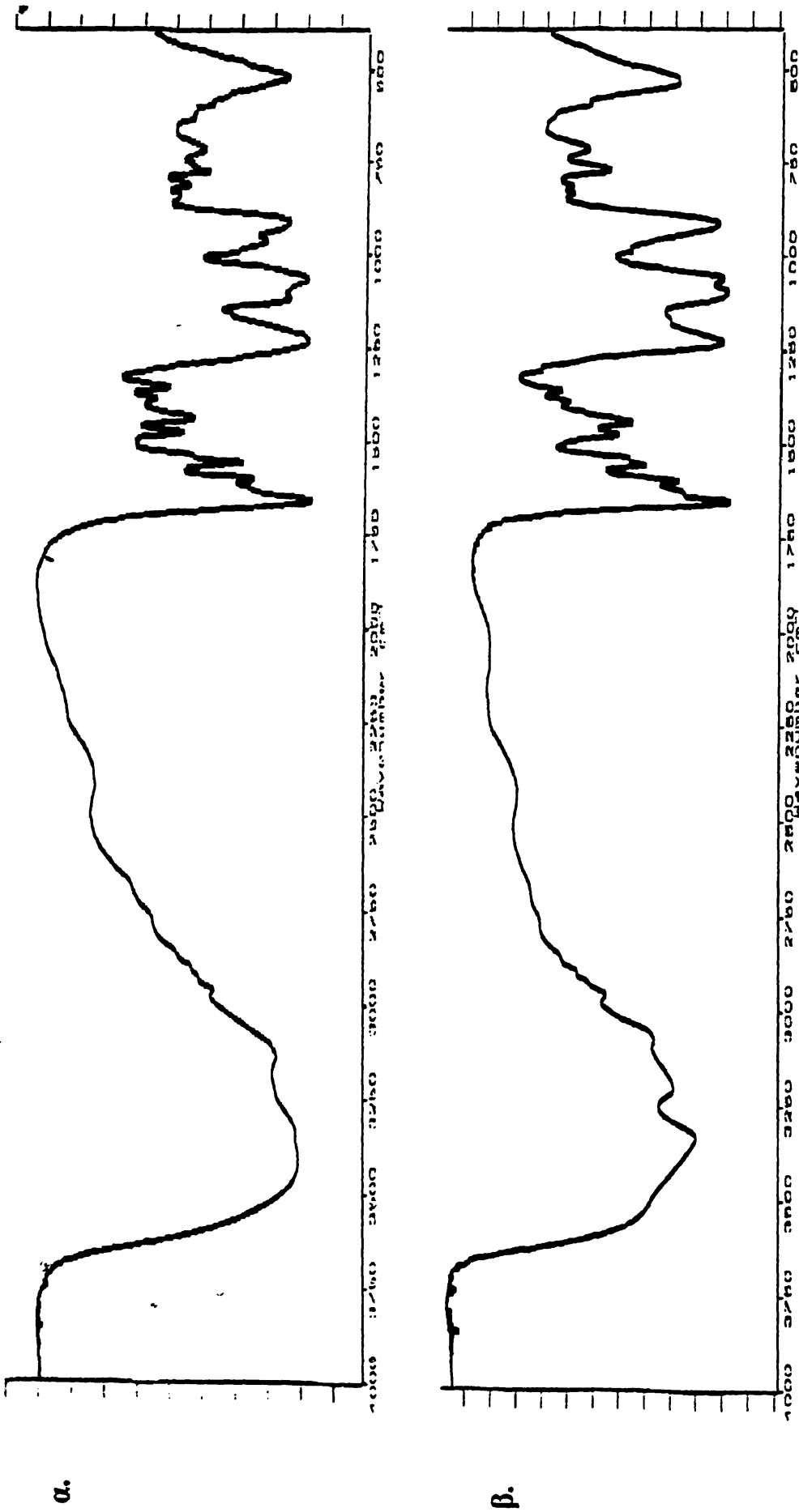
Στην περιοχή $1300-300 \text{ cm}^{-1}$ παρουσιάζονται οι δονήσεις $\nu(\text{P=O})$, $\nu(\text{C-O})+\nu(\text{P-O-C})$, $\nu(\text{P-O})+\nu(\text{P-O-P})$ και η $\delta(\text{P-O})$. Από τις παραπάνω δονήσεις, πληροφορίες σχετικά με τη συμμετοχή ή όχι της πυροφωσφορικής ομάδας στη συμπλοκοποίηση μας δίνουν μόνο η πρώτη και η τελευταία, καθώς οι υπόλοιπες επικαλύπτονται ή συνδυάζονται μεταξύ τους [72, 210]. Περνώντας απ' τον ελεύθερο υποκαταστάτη στα σύμπλοκα, οι μετατοπίσεις των ταινιών $\nu(\text{P=O})$ και $\delta(\text{P-O})$ (πίνακας 15) προσφέρουν ισχυρές ενδείξεις για σύμπλεξη των μεταλλικών ιόντων και μέσω της πυροφωσφορικής ομάδας. Τέλος στην περιοχή κάτω από 300 cm^{-1} τόσο στο IR όσο και στο Raman εντοπίζονται οι δονήσεις $\nu(\text{M-Cl})$ ($250-290 \text{ cm}^{-1}$) και $\nu(\text{M-N})$ ($180-195 \text{ cm}^{-1}$).

Συνοψίζοντας τα δεδομένα IR και Raman καταλήγουμε στο συμπέρασμα της ένταξης των Cd^{2+} και Zn^{2+} μέσω του $\text{N}(1')$ και της πυροφωσφορικής ομάδας ταυτόχρονα. Τα σύμπλοκά μας θεωρούμε ότι έχουν τουλάχιστον δομή διμερών της μορφής $[\text{M}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$) όπως ακριβώς και τα αντίστοιχα της HETPP. Αυτό ενισχύεται απ' το γεγονός ότι η ένταξη ενός και του αυτού μεταλλοϊόντος με άτομα δότες που εντοπίζονται στα δυο άκρα του ογκώδους σχετικά υποκαταστάτη μας δεν θα πρέπει να ευνοείται. Τα αποτελέσματα της ποτενσιομετρίας στα συστήματα $\text{M}^{2+} : \text{TPP} 1:1$ ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$) που ακολουθούν θα επιβεβαιώσουν την υπόθεση αυτή. Τα φάσματα του υποκαταστάτη και των συμπλόκων παρατίθενται στα επόμενα σχήματα (93-98).

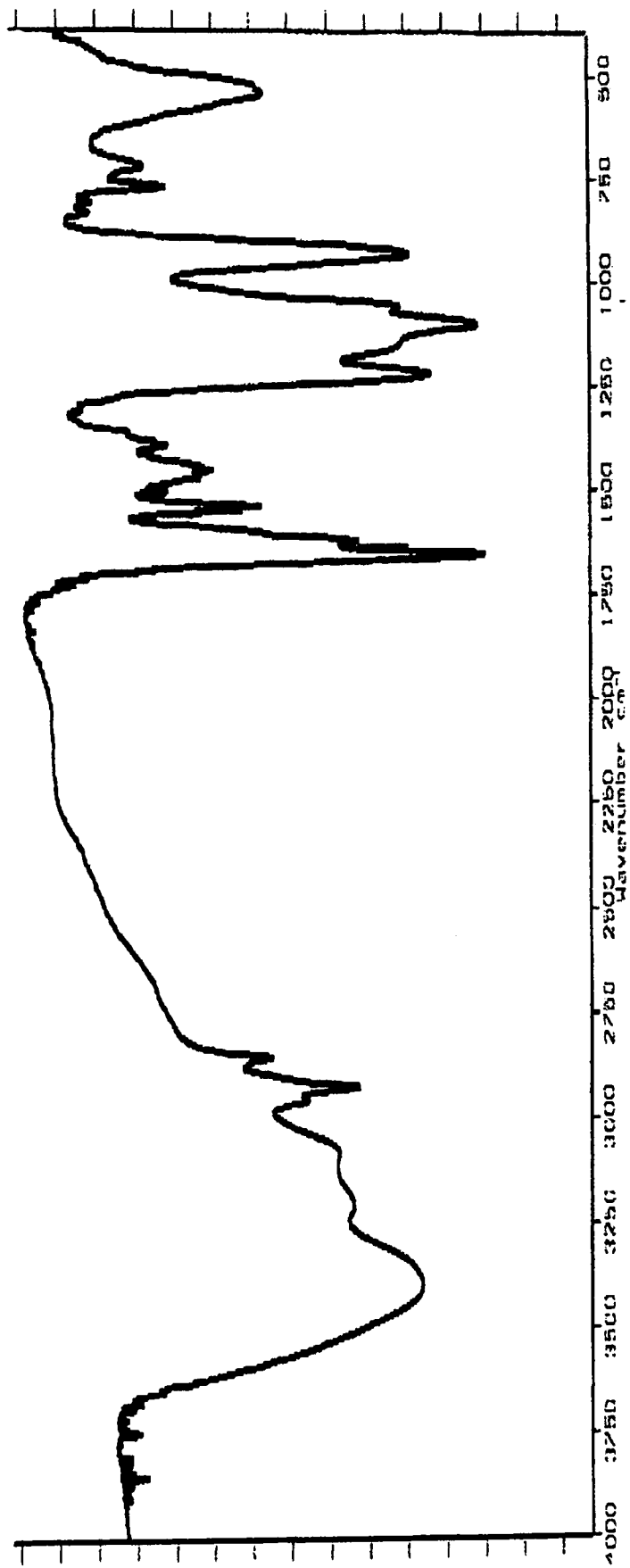




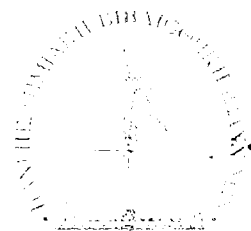
Σχήμα 93: Φάσματα IR της TPP στην καρβονική της μορφή ($L'H_3^+Cl^-$ α) κανονικό φάσμα β) μετά από δευτερίωση (περιοχή 1800-400 cm^{-1}).

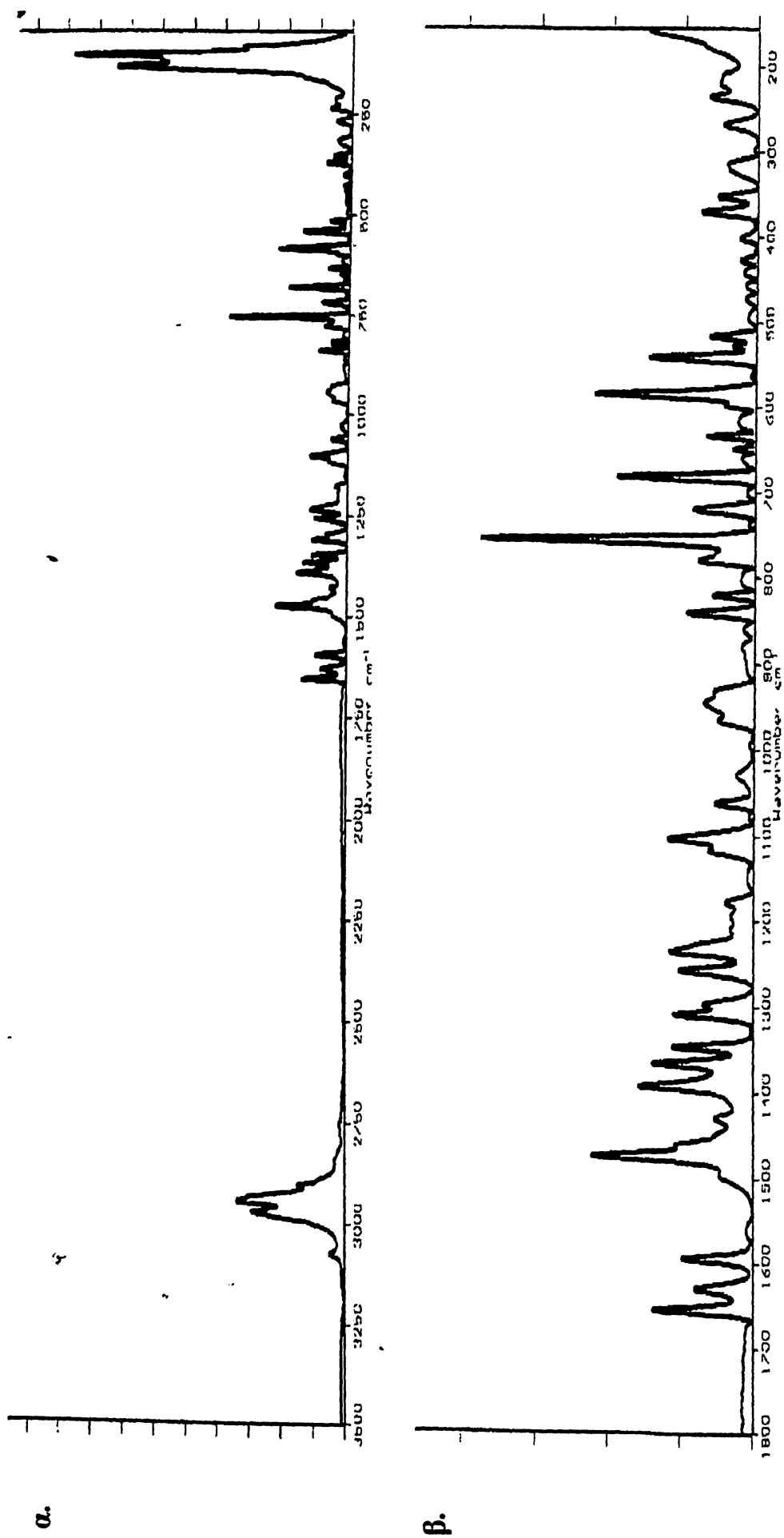


Σχήμα 94: Φάσματα IR α) της μονοανιονικής μορφής της TPP, (L'H)K⁺ β) του συμπλόκου [Cd(L'H)Cl]₂.

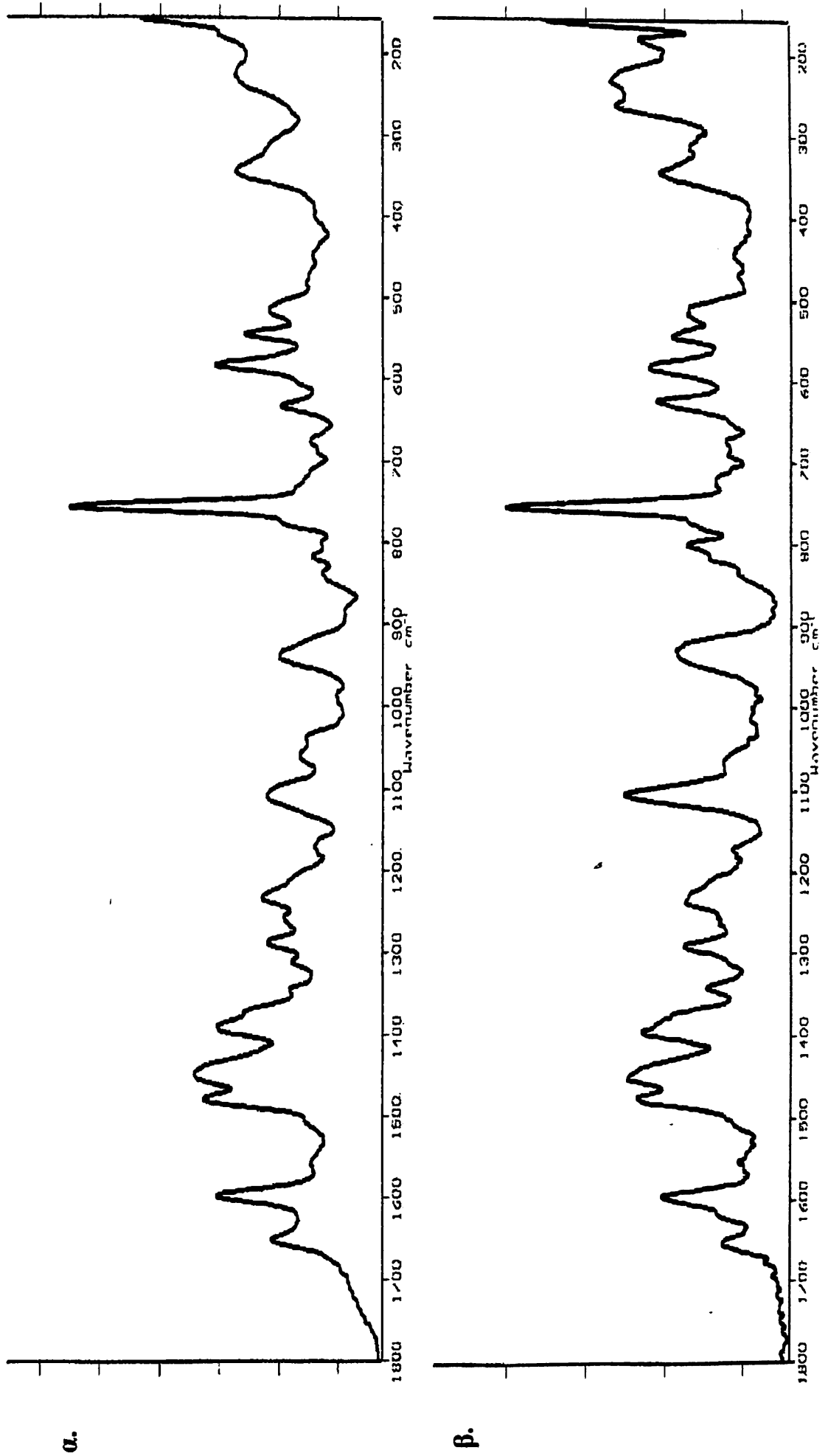


Σχήμα 95: Φάσμα IR του συμπλόκου $[Zn(L'H)Cl]_2$.

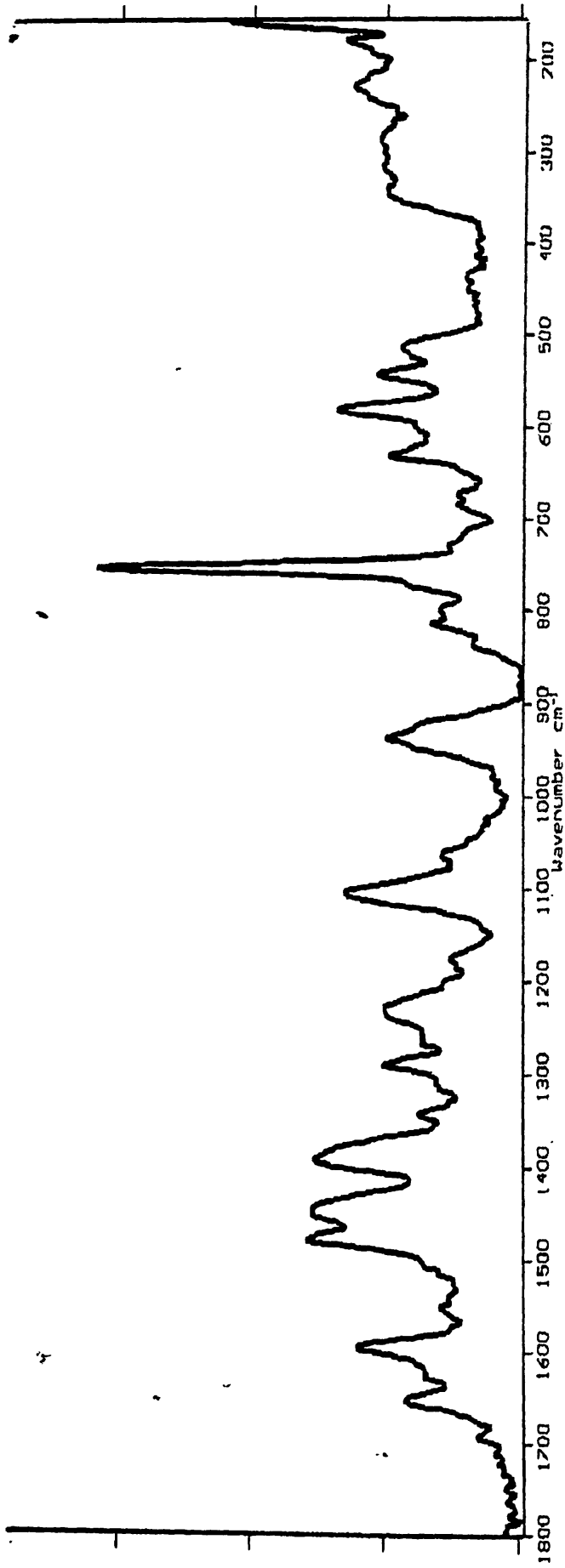




Σχήμα 96: Φάσματα Raman του $(L'H_3)^+Cl^-$ α) περιοχή 4000-100 cm^{-1} β) περιοχή 1800-150 cm^{-1} .



Σχήμα 97: Φάσματα Raman των α) υποκαταστάτη στην μονοανιωνική μορφή (L'H)K⁺ β) του συμπλόκου $[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$.



Σχήμα 98: Φάσμα Raman του συμπλόκου $[Zn(L'H)Cl]_2$.

Γ. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων σε διάλυμα.

I. Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$.

Ενδείξεις για τη συμπλοκοποίηση μέσω του N(1') παρέχουν και τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (σχήματα 99-100). Μετά την επεξεργασία τους προκύπτει ο πίνακας 17.

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Χημικές μετατοπίσεις ^1H (δ , ppm) της TPP και των συμπλόκων της σε διαλύματα D_2O .

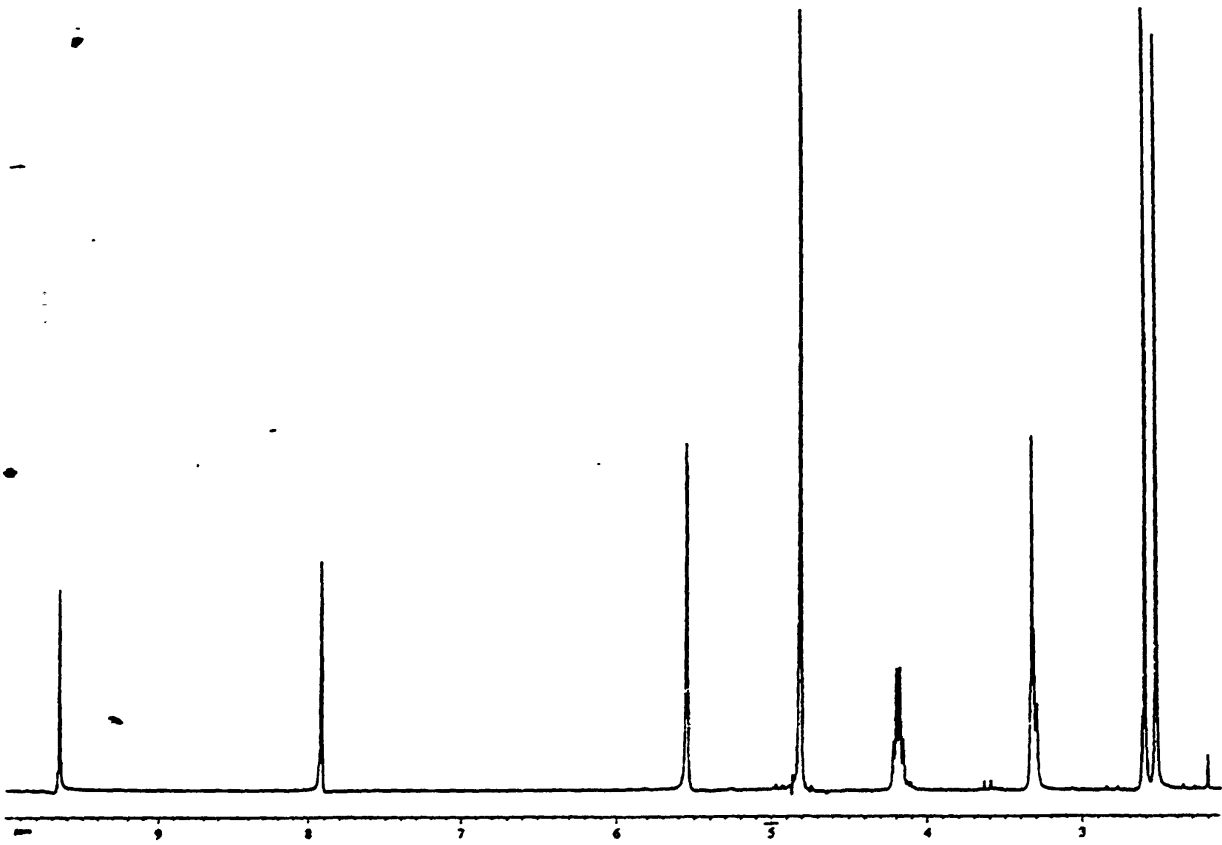
	H-C(6')	H ₂ C(3.5')	H ₂ C(5β)	H ₂ C(5α)	2'-CH ₃	4-CH ₃	H-C(2)
(L'H ₃) ⁺ Cl ⁻ , pH=1.5	7.92	5.55	4.18	3.32	2.61	2.54	—
(L'H)K ⁺ , pH=6.0	8.07	5.50	4.20	3.30	2.60	2.49	—
[Cd(L'H)Cl] ₂	7.85	5.51	4.20	3.32	2.56	2.54	—
[Zn(L'H)Cl] ₂	7.81	5.51	4.20	3.32	2.56	2.53	—

Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές δ για το πρωτόνιο H-C(6') που είναι κοντά στην αναμενόμενη θέση ένταξης N(1'), μετατοπίζονται κατά 0.22 και 0.26 ppm προς υψηλότερα πεδία στα σύμπλοκα Cd(II) και Zn(II) αντίστοιχα, σε σχέση με την τιμή του ελεύθερου υποκαταστάτη (L'H)K⁺. Η επίδραση αφενός μεν της συμπλοκοποίησης (μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία) και αφετέρου ο εντοπισμός στη θέση N(1') του αρνητικού φορτίου του συμπλέγματος [O₂MCl]⁻ (που προκύπτει απ' την συμπλοκοποίηση και της πυροφωσφορικής ομάδας) προκαλεί τις παραπάνω μετατοπίσεις [211, 218-220]. Σημειώνεται ότι ίδιο φαινόμενο παρατηρήσαμε και στις περιπτώσεις των συμπλόκων της HETPP, στα φάσματα ^1H , ^{13}C και $^{13}\text{C-CP MAS NMR}$.

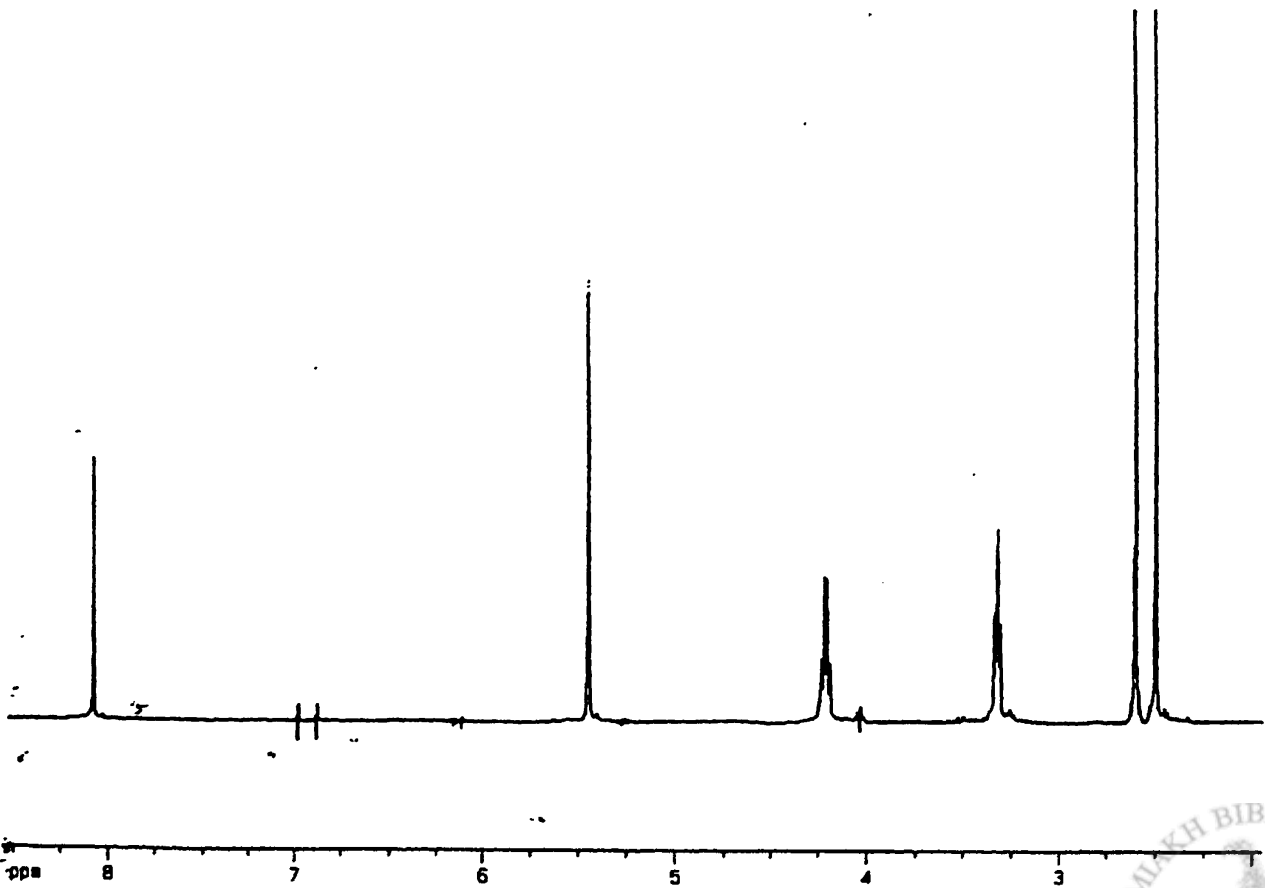
Τέλος, η συχνότητα του H-C(2) δεν εμφανίζεται στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ της TPP στην μονοανιονική μορφή (pH=6.0) καθώς και σ' αυτά των συμπλόκων, λόγω ταχείας ανταλλαγής του ατόμου υδρογόνου με δευτέριο [118].



α.

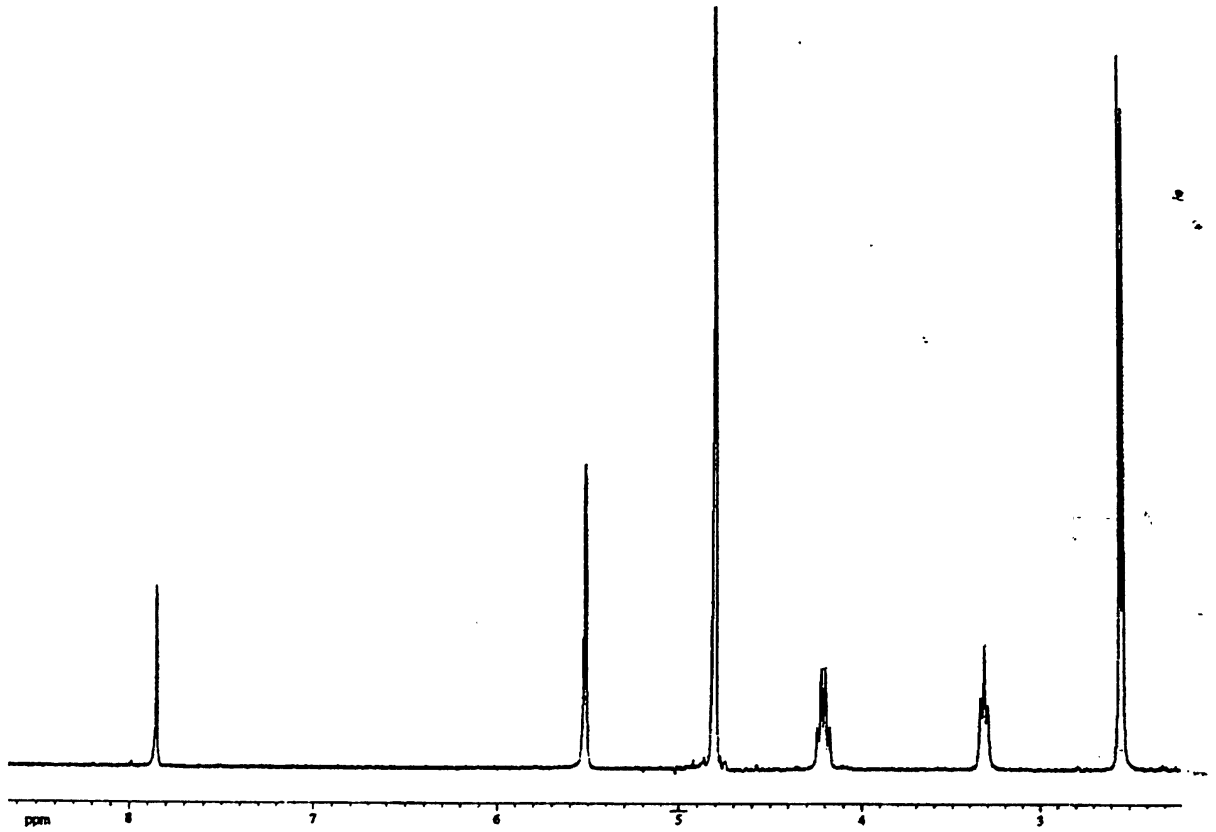
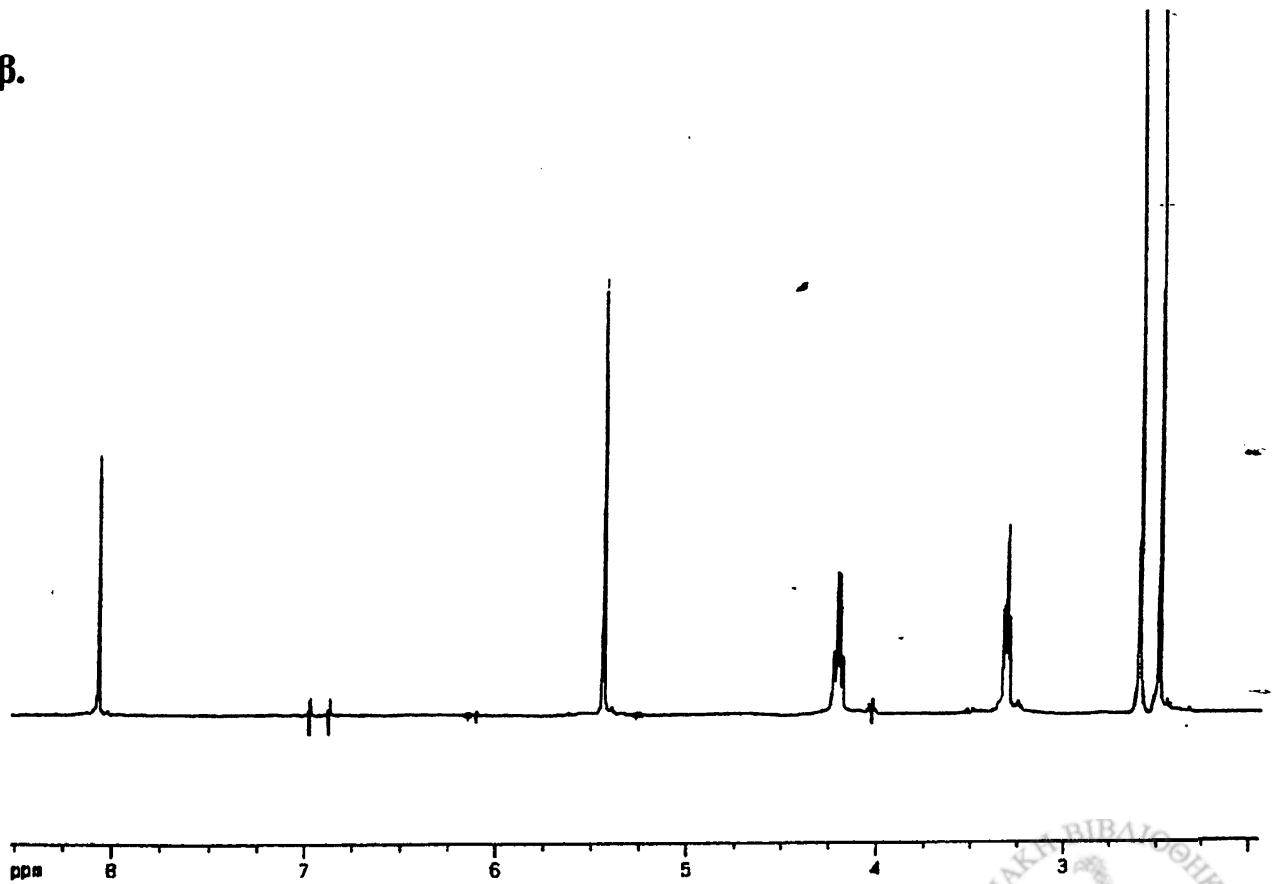


β.

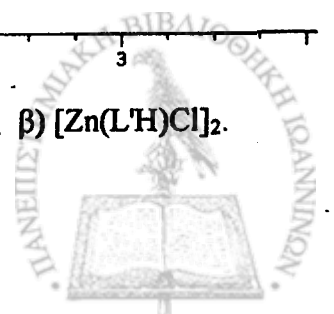


Σχήμα 99: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ σε D_2O α) του $(\text{LH}_3)^+\text{Cl}^-$, $\text{pH}=1.5$ β) του $(\text{LH})\text{K}^+$, $\text{pH}=6.5$.



α.**β.**

Σχήμα 100: Φάσμα ¹H-NMR σε D₂O των συμπλόκων α) [Cd(L'H)Cl]₂ β) [Zn(L'H)Cl]₂.



II. Φασματοσκοπία ^{13}C -NMR.

Οι χημικές μετατοπίσεις και οι αποδόσεις των κορυφών που εμφανίζονται στα φάσματα ^{13}C -NMR της TPP και των συμπλόκων της δίνονται στον πίνακα 18.

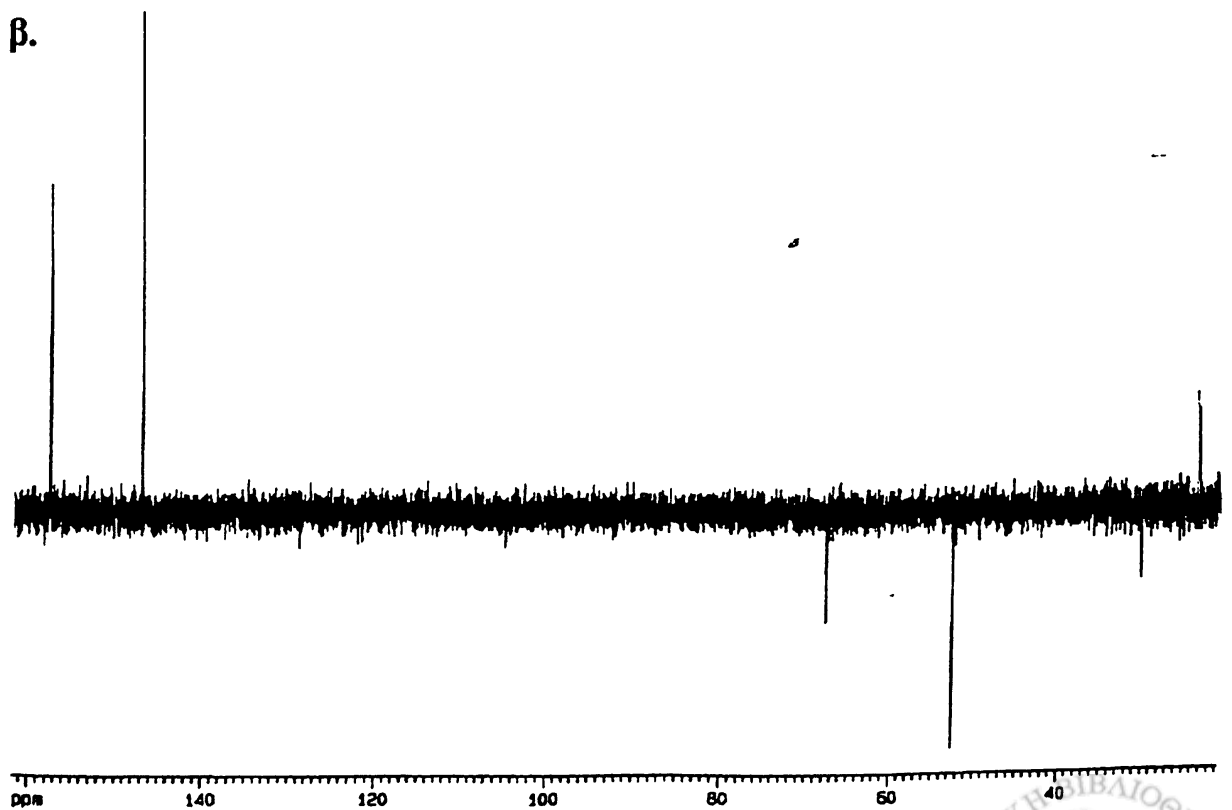
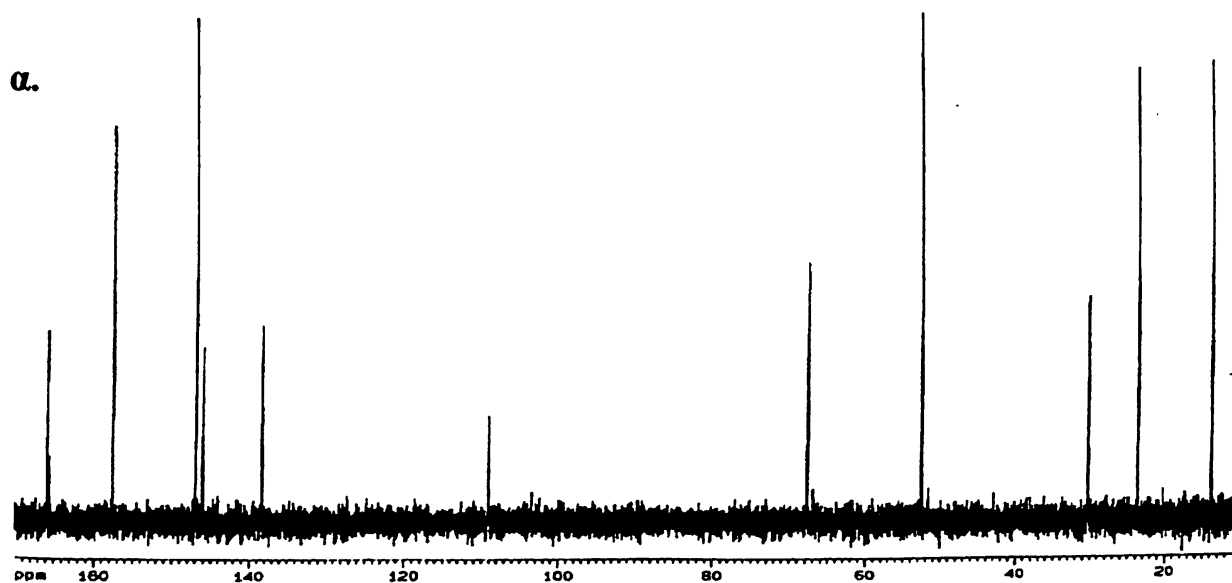
ΠΙΝΑΚΑΣ 18: Χημικές μετατοπίσεις ^{13}C (δ , ppm) της TPP και των συμπλόκων της σε διαλύματα D_2O .

	(L'H ₃) ⁺ Cl ⁻ , pH=1.5	(L'H) ⁺ K ⁺ , pH=6.2	[Cd(L'H)Cl] ₂	[Zn(L'H)Cl] ₂
C(2')	165.9	170.9	167.0	168.0
C(4')	165.7	164.7	165.1	165.0
C(2)	157.6	158.1	—	157.7w
C(6')	147.0	156.7	148.9	151.2
C(4)	146.1	145.8	145.9	145.9
C(5)	138.4	138.3	138.3	138.3
C(5')	109.1	107.5	109.2	108.8
C(5β)	67.74, 67.69	67.26, 67.21	67.88	67.68
C(3,5')	52.6	53.5	52.7	52.9
C(5α)	30.31, 30.23	30.37	30.32	30.35, 30.27
2'-CH ₃	23.7	26.3	24.5	25.0
4-CH ₃	13.8	13.9	13.9	13.9

Οι αποδόσεις των κορυφών των φασμάτων (σχήματα 101-104) βασίστηκαν σε πειράματα ^{13}C -DEPT 135° NMR. Πρωτονίωση στο N(1') επηρεάζει κυρίως τους γειτονικούς στο N(1') άνθρακες [C(2'), C(6') και 2'-CH₃] οι συχνότητες των οποίων μετατοπίζονται σε υψηλότερα πεδία κατά 5.0, 9.7 και 2.6 ppm αντίστοιχα, σε σχέση με τον μη πρωτονιωμένο στο N(1') υποκαταστάτη (pH=6.2), όπως ακριβώς και στην περίπτωση της HETPP και των συμπλόκων της [118].

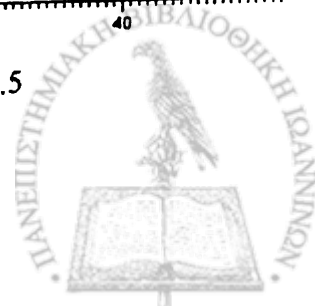
Η σύγκριση των τιμών δ των συμπλόκων μ' αυτές του υποκαταστάτη στη μορφή (L'H)⁺K⁺ αποκαλύπτει ότι η συμπλοκοποίηση προκαλεί όμοια μετατοπίσεις σε υψηλότερα πεδία των ανθράκων C(2'), C(6') και 2'-CH₃. Συγκεκριμένα οι μετατοπίσεις είναι 2.9, 5.5 και 1.3 ppm αντίστοιχα στο σύμπλοκο [Cd(L'H)Cl]₂, και τέλος 3.9, 7.8 και 1.8 ppm αντίστοιχα στο σύμπλοκο [Zn(L'H)Cl]₂. Αιτία των μεταβολών αυτών είναι η επίδραση της συμπλοκοποίησης και ο εντοπισμός αρνητικού φορτίου όπως έχουν αναφερθεί και στη φασματοσκοπία ^1H -NMR [211, 218-220]. Μικρή μετατόπιση της τάξης των 0.6 ppm παρατηρείται επίσης και στη συχνότητα του C(5β) και στα δυο σύμπλοκα, υποδεικνύοντας πιθανή αλληλεπίδραση των

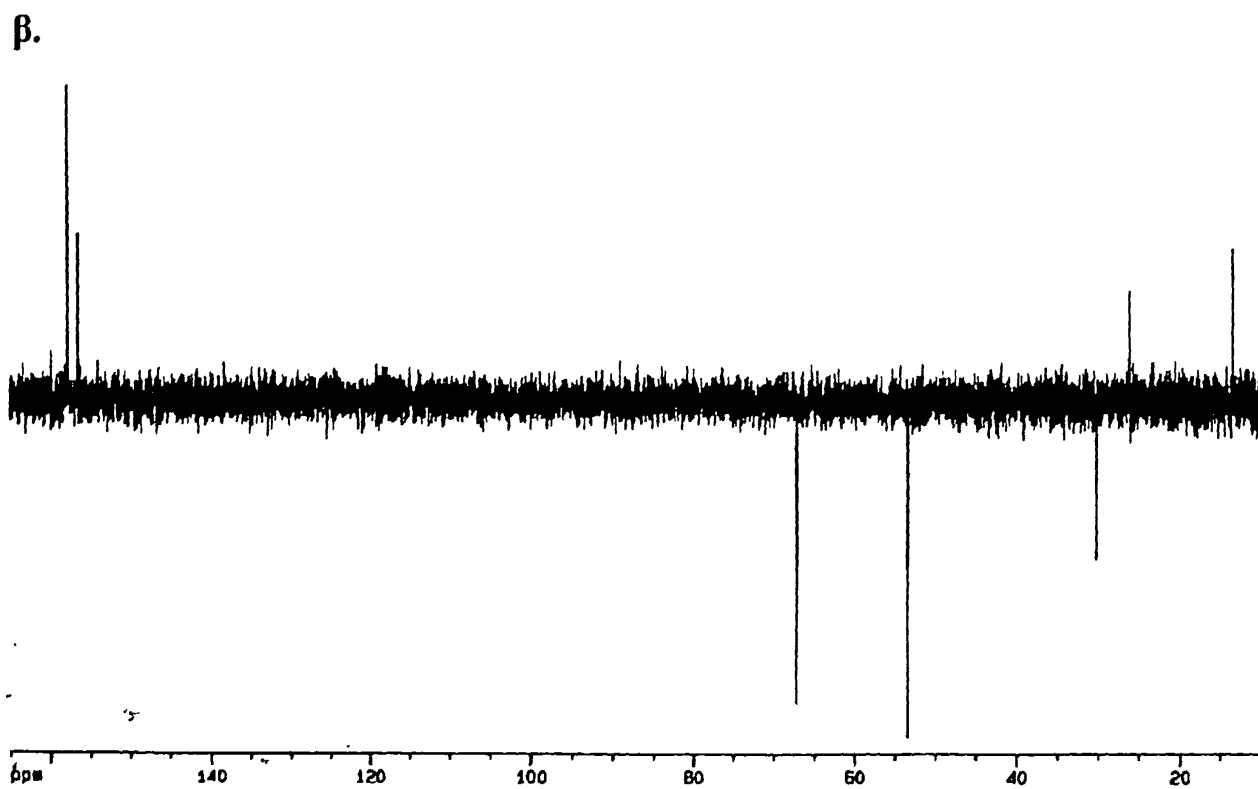
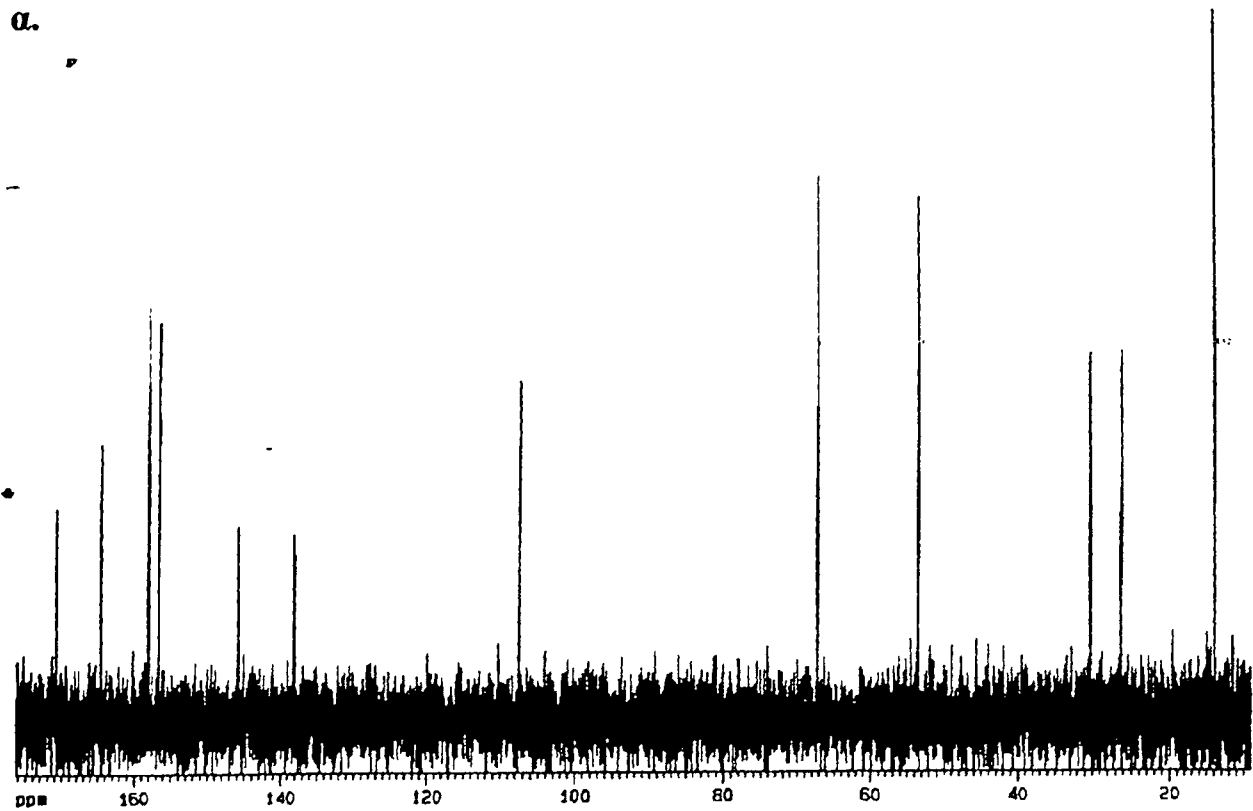
ιόντων με την πυροφωσφορική ομάδα. Παρατηρήθηκε τέλος ότι στον υποκαταστάτη (σε pH=1.5 και 6.2) οι κορυφές που οφείλονται στους άνθρακες C(5α) και C(5β) εμφανίζονται ως διπλές. Αυτό θα πρέπει να οφείλεται πιθανά στην σταθεροποίηση της εύκαμπτης πυροφωσφορικής ομάδας σε δυο διαφορετικές διαμορφώσεις.



Σχήμα 101: Φάσματα ^{13}C -NMR του $(\text{L}'\text{H}_3)^+\text{Cl}^-$ σε διάλυμα D_2O , pH=1.5

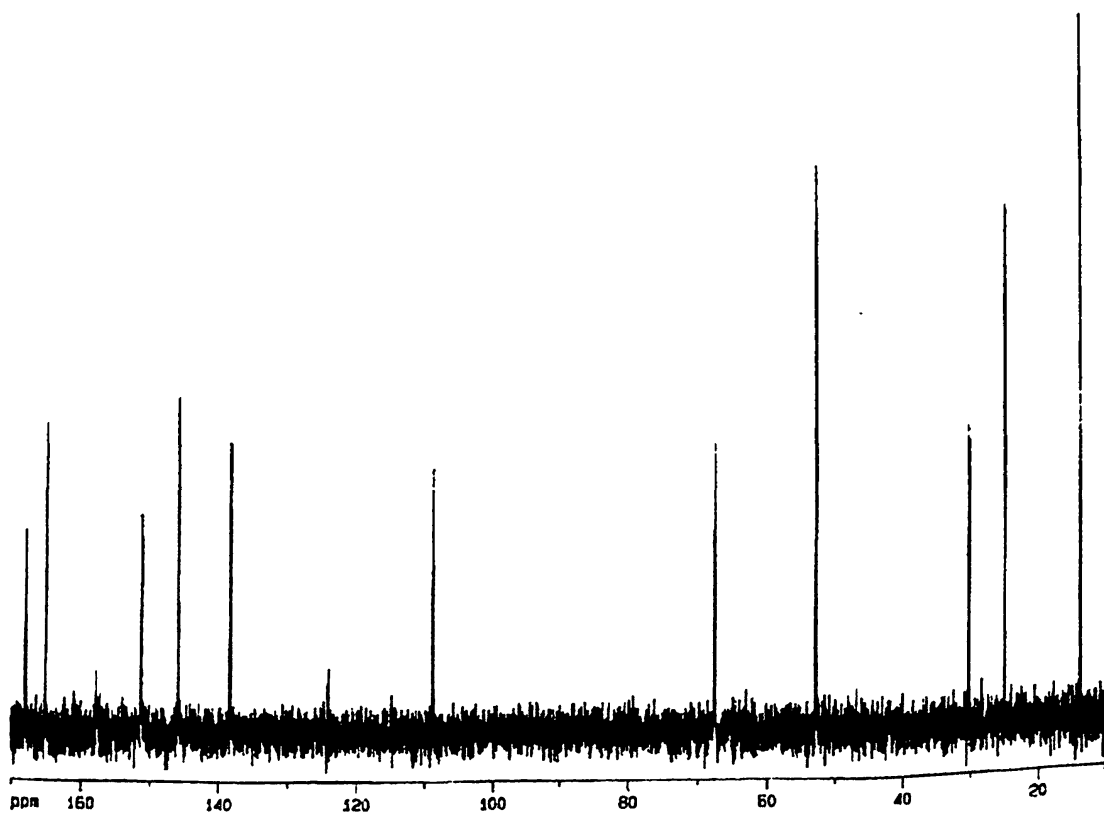
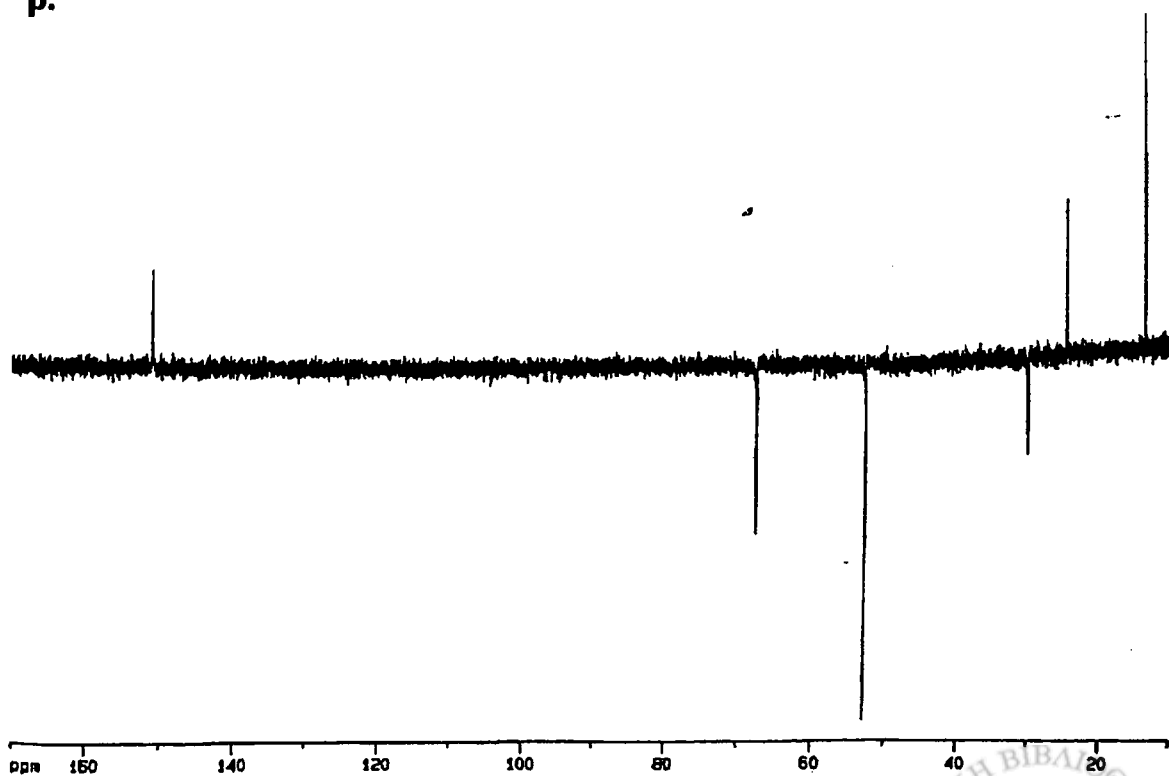
α) κανονικό β) DEPT 135°.





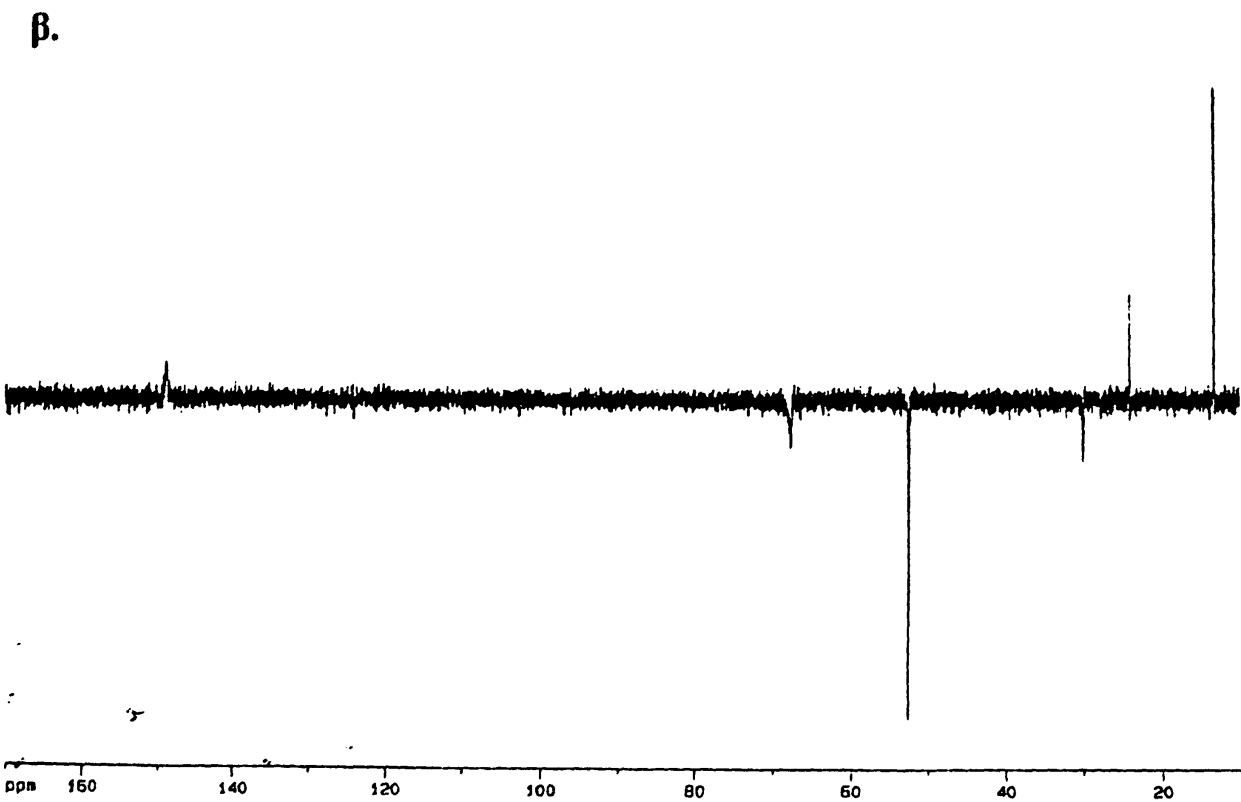
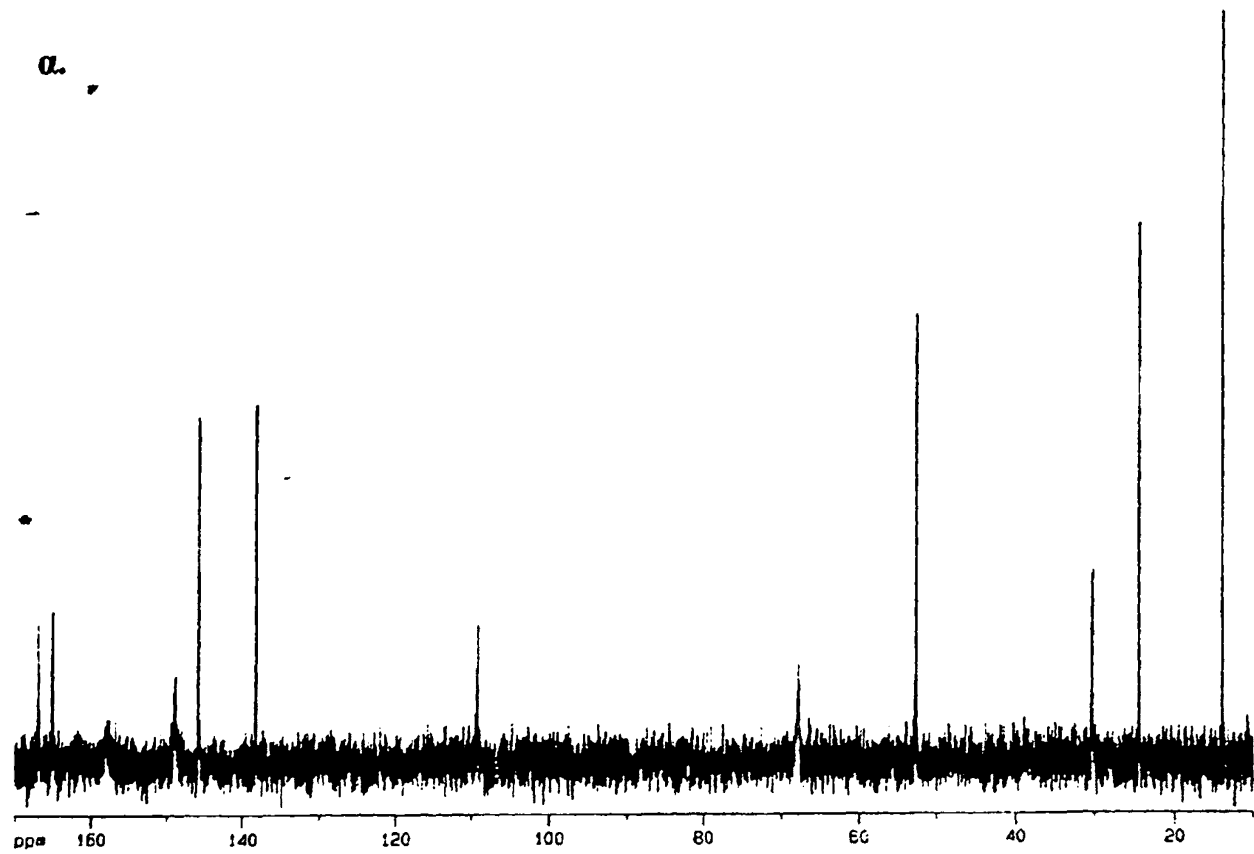
Σχήμα 102: Φάσματα ^{13}C -NMR του $(\text{L}'\text{H})\text{K}^+$ σε διάλυμα D_2O , $\text{pH}=6.0$
α) κανονικό β) DEPT 135° .



α.**β.**

Σχήμα 103: Φάσματα ^{13}C -NMR του συμπλόκου $[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ σε διάλυμα D_2O
α) κανονικό β) DEPT 135°.





Σχήμα 104: Φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ του συμπλόκου $[\text{Zn}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ σε D_2O
α) κανονικό β) DEPT 135° .



III. Φασματοσκοπία ^{31}P -NMR.

Ισχυρές ενδείξεις για τη συμπλοκοποίηση των μεταλλικών ιόντων μέσω της πυροφωσφορικής ομάδας παρέχουν τα φάσματα ^{31}P -NMR των συμπλόκων Zn και Cd (σχήματα 105-107). Τα δεδομένα που προκύπτουν μετά την επεξεργασία τους δίνονται στον πίνακα 20.

ΠΙΝΑΚΑΣ 20: Χημικές μετατοπίσεις ^{31}P (δ , ppm) και σταθερές σύζευξης ($^2J_{\text{P-P}}$) υποκαταστάτη και συμπλόκων σε διαλύματα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1.

	P_α	P_β	$\Delta\delta_{P_\alpha}^*$	$\Delta\delta_{P_\beta}^*$	$\Delta\delta_{P_\alpha}^{**}$	$\Delta\delta_{P_\beta}^{**}$	$^2J_{\text{P-P}}$
$\text{L}'\text{H}_2$, pH=5.0	-11.40	-10.55	—	—			21.26
$(\text{L}'\text{H})\text{K}^+$, pH=6.0	-11.17	-8.65	—	—	+0.23	+1.90	21.26
$[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ pH=5.0	-9.77	-6.59	+1.63	+3.96			17.00
$[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ pH=6.5	-9.12	-4.67	+2.05	+3.98	+0.65	+1.92	17.80
$[\text{Zn}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ pH=5.0	-10.08	-7.43	+1.32	+3.12			17.80
$[\text{Zn}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ pH=6.0	-9.54	-5.97	+1.63	+2.68	+0.54	+1.46	17.33

Διαφορά σε (ppm) μεταξύ των τιμών δ του ελεύθερου υποκαταστάτη και των συμπλόκων στην ίδια τιμή pH ($\Delta\delta = \delta_{\text{υποκαταστάτη}} - \delta_{\text{συμπλόκου}}$).

**Διαφορά (σε ppm) μεταξύ των τιμών δ των υποκαταστατών ή των συμπλόκων σε διαφορετικές τιμές pH ($\Delta\delta = \delta_{\text{υποκαταστάτη(pH=6.0)}} - \delta_{\text{υποκαταστάτη(pH=5.0)}}$ ή $\Delta\delta = \delta_{\text{συμπλόκου(pH=6.5)}} - \delta_{\text{συμπλόκου(pH=5.0)}}$).

Για την απόδοση των κορυφών των P_α και P_β καταγράφηκαν επίσης τα φάσματα ^{31}P -NMR χωρίς αποσύζευξη πρωτονίου, οπότε η κορυφή που οφείλεται στον P_α εμφανίζεται ως τριπλή λόγω της σύζευξης $^3J_{\text{P-H}}$.

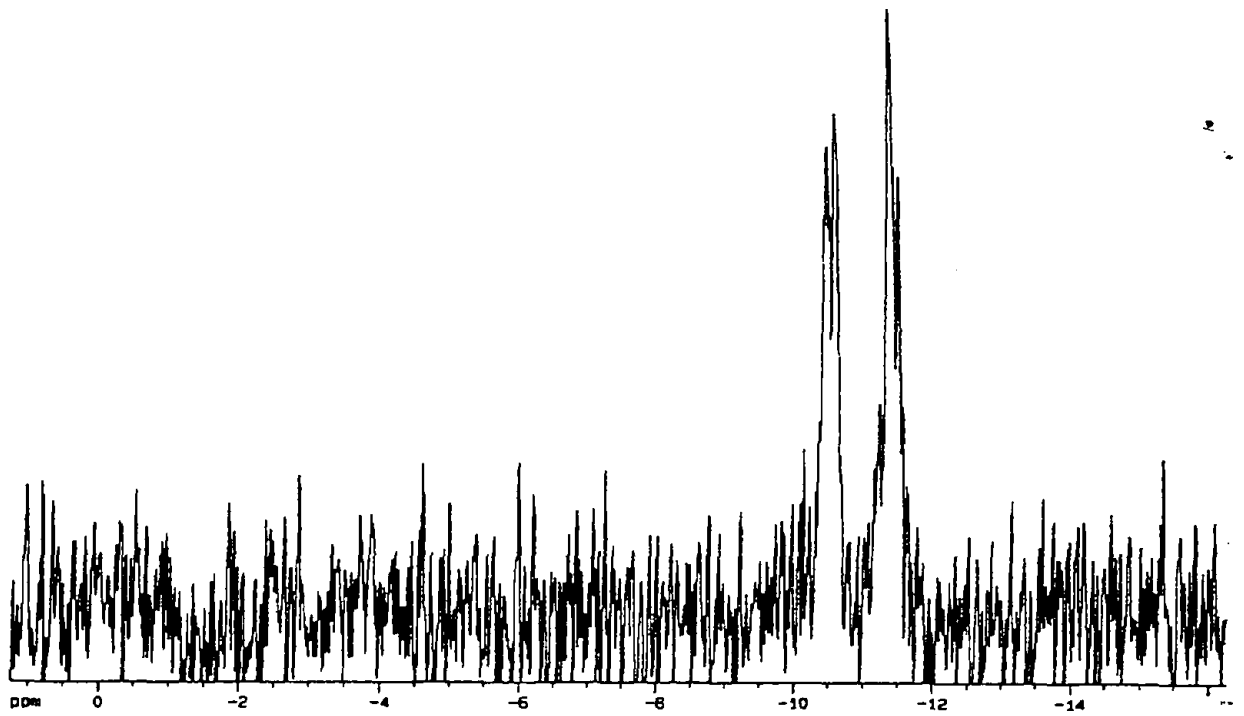
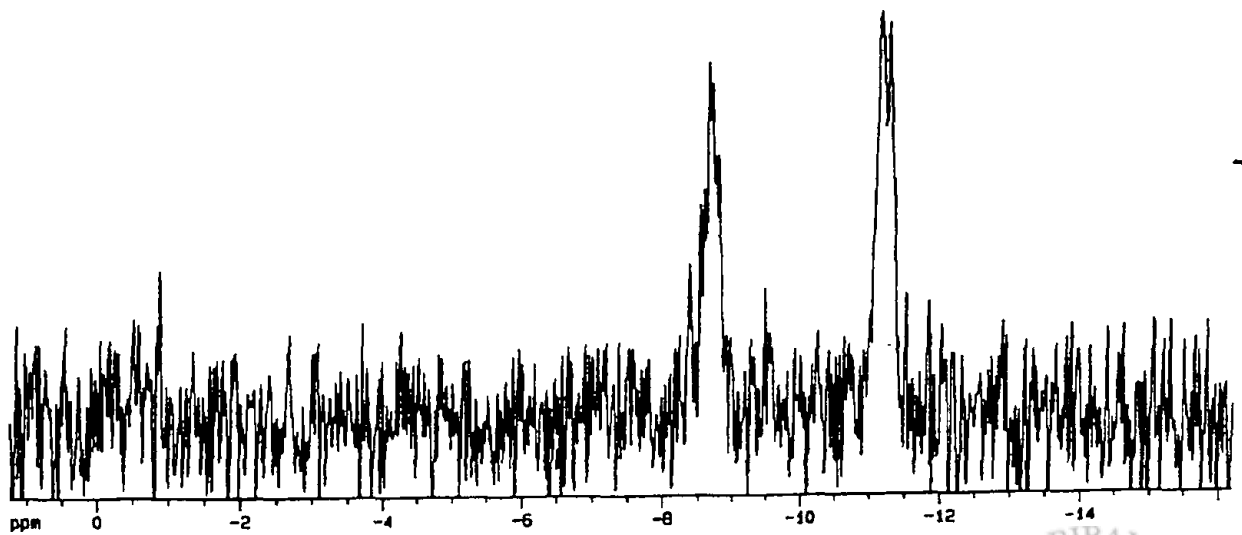
Έτσι, οι συχνότητες των P_α και P_β στα σύμπλοκα $[\text{Zn}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ και $[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ μετατοπίζονται κατά 1.3, 3.1 και 1.6, 4.0 ppm σε χαμηλότερα πεδία αντίστοιχα, σε σχέση μ' αυτές του ελεύθερου υποκαταστάτη σε pH=5.0, ενώ η δεύτερη -OH ομάδα του P_β παραμένει πρωτονιωμένη σ' αυτό το pH. Οι μετατοπίσεις αυτές αποτελούν μια καθαρή ένδειξη αλληλεπίδρασης της ομάδας $P_\beta\text{-O}^-$ με τα μεταλλικά ιόντα, ενώ η ομάδα $P_\alpha\text{-O}^-$ αλληλεπιδρά λιγότερο ισχυρά [223]. Τα δεδομένα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με φασματοσκοπικές μελέτες ^{31}P -NMR της αλληλεπίδρασης $\text{TPP}:\text{Mg}^{2+}$ απουσία και παρουσία του ενζύμου πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση [229,230]. Στις παραπάνω περιπτώσεις, όπου προτείνεται ότι το ιόν Mg^{2+} συνδέεται άμεσα με την ομάδα $P_\beta\text{-O}^-$, οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων ^{31}P για τους P_α και P_β σε pH=6.8-8.8 ήταν -10.1 έως 10.7 ppm και -5.9 έως -6.5 ppm αντίστοιχα

[229,230]. Ενδείξεις για α,β-διδοντική συμπεριφορά των δυο φωσφόρων δεν προέκυψαν απ' τα δεδομένα μας, όπως ακριβώς και στην περίπτωση των συμπλόκων της HETPP [222,224], αφού δεν ανιχνεύθηκαν ακόμα και αν υπήρχαν τα διαστερεοϊσομερή που προκύπτουν από τέτοιου είδους ένταξη.

Οι χημικές μετατοπίσεις ^{31}P που αναφέρθηκαν πιο πάνω προέκυψαν μετά την καταγραφή των φασμάτων των συμπλόκων σε διαλύματα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 σε $\text{pH}=5.0$. Καταγράψαμε ξανά τα φάσματα, αυτή τη φορά σε pH γύρω στο έξι. Παρατηρήσαμε ότι οι συχνότητες των P_α και P_β μετατοπίζονται περαιτέρω κατά 0.5, 1.5 και 0.6, 1.9 ppm αντίστοιχα σε χαμηλότερα πεδία, σε σχέση με τις τιμές που παρατηρήθηκαν σε $\text{pH}=5.0$. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην αποπρωτονίωση και της δεύτερης υδροξυλομάδας του P_β .

Τέλος η πτωτική τάση των σταθερών σύζευξης $^2J_{\text{P}_\alpha-\text{P}_\beta}$ περνώντας απ' τον υποκαταστάτη στα σύμπλοκα, από 21 σε 17-18 Hz, αποτελεί άλλη μια ένδειξη συμμετοχής της πυροφωσφορικής ομάδας στη σφαίρα ένταξης των μεταλλοϊόντων [222,225].

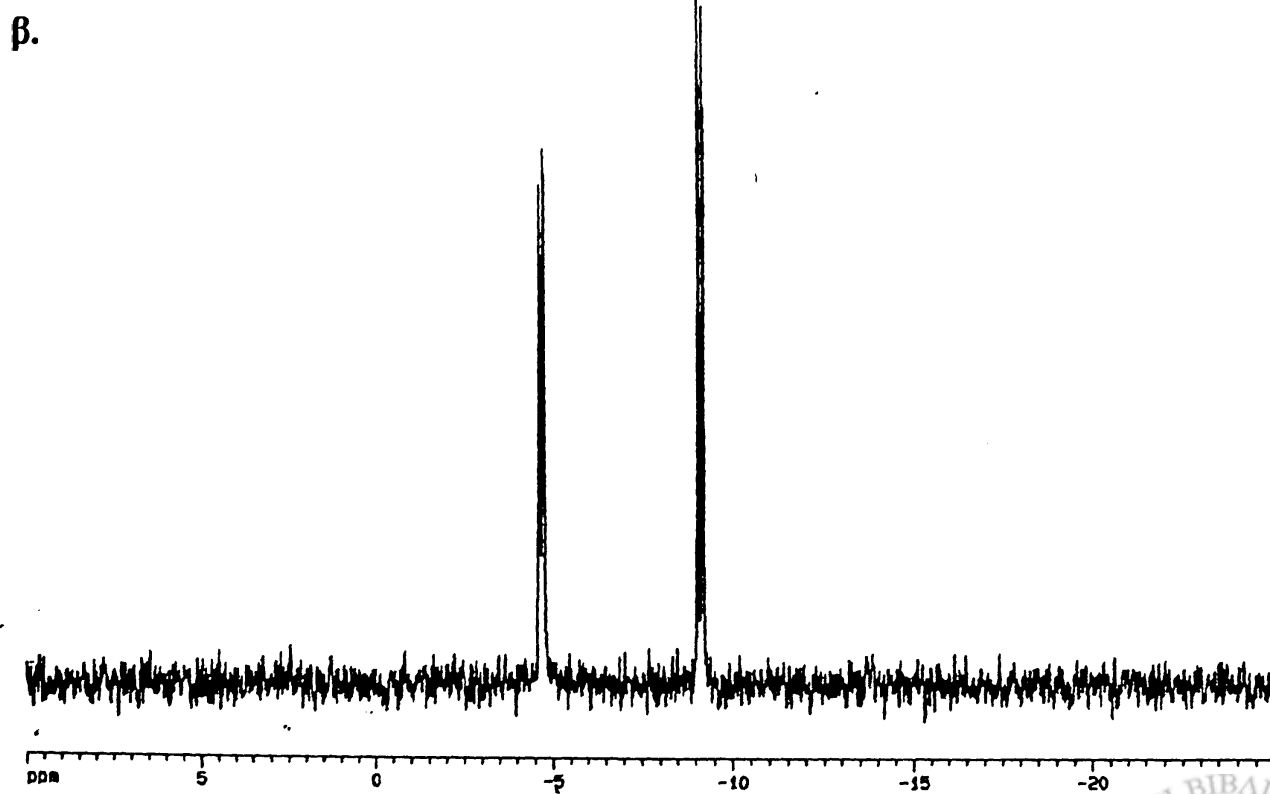
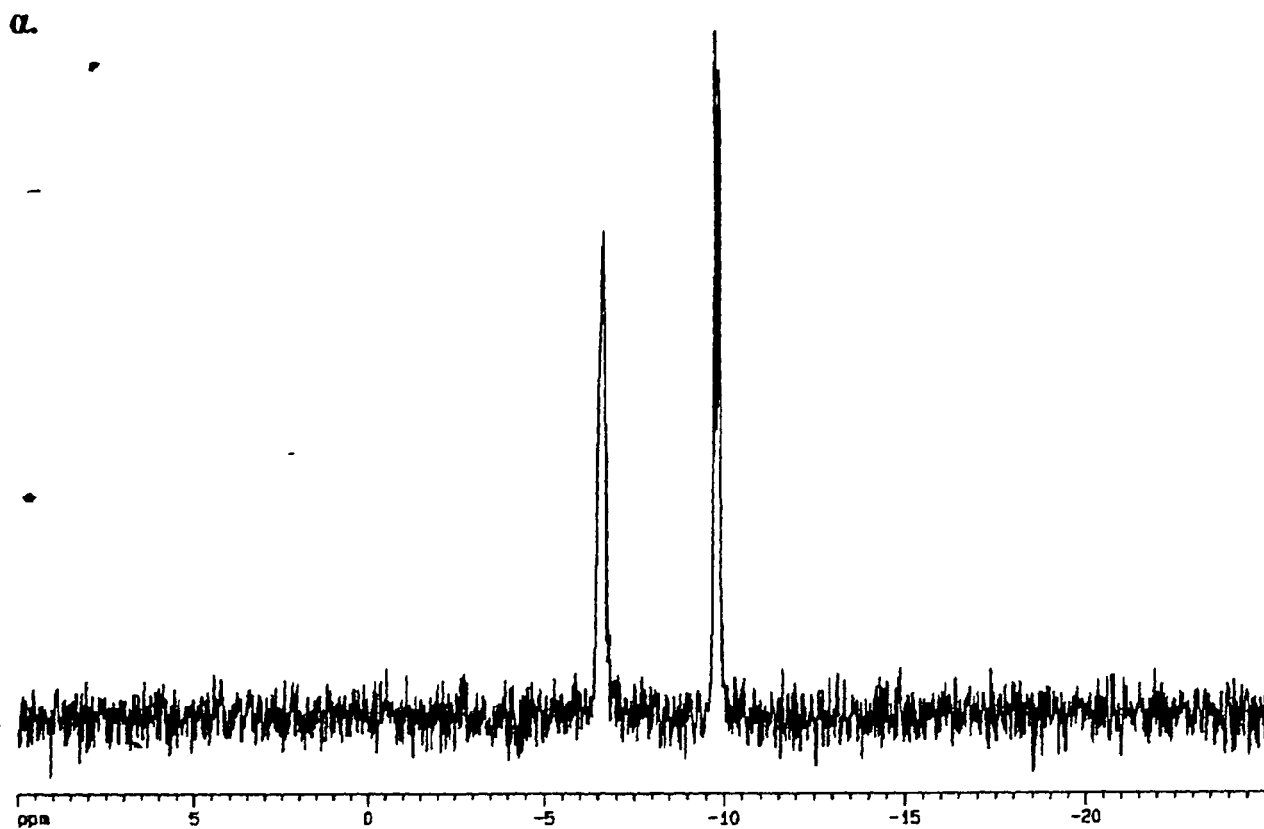


α.**β.**

Σχήμα 105: Φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR της TPP σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1

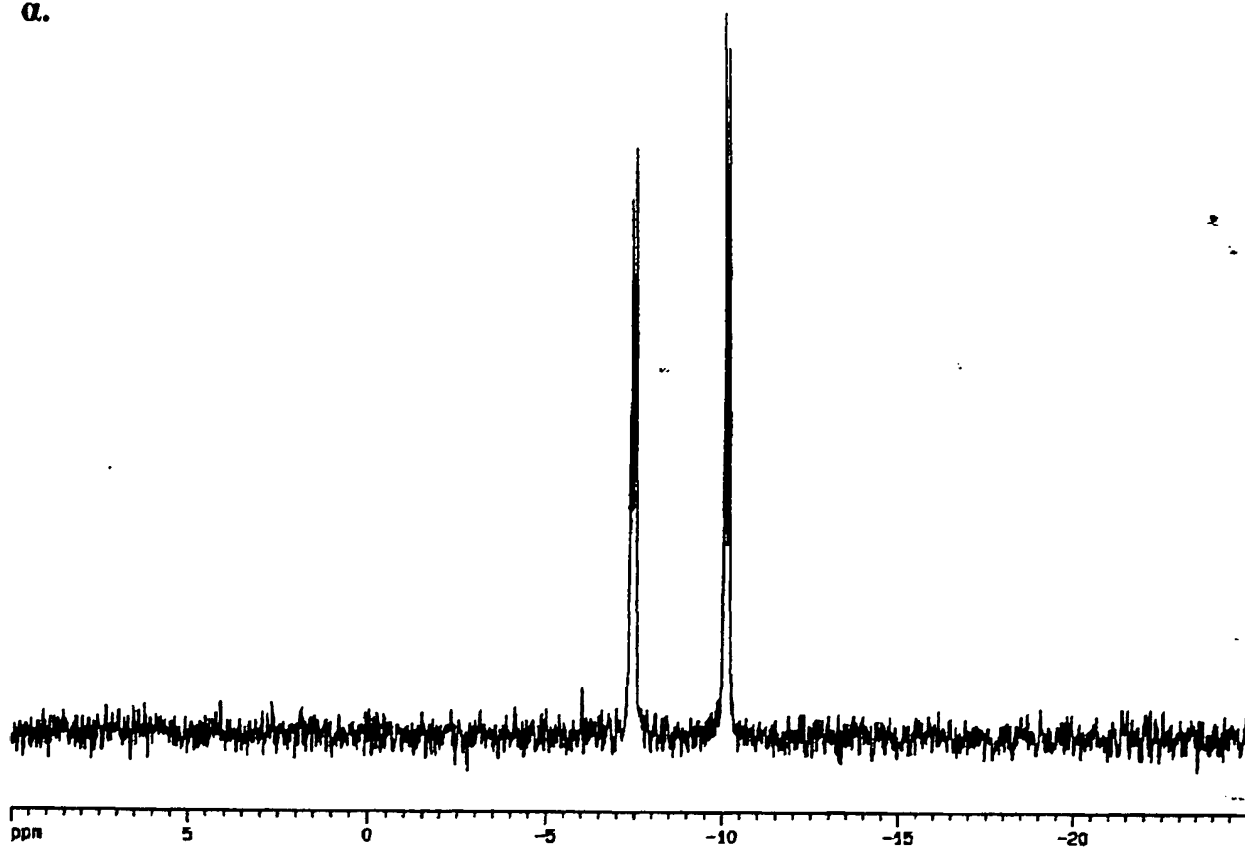
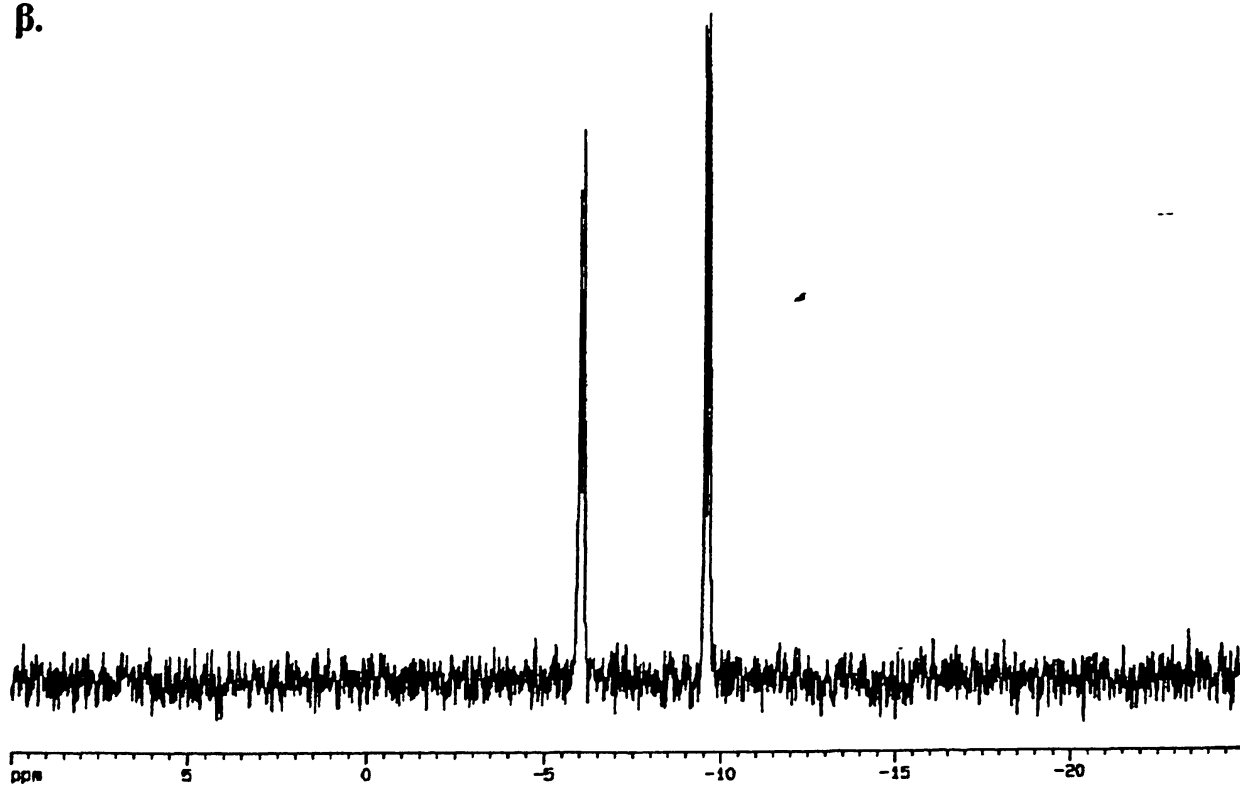
α) του $\text{L}'\text{H}_2$ σε $\text{pH}=5.0$ β) του $(\text{L}'\text{H})\text{K}^+$ σε $\text{pH}=6.5$.





Σχήμα 106: Φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR του συμπλόκου $[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1
α) σε pH=5.0 β) σε pH=6.5.



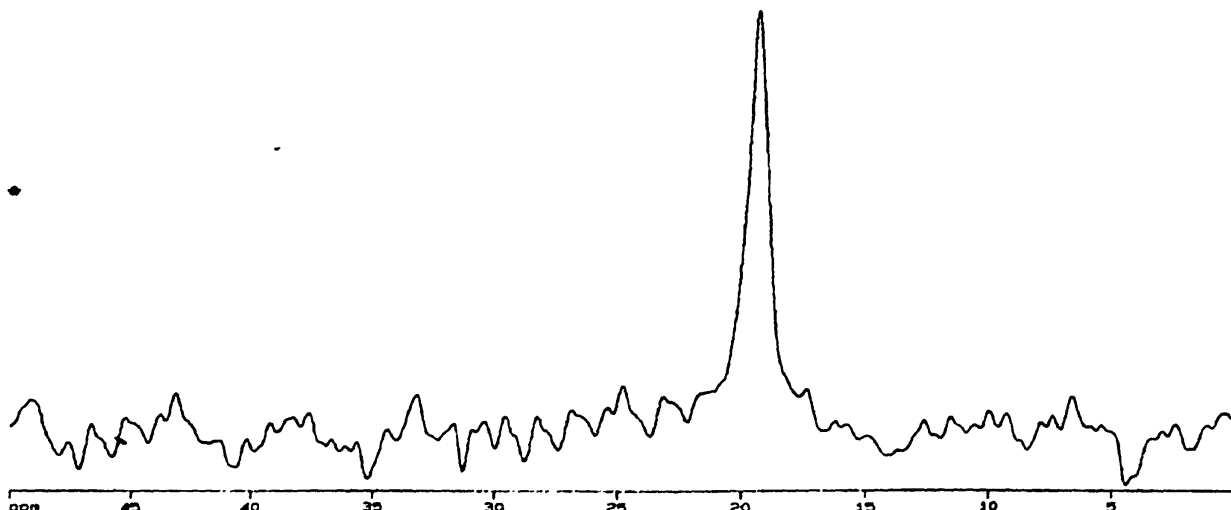
α.**β.**

Σχήμα 107: Φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR του συμπλόκου $[\text{Zn}(\text{L}^{\text{H}})\text{Cl}]_2$ σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1
α) σε $\text{pH}=5.0$ β) σε $\text{pH}=6.0$.



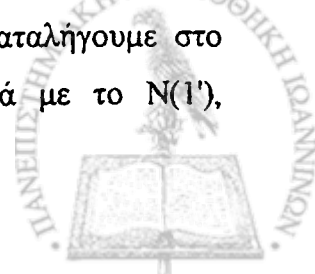
IV. Φασματοσκοπία ^{113}Cd -NMR.

Το φάσμα ^{113}Cd -NMR του συμπλόκου $[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ καταγράφηκε σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1, σε $\text{pH}=5.0$ (σχήμα 108).



Σχήμα 108: Φάσμα ^{113}Cd -NMR του συμπλόκου $[\text{Cd}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1.

Η χημική μετατόπιση του πυρήνα του ^{113}Cd παρουσιάζεται εδώ στα 19.1 ppm (εξωτερικό πρότυπο: $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ 0.1M). Έχουμε ήδη αναφέρει ότι αλλαγή του χημικού περιβάλλοντος γύρω απ' τον πυρήνα αυτό επιφέρει μεγάλες αλλαγές στη χημική μετατόπιση [226]. Το μεγάλο εύρος της κλίμακας των τιμών δ (~850 ppm) σε συνδυασμό με την ευαισθησία του αυτή, τον καθιστούν κατάλληλο για τη διερεύνηση της σφαίρας ένταξης του $\text{Cd}(\text{II})$ σε σύμπλοκα και μεταλλοπρωτεΐνες. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι στην περίπτωση συμπλόκων του $\text{Cd}(\text{II})$ με 4-υποκατεστημένες πυριδίνες οι χημικές μετατοπίσεις ^{113}Cd μεταβάλλονται ως εξής: για το σύμπλοκο CdL (άτομο δότης 1N) 11 ppm, για το CdL_2 (άτομα δότες 2N) 42 ppm, για το CdL_3 (άτομα δότες 3N) 72 ppm και για το CdL_4 (άτομα δότες 4N) 101 ppm. Απ' την άλλη οι χημικές μετατοπίσεις ^{113}Cd του συμπλόκου $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]\}_2$ που ήδη μελετήσαμε καθώς και του $\{\text{KCd}(\text{HBTPPH})\text{Cl}_2\}_n$ [129] με ένταξη μέσω του $\text{N}(1')$, ατόμων O απ' την πυροφωσφορική ομάδα και μορίων H_2O , παρουσιάζονται στα 31.5 και 31.2 ppm αντίστοιχα. Στα παραπάνω συστήματα λαμβάνει χώρα μερική χημική ανταλλαγή μεταξύ των ιδίων Cl^- και μορίων διαλύτη. Έχοντας υπόψη τα παραπάνω δεδομένα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι και σ' αυτή την περίπτωση το ιόν $\text{Cd}(\text{II})$ αλληλεπιδρά με το $\text{N}(1')$, πυροφωσφορικά οξυγόνα και μόρια H_2O απ' το διάλυμα.



V. Ποτενσιομετρία.

Η αλληλεπίδραση των ιόντων Cd^{2+} και Zn^{2+} με την TPP σε υδατικά διαλύματα και σε μοριακή αναλογία 1:1 μελετήθηκε επιπλέον με ποτενσιομετρικές τιτλοδοτήσεις. Προσδιορίστηκαν έτσι τόσο οι σταθερές ιονισμού των όξινων ομάδων της TPP όσο και οι ολικές σταθερές σχηματισμού ($\log\beta$) των σωματιδίων (συμπλόκων) (εξισώσεις 21-22, σελίδα 136) που σχηματίζονται κάτω απ' αυτές τις συνθήκες (πίνακας 21).

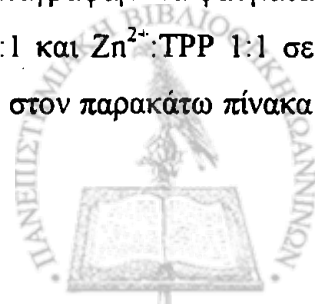
ΠΙΝΑΚΑΣ 21: Ολικές σταθερές σχηματισμού ($\log\beta$) των σωματιδίων που σχηματίζονται στα συστήματα M(II):TPP 1:1 ($\text{M}=\text{Cd},\text{Zn}$).

Σύστημα	$\text{Log}\beta$ (\pm τυπ. απόκλιση $\times 10^{-2}$)		
	$\text{M}_2\text{L}_2\text{H}_2$	$\text{M}_2\text{L}_2\text{H}$	M_2L_2
Cd(II)-TPP	21.19(5)	15.79(8)	10.76(3)
Zn(II)-TPP	20.64(4)	15.50(3)	10.11(2)

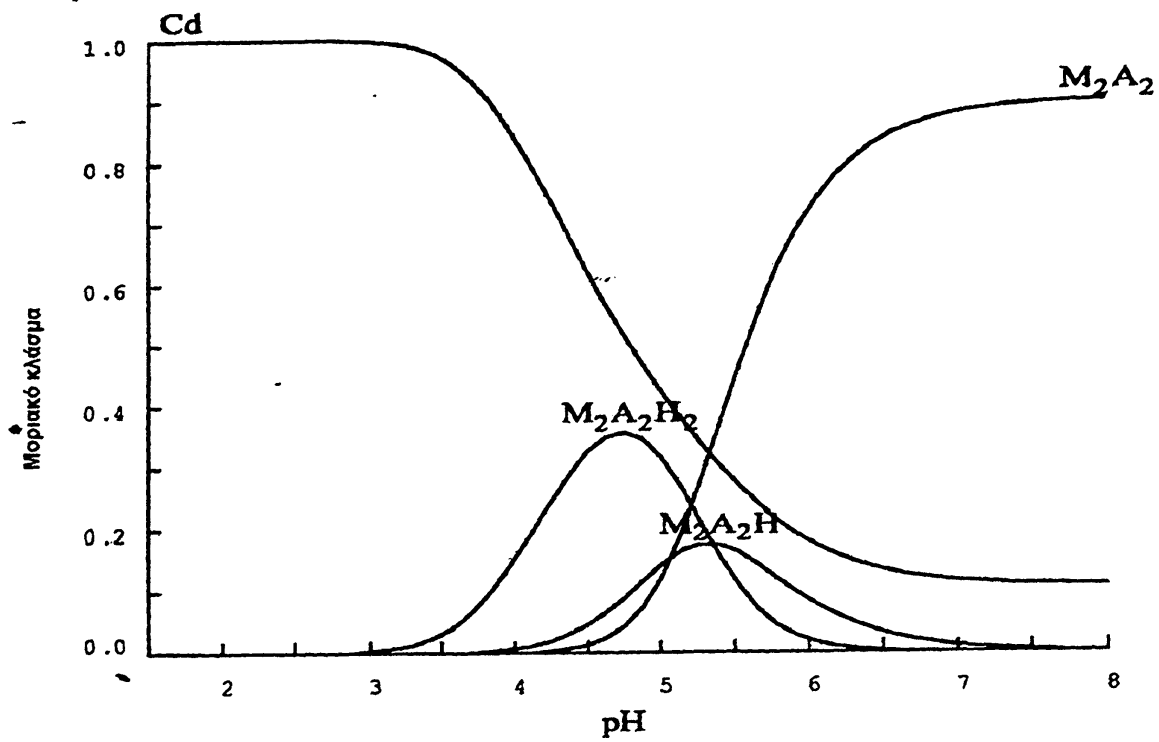
Οι σταθερές ιονισμού της TPP (pK_a) βρέθηκαν $\text{pK}_{a1}=5.06$ και $\text{pK}_{a2}=6.30$. Η πρώτη αντιστοιχεί στον ιονισμό του $\text{N}(1')$, ενώ η δεύτερη στον ιονισμό της δεύτερης ομάδας $-\text{OH}$ του P_β . Οι τιμές αυτές βρίσκονται σε απόλυτη συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα [9].

Όπως και κατά τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της HETPP με τα ιόντα Cd^{2+} και Zn^{2+} , η εισαγωγή του μοντέλου σωματιδίων $\text{M}_2\text{L}'_2\text{H}_2$, $\text{M}_2\text{L}'_2\text{H}$, $\text{M}_2\text{L}'_2$ έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την προσομοίωση των πειραματικών καμπυλών ογκομέτρησης με τις πειραματικά υπολογιζόμενες βασιζόμενοι στο παραπάνω μοντέλο. Έτσι προκύπτει ότι σχηματίζονται διμερή σύμπλοκα και όπως φαίνεται απ' τις καμπύλες κατανομής σωματιδίων (σχήμα 109), τα σωματίδια $\text{M}_2\text{L}'_2\text{H}_2$ σχηματίζονται μεταξύ $\text{pH}=4.5-6.5$, τα $\text{M}_2\text{L}'_2\text{H}$ μεταξύ $\text{pH}=5.0-6.0$ ενώ τα σωματίδια $\text{M}_2\text{L}'_2$ επικρατούν σε pH μεγαλύτερο του 6.0.

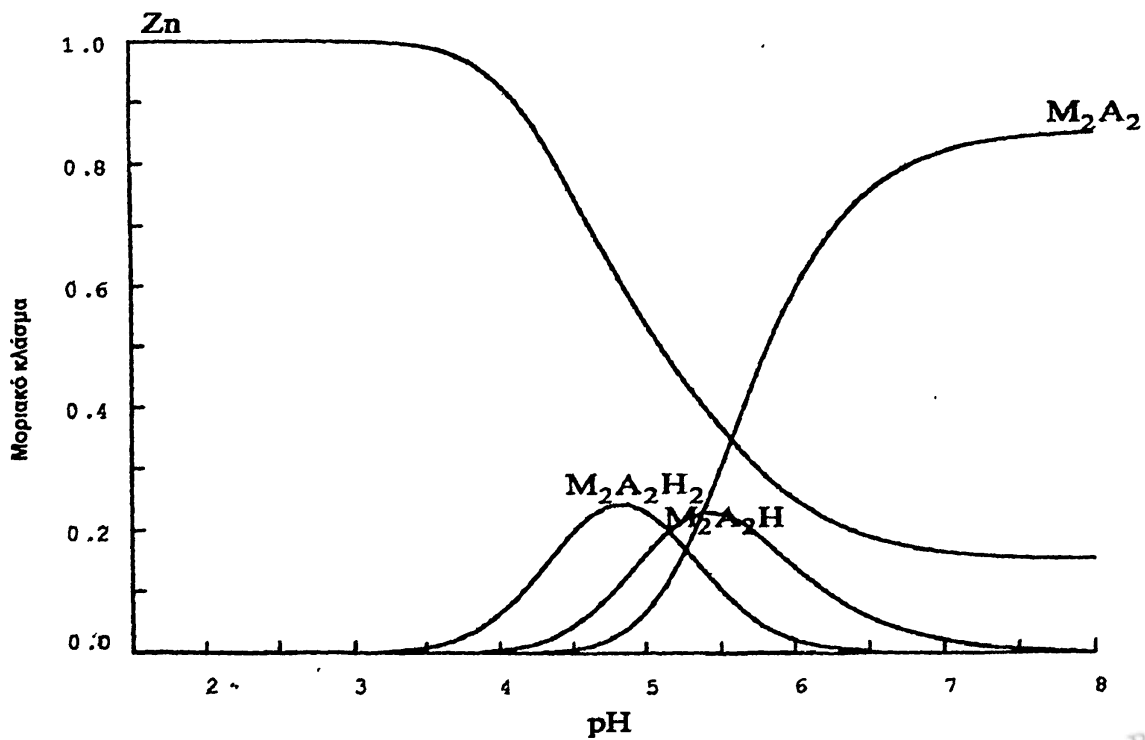
Στο σύμπλοκο $\text{M}_2\text{L}'_2\text{H}_2$ τα μεταλλικά ιόντα θα πρέπει να εντάσσονται και με το $\text{N}(1')$ και με την πυροφωσφορική ομάδα των δυο υποκαταστατών του διμερούς, ενώ η δεύτερη ομάδα $\text{P}_\beta\text{-OH}$ και των δυο μορίων υποκαταστάτη πρέπει να είναι πρωτονιωμένη. Κατά την άνοδο του pH αποπρωτονιώνεται η μια απ' αυτές και έτσι σχηματίζονται τα σωματίδια $\text{M}_2\text{L}'_2\text{H}$. Τέλος σε λίγο υψηλότερο pH , αποπρωτονιώνεται και η άλλη $\text{P}_\beta\text{-OH}$ ομάδα οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό των σωματιδίων $\text{M}_2\text{L}'_2$. Για την ενίσχυση των παραπάνω καταγράψαμε τα φάσματα $^{31}\text{P-NMR}$ (σε διαλύματα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1) των συστημάτων $\text{Cd}^{2+}:\text{TPP}$ 1:1 και $\text{Zn}^{2+}:\text{TPP}$ 1:1 σε $\text{pH}=4.8$ και 6.5 (σχήματα 110-111). Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 22).



α.



β.



Σχήμα 109: Διαγράμματα κατανομής σωματιδίων των συστημάτων
α) Cd(II):TPP 1:1 β) Zn(II):TPP 1:1.



ΠΙΝΑΚΑΣ 22: Χημικές μετατοπίσεις ^{31}P (δ , ppm) και σταθερές σύζευξης ($^2J_{\text{P-P}}$, Hz) της TPP και των συστημάτων M^{2+} : TPP 1:1, σε $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 σε διάφορες τιμές pH.

	P_α	P_β	$\Delta\delta_{P_\alpha}$ *	$\Delta\delta_{P_\beta}$ *	$\Delta\delta_{P_\alpha}$ **	$\Delta\delta_{P_\alpha}$ **	$^2J_{P_\alpha-P_\beta}$
$\text{L}'\text{H}_2$, pH=5.0	-11.40	-10.55	—	—			21.26
$(\text{L}'\text{H})\text{K}^+$, pH=6.0	-11.17	-8.65	—	—	+0.23	+1.90	21.26
$\text{Cd}(\text{II}) + \text{TPP}$ 1:1 pH=4.8	-9.38	-6.64	+2.02	+3.91			—
$\text{Cd}(\text{II}) + \text{TPP}$ 1:1 pH=6.5	-8.45	-3.91	+2.72	+4.74	+0.93	+2.73	17.82
$\text{Zn}(\text{II}) + \text{TPP}$ 1:1 pH=4.8	-9.34	-6.60	+2.06	+3.95			17.49
$\text{Zn}(\text{II}) + \text{TPP}$ 1:1 pH=6.5	-8.98	-5.47	+2.19	+3.18	+0.36	+1.13	17.20

* Διαφορά σε (ppm) μεταξύ των τιμών δ του ελεύθερου υποκαταστάτη και των συστημάτων υποκαταστάτη και μετάλλου στην ίδια τιμή pH ($\Delta\delta = \delta_{\text{υποκαταστάτη}} - \delta_{\text{υποκαταστάτη-μετάλλου}}$).

** Διαφορά (σε ppm) μεταξύ των τιμών δ των υποκαταστάτων ή των συστημάτων υποκαταστάτη-μετάλλου σε διαφορετικές τιμές pH ($\Delta\delta = \delta_{\text{υποκαταστάτη}(pH=6.0)} - \delta_{\text{υποκαταστάτη}(pH=5.0)}$ ή $\Delta\delta = \delta_{\text{υποκαταστάτη-μετάλλου}(pH=6.5)} - \delta_{\text{υποκαταστάτη-μετάλλου}(pH=4.8)}$).

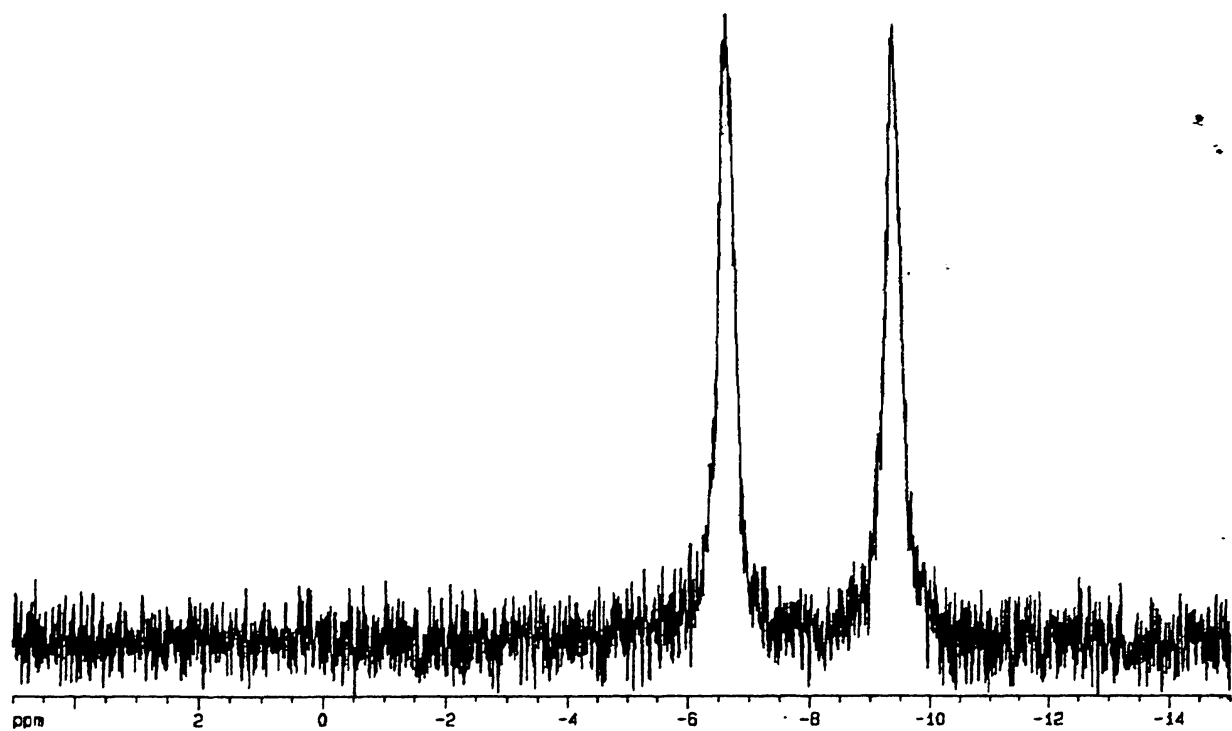
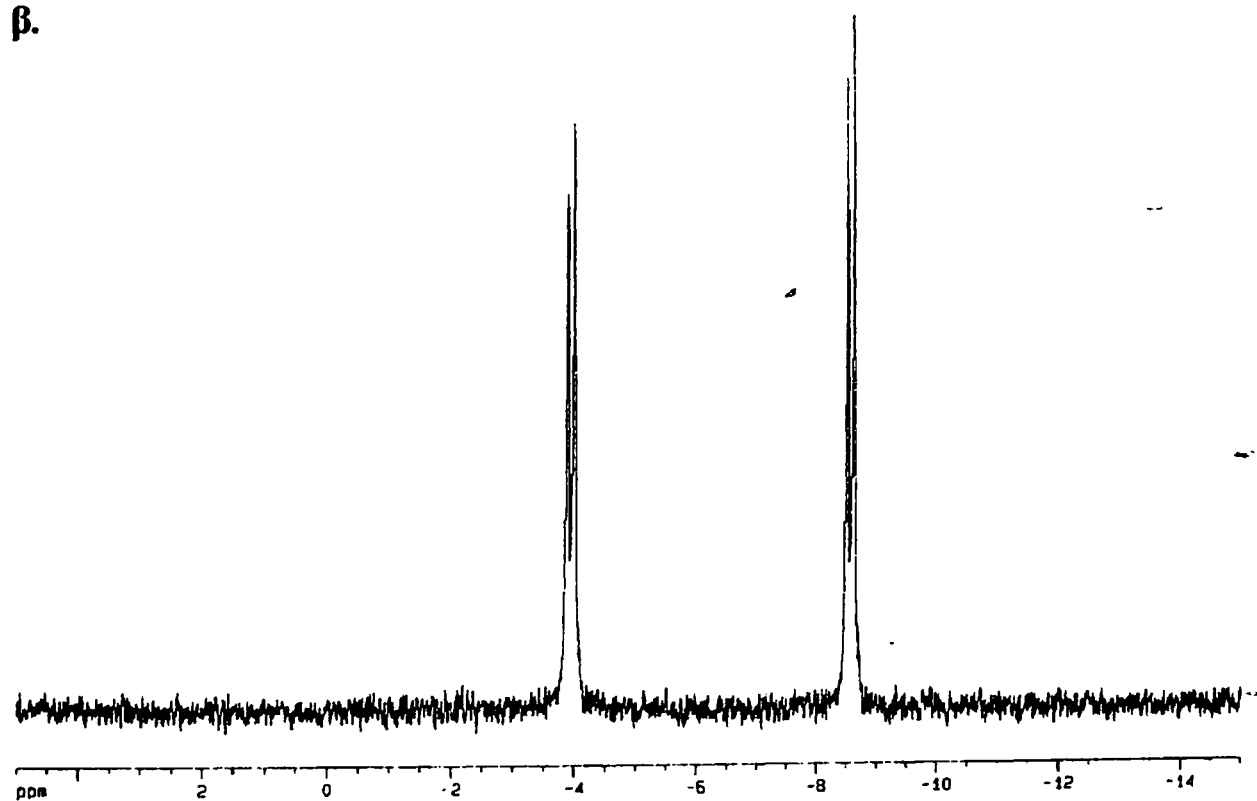
Κατά την άνοδο του pH από 5.0 σε 6.0 στον υποκαταστάτη (TPP) οι τιμές δ για τα άτομα P_α και P_β μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία κατά 0.23 και 1.90 ppm αντίστοιχα, λόγω του ότι το pH πλησιάζει την τιμή αποπρωτονίωσης της ομάδας $P_\beta\text{-OH}$ ($pK_a \sim 6.3$).

Ισχυρές ενδείξεις για συμπλοκοποίηση των μεταλλοϊόντων μέσω της πυροφωσφορικής ομάδας και σε pH=4.8 και σε pH=6.5 παρέχουν οι μετατοπίσεις των συχνοτήτων των P_α και P_β . Έτσι, για το σύστημα $\text{Cd}(\text{II})\text{:TPP}$ 1:1 σε pH=4.8 και 6.5 παρατηρούνται μετατοπίσεις προς χαμηλότερα πεδία κατά 2.02, 3.91 ppm και κατά 2.72, 4.94 ppm αντίστοιχα, ενώ για το σύστημα $\text{Zn}(\text{II})\text{:TPP}$ 1:1 στις ίδιες τιμές pH, οι αντίστοιχες τιμές είναι 2.06, 3.95 ppm και 2.19, 3.18 ppm. Απ' τα παραπάνω δεδομένα γίνεται εμφανές ότι η ομάδα $P_\beta\text{-OH}$ είναι αυτή που αλλάζει χημική συμπεριφορά με την αποπρωτονίωση και αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τα μεταλλικά ιόντα σε σχέση με την $P_\alpha\text{-OH}$ που είναι πιο ασθενώς συνδεδεμένη [222,223]. Έτσι, η επιπλέον μετατόπιση των τιμών δ για τους P_α και P_β κατά 0.93, 2.73 και 0.36, 1.13 ppm σε χαμηλότερα πεδία στα συστήματα $\text{Cd}(\text{II})\text{:TPP}$ 1:1 και $\text{Zn}(\text{II})\text{:TPP}$ 1:1 αντίστοιχα, κατά την άνοδο του pH των διαλυμάτων τους από 4.8 σε 6.5, ενισχύει την υπόθεσή μας ότι η δεύτερη - OH ομάδα του P_β είναι πρωτονιωμένη στους υποκαταστάτες του διμερούς $\text{M}_2\text{L}'_2\text{H}_2$ που επικρατεί σε pH=4.8, ενώ αποπρωτονιώνεται πλήρως και στους δυο υποκαταστάτες σε pH=6.5 (σωματίδιο $\text{M}_2\text{L}'_2$). Οι μειωμένες τιμές της σταθεράς σύζευξης $^2J_{P_\alpha-P_\beta}$ συνηγορούν επίσης

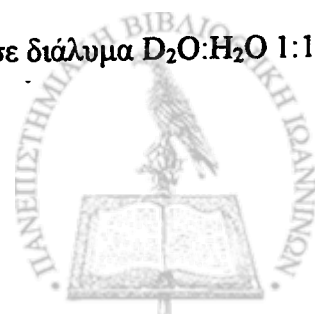
περαιτέρω υπέρ της ένταξης της διφωσφορικής ομάδας όπως έχουμε δει και προηγούμενα [222,225].

Συγκρίνοντας τέλος τις τιμές $\log \beta$ των συστημάτων $M(II):HETPP$ 1:1 και $M(II):TPP$ 1:1 ($M = Zn, Cd$) για τα οποία υποστηρίξαμε το σχηματισμό ανάλογων σωματιδίων με όμοια σφαίρα ένταξης, συμπεραίνουμε ότι η HETPP σχηματίζει σταθερότερα σύμπλοκα απ' ότι η TPP αφού $\beta_{Zn(II)-HETPP}/\beta_{Zn(II)-TPP} = 7.94$ και $\beta_{Cd(II)-HETPP}/\beta_{Cd(II)-TPP} = 3.72$.

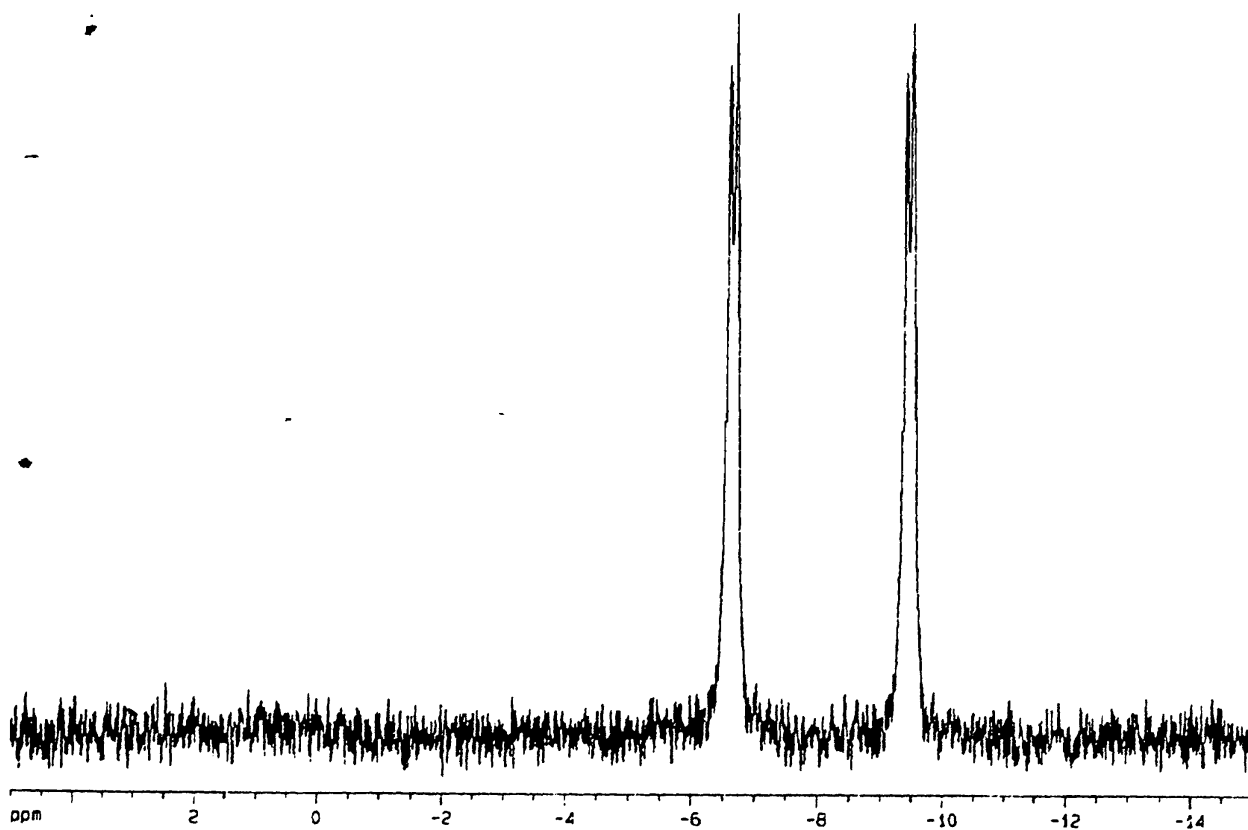


α.**β.**

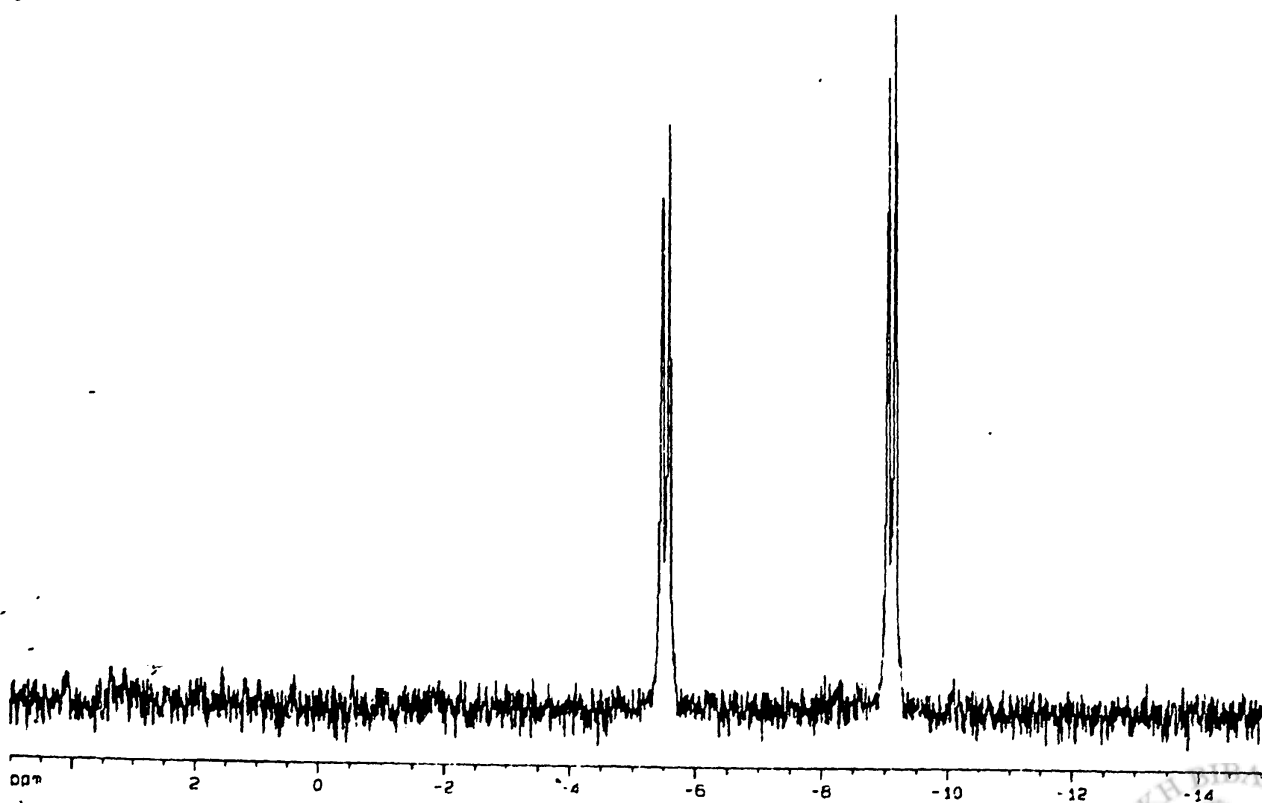
Σχήμα 110: Φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR του συστήματος Cd(II):TPP 1:1 σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1
α) σε pH=4.8 β) σε pH=6.5.



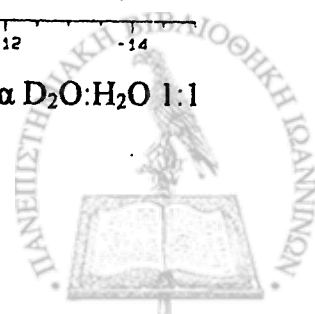
α.



β.



Σχήμα 111: Φάσματα $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR του συστήματος $\text{Zn(II)}:\text{TPP}$ 1:1 σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1
α) σε $\text{pH}=4.8$ β) σε $\text{pH}=6.5$.



VI. Μελέτες αλληλεπίδρασης των συμπλόκων της HETPP και TPP με το αποένζυμο της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (yPDC).

Στην ενότητα αυτή μελετάται η συμπεριφορά των συμπλόκων της TPP ($[Cd(L'H)Cl]_2$, $[Zn(L'H)Cl]_2$) και της HETPP ($K_2\{[Zn(LH)Cl]_2\}$, $Zn(LH_3)Cl_3$) όσον αφορά τη συνενζυμική τους δράση παρουσία του αποενζύμου της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (yPDC) κατά την αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Για το λόγο αυτό διαλύματα των συμπλόκων αναμίχθηκαν με το αποένζυμο της yPDC παρουσία (σύμπλοκα TPP) και απουσία (σύμπλοκα HETPP) πυροσταφυλικού οξέος και μετρήθηκε κατάλληλα (βλέπε πειραματικό μέρος) η % ενεργότητα του ολοενζύμου όσον αφορά την αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης του οξέος. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 23.

Θα πρέπει στο σημείο αυτό να υπενθυμίσουμε ότι η HETPP που είναι ενδιάμεσο του καταλυτικού κύκλου, προκύπτει από την προσθήκη του υποστρώματος -πυροσταφυλικό οξύ- στην TPP. Ως εκ τούτου, κατά τα πειράματα συνενζυμικής δραστηριότητας των συμπλόκων μας, στην μεν περίπτωση των συμπλόκων της TPP απαιτείται η προσθήκη υποστρώματος στη δε περίπτωση των συμπλόκων της HETPP, όχι.

ΠΙΝΑΚΑΣ 23: Ενεργότητα του αποενζύμου της yPDC παρουσία των συμπαραγόντων και των μεταλλικών συμπλόκων της HETPP και TPP.

	% ενζυμική ενεργότητα						
	Απουσία συμπαραγόντων	Mg ²⁺	TPP	Παρουσία συμπαραγόντων	Μεταλλικά σύμπλοκα		
					$[Zn(L'H)Cl]_2$	$Zn(LH_3)Cl_3$	$K_2\{[Zn(LH)Cl]_2\}$
Αποένζυμο	0	0	3	60	3	23	80

Απ' τα δεδομένα του πίνακα 23 παρατηρούμε ότι γίνεται ανάκτηση ενός μεγάλου μέρους της ενεργότητας του ενζύμου (60%) κατά τον σχηματισμό του ολοενζύμου απ' το αποένζυμο και τους συμπαραγόντες TPP και Mg²⁺. Παρατηρούμε επίσης ότι τα σύμπλοκα της TPP είναι πρακτικά ανενεργά (3%) στην αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος. Απ' την άλλη τα σύμπλοκα της HETPP, $Zn(LH_3)Cl_3$ και $K_2\{[Zn(LH)Cl]_2\}$ παρουσιάζουν αυξημένη καταλυτική ενεργότητα κατά 23 και 80% αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι και στις δυο σειρές συμπλόκων ($[M(L'H)Cl]_2$ και $K_2\{[M(LH)Cl]_2\}$, M= Zn, Cd) τα μεταλλικά ιόντα εντάσσονται κατά τον ίδιο τρόπο (μέσω του N(1') και της πυροφωσφορικής ομάδας) εξάγεται αρχικά το συμπέρασμα ότι η μη αλληλεπίδραση των συμπλόκων της TPP με το αποένζυμο δεν οφείλεται στον τρόπο ένταξης.



Οι Diefenback και Duggleby [142] πρότειναν ένα μοντέλο για την επανενεργοποίηση του απρενζύμου της zPDC απ' την TPP και το ιόν Mg^{2+} και το οποίο είναι παρόμοιο μ' αυτό που πρότειναν οι Schellenberger και Hubner [143] για την yPDC (σχήμα 29, σελίδα 42). Ο σχηματισμός του ολοενζύμου γίνεται μέσω δυο εναλλακτικών αλλά ισοδυνάμων οδών, είτε συνδέεται πρώτα η TPP και ακολουθεί το ιόν Mg^{2+} είτε το αντίθετο. Η παρουσία και των δυο συμπαραγόντων οδηγεί τελικά στο σχηματισμό του ενεργού ολοενζύμου. Η πιθανότητα να σχηματίζεται αρχικά ένα σύμπλοκο $Mg(II)$ -TPP και να έπεται η σύνδεσή του με το αποένζυμο σ' αυτή τη μορφή, έχει επίσης αποκλειστεί [142]. Οι παραπάνω προτάσεις επιβεβαιώνονται και απ' τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αφού τα μεταλλικά σύμπλοκα της TPP δεν μπορούν να δράσουν ως συνένζυμα. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα αυτά, το σύμπλοκο $K_2\{[Zn(LH)Cl]_2\}$ παρουσιάζει πολύ υψηλή καταλυτική ενεργότητα. Ακόμα και το ιονικό άλας $Zn(LH_3)Cl_3$ παρουσιάζει κάποια (23%) συνενζυμική δραστηριότητα.

Όπως έχουμε αναφέρει το N(1') της πυριμιδίνης παίζει σημαντικό ρόλο κατά την καταλυτική πορεία σχηματίζοντας δεσμό υδρογόνου με την παράπλευρη ομάδα ενός μορίου Glu του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος [41-46]. Ο δεσμός αυτός είναι υπεύθυνος τόσο για τη σταθεροποίηση της ίμινο-ταυτομερούς μορφής του πυριμιδινικού δακτυλίου, όσο και για την αύξηση της βασικότητας της N(4'a)H (ίμινο) ομάδας ώστε να δράσει αυτή ως βάση αποσπώντας το H-C(2) και οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό του υλιδίου (σχήμα 18, σελίδα 20) [62,63]. Για το σχηματισμό του προαναφερόμενου δεσμού υδρογόνου το N(1') πρέπει να είναι πρωτονιωμένο. Η μη ενεργοποίηση του αποενζύμου απ' τα σύμπλοκα $[M(L'H)Cl]_2$ ($M = Zn, Cd$) μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το N(1') δεν είναι πρωτονιωμένο αλλά συνδέεται με τα μεταλλικά ιόντα, δρώντας έτσι τα παραπάνω σύμπλοκα ως αναστολείς της ενζυμικής δράσης. Επιβεβαιώνεται λοιπόν ότι ο ενζυμικός κύκλος πρέπει να ξεκινά απ' την πρωτονιωμένη στο N(1') TPP και η οποία πρέπει να υιοθετεί την V-διαμόρφωση.

Το σύμπλοκο $Rh^{III}(HETPP)$ στο οποίο το ιόν Rh^{3+} εντάσσεται μόνο με την πυροφωσφορική ομάδα, δεν ενεργοποιεί το αποένζυμο της yPDC [223]. Αυτό πρέπει να οφείλεται είτε στη φύση του μεταλλοϊόντος (φορτίο, μέγεθος) ή στον τρόπο ένταξής του. Το γεγονός ότι το σύμπλοκο $K_2\{[Zn(LH)Cl]_2\}$ ενεργοποιεί το αποένζυμο υποδηλώνει ότι τόσο η ένταξη μέσω του N(1') όσο και η S-διαμόρφωση δεν επηρεάζουν την σύνδεση με το αποένζυμο ή την καταλυτική ενεργότητα. Επιπλέον, στις μετρήσεις μας ως πηγή μεταλλικών ιόντων χρησιμοποιείται εμμέσως το ίδιο το σύμπλοκο. Οι τελευταίες παρατηρήσεις ενισχύουν την άποψη της ερευνητικής μας ομάδας ότι τα μεταλλικά ιόντα πιθανόν να επεμβαίνουν μετά τον σχηματισμό των παραγώγων "ενεργού αλδεύδης" στον καταλυτικό κύκλο [58, 211]. Το γεγονός ότι το ιονικό άλας $Zn(LH_3)Cl_3$ παρουσιάζει κάποια καταλυτική ενεργότητα, δεν έρχεται σε

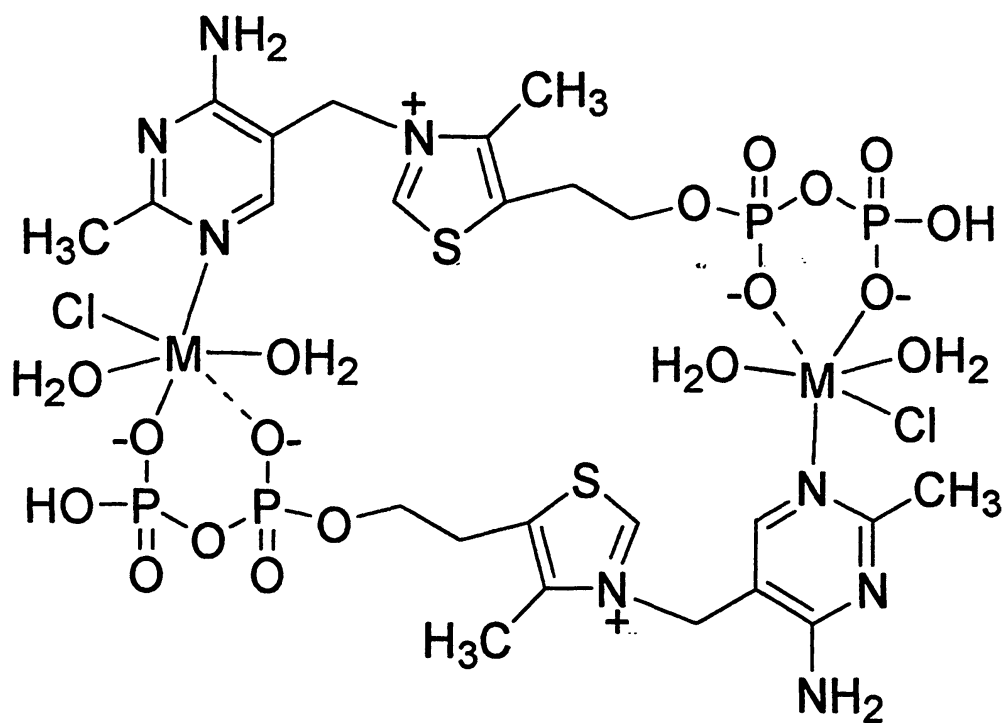
αντίθεση με τις παραπάνω υποθέσεις. Η βασικότητα της 4'α-NH₂ αλλάζει πολύ κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου [62-64]. Πιθανόν μόνο ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου του τύπου N(1')H...O₂C-Glu δεν επαρκεί ώστε η 4'α-NH₂ να επιτελέσει τον καταλυτικό της ρόλο. Σ' αυτό το σημείο η επιπλέον αλληλεπίδραση των μεταλλικών ιόντων με το N(1') ίσως να παίζει κάποιο ρόλο.



Δ. Τελικά συμπεράσματα απ' τη μελέτη αλληλεπίδρασης των Zn^{2+} , Cd^{2+} με την TPP.

Συνοψίζοντας τα πειραματικά δεδομένα του τμήματος αυτού καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- α) Κατά την αλληλεπίδραση των Cd^{2+} και Zn^{2+} με την ανιονική μορφή της TPP, $(L'H)K^+$ σε μεθανολικά διαλύματα σχηματίζονται άμεσα στερεά σύμπλοκα με μοριακό τύπο $[M(L'H)Cl]_2$ ($M= Zn, Cd$) (διμερή). Τα μεταλλοϊόντα εντάσσονται μέσω του $N(1')$ του ενός υποκαταστάτη του διμερούς και με την πυροφωσφορική ομάδα του άλλου. Η ομάδα $P_\beta-O^-$ αλληλεπιδρά ισχυρότερα, η $P_\alpha-O^-$ ασθενέστερα ενώ η δεύτερη $-OH$ ομάδα του P_β παραμένει πρωτονιωμένη. Η προτεινόμενη δομή των συμπλόκων της TPP παρουσιάζεται στο σχήμα 112.
- β) Κατά την ανάμιξη των Cd^{2+} και Zn^{2+} με την TPP σε υδατικά διαλύματα παρατηρείται ίδια συμπεριφορά όσον αφορά τον τρόπο συμπλοκοποίησης. Σχηματίζονται δηλαδή διμερή του τύπου $M_2L'_2H_2$, $M_2L'_2H$ και $M_2L'_2$. Απ' αυτά το πρώτο είναι το ίδιο με τα σύμπλοκα που απομονώθηκαν από μεθανολικά διαλύματα, ενώ το $M_2L'_2$ διαφέρει μόνο στο ότι η δεύτερη ομάδα $P_\beta-OH$ έχει αποπρωτονιωθεί και στα δυο μόρια υποκαταστάτη του διμερούς.
- γ) Η HETPP σχηματίζει σταθερότερα σύμπλοκα με τα ιόντα Cd^{2+} και Zn^{2+} απ' ότι η TPP. Η πειραματική απόδειξη της σταθερότητας τους για πρώτη φορά, ενισχύει την αρχική υπόθεση της ερευνητικής μας ομάδας περί ευκολότερου σχηματισμού των συμπλόκων παραγώγων "ενεργού αλδεύδης" σε σχέση με τα σύμπλοκα απλής θειαμίνης [58, 211]. Λαμβάνοντας δε υπόψη α) τον ίδιο τρόπο ένταξης των ιόντων στα σύμπλοκα της HETPP και TPP και β) ότι τα δυο μόρια διαφέρουν μόνο στην ομάδα $CH_3CH(OH)-$ που βρίσκεται συνδεδεμένη στον C(2) της HETPP, συμπεραίνουμε ότι η επιπλέον σταθερότητα των συμπλόκων της HETPP πρέπει να οφείλεται στην ενδομοριακή αλληλεπίδραση $S(1)...O(2\alpha)$ για τους λόγους που έχουν ήδη αναφερθεί [58].
- δ) Το σημαντικότερο όμως συμπέρασμα είναι ότι τα σύμπλοκα της TPP δεν παρουσιάζουν συνενζυμική δράστικότητα στην ενζυμική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος σε αντίθεση με το σύμπλοκο $K_2\{[Zn(LH)Cl]_2\}$ της HETPP το οποίο παρουσιάζει υψηλή καταλυτική ενεργότητα της τάξης του 80%. Το γεγονός αυτό ενισχύει τις απόψεις της ερευνητικής μας ομάδας ότι α) τα μεταλλικά ιόντα πιθανόν να επεμβαίνουν μετά το σχηματισμό των παραγώγων "ενεργού αλδεύδης" κατά τον ενζυμικό κύκλο και β) Τα μεταλλικά ιόντα δεν δρουν μόνο ως γέφυρα που συνδέει το αποένζυμο με το συνένζυμο όπως προτείνεται μέχρι σήμερα [64, 88, 89, 192, 193, 195], αλλά πολύ πιθανόν να βοηθούν επιπλέον και στην μεταβολή της βασικότητας της 4'-αμινομάδας όπως ακριβώς και ο δεσμός υδρογόνου $N(1')H...O_2C-Glu$.



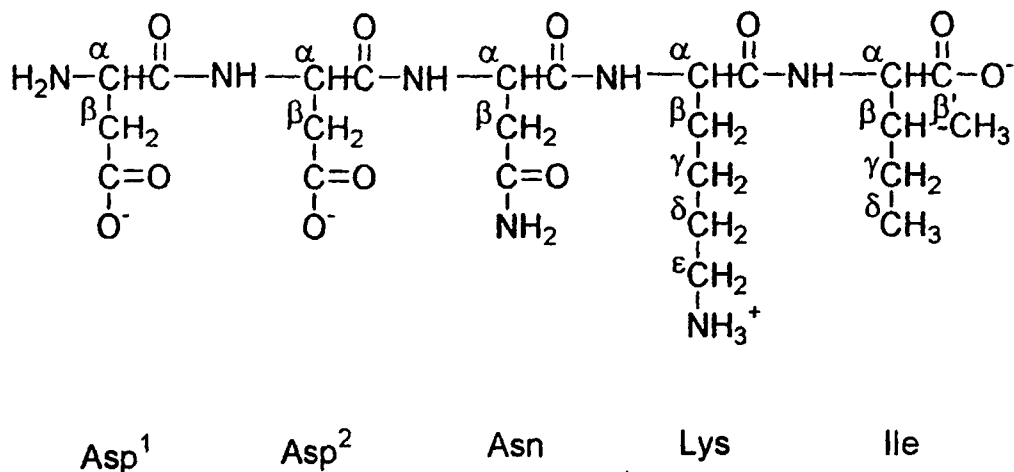
Σχήμα 112: Προτεινόμενη μοριακή δομή των συμπλόκων $[M(L'H)Cl]_2 \cdot 4 H_2O$ ($M= Zn, Cd$).

III. Μικτά σύμπλοκα Zn(II), Cd(II) με την HETPP και το πενταπεπίδιο Asp-Asp-Asp-Lys-Ile.

Στο τμήμα αυτό θα παρουσιασθεί η πιθανή αλληλεπίδραση των συμπλόκων Zn και Cd της HETPP που έχουν ήδη μελετηθεί, ($K_2\{[Zn(LH)Cl_2]_2\}$ και $K_2\{[Cd(LH)Cl_2]_2\}$) με το πεπτιδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile. Η μελέτη αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς το παραπάνω πεπτιδιο αποτελεί τμήμα του ενζύμου γTK που περιβάλλει την πυροφωσφορική ομάδα και είναι συγκεκριμένα η περιοχή 185-189. Όπως αναφέρθηκε και στο εισαγωγικό μέρος η Asn187 και η Ile189 είναι τα αμινοξικά κατάλοιπα που συμμετέχουν στην σύνδεση της πυροφωσφορικής ομάδας της *TRP με το ένζυμο άμεσα, μέσω ενός οκταεδρικά ενταγμένου ιόντος Ca(II). Πριν προχωρήσουμε στη μελέτη των μικτών συμπλόκων πεπτιδίου-μετάλλου-HETPP θα μελετηθούν κατ' αρχήν τα σύμπλοκα που σχηματίζονται λόγω της αλληλεπίδρασης μόνο των ιόντων Zn(II), Cd(II) με το παραπάνω πεπτιδιο.

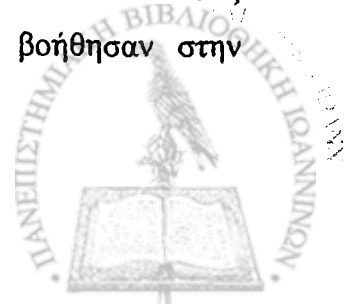
A. Χαρακτηρισμός του πεπτιδίου Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.

Το πεπτιδιο (σχήμα 113) χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπίες 1H -, ^{13}C -NMR και με ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις.



Σχήμα 113: Το πεπτιδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.

Η απόδοση των κορυφών στα φάσματα έγινε τόσο με την βοήθεια βιβλιογραφικών δεδομένων [231,232] όσο και με την καταγραφή και επεξεργασία των φασμάτων 1H - 1H TOCSY, 1H - ^{13}C HMQC και 1H - ^{13}C HMBC. Ειδικά τα τελευταία (1H - ^{13}C HMBC) βοήθησαν στην



αναγνώριση και ταυτοποίηση των κορυφών των καρβονυλικών και καρβοξυλικών ατόμων άνθρακα. Τα δεδομένα που προκύπτουν απ' την μελέτη με τις παραπάνω τεχνικές παρουσιάζονται στους πίνακες 24 έως 26, ενώ χαρακτηριστικά 1D και 2D-NMR φάσματα του πεπτιδίου σε μίγμα D₂O:H₂O 1:4 παραθέτονται στα σχήματα 114 έως 116.

ΠΙΝΑΚΑΣ 24: Ολικές σταθερές σχηματισμού (logβ) και σταθερές ιονισμού (pK_{ai}) για το πενταπεπτίδιο (σε παρέθεση οι τυπικές αποκλίσεις x 10⁻²).

H ₅ A	H ₄ A	H ₃ A	H ₂ A	HA
28.17(8)	25.36(4)	21.89(6)	18.09(3)	10.36(1)
pK _{a1} (καρβοξύλιο)	pK _{a2} (καρβοξύλιο)	pK _{a3} (καρβοξύλιο)	pK _{a4} (Asp ¹ -NH ₂)	pK _{a5} (Lys-ε-NH ₂)
2.82	3.46	3.81	7.72	10.38

ΠΙΝΑΚΑΣ 25: Χημικές μετατοπίσεις ¹H (δ, ppm) για το πεπτίδιο σε δυο τιμές pH.

		pH = 6.0	pH = 7.0
Asp ¹	-NH ₃ ⁻	*	*
	α	4.37	4.27
	β	2.86, 2.96	2.83, 2.96
Asp ²	α	**	**
	β	2.73, 2.86	2.71, 2.87
	-NH-	8.71	8.71
Asn	α	**	**
	β	2.90, 2.95	2.87, 2.93
	-NH-	8.61	8.62
	-CONH ₂ (cis)	7.04	7.03
	-CONH ₂ (trans)	7.75	7.73
Lys	α	4.48	4.48
	β	1.92, 2.00	1.92, 2.02
	γ	1.57	1.57
	δ	1.83	1.83
	ε	3.14	3.14
	-NH-	8.34	8.33 ^ε
	ε-NH ₃ ⁺	*	*
Ple	α	4.20	4.20
	β	1.95	1.96
	β'	1.03	1.02
	γ	1.26, 1.54	1.25, 1.57
	δ	0.92	0.98
	-NH-	7.85	7.84

* = δεν παρατηρείται λόγω ταχείας ανταλλαγής με το διαλύτη.

** = δεν παρατηρείται λόγω επικάλυψης με την κορυφή του H₂O.

^ε = ευρεία κορυφή.



ΠΙΝΑΚΑΣ 26: Χημικές μετατοπίσεις ^{13}C (δ , ppm) για το πεπτιδίο σε δυο τιμές pH.

		pH = 6.0	pH = 7.0
Asp¹	C_α	53.38	53.78
	C_β	39.87	40.77
	$\text{C}=\text{O}$	172.46	---
	COO^-	178.64	179.13
Asp²	C_α	54.47	54.50
	C_β	41.20	41.21
	$\text{C}=\text{O}$	175.60	175.73
	COO^-	180.09	180.14
Asn	C_α	53.53	53.39
	C_β	38.86	38.83
	$\text{C}=\text{O}$	174.75	175.45
	CONH_2	177.19	177.22
Lys	C_α	56.32	56.32
	C_β	32.94, 33.02	32.93, 33.00
	C_γ	24.61	24.60
	C_δ	28.88	28.88
	C_ϵ	42.01	42.00
	$\text{C}=\text{O}$	175.32	175.41
Pe	C_α	62.88	62.89
	C_β	39.59	39.60
	C_β'	18.02	18.01
	C_γ	27.32	27.30
	C_δ	13.44	13.44
	COO^-	181.08	181.10

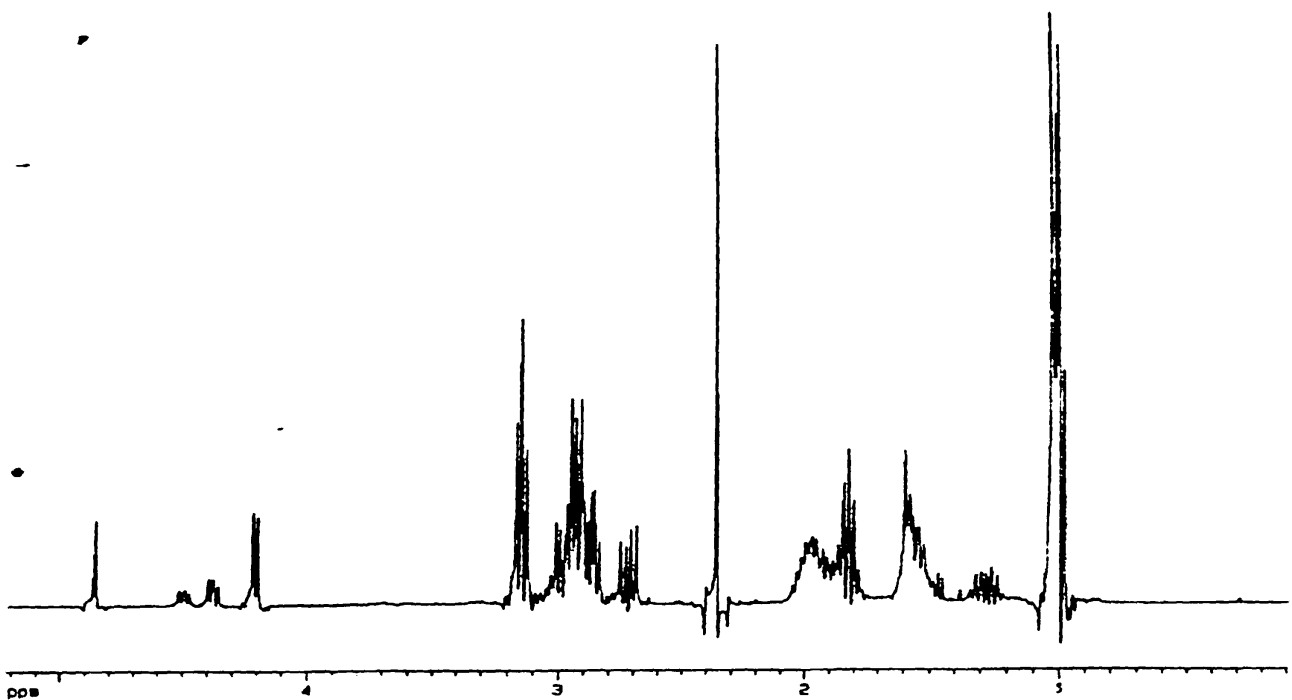
Όπως φαίνεται εύκολα και απ' το συντακτικό τύπο του πεπτιδίου (σχήμα 113), αυτό περιέχει πέντε όξινες ομάδες οι οποίες μπορούν να τιτλοδοτηθούν σε pH=2-11. Αυτές είναι τα τρία καρβοξύλια, η N-τελική αμινομάδα και η ε-αμινομάδα της λυσίνης. Με την βοήθεια



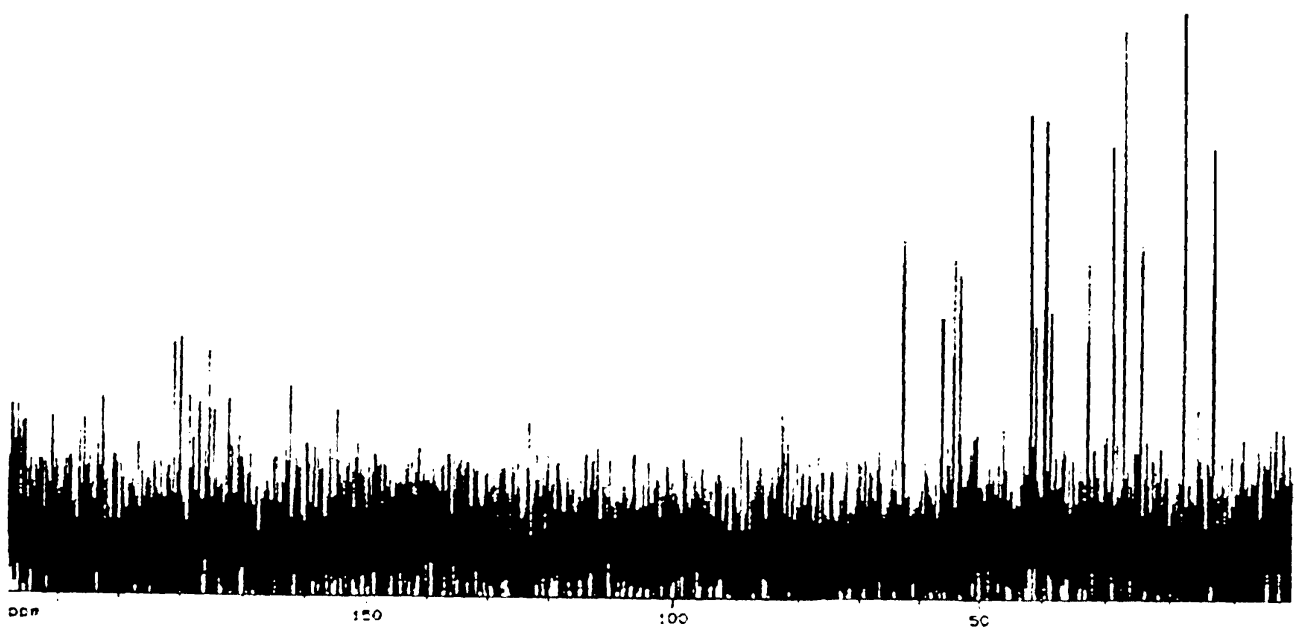
ποτενσιομετρικών τιτλοδοτήσεων έγινε δυνατός ο προσδιορισμός των pK_a για όλες τις παραπάνω ομάδες. Σε χαμηλές τιμές pH αναμένεται να αποπρωτονιώνονται οι καρβοξυλομάδες. Επειδή όμως οι ισορροπίες πρωτονίωσης/ αποπρωτονίωσής τους επηρεάζονται η μια απ' την άλλη δεν κατέστη δυνατόν να αποδοθούν σε συγκεκριμένη καρβοξυλική ομάδα οι ευρισκόμενες τιμές pK_a (πίνακας 24). Αντιθέτως οι δυο επόμενες τιμές μπορούν να αποδοθούν εύκολα στον ιονισμό της N-τέλικής αμινομάδας ($pK_a=7.72$) και στον ιονισμό της ε-αμινομάδας της Lys ($pK_a=10.38$).

Τα φάσματα 1H και ^{13}C -NMR καταγράφηκαν σε δυο τιμές pH για λόγους σύγκρισης με τα αντίστοιχα φάσματα των συστημάτων Zn(II), Cd(II)/πενταπεπτιδίου (pH~7.0) και $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ (M= Zn, Cd)/ πενταπεπτιδίου (pH~6.3). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μίγμα $D_2O:H_2O$ 1:4 ώστε να είναι δυνατή η παρατήρηση και των αμιδικών πρωτονίων τα οποία δεν εμφανίζονται σε διάλυμα D_2O λόγω ταχείας ανταλλαγής τους με δευτέριο [231,232]. Απ' τα δεδομένα των πινάκων 25 και 26 προκύπτει ότι με άνοδο του pH κατά μια μονάδα οι κυριότερες αλλαγές όσον αφορά τις χημικές μετατοπίσεις εντοπίζονται στο N-τελικό άκρο, αφού πλησιάζουμε την τιμή pK_a του ιονισμού της αμινομάδας του Asp¹. Έτσι, τόσο το πρωτόνιο όσο και ο άνθρακας της θέσης α παρουσιάζουν κάποιες μετατοπίσεις της τάξης των 0.1 και 0.4 ppm αντίστοιχα. Η β-καρβοξυλομάδα του Asp¹ φαίνεται να επηρεάζεται επίσης σημαντικά αφού η συχνότητά της μετατοπίζεται κατά 0.5 ppm περίπου προς χαμηλότερα πεδία. Είναι γνωστό ότι πρωτονίωση μιας καρβοξυλικής ομάδας προκαλεί μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία ενώ ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου προς χαμηλότερα [233]. Η παρατηρούμενη λοιπόν μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία θα μπορούσε να οφείλεται και σε σχηματισμό ενδομοριακού ή διαμοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ της αμινομάδας και του καρβοξυλίου του Asp¹. Ανάλογα η κατά 0.7 ppm μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία του καρβονυλικού άνθρακα της Asn θα μπορούσε να αποδοθεί επίσης στο ίδιο φαινόμενο. Τέλος σημειώνεται ότι στην περίπτωση των φασμάτων ^{13}C -NMR δεν είναι πάντοτε δυνατή η ανίχνευση των καρβονυλικών ή/και καρβοξυλικών ανθράκων λόγω του μεγάλου χρόνου αποδιέγερσης T1 (T1: spin-lattice relaxation time) που συχνά έχουν [231,234]. Επίσης οι κορυφές των α-πρωτονίων των Asp² και Asn δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθούν αφού αυτά συντονίζονται στην ίδια περιοχή με το διαλύτη (H_2O).



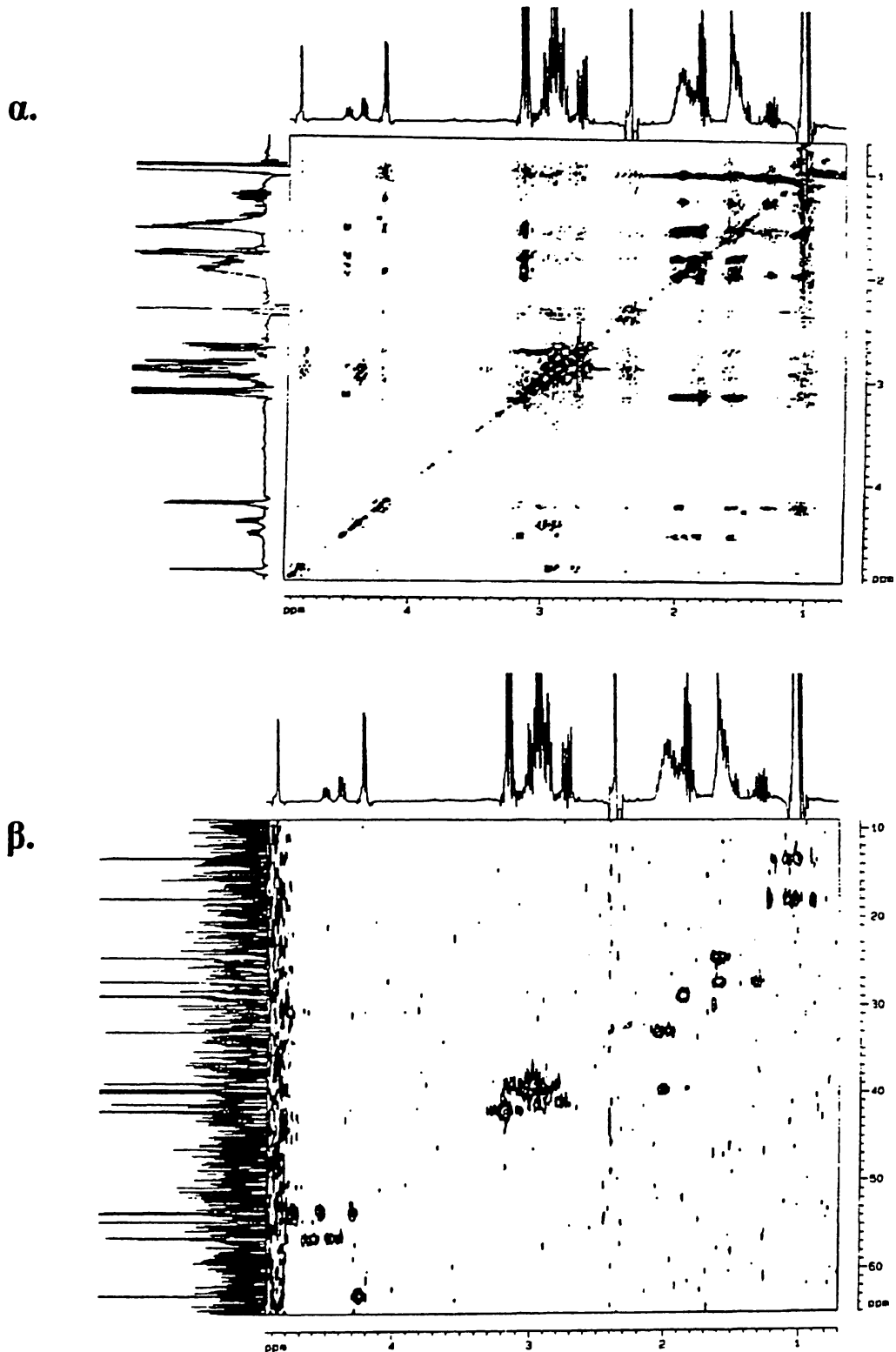


Σχήμα 114: Φάσμα ^1H -NMR του πεπτιδίου σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4 σε $\text{pH}=6.0$.



Σχήμα 115: Φάσμα ^{13}C -NMR του πεπτιδίου σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4 σε $\text{pH}=6.0$.





Σχήμα 116: Φάσματα 2D-NMR του πεπτιδίου σε διάλυμα $D_2O:H_2O$ 1:4 σε $pH=6.0$
α) $^1H-^1H$ TOCSY β) $^1H-^{13}C$ HMQC.

B. Αλληλεπίδραση των Zn(II) και Cd(II) με το πεπτίδιο Asp-Asn-Lys-Ile.

Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα D₂O:H₂O 1:4 και σε μοριακή αναλογία μετάλλου:πεπτίδιο 1:1. Το pH των διαλυμάτων ρυθμίστηκε στην τιμή 7.0, αφού σε αλκαλικά διαλύματα παρατηρήθηκε καταβύθιση υδροξειδίων των μετάλλων, και καταγράφηκαν τα φάσματα ¹H, ¹³C και ¹¹³Cd-NMR. Η απόδοση των κορυφών βασίστηκε στα δεδομένα για το ελεύθερο πεπτίδιο καθώς και σε πειράματα ¹H-¹H TOCSY, ¹H-¹³C HMQC και ¹H-¹³C HMBC NMR. Μετά την επεξεργασία των φασμάτων προέκυψαν οι πίνακες 27 και 28 στους οποίους για λόγους σύγκρισης παρατίθενται και τα δεδομένα για το ελεύθερο πεπτίδιο σε pH=7.0. Χαρακτηριστικά φάσματα NMR για τα συστήματα Zn(II),Cd(II) /πενταπεπτίδιο δίνονται στα σχήματα 117-121.

ΠΙΝΑΚΑΣ 27: Χημικές μετατοπίσεις ¹H (δ, ppm) για το ελεύθερο πεπτίδιο και για τα συστήματα M(II)/πενταπεπτίδιο (M=Zn,Cd), σε διαλύματα D₂O:H₂O 1:4 σε pH=7.0.

		πεπτίδιο	Zn(II):πεπτίδιο 1:1	Cd(II):πεπτίδιο 1:1
Asp ¹	-NH ₃ ⁺	*	*	*
	α	4.27	4.11	4.17
	β	2.83, 2.96	2.90, 3.00	2.85, 2.96
Asp ²	α	**	**	**
	β	2.71, 2.87	2.73, 2.93	2.74, 2.84
	-NH-	8.71	8.60-8.71 ^{εκ.ευρ}	8.61 ^{ευρ}
Asn	α	**	**	**
	β	2.87, 2.93	2.87, 2.93	2.85, 2.94
	-NH-	8.62	8.60-8.71 ^{εκ.ευρ}	8.61 ^{ευρ}
	-CONH ₂ (cis)	7.03	7.02	7.02
	-CONH ₂ (trans)	7.73	7.73	7.74
Lys	α	4.48	4.48	4.47
	β	1.92, 2.02	1.91, 2.02	1.80, 1.99
	γ	1.57	1.54	1.54
	δ	1.83	1.81	1.84
	ε	3.14	3.14	3.13
	-NH-	8.3 ^{ευρ}	8.45 ^{ευρ}	8.3 ^{ευρ}
	ε-NH ₃ ⁺	*	*	*
Ile	α	4.20	4.21	4.20
	β	1.96	1.97	1.95
	β'	1.02	1.00	1.05
	γ	1.25, 1.57	1.27, 1.56	1.26, 1.56
	δ	0.98	0.97	0.99
	-NH-	7.84	7.85	7.79, 7.85

* = δεν παρατηρείται λόγω ταχείας ανταλλαγής με το διαλύτη.

**= δεν παρατηρείται λόγω επικάλυψης με την κορυφή του H₂O.

^{ευρ}= ευρεία κορυφή.

^{εκ}= επικαλύπτεται.



ΠΙΝΑΚΑΣ 28: Χημικές μετατοπίσεις ^{13}C (δ , ppm) για το ελεύθερο πεπτίδιο και για τα συστήματα M(II) /πενταπεπτίδιο ($\text{M}=\text{Zn}, \text{Cd}$), σε διαλύματα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4 σε $\text{pH}=7.0$.

		πεπτίδιο	Zn(II) :πεπτίδιο 1:1	Cd(II) :πεπτίδιο 1:1
Asp¹	C_α	53.78	52.85	53.53
	C_β	40.77	41.68	39.05
	$\text{C}=\text{O}$	----	----	174.12
	COO^-	179.13	178.08	179.71
Asp²	C_α	54.50	54.37, 54.64	54.52, 54.60
	C_β	41.21	41.22	41.13
	$\text{C}=\text{O}$	175.73	175.30	175.63
	COO^-	180.14	180.00	180.22
Asn	C_α	53.39	53.40, 53.62	53.66
	C_β	38.83	39.08	38.96
	$\text{C}=\text{O}$	175.45	175.30	---
	CONH_2	177.22	177.26	177.32, 177.64
Lys	C_α	56.32	56.53	55.48
	C_β	32.93, 33.00	32.95, 33.12	32.97, 33.04
	C_γ	24.60	24.68	24.62
	C_δ	28.88	29.04	28.99, 29.08
	C_ϵ	42.00	42.24	42.20
	$\text{C}=\text{O}$	175.41	174.13, 175.30	174.12, 175.55
Ile	C_α	62.89	62.91	62.90
	C_β	39.60	39.58, 39.70	39.58, 39.70
	C_β'	18.01	18.08	18.04
	C_γ	27.30	27.36	27.31
	C_δ	13.44	13.52, 13.59	13.47, 13.54
	COO^-	181.10	181.13	181.13

Είναι γνωστό ότι η συμπλοκοποίηση προκαλεί συνήθως μετατοπίσεις των σημάτων NMR που βρίσκονται κοντά στις αναμενόμενες θέσεις ένταξης, σε χαμηλότερα πεδία λόγω έλξης



ηλεκτρονιακής πυκνότητας απ' το μεταλλικό ιόν. Στις περιπτώσεις όμως που ο μελετούμενος πυρήνας βρίσκεται σε ένα περιβάλλον που περιέχει ετεροάτομα ή καρβονύλια μπορεί να παρατηρηθούν και μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία [235]. Ειδικά στις περιπτώσεις μικρών πεπτιδίων τα οποία σε διάλυμα μπορούν να λάβουν έναν μεγάλο αριθμό διαμορφώσεων που εναλλάσσονται μεταξύ τους [236], η συμπλοκοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε μετατοπίσεις κορυφών πυρήνων που βρίσκονται μακριά απ' τις θέσεις ένταξης του μετάλλου, λόγω μόνο αλλαγής της διαμόρφωσης [237]. Γενικά έχει προταθεί ότι η εξάπλωση των σημάτων των αμιδικών πρωτονίων κατά τη συμπλοκοποίηση αποτελεί ένδειξη μιας συμπαγούς και άκαμπτης δομής [238,239].

• Στους πίνακες 27 και 28 με έντονη γραφή επισημαίνονται οι τιμές δ οι οποίες μετατοπίζονται περισσότερο κατά τη συμπλοκοποίηση. Γενικά παρατηρούμε ότι κατά την προσθήκη των μεταλλοϊόντων σε διάλυμα του πεπτιδίου σε pH 7 δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$. Οι σημαντικότερες απ' αυτές εντοπίζονται στα α-πρωτόνια του Asp¹ (μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία κατά 0.16 και 0.10 ppm για τα σύμπλοκα του Zn και Cd αντίστοιχα). Όσον αφορά τα σήματα των αμιδικών πρωτονίων παρατηρείται μια τάση να έρθουν πιο κοντά το ένα στο άλλο παρά να εξαπλωθούν. Έτσι τα σήματα των Asp²NH και AsnNH επικαλύπτονται σε μια αρκετά ευρεία κορυφή (^{επ.επρ} στον πίνακα 27). Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα είναι αρκετά ευκίνητα [237]. Είναι εξάλλου γνωστή η δυσκολία μελέτης συμπλόκων Zn(II) ή Cd(II)-πεπτιδίων σε διάλυμα, καθώς η γεωμετρία της σφαίρας ένταξης των ιόντων αυτών παραμορφώνεται εύκολα λόγω της μεγάλης ευκινησίας αυτών των συμπλόκων. Αυτή χαρακτηρίζεται από αποκατάσταση ισορροπιών έχοντας ως άτομα δότες διάφορα ετεροάτομα του υποκαταστάτη ή/και από αποκατάσταση ισορροπιών μεταξύ συμπλοκοποιημένης και μη συμπλοκοποιημένης μορφής [238]. Η αύξηση του εύρους κάποιων σημάτων του πεπτιδίου στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ κατά την προσθήκη ειδικά του Zn(II) θα μπορούσε να αποδοθεί σε αποκατάσταση κάποιων ισορροπιών στο διάλυμα. Δεν αποκλείεται όμως η αύξηση αυτή να οφείλεται και σε αλλαγή της διαμόρφωσης του πεπτιδίου κατά τη συμπλοκοποίηση [238]. Η κατά 0.12 ppm μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία του σήματος του LysNH στο σύστημα Zn(II)-πεπτιδίου, θα μπορούσε να οφείλεται σε μια τέτοια αλλαγή διαμόρφωσης. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η εμφάνιση δυο σημάτων για το αμιδικό πρωτόνιο της Ile στο σύστημα Cd(II)-πεπτιδίου. Παρόμοιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί κατά την αλληλεπίδραση του ιόντος Al(III) με τη θυμουλίνη, μια ορμόνη-εννιαπεπτίδιο (Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn) που εκκρίνεται απ' τα σπιθηλιακά κύτταρα του θύμου αδένου [239]. Πιο συγκεκριμένα η παρουσία δυο φασματικών



γραμμών στα 7.96 και 8.03 ppm για τα αμιδικά πρωτόνια της Ser⁴ σε θερμοκρασία δωματίου αποδόθηκε στο γεγονός ότι η συμπλοκοποίηση προκαλεί κάποιες μικρές αλλαγές διαμόρφωσης μεταξύ των δυο μορίων πεπτιδίου στο σύμπλοκο Al^{III}(θυμουλίνη)₂. Στη δική μας περίπτωση η μοριακή αναλογία πεπτιδίου:Cd(II) ήταν 1:1 και ο σχηματισμός ενός συμπλόκου 1:2 θεωρείται μάλλον απίθανος. Θα πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι οι δυο κορυφές έχουν το ίδιο ύψος και μόνο το IleNH παρατηρείται ως δυο κορυφές. Καταλήγουμε λοιπόν στο ότι το Cd(II) θα πρέπει να πλησιάζει στο τμήμα Lys-Ile του πεπτιδίου επηρεάζοντάς το. Η εναλλαγή μεταξύ των δυο διαφορετικών καταστάσεων πρέπει να είναι αργή (στην κλίμακα χρόνου του NMR) έτσι ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί. Συνοψίζοντας τα δεδομένα ¹H-NMR καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα: α) τα μεταλλικά ιόντα αλληλεπιδρούν με την α-NH₂ του Asp¹ β) η συμπλοκοποίηση επιφέρει αλλαγές στη διαμόρφωση του πεπτιδίου γ) τα σωματίδια που σχηματίζονται είναι αρκετά ευκίνητα.

Σε αντίθεση με τα φάσματα ¹H-NMR στα φάσματα ¹³C-NMR των συμπλόκων παρατηρούνται σημαντικές διαφορές. Παρατηρούνται μετατοπίσεις και προς χαμηλά και προς υψηλά πεδία. Το γεγονός αυτό αποδίδεται αφενός μεν στην συμπλοκοποίηση αφετέρου δε στην γειτνίαση αρνητικά ή θετικά φορτισμένων ομάδων [237,240]. Για τις περισσότερες καρβονυλομάδες του μορίου παρατηρούνται μετατοπίσεις προς υψηλά πεδία γεγονός που αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη τόσο διαμορφωτικών αλλαγών [237], όσο και της γειτνίασης θετικά φορτισμένων ομάδων [233]. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις μπορούμε να υποθέσουμε ότι παρουσία των μεταλλικών ιόντων το πεπτίδιο υιοθετεί μια τέτοια διαμόρφωση ώστε να διπλώνει και να τα περιβάλλει.

Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά το σύστημα Zn(II)/πενταπεπτιδίου, οι σημαντικότερες μετατοπίσεις προς υψηλά πεδία παρατηρούνται για τους άνθρακες Asp¹C_α, Asp¹COO⁻, Asp²CO και LysCO κατά 0.93, 1.05, 0.43 και 1.28 ppm αντίστοιχα. Μετατοπίσεις προς χαμηλά πεδία παρατηρούνται για τους άνθρακες Asp¹C_β (0.9 ppm) και LysC_α (0.3 ppm). Η μετατόπιση προς υψηλά πεδία για τον Asp¹C_α σε αντίθεση με το αναμενόμενο αποτέλεσμα της σύμπλεξης στην N-τελική αμινομάδα (μετατόπιση προς χαμηλά πεδία) σημαίνει ότι ο άνθρακας αυτός βρίσκεται σε ένα μη ισότροπο περιβάλλον που δημιουργεί ένα ετεροάτομο ή καρβονύλιο [235]. Με βάση τις παραπάνω μετατοπίσεις μπορούμε να προτείνουμε ότι ο Zn(II) αλληλεπιδρά με την N-τελική αμινομάδα και το β-καρβοξύλιο του Asp¹ σχηματίζοντας έναν εξαμελή χηλικό δακτύλιο καθώς και τις καρβονυλομάδες των Asp² και της Lys. Επιπλέον αλληλεπίδραση με το Asp¹CO είναι επίσης πιθανή με βάση την τιμή δ του Asp¹C_α και τη μη ανίχνευση του σήματος του Asp¹CO. Γενικά είναι



γνωστό ότι κατά τη συμπλοκοποίηση τέτοιων ομάδων παρατηρείται κάποιες φορές μείωση της έντασης απορρόφησής τους ως την πλήρη εξαφάνισή τους λόγω μεγάλης αλλαγής στο χρόνο T1 αποκατάστασης σπίν-πλέγματος [235,237].

Περνώντας στο σύστημα Cd(II)/πενταπεπτιδίου οι κυριότερες μετατοπίσεις προς υψηλά πεδία παρατηρούνται για τους Asp¹C_α, Asp¹C_β, LysC_α και LysCO κατά 0.35, 1.72, 0.84 και 1.28 ppm, ενώ ο Asp¹COO⁻ μετατοπίζεται προς χαμηλότερα πεδία κατά 0.6 ppm. Οι κυριότερες διαφορές σε σχέση με το σύστημα Zn(II)/πενταπεπτιδίου εντοπίζονται τόσο στο μέγεθος όσο και στο είδος της χημικής μετατόπισης (προς υψηλά ή χαμηλά πεδία) κυρίως για τους άνθρακες του Asp¹. Το Cd(II) θα πρέπει είτε να εντάσσεται λιγότερο ισχυρά με την N-τελική αμινομάδα και το β-COO⁻ του Asp¹, κάτι που δεν συνάγει με την μεγάλη μετατόπιση προς υψηλά πεδία που παρατηρείται για τον Asp¹C_β, είτε να βρίσκεται σε ένα τελείως διαφορετικό χημικό περιβάλλον. Η κορυφή του Asp¹CO εμφανίζεται σ' αυτή την περίπτωση, αλλά η έλλειψη της αντίστοιχης τιμής δ σε pH=7.0 για το ελεύθερο πεπτιδίο δεν μας επιτρέπει να κάνουμε σύγκριση. Σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο συστημάτων παρουσιάζεται και στη χημική μετατόπιση του LysC_α γεγονός που ενισχύει την αλλαγή του χημικού περιβάλλοντος γύρω απ' αυτό το άτομο. Συνοψίζοντας τα δεδομένα για το σύστημα Cd(II)/πενταπεπτιδίου καταλήγουμε ότι η ένταξη λαμβάνει χώρα μέσω της N-τελικής αμινομάδας, του β-καρβοξυλίου του Asp¹ και της καρβονυλομάδας της Lys. Πιθανή ένταξη και της καρβονυλομάδας του Asp¹ δεν μπορεί να αποκλειστεί. Συνεκτιμώντας την μεγάλη μεταβολή της χημικής μετατόπισης του LysC_α (-0.8 ppm) σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή του συστήματος Zn(II)/πενταπεπτιδίου (+0.3 ppm) όπου δεν εντάσσεται η καρβονυλομάδα της Asn, προτείνουμε ότι η τελευταία εντάσσεται μάλλον με το ιόν Cd(II) έναντι του Asp²CO του συστήματος Zn(II)/πενταπεπτιδίου, συμπληρώνοντας έτσι τη σφαίρα ένταξης του Cd(II). Η υπόθεση αυτή ισχυροποιείται απ' το γεγονός της μη ανίχνευσης του σήματος της AsnCO στα φάσματα ¹³C-NMR.

Ένα τελευταίο φαινόμενο που παρατηρείται στα φάσματα ¹³C-NMR και των δυο συστημάτων είναι η εμφάνιση για κάποιους άνθρακες δυο κορυφών ίδιου περίπου ύψους. Το γεγονός αυτό θα πρέπει να αποδοθεί στην παρουσία μιας πιο άκαμπτης και κλειστής διαμόρφωσης του πεπτιδίου παρουσία των μεταλλικών ιόντων [237]. Το φαινόμενο παρατηρείται κυρίως για τους C_β και C_δ των παράπλευρων αλυσίδων της Lys και Ile οι οποίες απουσία μετάλλου αναμένεται να έχουν μεγάλη ελευθερία διαμόρφωσης [231,236,241]. Η εμφάνιση δυο ή τεσσάρων κορυφών για κάθε άτομο C_α και δυο κορυφών για κάθε καρβονυλικό άνθρακα μπορεί να αποδοθεί και σε ισοτοπικά φαινόμενα μέσω δυο η τριών δεσμών σε διαλύτες που περιέχουν κάποιο ποσοστό ²H



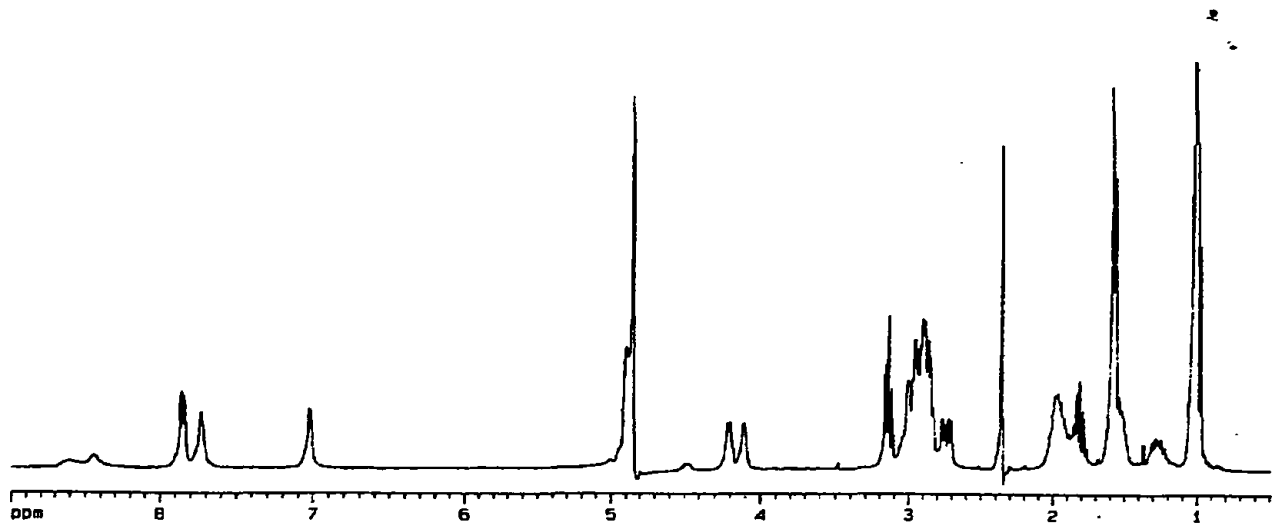
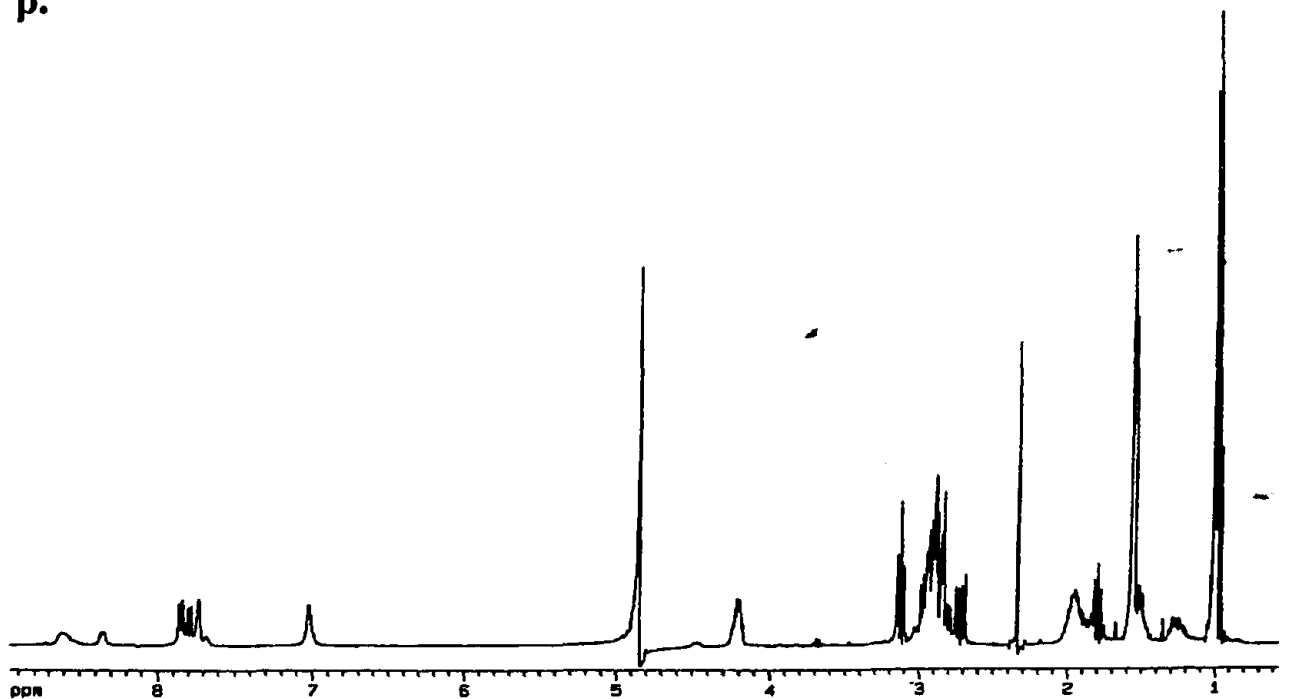
[242]. Η διαφορά όμως μεταξύ των κορυφών αυτών είναι μικρότερη ή ίση με 0.1 ppm γεγονός που δεν ισχύει στην δική μας περίπτωση (πίνακας 28), όπου εκτός των σημάτων του Asp^2Ca για το σύστημα $\text{Cd(II)/πενταπεπτιδίου}$ οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται ως διπλές απέχουν μεταξύ τους περισσότερο από 0.1 ppm. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του άνθρακα LysCO και για τα δυο συστήματα. Παρατηρούνται δυο κορυφές για κάθε καρβονυλικό άνθρακα οι οποίες απέχουν μεταξύ τους 1.3 ppm περίπου. Απ' αυτές η μια πλησιάζει την τιμή του ελεύθερου υποκαταστάτη σε $\text{pH}=7.0$ ενώ η δεύτερη μετατοπίζεται κατά 1.3 ppm προς υψηλότερα πεδία σε σχέση μ' αυτόν. Η διαφορά μεταξύ τους είναι αρκετά μεγάλη ώστε να μπορούν να αποδοθούν σε διαμορφωμερή του ίδιου συμπλόκου. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα δεδομένα ότι μια απ' τις κορυφές πλησιάζει την τιμή του ελεύθερου υποκαταστάτη, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αποκαθίσταται ισορροπία μεταξύ δυο μορφών στο διάλυμα, στη μια εκ των οποίων η καρβονυλική ομάδα της LysCO συμπλέκεται με το μεταλλικό ιόν, στην άλλη όχι. Η εναλλαγή μεταξύ των δυο μορφών πρέπει να είναι αργή στην κλίμακα χρόνου του NMR έτσι ώστε να μπορεί να γίνεται δυνατή η παρατήρησή τους. Η ύπαρξη τέλος δυο κορυφών για τα αμιδικά πρωτόνια της IleNH θα μπορούσε να αποδοθεί, με βάση τα παραπάνω δεδομένα, στην ύπαρξη των δυο παραπάνω μορφών.

Σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά την σφαίρα ένταξης του Cd(II) στο σύστημα $\text{Cd(II)/πενταπεπτιδίου}$ έδωσε και το φάσμα $^{113}\text{Cd-NMR}$ (σχήμα 121). Το σήμα παρουσιάζεται αρκετά διευρυμένο με $\Delta\nu_{1,2} = 244 \text{ Hz}$ ενώ εντοπίζεται στα 74.28 ppm. Η διεύρυνση του σήματος αποδίδεται στο ότι ο χρόνος αποδιέγερσης του πυρήνα ^{113}Cd επηρεάζεται απ' το μηχανισμό της χημικής ανισοτροπίας, λόγω της μικρής συμμετρίας του χημικού περιβάλλοντος γύρω απ' το μεταλλικό ιόν [243], χωρίς να αποκλειστούν και άλλοι παράμετροι όπως η ευκινησία του ιόντος Cd(II) και η εναλλαγή μεταξύ διαφορετικών διαμορφώσεων [243]. Ο πιο σημαντικός λόγος πάντως είναι η ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ δυο διαφορετικών μορφών. Η αντικατάσταση ενός καρβονυλικού οξυγόνου από ένα μόριο H_2O δεν προκαλεί σημαντική αλλαγή στη χημική μετατόπιση του ^{113}Cd [226] με αποτέλεσμα τα σήματα που οφείλονται στην ύπαρξη των δυο παραπάνω μορφών να επικαλύπτονται. Η τιμή $\delta = 74.28 \text{ ppm}$ δεν αφήνει καμιά αμφιβολία περί της ύπαρξης ενός τουλάχιστον ατόμου αζώτου στη σφαίρα ένταξης του Cd(II) [226]. Οι τιμές $\delta \text{ }^{113}\text{Cd}$ για την κονκαναβαλίνη (1 ιμιδαζολικό άζωτο, 3 COO^- , 2 H_2O), αλκαλική φωσφατάση (1 ιμιδαζολικό άζωτο, 2 COO^-) και αλβουμίνη από ανθρώπινο πλάσμα (1 ιμιδαζολικό άζωτο, 3 COO^-) βρέθηκαν να είναι 46, 52 και 58 ppm αντίστοιχα [226, 243]. Είναι επίσης γνωστό ότι η παρουσία ανιονικών υποκαταστατών όπως τα καρβοξύλια προκαλούν μεγαλύτερη μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία απ' ότι οι ουδέτεροι όξο-υποκαταστάτες όπως τα καρβονύλια. Η παρουσία



λοιπόν της N-τελικής αμινομάδας στη σφαίρα ένταξης του συμπλόκου Cd(II)/πενταπεπτιδίου και η παρουσία ενός μόνο ανιονικού καρβοξυλικού υποκαταστάτη (β -COO⁻ του Asp¹) μπορεί να ερμηνεύσει την παρατηρούμενη χημική μετατόπιση, ενισχύοντας την πρότασή μας περί σφαίρας ένταξης με 1 NH₂, 1 COO⁻ και 1 ή 2 CO. Στο σχήμα 122 παρουσιάζονται οι πιθανές δομές των συμπλόκων M(II)/πενταπεπτιδίου (όπου M= Zn, Cd).

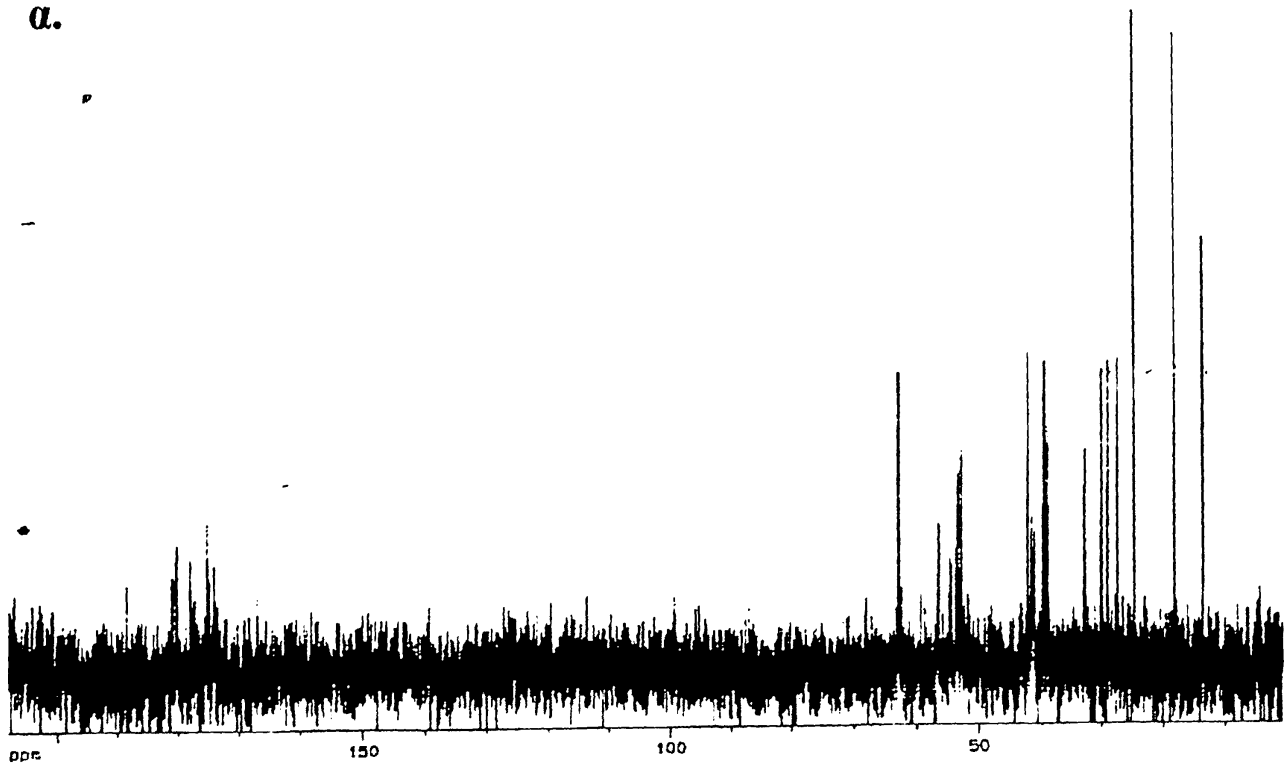


α.**β.**

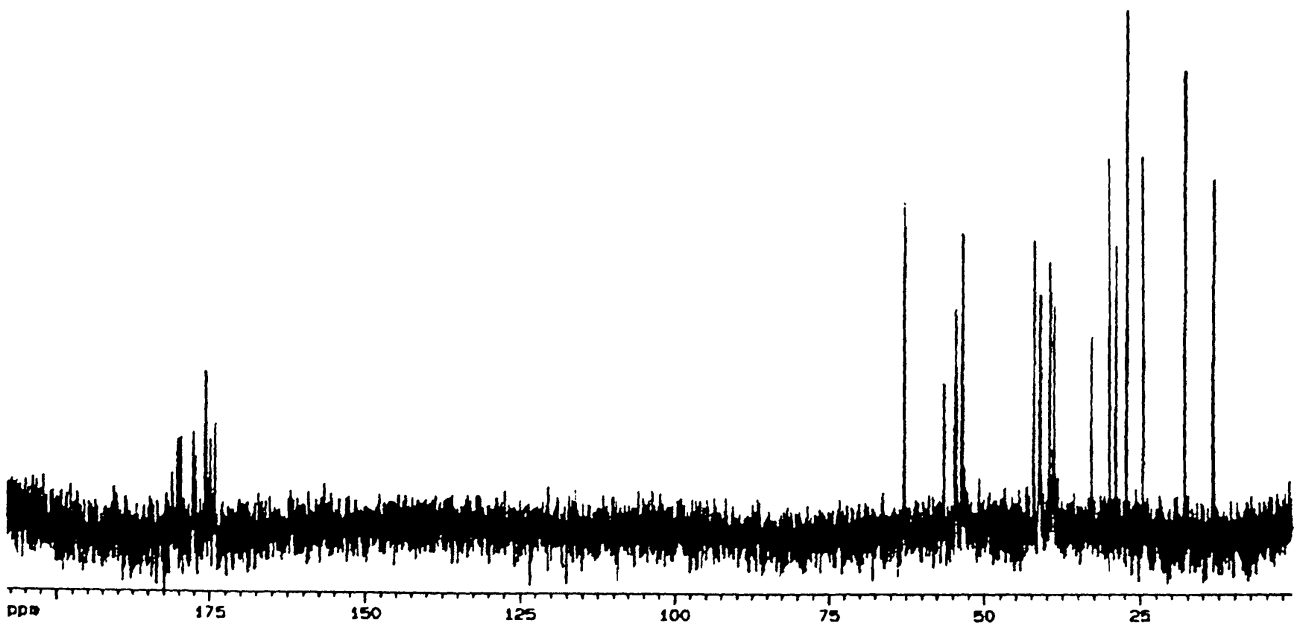
Σχήμα 117: Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4, σε $\text{pH}=7.0$ των συστημάτων:
α) Zn(II) /πενταπεπτιδίου β) Cd(II) /πενταπεπτιδίου.



α.



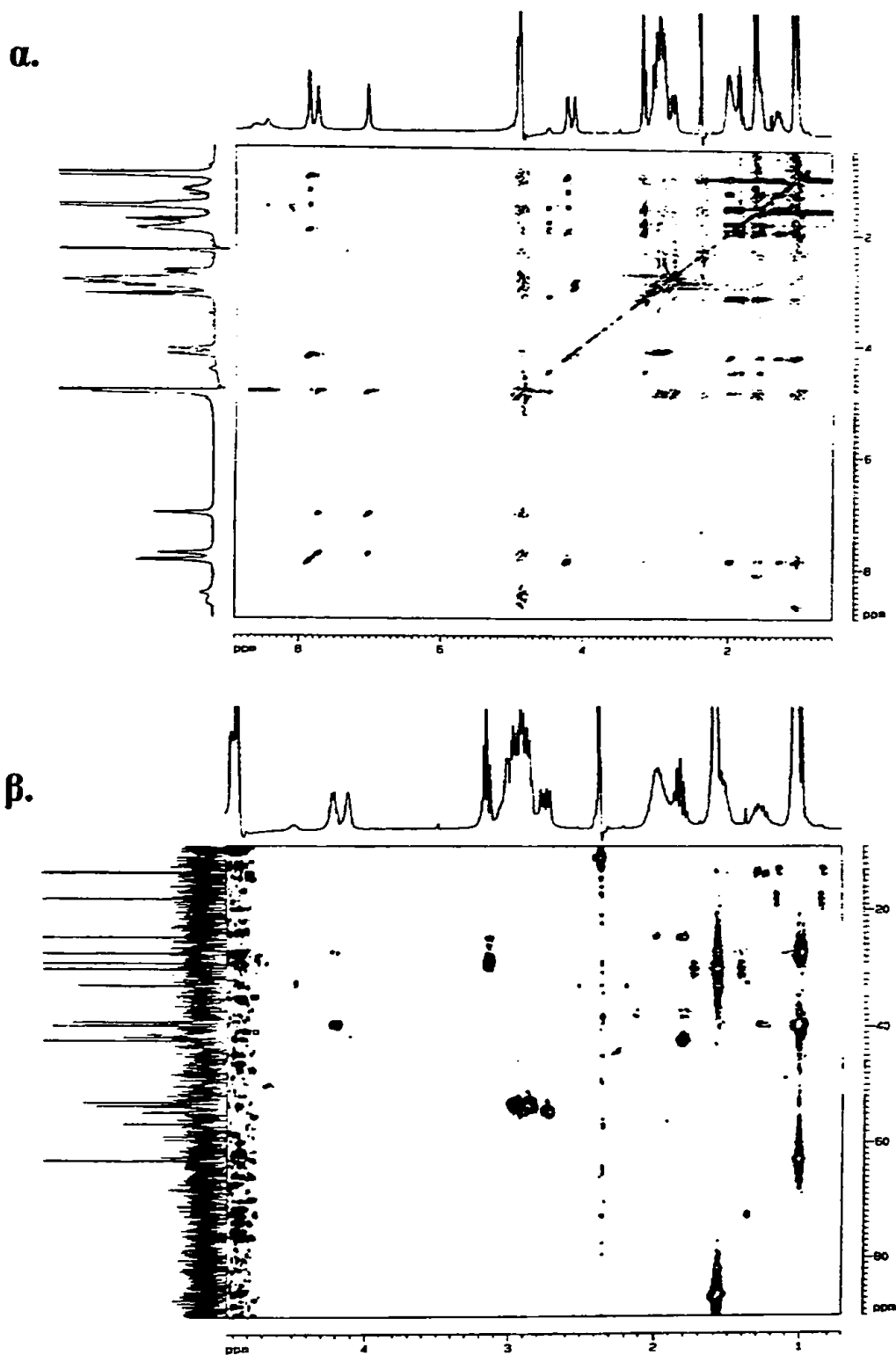
β.



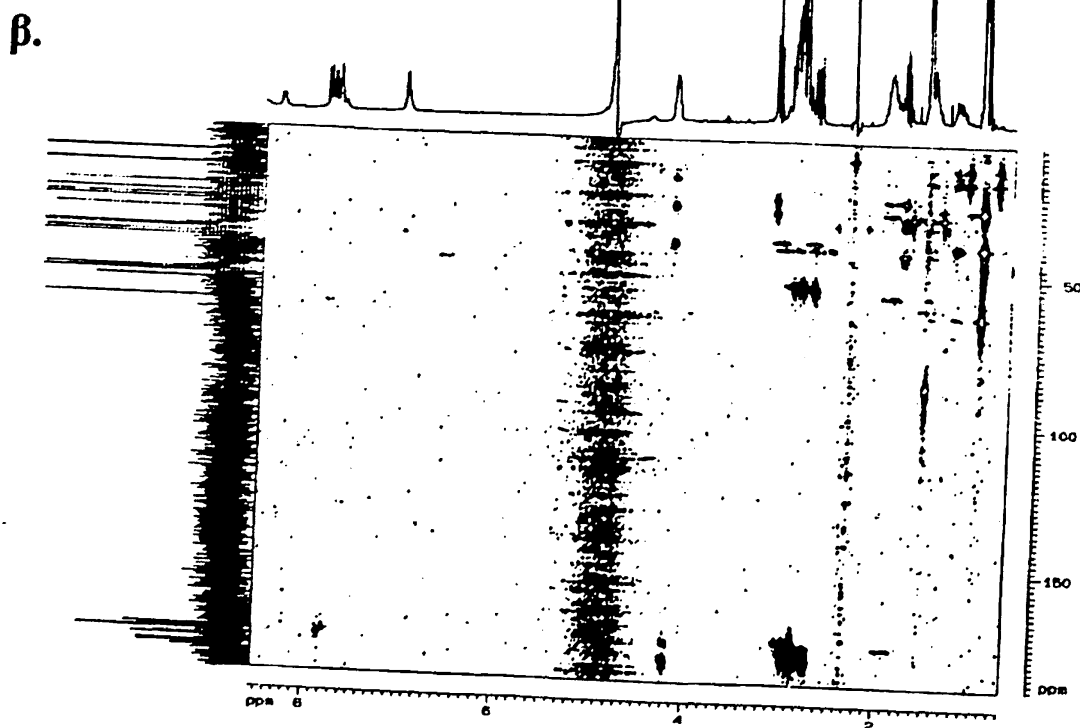
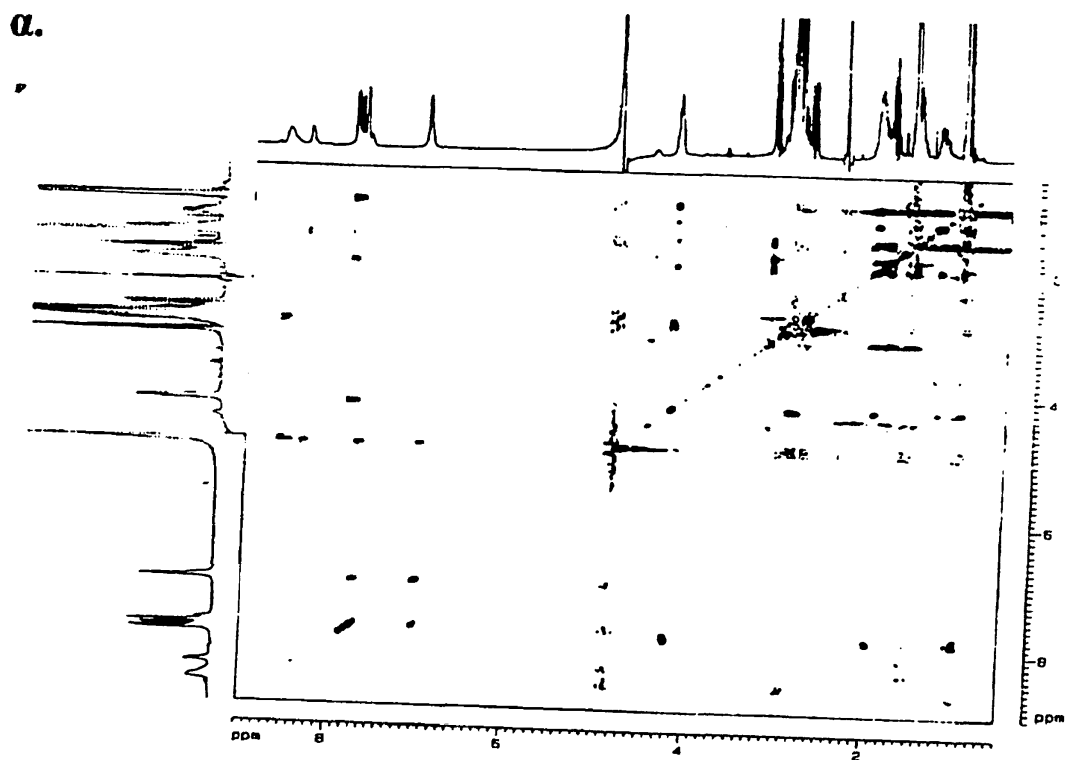
Σχήμα 118: Φάσματα ^{13}C -NMR σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4, σε $\text{pH}=7.0$ των συστημάτων:

α) $\text{Zn}(\text{II})$ /πενταπεπτιδίου β) $\text{Cd}(\text{II})$ /πενταπεπτιδίου.





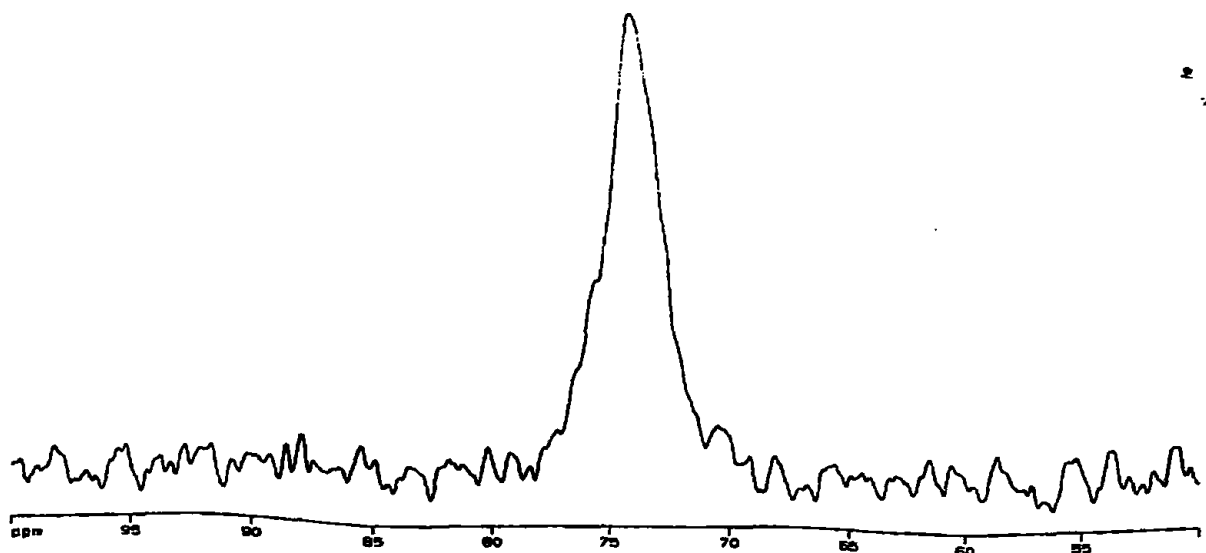
Σχήμα 119: Φάσματα 2D-NMR του συστήματος Zn(II)/πενταπεπτιδίου:
α) ^1H - ^1H -TOCSY β) ^1H - ^{13}C HMBSC.



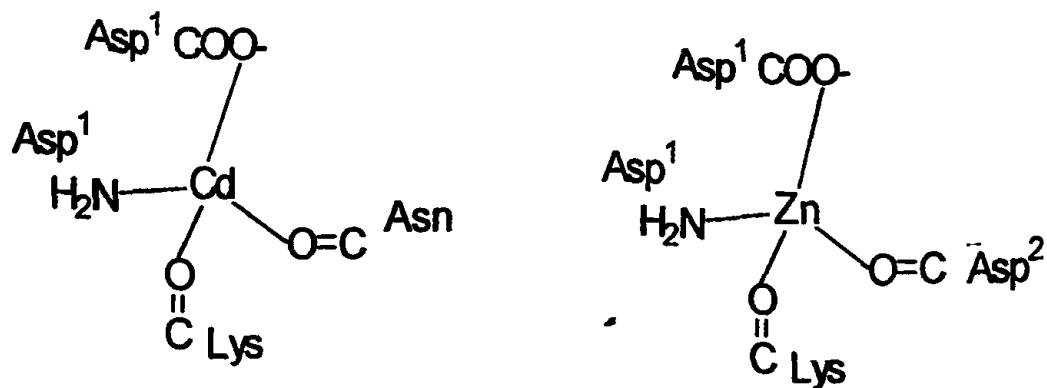
Σχήμα 120: Φάσματα 2D-NMR του συστήματος Cd(II)/πενταπεπτιδίου:

α) ^1H - ^1H -TOCSY β) ^1H - ^{13}C HMCBC.





Σχήμα 121: Φάσμα ^{113}Cd -NMR του συστήματος Cd(II) /πενταπεπτιδίου σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4, σε $\text{pH}=7.0$.



Σχήμα 122: Προτεινόμενες δομές για τα σύμπλοκα που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση των ιόντων Cd(II) και Zn(II) με το πεπτίδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Πε σε υδατικό διάλυμα.

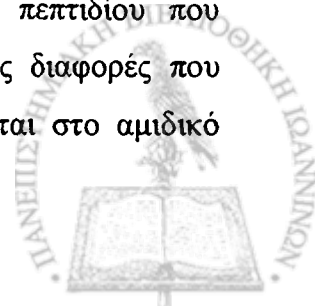
Γ. Αλληλεπίδραση των συμπλόκων $K_2\{[M(LH)Cl_2]\}_2$ ($M= Zn, Cd$) ($L=HETPP$) με το πεπτιδίο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.

I. Γενικά.

Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα $D_2O:H_2O$ 1:4 και σε μοριακή αναλογία συμπλόκου:πεπτιδίο 1:2. Όπως αναφέρθηκε πριν τα σύμπλοκα είναι διμερή και για το λόγο αυτό προστίθεται σε διαλύματα των συμπλόκων διπλάσια ποσότητα πεπτιδίου έτσι ώστε να επιτευχθεί μοριακή αναλογία μετάλλου:HETPP:πεπτιδίο 1:1:1. Εν συνεχεία το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 6.3. Σε $pH > 6.5$ παρατηρήθηκε καταβύθιση λευκών ιζημάτων. Στην παραπάνω τιμή pH (6.3) αναμένεται να είναι πρωτονιωμένη η N-τελική αμινομάδα του πεπτιδίου ($pK_a = 7.72$) καθιστώντας έτσι μάλλον απίθανη τη συμπλοκοποίηση της με τα ιόντα $Zn(II)$ ή $Cd(II)$. Έτσι, ως θέσεις ένταξης του πεπτιδίου με τα μεταλλικά ιόντα αναμένονται μόνο καρβοξυλικά ή καρβονυλικά άτομα οξυγόνου, αφού τα ιόντα $Cd(II)$ και $Zn(II)$ δεν μπορούν να αντικαταστήσουν τα αμιδικά πρωτόνια του πεπτιδίου ειδικά σε χαμηλές τιμές pH [244]. Ακολούθησε η καταγραφή των φασμάτων 1H , ^{13}C , ^{31}P και ^{113}Cd -NMR καθώς και των 1H - 1H TOCSY, 1H - ^{13}C HMQC, 1H - ^{13}C HMBC και 1H - 1H NOESY NMR. Η απόδοση των κορυφών βασίστηκε στα αντίστοιχα δεδομένα NMR για την HETPP, τα σύμπλοκά της καθώς και τα δεδομένα NMR του ελεύθερου πεπτιδίου και των μεταλλικών συμπλόκων του. Τα φάσματα 2D-NMR βοήθησαν στην απόδοση των κορυφών που επικαλύπτονταν μεταξύ τους λόγω του μεγάλου μεγέθους του συστήματος που περιελάμβανε 38 άτομα άνθρακα.

II. 1H -NMR.

Μετά την επεξεργασία των 1H -NMR φασμάτων προέκυψαν οι πίνακες 29 και 30, ενώ χαρακτηριστικά φάσματα 1H -NMR και 1H - 1H TOCSY NMR δίνονται στα σχήματα 123 και 124. Βασιζόμενοι στον πίνακα 29, παρατηρούμε ότι δεν εμφανίζονται σημαντικές διαφορές στα δεδομένα NMR του πεπτιδικού τμήματος και των δυο συστημάτων μετάλλου:HETPP:πεπτιδίου σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του ελεύθερου πεπτιδίου σε $pH=6.0$. Όπως και στην περίπτωση των συμπλόκων Zn , Cd -πεπτιδίου παρατηρείται μια τάση των σημάτων των αμιδικών πρωτονίων να έλθουν κοντά το ένα στο άλλο παρά να εξαπλωθούν. Παράλληλα η αύξηση του εύρους κάποιων σημάτων ειδικά στο σύστημα $K_2\{[Zn(LH)Cl_2]\}_2$:πεπτιδίο ($Asp^{1,2}$, $Asn CH_\beta$) θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη κάποιων αλλαγών στη διαμόρφωση του πεπτιδίου που προκύπτουν κατά τη συμπλοκοποίηση [238]. Αναλυτικότερα, οι κυριότερες διαφορές που παρατηρούνται σε σχέση με το φάσμα του ελεύθερου πεπτιδίου εντοπίζονται στο αμιδικό



πρωτόνιο της Ile το σήμα του οποίου εμφανίζεται ως δυο διπλές κορυφές οι οποίες απέχουν λίγο μεταξύ τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 29: Χημικές μετατοπίσεις ^1H (δ , ppm) του πεπτιδικού τμήματος των συστημάτων $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: πεπτίδιο 1:2, (όπου $\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$).

		πεπτίδιο, pH = 6.0	$\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ + πεπτίδιο 1:2, pH=6.3	$\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ + πεπτίδιο 1:2, pH=6.3
Asp¹	$-\text{NH}_3^+$	*	*	*
	α	4.37	4.30	4.28 ^{επ}
	β	2.86, 2.96	2.89 ^{επ} , 2.99	2.83 ^{επ} , 2.93 ^{επ}
Asp²	α	**	**	**
	β	2.73, 2.86	2.73, 2.86	2.73, 2.83
	$-\text{NH}-$	8.71	8.62 ^{επ}	8.61 ^{επ}
Asn	α	**	**	**
	β	2.90, 2.95	2.88 ^{επ} , 2.99	2.83 ^{επ} , 2.93 ^{επ}
	$-\text{NH}-$	8.61	8.62 ^{επ}	8.61 ^{επ}
	$-\text{CONH}_2$ (cis)	7.04	7.05 ^{επ}	7.02
	$-\text{CONH}_2$ (trans)	7.75	7.74	7.73
Lys	α	4.48	4.53	4.46
	β	1.92, 2.00	1.97	1.82, 1.95
	γ	1.57	1.56	1.55
	δ	1.83	1.77	1.78
	ϵ	3.14	3.14	3.12
	$-\text{NH}-$	8.34	8.38	8.35
	$\epsilon\text{-NH}_3^+$	*	?	*
Ile	α	4.20	4.20 ^{επ}	4.22
	β	1.95	1.97	1.94
	β'	1.03	1.00	0.98
	γ	1.26, 1.54	1.30, 1.58	1.25, 1.53
	δ	0.92	0.96	0.95
	$-\text{NH}-$	7.85	7.81, 7.85	7.77, 7.84

* = δεν παρατηρείται λόγω ταχείας ανταλλαγής με το διαλύτη.

** = δεν παρατηρείται λόγω επικάλυψης με την κορυφή του H_2O .

^{επ} = επικαλύπτονται είτε με άλλες κορυφές του πεπτιδίου είτε με κορυφές της HETPP.

Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην ύπαρξη δυο σωματιδίων στα συστήματα $\text{M}(\text{II})$:πεπτίδιο ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$). Δεν αποκλείεται λοιπόν να συμβαίνει το ίδιο και στην παρούσα περίπτωση. Τέλος η ύπαρξη μιας σχετικά ευρείας κορυφής στα 7.41 ppm στο σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτίδιο η οποία δεν εμφανίζεται στο ελεύθερο πεπτίδιο θα μπορούσε να αποδοθεί είτε στην αμινομάδα της HETPP, είτε στην $\epsilon\text{-NH}_2$ της Lys. Η εμφάνισή της στο παραπάνω σύστημα πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι τα πρωτόνια αυτά βρίσκονται εντός μιας κλειστής και συμπαγούς διαμόρφωσης με αποτέλεσμα να προστατεύονται απ' το διαλύτη, η ταχύτητα ανταλλαγής τους να μικραίνει και έτσι να μπορούν να παρατηρηθούν [240]. Συμπερασματικά, απ' τα δεδομένα

που μόλις αναφέρθηκαν δεν προκύπτουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη συμπλοκοποίηση των μεταλλικών ιόντων με το πεπτιδικό τμήμα και των δυο συστημάτων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 30: Χημικές μετατοπίσεις ^1H (δ , ppm) της HETPP στα συστήματα

$\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: πεπτίδιο 1:2, (όπου $\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$).

	H-C(6')	H ₂ C(3,5')	H-C(2 α)	H ₂ C(5 β)	H ₂ C(5 α)	2'-CH ₃	4-CH ₃	2 α -CH ₃
(LH) ⁻ K ⁺ , pH=6.0	7.22	5.48	5.40	4.19	3.29	2.45	2.38	1.65
$\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$	7.14	5.51	5.39	4.21	3.32	2.54	2.37	1.67
$\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$	7.27	5.50	5.38	4.21	3.31	2.52	2.38	1.67
$\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ + πεπτίδιο 1:2. pH=6.3	<u>7.05^{επ}</u> 7.17	5.64	5.51	<u>4.20^{επ}</u> 4.32	<u>3.38</u> 3.43	2.56 <u>2.62</u>	2.48 <u>2.51</u>	<u>1.72</u> 1.78
$\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ + πεπτίδιο 1:2. pH=6.3	<u>7.32</u> 7.36	5.57	5.49- 5.53 ^{επ}	<u>4.15</u> 4.33	<u>3.34</u> 3.43	2.55 2.60	2.47	1.74- 1.76 ^{δδ}

^{επ} = δυο τετραπλές κορυφές επικαλυπτόμενες μεταξύ τους.

^{επ} = επικαλύπτονται με κορυφές που αποδίδονται στον πεπτιδικό υποκαταστάτη.

^{δδ} = δυο διπλές κορυφές επικαλυπτόμενες μεταξύ τους.

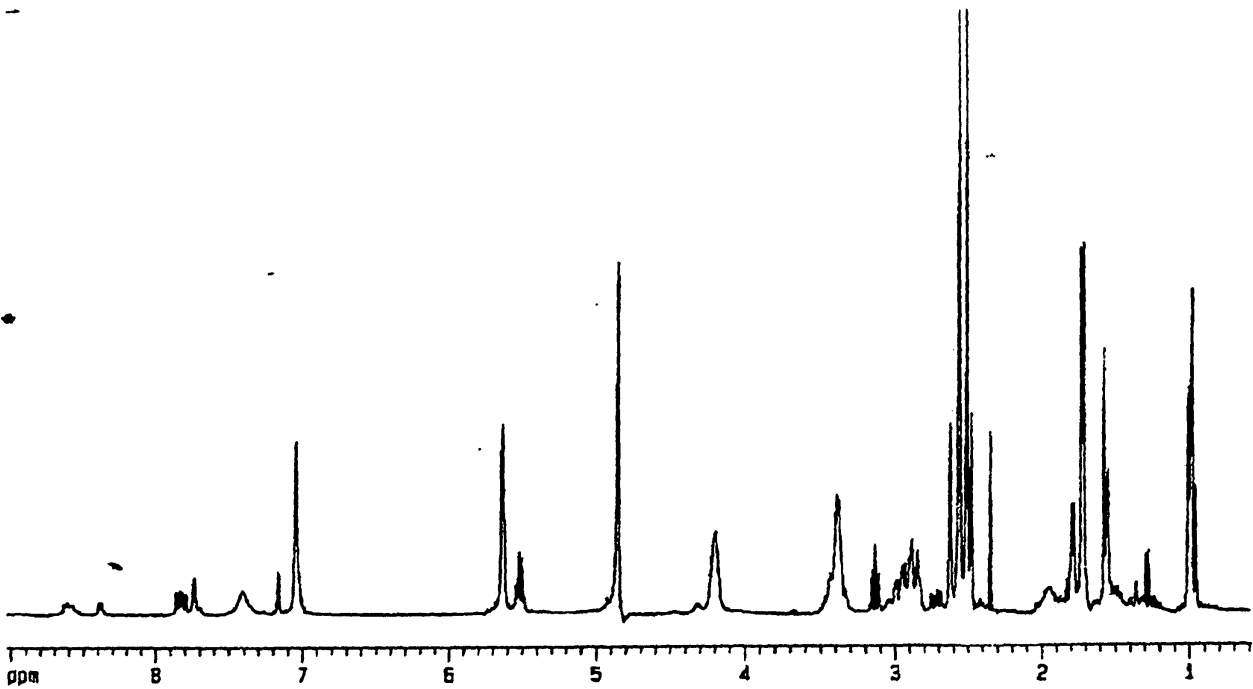
Αντιθέτως τα δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ που αφορούν την HETPP στα δυο μικτά συστήματα παρέχουν σημαντικές πληροφορίες (πίνακας 30). Η πιο σημαντική παρατήρηση είναι το γεγονός της ύπαρξης δυο σημάτων σχεδόν για κάθε πρωτόνιο της HETPP. Οι τιμές που εμφανίζονται υπογραμμισμένες στον πίνακα 30 αντιστοιχούν στις κορυφές με την μεγαλύτερη ένταση. Σε αντίθεση με τα δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ των δυο συμπλόκων της HETPP όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μετατοπίσεις, στην περίπτωση των μικτών συστημάτων παρατηρούνται μικρές μετατοπίσεις για όλες τις κορυφές. Έτσι στο σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: πεπτίδιο παρατηρούνται μετατοπίσεις κατά 0.16, 0.11, 0.11 και 0.13 ppm σε χαμηλότερα πεδία για τις κορυφές που αποδίδονται στα H₂C(3,5'), H-C(2 α), 2'-CH₃ και 4-CH₃ αντίστοιχα, ενώ η κορυφή του H-C(6') μετατοπίζεται κατά 0.17 ppm σε υψηλότερα πεδία. Στο σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: πεπτίδιο οι αντίστοιχες μετατοπίσεις είναι περίπου 0.1 ppm προς χαμηλότερα πεδία για όλα τα παραπάνω πρωτόνια συμπεριλαμβανομένου και του H-C(6') (για τις παραπάνω συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές δ των κορυφών με τη μεγαλύτερη ένταση). Βασιζόμενοι στις μετατοπίσεις κυρίως των H-C(6') και 2'-CH₃ μπορούμε να συμπεράνουμε περί πιθανής αλληλεπίδρασης του N(1') με τα μεταλλικά ιόντα. Η ύπαρξη μετατοπίσεων έστω και μικρού μεγέθους σε σχέση με τις μηδαμινές μετατοπίσεις των πρωτονίων των συμπλόκων $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$) υποδεικνύει σημαντική αλλαγή του

χημικού περιβάλλοντος γύρω απ' την HETPP και τα μεταλλικά ιόντα, γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στις χημικές μετατοπίσεις πρωτονίων μακριά απ' τις αναμενόμενες θέσεις ένταξης και κυρίως σ' αυτά που είναι εκτεθειμένα και ανήκουν σε ευκίνητες πλευρικές ομάδες (π.χ. $H_2C(3,5')$, $4-CH_3$, $H_2C(5\alpha)$, $H_2C(5\beta)$, $2\alpha-CH_3$). Η παρουσία του πεπτιδίου στα μικτά συστήματα πρέπει να είναι υπεύθυνη για τα παραπάνω φαινόμενα, υποδεικνύοντας έτσι έμμεσα την ύπαρξη μικτών συμπλόκων. Επιστρέφοντας στο ερώτημα που μπορεί να οφείλονται οι επιπλέον κορυφές μικρής ένταξης που παρατηρούνται στα φάσματα ^1H-NMR , μπορούμε να πιθανολογήσουμε:

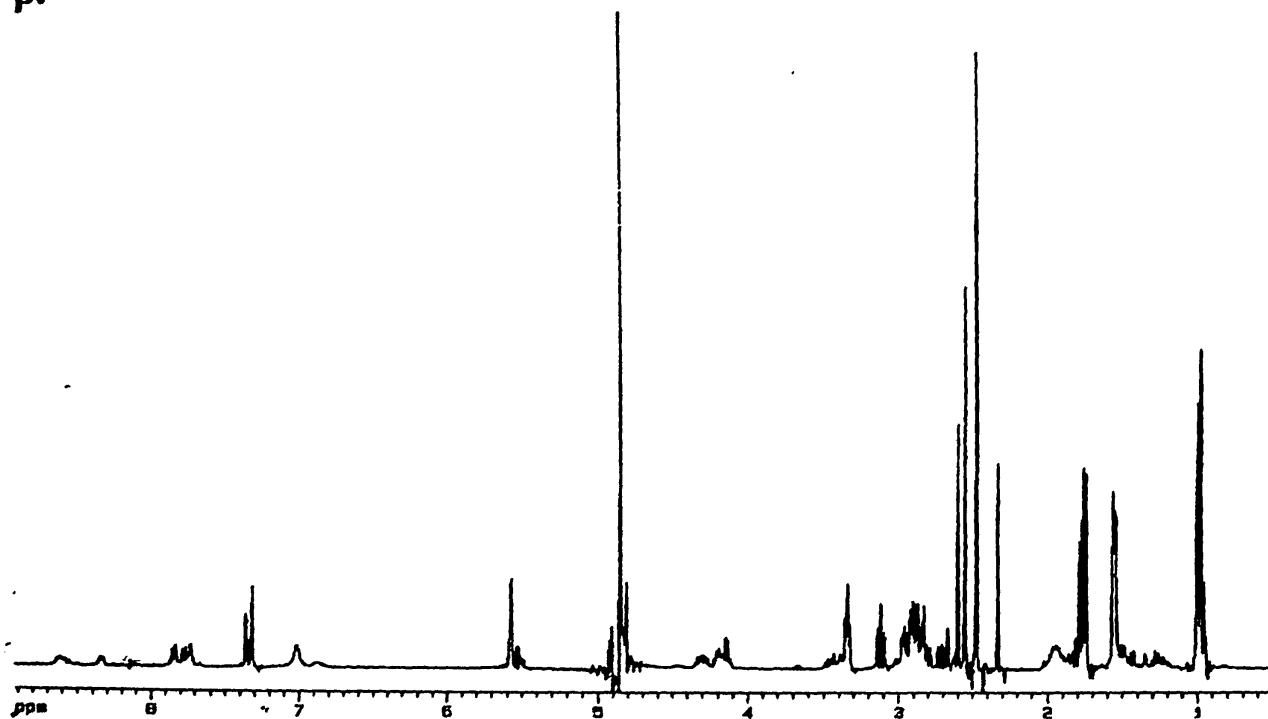
α) την ύπαρξη δυο διαφορετικών μικτών συμπλόκων και β) τη μη στοιχειομετρική αντίδραση μεταξύ των συμπλόκων $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M= Zn, Cd$) και του πεπτιδίου έτσι ώστε να περισσεύει κάποια ποσότητα συμπλόκου. Στην τελευταία όμως περίπτωση θα έπρεπε να εμφανιστούν κορυφές που θα οφείλονταν και στο ελεύθερο πεπτίδιο γεγονός που δεν παρατηρήθηκε. Απ' την άλλη μερική διάσπαση της πυροφωσφορικής ομάδας της HETPP στα μικτά σύμπλοκα (όπως αυτή προκύπτει απ' τα φάσματα $^{31}P-NMR$) θα μπορούσε να οδηγεί στην ύπαρξη δυο διαφορετικών μικτών συμπλόκων, ερμηνεύοντας έτσι τις επιπλέον κορυφές που παρατηρούνται στα φάσματα ^1H-NMR .



α.

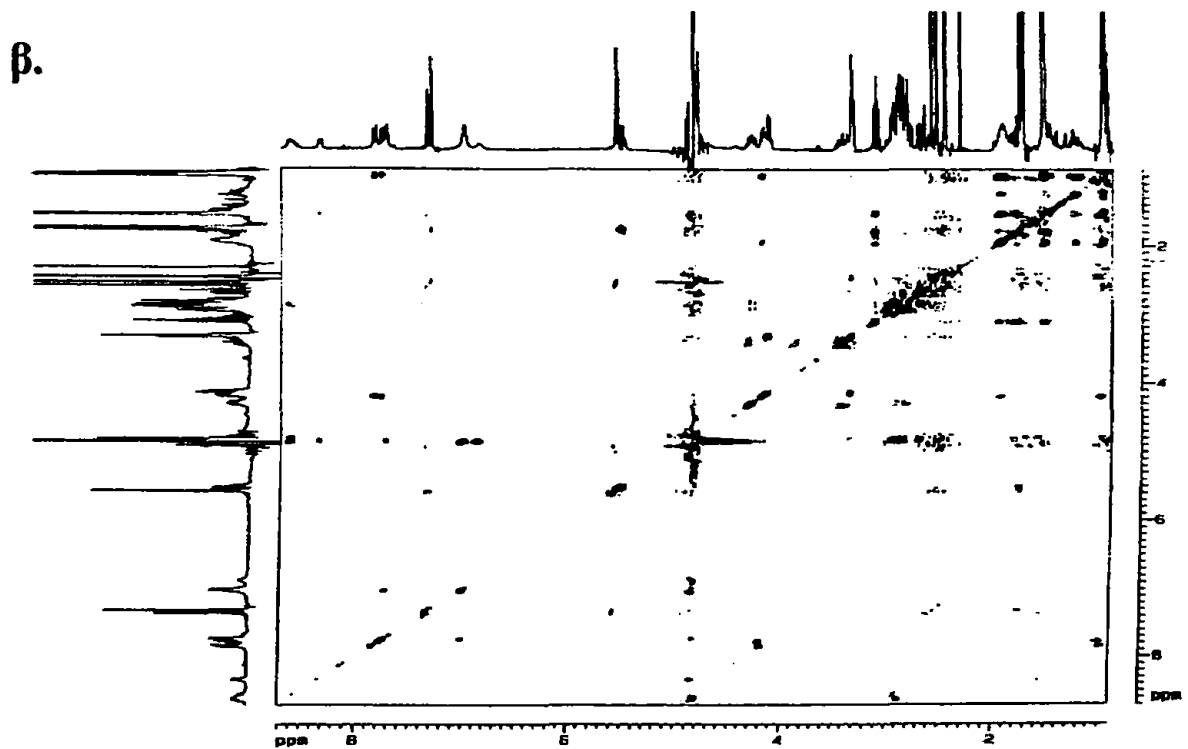
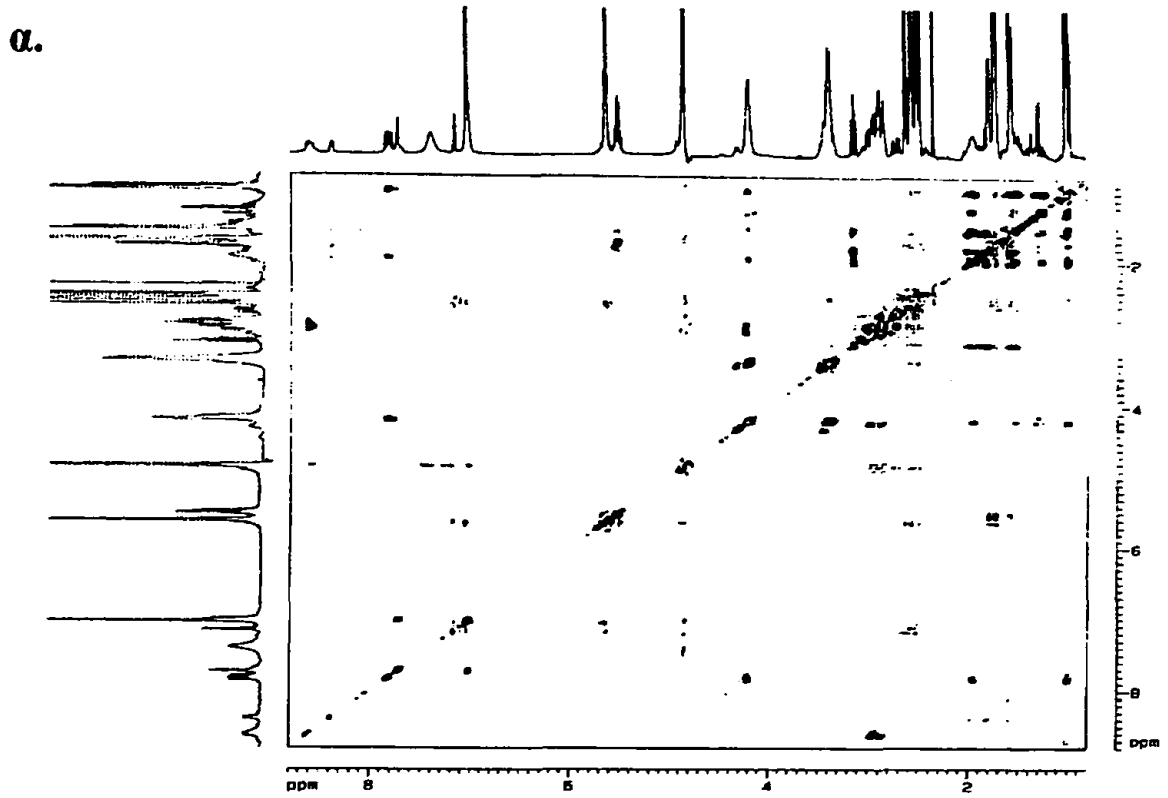


β.



Σχήμα 123: Φάσματα ¹H-NMR των συστημάτων $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$: πεπτίδιο 1:2 σε διάλυμα $D_2O:H_2O$ 1:4 σε pH=6.3 α) M=Zn β) M=Cd.





Σχήμα 124: Φάσματα ^1H - ^1H TOCSY NMR των συστημάτων $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο 1:2 σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4, σε $\text{pH}=6.3$ α) $\text{M}=\text{Zn}$ β) $\text{M}=\text{Cd}$.

III. ^{13}C -NMR.

Τα δεδομένα ^{13}C -NMR παρείχαν σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά τις θέσεις ένταξης των μεταλλικών ιόντων με τους δυο υποκαταστάτες. Λόγω του μεγάλου μεγέθους των μελετούμενων συστημάτων που έχει σαν αποτέλεσμα την γειννίαση ή και την επικάλυψη πολλών κορυφών, κρίθηκε αναγκαία και η καταγραφή των φασμάτων ^1H - ^{13}C HMQC και ^1H - ^{13}C HMBC NMR. Τα τελευταία ειδικά βοήθησαν πολύ στην αναγνώριση και ταυτοποίηση των καρβονυλικών και καρβοξυλικών ατόμων άνθρακα. Τα δεδομένα απ' την επεξεργασία των φασμάτων δίνονται στους πίνακες 31 και 32 ενώ χαρακτηριστικά 1D και 2D φάσματα παρουσιάζονται στα σχήματα 125 έως 127.

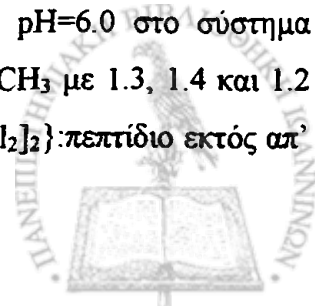
Έτσι για το σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: πεπτιδίο παρατηρούνται μετατοπίσεις κατά 1.0, 2.9 και 0.6 ppm προς χαμηλότερα πεδία για τις τιμές δ των ατόμων $\text{Asp}^1\text{C}_\beta$, Asp^1CO και AsnCO αντίστοιχα, ενώ το σήμα που οφείλεται στον Asp^1COO^- δεν εμφανίζεται. Στο σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: πεπτιδίο οι αντίστοιχες μετατοπίσεις είναι 0.85, 1.65 και 0.79 ppm προς χαμηλότερα πεδία για τα άτομα $\text{Asp}^1\text{C}_\beta$, Asp^1CO και Asp^1COO^- ενώ ο AsnCO μετατοπίζεται κατά 0.54 ppm προς υψηλότερα πεδία. Μικρότερες μετατοπίσεις προς υψηλά ή χαμηλά πεδία παρατηρούνται και για τα υπόλοιπα άτομα άνθρακα και των δυο συστημάτων, υποδεικνύοντας ότι το πεπτιδίο παρουσία των ιόντων υιοθετεί μια πιο κλειστή και άκαμπτη διαμόρφωση [237]. Η απουσία σημαντικής μετατόπισης του ατόμου $\text{Asp}^1\text{C}_\alpha$ (< 0.2 ppm) και στα δυο συστήματα ενισχύει την άποψη ότι η N-τελική αμινομάδα είναι πρωτονιωμένη. Όπως ακριβώς και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης των $\text{Cd}(\text{II})$ και $\text{Zn}(\text{II})$ με το πενταπεπτιδίο έτσι και εδώ παρατηρούνται δυο κορυφές για τον καρβονυλικό άνθρακα της Lys οι οποίες απέχουν 1.3-1.4 ppm μεταξύ τους. Η τιμή δ για τη μια απ' αυτές πλησιάζει την αντίστοιχη τιμή για το ελεύθερο πεπτιδίο σε $\text{pH}=6.0$, ενώ η άλλη παρουσιάζεται μετατοπισμένη κατά 1.2 ppm περίπου προς υψηλότερα πεδία. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και ακολουθώντας τη συλλογιστική πορεία που αναπτύχθηκε στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης των $\text{Zn}(\text{II}), \text{Cd}(\text{II})/\text{πεπτιδίου}$ προτείνουμε την ύπαρξη δυο σωματιδίων στο διάλυμα. Έτσι η σφαίρα ένταξης των δυο ιόντων καλύπτεται απ' τα Asp^1COO^- , Asp^1CO , AsnCO ενώ την τέταρτη θέση καταλαμβάνει είτε το LysCO είτε ένα μόριο H_2O . Η ύπαρξη δυο ισοϋψών κορυφών για το αμιδικό πρωτόνιο της Ile στο φάσμα ^1H -NMR αποτελεί εξάλλου μια ισχυρή ένδειξη διαμορφωτικών αλλαγών στο τμήμα $-\text{Lys-Ile}$ του πεπτιδίου οι οποίες θα μπορούσαν να οφείλονται στη συμπλοκοποίηση ή μη του LysCO . Εδώ πρέπει να τονισθεί η συμμετοχή μόνο καρβονυλικών και καρβοξυλικών πεπτιδικών οξυγόνων στη σφαίρα ένταξης των μεταλλικών ιόντων όπως ακριβώς και στην γTK , όπου μοντέλο του ενεργού της κέντρου αποτελεί το παρόν σύστημα (σχήμα 46, σελίδα 69).

ΠΙΝΑΚΑΣ 31: Χημικές μετατοπίσεις ^{13}C (δ , ppm) του πεπτιδικού τμήματος των συστημάτων $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο 1:2, (όπου $\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$).

		πεπτιδίο, pH = 6.0	$\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ + πεπτιδίο 1:2, pH=6.3	$\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ + πεπτιδίο 1:2, pH=6.3
Asp¹	C_α	53.38	53.21	53.55
	C_β	39.87	40.86	40.72
	$\text{C}=\text{O}$	172.46	175.39 ^{επ}	174.11
	COO^-	178.64	---	179.43
Asp²	C_α	54.47	54.62	54.58
	C_β	41.20	41.22	41.11
	$\text{C}=\text{O}$	175.60	175.39 ^{επ}	175.56
	COO^-	180.09	180.10	180.24
Asn	C_α	53.53	53.47, 53.64	53.65
	C_β	38.86	39.07	38.98
	$\text{C}=\text{O}$	174.75	175.39 ^{επ}	174.21
	CONH_2	177.19	---	177.31, 177.63
Lys	C_α	56.32	56.51	56.49
	C_β	32.94, 33.02	32.97, 33.10	32.98, 33.06
	C_γ	24.61	24.66	24.63
	C_δ	28.88	29.02	29.00
	C_ϵ	42.01	42.22	42.21
	$\text{C}=\text{O}$	175.32	174.10, 175.47	174.11, 175.56
Ile	C_α	62.88	62.88	62.88
	C_β	39.59	39.60, 39.72	39.58, 39.69
	C_β'	18.02	18.09	18.03
	C_γ	27.32	27.34	27.03, 27.32
	C_δ	13.44	13.52, 13.59	13.48, 13.55
	COO^-	181.08	181.07	181.38

^{επ} = επικαλύπτονται με άλλες κορυφές του πεπτιδίου.

Περνώντας τώρα στα φασματοσκοπικά δεδομένα που αφορούν την ΗΕΤΡΡ (πίνακας 32), οι κυριότερες διαφορές σε σχέση με την ελεύθερη ΗΕΤΡΡ σε pH=6.0 στο σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο εντοπίζονται στα άτομα $\text{C}(2')$, $\text{C}(6')$ και $2'\text{-CH}_3$ με 1.3, 1.4 και 1.2 ppm αντίστοιχα προς χαμηλότερα πεδία. Για το σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο εκτός απ'



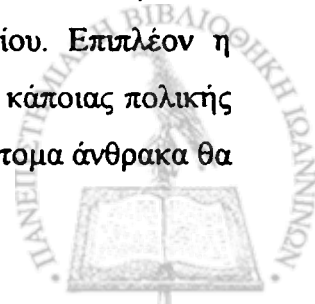
τις μετατοπίσεις των C(2'), C(6') και 2'-CH₃ της τάξης των 1.1, 1.8 και 0.8 ppm αντίστοιχα προς χαμηλότερα πεδία, παρατηρείται και μετατόπιση του C(5β) κατά 1.8 ppm προς υψηλότερα πεδία. Και στα δυο συστήματα τέλος εμφανίζονται δυο κορυφές για τα περισσότερα άτομα άνθρακα ενώ αυτές με τη μεγαλύτερη ένταση, στον πίνακα 32, παρουσιάζονται υπογραμμισμένες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 32: Χημικές μετατοπίσεις ¹³C (δ, ppm) της HETPP στα συστήματα

$K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$: πεπτιδίο 1:2, (όπου M= Zn, Cd).

	(LH)K ⁻ pH=6.0	$K_2\{[Zn(LH)Cl_2]_2\}$	$K_2\{[Cd(LH)Cl_2]_2\}$	$K_2\{[Zn(LH)Cl_2]_2\}$ + πεπτιδίο 1:2, pH=6.3	$K_2\{[Cd(LH)Cl_2]_2\}$ + πεπτιδίο 1:2, pH=6.3
C(2)	181.3	181.5	181.4	<u>181.4</u> , 181.6	<u>180.9</u> , 180.7
C(2')	168.7	167.2	167.1	170.0	<u>169.8</u> , 170.0
C(4')	163.5	164.0	163.7	163.3	163.1
C(4)	147.1	147.2	147.4	<u>147.1</u> , 147.3	<u>146.5</u> , 147.3
C(6')	149.7	145.6	147.2	151.1	152.4, <u>152.5</u>
C(5)	136.4	136.2	136.3	<u>136.7</u> , 136.0	<u>136.6</u> , 136.0
C(5')	110.5	111.0	110.7	110.7	110.1
C(2α)	67.4	67.2	67.2	67.4	<u>67.3</u> , 67.4
C(5β)	67.5, 67.4	67.9, 67.9	67.8, 67.9	<u>67.1</u> , 67.4	<u>65.7</u> , <u>65.8</u> , 68.0
C(3,5')	50.0	49.6	49.6	49.9	49.9
C(5α)	30.4, 30.5	30.2, 30.2	30.1, 30.2	<u>30.0</u> , 30.3d	<u>30.0</u> , 30.6d
2α-CH ₃	24.7	24.6	24.5	<u>24.9</u> , 24.8	24.9
2'-CH ₃	25.7	24.9	25.3	26.9	26.5
4-CH ₃	14.1	14.0	13.9	14.1	13.9

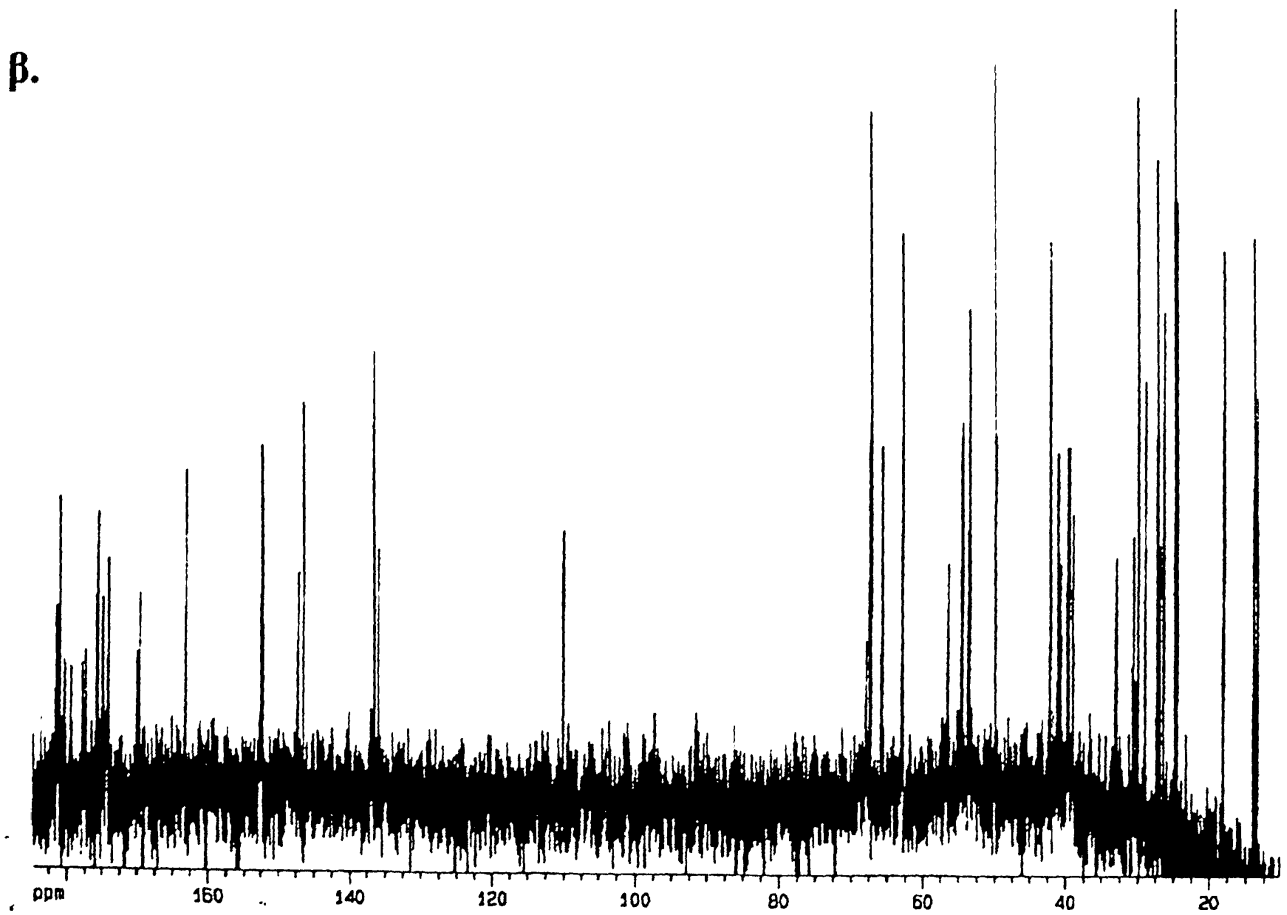
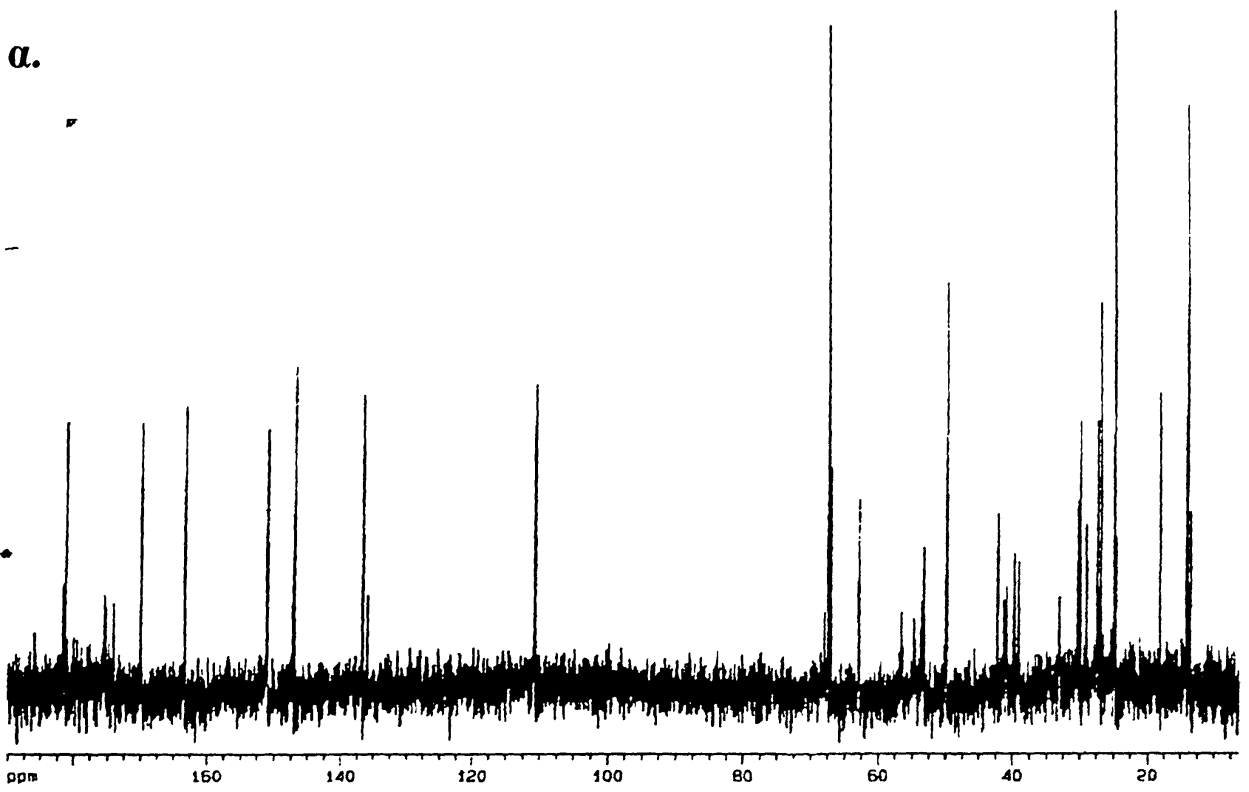
Συγκρίνοντας τα παραπάνω δεδομένα των μικτών συστημάτων με τα αντίστοιχα των απλών συμπλόκων $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ (M= Zn, Cd) διαπιστώνεται ότι για τους άνθρακες C(2'), C(6') και 2'-CH₃ παρουσιάζονται γενικά μετατοπίσεις μικρότερου μεγέθους προς χαμηλότερα όμως πεδία σε σχέση με τις μεγαλύτερου μεγέθους μετατοπίσεις προς υψηλότερα όμως πεδία των συμπλόκων. Απ' τα παραπάνω προκύπτει η συμμετοχή του N(1') στη σφαίρα ένταξης των ιόντων, ενώ οι διαφορές κατεύθυνσης κυρίως των χημικών μετατοπίσεων μπορούν να αποδοθούν στην αλλαγή του χημικού περιβάλλοντος τόσο γύρω απ' τα ιόντα, όσο και γύρω απ' τους συγκεκριμένους πυρήνες, ως αποτέλεσμα της παρουσίας του πεπτιδίου. Επιπλέον η μετατόπιση της τιμής δ του C(5β) μπορεί να αποτελεί ένδειξη της γειτνίασης κάποιας πολικής ομάδας στο άτομο αυτό. Τέλος η παρουσία δυο κορυφών για τα περισσότερα άτομα άνθρακα θα



μπορούσε να οφείλεται στην ύπαρξη δυο μικτών σωματιδίων για κάθε σύστημα, όπως συζητήθηκε στα $^1\text{H-NMR}$ φάσματα και όπως προκύπτει απ' τις μελέτες $^{31}\text{P-NMR}$ που ακολουθούν.

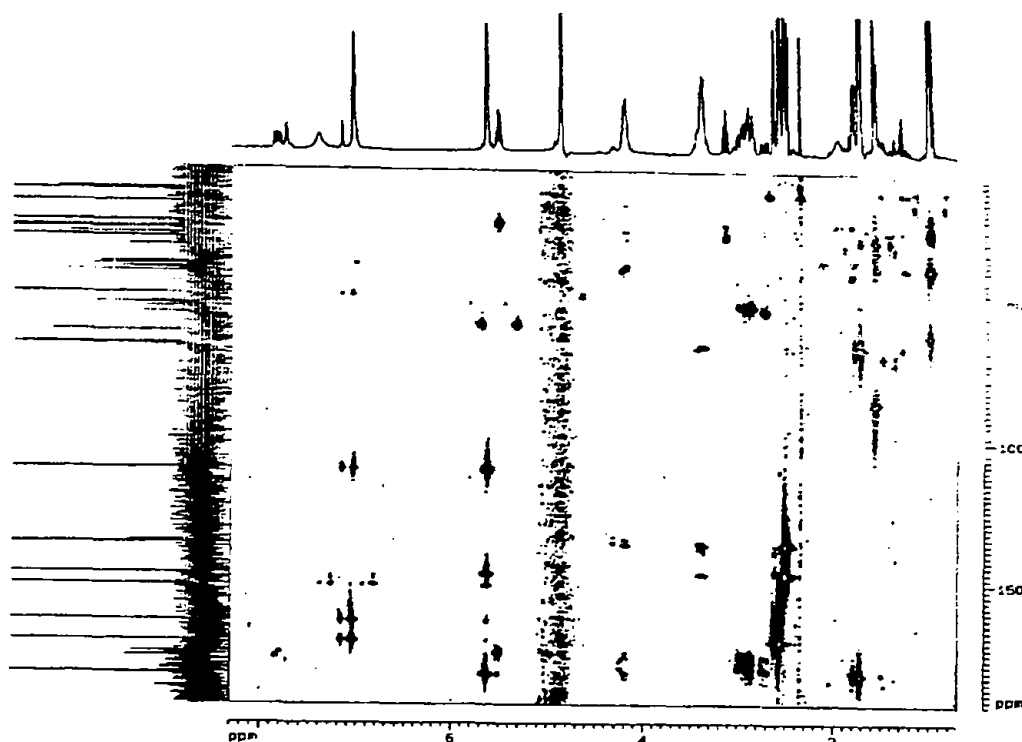
[The following text is extremely faint and illegible due to the quality of the scan. It appears to be a continuation of the scientific discussion.]



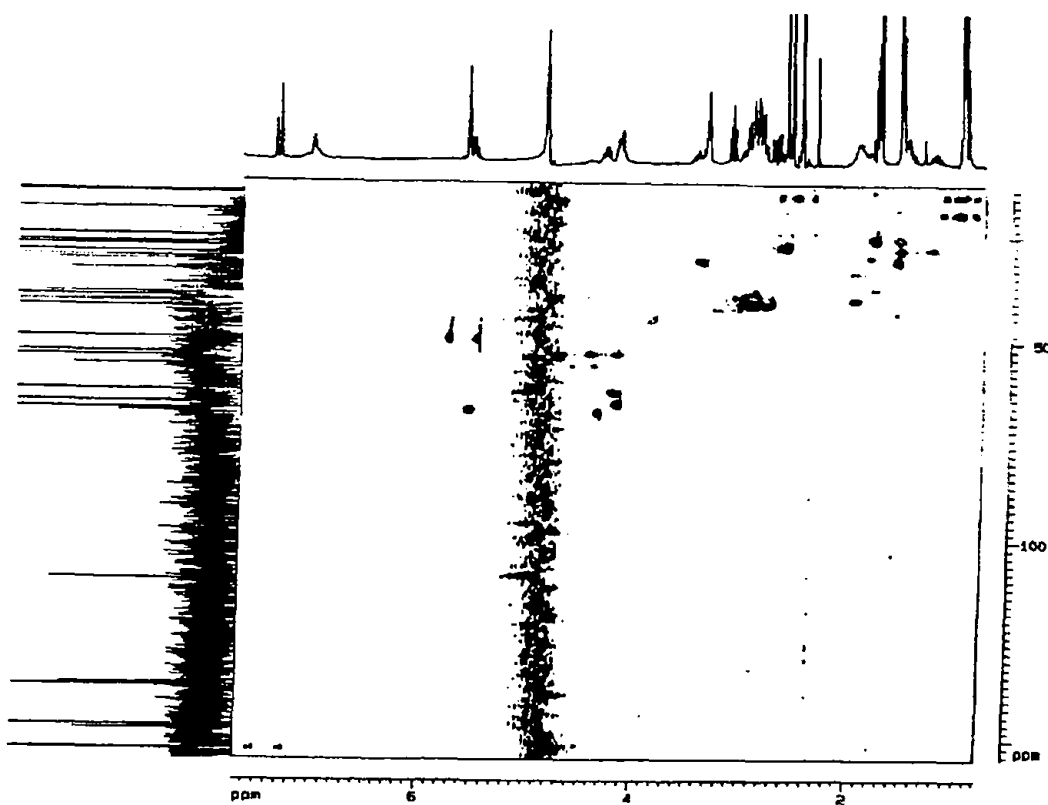


Σχήμα 125: Φάσματα ^{13}C -NMR των συστημάτων $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: πεπτιδίο 1:2 σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4 σε $\text{pH}=6.3$ α) $\text{M}=\text{Zn}$ β) $\text{M}=\text{Cd}$.





Σχήμα 126: Φάσμα ^1H - ^{13}C HMBC NMR για το σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: πεπτιδίο 1:2 σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4, σε $\text{pH}=6.3$.



Σχήμα 127: Φάσμα ^1H - ^{13}C HMQC NMR για το σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4, σε $\text{pH}=6.3$.



IV. ^{31}P -NMR.

Σε μια προσπάθεια να διαπιστώσουμε τη συμμετοχή ή μη της πυροφωσφορικής ομάδας στη σφαίρα ένταξης των μεταλλοϊόντων καταγράψαμε τα φάσματα ^{31}P -NMR (σχήμα 128) των μικτών συστημάτων. Τα δεδομένα που προέκυψαν παρατίθενται στον πίνακα 33.

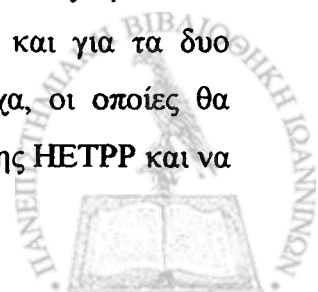
ΠΙΝΑΚΑΣ 33: Χημικές μετατοπίσεις ^{31}P (δ , ppm) της HETPP στα συστήματα $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο 1:2, (όπου $\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$).

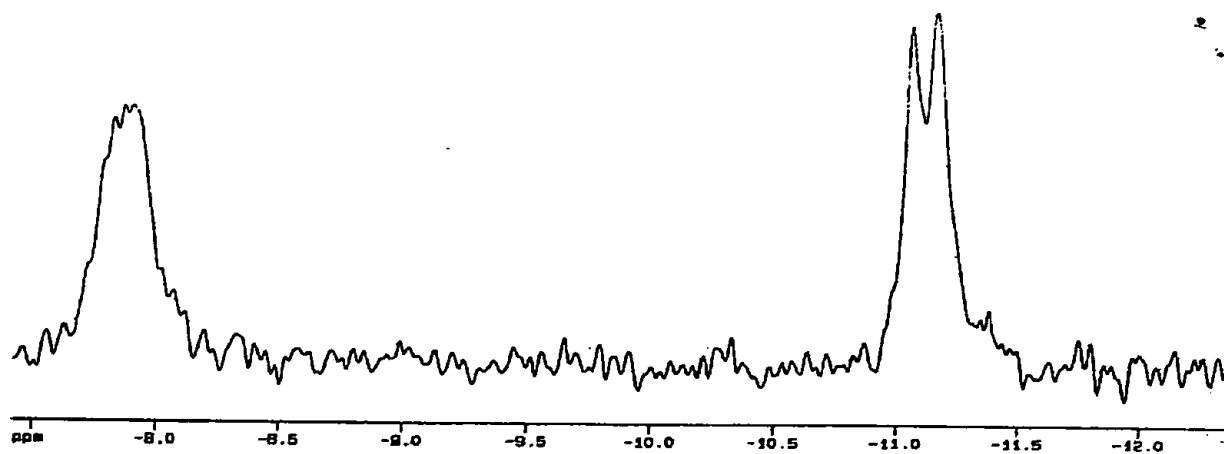
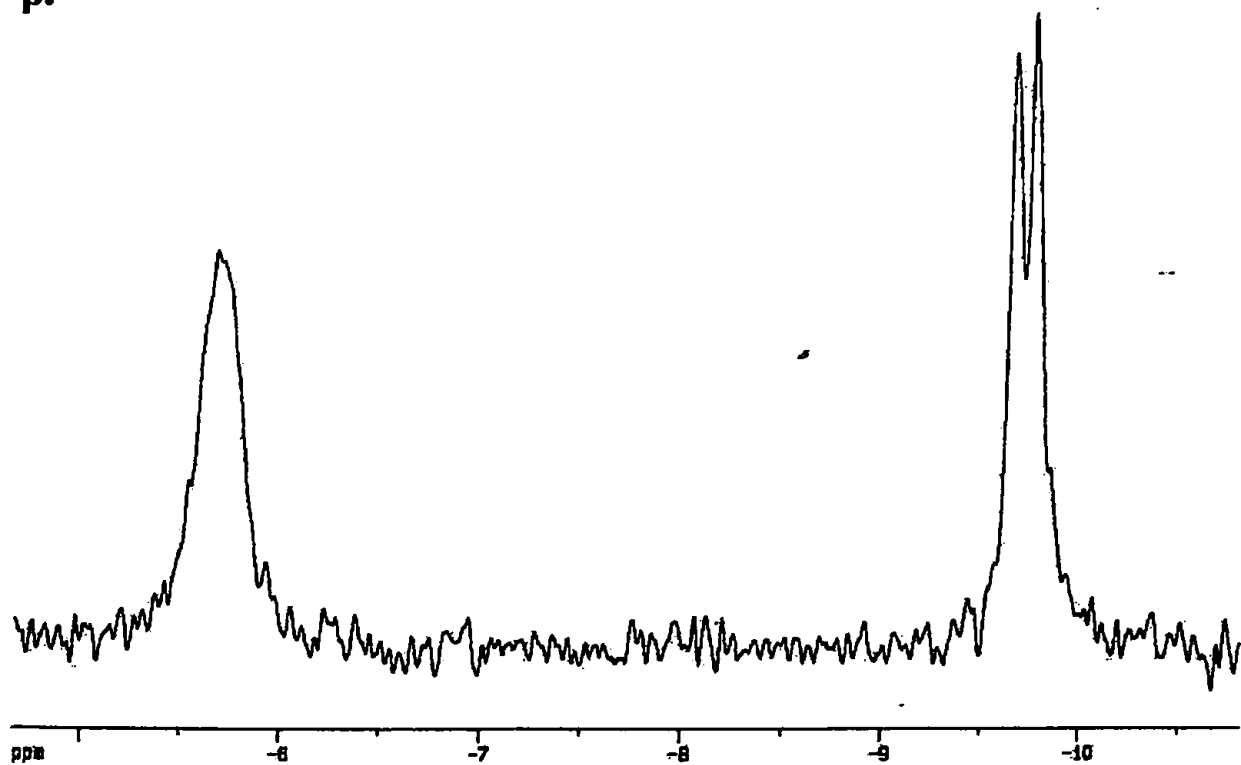
	P_α	P_β	$\Delta\delta_{\text{P}_\alpha}$ *	$\Delta\delta_{\text{P}_\beta}$ *	$^2\text{J}_{\text{P}_\alpha-\text{P}_\beta}$
$(\text{LH})\text{K}^+$, pH=6.0	-10.6	-8.8	—	—	20.1
$\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$	-9.0	-6.0	+1.6	+2.8	16.5
$\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$	-8.3	-4.8	+2.3	+4.0	16.5
$\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\} +$ πεπτιδίο 1:2, pH=6.3	-11.1	-7.9	-0.5	+0.9	17.8
$\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\} +$ πεπτιδίο 1:2, pH=6.3	-9.7	-6.0	+0.9	+2.8	15.7

* $\Delta\delta = \delta_{\text{υποκαταστάτη}} - \delta_{\text{συμπλόκου}}$ όταν ο ελεύθερος και ο συμπλοκοποιημένος υποκαταστάτης βρίσκονται στην ίδια κατάσταση πρωτονίωσης

Παρατηρούμε ότι τιμές δ για τους P_α και P_β στο σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο μετατοπίζονται κατά 0.9 και 2.8 ppm προς χαμηλότερα πεδία αντίστοιχα, ενώ για το σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο οι τιμές δ μετατοπίζονται κατά 0.5 ppm προς υψηλότερα πεδία και 0.9 ppm προς χαμηλότερα πεδία για τους P_α και P_β αντίστοιχα (σύγκριση με τις τιμές για την ελεύθερη HETPP σε pH=6.0). Απ' τα παραπάνω δεδομένα μπορούμε να υποθέσουμε ότι το ιόν $\text{Cd}(\text{II})$ εντάσσεται με την ομάδα $\text{P}_\beta\text{-O}^-$ ενώ η ομάδα $\text{P}_\alpha\text{-O}^-$ είναι πιθανότατα ασθενώς συνδεδεμένη [222,223]. Επιπλέον η χαμηλή τιμή της $^2\text{J}_{\text{P-P}}$ (15.7 Hz) ενισχύει την άποψη για συμπλοκοποίηση της πυροφωσφορικής ομάδας [222, 225]. Απ' την άλλη το ιόν $\text{Zn}(\text{II})$ δεν εντάσσεται με την ομάδα $\text{P}_\alpha\text{-O}^-$ ενώ η ομάδα $\text{P}_\beta\text{-O}^-$ πρέπει να είναι πολύ ασθενώς συνδεδεμένη.

Συγκρίνοντας τις τιμές $\Delta\delta_{\text{P}_\alpha}$ και $\Delta\delta_{\text{P}_\beta}$ των δυο συστημάτων με τις αντίστοιχες των συμπλόκων $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$) μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η παρουσία του πεπτιδίου προκαλεί εξασθένηση των δεσμών φωσφορικών οξυγόνων-μεταλλοϊόντων αφού οι τιμές αυτές παρουσιάζονται αρκετά μειωμένες και στα δυο συστήματα. Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι παρατηρούμε μια επιπλέον κορυφή στα 2.30 και 1.00 ppm και για τα δυο συστήματα $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο, $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο αντίστοιχα, οι οποίες θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μερική διάσπαση της πυροφωσφορικής ομάδας της HETPP και να προκύπτει έτσι το μονοφωσφορικό παράγωγο.



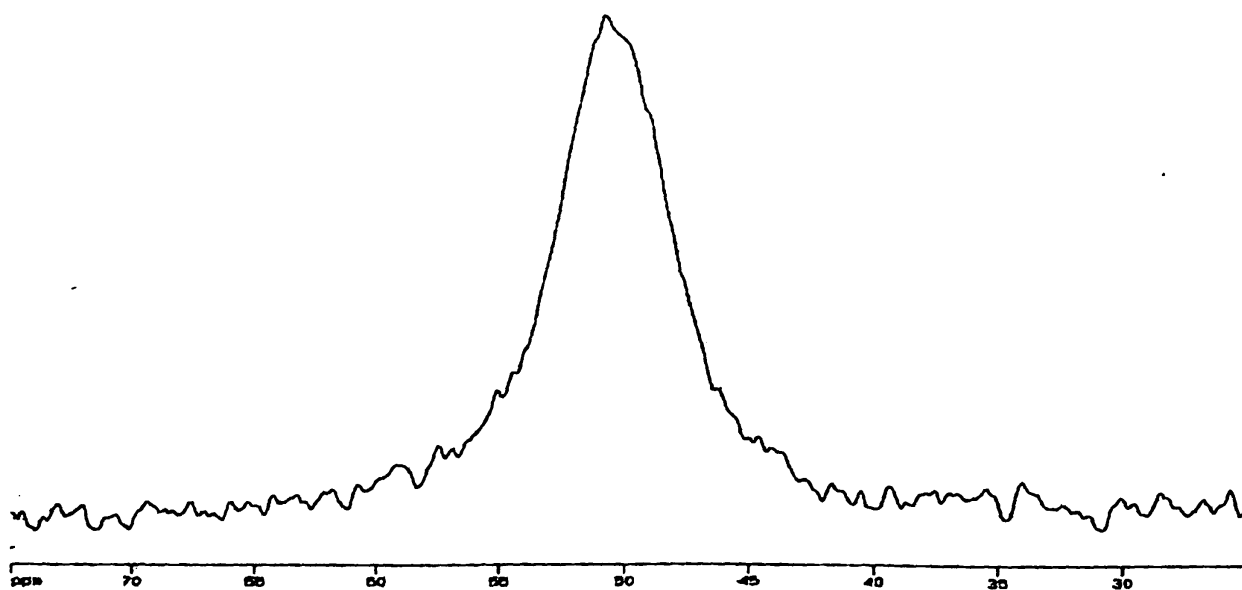
α.**β.**

Σχήμα 128: Φάσματα ^{31}P -NMR των συστημάτων $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: πεπτιδίο 1:2 σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4, σε $\text{pH}=6.3$ α) $\text{M}=\text{Zn}$ β) $\text{M}=\text{Cd}$.



V. $^{113}\text{Cd-NMR}$.

Το φάσμα $^{113}\text{Cd-NMR}$ του συστήματος $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο παρουσιάζεται στο σχήμα 129. Το σήμα εντοπίζεται στα 51.0 ppm αρκετά διευρυμένο με $\Delta\nu_{1/2} = 420 \text{ Hz}$. Η διεύρυνση αυτή που είναι σχεδόν διπλάσια απ' την αντίστοιχη του συμπλόκου Cd(II) -πενταπεπτιδίου (244 Hz), πρέπει να οφείλεται στην πολύ μικρή συμμετρία του χημικού περιβάλλοντος γύρω απ' το μεταλλικό ιόν (μεγάλη παραμόρφωση της γεωμετρίας) [243] ή/και στην ύπαρξη περισσοτέρων του ενός μικτών σωματιδίων Cd, γεγονός που δεν έρχεται σε αντίθεση με τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συζητήθηκαν πιο πάνω. Η τιμή $\delta=51.0 \text{ ppm}$ υποδεικνύει την ύπαρξη ενός τουλάχιστον ατόμου αζώτου στη σφαίρα ένταξης του Cd(II) [226]. Έτσι η αντικατάσταση σ' αυτήν ενός αλειφατικού ατόμου N, της N-τελικής αμινομάδας, από ένα αρωματικό άτομο, του N(1') πυριμιδίνης, αναμένεται να έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του σήματος του ^{113}Cd προς υψηλότερα πεδία [226]. Ο εντοπισμός επιπλέον της ανιονικής πυροφωσφορικής ομάδας στο περιβάλλον του Cd(II) προκαλεί το ίδιο φαινόμενο. Απ' την άλλη η τιμή δ για την αλκαλική φωσφατάση (άτομα δότες, 1 ιμιδαζολικό άζωτο, 2 COO^-) βρέθηκε να είναι 52 ppm [226]. Με βάση τα δεδομένα αυτά συμπεραίνουμε ότι το ιόν Cd(II) στο μικτό σύμπλοκο εντάσσεται πιθανότατα με το N(1') της πυριμιδίνης και με ανιονικούς και ουδέτερους οξυγονούχους υποκαταστάτες (COO^- , CO , $\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$).



Σχήμα 129: Φάσμα $^{113}\text{Cd-NMR}$ του συστήματος $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτιδίο 1:2 σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4, σε $\text{pH}=6.3$.



VI. Μελέτες διαμόρφωσης. Φάσματα ^1H - ^1H NOESY NMR.

Έχοντας ανιχνεύσει την ύπαρξη μικτών συμπλόκων στα οποία το πεπτιδικό τμήμα εντάσσεται περίπου όπως και στο φυσικό ένζυμο (yTK) με παράλληλη ένταξη και της HETPP, αποφασίσαμε να μελετήσουμε την διαμόρφωση της HETPP σ' αυτά. Για το λόγο αυτό καταγράψαμε τα φάσματα ^1H - ^1H NOESY NMR τα οποία και παρουσιάζονται στο σχήμα 130.

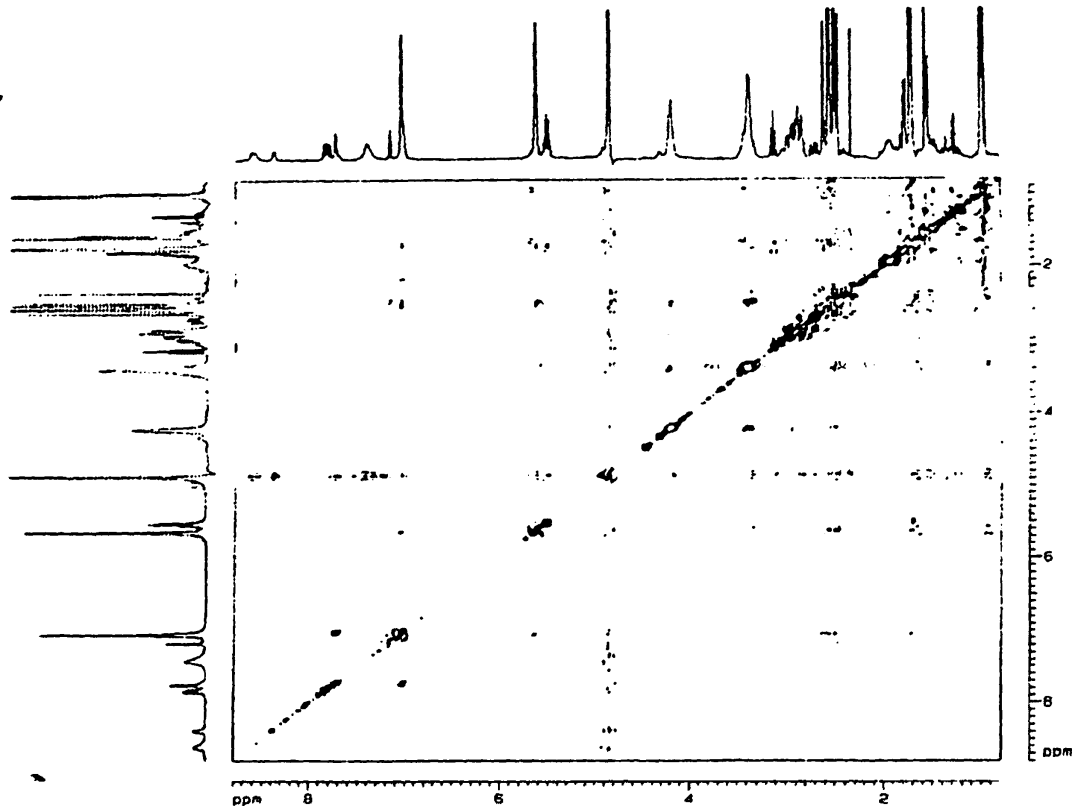
Έτσι στο σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Cd}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτίδιο οι κυριότερες κορυφές διασταύρωσης όσον αφορά την HETPP παρουσιάζονται μεταξύ των $4\text{-CH}_3/\text{H}_2\text{C}(5\alpha)$, $\text{H-C}(6')/4\text{-CH}_3$ και $\text{H-C}(6')/\text{H-C}(2\alpha)$. Απ' τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι το πρωτόνιο $\text{H-C}(6')$ κατευθύνεται προς το $\text{N}(3)$ του θειαζολικού δακτυλίου, ένα χαρακτηριστικό δομικό γνώρισμα της S-διαμόρφωσης [58]. Η ύπαρξη της κορυφής διασταύρωσης $\text{H-C}(6')/4\text{-CH}_3$ οδηγεί επιπλέον στο συμπέρασμα ότι ο θειαζολικός δακτύλιος έχει στραφεί κατά τον ίδιο τρόπο όπως και στην κρυσταλλική δομή της HETPP (σχήμα 49, σελίδα 81). Όπως έχουμε σημειώσει ίδιες αλληλεπιδράσεις παρατηρήθηκαν και στα σύμπλοκα $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$), γεγονός που υποδεικνύει ότι και στην παρούσα περίπτωση η HETPP εντάσσεται στο μεταλλοϊόν με τον ίδιο τρόπο διατηρώντας την S-διαμόρφωση.

Όσον αφορά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πεπτιδίου και HETPP παρατηρούνται κορυφές διασταύρωσης μεταξύ των $\text{CH}_2(\beta)$ των $\text{Asp}^1, \text{Asp}^2$ και Asn του πεπτιδίου με τα $\text{H}_2\text{C}(5\alpha)$ και $\text{H}_2\text{C}(5\beta)$ της θειαμίνης, τα $(\text{CH}_2)\epsilon$ της Lys με το $2\alpha\text{-CH}_3$ της HETPP, τα $\text{CH}(\beta)$, $\text{CH}_3(\delta)$ της Ile με τα 4-CH_3 και $2\alpha\text{-CH}_3$ της HETPP, τα $\text{CH}_2(\beta)$ του Asp^1 με το $\text{H-C}(6')$ και τέλος τα $(\text{CH}_2)\gamma$ της Lys με το $\text{H-C}(6')$. Τα παραπάνω δεδομένα ενισχύουν την πρόταση μας περί ένταξης τόσο του πεπτιδίου όσο και της πυριμιδίνης και της πυροφωσφορικής ομάδας της θειαμίνης, λόγω ακριβώς της προσέγγισης των παραπάνω ομάδων που δικαιολογείται μόνο σαν αποτέλεσμα της συμπλοκοποίησης. Επιπλέον αποδεικνύεται η γειτνίαση πολικών ομάδων του πεπτιδίου όπως Ile COO^- , $\text{Asp}^{1,2} \text{COO}^-$ με πρωτόνια της HETPP όπως 4-CH_3 , $\text{H}_2\text{C}(5\alpha)$ και $\text{H}_2\text{C}(5\beta)$ γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει τις παρατηρούμενες μετατοπίσεις των τιμών δ στα φάσματά τους ^1H και ^{13}C -NMR, αν και βρίσκονται μακριά απ' τις αναμενόμενες θέσεις ένταξης της HETPP.

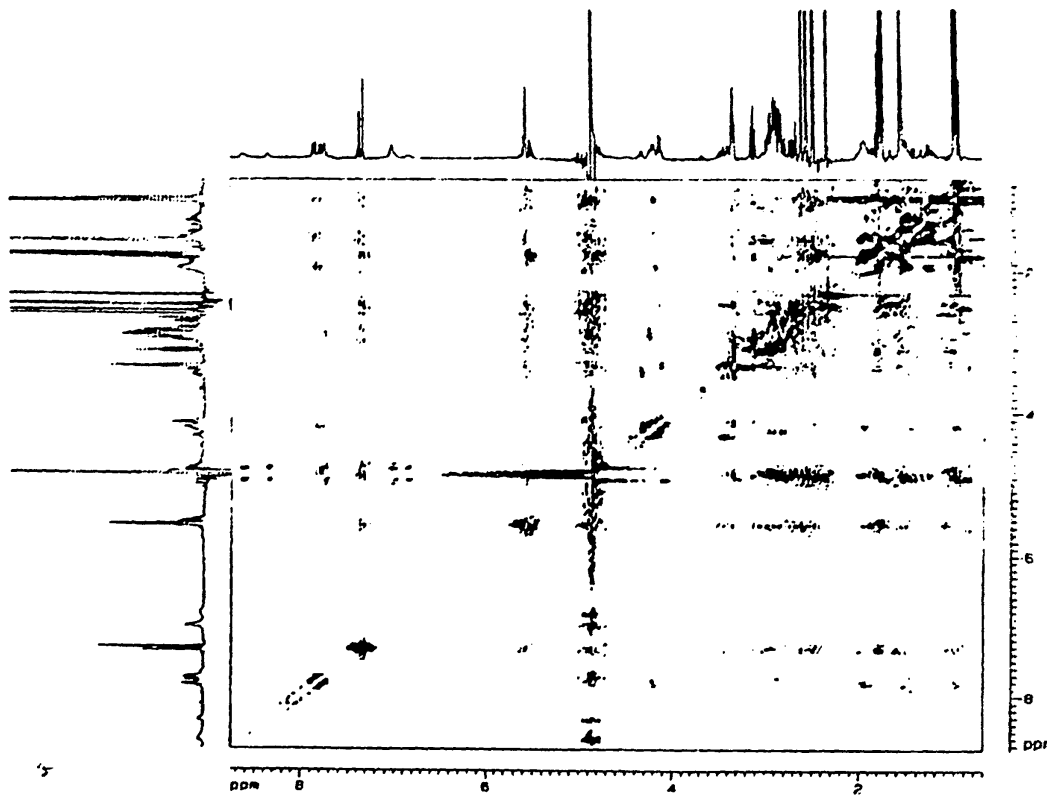
Περνώντας στο σύστημα $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$:πεπτίδιο παρατηρούνται περίπου οι ίδιες κορυφές διασταύρωσης όσον αφορά τόσο την HETPP όσο και τις αλληλεπιδράσεις πεπτιδίου/HETPP οδηγώντας ξανά στα συμπεράσματα που μόλις αναπτύχθηκαν.



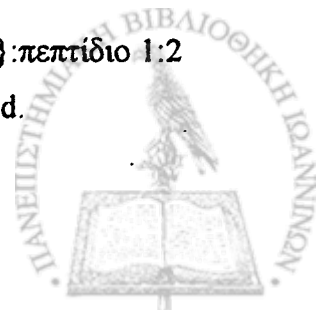
α.



β.



Σχήμα 130: Φάσματα ^1H - ^1H NOESY NMR των συστημάτων $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$: πεπτιδίο 1:2 σε διάλυμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4, σε $\text{pH}=6.3$, $T=298^\circ\text{K}$ α) $\text{M}=\text{Zn}$ β) $\text{M}=\text{Cd}$.

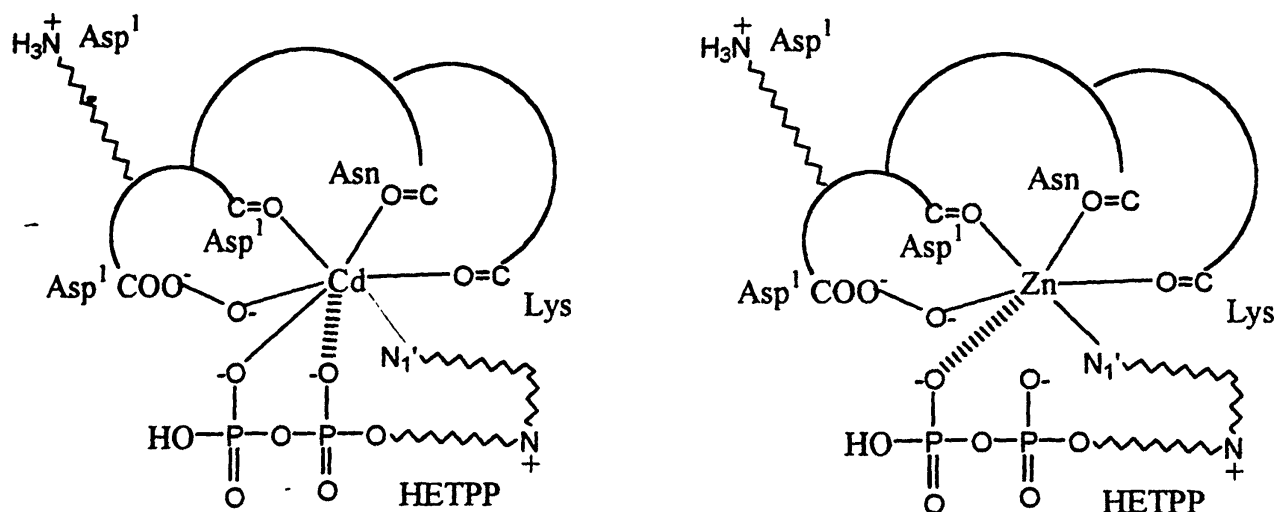


Δ. Τελικά συμπεράσματα απ' τη μελέτη των μικτών συστημάτων.

Συνοψίζοντας τα πειραματικά δεδομένα της μελέτης των μικτών συστημάτων καταλήγουμε στα εξής:

- α) Κατά την αλληλεπίδραση των συμπλόκων $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M= Zn, Cd$) με το πεπτίδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile, τα μεταλλικά ιόντα εντάσσονται με το πεπτίδιο μέσω των Asp^1COO^- , Asp^1CO , $AsnCO$ και $LysCO$, ενώ η ύπαρξη ενός άλλου σωματιδίου όπου η καρβονυλομάδα της Lys αντικαθίσταται από ένα μόριο H_2O δεν πρέπει να αποκλειστεί. Η N-τελική αμινομάδα αναμένεται να είναι πρωτονιωμένη. Η σφαίρα ένταξης των ιόντων συμπληρώνεται απ' το $N(1')$ και την ομάδα $P_{\beta}-O^-$ της HETPP. Η ομάδα $P_{\alpha}-O^-$ είτε δεν εντάσσεται (σύμπλοκο Zn) είτε είναι πολύ ασθενώς συνδεδεμένη (σύμπλοκο Cd). Πιθανές δομές των μικτών συμπλόκων δίνονται στο σχήμα 131.
- β) Διάσπαση σε κάποιο βαθμό της πυροφωσφορικής ομάδας της HETPP στα μικτά σύμπλοκα οδηγεί σε σωματίδια στα οποία συμμετέχει το μονοφωσφορικό παράγωγο του συμπαραγόνα.
- γ) Τα σχηματιζόμενα μικτά σύμπλοκα αποτελούν πολύ καλά μοντέλα του ενεργού κέντρου της γTK γύρω απ' την πυροφωσφορική ομάδα αφού τα μεταλλικά ιόντα εντάσσονται με το πεπτίδιο και την HETPP σχεδόν με τον ίδιο τρόπο όπως και στο ένζυμο. Όπως αναφέρθηκε και στο εισαγωγικό μέρος της διατριβής, το ιόν $Ca(II)$ στο ενεργό κέντρο της γTK αλληλεπιδρά με την πυροφωσφορική ομάδα της HETPP, τις παράπλευρες αλυσίδες των Asp157 και Asn187, το καρβονυλικό οξυγόνο της Ile189 και μ' ένα μόριο H_2O (σχήμα 46, σελίδα 69).
- δ) Η προσθήκη του πεπτιδίου σε διαλύματα των συμπλόκων $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M= Cd, Zn$) προκαλεί εξασθένηση σε κάποιο βαθμό της ισχύος των δεσμών M-πυροφωσφορικών οξυγόνων. Απ' την άλλη η διατήρηση του $N(1')$ στη σφαίρα ένταξης των ιόντων και στα μικτά σύμπλοκα ενισχύει την άποψή μας ότι ο ρόλος των μεταλλικών ιόντων δεν περιορίζεται ίσως μόνο στη σύνδεση ενζύμου-συνενζύμου μέσω της πυροφωσφορικής ομάδας.
- ε) Η S-διαμόρφωση της HETPP διατηρείται και στα μικτά σύμπλοκα τονίζοντας για άλλη μια φορά τη σπουδαιότητα και το σημαντικό ρόλο της κατά τη διάρκεια της ενζυμικής δράσης.





Σχήμα 131: Πιθανές δομές των μικτών συμπλόκων που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση των συμπλόκων $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M= Zn, Cd$) με το πεπτίδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.

A. ΤΑΥΤΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Η παρούσα έρευνα αφορά στην μελέτη της επίδρασης της...

Ο σκοπός της έρευνας είναι να διερευνηθεί η επίδραση της...

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ένα δείγμα...

Οι αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν ότι...

Η έρευνα αυτή αποτελεί σημαντικό βήμα στην κατανόηση...

Οι περιορισμοί της έρευνας είναι οι εξής...

Οι προτάσεις για μελλοντική έρευνα είναι οι εξής...

Η έρευνα αυτή υποστηρίζει την άποψη ότι...

Οι ευρήματα της έρευνας είναι σε συμφωνία με...

Η έρευνα αυτή αποτελεί σημαντικό βήμα στην κατανόηση...

Οι περιορισμοί της έρευνας είναι οι εξής...

Οι προτάσεις για μελλοντική έρευνα είναι οι εξής...

Η έρευνα αυτή υποστηρίζει την άποψη ότι...

Οι ευρήματα της έρευνας είναι σε συμφωνία με...



IV. Μικτά σύμπλοκα Cu(II) με την HETPP και το πεπτιδίο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.

Συνεχίζοντας τη μελέτη των μικτών συστημάτων μετάλλου-πεπτιδίου-HETPP αναφέρουμε εδώ τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης του ιόντος Cu(II) με την HETPP και το πεπτιδίο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile. Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός των σωματιδίων που σχηματίζονται είτε κατά την αλληλεπίδραση Cu(II)-πενταπεπτιδίου, είτε κατά την αλληλεπίδραση Cu(II)-HETPP-πενταπεπτιδίου έγινε κυρίως με ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις και φασματοσκοπίες ορατού και CW-EPR [245]. Εκτός των παραπάνω τεχνικών χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η φασματοσκοπία ESEEM (electron spin envelope modulation) (διαμόρφωση της ηχούς των ηλεκτρονιακών spin) η οποία έχει εφαρμοστεί για τη μελέτη συμπλόκων Cu(II) τόσο σε πρωτεΐνες όσο και σε συστήματα μοντέλων αυτών [246, 247]. Η εφαρμογή της στο παρόν σύστημα είναι αρκετά σημαντική αφού οι μέχρι σήμερα μελέτες με την τεχνική αυτή περιορίζονται σε σύμπλοκα Cu(II)-(ιστιδίνης)_n, ενώ σε άλλα συστήματα είναι πολύ περιορισμένες [248]. Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκε και η φασματοσκοπία 2D-HYSCORE (Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy) (φασματοσκοπία συσχέτισης υπέρλεπτων υποσταθμών) η οποία έχει αποδειχθεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την ανάλυση σύνθετων φασμάτων ESEEM [249-252]. Έτσι, στο πρώτο και δεύτερο τμήμα της μελέτης αυτής θα ασχοληθούμε με το χαρακτηρισμό των σωματιδίων που σχηματίζονται κατά την αλληλεπίδραση Cu(II)-πενταπεπτιδίου και Cu(II)-HETPP-πενταπεπτιδίου χρησιμοποιώντας ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις και φασματοσκοπίες ορατού και CW-EPR. Στο τρίτο και τελευταίο τμήμα θα αναφερθούμε στην εφαρμογή των φασματοσκοπιών ESEEM και 2D-HYSCORE για την απόδειξη του τρόπου ένταξης του ιόντος Cu(II) στα σωματίδια που σχηματίζονται σε φυσιολογικές τιμές pH (7.0-7.5) στα συστήματα Cu(II)-HETPP, Cu(II)-πενταπεπτιδίου και Cu(II)-HETPP-πενταπεπτιδίου. Τέλος, για τη μελέτη της διαμόρφωσης της HETPP στο μικτό σύστημα καταγράφηκε επιπλέον το φάσμα ¹H-¹H ROESY NMR σε χαμηλή θερμοκρασία (278°K).

A. Αλληλεπίδραση Cu(II) με το πεπτιδίο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.

Κατά τις ποτενσιομετρικές τιτλοδοτήσεις του παραπάνω συστήματος για [Cu(II)]=[πεπτιδίο]=4mM σε υδατικό διάλυμα, ανιχνεύθηκαν τα σωματίδια MAH, MA, MAH₁, MAH₂, MAH₃ (M=Cu(II), A= Asp-Asp-Asn-Lys-Ile). Για το χαρακτηρισμό των παραπάνω σωματιδίων καταγράφηκαν τα φάσματα ορατού και CW-EPR σε διάφορες τιμές pH. Οι ολικές σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων (logβ) καθώς και τα φασματοσκοπικά δεδομένα (λ_{max}, g_{||}, A_{||}) παρουσιάζονται στον πίνακα 34, οι καμπύλες κατανομής σωματιδίων δίνονται στο

σχήμα 132, ενώ χαρακτηριστικά φάσματα ορατού και CW-EPR δίνονται στα σχήματα 133 και 134 αντίστοιχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 34: Ολικές σταθερές σχηματισμού ($\log\beta$)^a και φασματοσκοπικά δεδομένα (ορατού, EPR) για το σύστημα Cu(II)-Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.

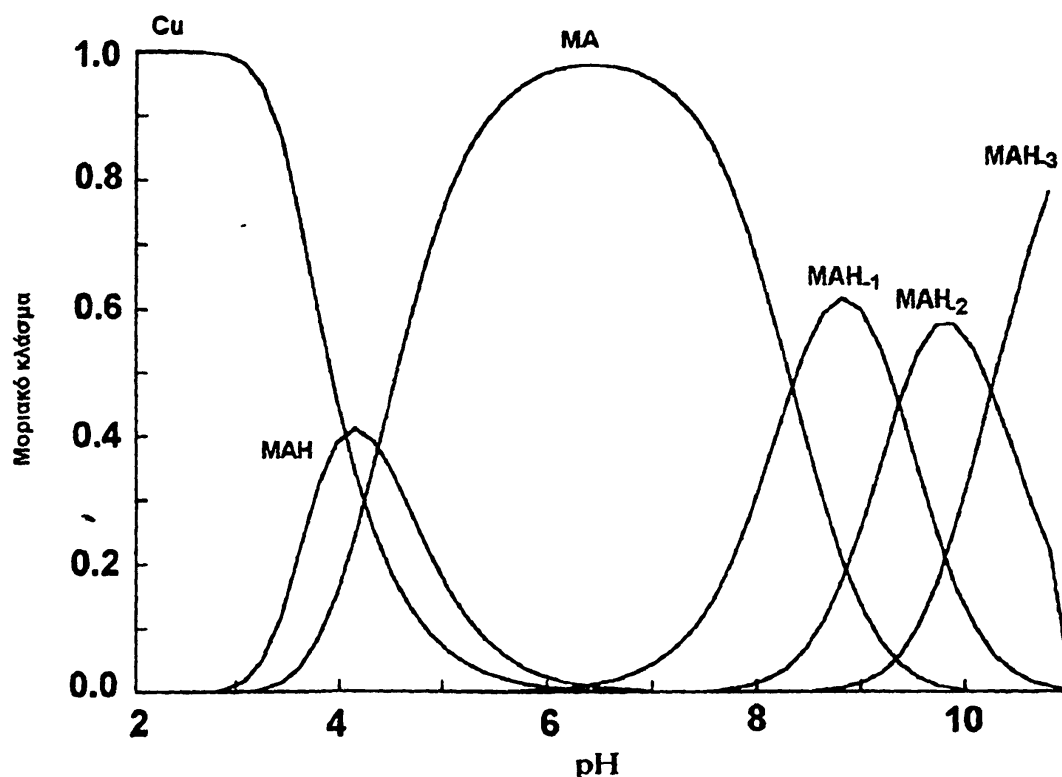
pH	επικρατών σωματίδιο	$\log\beta \pm$ (τυπ. απόκλιση $\times 10^{-2}$)	λ_{\max} (nm)	ϵ ($\text{dm}^{-3} \text{mol cm}^{-1}$)	g_{\parallel}	A_{\parallel} (G)	g_{\perp}	A_{\perp} (G)
4.6	MAH	17.07(6)	637	47	2.27	193	2.09	30
6.4	MA	12.68(4)	630	71	2.22	195	2.08	30
9.0	MAH ₁	4.32(8)	560	103	2.18	215	2.03	20
10.0	MAH ₂	-5.06(7)	529	114	2.14	229	2.00	12
11.0	MAH ₃	-15.33(8)	521	117	2.14	229	2.00	12

^a T= 298° K. I= 0.2 mol dm⁻³ (KCl). [Cu²⁺]=[πεπτιδίο]=4mM.

Μελέτες σε έναν μεγάλο αριθμό συμπλόκων Cu²⁺ με πεπτιδία έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός εμπειρικού τύπου με τον οποίο μπορούμε να προβλέψουμε το λ_{\max} στα φάσματα ορατού. Η ενέργεια των d-d μεταπτώσεων εξαρτάται απ' το είδος των ατόμων δοτών που βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο γύρω απ' το ιόν Cu(II). Η συνεισφορά άμινο ή άμιδο ατόμων αζώτου είναι μεγαλύτερη απ' την αντίστοιχη ατόμων οξυγόνου. Έτσι, αντικατάσταση ενός ατόμου οξυγόνου από άτομο αζώτου στο ισημερινό επίπεδο προκαλεί μείωση του λ_{\max} (αντικατάσταση στις αξονικές θέσεις προκαλεί μικρή αύξηση στο λ_{\max}) [227, 253-255].

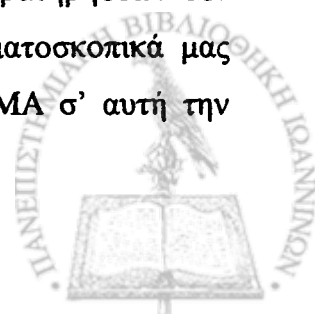
Απ' την άλλη είναι γνωστό ότι η παρουσία ασπαρτικού οξέος (Asp) στην N-τελική θέση ενός πεπτιδίου έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση ενός συμπλόκου με ένταξη μέσω της N-τελικής αμινομάδας, λόγω του σχηματισμού ενός σταθερού εξαμελούς χηλικού δακτυλίου με συμμετοχή και του β-καρβοξυλίου. Πεπτιδία που περιέχουν Asp στη 2^η ή 3^η θέση της αλληλουχίας ευνοούν τον σχηματισμό 2N ή 3N σωματιδίων (με ένταξη μέσω δυο ή τριών ατόμων αζώτου) αντίστοιχα ενώ καθυστερεί ή δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός 4N σωματιδίων. Γενικότερα, η παρουσία ασπαρτικού οξέος στην x θέση μιας πεπτιδικής αλληλουχίας παρεμποδίζει ή και αποτρέπει τελείως την αποπρωτονίωση του ατόμου N του x πεπτιδικού δεσμού έτσι ώστε δεν μπορούν να ανιχνευθούν σωματίδια με (x+1) άτομα N στη σφαίρα ένταξης του Cu(II) [256, 257]. Η σταθεροποίηση κάποιων σωματιδίων στα συστήματα Cu(II)-πεπτιδίων που περιέχουν ασπαρτικό οξύ γίνεται εμφανής απ' τις τιμές $\log\beta$ και απ' τα διαγράμματα κατανομής σωματιδίων αφού τα σύμπλοκα που σταθεροποιούνται σημαντικά έχουν μεγάλο εύρος ύπαρξης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα σωματίδια πεπτιδίων που δεν περιέχουν Asp. Ειδικότερα στην περίπτωση του πεπτιδίου Asp-Asp-Asn-Lys-Ile αναμένουμε την εύκολη αποπρωτονίωση και ένταξη του αμιδικού αζώτου μεταξύ των Asp¹ και Asp² με

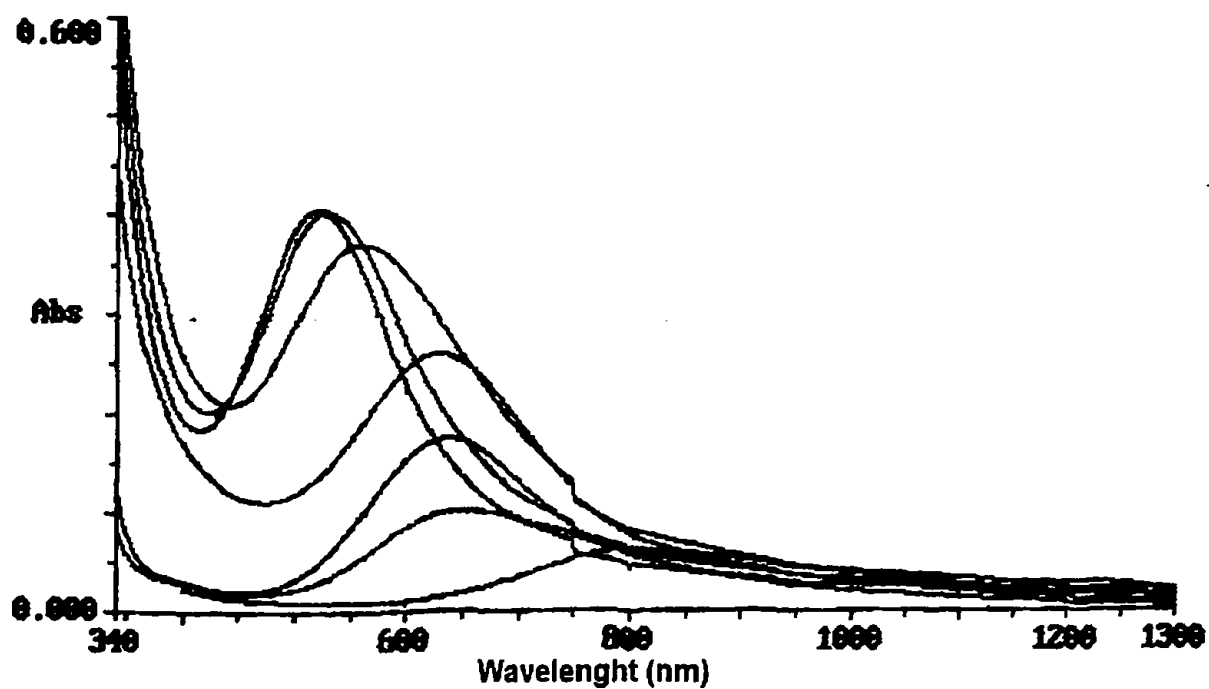
ταυτόχρονη ένταξη και των Asp^1COO^- , Asp^2COO^- ενώ η αποπρωτονίωση και ένταξη των ακόλουθων πεπτιδικών δεσμών θα πρέπει να γίνεται δυσκολότερα.



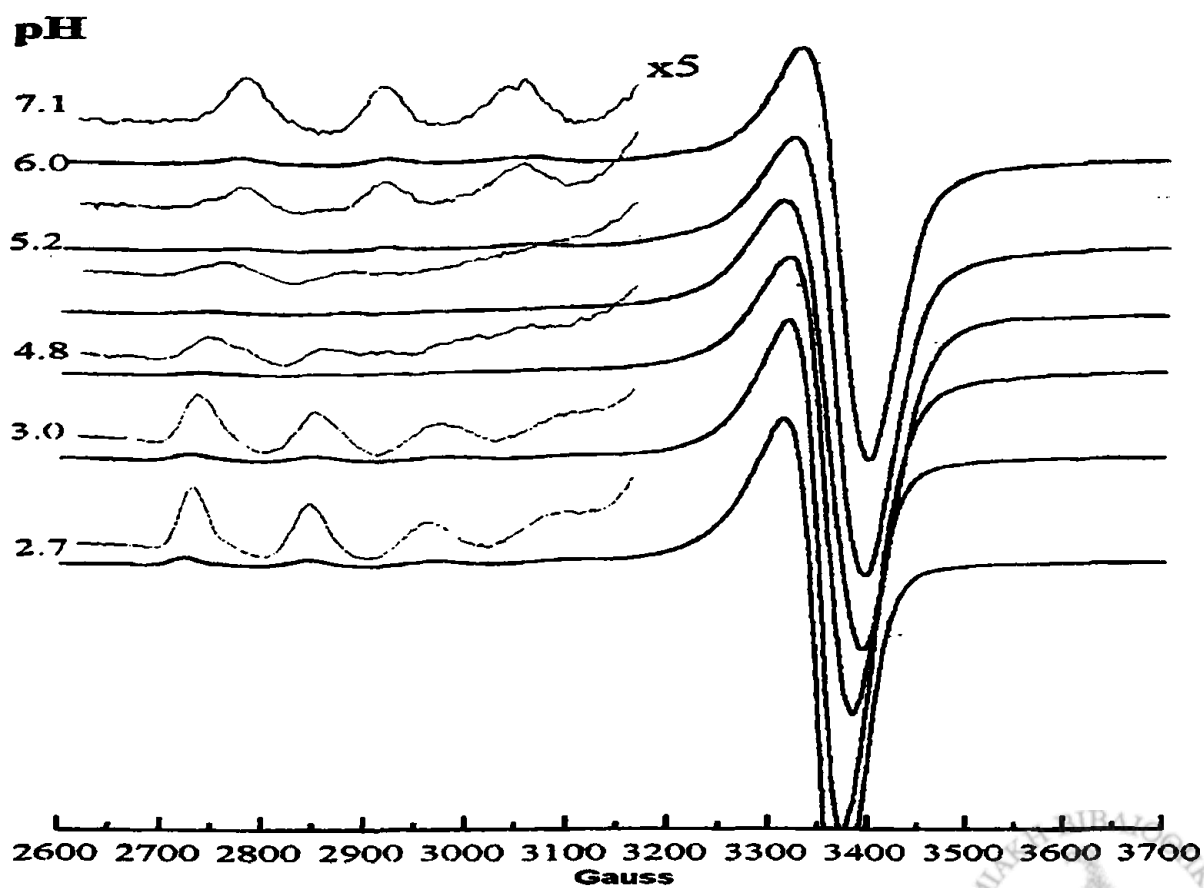
Σχήμα 132: Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του συστήματος Cu(II)-πενταπεπτιδίου (A= Asp-Asp-Asn-Lys-Ile).

Απ' το διάγραμμα του σχήματος 132 φαίνεται ότι τα σωματίδια MAH σχηματίζονται μεταξύ $\text{pH}=3.0$ και 6.0 . Για αυτά προτείνεται ότι ο Cu(II) εντάσσεται μέσω της N-τελικής αμινομάδας ($\text{Asp}^1\text{-NH}_2$) και του $\beta\text{-COOH}$ του Asp^1 σχηματίζοντας έτσι ένα σταθερό εξαμελή χηλικό δακτύλιο και πιθανόν μέσω της καρβονυλομάδας του Asp^1 (σχηματισμός ενός επιπλέον πενταμελούς χηλικού δακτυλίου). Σωματίδια με ένταξη μέσω ενός ατόμου αζώτου (1N) παρουσιάζουν $\lambda_{\text{max}}=700\text{-}730\text{ nm}$. Η ένταση της ταινίας απορρόφησης όμως είναι μικρή και συνήθως δεν παρατηρείται, ειδικά όταν η συγκέντρωση των 1N σωματιδίων είναι μικρή ή όταν είναι παρόντα και 2N σωματίδια [255]. Σαν αποτέλεσμα των παραπάνω παρατηρήσεων δεν είναι δυνατή η απόδειξη της ύπαρξης των σωματιδίων MAH απ' τα φασματοσκοπικά μας δεδομένα (πίνακας 34) λόγω κυρίως της συνύπαρξης και των σωματιδίων MA σ' αυτή την περιοχή pH.





Σχήμα 133: Φάσματα ορατού του συστήματος Cu(II)-πενταπεπτιδίου σε διάφορες τιμές pH.



Σχήμα 134: Φάσματα CW-EPR του συστήματος Cu(II)-πενταπεπτιδίου σε διάφορες τιμές pH.



Αντιθέτως, τα σωματίδια MA με ένταξη μέσω 2N κυριαρχούν στην περιοχή pH = 3.2-10.0 με μέγιστο του μοριακού τους κλάσματος (-0.96) σε pH = 6.0. Το μεγάλο εύρος ύπαρξης τους θα πρέπει να οφείλεται στην αυξημένη τους σταθερότητα. Σημαντικό αλλά μικρότερου μεγέθους εύρος έχει βρεθεί στα πεπτιδία Ala-Asp-Ala-Asp [pH= 5-9.5], Ala-Asp-Asp-Ala [pH= 5-7.3] και Asp-Asp-Asp [pH= 5-8] όσον αφορά το σωματίδιο MA [255]. Για το MA λοιπόν προτείνεται ένταξη του Cu(II) μέσω των Asp¹-NH₂, Asp¹COO⁻, Asp²COO⁻ και ενός αποπρωτονιωμένου πεπτιδικού αζώτου (N') (πεπτιδικός δεσμός μεταξύ Asp¹ και Asp²). Η τιμή pK_a για αυτή την αποπρωτονίωση βρέθηκε 4.55 στο παρόν σύστημα και είναι συγκρίσιμη με την τιμή pK_a= 4.8 για το σύστημα Asp-Asp-Asp-Cu(II) αποδεικνύοντας έτσι τον εύκολο σχηματισμό και τη μεγάλη σταθερότητα των σωματιδίων MA. Τόσο η τιμή λ_{max} όσο και οι παράμετροι EPR (πίνακας 34) συνηγορούν υπέρ του τύπου ένταξης που προτάθηκε. Για σωματίδια με παρόμοιο τρόπο ένταξης ευρέθησαν λ_{max}= 630-652 nm, g_{||}= 2.220-2.271 και A_{||}= 152-203 G [258]. Σύγκριση με τα δεδομένα του παρόντος συστήματος για το σωματίδιο MA αποδεικνύει μια μικρή μείωση των λ_{max}, g_{||} και συνακόλουθη αύξηση του A_{||}. Οι παρατηρούμενες μεταβολές των φασματοσκοπικών παραμέτρων θα πρέπει να οφείλονται στην αύξηση της ισχύος του πεδίου των υποκαταστατών στο ισημερινό επίπεδο γύρω απ' το ιόν Cu(II), που με τη σειρά της αποδίδεται τόσο στο σχηματισμό ενός τρίτου χηλικού δακτυλίου ο οποίος σταθεροποιεί περαιτέρω το σύστημα, όσο και στο συνολικό αρνητικό φορτίο του Cu(II) και των τεσσάρων ατόμων δοτών γύρω από το ισημερινό επίπεδο. Η συσχέτιση των παραμέτρων g_{||}, A_{||} για διαφορετική κάθε φορά σφαίρα ένταξης του Cu(II) στο ισημερινό επίπεδο σε συνάρτηση με το συνολικό φορτίο του ιόντος και των τεσσάρων ατόμων δοτών έχει μελετηθεί απ' τους Peisach και Blumberg, οι οποίοι πρότειναν διαγράμματα που συσχετίζουν όλες τις παραπάνω παραμέτρους [259]. Τοποθετώντας τα φασματοσκοπικά μας δεδομένα σ' αυτά τα διαγράμματα προβλέπεται σφαίρα ένταξης 2N, 2O και συνολικό φορτίο -1 για τον Cu(II) και τα τέσσερα άτομα δότες του ισημερινού επιπέδου, σε απόλυτη συμφωνία με την προτεινόμενη σφαίρα ένταξης του Cu(II) (NH₂, N', 2COO⁻ -σχηματισμός δυο εξαμελών και ενός πενταμελούς χηλικού δακτυλίου-).

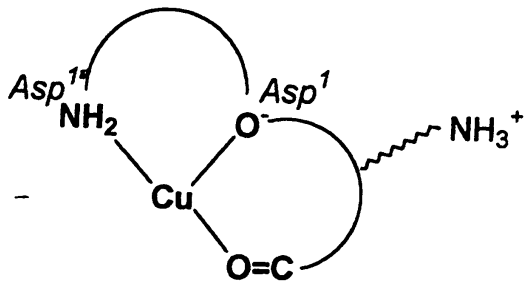
Η αποπρωτονίωση ενός δευτέρου πεπτιδικού αζώτου (pK_a= 8.32) οδηγεί στο σχηματισμό του σωματιδίου MAH₁. Η παραπάνω τιμή είναι συγκρίσιμη με την αντίστοιχη του συστήματος Asp-Asp-Asn-Cu(II) (pK_a= 8.37) για το ίδιο σωματίδιο. Οι φασματοσκοπικές παράμετροι (λ_{max}= 560 nm, g_{||}= 2.18, g_⊥= 2.03, A_{||}= 215 G, A_⊥= 20 G) υποδεικνύουν ένταξη των Asp¹-NH₂, 2N' και ενός COO⁻, ενώ απ' τα διαγράμματα των Peisach και Blumberg [259] προβλέπεται ένταξη μέσω 3N και 1O με συνολικό φορτίο -1. Συγκρίνοντας τις παραπάνω τιμές με βιβλιογραφικά δεδομένα (g_{||}= 2.20-2.24, A_{||}= 185-210 G) [255] παρουσιάζεται μια μικρή

μείωση στην τιμή του g_{\parallel} και συνακόλουθη αύξηση του A_{\parallel} . Αυτές οι μικρές αλλαγές μπορούν να αποδοθούν στην αυξημένη ισχύ του πεδίου των υποκαταστατών. Τέλος, βάσει των φασματοσκοπικών μας δεδομένων δεν μπορεί να υποδειχθεί ποια απ' τις δυο καρβοξυλικές ομάδες (Asp^1COO^- ή Asp^2COO^-) εντάσσεται με το ιόν του Cu(II) .

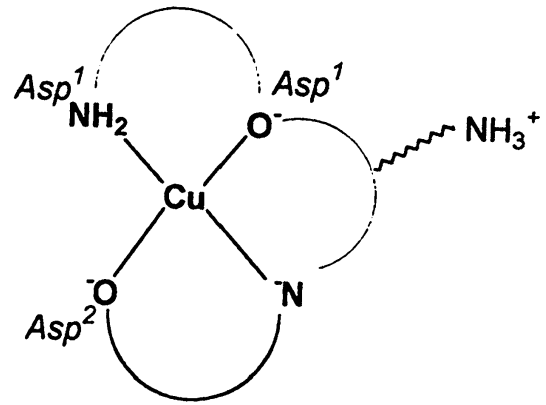
Η κατανάλωση ενός επιπλέον ισοδυνάμου βάσεως οδηγεί στο σχηματισμό του σωματιδίου MAH_2 . Η τιμή $pK_a = 9.42$ για τον ιονισμό $\text{MAH}_1 \leftrightarrow \text{MAH}_2 + \text{H}^+$ είναι πολύ υψηλότερη απ' αυτή του συστήματος $\text{Gly}_5\text{-Cu(II)}$ ($pK_a = 7.89$) για τον ίδιο τύπο ιονισμού, υποδεικνύοντας έτσι τη δυσκολία αποπρωτονίωσης και τρίτου πεπτιδικού αζώτου. Φασματοσκοπικά δεδομένα απ' τη βιβλιογραφία ($g_{\parallel} = 2.17\text{-}2.18$ και $A_{\parallel} = 205\text{-}212 \text{ G}$) [255] έχουν αποδοθεί σε ένταξη μέσω της N-τελικής αμινομάδας και τριών αποπρωτονιωμένων ατόμων αζώτου πεπτιδικών δεσμών (3 N). Στην δική μας περίπτωση η κατά 9-19 nm ερυθρή μετατόπιση της τιμής του λ_{max} (πίνακας 34) σε σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα μπορεί να εξηγηθεί υποθέτοντας ότι ένα από τα τέσσερα άτομα αζώτου εντάσσεται σε αξονική θέση γύρω απ' το ιόν του Cu(II) . Επιπλέον είναι γνωστό ότι μεγάλες αποκλίσεις απ' την επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία έχουν σαν αποτέλεσμα την μετατόπιση των τιμών του g_{\parallel} γύρω στο 2, γεγονός που επιβεβαιώνει περαιτέρω την προτεινόμενη ένταξη μέσω των $\alpha\text{-NH}_2$, 3N, COO^- με πιθανή αξονική ένταξη ενός ατόμου αζώτου. Σε μια τέτοια περίπτωση το συνολικό φορτίο του Cu(II) και των τεσσάρων ατόμων δοτών στο επίπεδο θα ήταν -2 και βασιζόμενοι στα διαγράμματα των Reisch και Blumberg [259] προβλέπεται σφαίρα ένταξης αποτελούμενη είτε από 3N, 1O είτε από 4N.

Τέλος η τιμή pK_a για την αποπρωτονίωση $\text{MAH}_2 \leftrightarrow \text{MAH}_3 + \text{H}^+$ βρέθηκε 10.27 και είναι συγκρίσιμη με την τιμή pK_a για την αποπρωτονίωση της ε-αμινομάδας της λυσίνης. Λαμβάνοντας υπόψη τα φασματοσκοπικά δεδομένα για το σωματίδιο αυτό (πίνακας 34) τα οποία είναι ίδια με τα αντίστοιχα του MAH_2 , συμπεραίνουμε ότι ο τρόπος ένταξης του Cu(II) είναι ίδιος, ενώ η μόνη διαφορά είναι ότι στο MAH_3 , η ε- NH_2 της λυσίνης είναι αποπρωτονιωμένη. Οι προτεινόμενες μοριακές δομές για όλα τα παραπάνω σωματίδια δίνονται στο σχήμα 135 που ακολουθεί.

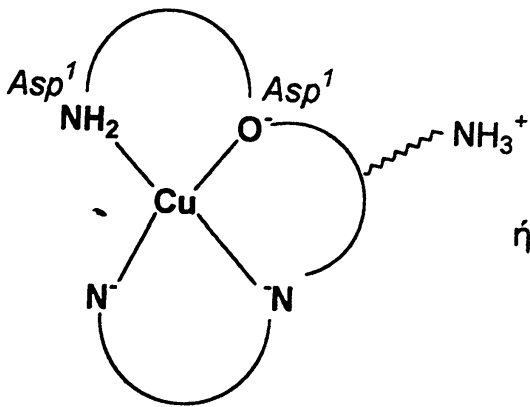




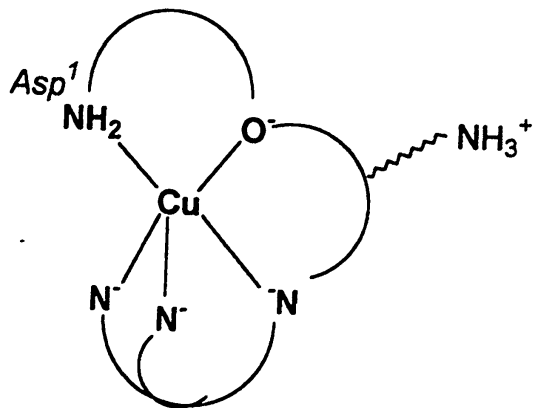
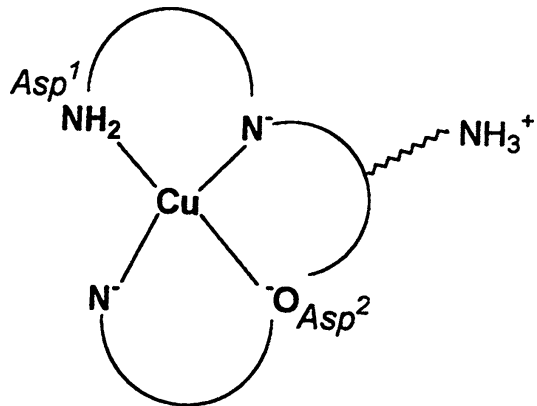
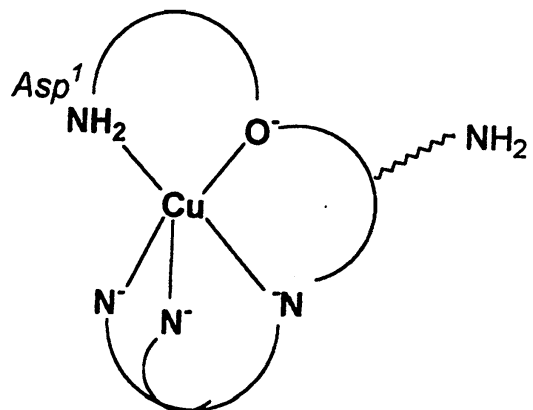
MAH



MA



ή

MAH₁MAH₂MAH₃

Σχήμα 135: Προτεινόμενες δομές για τα σωματίδια που σχηματίζονται στο σύστημα Cu(II)-πενταπεπτιδίου.



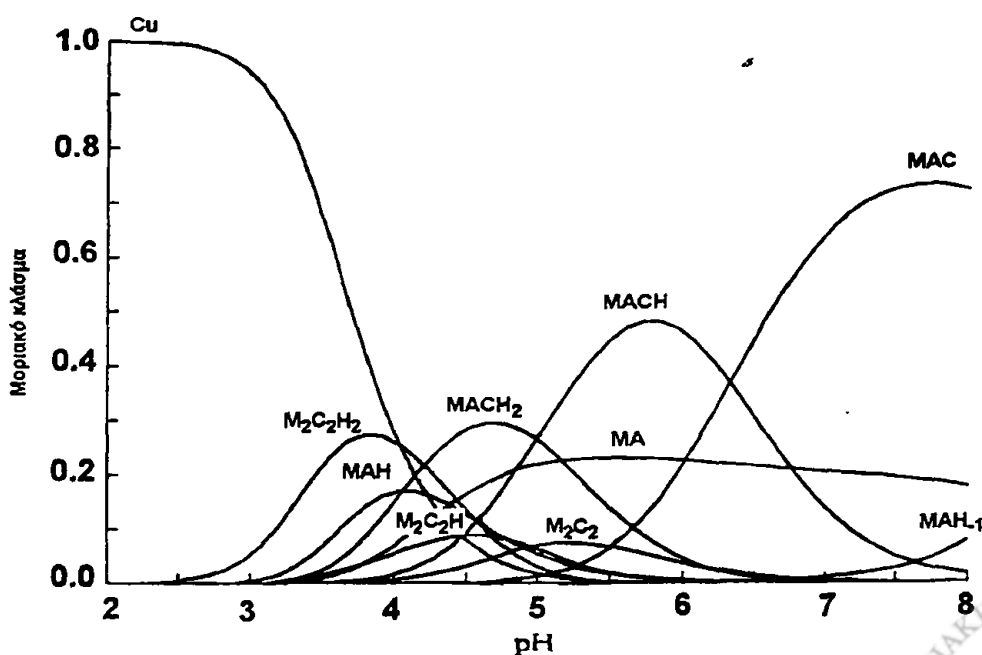
B. Αλληλεπίδραση Cu(II) με το πενταπεπτίδιο και την HETPP.

Η αλληλεπίδραση του ιόντος Cu(II) με το πενταπεπτίδιο και την HETPP μελετήθηκε με ποτενσιομετρικές τιτλοδοτήσεις και φασματοσκοπίες ορατού και CW-EPR σε υδατικά διαλύματα. Λαμβάνοντας υπόψη την μεγαλύτερη σταθερότητα των σωματιδίων του συστήματος Cu(II)-πεπτιδίου απ' ότι των σωματιδίων του συστήματος Cu(II)-HETPP (πίνακας 11, σελίδα 136) χρησιμοποιήσαμε μοριακή αναλογία Cu(II):πεπτίδιο:HETPP 1:1:2 ώστε να ευνοηθεί ο σχηματισμός μικτών σωματιδίων. Οι ολικές σταθερές σχηματισμού των σωματιδίων που σχηματίζονται καθώς και τα φασματοσκοπικά δεδομένα δίνονται στον πίνακα 35 ενώ το διάγραμμα κατανομής σωματιδίων παρουσιάζεται στο σχήμα 136.

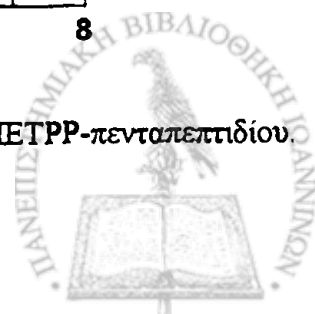
ΠΙΝΑΚΑΣ 35: Ολικές σταθερές σχηματισμού ($\log\beta$)^a και φασματοσκοπικά δεδομένα (ορατού, CW-EPR) για το σύστημα Cu(II)-HETPP-Asp-Asp-Asn-Lys-Ile.

pH	επικρατών σωματίδιο	$\log\beta \pm$ (τυπ. απόκλιση $\times 10^{-2}$)	λ_{\max} (nm)	ϵ ($\text{dm}^{-3} \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	β_{\perp}	A_{\parallel} (G)	β_{\perp}	A_{\perp} (G)
4.6	MACH ₂	27.22(9)	641	51	2.29	195	2.08	45
5.6	MACH	22.23(7)	637	63	-	-	-	-
7.5	MAC	15.90(9)	621	82	2.22	203	2.025	12

^a T = 298° K, I = 0.2 mol dm⁻³ (KCl), [Cu²⁺] = [πεπτίδιο] = 2mM, [HETPP] = 4mM.



Σχήμα 136: Διάγραμμα κατανομής σωματιδίων του συστήματος Cu²⁺-HETPP-πενταπεπτιδίου.



Οι ποτενσιομετρικές τιτλοδοτήσεις πραγματοποιήθηκαν μέχρι $\text{pH} = 8.0$ ώστε να αποτραπεί η υδρόλυση της HETPP. Ανιχνεύθηκαν τρία μικτά σωματίδια, τα MACH_2 , MACH και MAC ($\text{M} = \text{Cu(II)}$, $\text{A} = \text{Asp-Asp-Asn-Lys-Ile}$, $\text{C} = \text{HETPP}$). Όπως φαίνεται απ' το σχήμα 136 σε $\text{pH} < 4.5$ κυριαρχεί το σωματίδιο $\text{M}_2\text{C}_2\text{H}_2$ το οποίο αντιστοιχεί στο σύμπλοκο $[\text{Cu}(\text{LH})\text{Cl}]_2$ (βλέπε το αντίστοιχο τμήμα για την αλληλεπίδραση Cu(II)-HETPP , (σελίδα 136). Σχηματίζονται επίσης τα σωματίδια $\text{M}_2\text{C}_2\text{H}$ και M_2C_2 αλλά σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Όσον αφορά τα σωματίδια που μελετήσαμε στο προηγούμενο τμήμα, τα MAH συνυπάρχουν με τα $\text{M}_2\text{C}_2\text{H}_2$, $\text{M}_2\text{C}_2\text{H}$, MA και το μικτό σωματίδιο MACH_2 . Το MA έχει μεγάλο εύρος ύπαρξης και σ' αυτό το σύστημα, όπως ακριβώς διαπιστώθηκε και στο προηγούμενο τμήμα της μελέτης. Συγκρίνοντας τις ολικές σταθερές σχηματισμού για τα συστήματα Cu(II)-HETPP (πίνακας 11, σελίδα 136), $\text{Cu(II)-πενταπεπτιδίο}$ (πίνακας 34) και $\text{Cu(II)-πενταπεπτιδίο-HETPP}$ (πίνακας 35) διαπιστώνεται ότι τα μικτά σωματίδια MACH_2 , MACH και MAC είναι σταθερότερα απ' αυτά που σχηματίζονται στα άλλα δυο συστήματα. Το μέγιστο του μοριακού τους κλάσματος παρουσιάζεται σε $\text{pH} = 4.6$ (MACH_2), $\text{pH} = 5.6$ (MACH) και $\text{pH} = 7.5$ (MAC). Η τιμή $\lambda_{\text{max}} = 641$ nm για το σωματίδιο MACH_2 είναι ενδεικτική της ένταξης της N-τελικής αμινομάδας και ενός αποπρωτονιωμένου πεπτιδικού αζώτου (N'), όπως ακριβώς και στο σωματίδιο MA ($\lambda_{\text{max}} = 630$ nm). Ωστόσο η τιμή $g_{\parallel} = 2.29$ είναι κατά πολύ μεγαλύτερη απ' την αντίστοιχη του σωματιδίου MA ($g_{\parallel} = 2.22$) υποδηλώνοντας έτσι ότι η γεωμετρία γύρω απ' το ιόν του Cu(II) είναι λιγότερο παραμορφωμένη στο MACH_2 [259]. Το πιο πιθανό είναι ο σχηματισμός μόνο ενός πενταμελούς χηλικού δακτυλίου (NH_2 , N') απ' το πεπτιδικό τμήμα του συστήματος, σε αντίθεση με την τριδοντική συμπεριφορά του πεπτιδίου στο σωματίδιο MA (συμμετοχή και των $\beta\text{-COOH}$ των ασπαρτικών οξέων). Τέλος η HETPP θα πρέπει να εντάσσεται μόνο μέσω της πυροφωσφορικής ομάδας σ' αυτή την τιμή pH (4.6).

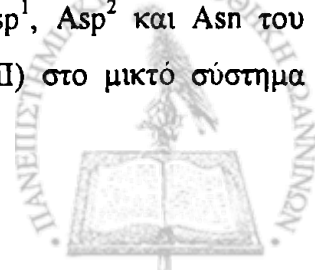
Η τιμή $\text{pK}_a = 4.99$ για την αποπρωτονίωση $\text{MACH}_2 \leftrightarrow \text{MACH} + \text{H}^+$ είναι λίγο μικρότερη απ' την τιμή pK_a για την αποπρωτονίωση της ελεύθερης HETPP (5.21) [10], ενώ $\lambda_{\text{max}} = 637$ nm. Απ' τα υπάρχοντα δεδομένα για το σωματίδιο αυτό υποθέτουμε ότι η μόνη διαφορά του απ' το MACH_2 συνίσταται στην επιπλέον ένταξη του $\text{N}(1')$ του πυριμιδινικού δακτυλίου της HETPP. Η μικρή κυανή μετατόπιση της τιμής του λ_{max} στο MACH μπορεί να εξηγηθεί θεωρώντας ότι ένα άτομο αζώτου (πιθανότατα το $\text{N}(1')$) εντάσσεται σε αξονική θέση γύρω από το ιόν του Cu(II) .

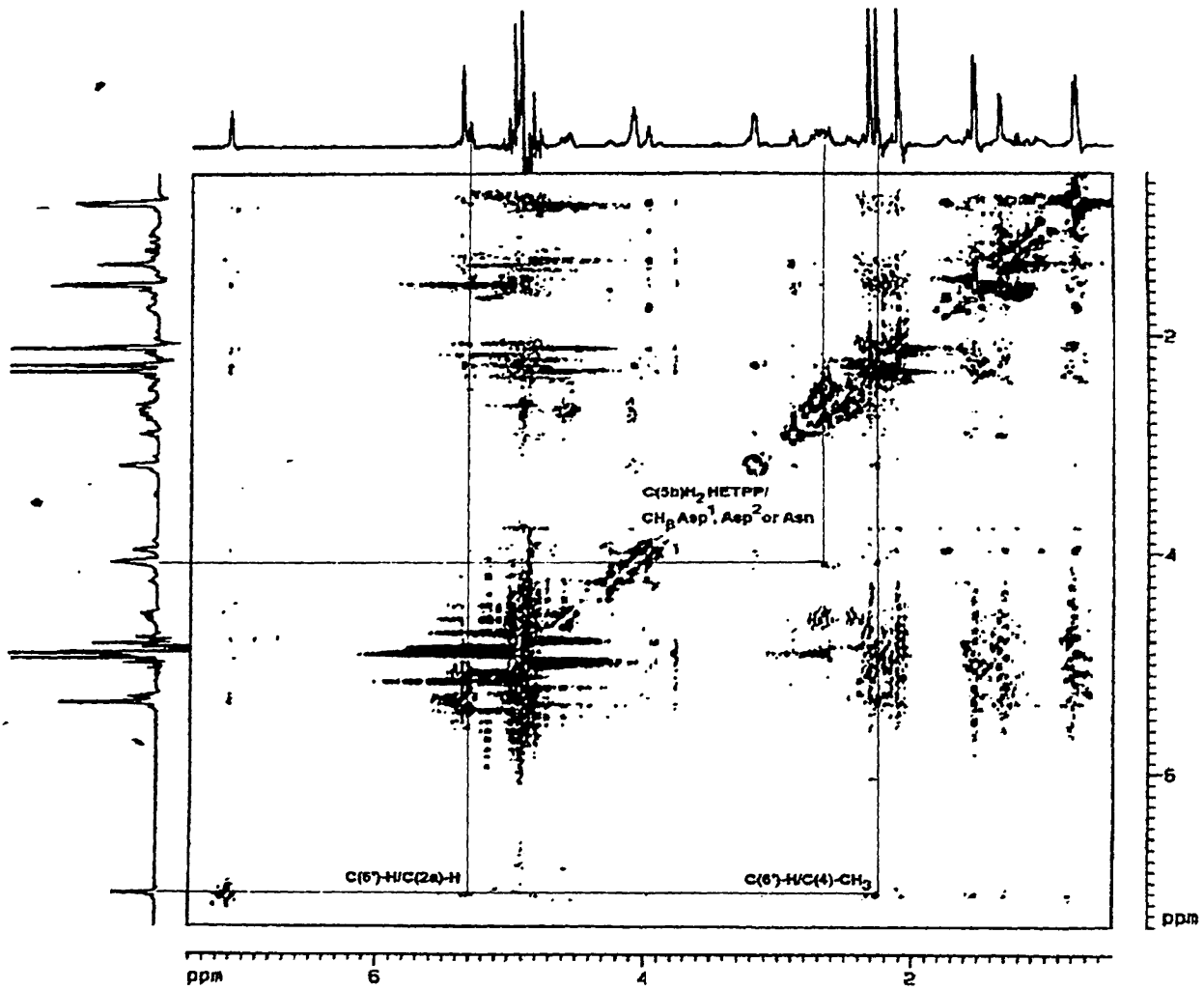
Η παρουσία μικτών σωματιδίων MAC σε περίπου φυσιολογικές τιμές pH (7.0-7.5) έχει σημαντικό βιολογικό ενδιαφέρον. Για το σωματίδιο αυτό προτείνεται ένταξη του Cu(II) μέσω των $\text{N}(1')$ και της πυροφωσφορικής ομάδας της HETPP, ενώ το πεπτιδίο θα πρέπει να εντάσσεται μέσω των $\text{Asp}^1\text{-NH}_2$, Asp^1COO^- ή Asp^2COO^- και ενός αποπρωτονιωμένου ατόμου

αζώτου πεπτιδικού δεσμού. Οι φασματοσκοπικές παράμετροι ($\lambda_{\max}= 621 \text{ nm}$, $g_{\parallel}= 2.22$, $g_{\perp}= 2.025$, $A_{\parallel}= 203 \text{ G}$, $A_{\perp}= 12 \text{ G}$) συνηγορούν υπέρ της ένταξης δυο τουλάχιστον ατόμων αζώτου στο ισημερινό επίπεδο όπως στα σωματίδια MA ($g_{\parallel}= 2.22$, $A_{\parallel}= 195 \text{ G}$). Με εφαρμογή των παραπάνω τιμών για το σωματίδιο MAC στα διαγράμματα των Reisach και Blumberg [259] προβλέπεται σφαίρα ένταξης 2N, 2O στο ισημερινό επίπεδο με συνολικό φορτίο Cu(II) και ατόμων δοτών -1. Η κατά 9 nm κυανή μετατόπιση της τιμής του λ_{\max} σε σχέση με την αντίστοιχη του σωματιδίου MA μπορεί να εξηγηθεί υποθέτοντας ότι κάποιο απ' τα άτομα αζώτου εντάσσεται σε αξονική θέση.

Σε μια προσπάθεια να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με την διαμόρφωση της HETPP καταγράψαμε το φάσμα $^1\text{H}-^1\text{H}$ ROESY NMR του συστήματος Cu(II):HETPP:πεπτιδίου (μοριακές αναλογίες 1:50:100 αντίστοιχα) σε διάλυμα D_2O , pH= 7.2 και στους 278°K (σχήμα 137). Χρησιμοποιήθηκε χαμηλή θερμοκρασία έτσι ώστε να μειωθεί το εύρος κάποιων κορυφών λόγω της αλληλεπίδρασης με το παραμαγνητικό ιόν του Cu(II) [221]. Η μεγαλύτερη διεύρυνση παρατηρήθηκε για τα σήματα των πρωτονίων H-C(6') και H₂C(5β) της HETPP καθώς και για τα (CH)_α και (CH₂)_β των Asp¹, Asp² και Asp του πεπτιδίου, γεγονός που υποδεικνύει την άμεση αλληλεπίδραση του Cu(II) με το N(1') και την πυροφωσφορική ομάδα της HETPP καθώς και με την N-τελική αμινομάδα και την καρβοξυλομάδα του Asp¹ του πεπτιδίου.

Αν και η παρουσία ενός παραμαγνητικού κέντρου οδηγεί σε εξασθένιση ως και πλήρη εξαφάνιση του NOE φαινομένου [260], στην παρούσα περίπτωση στο φάσμα $^1\text{H}-^1\text{H}$ ROESY NMR εμφανίζεται ένας μεγάλος αριθμός κορυφών διασταύρωσης, πιθανόν λόγω της μικρής συγκέντρωσης του Cu(II) στο σύστημα. Οι σημαντικότερες κορυφές διασταύρωσης παρουσιάζονται μεταξύ των H-C(6')/H-C(2α) και H-C(6')/ 4-CH₃ της HETPP. Απ' αυτές η πρώτη υποδεικνύει ότι το πρωτόνιο H-C(6') κατευθύνεται προς το θειαζολικό δακτύλιο, ένα δομικό χαρακτηριστικό της S-διαμόρφωσης [58], ενώ η δεύτερη αποτελεί ισχυρή ένδειξη της περιστροφής του θειαζολικού δακτυλίου κατά τον ίδιο τρόπο όπως και στην κρυσταλλική δομή της HETPP (σχήμα 49, σελίδα 81). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα καταλήγουμε ότι η S-διαμόρφωση η οποία υιοθετείται και στην ελεύθερη HETPP, όπως και στα σύμπλοκα M(II)-HETPP και M(II)-HETPP-πεπτιδίου (M= Zn, Cd) σε διάλυμα, διατηρείται και στην παρούσα περίπτωση. Απ' την άλλη τόσο η HETPP όσο και το πεπτιδίο εντάσσονται με το ιόν Cu(II), έτσι αναμένουμε τη γειτνίαση των δυο αυτών μορίων. Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται απ' την παρουσία των κορυφών διασταύρωσης H₂C(5β) της HETPP με τα (CH₂)_β των Asp¹, Asp² και Asp του πεπτιδίου και της 2'-CH₃ της HETPP με τα (CH)_α των Asp¹, Asp² και Asp του πεπτιδίου, επιβεβαιώνοντας έμμεσα και τον τρόπο ένταξης του Cu(II) στο μικτό σύστημα Cu(II)-HETPP-πεπτιδίου.





Σχήμα 137: Φάσμα ^1H - ^1H ROESY του συστήματος Cu^{2+} -HETPP-πενταπεπτιδίου σε διάλυμα D_2O , $\text{pH}=7.2$, $T=278^\circ\text{K}$.

Γ. Εφαρμογή των φασματοσκοπιών ESEEM και 2D-HYSCORE για την απόδειξη της δομής των M_2C_2 , MA και MAC (M= Cu(II), C= HETPP, A= Asp-Asp-Asn-Lys-Ile).

Όπως αναφέραμε και στην αρχή του τμήματος αυτού, για την απόδειξη του τρόπου ένταξης του Cu(II) σε κάποια απ' τα σωματίδια και ειδικότερα σε αυτά που σχηματίζονται σε φυσιολογικές τιμές pH (7.0-7.5) χρησιμοποιήθηκαν οι φασματοσκοπίες ESEEM και 2D-HYSCORE. Συγκεκριμένα καταγράφηκαν τα φάσματα του σύμπλοκου Cu_2C_2 σε pH= 7.5, του σωματιδίου CuA σε pH=7.2 και του μικτού σωματιδίου CuCA σε pH= 7.5. Τα φάσματα ESEEM αποτελούνταν από κορυφές που οφείλονται στη σύζευξη του πυρηνικού spin πυρήνων όπως 1H ($I=1/2$), ^{31}P ($I=1/2$) και ^{14}N ($I=1$) με το ηλεκτρονιακό spin του ιόντος Cu(II) (υπέρλεπτη αλληλεπίδραση). Παρατηρήθηκαν τόσο ισχυρές ($A_{iso} < 2\nu_l$) όσο και ασθενείς ($A_{iso} > 2\nu_l$) υπέρλεπτες αλληλεπιδράσεις (A_{iso} = σταθερά ισότροπης υπέρλεπτης αλληλεπίδρασης, ν_l = η συχνότητα συντονισμού Larmor του κάθε πυρήνα). Η επικάλυψη πολλών κορυφών καθώς και οι ασθενείς υπέρλεπτες αλληλεπιδράσεις για κάποιους πυρήνες δεν επέτρεψαν την πλήρη ανάλυση των φασμάτων για την εξαγωγή δομικών πληροφοριών. Αντιθέτως στα φάσματα 2D-HYSCORE έγινε δυνατή η παρατήρηση και η απόδοση όλων των πυρηνικών μεταπτώσεων. Ο υπολογισμός των παραμέτρων A_{iso} και T όπου T= η ανισοτροπική υπέρλεπτη αλληλεπίδραση έγινε με κατάλληλη προσομοίωση των πειραματικών φασμάτων όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία [249, 250, 261-268]. Η απόδοση των κορυφών διασταύρωσης σε συγκεκριμένους πυρήνες που συζεύγγονται με το ηλεκτρονιακό spin του Cu(II) και που δεν εντάσσονται όμως άμεσα με το ιόν, έγινε με βάση την ευρισκόμενη συχνότητα συντονισμού τους ν_l με δεδομένο την ένταση του εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Η απόδοση των πυρήνων σε κάποια χαρακτηριστική ομάδα των μελετούμενων συστημάτων έγινε με σύγκριση των τιμών των A_{iso} και T με βιβλιογραφικά δεδομένα [269-274]. Τα δεδομένα που προκύπτουν απ' την επεξεργασία των φασμάτων δίνονται στον πίνακα 36, ενώ τα φάσματα 2D-HYSCORE των συστημάτων Cu(II)-HETPP, Cu(II)-πεπτιδίου και Cu(II)-HETPP-πεπτιδίου δίνονται στα σχήματα 138, 139 και 140 αντίστοιχα.

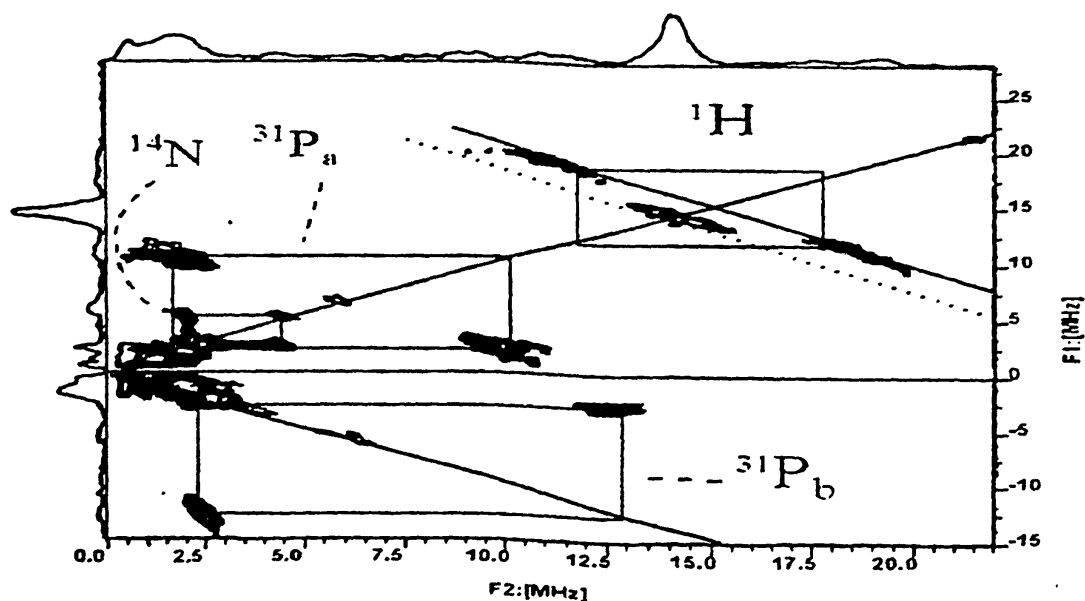


ΠΙΝΑΚΑΣ 36: Παράμετροι σύζευξης πυρήνων (A_{iso} , T) για τα τρία σύμπλοκα του $Cu(II)$ όπως προσδιορίστηκαν από τη φασματοσκοπία 2D-HYSCORE και βιβλιογραφικές τιμές.

Σύμπλοκο	Πυρήνας	A_{iso} , $g_1 T^a$ (MHz) ^β	Βιβλιογραφικά δεδομένα A_{iso} , T (MHz)	Παραπομπή
Cu^{2+} -πενταπεπτιδιο	1H (I)	4.4, 1.6	$Cu^{2+} \cdot H_2O$ 0.7, 1.6	272
	1H (II)	6.5, 5.7	" 0.4, 1.7	274
			Cu^{2+} -γλυκίνη 3.7, 1.6 (CH_2)	273
			" 3.5, 6.2 (NH_2)	273
			" 5.5, 6.8 (NH_2)	273
Cu^{2+} -HETPP	1H	6.5, 7.6		
	$^{31}P_a$	-9.2, 2.4	$^{31}P-VO^{2+}$ -14.3, 1.9	270
	$^{31}P_b$	-14.0, 3.6	-9.2, 1.5	270
	^{14}N	2-3, -	8.7, -	269
			$^{31}P-Cu^{2+}$ 8.2, -	271
Cu^{2+} -HETPP-πενταπεπτιδιο	1H	6.5, 7.6		
	$^{31}P_a$	-9.3, 2.6		
	$^{31}P_b$	-14.1, 3.5		
	^{14}N	1-2, -		

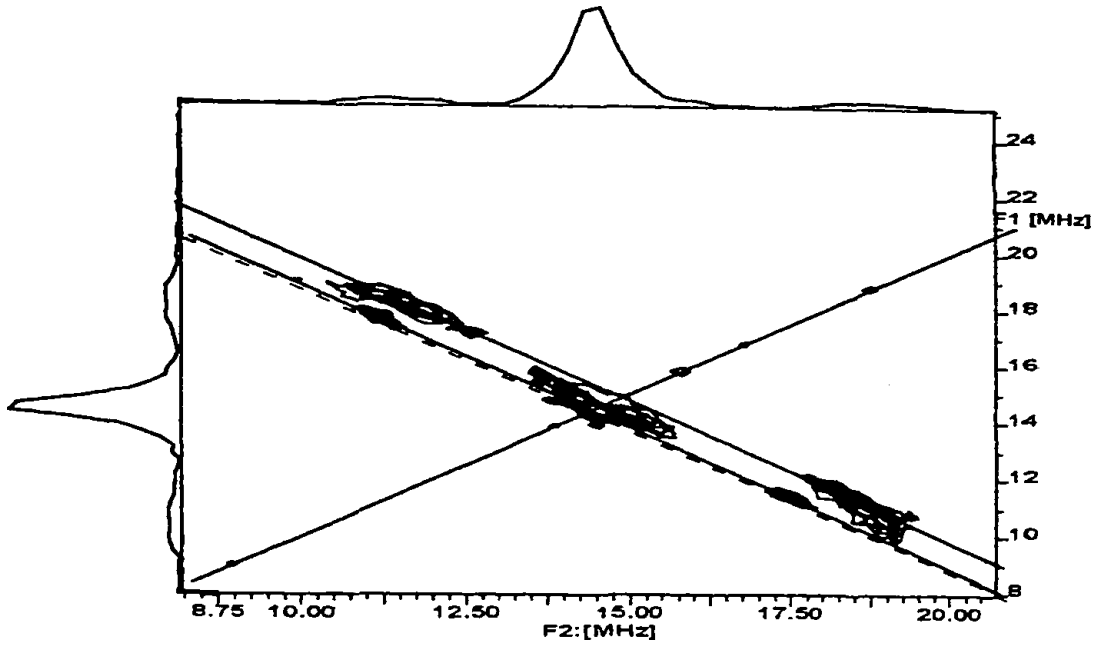
^a. Ο πολλαπλασιασμός με τον παράγοντα g_1 έγινε ώστε να διευκολυνθεί η σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

^β Σφάλμα: ± 0.5 MHz

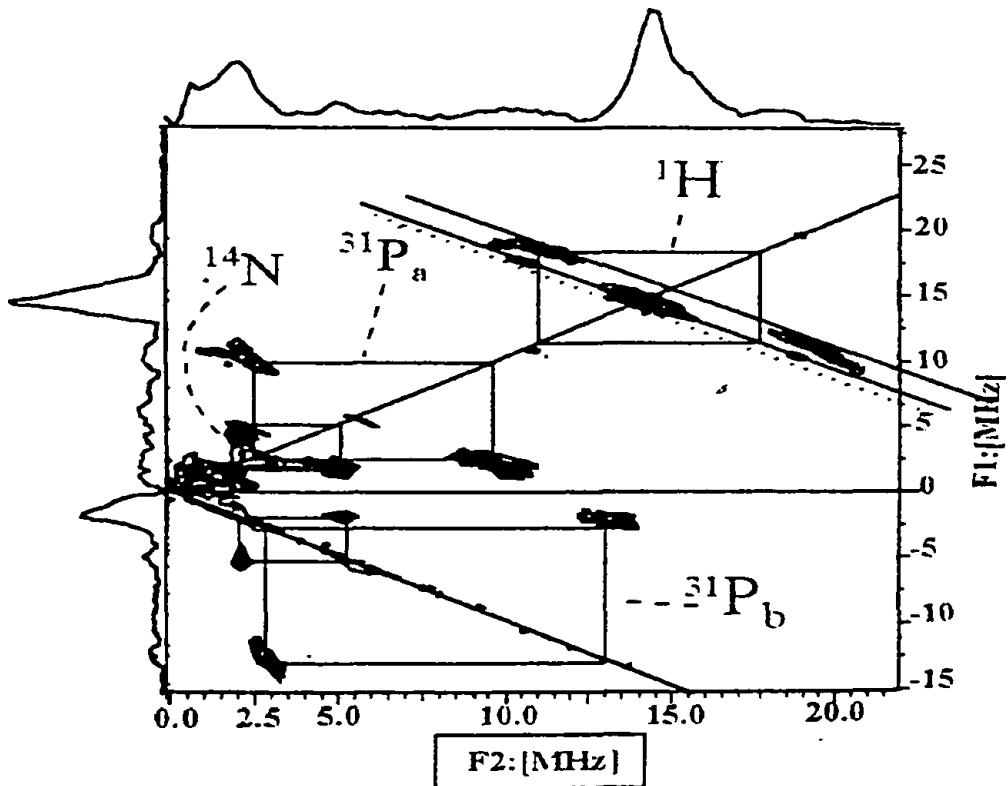


Σχήμα 138: Φάσμα 2D-HYSCORE του συστήματος Cu^{2+} -HETPP, pH=7.5.





Σχήμα 139: Φάσμα 2D-HYSCORE του συστήματος Cu^{2+} -πενταπεπτιδίου, $\text{pH}=7.2$.



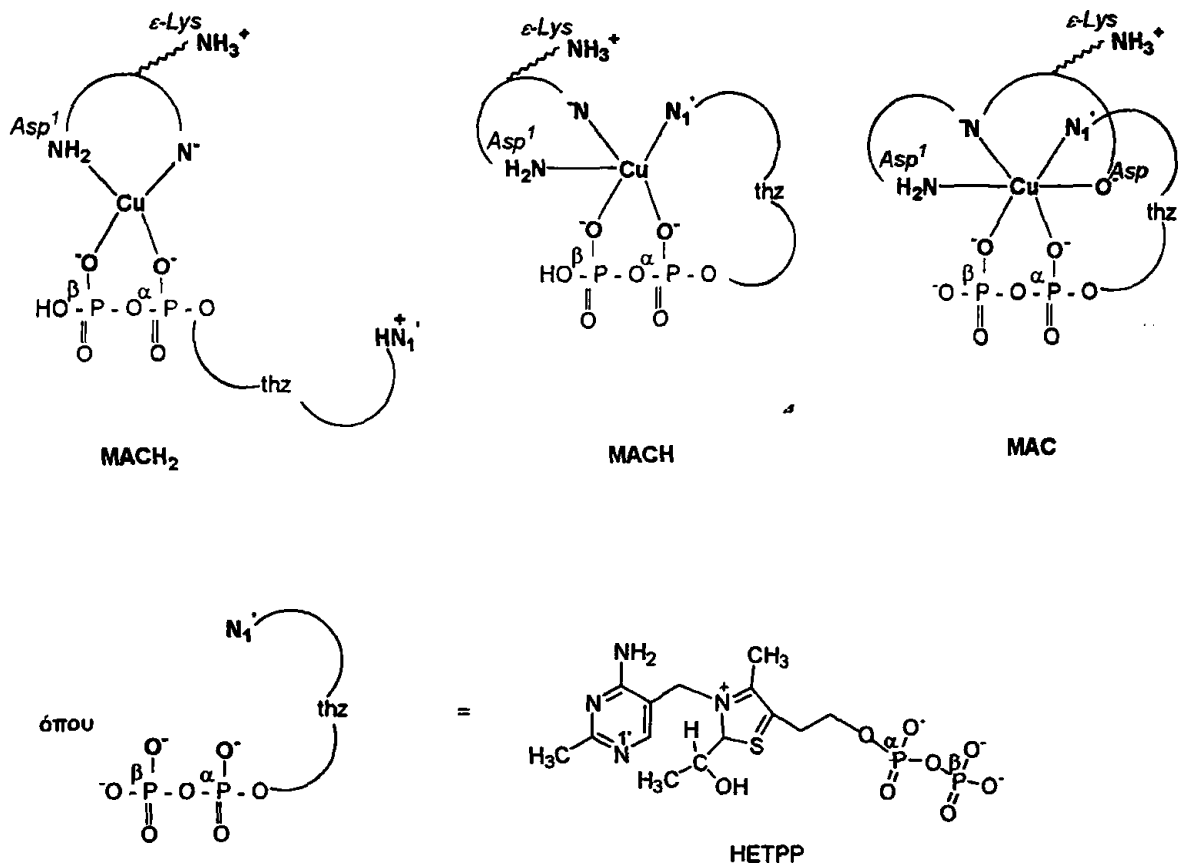
Σχήμα 140: Φάσμα 2D-HYSCORE του συστήματος Cu^{2+} -HETPP-πενταπεπτιδίου, $\text{pH}=7.5$.

Έτσι, στο σύστημα Cu(II)-HETPP σε pH= 7.5 αναμένουμε το σχηματισμό του σωματιδίου Cu₂C₂ για το οποίο προτείναμε τη δομή του σχήματος 90β, σελίδα 145 με τη μόνη διαφορά ότι η δεύτερη ομάδα P_β-OH είναι αποπρωτονιωμένη και στα δυο μόρια HETPP. Στο φάσμα 2D-HYSCORE (σχήμα 138) παρουσιάζονται κορυφές διασταύρωσης που οφείλονται στη σύζευξη του ηλεκτρονιακού spin του Cu(II) με τα πυρηνικά spin ¹H, ³¹P και ¹⁴N (οι αποδόσεις σημειώνονται στο σχήμα). Συγκρίνοντας τα δεδομένα A_{iso} και T για τον πυρήνα ¹H με βιβλιογραφικά δεδομένα και λαμβάνοντας υπόψη και το γεγονός ότι στο φάσμα ¹H-NMR του συστήματος διευρύνεται περισσότερο η κορυφή που οφείλεται στο H-C(6'), αποδίδουμε την ισχυρή ανισοτροπική υπέρλεπτη αλληλεπίδραση που παρατηρείται στο πρωτόνιο αυτό. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται αφενός μεν την απευθείας ένταξη του Cu(II) με το N(1') της πυριμιδίνης, αφετέρου δε τον απεντοπισμό ενός σημαντικού ποσοστού πυκνότητας spin στον πυριμιδινικό δακτύλιο της HETPP. Ο απεντοπισμός αυτός ίσως ευθύνεται για την παρατηρούμενη ασθενή σύζευξη με τον πυρήνα ¹⁴N του N(3) του πυριμιδινικού δακτυλίου. Όσον αφορά τις συζεύξεις με τους πυρήνες ³¹P, σύγκριση των τιμών των A_{iso} και T με βιβλιογραφικά δεδομένα [269-274] υποδεικνύει πιθανή ένταξη του Cu(II) με την πυροφωσφορική ομάδα μέσω ατόμων οξυγόνου. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι οι παράμετροι A_{iso} και T είναι διαφορετικές για κάθε άτομο φωσφόρου (P_α και P_β) αποκαλύπτοντας έτσι ότι τα δυο άτομα αυτά εντάσσονται με διαφορετικό τρόπο στο ιόν του Cu(II) [269]. Συνοψίζοντας, τα δεδομένα HYSCORE επιβεβαιώνουν την ένταξη του Cu(II) μέσω του N(1') και των πυροφωσφορικών ατόμων οξυγόνου της HETPP.

Περνώντας στο σύστημα Cu(II)-πενταπεπτιδίου, μελετήθηκε το σωματίδιο MA το οποίο όπως αποδείχθηκε είναι πολύ σταθερό με μεγάλο εύρος ύπαρξης. Στο φάσμα 2D-HYSCORE (σχήμα 139) παρουσιάζονται δυο ειδών κορυφές διασταύρωσης οφειλόμενες σε συζεύξεις με πυρήνες ¹H. Και πάλι σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα [272-274] οδηγεί στην απόδοση των κορυφών διασταύρωσης σε συζεύξεις με τα πρωτόνια (CH₂)_β των ασπαρτικών οξέων του πεπτιδίου καθώς και στη σύζευξη με τα πρωτόνια της N-τελικής αμινομάδας. Συμπερασματικά, στην τιμή pH που καταγράφηκε το φάσμα (7.2) ο Cu(II) εντάσσεται με το πεπτίδιο μέσω της N-τελικής αμινομάδας και καρβοξυλικών ατόμων οξυγόνου των δυο ασπαρτικών.

Συνεχίζοντας με το μικτό σύστημα, στην τιμή pH που καταγράφηκε το φάσμα (7.5) επικρατεί το σωματίδιο CuAC. Στο φάσμα 2D-HYSCORE (σχήμα 140) παρατηρούμε κορυφές διασταύρωσης που οφείλονται σε συζεύξεις δυο μη χημικά ισοδυνάμων πυρήνων ³¹P οι οποίοι αποδίδονται στην HETPP. Η μικρή διαφορά των τιμών των A_{iso} και T μεταξύ της παρούσας περίπτωσης και του συστήματος Cu(II)-HETPP υποδεικνύει ότι δεν έχει αλλάξει ο τρόπος ένταξης της πυροφωσφορικής ομάδας με το ιόν Cu(II). Συνεχίζοντας την ανάλυση του

φάσματος όπως παραπάνω, αποδίδουμε την ισχυρή ανισοτροπική σύζευξη ^1H στο πρωτόνιο $\text{H-C}(6')$ της πυριμιδίνης, γεγονός που συνεπάγεται ένταξη της HETPP και μέσω του $\text{N}(1')$. Η παρουσία μιας ασθενούς σύζευξης ^1H αποδίδεται στην ομάδα $(\text{CH}_2)_\beta$ του ασπαρτικού, απόδειξη της ένταξης και του πεπτιδίου μέσω των καρβοξυλικών ατόμων οξυγόνου. Παρατηρείται επίσης η σύζευξη ^{14}N του $\text{N}(3)$ του πυριμιδινικού δακτυλίου, η οποία σ' αυτή την περίπτωση έχει εξασθενήσει περαιτέρω (σύγκριση των τιμών A_{iso} και T με τις αντίστοιχες του συστήματος Cu(II)-HETPP). Ολοκληρώνοντας καταλήγουμε ότι στο μικτό σωματίδιο CuAC η HETPP εντάσσεται με το ιόν Cu(II) μέσω του $\text{N}(1')$ και της πυροφωσφορικής ομάδας, ενώ το πενταπεπτίδιο εντάσσεται μέσω των καρβοξυλικών οξυγόνων των ασπαρτικών. Οι προτεινόμενες δομές των μικτών σωματιδίων $\text{Cu(II)-HETPP-πεπτιδίου}$ δίνονται στο σχήμα 141. Όλα τα παραπάνω δεδομένα HYSORE ενισχύουν τις υποθέσεις που έγιναν σχετικά με τη σφαίρα ένταξης του Cu(II) στα μελετούμενα συστήματα με τη χρήση των φασματοσκοπιών ορατού και CW-EPR, ενώ ταυτόχρονα αποδεικνύεται ότι η φασματοσκοπία 2D-HYSORE αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την επίλυση πολύπλοκων δομικών προβλημάτων.



Σχήμα 141: Προτεινόμενες δομές για τα σωματίδια που σχηματίζονται στο σύστημα Cu^{2+} -HETPP-πενταπεπτίδιο (A= Asp-Asp-Asn-Lys-Ile, C= HETPP).



Δ. ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Τα κυριότερα συμπεράσματα που προκύπτουν απ' την ανάλυση και τη σύγκριση όλων των δεδομένων που συζητήθηκαν είναι:

α) Ο πολύ εύκολος σχηματισμός μεταλλικών συμπλόκων της 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορικής θειαμίνης (HETPP) με τα ιόντα Cu(II), Zn(II), Cd(II), τόσο σε υδατικά όσο και σε μη υδατικά διαλύματα. Υπενθυμίζουμε ότι η HETPP είναι το πραγματικό ενδιάμεσο της καταλυτικής (ενζυμικής) μετατροπής του πυροσταφυλικού οξέος σε ακεταλδεΐδη [32,33]. Το αποτέλεσμα αυτό ενισχύει την πρόταση της ερευνητικής μας ομάδας περί σχηματισμού στον καταλυτικό κύκλο μεταλλικών συμπλόκων με παράγωγα “ενεργού αλδεύδης” της θειαμίνης, έναντι του σχηματισμού μεταλλικών συμπλόκων με απλή θειαμίνη [58].

β) Η ένταξη των μεταλλικών ιόντων στα παραπάνω σύμπλοκα λαμβάνει χώρα μέσω του N(1') του πυριμιδινικού δακτυλίου και της πυροφωσφορικής ομάδας.

γ) Τα μεταλλικά σύμπλοκα της πυροφωσφορικής θειαμίνης (TPP) με τα ιόντα Cd(II) και Zn(II), εντάσσονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο στον υποκαταστάτη (TPP) όπως και στην HETPP. Η σύγκριση των τιμών $\log \beta$ μεταξύ των σωματιδίων που σχηματίζονται και με τους δυο υποκαταστάτες αποδεικνύει ότι τα σύμπλοκα της HETPP είναι σταθερότερα (Cu(II) > Cd(II) > Zn(II)). Δεδομένου λοιπόν του παρόμοιου τρόπου ένταξης, η επιπλέον σταθερότητα των συμπλόκων της HETPP θα πρέπει να οφείλεται στην ύπαρξη της πλευρικής ύδροξυ-αίθυλ αλυσίδας στον C(2) του θειαζολίου. Αποδεικνύεται λοιπόν για πρώτη φορά η υπόθεσή μας ότι τα παράγωγα “ενεργού αλδεύδης” της θειαμίνης σχηματίζουν πράγματι σταθερότερα μεταλλικά σύμπλοκα, απ' ότι τα σύμπλοκα απλής θειαμίνης [58]. Η ευκολία σχηματισμού τους αποδίδεται στην ισχυρή, ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπίδραση S(1)...O(2a) (που παρουσιάζεται μόνο στα παράγωγα “ενεργού αλδεύδης” της θειαμίνης) και οδηγεί σε μερική εσωτερική εξουδετέρωση του καθαρού θετικού φορτίου του N(3) του θειαζολικού δακτυλίου.

δ) Τα σύμπλοκα με την HETPP αποτελούν καλά μοντέλα συνενζυμικής δράσης αφού βρέθηκε ότι ελευθερώνουν εύκολα την ομάδα CH₃CH(OH)- απ' τον C(2) του θειαζολίου. Ενισχυτικό για αυτό είναι το γεγονός ότι σύμπλοκα της TPP δεν παρουσιάζουν συνενζυμική δραστηριότητα κατά την ενζυμική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος, σε αντίθεση με το σύμπλοκο Zn της HETPP. Η παρατήρηση αυτή είναι πολύ σημαντική αφού ενισχύει τις απόψεις της ερευνητικής μας ομάδας ότι i) τα μεταλλικά ιόντα επεμβαίνουν μετά το σχηματισμό των παραγώγων “ενεργού αλδεύδης” κατά τον ενζυμικό κύκλο, ii) τα μεταλλικά ιόντα δεν δρούν

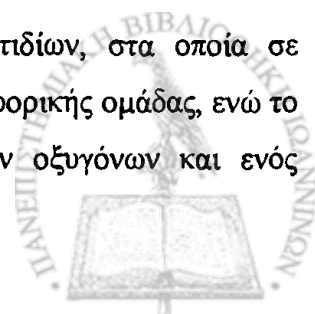
μόνο ως γέφυρα που συνδέει το αποένζυμο με το συνένζυμο όπως προτείνεται μέχρι σήμερα [64,88,89,192,193,195], αλλά πολύ πιθανόν να βοηθούν επιπλέον και στην μεταβολή της βασικότητας της 4'α-NH₂ συνεργικά ίσως με τον δεσμό υδρογόνου N(1')H...-O₂C-Glu [62,64,156].

ε) Αποδείχθηκε για μια ακόμη φορά η σπουδαιότητα και ο σημαντικός ρόλος της S-διαμόρφωσης αφού τόσο ο υποκαταστάτης (HETPP) όσο και τα σύμπλοκα του, Cd και Zn υιοθετούν την S-διαμόρφωση και στη στερεά φάση και σε διάλυμα. Πιστεύουμε λοιπόν ότι πρέπει να παίζει σημαντικό ρόλο μαζί με την V-διαμόρφωση κατά την διάρκεια της ενζυμικής δράσης, όπως ακριβώς προτείνουμε τα τελευταία χρόνια [58].

στ) Η αλληλεπίδραση της HETPP με μεταλλικά ιόντα έναντι της TPP ενισχύεται και απ' το γεγονός ότι αυτή δεν οξειδώνεται παρουσία ιόντων Cu(II) σε θειόχρωμα, σε αντίθεση με την TPP η οποία οξειδώνεται μερικώς. Η οξείδωση της HETPP σε βιολογικά συστήματα θα οδηγούσε σε καταστροφή της συνενζυμικής της δράσης αφού τόσο αυτή όσο και τα ιόντα Cu(II) βρίσκονται παρόντα σ' αυτά.

ζ) Τέλος στα βασικά αποτελέσματα της παρούσας διατριβής θα πρέπει να αναφερθεί η επιτυχής σύνθεση για πρώτη φορά μικτών σωματιδίων M(II)-HETPP-Asp-Asp-Asn-Lys-Ile (όπου M= Cu, Zn, Cd). Όταν M= Zn, Cd σχηματίζονται μικτά σύμπλοκα στα οποία τα μεταλλικά ιόντα σε φυσιολογικό pH εντάσσονται μέσω των N(1') και της πυροφωσφορικής ομάδας της HETPP, ενώ η σφαίρα ένταξής τους συμπληρώνεται από καρβονυλικά και καρβοξυλικά άτομα οξυγόνου του πεπτιδίου. Αποτελούν λοιπόν πολύ καλά μοντέλα του ενεργού κέντρου του ενζύμου γTK (σχήμα 46, σελίδα 69) και τα αποτελέσματα που βρίσκουμε μπορούν να συσχετιστούν άμεσα με το βιολογικό σύστημα, αφού τα ιόντα εντάσσονται σχεδόν με τον ίδιο τρόπο όπως και το ιόν Ca(II) στο φυσικό ένζυμο. Υπενθυμίζεται ότι το πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί την περιοχή 185-189 που εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο της γTK [194]. Ως εκ τούτου η διατήρηση της S- διαμόρφωσης της HETPP στα σωματίδια αυτά καθώς και η συμμετοχή του N(1') στη σφαίρα ένταξης ενισχύουν για μια ακόμη φορά τις απόψεις περί του σημαντικού ρόλου των μεταλλικών ιόντων, του N(1') και της S-διαμόρφωσης κατά την ενζυμική δράση όπως προαναφέρθηκε.

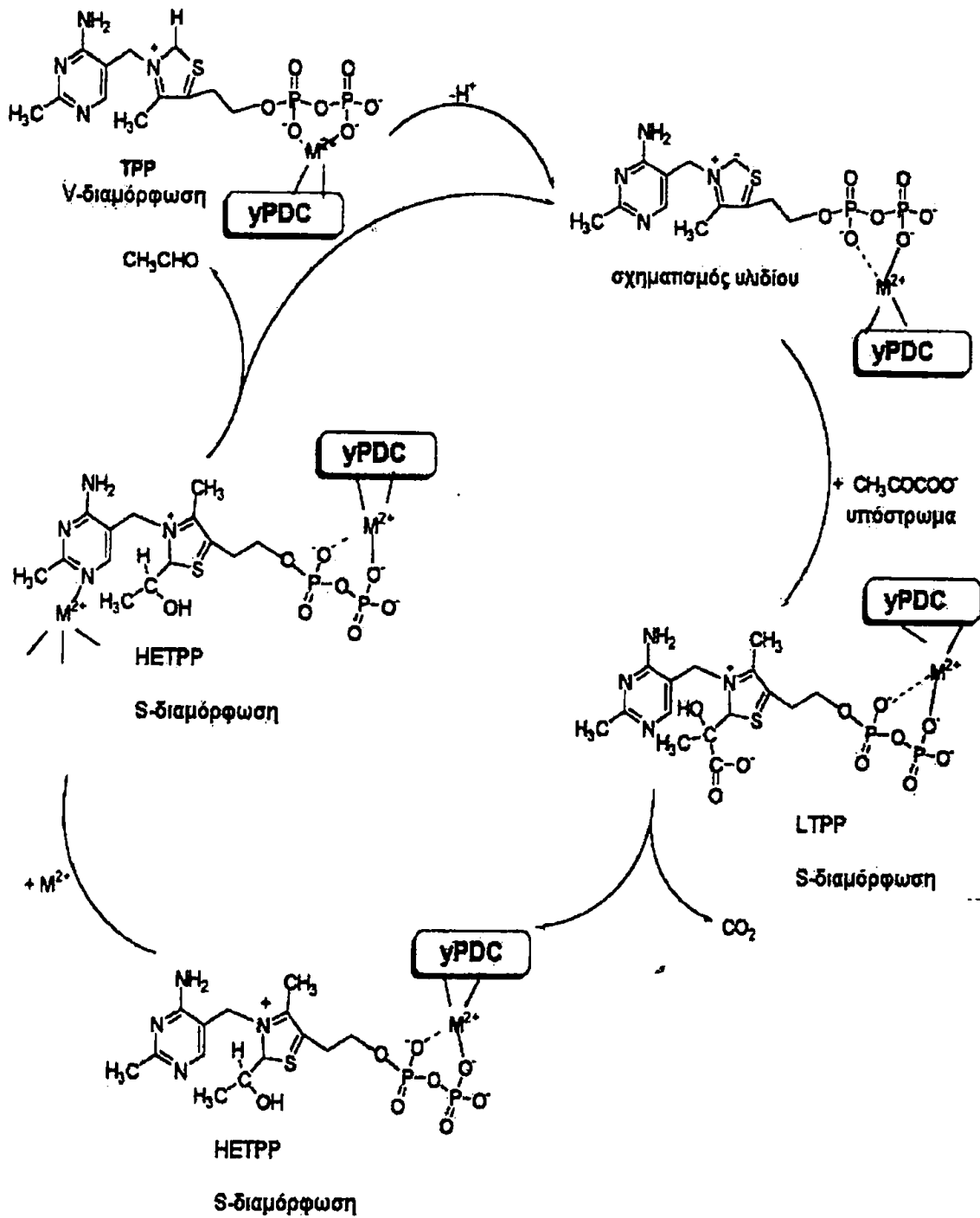
Όταν M= Cu, παρατηρήθηκε επίσης ο σχηματισμός μικτών σωματιδίων, στα οποία σε φυσιολογικό pH η HETPP εντάσσεται μέσω του N(1') και της πυροφωσφορικής ομάδας, ενώ το πεπτίδιο εντάσσεται μέσω της N-τελικής αμινομάδας, καρβοξυλικών οξυγόνων και ενός



αποπρωτονιωμένου ατόμου αζώτου πεπτιδικού δεσμού. Η S-διαμόρφωση διατηρείται και στην περίπτωση αυτών των συμπλόκων, τα οποία είναι σταθερότερα απ' τα σωματίδια που σχηματίζονται τόσο κατά την αλληλεπίδραση Cu(II)-HETPP, όσο και κατά την αλληλεπίδραση Cu(II)-πεπτιδίου.

Βασιζόμενοι σε όλα τα παραπάνω συμπεράσματα μπορούμε να προτείνουμε ένα υποθετικό μοντέλο ενζυμικής δράσης της θειαμίνης το οποίο και παρουσιάζεται στο σχήμα 142. Το μοντέλο αυτό διαφέρει απ' τα ήδη προτεινόμενα από πολλές ερευνητικές ομάδες στο ότι α) Τα ενδιάμεσα της ενζυμικής δράσης 2-(α-λάκτυλ) πυροφωσφορική θειαμίνη (LTPP) και 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορική θειαμίνη (HETPP) υιοθετούν την S-διαμόρφωση η οποία ακολουθεί την αρχική V-διαμόρφωση της TPP με την οποία ξεκινά ο καταλυτικός κύκλος και β) Μετά τον σχηματισμό της HETPP τα μεταλλικά ιόντα M^{2+} αλληλεπιδρούν με το N(1') επηρεάζοντας την βασικότητα της 4'α-αμινομάδας όπως ακριβώς συμβαίνει και κατά τον σχηματισμό του δεσμού υδρογόνου N(1')H...O₂C-Glu.





Σχήμα 142: Προτεινόμενο μοντέλο ενζυμικής δράσης της θειαμίνης.



E. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. Αντιδραστήρια και υλικά.

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων ήταν των οίκων Merck, Aldrich και Labscan. Ήταν αναλυτικής καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τα κιτρικό οξύ, CdCl_2 , όξινο φθαλικό κάλιο, D_2O , DCI , HoBt , Sephadex G-10, Sephadex SP-C25 και Silica-gel 645 ήταν του οίκου Aldrich, ενώ τα ZnCl_2 , KOH , NaOH , KCl , KNO_3 , CuCl_2 , DCC , το διάλυμα Titriplex 0.1M και το διάλυμα ZnSO_4 0.1M του οίκου Merck. Οι πλάκες που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ήταν τύπου silica-gel 60-F₂₅₄ του οίκου Merck, ενώ τα παράγωγα αμινοξέων Fmoc-Asp(OBu^t), Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH και η ρητίνη 2-χλώρο-τριτύλ χλωρίδιο ήταν του οίκου CBL. Τέλος, η πυροφωσφορική θειαμίνη, το NADH, το πυροσταφυλικό νάτριο και τα ένζυμα αλκοολική δεϋδρογονάση (ADH) και πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (γPDC) ήταν του οίκου Sigma.

II. Σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων.

Ο υποκαταστάτης HETPP συντέθηκε σύμφωνα με μέθοδο της βιβλιογραφίας [275] με μικρές παραλλαγές. Συγκεκριμένα μετά την αφαλάτωση του προϊόντος της αντίδρασης TPP και CH_3CHO σε στήλη που περιέχει Sephadex G-10, τα κλάσματα που περιέχουν το μίγμα TPP και HETPP ανιχνεύονται σε πλάκες TLC οι οποίες φωτίζονται με λάμπα υπεριώδους φωτός (260nm). Τα κλάσματα αυτά συγκεντρώνονται και ο διαλύτης απομακρύνεται μέχρι τελικού όγκου 2ml. Ακολουθεί διαχωρισμός του ανωτέρω μείγματος σε στήλη που περιέχει Sephadex SP-C25 και τα κλάσματα που περιέχουν την HETPP ή την TPP ανιχνεύονται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, χρησιμοποιώντας το σύστημα διαλυτών κιτρικό οξύ/κιτρικό νάτριο (0.15M), $\text{pH}=4.0$: $n\text{-BuOH}:\text{EtOH}$, 6:10:1 [276]. Για την εμφάνιση των χρωματογραφημάτων χρησιμοποιείται πάλι λάμπα υπεριώδους στα 260 nm. Το πλεονέκτημα αυτών των παραλλαγών συνίσταται στην συντόμευση του χρόνου ο οποίος απαιτείται για την σύνθεση της HETPP.

Το πεπτιδίο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile συντέθηκε με την Fmoc-στρατηγική στην στερεά φάση [234, 277] χρησιμοποιώντας τη ρητίνη 2-χλώρο-τριτύλ χλωρίδιο (υποκατάσταση 1.1-1.6 meq Cl/gr) [278]. Μετά το τέλος της σύνθεσης, η αποκοπή του πεπτιδίου απ' τη ρητίνη έγινε με επίδραση



διαλύματος $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{TFE}$ 7:1:2. Το πεπτιδίο καθαρίστηκε με flash chromatography χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης silica-gel και διαλύτη έκλουσης μίγμα $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$, 5:1. Οι προστατευτικές ομάδες Boc και Bu^t απομακρύνθηκαν μετά τον καθαρισμό του πεπτιδίου με επίδραση διαλύματος 1.2N HCl σε CH_3COOH για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε με τη βοήθεια υψηλού κενού και εν συνεχεία προστέθηκε Et_2O προς στερεοποίηση του προϊόντος. Μετά την ξήρανσή του ακολούθησε αφαλάτωση με χρήση χρωματογραφίας πηκτής (gel filtration) σε στήλη Sephadex G-10 με διαλύτη έκλουσης H_2O . Τα κλάσματα που περιείχαν το προϊόν συγκεντρώθηκαν, μειώθηκε ο όγκος τους και ακολούθησε λυοφιλοποίηση προς ξήρανση. Η καθαρότητα του πεπτιδίου ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) χρησιμοποιώντας τα συστήματα $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 5:1 και $n\text{-BuOH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{H}_2\text{O}$ 4:1:1, καθώς και με χρήση φασματοσκοπίας NMR.

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή τόσο η TPP (L') όσο και η HETPP (L) υφίστανται σε διαφορετικές καταστάσεις πρωτονίωσης ανάλογα με το pH. Έτσι σε $\text{pH}<2$ επικρατεί η μονοκατιονική μορφή $(L \text{ ή } L')\text{H}_3^+$, σε $\text{pH}=2-5$ η μορφή αμφολύτη (zwitterion) $(L \text{ ή } L')\text{H}_2^\circ$, σε $\text{pH}=5-6$ η μονοανιονική μορφή $(L \text{ ή } L')\text{H}^-$ και τέλος σε $\text{pH}=6-7$ η διανιονική μορφή $(L \text{ ή } L')^{2-}$ (σχήμα 4, σελίδα 4).

Τα σύμπλοκα $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{LH})\text{Cl}_2]_2\}$ και $[\text{M}(\text{L}'\text{H})\text{Cl}]_2$ ($\text{M} = \text{Zn}^{2+}, \text{Cd}^{2+}$) παρασκευάστηκαν αναμιγνύοντας ισομοριακές ποσότητες (0.25mmol) των υποκαταστάτων HETPP (LH)⁻ και TPP (L'H)⁻ με τα χλωρίδια των μετάλλων σε μεθανολικά διαλύματα. Η παρασκευή των μονοανιονικών μορφών των υποκαταστατών έγινε (πριν την προσθήκη του μετάλλου) προσθέτοντας σε μεθανολικά διαλύματα των $(L, L')\text{H}_3^+$ δυο ισοδύναμα μεθανολικού διαλύματος KOH και απομακρύνοντας το αδιάλυτο KCl με φυγοκέντρηση. Το ιονικό άλας $[\text{ZnCl}_3][\text{LH}_3]^+$ συντέθηκε χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε ο υποκαταστάτης στην αμφολυτική του μορφή $(\text{LH}_2)^\circ$. Ο τελευταίος παρασκευάστηκε με την προσθήκη ενός ισοδύναμου μεθανολικού KOH σε διάλυμα της μονοκατιονικής μορφής της HETPP $(\text{LH}_3)^+$. Σε όλες τις περιπτώσεις καταβυθίστηκαν άμεσα λευκά στερεά, τα οποία αναδεύτηκαν για 12h σε θερμοκρασία δωματίου, απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση, εκκλύθηκαν με μικρές ποσότητες MeOH, Me_2CO και Et_2O και τελικά ξηράθηκαν στους 50°C υπό υψηλό κενό για 2h. Οι αποδόσεις σε όλες τις περιπτώσεις ήταν 50-60%. Το σύμπλοκο $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{LH})\text{Cl}]_2$ παρασκευάστηκε με ανάμιξη ισομοριακών ποσοτήτων (0.25 mmol) CuCl_2 και της μονοανιονικής μορφής του υποκαταστάτη HETPP (LH)⁻ (η οποία παρασκευάστηκε όπως αναφέρθηκε πιο πάνω) σε μεθανολικά-αιθανολικά διαλύματα 2:3. Καταβυθίστηκε άμεσα στερεό ανοικτού πράσινου χρώματος το οποίο αναδεύτηκε για 12h σε



θερμοκρασία δωματίου, απομονώθηκε με φυγοκέντρωση, εκπλύθηκε με μικρές ποσότητες MeOH/EtOH 2:3, Me₂CO, Et₂O και τελικά ξηράνθηκε στους 50°C υπό υψηλό κενό για 2h. Η απόδοση ήταν 40-45%.

Οι δευτεριωμένες μορφές των συμπλόκων και των υποκαταστατών HETPP και TPP παρασκευάστηκαν με διάλυση μικρής ποσότητας τους σε D₂O, κατάλληλη ρύθμιση του pH (για τους υποκαταστάτες) και λυοφιλοποίηση.

Τέλος κατάλληλοι κρύσταλλοι για ανάλυση ακτίνων X της HETPP αναπτύχθηκαν με αέρια διάχυση ακετόνης σε αραιό υδατικό διάλυμα του υποκαταστάτη (pH=3.0).

III. Μεθοδοι αναλύσεων και όργανα.

- ▶ Οι στοιχειακές αναλύσεις C,H,N,S των συμπλόκων έγιναν στο Κέντρο Μικροαναλύσεων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε έναν CARLO-ERBA EA-1108 στοιχειακό αναλυτή, ενώ οι αναλύσεις των μετάλλων έγιναν ογκομετρικά με πρότυπο διάλυμα Titriplex [279].
- ▶ Τα φάσματα υπερύθρου και μακρινού υπερύθρου (far-IR) καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker IFS 48 στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου McGill στο Μόντρεαλ (Καναδάς) και σε φασματοφωτόμετρα Perkin Elmer 783 και Perkin Elmer-Spectrum GX FT-IR στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με μορφή δισκίων KBr ή αιωρημάτων σε Nujol (mid-IR) και δισκίων CsI ή πολυαιθυλενίου (far-IR).
- ▶ Τα φάσματα Raman καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker-IFS 88 στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου McGill στο Μόντρεαλ (Καναδάς). Για τη διέγερση χρησιμοποιήθηκε η φασματική γραμμή 1064.1 nm ενός laser τύπου Nd³⁺:YAG.
- ▶ Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) σε διάλυμα καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Jasco V-570 χρησιμοποιώντας κυψελίδες από χαλαζία ή γυαλί 1 cm.
- ▶ Η κρυσταλλική δομή του υποκαταστάτη HETPP λύθηκε σε ένα Siemens P4 περιθλασόμετρο ακτίνων X, στο Πανεπιστήμιο της Νοτίου Καλιφόρνιας (ΗΠΑ). Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τις παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να βρεθούν στην [73].
- ▶ Τα φάσματα μάζας με την τεχνική electrospray (ES-MS) σε υδατικά διαλύματα καταγράφηκαν σε ένα φασματογράφο Fisons VG Quattro εφοδιασμένο με μια VG-Biotech πηγή electrospray, στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Το δυναμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν 3.30 kV για τα θετικά και 3.00 kV για τα αρνητικά ιόντα [10].



► Οι ποτενσιομετρικές ογκομετρήσεις, για τα συστήματα M^{2+}/HETPP ($M=\text{Cu}, \text{Zn}, \text{Cd}$), M^{2+}/TPP ($M=\text{Zn}, \text{Cd}$), $\text{Cu}^{2+}/\text{Asp-Asp-Asn-Lys-Ile}$ και $\text{Cu}^{2+}/\text{HETPP/Asp-Asp-Asn-Lys-Ile}$ πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Lajos Kossuth (Debrecen, Ουγγαρία) καθώς και στο Εργαστήριο Ανόργανης και Γενικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Χρησιμοποιήθηκε είτε πεχάμετρο Radiometer PHM 84 εφοδιασμένο με ηλεκτρόδιο τύπου 6.0234.100 και μια DOSIMAT 715 αυτόματη προχοίδα του οίκου Metrohm, που περιείχε διάλυμα KOH 0.200N ελευθέρου ανθρακικών ιόντων, είτε ένας αυτόματος τιτλοδότης τύπου DL50 του οίκου Mettler Toledo που περιείχε το ίδιο διάλυμα. Οι ογκομετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε όγκο δείγματος 10ml, οι συγκεντρώσεις του μεταλλοϊόντος (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) και των υποκαταστατών (HETPP, TPP) ήταν 1-4mM, ενώ χρησιμοποιήθηκαν αναλογίες $M^{2+}/(\text{HETPP}$ ή $\text{TPP})$ 1:1-1:4. Για το σύστημα $\text{Cu}^{2+}/\text{Asp-Asp-Asn-Lys-Ile}$, ο όγκος του δείγματος ήταν 5ml, οι συγκεντρώσεις των Cu^{2+} και $\text{Asp-Asp-Asn-Lys-Ile}$ 2-4mM και οι μεταξύ τους αναλογίες 1:1 και 1:2. Τέλος στο σύστημα $\text{Cu}^{2+}/\text{HETPP/Asp-Asp-Asn-Lys-Ile}$ ο όγκος του δείγματος ήταν 5ml ενώ οι συγκεντρώσεις τους ήταν 2mM (Cu^{2+}), 4mM (HETPP) και 2mM (Asp-Asp-Asn-Lys-Ile). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 298°K με συνεχή διαβίβαση αερίου αργού μέσα στα υδατικά διαλύματα των δειγμάτων και υπό σταθερή ιονική ισχύ (0.2) που ρυθμιζονταν σε όλες τις περιπτώσεις με KCl εκτός απ' το σύστημα $\text{Cd}^{2+}/(\text{HETPP}$ ή $\text{TPP})$ που χρησιμοποιήθηκε KNO_3 . Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα PSEQUAD [280].

► Για τη μέτρηση της καταλυτικής ενεργότητας της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (γPDC) παρουσία τόσο Mg^{2+} και TPP όσο και των συμπλόκων $[\text{M}(\text{TPPH})\text{Cl}]_2$ ($M= \text{Zn}, \text{Cd}$), $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{HETPPH})\text{Cl}_2]_2\}$, $\text{Zn}(\text{LH}_3)\text{Cl}_3$ χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Ullrich [281]. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην προσθήκη του ενζύμου αλκοολική δεϋδρογονάση (ADH) και του συνενζύμου NADH στο μίγμα της αντίδρασης, οπότε η ADH ανάγει την παραγόμενη απ' την γPDC ακεταλδεΐδη σε αιθανόλη με ταυτόχρονη οξείδωση του NADH σε NAD^+ . Η ταχύτητα της οξείδωσης αυτής παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά μέσω της μείωσης της απορρόφησης του NADH στα 340nm. Στη συγκεκριμένη μελέτη το μίγμα της αντίδρασης (συνολικός όγκος 1ml, pH=6.0) περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (0.2M), πυροσταφυλικό νάτριο (33mM), NADH (0.2mM), ADH (10 μονάδες) και το ολοένζυμο ή το αποένζυμο (μέθοδος παρασκευής του στην [8]) της γPDC (0.06 μονάδες). Τα διαλύματα των συμπλόκων (10mM) ή των Mg^{2+} και TPP (10mM) περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα MES (pH=6.2). Ο έλεγχος της καταλυτικής ενεργότητας παρουσία των $\text{K}_2\{[\text{Zn}(\text{HETPPH})\text{Cl}_2]_2\}$ και $\text{Zn}(\text{HETPPH}_3)\text{Cl}_3$ έγινε απουσία πυροσταφυλικού νατρίου στο



αντιδρών μίγμα. Τέλος η συγκέντρωση της γPDC μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά μέσω της απορρόφησης στα 260 και 280 nm [282].

► Τα φάσματα ^{13}C -CP MAS NMR (με αποσύζευξη πρωτονίου) της HETPP και των συμπλόκων της, καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας τις τεχνικές της διασταυρούμενης πόλωσης (CP) και περιστροφής του δείγματος υπό τη “μαγική γωνία” (MAS) σε ένα φασματογράφο Chemagnetics CMX 300 (συχνότητα συντονισμού ^{13}C 75.3425 MHz), στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου McGill στο Μόντρεαλ (Καναδάς). Καταγράφηκαν επίσης τα ίδια φάσματα με την τεχνική της διακοπτόμενης αποσύζευξης (interrupted decoupling) στα οποία οι κορυφές οι οποίες οφείλονται στα μεθινικά και μεθυλενικά πρωτόνια εξαφανίζονται [213,283]. Ως εξωτερική αναφορά χρησιμοποιήθηκε TMS.

► Τα φάσματα ^1H , ^{13}C , ^{13}C -DEPT 135, ^{31}P και ^{113}Cd NMR σε διάλυμα καταγράφηκαν σε φασματογράφους Bruker AMX-400, Bruker AC-250, Jeol 270 και Varian XL300, στους 300°K, στο Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ή στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου McGill στο Μόντρεαλ (Καναδάς). Ως εξωτερικά πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν TSP (^1H -NMR), TMS (^{13}C -NMR), 85% H_3PO_4 (^{31}P -NMR) και υδατικό διάλυμα 0.1M $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ (^{113}Cd -NMR).

► Όλα τα φάσματα NMR δυο διαστάσεων (^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HMQC και ^1H - ^{13}C HMBC) καταγράφηκαν σε φασματογράφο Bruker AMX-400, στους 300°K, εκτός των φασμάτων ^1H - ^1H ROESY που έγιναν στους 278°K. Για το φάσμα ^1H - ^1H TOCSY χρησιμοποιήθηκε η παλμική ακολουθία MLEV-17, η διάρκεια της οποίας ήταν 50 msec. Καταγράφηκαν 256 διαστήματα σε χρόνο t_1 (1 sec) ενώ κάθε FID ήταν άθροισμα 16 ή 32 σαρώσεων και αναλύθηκε σε 1K σημεία. Για τα φάσματα ^1H - ^1H ROESY και ^1H - ^1H NOESY χρησιμοποιήθηκαν τα μικροπρογράμματα παλμικών ακολουθιών roesyph και noesyg5tp19 της Bruker. Ο χρόνος μίξης ήταν 400 msec, ενώ κάθε FID ήταν άθροισμα 150 ή 200 σαρώσεων. Τα φάσματα ^1H - ^{13}C HMQC [284] και ^1H - ^{13}C HMBC [285] καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας τα μικροπρογράμματα παλμικής ακολουθίας της Bruker inv4gstr και inv4gslprndat αντίστοιχα. Καταγράφηκαν 384 διαστήματα σε χρόνο t_1 (1 sec) ενώ κάθε FID ήταν άθροισμα 30 ή 100 σαρώσεων αντίστοιχα και αναλύθηκε σε 1 K σημεία.

Στα φάσματα HMQC και HMBC γίνεται συσχέτιση πρωτονίων με ετεροπυρήνες (στην παρούσα περίπτωση συσχέτιση ^1H με ^{13}C , 1^η και 2^η διάσταση του φάσματος αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα στο φάσμα ^1H - ^{13}C HMQC εμφανίζονται κορυφές διασταύρωσης που οφείλονται στη σύζευξη του πυρήνων ^1H και ^{13}C οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με έναν δεσμό ($^1\text{J}_{\text{C-H}}$, μεγάλη



σταθερά σύζευξης). Αντιθέτως στο φάσμα ^1H - ^{13}C HMBC παρατηρούνται κορυφές διασταύρωσης που οφείλονται στις συζεύξεις $^2\text{J}_{\text{C-H}}$, $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ (μέσω δυο και τριών δεσμών αντίστοιχα-μικρή σταθερά σύζευξης-) [284, 285].

► Τα δείγματα για τις παραπάνω μελέτες παρασκευάστηκαν με διάλυση ποσότητας υποκαταστάτη (HETPP ή TPP) ή των συμπλόκων M^{2+} -HETPP, M^{2+} -TPP ($\text{M} = \text{Cu}, \text{Zn}, \text{Cd}$) σε D_2O έτσι ώστε οι τελικές τους συγκεντρώσεις να είναι 10-15mM για ^1H , ^{31}P και ^1H - ^1H ROESY NMR, ενώ 50-100mM για ^{13}C , ^{13}C -DEPT 135 και ^{113}Cd NMR. Το pH των διαλυμάτων των συμπλόκων ή των υποκαταστατών ρυθμίστηκε όπου ήταν αναγκαίο με διαλύματα KOD και DCI και μετρήθηκε σε πεχάμετρο Gison GLP21 εφοδιασμένο με συνδυασμένο ηλεκτρόδιο υάλου//Ag/AgCl τύπου U402-M6-S7/100 του οίκου Mettler Toledo. Η βαθμονόμηση του ηλεκτροδίου έγινε με ρυθμιστικά διαλύματα του οίκου Merck (pH= 4.01, 7.00, 10.00).

Για τη μελέτη αλληλεπίδρασης M^{2+} :Asp-Asp-Asn-Lys-Ile ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$) το πεπτιδίο διαλύθηκε σε μίγμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4 και μετά προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος CdCl_2 ή ZnCl_2 ώστε η μοριακή αναλογία πεπτιδίου:μεταλλοϊόντος να είναι 1:1. Οι συγκεντρώσεις M^{2+} και πεπτιδίου ήταν 10mM για τα πειράματα ^1H και ^1H - ^1H TOCSY NMR ενώ ήταν 50mM για τα πειράματα ^{13}C , ^{113}Cd , ^1H - ^{13}C HMQC και ^1H - ^{13}C HMBC NMR. Το pH ρυθμίστηκε στο 6.8 με προσθήκη υδατικού διαλύματος KOH 0.01 N. Οι ίδιες συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν και για την καταγραφή των φασμάτων του ελεύθερου πεπτιδίου σε pH 6.0 και 7.0.

Για τη μελέτη αλληλεπίδρασης των συμπλόκων $\text{K}_2\{[\text{M}(\text{HETPPH})_2\text{Cl}_2]\}$ ($\text{M} = \text{Zn}, \text{Cd}$) με το πεπτιδίο, το τελευταίο διαλύθηκε σε μίγμα $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ 1:4 και σ' αυτό προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος συμπλόκου έτσι ώστε η μοριακή αναλογία πεπτιδίου προς σύμπλοκο να είναι 2:1. Οι συγκεντρώσεις του πεπτιδίου ήταν 10mM και των συμπλόκων 5mM για τα πειράματα ^1H , ^{31}P , ^1H - ^1H TOCSY και ^1H - ^1H NOESY NMR, ενώ για τα πειράματα ^{13}C , ^{113}Cd , ^1H - ^{13}C -HMQC και ^1H - ^{13}C HMBC NMR ήταν 60 και 30mM αντίστοιχα. Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 6.3.

Τέλος το διάλυμα για την καταγραφή του φάσματος ^1H - ^1H ROESY NMR στο σύστημα Cu^{2+} -HETPP-πεπτιδίο παρασκευάστηκε με διάλυση κατάλληλων ποσοτήτων πεπτιδίου, HETPP και CuCl_2 σε D_2O ώστε να επιτευχθεί η μοριακή αναλογία Cu^{2+} :HETPP:πεπτιδίο 1:100:50 (συγκεντρώσεις 0.04:4.2 mM αντίστοιχα). Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 7.2.

► Τα φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού συνεχούς κύματος (CW-EPR) τόσο του συμπλόκου $\text{Cu}_2(\text{HETPPH})_2\text{Cl}_2$ όσο και των συστημάτων Cu^{2+} :Asp-Asp-Asn-Lys-Ile, Cu^{2+} :HETPP: Asp-Asp-Asn-Lys-Ile σε υδατικά διαλύματα, καταγράφηκαν σε θερμοκρασία υγρού ηλίου σε ένα φασματογράφο EP-200D X-band της Bruker εφοδιασμένο με έναν κρουστάτη του



οίκου Oxford Instruments στη CEA, Saclay, Γαλλία. Η συχνότητα των μικροκυμάτων και η ένταση του μαγνητικού πεδίου μετρήθηκε με ένα μετρητή συχνότητας μικροκυμάτων τύπου HP 5350B της Bruker και μ' ένα ER035M-NMR μετρητή gauss της Bruker αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις των $\text{Cu}_2(\text{HETPPH})_2\text{Cl}_2$, Cu^{2+} και πεπτιδίου ήταν 4 mM, ενώ η αναλογία συγκεντρώσεων στο σύστημα $\text{Cu}^{2+}:\text{HETPP}:\text{πεπτίδιο}$ ήταν 2:4:2 mM. Η ιονική ισχύς ρυθμίστηκε στο 0.2 με KCl ενώ όπου ήταν απαραίτητο το pH ρυθμίστηκε με διάλυμα KOH 0.01 N.

► Τα φάσματα παλμικού ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού ESEEM (Electron Spin Echo Envelope Modulation) (διαμόρφωση της ηχούς των ηλεκτρονικών spin) [120,246,247,286] και HYSCORE (Hyperfine Sublevel Correlation Spectroscopy) (Φασματοσκοπία συσχετισμού υπέρλεπτων υποσταθμών) [249-252,287] καταγράφηκαν σε θερμοκρασία 40°K σ' ένα φασματογράφο Bruker ESP380 εφοδιασμένο μ' έναν διηλεκτρικό συντονιστή [120] στη CEA, Saclay, Γαλλία. Φάσματα ESEEM και HYSCORE καταγράφηκαν τόσο για το σύμπλοκο $\text{Cu}_2(\text{HETPPH})_2\text{Cl}_2$ όσο και για τα συστήματα $\text{Cu}^{2+}:\text{Asp-Asp-Asn-Lys-Ile}$ και $\text{Cu}^{2+}:\text{HETPP}:\text{Asp-Asn-Lys-Ile}$.

Στο φάσμα ESEEM καταγράφεται η ένταση της ηχούς των spin ως συνάρτηση του χρόνου $t+T$, χρησιμοποιώντας την παλμική ακολουθία $\pi/2-t-\pi/2-T-\pi/2$. Η συχνότητα μικροκυμάτων στην οποία καταγράφηκε το φάσμα ήταν 9.6 GHz, ενώ η βέλτιστη τιμή της έντασης του μαγνητικού πεδίου B προσδιορίστηκε με μια σειρά πειραμάτων ESEEM σάρωσης πεδίου (καταγραφή της έντασης της ηχούς των spin συναρτήσει της έντασης του εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου, χρησιμοποιώντας την παλμική ακολουθία $\pi/2-144 \text{ nsec}-\pi$, με διάρκεια παλμών $\pi/2$ και π 32 και 64 nsec αντίστοιχα). Η αρχική τιμή του χρόνου T ήταν 16 nsec και αυξάνονταν σταδιακά με βήμα 8 nsec. Οι τιμές του τ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 120-720 nsec ενώ η χρονική διάρκεια του παλμού $\pi/2$ ήταν 16 nsec.

Τα φάσματα HYSCORE καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας την παλμική ακολουθία $\pi/2-t-\pi/2-t_1-\pi-t_2-\pi/2-t$ και στα οποία η ηχώ των spin καταγράφεται ως συνάρτηση των t_1 και t_2 ($1^{\text{η}}$ και $2^{\text{η}}$ διάσταση του φάσματος αντίστοιχα). Η χρονική διάρκεια των $\pi/2$ και π παλμών ήταν 16 και 32 nsec αντίστοιχα. Τυπικά καταγράφηκαν 170-256 σημεία για κάθε διάσταση για $\tau = 88, 120$ και 136 nsec, ενώ τα t_1 και t_2 αυξάνονταν σταθερά με βήμα 32 nsec σε σχέση με τις αρχικές τους τιμές. Λεπτομέρειες τόσο για την επεξεργασία όσο και την προσομοίωση όλων των παραπάνω φασμάτων EPR με σκοπό την εξαγωγή δομικών πληροφοριών μπορούν να βρεθούν στην [268].



The following information was obtained from the records of the
 Bureau of the Census, Department of Commerce, Washington, D. C.
 for the year 1954. The information is presented in the form of
 a table showing the number of persons in the United States
 who were employed in the various occupations listed below.
 The total number of persons employed in all occupations
 was 100,000,000. The number of persons employed in
 agriculture, forestry, and fishing was 10,000,000.
 The number of persons employed in manufacturing and
 construction was 30,000,000. The number of persons
 employed in transportation, communication, and public
 utilities was 5,000,000. The number of persons
 employed in trade, commerce, and services was 25,000,000.
 The number of persons employed in government was 10,000,000.
 The number of persons employed in education, health, and
 social services was 15,000,000. The number of persons
 employed in the arts, sciences, and professional services
 was 5,000,000. The number of persons employed in
 the unclassified category was 10,000,000.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. B.S.P Jansen, W.F. Donath, *Proc.K.Aad.Watensch, Amsterdam*, (1926), 29, 1390.
- [2]. R.R Williams, R.E Waterman, J.C Kereztesy, E.R Buchman, *J.Am.Chem.Soc*, (1935), 57, 536.
- [3]. J. Kraut, J. Reed, *Acta.Cryst*, (1962), 15, 747.
- [4]. A.White, P.Handler, E.L.Smith, "*Principles of Biochemistry*", McGraw-Hill, 5th edition, page 1154.
- [5]. Ι.Γ Γεωργιάτσου, "*Βιοχημεία, τόμοι Α&Β*", εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, 6^η έκδοση, Θεσσαλονίκη, 1989.
- [6]. R.R.Williams, T.D.Spies, "*Vitamin B1 and its Use in Medicine*", Macmillan publs, N.York, 1938.
- [7]. J.P.Bonjour, *Int.J.Vitamin.Nutr.Res*, (1980), 50, 321.
- [8]. A.H.Cain, G.R.Sullivan, J.D.Roberts, *J.Am.Chem.Soc*, (1977), 99, 6423.
- [9]. J.P.Taglioni, J. Fournier, *C.R.Acad.Sci.Paris*, (1979), 288C, 141.
- [10]. G.Malandrinos, M.Louloudi, A.I.Koukkou, I.Sovago, K.Drainas, N.Hadjiliadis *J.Biol.Inorg.Chem*, (2000), 5, 218.
- [11]. G.D. Maier, D.E. Metzler, *J.Am.Chem.Soc*, (1957), 79, 4387.
- [12]. F. Friedrich, "*Vitamins*", Walter de Gruyter, New York, (1988), 339-404.
- [13]. P. Haake, J.M. Duclos, *Biochemistry*, (1974), 13, 5358.
- [14]. A.Takamizava, K.Hirai, T. Ishiba, I.Makino, *Chem.Pharm.Bull*, (1971), 19, 759.
- [15]. K. Lohmann, P. Schuster, *Biochem Z*, (1937), 294, 188.
- [16]. K. Lohmann, P. Schuster, *Naturwiss*, (1937), 25, 26.
- [17]. N. Hadjiliadis, J. Markopoulos, *Chim.Chron, New Ser*, (1981), 10,1.
- [18]. E. Barron, C. Lyman, M. Lipton, J. Coldinger, *J.Biol.Chem*, (1941), 140, 11.
- [19]. T. Ugai, S. Tanaka, S. Dokava, *J.Pharm.Soc.Jpn*, (1943), 63, 269.
- [20]. S. Mizuhara, P. Handler, *J.Am.Chem.Soc*, (1954), 76, 571.
- [21]. H. Koffler, L. Krampitz, *Bacteriol.Proc*, (1955), 113.
- [22]. R. Breslow, *J.Am.Chem.Soc*, (1958), 80, 3719.
- [23]. R. Kluger, *Ann.N.Y.Acad.Sci*, (1982), 378, 63.
- [24]. F. Lipmann, *Nature*, (1936), 138, 1097.



- [25]. O. Zima, R. Williams, *Ber.*, (1940), 73, 941.
- [26]. W. Langebeck, "Die Organischen Katalysatoren", *Julius Springer, Berlin*, (1935), 55.
- [27]. K. Wiesner, Z. Valenta, *Experientia*, (1956), 12, 192.
- [28]. S. Mizuhara, R. Tamura, H. Arata, *Proc. Japan. Acad.*, (1951), 27, 302.
- [29]. S. Mizuhara, P. Handler, *J. Am. Chem. Soc.*, (1954), 76, 571.
- [30]. R. Breslow, *Chem&Ind. London*, (1956), 28.
- [31]. L. Ingraham, F. Westheimer, *Chem&Ind. London*, (1956), 846.
- [32]. H. Holzer, K. Beaucamp, *Angew. Chem.*, (1959), 71, 776.
- [33]. H. Holzer, K. Beaucamp, *Biochim. Biophys. Acta*, (1961), 46, 225.
- [34]. G. Carlson, G. Brown, *J. Biol. Chem.*, (1960), 235, PC3.
- [35]. L. Krampitz, "Thiamin Diphosphate and Its Catalytic Functions", *Marcel Dekker, New York*, (1970).
- [36]. C. Risinger, W. Gore, K. Pulver, *Synthesis*, (1974), 659.
- [37]. A. Schellenberger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, (1967), 6, 1024.
- [38]. F. Jordan and Y. Mariam, *J. Am. Chem. Soc.*, (1978), 100, 2534.
- [39]. A. Schellenberger, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1982), 378, 51.
- [40]. M. Sax, P. Pulsinelli, J. Pletcher, *J. Am. Chem. Soc.*, (1974), 96, 155.
- [41]. Y. Lindqvist, G. Schneider, U. Ermler, M. Sundstrom, *The EMBO Journal*, (1992), 11, 2373.
- [42]. M. Nikkola, Y. Lindqvist, G. Schneider, *J. Mol. Biol.*, (1994), 238, 387.
- [43]. Y. Muller, G. Schulz, *Science*, (1993), 259, 965.
- [44]. D. Dobritzsch, S. Konig, G. Schneider, G. Lu, *J. Biol. Chem.*, (1998), 273, 20196.
- [45]. M. Hasson, A. Muscate, M. McLeish, L. Polovnikova, J. Gerlb, G. Kenyon, G. Petsko, D. Ringe, *Biochemistry*, (1998), 37, 9918.
- [46]. F. Dyda, W. Furey, S. Swaminathan, M. Sax, B. Farrenkopf, F. Jordan, *Biochemistry*, (1993), 32, 6165.
- [47]. W. Shin, J. Pletcher, M. Sax, G. Blank, *J. Am. Chem. Soc.*, (1979), 101, 2462.
- [48]. W. Shin, J. Pletcher, M. Sax, *Acta Cryst. Sect B*, (1981), 37, 1719.
- [49]. W. Shin, Y.C. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, (1986), 108, 7078.
- [50]. N.H. Hu, T. Tokuno, K Aoki, *Inorg. Chim. Acta*, (1999), 295, 71.
- [51]. W. Shin, D-G. Oh, C-H. Chae, T-S. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.*, (1993), 115, 12238.
- [52]. F. Jordan, G. Chen, S. Nishikawa, B.S. Wu, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1982), 378, 14.
- [53]. F. Jordan, *J. Org. Chem.*, (1982), 47, 2748.



- [54]. R. Friedemann, C. Breitkopf, *Bioorg.Chem*, (1994), 22, 119.
- [55]. M.W. Washabaugh, W.P. Jencks, *Biochemistry*, (1998), 27, 5044.
- [56]. M. Lobell, D.H.G. Crout, *J.Am.Chem.Soc*, (1996), 118, 1867.
- [57]. A. Schellenberger, J. Ermer, G. Hubner, *FEBS lett*, (1992), 299, 163.
- [58]. M. Louloudi, N. Hadjiliadis, *Coord.Chem.Rev*, (1994), 135/136, 429.
- [59]. J.D. Brown, E. Hoerger, S.F. Mason, *J.Chem.Soc*, (1955), 211, 4035.
- [60]. R. Friedemann, H. Neef, *Biochim.Biophys.Acta*, (1998), 1385, 245.
- [61]. J.A. Zoltowicz, T.D. Baugh, R.W. King, *J.Org.chem*, (1978), 43, 4670.
- [62]. A. Schellenberger, *Biochim.Biophys.Acta*, (1998), 1385, 177.
- [63]. D. Kern, G. Kern, H. Neef, K. Tittmann, M. Killenberg-Jabs, C. Wikner, G. Schneider, G. Hubner, *Science*, (1997), 275, 67.
- [64]. A. Schellenberger, G. Hubner, H. Neef, *Methods Enzymol*, (1997), 279, 131.
- [65]. J. Wittorf, C. Gubler, *Eur.J.Bioch*, (1971), 22, 544.
- [66]. A. Schellenberger, G. Hubner, *Angew.Chem.Int.Ed.Engl*, (1968), 7, 68.
- [67]. P. Haake, L. Bausher, W. Miller, *J.Am.Chem.Soc*, (1969), 91, 113.
- [68]. P. Haake, L. Bausher, J. McNeal, *J.Am.Chem.Soc*, (1971), 93, 7045.
- [69]. J. Hogg, *Bioorg.Chem*, (1981), 10, 233.
- [70]. J. Pletcher, M. Sax, G. Blank, M. Wood, *J.Am.Chem.Soc*, (1977), 99, 1396.
- [71]. W. Shin, J. Pletcher, M. Sax, *J.Am.Chem.Soc*, (1979), 101, 4365.
- [72]. K. Dodi, I.P. Gerothanassis, N. Hadjiliadis, A. Schreiber, R. Bau, I.S. Butler, P.J. Barrie, *Inorg.Chem*, (1996), 35, 6513.
- [73]. G. Malandrinos, M. Louloudi, C.A. Mitsopoulou, I.S. Butler, R. Bau, N. Hadjiliadis, *J.Biol.Inorg.Chem*, (1998), 3, 437.
- [74]. J. Crosby, R. Stone, G. Lienhard, *J.Am.Chem.Soc*, (1970), 92, 2891.
- [75]. A. Tubano, W. Furey, J. Pletcher, M. Sax, D. Pike, R. Kluger, *J.Am.Chem.Soc*, (1982), 104, 3089.
- [76]. R. Kluger, *Chem.Rev*, (1987), 87, 863.
- [77]. S. Menon-Rudolph, S. Nishikawa, X. Zeng, F. Jordan, *J.Am.Chem.Soc*, (1992), 114, 10110.
- [78]. X. Zeng, A. Chung, M. Haran, F. Jordan, *J.Am.Chem.Soc*, (1991), 113, 5842.
- [79]. D.J. Kuo, F. Jordan, *J.Biol.Chem*, (1983), 225, 13415.
- [80]. F. Jordan, H. Li, A. Brown, *Biochemistry*, (1999), 38, 6369.
- [81]. W.W. Washbaugh, W.P. Jencks, *J.Am.Chem.Soc*, (1989), 111, 674.



- [82]. G. Barletta, W.P. Huskey, F. Jordan, *J.Am.Chem.Soc.*, (1992), 114, 7607.
- [83]. G. Barletta, W.P. Huskey, F. Jordan, *J.Am.Chem.Soc.*, (1997), 119, 2536.
- [84]. Y. Zou, *Ph.D Dissertation*, Rutgers University Graduate Faculty at Newark, Newark, N.J., (1999).
- [85]. F.G. Bordwell, A.V. Satish, C.B. Rios, A. Chung, F. Jordan, *J.Am.Chem.Soc.*, (1990), 112, 792.
- [86]. W. Shin, J. Pletcher, G. Blank, M. Sax, *J.Am.Chem.Soc.*, (1977), 99, 3491.
- [87]. S. Eppendorfer, S. Konig, R. Golbik, H. Neef, K. Lehle, R. Jaenicke, A. Schellenberger, *Biol.Chem.Hoppe-Seyler*, (1993), 374, 1129.
- [88]. D.E. Green, D. Herbert, V. Subrahmanyam, *J.Biol.Chem.*, (1941), 138, 327.
- [89]. G.A. Kochetov, P.P. Fillipov, R.A. Usmanov, *Biokhimiya*, (1969), 34, 810.
- [90]. Y.A. Muller, Y. Lindqvist, W. Furey, G.E. Schultz, F. Jordan, G. Schneider, *Structure*, (1993), 1, 95.
- [91]. H. Grande, R. Houghton, C. Veeger, *Eur.J.Bioch.*, (1973), 37, 563.
- [92]. D. White, R. Drago, *Inorg.Chem.*, (1971), 10, 2727.
- [93]. A. Gallo, I. Hansen, H. Sable, T. Swift, *J.Biol.Chem.*, (1972), 247, 5913.
- [94]. A. Gallo, H. Sable, *J.Biol.Chem.*, (1975), 250, 4986.
- [95]. P.T. Talbert, J.A. Weaver, P. Hambright, *J.Inorg.Nucl.Chem.*, (1970), 32, 2147.
- [96]. A. Marzotto, G. Bandoli, D.E. Clemente, F. Benetollo, L. Galzigna, *J.Inorg.Nucl.Chem.*, (1973), 35, 2769.
- [97]. M.R. Caira, G.V. Fazakerleg, P.W. Linder, L.R. Nussinibeni, *Acta.Cryst.Sect B*, (1974), 30, 1660.
- [98]. G.V. Fazakerleg, J.C. Russel, *J.Inorg.Nucl.Chem.*, (1975), 37, 2377.
- [99]. M.F. Richardson, K. Franklin, D.M. Thomson, *J.Am.Chem.Soc.*, (1975), 97, 3204.
- [100]. D.A. Clemente, G. Bandoli, F. Benetollo, A. Marzoto, *J.Cryst.Mol.Struct.*, (1974), 4, 1.
- [101]. J. Casas, A. Castineiras, M.D. Couce, G. Martinez, J. Sordo, J.M. Varela, *J.Organomet.Chem.*, (1996), 517, 165.
- [102]. J. Casas, E.E. Castellano, M.D. Couce, A. Sanchez, J. Sordo, C. Taboada, E.M. Vazquez-Lopez, *Main group Met Chem*, (1999), 22, 439.
- [103]. K. Aoki, N.H. Hu, T. Tokumo, A.O. Adeyemo, G.N. Williams, *Inorg.Chim.Acta*, (1999), 290, 145.
- [104]. N. Hadjiliadis, J. Markopoulos, G. Pneumatikakis, D. Katakis, T. Theophanides,



Inorg.Chim.Acta, (1977), 25, 21.

- [105]. N. Hadjiliadis, J. Markopoulos, *Chim.Chron.*(New Ser), (1981), 10, 1.
- [106]. R. Cramer, R. Maynard, J. Ibers, *J.Am.Chem.Soc*, (1981), 103, 76.
- [107]. R. Cramer, R. Kirkup, M. Carrie, *Inorg.Chem*, (1988), 27, 123.
- [108]. R. Cramer, R. Maynard, R. Evangelista, *J.Am.Chem.Soc*, (1984), 106, 111.
- [109]. K. Aoki, H. Yamazaki, *J.Am.Chem.Soc*, (1985), 107, 6242.
- [110]. A. Bencini, E. Borghi, *Inorg.Chim.Acta*, (1987), 135, 85.
- [111]. E. Archibong, A. Adeyemo, K. Aoki, H. Yamazaki, *Inorg.Chim.Acta*, (1989), 156, 77.
- [112]. K. Aoki, N. Hu, H. Yamazaki, A. Adeyemo, *Inorg.Chim.Acta*, (1990), 175, 247.
- [113]. K. Aoki, H. Yamazaki, A. Adeyemo, *Inorg.Chim.Acta*, (1991), 180, 117.
- [114]. K. Aoki, H. Yamazaki, *J.Am.Chem.Soc*, (1980), 102, 6878.
- [115]. N.H. Hu, *Inorg.Chim.Acta*, (1991), 186, 209.
- [116]. S. Kitagawa, S. Matsuyama, M. Munakata, N. Osawa, H. Masada, *J.Chem.Soc.Dalton.Trans*, (1991), 1717.
- [117]. R.E. Cramer, M.J.J. Carrie, *Inorg.Chem*, (1993), 32, 3509.
- [118]. J. Casas, E. Castellano, M. Couce, A. Sanchez, J. Sordo, J. Varela, J. Zukerman-Schpector, *Inorg.Chem*, (1995), 34, 2430.
- [119]. J. Casas, A. Castineiras, M. Couce, A. Sanchez, J. Sordo, J. Varela, *Polyhedron*, (1995), 14, 1825.
- [120]. M. Louloudi, Y. Delligiannakis, J.P. Tuchagues, B. Donnadiou, N. Hadjiliadis, *Inorg.Chem*, (1997), 36, 6335.
- [121]. J. Casas, E. Castellano, M. Couce, J.R. Leis, A. Sanchez, J. Sordo, M.I. Suarez-Gimeno, C. Taboada, J. Zukerman-Schpector, *Inorg.Chem.Commun*, (1998), 1,93
- [122]. G. Micera, D. Sanna, E. Kiss, E. Garribba, T.Kiss, *J.Inorg.Bioch*, (1999), 75, 303.
- [123]. F. Jordan, *J.Am.Chem.Soc*, (1976), 98, 808.
- [124]. M. Louloudi, N.Hadjiliadis, J.A. Feng, S. Sukumar, R. Bau, *J.Am.Chem.Soc*, (1990), 112, 7233.
- [125]. M. Louloudi, N. Hadjiliadis, J.P. Laussac, R. Bau, *Metal Based Drugs*, (1994), 1, 221.
- [126]. M. Louloudi, N. Hadjiliadis, *J.Chem.Soc.Dalton.Trans*, (1991), 1635.
- [127]. N. Hadjiliadis, M. Louloudi, I.S. Butler, *Spectrochim.Acta Part A*, (1991), 47, 445
- [128]. M. Louloudi, N. Hadjiliadis, I.S. Butler, *J.Chem.Soc.Dalton.Trans*, (1992), 1401.



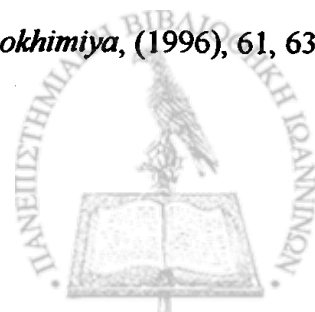
- [129]. K. Dodi, M. Louloudi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, *J.Inorg.Biochem*, (1999), 73, 41.
- [130]. N.H. Hu, T. Norifusa, K. Aoki, *Polyhedron*, (1999), 18, 2987.
- [131]. C. Neuberg, L. Karczag, *Biochem. Z*, (1911), 36, 68.
- [132]. J. Ullrich, J.H. Wittorf, C.J. Gubler, *Biochim.Biophys.Acta*, (1966), 113, 595.
- [133]. E. Kellermann, P.G. Seeboth, C.P Hollenberg, *Nucleic Acids.Res*, (1986), 14, 8963.
- [134]. S. Hohmann, H. Cederberg, *Eur.J.Biochem*, (1990), 188, 615.
- [135]. B.C. Farrenkopf, F. Jordan, *Protein Express.Purif*, (1992), 3, 101.
- [136]. T.C. Hoppner, H.D. Doelle, *Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol*, (1983), 17, 152.
- [137]. A.D. Neale, R.K. Scopes, R.E.H Wettenhall, N.J. Hoogenraad, *J.Bacteriol*, (1987), 169, 1024.
- [138]. C.E. Clifton, *Rroc.Soc.Exp.Biol.Med*, (1940), 43, 585.
- [139]. J. Swings, J. De Ley, *Bacteriol.Rev*, (1977), 41, 1.
- [140]. S. Konig, D. Svergun, M.H.J. Koch, G. Hubner, A. Schellenberger, *Biochemistry*, (1992), 31, 8726.
- [141]. M. Pohl, J. Grotzinger, A. Wollmer, M.R Kula, *Eur.J.Biochem*, (1994), 224, 651.
- [142]. R.J. Diefenbach, R.G. Duggleby, *Biochem J*, (1991), 276, 439.
- [143]. A. Schellenberger, G. Hubner, *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem*, (1967), 348, 491.
- [144]. T.P. Singer, J. Pensky, *J.Biol.Chem*, (1952), 196, 375.
- [145]. G. Hubner, R. Weidhase, A. Schellenberger, *Eur.J.Biochem*, (1978), 92, 175.
- [146]. G. Hubner, A. Schellenberger, *Biochem.Int*, (1986), 13, 767.
- [147]. S. Konig, D. Svergun, M.H.J. Koch, G. Hubner, A. Schellenberger, *Eur.Biophys.J*, (1993), 22, 185.
- [148]. H. Lehmann, G. Fischer, G. Hubner, K.D. Kohnert, A. Schellenberger, *Eur.J.Biochem*, (1973), 32, 83.
- [149]. H. Uhlemann, A. Schellenberger, *FEBS Lett*, (1976), 63, 37.
- [150]. C.F. Hawkins, A. Borges, R.N. Perham, *FEBS Lett*, (1989), 255, 77.
- [151]. W. Furey, P. Arjunan, L. Chen, M. Sax, F. Guo, F. Jordan, *Biochim.Biophys.Acta*, (1998), 1385, 253.
- [152]. P. Arjunan, T. Umland, F. Dyda, S. Swaminathan, W. Furey, M. Sax, B. Farrenkopf, Y. Gao, D. Zhang, F. Jordan, *J.Mol.Biol*, (1996), 256, 590.
- [153]. Y.A. Muller, G. Schumacher, R. Rudolph, G.E. Schultz, *J.Mol.Biol*, (1994), 247, 315.
- [154]. R.J. Diefenbach, J.M. Candy, J.S. Mattick, R.G. Duggleby, *FEBS Lett*, (1992), 296, 95.



- [155]. M. Killenberg-Jabs, S. Konig, I. Eberhardt, S. Hohmann, G. Hubner, *Biochemistry*, (1997), 36, 1900.
- [156]. K. Tittmann, K. Mesch, M. Pohl, G. Hubner, *FEBS Lett*, (1998), 441, 404.
- [157]. F. Jordan, N. Nemeria, F. Guo, I. Baburina, Y. Gao, A. Kahyaoglu, H. Li, J. Wang, J. Yi, J.R. Guest, W. Furey, *Biochim.Biophys.Acta*, (1998), 1385, 287.
- [158]. A.K. Chang, P.F. Nixon, R.G. Duggleby, *Biochem.J*, (1999), 339, 255.
- [159]. S. Sun, R.G. Duggleby, R.L. Schowen, *J.Am.Chem.Soc*, (1995), 117, 7317.
- [160]. G. Schenk, F.J. Leeper, R. England, P.F. Nixon, R.G. Duggleby, *Eur.J.Biochem*, (1997), 248, 73.
- [161]. J.M. Candy, R.G. Duggleby, *Biochim.Biophys.Acta*, (1998), 1385, 323.
- [162]. G. Schenk, F.J. Leeper, R. England, P.F. Nixon, R.G. Duggleby, *Eur.J.Biochem*, (1997), 248, 63.
- [163]. R. Kluger, T. Smyth, *J.Am.Chem.Soc*, (1981), 103, 1214.
- [164]. F.J. Alvarez, J. Ermer, G. Hubner, A. Schellenberger, R.L. Schowen, *J.Am.Chem.Soc*, (1995), 117, 1678.
- [165]. M. Lobell, D.H.G. Krout, *J.Chem.Soc.Perkin.Trans*, (1996), 1, 1577.
- [166]. F. Guo, D. Zhang, A. Kahyaoglu, R.S. Farid, F. Jordan, *Biochemistry*, (1998), 37, 13379.
- [167]. F.J. Alvarez, J. Ermer, G. Hubner, A. Schellenberger, R.L. Schowen, *J.Am.Chem.Soc*, (1991), 113, 8402.
- [168]. Y. Lindqvist, G. Schneider, *Curr.Opin.Struct.Biol*, (1993), 3, 896.
- [169]. I. Baburina, Y. Gao, Z. Hu, F. Jordan, *Biochemistry*, (1994), 33, 5630.
- [170]. I. Baburina, D.J. Moore, A. Volkov, A. Kahyaoglu, F. Jordan, R. Mendelsohn, *Biochemistry*, (1996), 35, 10249.
- [171]. I. Baburina, H. Li, B. Bennion, W. Furey, F. Jordan, *Biochemistry*, (1998), 37, 1235.
- [172]. I. Baburina, G. Dikdan, F. Guo, G.I. Tous, B. Root, F. Jordan, *Biochemistry*, (1998), 37, 1245.
- [173]. H. Li, F. Jordan, *Biochemistry*, (1999), 38, 10004.
- [174]. H. Li, W. Furey, F. Jordan, *Biochemistry*, (1999), 38, 9992.
- [175]. T.K. Harris, M.W. Washabaugh, *Biochemistry*, (1995), 34, 13994.
- [176]. G. Hubner, K. Tittmann, M. Killenberg-Jabs, J. Schaffner, M. Spinka, H. Neef, D. Kern, G. Kern, G. Schneider, C. Wikner, S. Ghisla, *Biochim.Biophys.Acta*, (1998), 1385, 221.
- [177]. G.L. Barletta, Y. Zou, W.P. Huskey, F. Jordan, *J.Am.Chem.Soc*, (1997), 119, 2356.



- [178]. D.J. Kuo, F. Jordan, *Biochemistry*, (1983), 22, 3735.
- [179]. F. Jordan, *FEBS Lett*, (1999), 457, 298.
- [180]. R. Breslow, *J.Am.Chem.Soc*, (1957), 79, 1762.
- [181]. G. Schenk, R.G. Duggleby, P.F. Nixon, *Int.J.Biochem.Cell.Biol*, (1998), 30, 1297.
- [182]. G. Haba, I.G. Leder, E. Racker, *J.Biol.Chem*, (1955), 214, 409.
- [183]. A. Mocali, F. Paoletti, *Eur.J.Biochem*, (1989), 180, 213.
- [184]. T. Takeuchi, K. Nishino, Y. Itokawa, *Biochem.Biophys.Acta*, (1986), 872, 24.
- [185]. G.A. Sprenger, U. Schorken, G. Sprenger, H. Sahm, *Eur.J.Biochem*, (1995), 230, 525.
- [186]. J.R. Tate, P.F. Nixon, *Anal.Biochem*, (1987), 160, 78.
- [187]. C. Wikner, L. Meshalkina, U. Nilsson, M. Nikkola, Y. Lindqvist, G. Schneider, *J.Biol.Chem*, (1994), 269, 32144.
- [188]. C. Wikner, L. Meshalkina, U. Nilsson, S. Backstrom, Y. Lindqvist, G. Schneider, *Eur.J.Biochem*, (1995), 233, 750.
- [189]. C. Wikner, U. Nilsson, L. Meshalkina, C. Udekwu, Y. Lindqvist, G. Schneider, *Biochemistry*, (1997), 36, 15643.
- [190]. G.A. Kochetov, *Biokhimiya*, (1986), 51, 2020.
- [191]. M.V. Kovina, V.A. Selivanov, N.V. Kochevona, G.A. Kochetov, *FEBS Lett*, (1997), 418, 11.
- [192]. P.C. Heinrich, H. Steffen, P. Janser, O. Wiss, *Eur.J.Biochem*, (1972), 30, 533.
- [193]. E.H. Jung, T. Takeuchi, K. Nishino, Y. Itokawa, *Int.J.Biochem*, (1988), 20, 1255.
- [194]. G. Schneider, Y. Lindqvist, *Biochim.Biophys.Acta*, (1998), 1385, 387.
- [195]. M. Sundstrom, Y. Lindqvist, G. Schneider, *FEBS Lett*, (1992), 313, 229.
- [196]. L. Meshalkina, U. Nilsson, C. Wikner, T. Kostikowa, G. Schneider, *Eur.J.Biochem*, (1997), 244, 646.
- [197]. S. Konig, A. Schellenberger, H. Neef, G. Schneider, *J.Biol.Chem*, (1994), 269, 10879.
- [198]. U. Nilsson, L. Meshalkina, Y. Lindqvist, G. Schneider, *J.Biol.Chem*, (1997), 272, 1864.
- [199]. Y. Kabori, D.C. Myles, G. Whitesides, *J.Org.Chem*, (1992), 57, 5899.
- [200]. U. Nilsson, L. Hecquet, T. Gefflaut, C. Guerard, G. Schneider, *FEBS Lett*, (1998), 424, 49.
- [201]. B.A. McCool, S.G. Plonk, P.R. Martin, C.K. Singleton, *J.Biol.Chem*, (1993), 268, 1397.
- [202]. C. Wikner, U. Nilsson, L. Meshalkina, C. Udekwu, Y. Lindqvist, G. Schneider, *Biochemistry*, (1997), 36, 11643.
- [203]. N.N. Sidorova, R.A. Usmanov, A.N. Kuimov, G.A. Kochetov, *Biokhimiya*, (1996), 61, 635.



- [204]. R.A. Usmanov, N.N. Sidorova, G.A. Kochetov, *Biochem.Mol.Biol.Int*, (1996), 38, 307.
- [205]. G. Schneider, Y. Lindqvist, *Bioorg.Chem*, (1993), 21, 109.
- [206]. J.E. Huheey, "Ανόργανη Χημεία, Τρίτη Έκδοση", μετάφραση από Ν. Χατζηλιάδη
Θ. Καμπανό, Σ. Περλεπέ, εκδόσεις "ΙΩΝ", Αθήνα, 1993.
- [207]. R.W. Hay, "Βιοανόργανη Χημεία", μετάφραση από Ε. Μάνεση-Ζούπα, Δ. Ράπτη,
εκδόσεις Παπαζήση, Αθήνα 1992.
- [208]. J. Pletcher, M. Wood, G. Blank, W. Shin, M. Sax, *Acta Crystallogr.Sect B*, (1977), 33, 3349.
- [209]. J. Pletcher, M. Sax, *J.Am.Chem.Soc*, (1972), 94, 3998.
- [210]. L.J. Bellamy, "The infrared spectra of complex molecules", 3rd edn,
Chapman&Hall, London, 1992.
- [211]. Μ. Λουλούδη, "Διδακτορική διατριβή", Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας,
Ιωάννινα, 1992.
- [212]. Α. Βαλαβανίδης, "Βασικές αρχές Μοριακής φασματοσκοπίας και εφαρμογές στην Οργανική
Χημεία", εκδόσεις Σύγχρονα Θέματα, Αθήνα, 1990.
- [213]. G.R. Hays, *Analyst*, (1982), 107, 241.
- [214]. N.J. Clayden, *Chem Scr*, (1988), 28, 211.
- [215]. C.J. Croombridge, R.K. Harris, K.J. Packer, B.J. Say, S.F. Tanner,
J.Chem.Soc.Chem.Commun, (1980), 174.
- [216]. J.G. Hexen, M.H. Frey, S.J. Opella, *J.Am.Chem.Soc*, (1981), 103, 224.
- [217]. E. Schempp, P.J. Bray, *J.Magn.Res*, (1971), 5, 78.
- [218]. G.C. Levy, R.L. Lichter, G.L. Nelson, "Carbon-13 spectroscopy", 2nd edn,
J.Willey&Sons, 1980.
- [219]. R.H. Bible, "Interpretation of NMR spectra", Plenum Press, N.York, 1965.
- [220]. L.M. Jackman, S. Sternhell, "Applications of NMR spectroscopy in Organic Chemistry",
2nd edn, Pergamon Press, 1969.
- [221]. I. Bertini in 'ESR and NMR of paramagnetic species in biological and related systems',
I. Bertini, R.S Drago Eds., Reidel Dordrecht, Holland, 1980.
- [222]. R.D. Cornelli, P.A. Hart, W.W. Cleland, *Inorg.Chem*, (1977), 16, 2799.
- [223]. J.C. Lautens, R. Kluger, *J.Org.Chem*, (1992), 57, 6410.
- [224]. W.W. Cleland, *Methods.Enzymol* (1982), 87, 159.
- [225]. T. Son, M. Roux, M. Ellenberger, *Nucleic.Acid.Res*, (1975), 79, 1214.
- [226]. M.F. Summers, *Coord.Chem.Rev*, (1988), 86, 43.



- [227]. A.B.P. Lever, "*Inorganic Electronic Spectroscopy (second edition)*", Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, 1984.
- [228]. J. Peisach and W.E. Blumberg, *Arch.Bioch.Biophys*, (1974), 165, 691.
- [229]. A.M. Chauret-Monges, M. Halida, A. Crerat, E.J. Vincent, *Arch.Bioch.Biophys*, (1981), 207, 311.
- [230]. G. Hubner, S. Konig, K.D. Schnackerz, *FEBS Lett*, (1992), 314, 101.
- [231]. K. Wuthrich, "*NMR of proteins and Nucleic Acids*", Willey Interscience Publs, New York, 1996.
- [232]. R. Richarz, K. Wuthrich, *Biopolymers*, (1978), 17, 2133.
- [233]. I. Bertini, C. Luchinat, L. Messori, A. Scozzafava, G. Pelleciani, M. Sola, *Inorg.Chem*, (1986), 25, 1782.
- [234]. Π. Τσιβεριώτης, "*Διδακτορική Διατριβή*", Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα, 1997.
- [235]. M.-T. Cung, M. Marraud, P. Lefrancier, M. Dardenne, J-F. Bach, J.-P. Laussac, *J. Biol.Chem*, (1988), 263, 5574.
- [236]. J.-P. Laussac, G. Peyrou, H. Mazarguill, M. Erard, M. Bourdonneau, M.-T. Cung, *New.J.Chem*, (1993), 17, 607.
- [237]. M. Gervais, G. Commenges, J.-P. Laussac, *Magn.Reson.Chem*, (1987), 25, 594.
- [238]. J.-P. Laussac, H. Mazarguill, D. Prome, M. Erard, M.-T. Cung in "*Genetic Responce to Metals*", (B. Sarkar eds), Marcel Dekker Inc, New York, 1995.
- [239]. J.-P. Laussac, P. Orlewski, M.-T. Cung, *Coord.Chem.Rev*, (1996), 149, 179.
- [240]. J.-P. Laussac, P. Lefrancier, M. Dardenne, J.-F. Bach, M. Marraud, M.-T. Cung, *Inorg.Chem*, 1988, 27, 4094.
- [241]. M.-T. Cung, J.-P. Laussac, *New.J.Chem*, (1990), 14, 293.
- [242]. A. Otter, X. Liu, G. Kotovych, *J.Magn.Reson*, (1990), 86, 657.
- [243]. W. Goumakos, J.-P. Laussac, B. Sarkar, *Biochem.Cell.Biol*, (1991), 69, 809.
- [244]. H. Sigel, R.B. Martin, *Chem.Rev*, 1982, 82, 385.
- [245]. B.J. Hathaway, D. E. Billing, *Coord.Chem.Rev*, 1970, 5, 143.
- [246]. G.L. Rowan, E. Hahn, W.B. Mims, *Phys.Rev. A*, 1965, 138, 4.
- [247]. S.A. Dikanov, Y.D. Tsvetkov, *ESEEM spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton, 1992.
- [248]. Y. Deligiannakis, M. Louloudi, N. Hadjiliadis, *Coord.Chem.Rev*, 2000, 204, 1.
- [249]. Y. Deligiannakis, L. Astrakas, G. Kordas, R.A. Smith, *Phys.Rev. B*, 1998, 58, 11420.



- [250]. L. Astrakas, Y. Deligiannakis, G.J. Kordas, *Chem.Phys*, 1998, 109, 8612.
- [251]. Y. Deligiannakis J. Hanley, A.W. Rutherford, *J.Am.Chem.Soc*, 1999, 121, 7653.
- [252]. Y. Deligiannakis J. Hanley, A.W. Rutherford, *J.Am.Chem.Soc*, 2000, 122, 400.
- [253]. E.J. Billo, *Inorg.Nucl.Chem.Lett*, 1974, 10, 613.
- [254]. A.K.W. Stephens, C.J Orvig, *Chem.Soc.Dalton.Trans*, 1998, 3049.
- [255]. J.-F. Galey, B. Decock-Le Reverend, A. Lebkiri, L.D. Pettit, S.I. Pyburn, H. Kozlowski, *J.Chem.Soc.Dalton.Trans*, 1991, 2281.
- [256]. I. Sovago, T. Kiss, A. Gergely, *Inorg.Chim.Acta*, 1984, 93, L53.
- [257]. B. Decock-Le Reverend, A. Lebkiri, C. Livera, L.D. Pettit, *Inorg.Chim.Acta*, 1986, 124, L19.
- [258]. I. Sovago, D. Sanna, A. Dessi, K. Varnagy, G. Micera, *J.Inorg.Biochem*, 1996, 63, 99.
- [259]. J. Peisach, W.E. Blumberg, *Arch.Biochem.Biophys*, 1974, 165, 691.
- [260]. W.W. Paudler, *Nuclear Magnetic Resonance*, Wiley-Interscience Publication, 1987.
- [261]. G. Gemperle, G. Aebli, A. Schweiger, R.R. Ernst, *J.Magn.Res*, 1990, 88, 241.
- [262]. S.A. Dikanov, M.K. Bowman, *J.Magn.Res.A*, 1995, 116, 125.
- [263]. S.A. Dikanov, M.K. Bowman, *J.Biol.Inorg.Chem*, 1998, 3, 18.
- [264]. S.A. Dikanov, A.M. Tyryshkin, M.K. Bowman, *J.Magn.Res*, 2000, 144, 228.
- [265]. Y. Deligiannakis, A.W. Rutherford, *J.Am.Chem.Soc*, 1997, 119, 4471.
- [266]. A. Pöpl, L. Kevan, *J.Phys.Chem*, 1996, 100, 3387.
- [267]. C.A. Hutchison, D.B. McKay, *J.Chem.Phys*, 1977, 66, 3311.
- [268]. G. Malandrinos, M. Louloudi, Y. Deligiannakis, N. Hadjiliadis, submitted for publication in *J.Am.Chem.Soc*.
- [269]. C. Buy, T. Matsui, S. Adrianambinitsoa, C. Sigalat, G. Girault, J.-L. Zimmerman, *Biochemistry*, 1996, 35, 14821.
- [270]. S.A. Dikanov, B.D. Liboiron, K.H. Thompson, E. Vera, V.G. Yuen, J.H. McNeil, C. Orvig, *J.Am.Chem.Soc*, 1999, 121, 11004.
- [271]. W. Möhl, A. Schweiger, H. Motschi, *Inorg.Chem*, 1990, 29, 1536.
- [272]. N.M. Atherton, A.J. Horsewill, *Molecular Physics*, 1979, 37, 1349.
- [273]. A. Schweiger, *Structure and Bonding*, 1982, 51, 1.
- [274]. A. Pöpl, M. Hartmann, W. Böhlmann, R. Böttcher, *J.Phys.Chem*, 1998, 102, 3599.
- [275]. K.J. Gruys, C.J. Halkides, P.A. Frey, *Biochemistry*, (1987), 26, 7575.
- [276]. J.A. Gutowski, *Methods Enzymol*, (1979), 62, 120.



- [277]. G. Stavropoulos, K. Karagiannis, D. Vynios, D. Papaioannou, D.W Aksnes, N.A. Froystein, G.W Francis, *Acta Chem. Scand*, (1991), 45, 1047.
- [278]. K. Barlos, O. Chatzi; D. Gatos, G. Stavropoulos , *Int. J. Pept. Protein Res*, (1991), 37, 513.
- [279]. E. Merck, “*Complexometric Assay Methods with Titriplex[®]*”, Darmstadt, Germany, 1982.
- [280]. L. Zekany, I. Nagypal, In: D.J. Leggett (ed) “*Computational Methods for the Determination of Stability Constants*”, Plenum, New York, 1991.
- [281]. J. Ullrich, *Methods Enzymol*, (1970), 18A, 109.
- [282]. E. Layne, *Methods Enzymol*, (1957), 3, 451.
- [283]. W. Xiaoling, Z. Shammin, W. Xaewen, *J.Magn.Reson*, (1988), 77, 343.
- [284]. A. Bax, S.J. Subramanian, *J. Magn. Reson*, (1986), 67, 565.
- [285]. A. Bax, M.F. Summers, *J. Am. Chem. Soc*, (1986), 108, 2093.
- [286]. Ι. Γεροθανάσης, Ι. Δεληγιαννάκης, “*Μέθοδοι Μαγνητικού Συντονισμού*”, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα ΕΠΕΑΕΚ στη Βιοανόργανη Χημεία (υπεύθυνος Καθ. Ν. Χατζηλιάδης), Ιωάννινα, 1999.
- [287]. Λουκάς.Γ. Άστρακας, “*Διδακτορική Διατριβή*”, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Γενικό Τμήμα, Αθήνα 1999.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

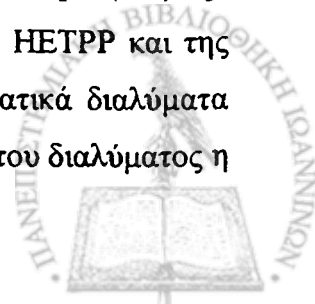
Η μελέτη αυτή αναφέρεται στην αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων (Cu(II), Zn(II), Cd(II)) με το πραγματικό ενδιάμεσο της ενζυμικής αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος, την 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορική θειαμίνη (HETPP). Επιπλέον αναφέρεται στην αλληλεπίδραση των παραπάνω ιόντων με την πρόδρομη ένωση της HETPP την πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP), καθώς και με την αλληλεπίδραση αυτών και της HETPP παρουσία του πεπτιδίου Asp-Asp-Lys-Ile (μικτά σύμπλοκα). Το τελευταίο αποτελεί την περιοχή 185-189 του ενεργού κέντρου του ενζύμου τρανσκετολάση (γTK).

Η διατριβή αποτελείται από πέντε τμήματα (εισαγωγή (Α), σκοπός (Β), αποτελέσματα-συζήτηση (Γ), τελικά συμπεράσματα (Δ) και πειραματικό μέρος (Ε)).

Στο πρώτο τμήμα (Α) επιχειρείται μια όσο το δυνατόν ευρύτερη ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας τόσο όσον αφορά την θειαμίνη και τα παράγωγά της, όσο και τα ενζυμικά συστήματα στα οποία αποτελεί συνένζυμο δίνοντας έμφαση στην πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (γPDC) και στην τρανσκετολάση (γTK). Αναφέρονται επίσης οι προτεινόμενοι μηχανισμοί μη ενζυμικής και ενζυμικής κατάλυσης, ο ρόλος των διάφορων τμημάτων του μορίου της θειαμίνης κατά την κατάλυση, καθώς και οι μελέτες συμπλοκοποίησης τόσο της απλής θειαμίνης όσο και των παραγώγων “ενεργού αλδεΐδης”. Περνώντας στο τμήμα της ενζυμικής κατάλυσης, περιγράφονται αναλυτικά οι δομές των ενζύμων γPDC και γTK δίνοντας έμφαση στο ενεργό κέντρο και στο ρόλο των αμινοξικών καταλοίπων που το απαρτίζουν και συμμετέχουν έμμεσα ή άμεσα στην καταλυτική διεργασία. Σε όλο το εισαγωγικό τμήμα συζητείται ο πιθανός ρόλος των διαμορφώσεων F, S ή V της θειαμίνης κατά τη διάρκεια της κατάλυσης.

Στο δεύτερο τμήμα (Β) αναφερόμαστε στο σκοπό αυτής της μελέτης, στους λόγους επιλογής των συγκεκριμένων μεταλλικών ιόντων και υποκαταστατών και τέλος στο προσδοκώμενα αποτελέσματα.

Στο τρίτο μέρος (Γ) παραθέτονται και αναλύονται τα πειραματικά δεδομένα. Η αλληλεπίδραση των ιόντων Cu(II), Zn(II) και Cd(II) με την 2-(α-ύδροξυ-αίθυλ) πυροφωσφορική θειαμίνη σε μη υδατικά διαλύματα οδηγεί στην απομόνωση στερεών μεταλλικών συμπλόκων του τύπου $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ (M= Zn,Cd, L= HETPP) και $[Cu(LH)Cl]_2$ στα οποία τα ιόντα εντάσσονται μέσω του N(1') της πυριμιδίνης ενός μορίου HETPP και της πυροφωσφορικής ομάδας ενός άλλου μορίου (σχήμα 90, σελίδα 145). Σε υδατικά διαλύματα σχηματίζονται σύμπλοκα του ίδιου τύπου με τη διαφορά ότι αναλόγως του pH του διαλύματος η

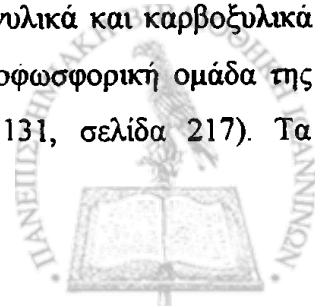


δεύτερη ομάδα $P\beta$ -OH και των δυο υποκαταστατών των διμερών είναι πρωτονιωμένη ή μη. Η σειρά σταθερότητας των παραπάνω συμπλόκων όπως αποδεικνύεται από σύγκριση των τιμών τους $\log\beta$ (ολικές σταθερές σχηματισμού) είναι $Cu(II) > Cd(II) > Zn(II)$. Η εύκολη απομάκρυνση της πλευρικής ομάδας $CH_3CH(OH)-$ απ' τον C(2) του θειαζολίου υποδεικνύει ότι τα σύμπλοκα αυτά αποτελούν καλά μοντέλα συνενζυμικής δράσης. Επιπλέον βρέθηκε ότι τόσο ο υποκαταστάτης όσο και τα σύμπλοκα και στη στερεά φάση και σε διάλυμα, υιοθετούν την S-διαμόρφωση, γεγονός που τονίζει για μια ακόμη φορά τη σπουδαιότητα αυτής κατά την καταλυτική διεργασία.

Η αλληλεπίδραση των ιόντων $Zn(II)$, $Cd(II)$ με την πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP) σε μη υδατικά διαλύματα οδηγεί στην απομόνωση στερεών μεταλλικών συμπλόκων του τύπου $[M(L'H)Cl]_2$ ($M = Zn, Cd$, $L' = TPP$). Ο τύπος ένταξης που προτάθηκε για τα αντίστοιχα σύμπλοκα της HETPP ισχύει και σ' αυτή την περίπτωση, τόσο για τα στερεά σύμπλοκα (σχήμα 112, σελίδα 180) όσο και για τα σωματίδια που σχηματίζονται σε υδατικά διαλύματα. Σύγκριση των τιμών $\log\beta$ μεταξύ των αντίστοιχων σωματιδίων της HETPP και της TPP αποδεικνύει ότι τα πρώτα είναι σταθερότερα, γεγονός που ενισχύει την άποψη της ερευνητικής μας ομάδας ότι τα σύμπλοκα παραγώγων “ενεργού αλδεύδης” είναι σταθερότερα και σχηματίζονται ευκολότερα απ' ότι τα αντίστοιχα σύμπλοκα απλής θειαμίνης [58].

Ο έλεγχος της συνενζυμικής δραστηριότητας των συμπλόκων HETPP και TPP όσον αφορά την ενζυμική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος, αποδεικνύει ότι τα σύμπλοκα της TPP είναι καταλυτικά ανενεργά ενώ τα αντίστοιχα της HETPP (σύμπλοκο με Zn) δείχνουν υψηλή δραστηριότητα.

Στο τελευταίο μέρος αυτού του τμήματος μελετάμε την αλληλεπίδραση των συμπλόκων $Zn(II)$ και $Cd(II)$ της HETPP με το πεπτίδιο Asp-Asp-Asn-Lys-Ile, καθώς και την αλληλεπίδραση $Cu(II)$ -HETPP-πεπτιδίου σε υδατικά διαλύματα. Το πεπτίδιο αυτό αποτελεί τμήμα (185-189) του ενεργού κέντρου της γ TK και εντοπίζεται γύρω απ' την πυροφωσφορική ομάδα της HETPP [194]. Αρχικά μελετάμε την αλληλεπίδραση μόνο του πεπτιδίου με τα παραπάνω ιόντα, οπότε βρέθηκε ότι σχηματίζονται σωματίδια με ένταξη των ιόντων μέσω της N-τελικής αμινομάδας, καρβονυλικών και καρβοξυλικών ατόμων οξυγόνου (σύμπλοκα $Zn(II), Cd(II)$, σχήμα 122, σελίδα 198) και επιπλέον αποπρωτονιωμένων ατόμων αζώτου πεπτιδικών δεσμών (σύμπλοκα $Cu(II)$, σχήμα 135, σελίδα 225). Περνώντας στα μικτά συστήματα παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μικτών σωματιδίων στα οποία σε φυσιολογικό pH η σφαίρα ένταξης των ιόντων $Zn(II)$ και $Cd(II)$ αποτελείται από καρβονυλικά και καρβοξυλικά άτομα οξυγόνου προερχόμενα απ' το πεπτίδιο, το N(1') και την πυροφωσφορική ομάδα της HETPP, ενώ η N-τελική αμινομάδα είναι πρωτονιωμένη (σχήμα 131, σελίδα 217). Τα



σύμπλοκα αυτά αποτελούν πολύ καλά μοντέλα του ενεργού κέντρου της γΤΚ αφού και στο φυσικό ένζυμο το ιόν Ca(II) εντάσσεται με παρόμοιο τρόπο [194] (αν εξαιρέσουμε την επιπλέον συμμετοχή και του N(1') στα σύμπλοκά μας). Όσον αφορά το μικτό σύστημα Cu(II) -HETPP-πεπτιδίου, σχηματίζονται μικτά σύμπλοκα στα οποία το ιόν Cu(II) εντάσσεται μέσω της τελικής αμινομάδας, καρβοξυλικών οξυγόνων και ενός αποπρωτονιωμένου ατόμου αζώτου πεπτιδικού δεσμού, ενώ η σφαίρα ένταξης συμπληρώνεται απ' το N(1') και την πυροφωσφορική ομάδα της HETPP (σχήμα 141, σελίδα 234). Η S-διαμόρφωση διατηρείται και στα μικτά σωματίδια ενισχύοντας ακόμη περισσότερο το ρόλο της κατά την καταλυτική δράση.

Στο τέταρτο μέρος (Δ) αναφέρονται επιγραμματικά τα κυριότερα συμπεράσματα που προκύπτουν απ' αυτή τη μελέτη, ενώ στο πέμπτο μέρος (Ε) δίνονται λεπτομέρειες σχετικά με τις μεθόδους σύνθεσης και μελέτης όλων των ουσιών που αναφέρονται στη διατριβή.



SUMMARY

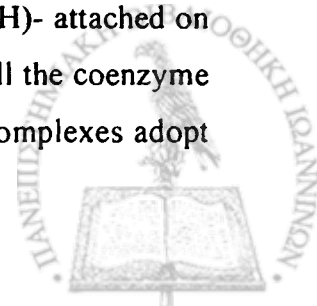
In this study we report on the interaction of metal ions (Cu(II), Zn(II), Cd(II)) with the real intermediate of the enzymatic decarboxylation of pyruvic acid, 2-(α -hydroxyethyl) thiamine pyrophosphate (HETPP). In addition we studied the interaction of the above mentioned ions with the precursor of HETPP, thiamine pyrophosphate (TPP), and the interaction of these ions and HETPP in the presence of the peptide Asp-Asp-Asn-Lys-Ile (ternary complexes): This peptide simulates the region 185-189 of the active center of the enzyme transketolase (γ TK).

This thesis consists of five sections (Introduction (A), Aim (B), Results and Discussion (C), Conclusions (D) and the Experimental Part (E)).

In the first section (A), a broad review based on the international literature of thiamine and its derivatives along with the enzymatic systems in which thiamine is used as a coenzyme, emphasizing in pyruvate decarboxylase (γ PDC) and transketolase (γ TK) is attempted. We discuss the proposed mechanisms of non enzymic and enzymic catalysis, the role of every part of the thiamine molecule during the enzymic cycle and finally the complexation behavior of both thiamine and its so called "active aldehyde" derivatives. Passing into the part of enzymic catalysis, an analytical description of the crystal structure of the enzymes γ PDC and γ TK is attempted, focusing on their active sites and the possible role of the present amino acid residues during the catalytic process. Through all the introduction part the possible role of the three main thiamine conformations F, S or V has been agitated.

In the second section (B) we refer to the aim of this study in addition analyzing the ligand and metal ions selection, and finally exposing the expected results.

In the third part we present, analyze and discuss the experimental data. The interaction of Cu(II), Zn(II) and Cd(II) with 2-(α -hydroxyethyl) thiamine pyrophosphate (HETPP) in non aqueous media results to the isolation of solid adducts of the general formulae $K_2\{[M(LH)Cl_2]_2\}$ ($M= Zn, Cd, L= HETPP$) and $[Cu(LH)Cl]_2$. Coordination takes place through the N(1') of a thiamine molecule and the pyrophosphate group of a second one (Figure 90, page 145). In aqueous media the complexation mode is the same, but depending upon the pH of the solutions the second P_{β} -OH groups of both ligands of the dimer are protonated or not. A simple comparison of the stability constants of these species reveals that Cu(II) forms the most stable complexes (Cu(II)>Cd(II)>Zn(II)). The easy release of the side chain $CH_3CH(OH)-$ attached on the C(2) of the thiazole ring indicates that the above complexes simulate very well the coenzyme activity of thiamine. In both solid state and solution the HETPP ligand and its complexes adopt the S-conformation, setting off its significance during catalysis.



In non aqueous media, the interaction of Zn(II) and Cd(II) ions with thiamine pyrophosphate (TPP) results to the isolation of solid adducts of the general formulae $[M(L'H)Cl]_2$ ($M= Zn, Cd, L'= TPP$). The proposed coordination mode is the same as in the case of HETPP complexes in both solid adducts (Figure 112, page 180) and the species formed in aqueous media. The HETPP forms more stable metal complexes than TPP does (comparison of the $\log\beta$ values). This finding further substantiate our previous proposal for easy formation of metal complexes of "active aldehyde" derivatives of thiamine and their enhanced stability [58].

The coenzyme activity of the metal complexes of HETPP and TPP in the enzymic decarboxylation of the pyruvic acid has been also evaluated. It was found that TPP complexes were totally inactive while the Zn(II)-HETPP complex showed high coenzyme activity.

Finally, the interaction of Zn(II) and Cd(II) complexes of HETPP with the peptide Asp-Asp-Lys-Ile as well as the interaction of Cu(II), HETPP and the above peptide were studied in aqueous media. This peptide is a part of the amino acid sequence of transketolase, i.e, 185-189, which is located into the active center around the pyrophosphate group of HETPP (coenzyme) [194]. Our study presents firstly the interaction of the above ions with the peptide. Several species were detected in which the metal ions coordinate through the N-terminal amino group, carbonyl and carboxyl oxygen atoms (Zn(II), Cd(II) complexes, Figure 122, page 198) and in the case of Cu(II) with additionally deprotonated amide groups (Cu(II) complexes, Figure 135, page 225). Going in to the ternary systems, the formation of ternary complexes in which the Zn(II) and Cd(II) ions are bound to carbonyl and carboxyl oxygen atoms, the N(1') and the pyrophosphate group of HETPP, being the N-terminal amino group protonated (Figure 131, page 217), was strongly supported from all the experimental data. The coordination mode of the above complexes was almost the same as the one found around the Ca(II) ion in the crystal structure of γ TK (except the N(1') coordination). Thus our complexes proved to be very good models for the active center of γ TK. The formation of ternary species in the system Cu(II)-HETPP-peptide in which the Cu(II) coordination sphere consisted of the N-terminal group, carboxylate oxygens, a deprotonated amide group, the N(1') and the pyrophosphate group of HETPP (Figure 141, page 234) was also strongly supported from our experimental data. In all the ternary species the HETPP molecule was found to adopt the S-conformation underlining once more that the S conformation should be of importance in the catalytic cycle.

In the fourth section (D) we present the general conclusions of this study and finally the fifth section (E) contains details about the synthetic procedures and characterization techniques of our complexes.

