ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ – ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΥΝΑΡΜΟΓΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΤΙΟΝΙΚΩΝ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΣΕ ΜΟΡΙΑ RNA »

ΜΑΡΚΕΤΑΚΗ ΕΜΜ. ΜΑΡΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

UNIVERSITY OF CRETE – DEPARTMENT OF CHEMISTRY

LABORATORY OF BIOINORGANIC CHEMISTRY

MASTER DEGREE

«SYNTHESIS OF CATIONIC PORPHYRINS AND THEIR NOUCLEOCIDIC ACTIVITY IN RNA MOLECULES»

MARKETAKI EMM. MARIA

HERAKLION 2008

Στον πατέρα μου…

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης όπως και το Ι.Τ.Ε για την υλικοτεχνική υποδομή που μου διέθεσαν ούτως ώστε να φέρω εις πέρας αυτό το μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης .

Ευχαριστώ τον καθηγητή μου , κύριο Κουτσολέλο Αθανάσιο για την εμπιστοσύνη και τη συμπαράστασή του αυτά τα χρόνια .Πιο πολύ όμως τον ευχαριστώ για το μεγάλο χαμόγελό του, κάθε φορά που περνούσα την πόρτα του γραφείου του , κάτι που μου έδινε πολλή δύναμη και κουράγιο να αντιμετωπίσω τις όποιες δυσκολίες προέκυπταν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής : τον καθηγητή κ. Καφετζόπουλο Δημήτρη και τον καθηγητή κ. Τοκατλίδη Κωνσταντίνο που δέχτηκαν να διορθώσουν την εργασία μου και να με συμβουλέψουν για ένα καλύτερο αποτέλεσμα όπως επίσης και να μου εξασφαλίσουν όσα χρειαζόμουν για την ολοκλήρωση της δουλειάς μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές που με βοήθησαν ιδιαίτερα, τον κ. Γανωτάκη Δημήτρη που με δέχτηκε στο εργαστήριό του για την ολοκλήρωση των πειραμάτων μου και τον κ. Τσιώτη Γιώργο για τις πολύτιμες συμβουλές του και τη διάθεσή του να βοηθήσει οποιαδήποτε στιγμή του το ζητούσα.

Στην κα Βαρδαλαχάκη Ελευθερία οφείλω να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ για τις ατέλειωτες συζητήσεις μας και την αγάπη που μου έδωσε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια.

Σε όλους τους συμφοιτητές και συναδέρφους μου στο εργαστήριο ένα μεγάλο ευχαριστώ και ιδιαίτερα στην Δόκτορα Λαδωμένου Πόπη που ήταν πάντα δίπλα μου στα πρώτα μου βήματα ,κάτι που έγινε αφορμή να εξελιχθεί η σχέση μας σε μία πολύ δυνατή φιλία, στον Δόκτορ Χαραλαμπίδη Γιώργο και στη Δόκτορα Δαφνομήλη Δήμητρα για τη βοήθειά τους και την άψογη συνεργασία που είχαμε ενώ στα νεότερα μέλη του εργαστηρίου, τη Λίτσα Φωτεινή, τη Ζερβάκη Γαλάτεια, τη Στάγγελ Χριστίνα και την Σκόνδρα Αγγελική για το πολύ όμορφο κλίμα που είχαμε στο εργαστήριο .

Επίσης ευχαριστώ πολύ τα μέλη του εργαστηρίου του κου Γανωτάκη για τη φιλοξενία που μου έδειξαν και τις πολύ ωραίες στιγμές που ζήσαμε παρέα . Όμως ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω να πω στον Δόκτορα Τουλουπάκη Λευτέρη που με στήριξε και με βοήθησε τόσο πολύ με τις γνώσεις του, που θεωρώ πως χωρίς τη βοήθειά του θα ήταν αδύνατο να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία.

Ευχαριστώ επίσης τον Πετράκη Νίκο, από το εργαστήριο του κου Τοκατλίδη για τη βοήθειά του στην ολοκλήρωση τω ηλεκτροφορήσεων.

Στους φίλους και συμφοιτητές μου θέλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την παρουσία τους στη ζωή μου. Πιο συγκεκριμένα στη Χιλετζάκη Σοφία και το Χατζάκη Μανόλη για τις πολύ όμορφες στιγμές που μου χάρισαν αυτά τα χρόνια.

Ένα ιδιαίτερο όμως ευχαριστώ θα ήθελα να πω στο φίλο μου Δόκτορα Μαργαρό Γιάννη , τόσο για τις πολύτιμες γνώσεις που μου χάρισε, όσο και για το ήθος και την αγάπη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια.

Στους φίλους μου εκτός πανεπιστημίου οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ για τις στιγμές που μου χαρίζουν και μέσα από αυτές παίρνω τη δύναμη να αντεπεξέλθω σε όποια προβλήματα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου. Αρχικά τη μητέρα μου, που είναι πάντα κοντά μου , που είμαι σίγουρη πως χωρίς την αμέριστη βοήθεια και αγάπη που τόσα χρόνια που έδινε , δεν θα είχα καταφέρει τίποτα, που είναι πάντα εκεί και στα καλά και στα άσχημα…να με στηρίζει και να με βοηθάει. Έπειτα ένα μεγάλο ευχαριστώ στα αδέρφια μου, Μύρων , Γιώργο, Μαρία και Βάσια που ήταν πάντα για μένα γονείς, αδέρφια, φίλοι , που έκαναν κάθε δυσκολία να φαίνεται μικρή.

Και τέλος στο μπαμπά μου ,στον οποίο και αφιερώνω την παρούσα εργασία, ένα μεγάλο ευχαριστώ που μου έμαθε πως είναι να αγωνίζεσαι με αξιοπρέπεια ακόμα και τις πιο δύσκολες ώρες… που μου έμαθε να δίνω, να προσφέρω , να ζω και να συνεχίζω… ευχαριστώ τον πατέρα μου, που υπήρξε έστω και για λίγο στη ζωή μου , μα η παρουσία του όπως και η απουσία του με έκαναν καλύτερο άνθρωπο…

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η σύνθεση τεχνητών RNA νουκλεασών. Νουκλεάσες ονομάζονται τα ένζυμα τα οποία προκαλούν τμήση νουκλεϊνικών οξέων. Η αναγκαιότητα σύνθεσης τεχνητών νουκλεασών έγκειται στην επίτευξη τμήσης μορίων RNA ογκογενών ιών, χωρίς ταυτόχρονα να καταστρέφεται το γενετικό υλικό λόγω της εξειδίκευσης που παρουσιάζουν. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως ομάδες υδροξαμικών οξέων εμφανίζουν νουκλεοσιδική δράση παρουσία ιόντων λανθανιδών. Έχει αναφερθεί επίσης η ικανότητα δέσμευσης πορφυρινών σε διπλοελικομένες περιοχές μορίων RNA. Γι΄αυτούς τους λόγους θελήσαμε να συνθέσουμε κατιονικά πορφυρινικά παράγωγα τα οποία φέρουν ως υποκαταστάτες ομάδες υδροξαμικών οξέων.

Συγκεκριμένα συντέθηκαν τα εξής μόρια: MeC4pMH, MeC4pCISH, MeC4pTRAH, MeC4pTRIH, MeC4pTERTH. . Οι τρεις πρώτες πορφυρίνες χρησιμοποιήθηκαν στις περαιτέρω μελέτες λόγω του ότι ήταν οι μόνες υδατοδιαλυτές. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των συντιθέμενων πορφυρινών με μόρια RNA με χρήση της φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού (UV-Vis). Πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις και τα αποτελέσματα έδειξαν πως η MeC4pMH αλληλεπιδρούσε ισχυρά, η MeC4pCISH ασθενέστερα, ενώ η MeC4pTRAH δεν αλληλεπίδρασε καθόλου με το RNA λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Έπειτα πραγματοποιήθηκε βιοχημική μελέτη για να εξακριβωθεί η πιθανή τους δράση ως τεχνητές νουκλεάσες παρουσία λανθανιδικών ιόντων. Συγκεκριμένα με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης διαπιστώθηκε η νουκλεοσιδική δράση της MeC4pMH, χωρίς να είναι απαραίτητη η παρουσία λανθανιδικών ιόντων σε ποσοστό 100 %. Νουκλεοσιδική δράση παρουσίασε επίσης και η MeC4pCISH η οποία όμως ενισχύθηκε από την παρουσία ιόντων Lu^{+3}, ενώ η MeC4pTRAH δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη νουκλεοσιδική δράση.

Ως γενικό συμπέρασμα της παρούσης εργασίας είναι ότι από τις συντιθέμενες πορφυρίνες οι δύο πρώτες (MeC4pMH , MeC4pCISH) εμφάνισαν νουκλεοσιδική δράση. Εξάγαμε επίσης το συμπέρασμα πως για να παρουσιάζει η πορφυρίνη νουκλεοσιδική δράση θα πρέπει απαραίτητα να έχει προηγηθεί αλληλεπίδραση με το μόριο του RNA. Η αλληλεπίδραση αυτή εξαρτάται από το βαθμό υποκατάστασης όπως επίσης και από στερεοχημικούς παράγοντες.

Summary

The aim of this thesis is the synthesis of artificial RNA nucleases. Nucleases are enzymes that induce cleavage of nucleic acids. The synthesis of artificial nucleases is essential due to possible cleavage of RNA tumor virus molecules, while at the same time the genetic material remains unaffected, due to their great selectivity .In the literature it has been proposed that hydroxamic acids show nucleosidic activity in the presence of lanthanide ions. It has also been shown that porphyrins intercalate with double stranded regions of RNA. Due to the above findings we synthesized cationic porphyrin derivatives substituted with groups.of hydroxamic acid. More specifically the following molecules were synthesized: MeC4pMH, MeC4pCISH, MeC4p TRAH, Me C4 TRIH, Me C4 pTERTH. The first three porphyrins were used in further studies because there were the only ones soluble in water. In addition, we studied the interaction of the above porphyrins with RNA molecules using UV-Vis spectroscopy. Titration studies were preformed and the results showed that MeC4pMH intercalated strongly with RNA molecules, MeC4pCISH weaker and MeC4pTRAH did not show any intercalation due to stereochemical barriers. Following, biochemical studies were performed in order to investigate the possible action of porphyrins as artificial nuleases in the presence of lanthanide ions. More specifically, with the use of electrophoreses we obtained 100 % nucleosidic activity of MeC4pMH, in the absence of lanthanide ions. Porphyrin MeC4pCISH also showed nucleosidic activity that was reinforced by the presence of Lu^{+3} ions, while MeC4p TRAH did not show any significant nucleosidic activity. Finally, from the findings of this thesis it can be concluded that the first two synthesized porphyrins (MeC4pMH , MeC4pCISH) showed nucleosidic activity. We also concluded that in order for a porphyrin to appear nucleosidic activity it is necessary its intercalation with the molecule of RNA. The intercalation depends on the degree of substitution and on stereochemistry of the porhyrin molecules.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα **1**

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή **3**

1.1 ΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ - ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ **3**

1.1.1 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ 5

1.1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ 7

1.1.3 ΚΑΤΙΟΝΙΚΕΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ 9

1.2 ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΑ ΟΞΕΑ - ΙΣΤΟΡΙΚΟ **12**

1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 13

1.2.2 ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΑ ΟΞΕΑ ΩΣ ΧΗΛΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ 14

1.2.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 16

1.3 ΛΑΝΘΑΝΙΔΕΣ - ΙΣΤΟΡΙΚΟ **17**

1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΛΑΝΘΑΝΙΔΩΝ 18

1.3.2 ΒΑΘΜΙΔΕΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΩΝ ΛΑΝΘΑΝΙΔΩΝ 19

1.3.3 ΣΥΝΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΛΑΝΘΑΝΙΔΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ 21

1.3.4 ΦΥΣΙΚΑ ΑΠΟΘΕΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΛΑΝΘΑΝΙΔΩΝ 23

1.4 ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΑ ΟΞΕΑ RNA – DNA. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ **26**

1.4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ 28

1.4.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ RNA 31

1.4.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΟΥ RNA 33

1.4.4 ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ RNA ΚΑΙ DNA 34

1.4.5 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΟΥ RNA 36

1.4.6 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ 42

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ **43**

Κεφάλαιο 2: Σύνθεση Πορφυρινικών Παραγώγων **52**

2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΟ **52**

2.2 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ **52**

2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ **55**

2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΙΟΝΙΚΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ ΜΕ ΟΜΑΔΑ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ **59**

Κεφάλαιο 3: Φασματοσκοπική Μελέτη **63**

3.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ. **63**

3.2 ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ **63**

3.3 ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΟ ΡΕΥΜΑ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ **64**

3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 66

3.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 74

3.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 77

Κεφάλαιο 4: Βιοχημικές Μέλετες 82

4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ-RNA ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 82

4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 82

4.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 88

4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ 89

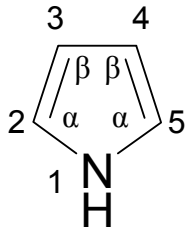
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 102

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 ΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ - ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι πορφυρίνες και οι αντίστοιχοι πολυπυρρολικοί μακροκυκλικοί δακτύλιοι είναι από τα πιο ευρέως μελετημένα μακροκυκλικά συστήματα.[1,2] Αυτό οφείλεται τόσο στην παρουσία τους στη φύση, όπου έχουν κρίσιμο ρόλο σε πολλά βιολογικά συστήματα, όσο και στις ενδιαφέρουσες φυσικές και χημικές ιδιότητες τους. Περαιτέρω, ο βασικός πορφυρινικός σκελετός που βρίσκεται σε φυσικά συστήματα, όπως την αίμη, τη χλωροφύλλη και τη βακτηριοχλωροφύλλη είναι ίσως από τα παλαιότερα βιοοργανικά μόρια στη Γη.[2] Οι πρώτοι ερευνητές προσελκύθηκαν κυρίως από τα έντονα χρώματα των ενώσεων αυτών, για να αποδειχθεί στη συνέχεια ότι τα συστήματα αυτά είναι απολύτως αναγκαία για όλα τα είδη των οποίων η ύπαρξη και η επιβίωση εξαρτάται από την ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου.[3]
Σημαντική συνεισφορά στη γνώση μας για τη δομή και τη χημεία των πορφυρινών αποκτήθηκε στο πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα και εστιάζεται κυρίως στις εργασίες των Fischer, Willstatter, Stall, Orh και Stern.[4]

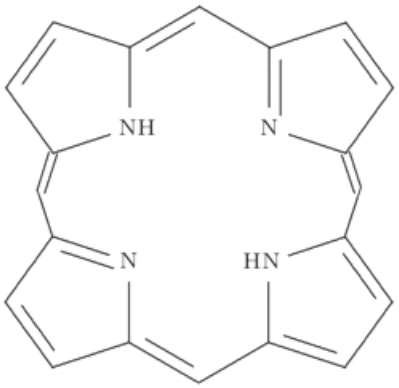
Οι πορφυρίνες είναι κυκλικά συζυγιακά συστήματα όπου η βασική δομική μονάδα είναι το πυρρόλιο. Στο σχήμα Ι.1 απεικονίζεται μία μονάδα πυρρολίου και με ελληνικά γράμματα σημειώνονται οι δύο διαφορετικοί τύποι C.



Σχήμα Ι.1 : *Μονάδα πυρρολίου.*

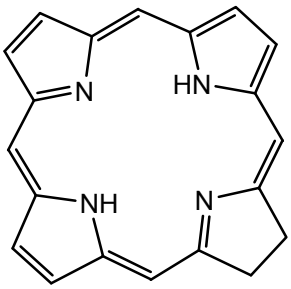
Ο πορφυρινικός σκελετός αποτελείται από τέσσερις δακτυλίους πυρολλικού τύπου οι οποίοι ενώνονται με τέσσερις μεθινικές γέφυρες, όπως φαίνεται στο σχήμα Ι.2. Αυτή η κυκλική τετραπυρολλική δομή προτάθηκε από τον Ouster το 1912.[5] Αρχικά δεν υιοθετήθηκε από τον Fischer, πατέρα της σύγχρονης χημείας των πορφυρινών, αργότερα όμως συνέβαλε και ο ίδιος στην τελική αποδοχή με την ολική σύνθεση της πρωτοαίμης το 1929. Από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα το όνομα που επικράτησε για την

δομή του βασικού μακροκυκλικού δακτυλίου είναι πορφίνη, σύμφωνα με την ονοματολογία του Fischer που αναπτύχθηκε στις δεκαετίες του 20΄και του 30΄.[4]

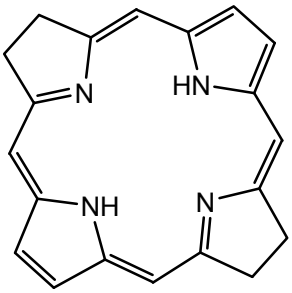


Σχήμα Ι.2 : *Πορφίνη.*

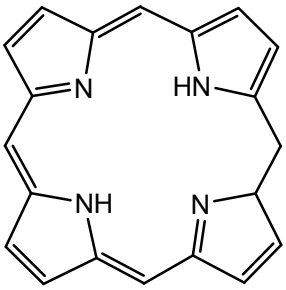
Από την πορφίνη προκύπτουν παρόμοιες μακροκυκλικές ενώσεις με την αναγωγή δεσμών, είτε στον ένα πυρρολικό δακτύλιο, είτε σε δύο απέναντι δακτυλίους, είτε στη μία ή και στις τέσσερις γέφυρες άνθρακα, οπότε προκύπτουν αντίστοιχα η χλωρίνη, η βακτηριοχλωρίνη, η φλωρίνη και το πορφυρογενές.



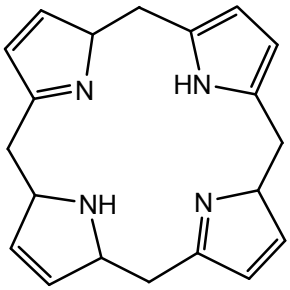
Χλωρίνη



Βακτηριοχλωρίνη



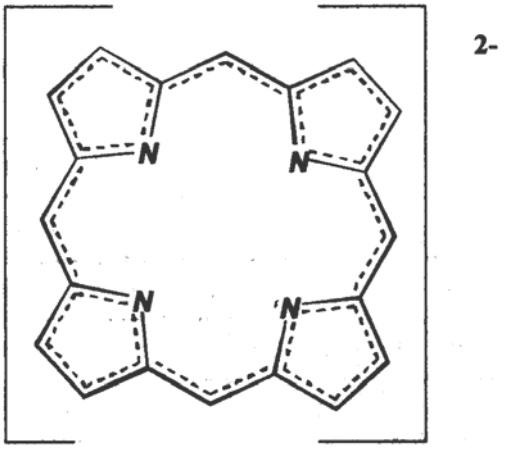
Φλωρίνη



Πορφυρογενές

Σχήμα Ι.3: *Ανηγμένες μορφές της πορφίνης.*

Το μόριο της πορφυρίνης θεωρείται επίπεδο, όμως δύο από τους πυρρολικούς δακτυλίους είναι ελαφρώς στραμμένοι προς τα κάτω, έτσι ώστε τα τέσσερα άτομα αζώτου να βρίσκονται ελαφρώς εκτός επιπέδου. Η απόσταση των πυρρολικών αζώτων από το κέντρο του δακτυλίου είναι 2.04 Å. Οι πορφυρίνες μπορούν να προσλάβουν δύο ιόντα υδρογόνου για να σχηματίσουν διπρωτικά οξέα με συνολικό φορτίο +2 ή να αποβάλλουν με ευκολία, δύο πρωτόνια αποκτώντας συνολικό φορτίο –2. Όπως φαίνεται στο σχήμα Ι.4 το πορφυρινικό διανιόν βρίσκεται σε πλήρη συζυγία στην περιφέρεια του υπακούωντας τον κανόνα των 4n+2 ηλεκτρονίων, ιδιότητα που προσδίδει στις πορφυρίνες και τα παραγωγά τους τα έντονα χρώματα. Κατ' αυτόν τον τρόπο και σε συνδυασμό με τους πορφυρινικούς υποκαταστάτες, οι οποίοι έχουν την ικανότητα πρόσληψης-απόδοσης ηλεκτρονικού νέφους, μπορούν να ρυθμιστούν τα μη εντοπισμένα μοριακά τροχιακά του συμπλόκου και να μεταβάλλουν τις ιδιότητες του.



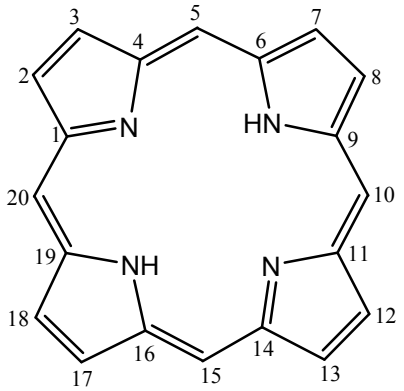
Σχήμα Ι.4: *Το συζυγιακό σύστημα του πορφυρινικού διανιόντος*.

1.1.1 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ

Η ονοματολογία που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τις πορφίνες και τα παράγωγά τους από τον Fischer βασίζονταν σε ένα μεγάλο αριθμό εμπειρικών ονομάτων, με αποτέλεσμα οι πολυπλοκότεροι τύποι να εγκαταλειφθούν και να δημιουργηθεί η ανάγκη για την ανάπτυξη ενός πιο εύχρηστου συστήματος ονοματολογίας. Κατ' αυτόν τον τρόπο το 1943, υιοθετήθηκε μια καινούργια ονομασία από τον Corwin, ο όρος «πορφυρίνη»,[6] ο οποίος είχε πρωτοδιατυπωθεί

κάπου ανάμεσα στα 1877 και 1878[7] και επικρατεί μέχρι και σήμερα. Οι πορφυρίνες τυπικά θεωρούνται σαν παράγωγα της πορφίνης με αντικατάσταση μερικών ή όλων των περιφερειακών θέσεων με διάφορες πλευρικές ομάδες.

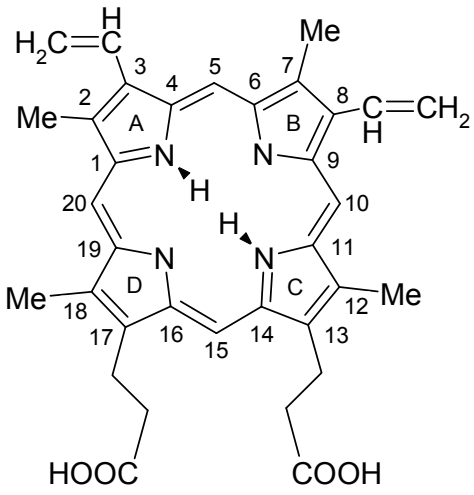
Οι τέσσερις πυρρολικοί δακτύλιοι, ονομάζονται A, B, C, D, ενώ η αρίθμηση των ατόμων άνθρακα, ξεκινάει από το πρώτο άτομο άνθρακα του πυρρολικού δακτυλίου που βρίσκεται δίπλα στο πυρρολικό άζωτο, και επεκτείνεται περιφερειακάκαι προς τα δεξιά, όπως φαίνεται στο σχήμα Ι.5.



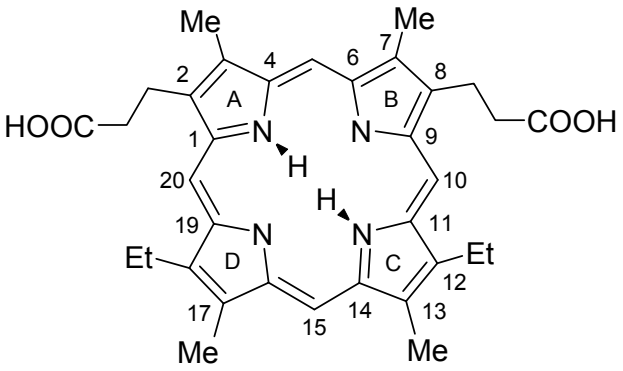
Σχήμα Ι.5: *Αρίθμηση των θέσεων της πορφυρίνης.*

Οι κανόνες που ισχύουν για την ονομασία των οργανικών και φυσικών προϊόντων, ισχύουν και στην περίπτωση των τετραπυρρολικών συστημάτων.[8] Οι θέσεις 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 και 18 αναφέρονται ως «βήτα-θέσεις», οι θέσεις 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 και 19 αναφέρονται ως «άλφα-θέσεις», ενώ οι 5, 10, 15 και 20 είναι γνωστές ως «μέσο-θέσεις».

Οι υποκατεστημένες πορφυρίνες αριθμούνται σύμφωνα με τους κανόνες της IUPAC που ισχύουν για τα οργανικά μόρια, με την αρίθμηση να γίνεται έτσι ώστε να έχουμε τους μικρότερους αριθμητικούς δείκτες. Υπάρχουν δύο βασικά είδη πορφυρινών, οι φυσικές πορφυρίνες με δύο ή περισσότερους υποκαταστάτες στις πυρολλικές θέσεις και οι συνθετικές με υποκαταστάτες και στις μεθινικές θέσεις. Οι πορφυρίνες οι οποίες είναι υποκατεστημένες στις πυρρολικές θέσεις ονομάζονται α-υποκατεστημένες πορφυρίνες, ενώ οι πορφυρίνες οι οποίες είναι υποκατεστημένες στις μέσο-θέσεις, β-υποκατεστημένες πορφυρίνες. Δύο παράδειγματα υποκατεστημένων πορφυρινών φαίνονται στο σχήμα Ι.6. Η πρωτοπορφυρίνη IX ονομάζεται πρωτοπορφυρίνη, ενώ η μεσοπορφυρίνη V ονομάζεται 12, 18-διέθυλ-3, 7, 13, 17-τετράκις-μεθυλπορφυρίνη-2, 8-διπροπιονικό οξύ.[3]



Πρωτοπορφυρίνη IX

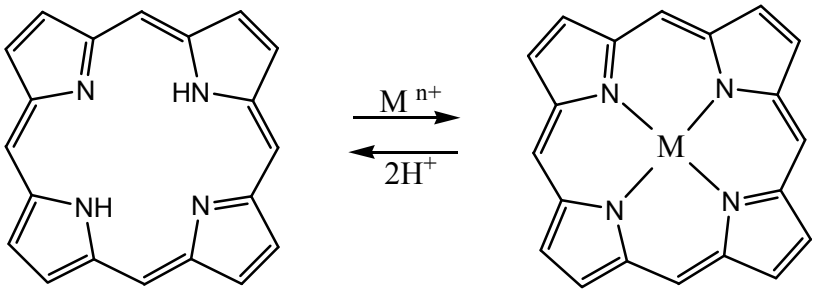


Μεσοπορφυρίνη V

Σχήμα Ι.6: *Παραδείγματα υποκατεστημένων πορφυρινών.*

1.1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ

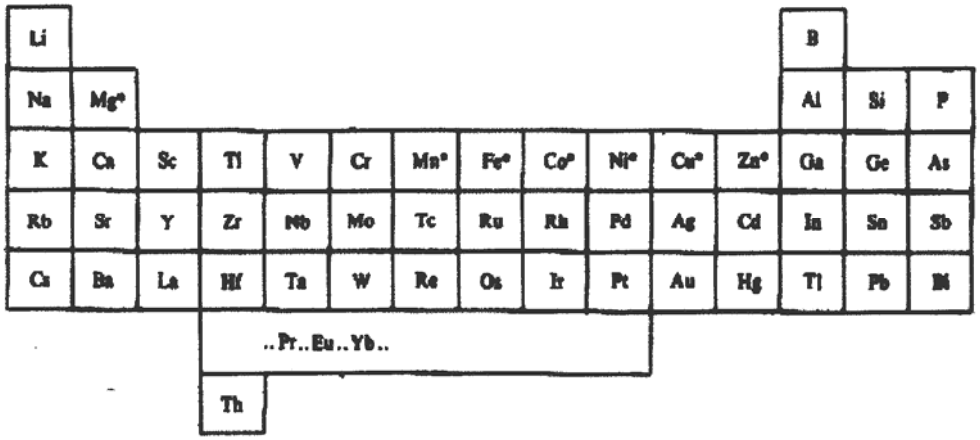
Οι πορφυρίνες όπως και όλα τα τετραπυρρολικά συστήματα είναι ακόρεστα τετραδοντικά μακροκυκλικά ligands τα οποία στην αποπρωτονιομένη μορφή τους μπορούν να προσδεθούν σαν υποκαταστάτες με δισθενής μεταλλικά ιόντα.[9] Η μετάλλωση γίνεται εύκολα με την αποχώρηση των δύο εύκολα αποχωριζόντων πρωτονίων που είναι συνδεδεμένα στα δύο από τα άζωτα, όπως φαίνεται στο σχήμα Ι.7



Σχήμα Ι.7: *Σύνθεση μεταλλοπορφυρίνης.*

Μέχρι σήμερα σχεδόν όλα τα μέταλλα αλλά και μερικά αμέταλλα έχουν συνδεθεί με τον πορφυρινικό δακτύλιο, όπως παρουσιάζεται στον επονομαζόμενο «περιοδικό πίνακα των μεταλλοπορφυρινών» που φαίνεται στο σχήμα Ι.8.[3] Τα στοιχεία αυτά

είναι το Mg στις χλωροφύλλες, ο Fe στις αίμες, τα Ni και V στα ορυκτέλαια, ο Cu στον *Turacus indicus*, το Mn στο αίμα, ο Zn στα προιόντα μετάλλαξης ζύμης και τέλος το Co στη βιταμίνη B_{12}.



Σχήμα Ι.8: *Περιοδικός πίνακας πορφυρινών, όπου με αστερίσκο σημειώνονται τα στοιχεία που έχει επιλέξει η φύση για εισαγωγή στον πορφυρινικό δακτύλιο.*

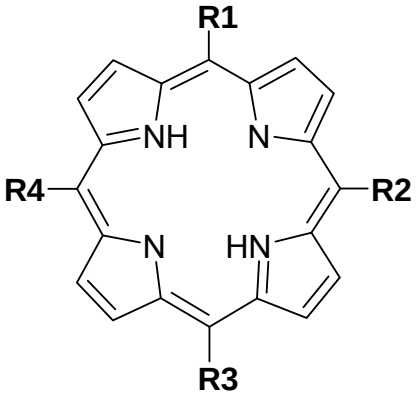
Οι μεταλλοπορφυρίνες είναι πιθανόν η πιο σπουδαία κατηγορία ενώσεων που περιέχουν μέταλλα στα βιολογικά συστήματα και παίζουν καθοριστικό ρόλο στο φαινόμενο της ζωής. Ο λόγος για τον οποίο τα πορφυρινικά σύμπλοκα είναι σπουδαία σε μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών συστημάτων είναι πιθανόν διπλός. Ο πρώτος λόγος είναι ότι οι μεταλλοπορφυρίνες είναι βιολογικά ευπρόσιτες ενώσεις των οποίων οι λειτουργίες μπορούν να μεταβληθούν αλλάζοντας το μέταλλο, την οξειδωτική του κατάσταση ή την φύση των οργανικών υποκαταστατών στην πορφυρινική δομή. Επίσης είναι μια γενική αρχή ότι η εξέλιξη τείνει να προχωρεί μετατρέποντας δομές και λειτουργίες που ήδη υπάρχουν στον οργανισμό παρά παράγοντας νέες.[10]

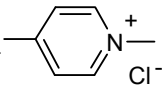
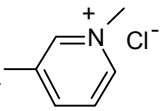
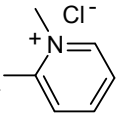
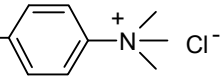
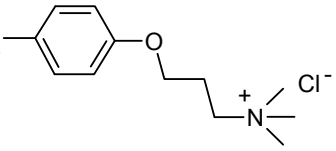
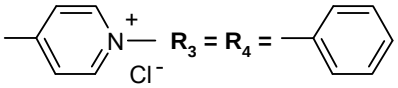
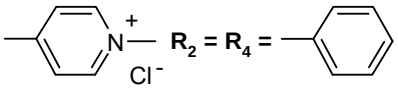
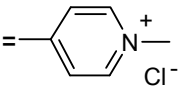
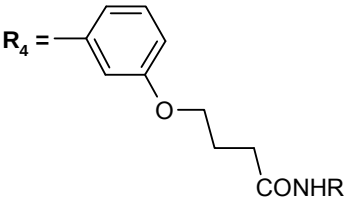
Οι μεταλλοπορφυρίνες που απαντώνται στις αιμοπρωτεΐνες, στην χλωροφύλλη και στα κυτοχρώματα αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα του βιολογικού ρόλου των μεταλλοπορφυρινών ως ενεργά κέντρα πρωτεϊνικών συστημάτων. Οι σιδηροπορφυρίνες, αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη, διασφαλίζουν τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς, ενώ οι χλωροφύλλες είναι υπεύθυνες για τη φωτοχημική μεταφορά ηλεκτρονίων μέσα στα φωτοσυστήματα των φυτών. Ακόμα, τα κυτοχρώματα c συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές δράσεις.

1.1.3 ΚΑΤΙΟΝΙΚΕΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΕΣ

Το 1979 προτάθηκε ό,τι η συνθετική πορφυρίνη μέσο-τετράκις-(Ν-μεθυλ-4-πυρίδινο)-πορφυρίνη (H_2TMPyP-4) παρεμβάλλεται και ενώνεται με το DNA.[11] Η πρόταση αυτή αγνοούσε απόλυτα την πιθανώς μεγάλη στερεοχημική παρεμπόδιση της παρεμβολής ανάμεσα στα ζευγάρια των βάσεων, η οποία οφείλεται στις συμμετρικά τοποθετημένες Ν-μέθυλο-πυρίδινο-ομάδες στις μέσο- θέσεις της πορφυρίνης. Γενικά, η παρεμβολή μορίων στο DNA προκαλεί την επιμήκυνση του διαστήματος ανάμεσα σε δύο ζευγάρια βάσεων του και μεταβάλλει τη γωνία στροφής μεταξύ δύο διαδοχικών βάσεων.[12] Επίσης, το ξετύλιγμα του υπερσπειρωμένου DNA μεταφράζεται πειραματικά με αύξηση του ιξώδους του διαλύματος. Η παρατήρηση των παραπάνω φαινομένων κατά τη διάρκεια των πειράματων επιβεβαίωσε την παρεμβολή του H_2TMPyP-4, ενώ προτάθηκε ακόμα ότι τα θετικά φορτία της περιφέρειας της πορφυρίνης αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτία του DNA, σταθεροποιώντας κατ' αυτόν τον τρόπο το σύμπλοκο της παρεμβολής. Επίσης, διατυπώθηκε η άποψη ότι η πορφυρίνη πρέπει να έχει τη δυνατότητα να υιοθετεί μια σχεδόν επίπεδη διάρθρωση σε σχέση με τους μέσο- υποκαταστάτες, ώστε να είναι ικανή να παρεμβληθεί ανάμεσα στα ζευγάρια βάσεων, επιτρέποντας παράλληλα την «αναπνοή» του DNA. Μετά τις παραπάνω διαπιστώσεις, συντέθηκε ένας μεγάλος αριθμός παραγώγων της πορφυρίνης H_2TMPyP-4, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση των παραγόντων που ελέγχουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των πορφυρινών και του DNA,[13,14] παραδείγματα των οποίων αποτυπώνονται στο σχήμα Ι.9.

Πολυάριθμοι δομικοί συντελεστές επηρεάζουν τον τρόπο αλληλεπίδρασης κατιονικών πορφυρινών DNA, όπως η όρθο-, μέτα- ή πάρα θέση του Ν-μεθυλίου των τετραμεθυλοπυριδίνο-πορφυρινών, ο όγκος των μέσο-υποκαταστατών, η αλκαλικότητα του δακτυλίου, καθώς και ο αριθμός και η απόσταση του θετικού φορτίου από το κέντρο της πορφυρίνης, που έχει το άζωτο. Από πλευράς DNA σημαντικό ρόλο παίζουν η αναλογία του λόγου $1/r_0$, ο οποίος εκφράζει την αρχική συγκέντρωση του DNA σε ζευγάρια βάσεων, σε αναλογία με την πορφυρίνη στο διάλυμα, η φύση του επιπώματος, το pH και η ιονική ισχύ. Η πορφυρίνη H_2TMPyP-4 συνδέεται με το DNA είτε μέσω παρεμβολής ανάμεσα στα ζευγάρια βάσων GC, είτε εξωτερικά στη μικρή αύλακα σε αλληλουχίες πλούσιες σε AT. Λεπτομερέστερη επεξήγηση του τρόπου αλληλεπίδρασης DNA-πορφυρινών γίνεται στο κεφάλαιο IV.



Υποκαταστάτες	Πορφυρίνη	Όνομα
$R_1 = R_2 = R_3 = R_4$ 	H_2TMPyP-4	μέσο-τετράκις-(N-μεθυλ-4-πυρίδινο)-πορφυρίνη[11]
$R_1 = R_2 = R_3 = R_4$ 	H_2TMPyP-3	μέσο-τετράκις-(N-μεθυλ-4-πυρίδινο)-πορφυρίνη[15]
$R_1 = R_2 = R_3 = R_4$ 	H_2TMPyP-2	μέσο-τετράκις-(N-μεθυλ-4-πυρίδινο)-πορφυρίνη[15]
$R_1 = R_2 = R_3 = R_4$ 	H_2TMAP	μέσο-τετράκις-(N-μεθυλ-4-πυρίδινο)-πορφυρίνη[15]
$R_1 = R_2 = R_3 = R_4$ 	H_2TθOPP	μέσο-τετράκις[4-[3-τριμεθυλαμμωνιοπρόπυλ) όξυ]φαίνυλο] πορφυρίνη[16]
$R_1 = R_2 =$  $R_3 = R_4 =$	cis-H_2P_{agg}	cis[μέσο-δι(N-μέθυλο-4-πυρίδινο)-διφαίνυλο] πορφυρίνη[17,18]
$R_1 = R_3 =$  $R_2 = R_4 =$	trans-H_2P_{agg}	trans[μέσο-δι(N-μέθυλο-4-πυρίδινο)-διφαίνυλο] πορφυρίνη[17,18]
$R_1 = R_2 = R_3 =$  $R_4 =$ 	tMPyP-GT, tMPyP-GR, tMPyP-GG, tMPyP-GGL, tMPyP-GGK, όπου R = δι- ή τρι- πεπτίδιο[19]	

Σχήμα Ι.9 : ***Παραδείγματα κατιονικών πορφυρινών***

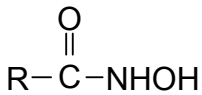
Από τις κατιονικές πορφυρίνες του σχήματος Ι.9, γίνεται αντιληπτό ότι η παρεμβολή βρίσκεται κυρίως υπό την εποπτεία των πυριδινικών ομάδων. Κατ' αυτόν τον τρόπο οι πορφυρίνες οι οποίες διαθέτουν αλκυλιωμένο πυριδίνιο, όπως η H_2TMPyP-4 και η H_2TMPyP-3 είναι ικανές να παρεμβληθούν από μόνες τους. Παρ' όλα αυτά, η H_2TMPyP-2 που περιέχει ένα μεθύλιο σε όρθο- θέση δεν παρεμβάλλεται, αλλά συνδέεται εξωτερικά με το DNA. Περαιτέρω, και η H_2ΤθΟΡΡ που είναι πλούσια σε ηλεκτρόνια σχηματίζει απλά σταθερά συσσωματώματα με το DNA, αν και η ανεπάρκεια ηλεκτρονίων δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση της παρεμβολής.[16] Αντίθετα, η παρουσία θετικών φορτίων στην περιφέρεια της πορφυρίνης μπορεί να χαρακτηριστεί καθοριστικός παράγοντας για την παρεμβολή.

Η trans-H_2P_{agg} δικατιονική πορφυρίνη, η οποία φέρει δύο υποκαταστάτες φαινυλίου, παρεμβάλλεται στο DNA σε διάλυμα 0,01M NaCl, σε μικρές τιμές του λόγου $1/r_0$ ([DNA]/[Πορφυρίνη]). Σε αύξηση όμως της ιονικής ισχύς του διαλύματος, για υψηλές τιμές του λόγου $1/r_0$, το trans-H_2P_{agg} συσσωρεύεται εξωτερικά κατά μήκος του άξονα της έλικας, υποδεικνύοντας τη συμμετοχή πολλών παραγόντων στον καθορισμό του τρόπου αλληλεπίδρασης των πορφυρινών με το DNA.[17]

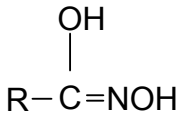
1.2 ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΑ ΟΞΕΑ - ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Παρόλο που τα υδροξαμικά οξέα είναι γνωστά από τα μέσα του 19ου αιώνα,[20] η μελέτη των χημικών ιδιοτήτων και των πρακτικών εφαρμογών τους χρειάστηκε παραπάνω από μία εκατονταετία για να ξεκινήσει.[21] Ο Exner, του οποίου η συνεισφορά στο κλάδο θεωρείται τεράστια, δηλώνει ότι ήταν μάλλον η αβεβαιότητα στο προσδιορισμό της δομής που εμπόδιζε την ανάπτυξη της χημείας των ενώσεων αυτών.[22] Ένα παράδειγμα που δείχνει πόσο μπερδεμένη ήταν η βιβλιογραφία της εποχής πάνω στις ενώσεις αυτές βρίσκεται στον τόμο 56 του περιοδικού *Chemical Abstracts*, όπου ο οδηγός για την ονοματολογία, αναφέρει και τις δύο ταυτομερείς μορφές των υδροξαμικών οξέων σαν «υδροξαμικά οξέα». Στη συνέχεια, στη μία σελίδα το παράδειγμα που παρουσιάζεται δίνει το $C_6H_5C(:NOH)OH$ σαν τον χημικό τύπο για το βενζοϋδροξαμικό όξυ, ενώ σε μια άλλη σελίδα ο πιο αποδεκτός χημικός τύπος για την ίδια ένωση δίνεται χωρίς σχόλιο για πιθανό ταυτομερισμό, ως $C_6H_5CONHOH$.[23,24]

Σε συμφωνία τελικά με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο χώρο της χημείας αζωτούχων ενώσεων, όπως του Smith[25] και του Exner,[22] ο όρος «υδροξαμικό οξύ» χρησιμοποιήθηκε για να εκφράσει τα Ν-ακυλιωμένα παράγωγα της υδροξυλαμίνης με τη δομή που παρουσιάζεται παρακάτω,



ενώ η αντίστοιχη ταυτομερής μορφή του εκφράζεται με τον όρο «υδροξιμικό όξυ» με τη παρακάτω δομή.



Παρόλο που πολλά υδροξιμικά παράγωγα είναι γνωστά, τα ελεύθερα υδροξιμικά οξέα αποτελούν μόνο ένα ελάχιστο συστατικό του μίγματος ισορροπίας των δύο αυτών ταυτομερών μορφών.

Η διευκρίνηση των ξεχωριστών ταυτοτήτων μιάς ευρείας ποικιλίας άκυλο-υδροξυλαμινικών παραγώγων, ήταν μία εξαιτερικά επίπονη και πολύπλοκη εργασία,

διότι εκτός από τον σημαντικό αριθμό δομικών τύπων που έπρεπε να ερευνηθούν, οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις βρίσκονται σε διάφορους πολυμορφικούς κρυσταλλικούς σχηματισμούς, καθώς επίσης σε ταυτομέρεια και γεωμετρική ισομέρεια. Το μεγαλύτερο μερίδιο αυτής της εργασίας πρεπεί να αναγνωριστεί στον W. Lossen και τους μαθητές του, οι οποίοι κατάφεραν να χαρακτηρίσουν επιτυχώς τις περισσότερες δομές κατά τη διάρκεια του τελευταίου τέταρτου του 19^{ου} αιώνα, χωρίς το πλεονέκτημα των φασματοσκοπικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται σήμερα.[26] Σχεδόν όλες οι μελέτες του Lossen ισχύουν ακόμα και σήμερα και έχουν επιβεβαιωθεί από φυσικές μεθόδους, εκτός από μερικές περιπτώσεις όπου υπάρχει σύγχυση ανάμεσα στα ταυτομερή και τα γεωμετρικά ισομερή.

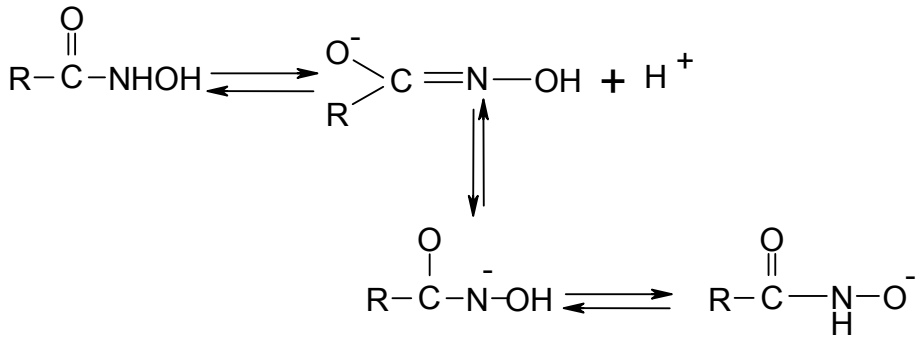
1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Τα μη υποκατεστημένα υδροξαμικά οξέα είναι στερεά, διαλυτά στο νερό όταν το μέγεθος τους δεν ξεπερνά τους έξι άνθρακες και σχεδόν αδιάλυτα στον αιθέρα όταν είναι μικρά. Αν ληφθεί υπ'όψιν η κατανομή των ηλεκτρονίων παρατηρείται ότι υπάρχουν διάφορες θέσεις στις οποίες οι ενώσεις αυτές μπορούν να δράσουν σαν πυρηνόφιλα αντιδραστήρια. Είναι ασθενή οξέα, ενώ σαν πολύ ασθενείς βάσεις, μπορούν να σχηματίσουν άλατα με ισχυρά οξέα σε μη υδατικά διαλύματα.

Η οξύτητα των υδροξαμικών οξεών είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με αυτή των καρβοξυλικών οξέων.[27] Στην πραγματικότητα, οι τιμές pK_α των υδροξαμικών οξέων καταλαμβάνουν ένα ευρύ πεδίο, από 7,05 για το ο-νιτροβενζοϋδροξαμικό οξύ, εώς 11,33 για το Ν-φαίνυλ-n-βουτυροϋδροξαμικό οξύ. Οι τιμές αυτές επηρεάζονται κυρίως από την εισαγωγή ομάδων που προκαλούν αρνητικό ή θετικό επαγωγικό φαινόμενο, την υποκατάσταση του φαινυλικού δακτυλίου και τη σύνδεση διαφόρων συζυγιακών συστημάτων στη λειτουργική καρβονυλική ομάδα. Κατ' αυτό τον τρόπο υποκαταστάτες όπως η νίτρο- ομάδα, το χλώριο ή το φθόριο που έχουν αρνητικό επαγωγικό φαινόμενο μειώνουν τις τιμές του pK_α, ενώ η μεθυλική ομάδα αντίθετα αυξάνει τις του pK_α, λόγω του θετικού επαγωγικού φαινομένου που προκαλεί. Ακόμα, από τις τιμές pK_α έχει παρατηρηθεί ότι τα μη κορεσμένα Ν-άρυλο υδροξαμικά οξέα είναι ισχυρότερα οξέα από τις αντίστοιχες κορεσμένες ενώσεις.

Ο ιονισμός των υδροξαμικών οξέων είναι λίγο περίπλοκος, διότι παρόμοιας τάξης μεγέθους οξύτητα με τα ελεύθερα οξέα έχουν και οι εστέρες και τα Ν-άλκυλο

παράγωγα τους.[22,28] Και ενώ οι τιμές pK_{α} των υδροξαμικών οξέων είναι τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από αυτές των υδροξιμικών οξέων, οι N,O-διακυλοϋδροξυλαμίνες είναι αρκετά ισχυρότερα οξέα από τα υδροξαμικά.[22] Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι όξινες ιδιότητες των υδροξαμικών οξέων συνδέονται και με το υδρογόνο της «υδροξιλάμινο» υδροξυλικής ομάδας, και με το υδρογόνο του ατόμου του αζώτου. Ο ιονισμός των υδροξαμικών οξέων αποτυπώνεται στο σχήμα Ι.10.



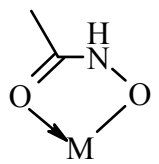
Σχήμα Ι.10 : ***Ιονισμός των υδροξαμικών οξέων***

Πάντως, το κυριότερο μονοπάτι μεταβολισμού των περισσότερων υδροξαμικών οξέων, έπειτα από πειράματα in vitro και in vivo, φαίνεται να είναι η υδρόλυση τους προς τα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα.[29,30]

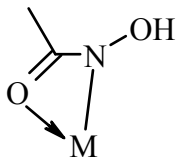
1.2.2 ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΑ ΟΞΕΑ ΩΣ ΧΗΛΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα υδροξαμικά οξέα αντιπροσωπεύουν ακόμα, μια πολύ σημαντική κατηγορία χηλικών αντιδραστηρίων.[31] Η πλειονότητα των μεταλλικών συμπλόκων με υδροξαμικά οξέα, χαρακτηρισμένα και σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση, που έχει αναφερθεί ακολουθεί τον {O,O} τρόπο συναρμογής, δηλαδή υποκατάσταση του OH υδροξαμικού πρωτονίου από το μεταλλικό ιόν, όπως φαίνεται στο σχήμα Ι.11α. Ο {N,O} τρόπος συναρμογής, που φαίνεται στι σχήμα Ι.11β, παρόλο που έχει παρατηρηθεί σε διάλυμα, σε μελέτες με αμινοϋδροξαμικά οξέα,[32] δεν έχει αποδειχθεί δομικά σε στερεά κατάσταση.[33] Η {O, μ-O} λειτουργία της υδροξαμικής ομάδας σαν γέφυρα, που φαίνεται στο σχήμα Ι.11γ, έχει παρατηρηθεί σε μια σειρά διπυρηνικών συμπλόκων που χρησιμοποιούνται σαν δομικά μοντέλα στο ενεργό κέντρο της ουρεάσης, και πιο συγκεκριμένα παρασκευάζονται με αντικατάσταση των

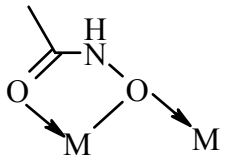
καρβοξυλικών από υδροξαμικούς υποκαταστάτες σε ενώσεις που είναι οργανωμένες στη διμερική δομή.[34] Η Ν-δέσμευση, που λαμβάνει χώρα με αποπρωτονίωση του υδροξαμικού αζώτου, όπως φαίνεται στο σχήμα Ι.11δ, παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε ένα σύμπλοκο νικελίου (ΙΙ) με την υδροξαμική ομάδα γλυκίνης[35] κι από τότε ελάχιστα παραδείγματα έχουν αναφερθεί.[36,37,38,39] Η πραγματοποίηση αυτού του είδους δέσμευσης βέβαια, πρέπει να υποστηρίζεται από την παρουσία ενός προσκείμενου ισχυρού δότη Χ, έτσι ώστε ο υποκαταστάτης να είναι σε θέση να σχηματίσει πενταμελείς ή εξαμελείς χηλικούς δακτυλίους. Συναρμογή μέσω του αζώτου αναφέρθηκε επίσης σε πολυπυρηνικά σύμπλοκα με γέφυρες υδροξαμικών ομάδων, που συνδέονται με {Ο,Ο} συναρμογή, όπως φαίνεται στο σχήμα Ι.11ε. Τα σύμπλοκα αυτής της κατηγορίας ανήκουν όλα σε ενώσεις που επονομάζονται «μεταλλοστεμμάτα».[40]



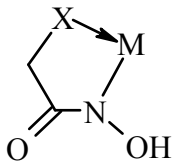
α) Ο,Ο συναρμογή



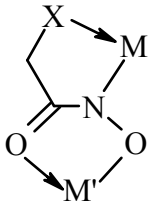
β) Ν,Ο συναρμογή



γ) (Ο, μ-Ο) συναρμογή και γεφύρωση



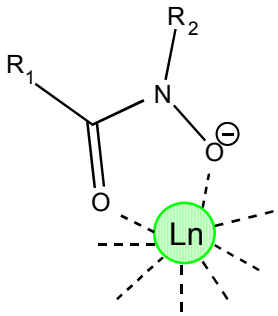
δ) Ν δέσμευση



ε) (Ν, Χ), (Ο,Ο) γεφύρωση

Σχήμα Ι.11 : *Τρόποι συναρμογής της υδροξαμικής ομάδας σε μεταλλικά σύμπλοκα.*

Από μελέτες που έγιναν στη σύνθεση συμπλόκων λανθανιδών με υδροξαμικά οξέα, φαίνεται πως οι άχρωμοι κρύσταλλοι που παρασκευάστηκαν, υιοθετούν την {Ο, Ο} συναρμογή που φαίνεται στο σχήμα Ι.12. Αυτό υποδεικνύεται από μετρήσεις IR, στις οποίες δεν εμφανίστηκε κορυφή στα 3250 cm^{-1}, γεγονός που δηλώνει την απουσία ΟΗ ομάδας στο μόριο και επιπλέον η κορυφή που οφείλεται στη δόνηση τάσης του C=O είναι μετατοπισμένη από τα 1650 cm^{-1} στον ελεύθερο υποκαταστάτη, στα 1590 cm^{-1}.[41]



***Σχήμα Ι.12*:** *Σύμπλοκο λανθανίδας-υδροξαμικού οξέος.*

1.2.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Το ενδιαφέρον των επιστημόνων πάνω στα υδροξαμικά οξέα άρχισε να αυξάνεται κυρίως χάρη στη μελέτη της κυκλοσερίνης (D-4-άμινο-3-ισοξαζολιδόνης, «οξαμυκίνης»), των σιδηροχρωμικών, της επιτάχυνσης της υδρόλυσης οργανικών φθοροφωσφορικών και φθοροφωσφονικών ενώσεων -όπως η σαρίνη (ισοπρόπυλο μεθυλφώσφονο-φθορίδιο)- και των χρήσεων τους σαν αντιδραστήρια επίπλευσης.[42,43,44] Παρόλα αυτά, λόγω του χαρακτηριστικού χρώματος που σχηματίζεται κατά την αντίδραση των υδροξαμικών οξέων με διαλύματα σιδηροχλωριδίων, η κύρια χρήση των υδροξαμικών οξέων ήταν για πολλά χρόνια σε διάφορες εφαρμογές στην αναλυτική χημεία και ιδιαίτερα σαν αντιδραστήρια ανίχνευσης διαφόρων μεταλλικών ιόντων στη σταθμική και φασματοφωτομετρική ανάλυση.[45,46,47]

Οι πιο πρόσφατες ανακαλύψεις όμως στις ιδιότητες συναρμογής τους έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των μελετών σε βιολογικές εφαρμογές και κυρίως στο ρόλο τους ως αντιδραστήρια μεταφοράς σιδήρου.[48,49,50] Για παράδειγμα, η δεσφερριοξαμίνη, ένα φυσικό τριυδροξαμικό οξύ, χρησιμοποιείται στη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από υπερσιδήρωση[51] και πιο συγκεκριμένα ανθρώπων που έχουν AIDS, όμως η αδυναμία δράσης τους κατά τη χορήγηση τους από το στόμα και ο μικρός βιολογικός χρόνος ημίσειας ζωής περιορίζουν τη χρήση του.[52] Άλλες εφαρμογές των υδροξαμικών οξέων σήμερα είναι σαν συστατικά σε διάφορα αντιβιοτικά και αντιμυκητιακά αντιδραστήρια, σαν αναστολείς καρκινικών κυττάρων, σαν παράγοντες ανάπτυξης, σαν αναστολείς της λιποξυγενάσης ή παράγοντες κυτταρικής διαίρεσης ακόμα και σαν πρόσθετα τροφίμων.[47,53]

1.3 ΛΑΝΘΑΝΙΔΕΣ - ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Το 1794, ο J. Gadolin κατάφερε να εξάγει ύττρια, δηλαδή μείγμα οξειδίου του υττρίου, από το ορυκτό γνωστό ως γαδολινίτης, ενώ το 1803, οι Berzelius και Klaproth απομόνωσαν την πρώτη καθαρή μορφή δημητρίου. Σε έρευνες που ακολούθησαν τον επόμενο αιώνα, αποδείχθηκε ότι η ύττρια ήταν ένα μείγμα από οξείδια του υττρίου, του ερβίου και του τερβίου και ο σερίτης αποτελούνταν από οξείδια του λανθανίου και του δημητρίου (Mosander, 1839-1843). Ακόμα έγινε γνωστό ότι η ένωση που αποκαλούνταν αρχικά «οξείδιο του ερβίου», ήταν στην πραγματικότητα ένα μείγμα ερβίου, ολμίου, θουλίου και υττερβίου (Cleve, Marignac, 1878-1880), ενώ ο διαχωρισμός του «διδυμίου» από λανθάνιο που είχε επιτύχει ο Mosander επισκιάστηκε από τον περαιτέρω διαχωρισμό σε σαμάριο, ευρώπιο, νεοδύμιο και πρασεοδύμιο.

Μέχρι το 1907, με την ανακάλυψη του λουτέτσιου, όλα τα λανθανιδικά στοιχεία είχαν αναγνωριστεί, εκτός από το ραδιενεργό προμήθειο. Κατ' αυτόν τον τρόπο το 1913, ο Moseley χρησιμοποίησε τα φάσματα ακτίνων Χ των στοιχείων για να τα κατατάξει στον Περιοδικό Πίνακα, δείχνοντας ότι υπάρχουν 14 στοιχεία μεταξύ του λανθανίου και του χαφνίου, αφήνοντας ακόμα το κενό για το προς ανακάλυψη στοιχείο με ατομικό αριθμό 61.[54]

Οι δυσκολίες εν τούτοις στο διαχωρισμό των λανθανιδών και η λήψη τους σε καθαρή μορφή ήταν ένα πρόβλημα που δεν βρήκε ολοκληρωτική λύση παρά μόνο έπειτα από το τέλος του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου και οφείλονταν κυρίως στις χημικές ομοιότητες που είχαν αποδοθεί στα στοιχεία αυτά. Οι διαχωρισμοί στηριζόταν αρχικά σε μικρές διαφορές στη διαλυτότητα, οι οποίες εκμεταλλεύονταν μέσο σχημάτων κλασματικής κρυσταλλώσεως, οι μέθοδοι όμως αυτοί ήταν αρκετά επίπονες και αντικαταστάθηκαν τελικά από πιο σύγχρονες μεθόδους. Σήμερα οι λανθανίδες διαχωρίζονται μέσω μιας ιονανταλλακτικής ρητίνης και την έκπλυση στη συνέχεια ενός συμπλοκοποιητικού παράγοντα, όπως είναι το κιτρικό ιόν. Τα μέταλλα των λανθανιδών ανακτώνται με αναγωγή των αλογονιδίων τους· τα ελαφρύτερα μέταλλα της σειράς (La,…,Gd) ανακτώνται με αναγωγή των τριχλωριδίων τους, παρουσία Ca σε θερμοκρασίες 1000°C, ενώ για τα βαρύτερα (Tb,…,Lu), χρησιμοποιούνται τα τριφθορίδιά τους, καθώς τα τριχλωρίδιά τους είναι πολύ πτητικά.[55]

1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΛΑΝΘΑΝΙΔΩΝ

Ο όρος λανθανίδες αναφέρεται στο λανθάνιο (Z=57) και στα 14 στοιχεία που το ακολουθούν στην κατάταξη των στοιχείων στον περιοδικό πίνακα, ενώ ο γενικός τους συμβολισμός είναι Ln. Συμβατικά, το λανθάνιο είναι μέλος της ομάδας ΙΙΙ, ή ΙΙΙΒ κατά IUPAC, βρίσκεται κάτω από το ύττριο (Z=39) και το σκάνδιο (Z=21), συμπεριλαμβάνεται όμως στην κατηγορία των λανθανιδών παρά την απουσία ηλεκτρονίων στα *f* τροχιακά στην θεμελιώδη κατάσταση, λόγω των πολλών ομοιοτήτων με τα στοιχεία που το ακολουθούν. Οι λανθανίδες παρουσιάζουν παρόμοιες φυσικές και χημικές ιδιότητες και εμφανίζονται σε φυσικά ορυκτά υπό την μορφή μειγμάτων των οξειδίων τους. Καλούνται επίσης και σπάνιες γαίες ή και έσω-μεταβατικά στοιχεία, καθώς τα 4*f* συμπληρώνονται μετά τα *5s*, *5p* και *6s* τροχιακά.

Καθώς τα 4*f* ηλεκτρόνια δεν συμμετέχουν συνήθως στην δημιουργία δεσμών, οι λανθανίδες αποτελούν ισχυρά ηλεκτροθετικά στοιχεία. Τα πρώτα μέλη θεωρούνται σχετικά μαλακά οξέα, η σκληρότητά τους όμως μεγαλώνει με την αύξηση του ατομικού αριθμού. Οι λανθανίδες είναι η μοναδική τάξη στοιχείων, μαζί με την τάξη των ακτινιδών, στην οποία τα μέλη της ομοιάζουν σε τέτοιο βαθμό μεταξύ τους, ώστε δεν προκαλείται ιδιαίτερη μεταβολή στις ιδιότητες, για μια δεδομένη οξειδωτική κατάσταση με την αύξηση του ατομικού αριθμού. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι οι ενεργειακές διαφορές μεταξύ των δύο διαδοχικών διαμορφώσεων είναι πολύ μικρές για να προσδώσουν διαφορετική χημική συμπεριφορά στα στοιχεία.[55]

Οι μικρές διαφορές στα στοιχεία της σειράς των λανθανιδών είναι συνέπεια του φαινομένου που είναι γνωστό ως «λανθανιδική συστολή», τη σταθερή δηλαδή μείωση της ατομικής και ιονικής ακτίνας με την αύξηση του ατομικού αριθμού. Ο λόγος της εμφάνισης της συστολής των λανθανιδών είναι η συρρίκνωση των ηλεκτρονίων στα εσωτερικά *f* τροχιακά με την αύξηση του ατομικού αριθμού. Καθώς λοιπόν τα *f* ηλεκτρόνια προστατεύουν ελλειπώς τα ηλεκτρόνια των εξωτερικών τροχιακών, υπάρχει μια σταθερή αύξηση στο αποτελεσματικό πυρηνικό φορτίο και συνακόλουθη μείωση του μεγέθους, σύμφωνα με την θεωρία Slatter για το «δρων φορτίο». Εν τούτοις, η συστολή της ατομικής ακτίνας διακόπτεται στο επίπεδο του ευρωπίου και του υττερβίου, τα οποία παρεκκλίνουν αρκετά από την γενική τάση των λανθανιδών, με ακτίνες σημαντικά μεγαλύτερες από τα υπόλοιπα στοιχεία, όπως φαίνεται και στον πίνακα Ι.1.[56]

Z	Ονομασία	Σύμβολο	Ηλεκτρονική Διαμόρφωση	Ατομική Ακτίνα (Å)	Χρώμα Ενώσεων
57	Λανθάνιο	La	[Xe]$5d6s^2$	1,877	άχρωμο
58	Δημήτριο	Ce	[Xe]$4f^2 6s^2$	1,825	άχρωμο
59	Πρασεοδύμιο	Pr	[Xe]$4f^3 6s^2$	1,828	πράσινο
60	Νεοδύμιο	Nd	[Xe]$4f^4 6s^2$	1,821	ερυθροϊώδες
61	Προμήθειο	Pm	[Xe]$4f^5 6s^2$	1,810	ερυθρό
62	Σαμάριο	Sm	[Xe]$4f^6 6s^2$	1,802	κίτρινο
63	Ευρώπιο	Eu	[Xe]$4f^7 6s^2$	2,042	ερυθρωπό
64	Γαδολίνιο	Gd	[Xe]$4f^7 5d6s^2$	1,802	άχρωμο
65	Τέρβιο	Tb	[Xe]$4f^9 6s^2$	1,782	ερυθρωπό
66	Δυσπρόσιο	Dy	[Xe]$4f^{10} 6s^2$	1,773	κίτρινο
67	Όλμιο	Ho	[Xe]$4f^{11} 6s^2$	1,776	κίτρινο
68	Έρβιο	Er	[Xe]$4f^{12} 6s^2$	1,757	ερυθροϊώδες
69	Θούλιο	Tm	[Xe]$4f^{13} 6s^2$	1,746	πράσινο
70	Υττέρβιο	Yb	[Xe]$4f^{14} 6s^2$	1,940	άχρωμο
71	Λουτέτσιο	Lu	[Xe]$4f^{14} 5d6s^2$	1,734	άχρωμο

Πίνακας Ι.1: *Βασικά χαρακτηριστικά των λανθανιδών.*

1.3.2 ΒΑΘΜΙΔΕΣ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΩΝ ΛΑΝΘΑΝΙΔΩΝ

Η χαρακτηριστική κατάσταση οξειδώσεως των στοιχείων των λανθανιδών είναι αυτή με αριθμό οξείδωσης +3 τόσο σε στερεές ενώσεις όσο και σε διαλύματα. Η ιδιαίτερη επιλεκτικότητα για την κατάσταση αυτή οξειδώσεως των λανθανιδών σε συνδυασμό με την αξιοσημείωτη ομοιότητα στο μέγεθος, καθιστούσαν προβληματικό το διαχωρισμό τους ιδιαίτερα πριν την ανάπτυξη των διαφόρων χρωματογραφικών μεθόδων. Παρά την τάση τους για σχηματισμό σταθερών κατιόντων +3, τα λανθανίδια δεν μοιάζουν με στοιχεία μεταπτώσεως όπως το χρώμιο ή το κοβάλτιο. Τα ελεύθερα μέταλλα των λανθανιδών είναι πιο δραστικά και στο θέμα αυτό μοιάζουν περισσότερο με τα μέταλλα των αλκαλίων ή των αλκαλικών γαιών παρά στα περισσότερα από τα στοιχεία μεταπτώσεως.

Αν και η +3 είναι η πιο χαρακτηριστική κατάσταση οξειδώσεως των λανθανιδών, παρατηρείται επίσης και η κατάσταση οξειδώσεως +2 και +4, οι οποίες είναι εξίσου σημαντικές, όπως φαίνεται και στον πίνακα Ι.2. Τα πιο σταθερά δισθενή ιόντα είναι αυτά του Eu και του Yb, ενώ το πιο σταθερό τετρασθενές ιόν είναι του Ce. Αρχικά η εμφάνιση αριθμών οξείδωσης με +2 και +4 αποδιδόταν απλά στη μεγαλύτερη σταθερότητα κάποιας συμπληρωμένης (Yb^{+2}), ημισυμπληρωμένης (Eu^{+2}) ή κενής (Ce^{+4}) 4*f* στοιβάδας. Η άποψη όμως αυτή δε στάθηκε αποδεκτή διότι δεν δικαιολογεί το γεγονός της εμφάνισης του θουλίου και του σαμαρίου με αριθμό οξείδωσης +2, που υιοθετούν μια ηλεκτρονική διαμόρφωση f^{13} και f^{6}, και όχι με αριθμό οξείδωσης +1, δηλαδή διαμορφώσεις f^{14} και f^{7}, αντίστοιχα. Επίσης το πρασεοδύμιο και το νεοδύμιο, εμφανίζονται με αριθμό οξείδωσης +4 με διαμορφώσεις f^{1} και f^{2} αλλά ποτέ δεν έχουν παρατηρηθεί +5 ή +6 σθενή που θα συνεπάγονταν μια f^{0} διαμόρφωση.

Για τον λόγο αυτό, η ύπαρξη των διαφόρων καταστάσεων οξείδωσης εξηγείται καλύτερα με τον συνυπολογισμό των ενεργειών ιονισμού και εξαχνώσεως των μετάλλων και τις ενέργειες πλέγματος όπως αυτές υπολογίζονται από τον κύκλο Born – Haber.[55] Τα δυναμικά οξείδωσης των λανθανιδών δείχνουν μια μικρή ελάττωση στο δυναμικό οξείδωσης (~ 17%) από το λανθάνιο προς στο λουτέτσιο παράλληλα με την αύξηση του πυρηνικού φορτίου (~25%) και την ελάττωση της ιονικής ακτίνας (~20%). Οι τιμές αυτές προβάλλουν τις πολύ μικρές ποσοστιαίες μεταβολές τόσο στο πυρηνικό φορτίο, το οποίο αυξάνεται, όσο και στα δυναμικά οξείδωσης σε σχέση με βέβαια με τα άλλα μεταβατικά στοιχεία.[57] Τα δυναμικά οξείδωσης των λανθανιδών επισημαίνουν την υψηλή δραστικότητα και τον ιονικό χαρακτήρα των ενώσεων τους, καθώς και το βασικό χαρακτήρα των οξειδίων τους και των υδροξειδίων τους.

Z	Σύμβολο	Ηλεκτρονική Διαμόρφωση				Ακτίνα Ιόντος Ln^{3+} (Å)
		Ln	Ln^{2+}	Ln^{3+}	Ln^{4+}	
57	La	[Xe]$5d6s^2$		[Xe]		1,061
58	Ce	[Xe]$4f^2 6s^2$	($4f^2$)	$4f^1$	[Xe]	1,034
59	Pr	[Xe]$4f^3 6s^2$		$4f^2$	($4f^1$)	1,013
60	Nd	[Xe]$4f^4 6s^2$	($4f^4$)	$4f^3$	($4f^2$)	0,995
61	Pm	[Xe]$4f^5 6s^2$		$4f^4$		0,979

62	Sm	[Xe]$4f^6 6s^2$	($4f^6$)	$4f^5$		0,964
63	Eu	[Xe]$4f^7 6s^2$	$4f^7$	$4f^6$		0,950
64	Gd	[Xe]$4f^7 5d6s^2$		$4f^7$		0,938
65	Tb	[Xe]$4f^9 6s^2$		$4f^8$	($4f^7$)	0,923
66	Dy	[Xe]$4f^{10} 6s^2$		$4f^9$	($4f^8$)	0,908
67	Ho	[Xe]$4f^{11} 6s^2$		$4f^{10}$		0,894
68	Er	[Xe]$4f^{12} 6s^2$		$4f^{11}$		0,881
69	Tm	[Xe]$4f^{13} 6s^2$	($4f^{13}$)	$4f^{12}$		0,869
70	Yb	[Xe]$4f^{14} 6s^2$	$4f^{14}$	$4f^{13}$		0,858
71	Lu	[Xe]$4f^{14} 5d6s^2$		$4f^{14}$		0,848

Πίνακας Ι.2: *Βασικά χαρακτηριστικά ιόντων λανθανιδών (Σε παρένθεση εμφανίζονται οι δομές που έχουν παρατηρηθεί μόνο σε στερεά μορφή).*

1.3.3 ΣΥΝΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΛΑΝΘΑΝΙΔΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

Ο αριθμός συναρμογής των λανθανιδικών ιόντων ποικίλλει, με πιο συνηθισμένες τιμές 7, 8 και 9. Εν τούτοις, έχουν παρατηρηθεί δομές που ο αριθμός συναρμογής λαμβάνει τιμές από 6 εώς 12, αν και μερικά παραδείγματα συμπλόκων με αριθμό συναρμογής 6 που αρχικά είχαν γίνει αποδεκτά, αποδειχθήκαν τελικά αναληθή. Η απόρριψη των συμπλόκων αυτών επήλθε έπειτα από την ανίχνευση μορίων διαλύτη στη σφαίρα συναρμογής, με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού συναρμογής σε 7, 8 ή 9.[55,58]

Στη βασική κατάσταση, κάθε κατιόν Ln^{3+} παρουσιάζεται να προσελκύει υποκαταστάτες με ηλεκτρονική διαμόρφωση ενός ευγενούς αερίου, με τα ηλεκτρόνια των 4*f* τροχιακών των λανθανιδών διατεταγμένα κατά τέτοιο τρόπο ώστε και οι υποκαταστάτες να προστατεύονται αποτελεσματικά. Η ενέργεια σταθεροποίησης του πεδίου του κάθε υποκαταστάτη είναι αντίστοιχα μικρή, ενώ οι ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις παρουσιάζονται σχετικά ελαττωμένες λόγω του συγκριτικά μεγάλου μεγέθους των κατιόντων Ln^{3+}.

Οι σταθερές σχηματισμού των συμπλόκων για τα ελαφρά ιόντα των λανθανιδών λαμβάνουν κανονικά μεγαλύτερες τιμές με ελάττωση της ακτίνας κατιόντος, άσχετα

με τον υποκαταστάτη που χρησιμοποιείται. Για τα σύμπλοκα όμως των βαρύτερων κατιόντων οι μεταβολές είναι πιο περίπλοκες και εξαρτώνται από το είδος του υποκαταστάτη. Το αποτέλεσμα είναι η διαφοροποιήση του τρόπου συναρμογής, ανάλογα με τη θέση του ιόντος στη σειρά του Περιοδικού Πίνακα. Γενικά, τα λανθανιδικά ιόντα ενώνονται κατά προτίμηση με σκληρές βάσεις, όπως το οξυγόνο και το φθόριο, σχηματίζοντας πολύ σταθερά σύμπλοκα.

Το νερό είναι γνωστό ότι είναι ισχυρός υποκαταστάτης και μόνο ο σχηματισμός με πιο σταθερά σύμπλοκα ή χηλικές ενώσεις μπορεί να το αντικαταστήσει από τη σφαίρα συναρμογής των λανθανιδών. Ο τύπος $[Ln(H_2O)n]^{3+}$ επικρατεί σε υδατικό διάλυμα και προκύπτει από την ισορροπία αναγωγής του H_2O από το Ln^{2+} και έπειτα από την οξείδωση του H_2O από τοLn^{4+}, όπως φαίνεται στο σχήμα Ι.13. Η τάση για υδρόλυση αυξάνει με αυξανόμενο ατομικό αριθμό, όπως αναμένεται από τη συστολή της ακτίνας.

$$Ln^{2+}_{(aq)} + H^{+}_{(aq)} \longrightarrow Ln^{3+}_{(aq)} + 0{,}5\ H_{2(g)}$$

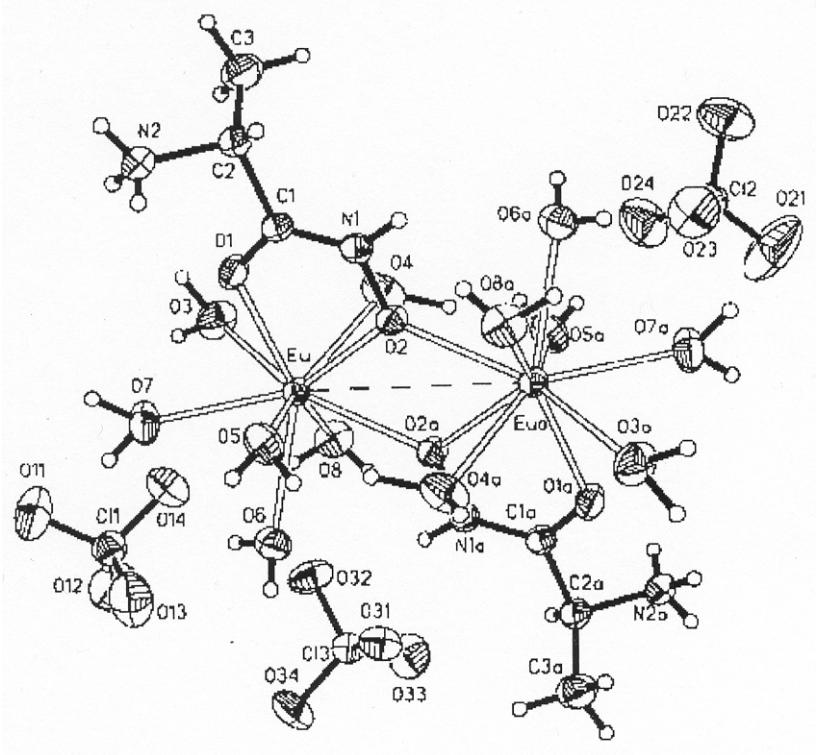
$$2\ Ln^{4+}_{(aq)} + H_2O_{(aq)} \longrightarrow 2\ Ln^{3+}_{(aq)} + 2\ H^{+}_{(aq)} + 0{,}5\ O_{2(g)}$$

Σχήμα Ι.13: *Σχηματισμός του Ln^{3+} σε υδατικό διάλυμα.*

Η αντίδραση ανταλλαγής είναι πάντοτε πολύ γρήγορη όταν γίνεται σε διαλύματα. Αυτή η κατάσταση περιορίζει τον αριθμό των συμπλόκων λανθανιδών, τα οποία είναι σε θέση να απομονωθούν και ελαττώνει τον αριθμό των γεωμετρικών και των οπτικών ισομερών που μπορούν να παραμείνουν σταθερά. Σε σύγκριση με τα *d*-μεταβατικά ιόντα, τα ιόντα των λανθανιδών σαν σύνολο σχηματίζουν πιο λίγα σύμπλοκα και έχουν πολύ διαφορετικές ιδιότητες.

Διάφορα σύμπλοκα λανθανιδών με υδροξαμικά οξέα έχουν παρασκευαστεί, δεδομένου ότι η δομή των υδροξαμικών οξέων ευνοεί το σχηματισμό συμπλόκων με δύο δότες οξυγόνου. Οι λανθανίδες αλληλεπιδρούν με υποκαταστάτες όπως το φαίνυλο-υδροξαμικό οξύ, γαι να δώσουν σύμπλοκα της μορφής $Ln(L)_3$ σε αιθανόλη.[59,60] Πρόσφατα, παρασκεύαστηκαν δινουκλεϊνικά σύμπλοκα του Eu(III) με DL-α και L-α αλανίνη-υδροξαμικό οξύ σε διαλύτη νερό, όπου ένα άτομο Eu συναρμόζεται με δύο άτομα οξυγόνου μιας ομάδς υδροξαμικού οξέος και έξι μόρια H_2O να συμπληρώνουν τη σφαίρα συναρμογής της λανθανίδας. Στο σχήμα

Ι.14 παρουσιάζεται η κρυσταλλική δομή του απομωνομένου συμπλόκου, μέσω περίθλασης ακτίνων Χ.[61]



Σχήμα Ι.14 : ***Κρυσταλλική δομή του δινουκλεϊνικού συμπλόκου [Eu(DL-α-AlaAH)(H$_2$O)$_6$]$_2$(ClO$_4$)$_6$***

1.3.4 ΦΥΣΙΚΑ ΑΠΟΘΕΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΛΑΝΘΑΝΙΔΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε οι λανθανίδες αναφέρονται και ως σπάνιες γαίες, χωρίς όμως να είναι στην πλειοψηφία τους σπάνιες στον ορυκτό πλούτο της γης, όπως φαίνεται στον πίνακα Ι.3. Για παράδειγμα, το δημήτριο και το νεοδύμιο βρίσκονται στην φύση σε μεγαλύτερη αφθονία από τον μόλυβδο, ενώ το θούλιο απαντά σε ποσότητα ίση περίπου με το ιώδιο.

Z	Ονομασία	Αφθονία (p.p.m.)
57	Λανθάνιο	18.3
58	Δημήτριο	46.1
59	Πρασεοδύμιο	5.5
60	Νεοδύμιο	23.9

61	Προμήθειο	0.0
62	Σαμάριο	6.5
63	Ευρώπιο	1.1
64	Γαδολίνιο	6.4
65	Τέρβιο	0.9
66	Δυσπρόσιο	4.5
67	Όλμιο	1.1
68	Έρβιο	2.5
69	Θούλιο	0.2
70	Υττέρβιο	2.7
71	Λουτέτσιο	0.8

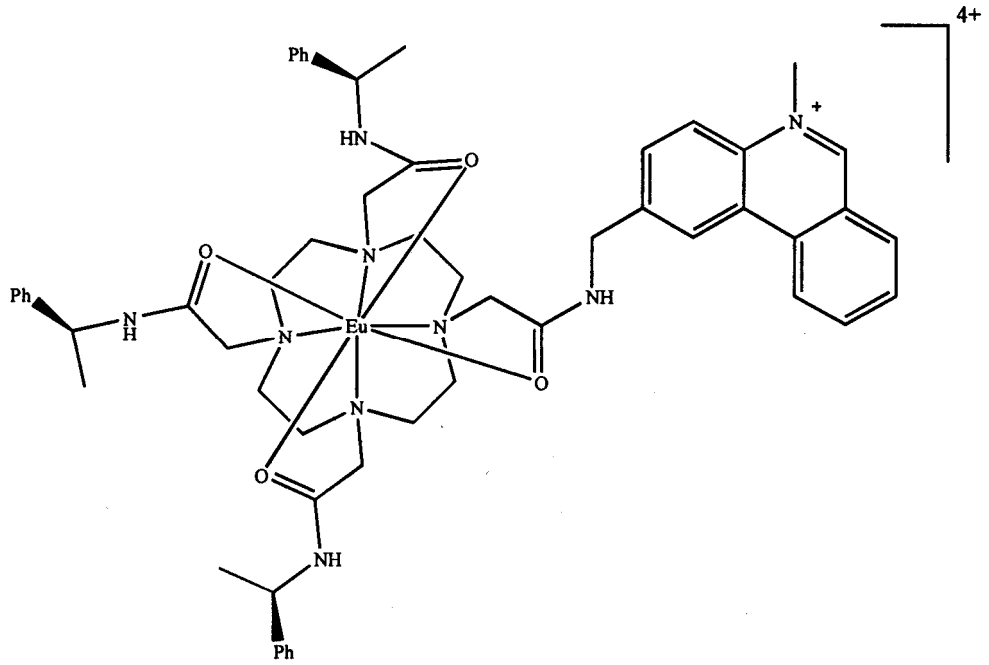
Πίνακας Ι.3: *Αφθονία Λανθανιδών στη φύση.*

Το στοιχείο προμήθειο βρίσκεται στην φύση μόνο σε ίχνη, σε ορυκτά που περιέχουν ουράνιο. Το προμήθειο είναι προϊόν της αργής πυρηνικής διάσπασης του ^{235}U και απαντά σε μικρές μόνο ποσότητες, διότι κανένα ισότοπό του δεν είναι αρκετά σταθερό, για παράδειγμα το ^{147}Pm που είναι το λιγότερο ασταθές ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι $t^{1/2} = 2,3$ χρόνια.

Τα κυριότερα αποθέματα μεταλλευμάτων, πλούσιων σε λανθανίδες βρίσκονται στην Κίνα, Σκανδιναβία, Βραζιλία, Αυστραλία, Ινδία, πρώην Σοβιετική Ένωση και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Τα απόθέματα αυτά υπολογίζονται σε περισσότερους από $84x10^6$ τόνους, τα οποία είναι αρκετά για να καλύψουν τις ανάγκες 2.300 χρόνων με τους σημερινούς ρυθμούς κατανάλωσης.

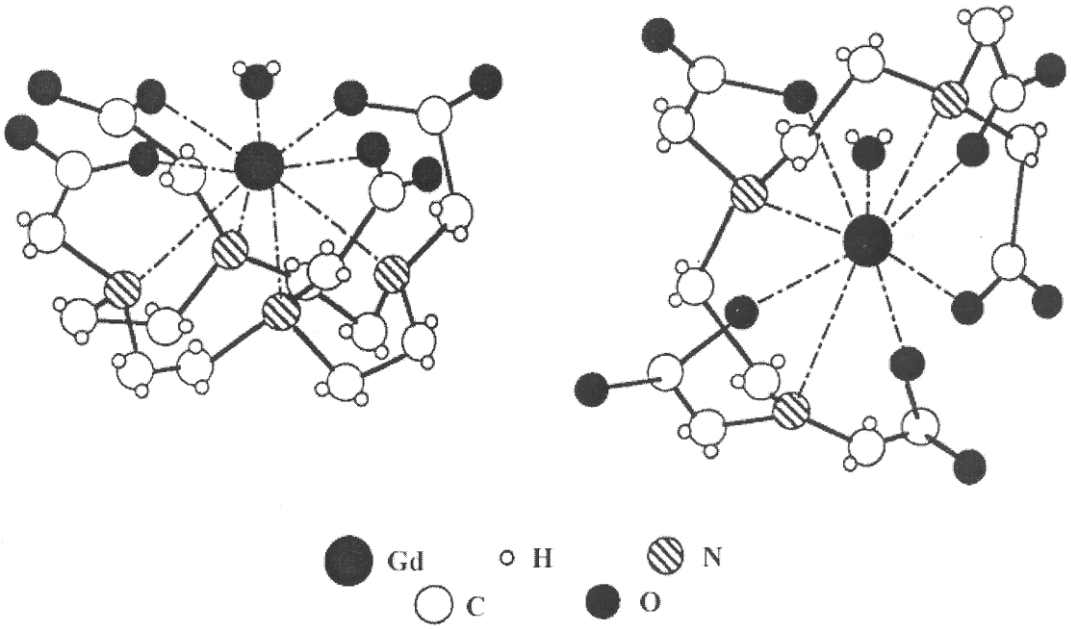
Η κύρια εφαρμογή των λανθανιδών τις προηγούμενες δεκαετίες βρίσκονταν στις έγχρωμες τηλεοράσεις, όπου αποτελούσε και την μεγαλύτερη αγορά σε φωσφόρους σπάνιων γαιών.[54] Την προηγούμενη δεκαετία όμως παρουσιάστηκε ένα έντονο ενδιαφέρον στην χημεία συναρμογής των λανθανιδών,[62] εξαιτίας κυρίως των εφαρμογών τους σαν αισθητήρες φωταύγειας στην ιατρική και τη βιολογία,[63] σαν αντιδραστήρια αντίθεσης στην μαγνητική τομογραφία (MRI)[64,65,66,67] και σαν ήπια αντιδραστήρια και καταλύτες στην οργανική σύνθεση.[68] Οι παραπάνω εφαρμογές απαιτούν ακριβή γνώση των ιδιοτήτων συναρμογής των λανθανιδικών ιόντων.[69]

Ένα παράδειγμα αντιδραστηρίου που χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής DNA, λόγω της ιδιότητας φωταύγειας που κατέχει είναι το σύμπλοκο μεταξύ ευρωπίου και του μακροκυκλικού τετρα-αμιδίου, συνδεδεμένου με μια μονάδα N-άλκυλ-φαιναθριδίνης, που παρουσιάζεται στο σχήμα Ι.15.[70] Τέτοιου είδους σύμπλοκα έχουν την ιδιότητα να παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις του DNA, παρουσία του οποίου αυξάνονται οι ιδιότητες φωταύγειας και να διευκολύνουν έτσι την επιθυμιτή παρατήρηση.[71]



Σχήμα Ι.15: *Δομή του συμπλόκου ευρωπίου-μακροκυκλικού τετρααμιδίου (SSS)-Δ-[EuL]$^{4+}$.*

Οι λανθανίδες και ιδιαίτερα τα σύμπλοκα του γαδολινίου, τα οποία εμφανίζουν μεγάλες ενεργές μαγνητικές ροπές, είναι από τα σημαντικότερα αντιδραστήρια αντίθεσης που χρησιμοποιούνται στο MRI. Οι διαγνωστικές δυνατότητες των συμπλόκων ενώσεων ως αντιδραστήτρια αντίθεσης παρουσιάστηκαν για πρώτη φορά σε ασθενείς από τον Carr και τους συνεργάτες του με το σύμπλοκο $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$, το οποίο χορηγήθηκε ενδοφλέβεια σε ασθενείς με όγκο στον εγκέφαλο, παρέχοντας πληροφορίες για την καταστροφή των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων του εγκεφάλου.[72] Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκο αυτού, το οποίο χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα, καθώς και του συμπλόκου $[Gd(DOTA)(H_2O)]^{-}$ παρουσιάζονται στο σχήμα Ι.16.[73]



Σχήμα Ι.16: *Κρυσταλλική δομή των συμπλόκων $[Gd(DOTA)(H_2O)]^-$ (αριστερά) και $[Gd(DTPA)(H_2O)]^{2-}$ (δεξιά).*

Μια νέα προοπτική η οποία ανοίγεται τα τελευταία χρόνια σύμφωνα με διάφορες έρευνες, είναι η χρήση των λανθανιδών σε θεραπευτικές αγωγές. Τα πειραματικά δεδομένα, όπως η διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης και η απόπτωση που προκαλούνται από της λανθανίδες, καθώς επίσης και η επίδραση τούς σε ROS μεσολαβούμενες οξειδωτικές βλάβες και στην οργάνωση και σταθερότητα του κυτταρικού σκελετού είναι ορισμένες ενδείξεις βιοδραστικότητας που είναι δυνατό να εξελιχθούν στο μέλλον σε ολοκληρωμένες εφαρμογές.[74]

1.4 ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΑ ΟΞΕΑ RNA – DNA. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

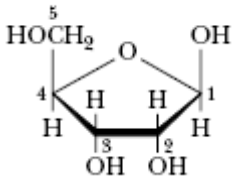
Τα νουκλεϊνικά οξέα ανακαλύφθηκαν το 1869 από τον F. Miescher ο οποίος απομόνωσε από πυρήνες κυττάρων ενώσεις με συγκεκριμένη όξινη αντίδραση, τις οποίες ονόμασε “nucleins” από το nucleus (= πυρήνας). Την ίδια περίπου εποχή ο Mendel ανακάλυπτε τους νόμους της Γενετικής. Πέρασαν όμως 75 χρόνια για να πάρουμε την πρώτη ένδειξη ότι η ανακάλυψη του πρώτου αποτελούσε τη μοριακή βάση της ανακάλυψης του δευτέρου.

Το βακτήριο του πνευμονιοκόκκου είχε σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη του γενετικού ρόλου του DNA. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες το βακτήριο (Β) έχει μια επικάλυψη από πολυσακχαρίτη η οποία του προσδίδει τις παθογονικές του ιδιότητες και προκαλεί πνευμονία στους ανθρώπους και σε άλλα ανώτερα θηλαστικά. Μεταλλαγμένες μορφές του βακτηρίου δεν έχουν αυτήν την επικάλυψη και κατά συνέπεια δεν είναι παθογόνα. Τα φυσιολογικά Β αναφέρονται σαν S-φόρμα (Smooth) επειδή δημιουργούν λείες αποικίες ενώ τα μεταλλαγμένα σαν R-φόρμα (Rough) επειδή δημιουργούν αδρές αποικίες. Στα μεταλλαγμένα Β λείπει ένα ένζυμο απαραίτητο για την σύνθεση του πολυσακχαρίτη. Το 1928 ο Fred Griffith ανακάλυψε ότι η μη παθογόνος R-φόρμα μπορεί να μετατραπεί σε παθογόνο S-φόρμα με τον ακόλουθο τρόπο: χορήγησε σε ένα ποντικό ένα μείγμα βακτηρίων από ζωντανά R B και νεκρά S B .Το μείγμα αποδείχτηκε θανατηφόρο, ενώ τα συστατικά του από μόνα τους όχι, δηλαδή ούτε τα ζωντανά R B αλλά ούτε και τα νεκρά S B από μόνα τους δεν ήταν παθογόνα. Το συμπέρασμα ήταν ότι κατά κάποιο τρόπο τα R B μετατράπηκαν σε S B. Την ίδια περίοδο βρέθηκε ότι η μετατροπή R® S μπορεί να γίνει και in vitro.

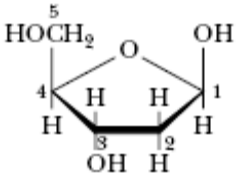
Το 1944 οι Oswald Avery, Colin MacLeod και Maclyn MacCarty αφού ομογενοποίησαν νεκρά S B διαχώρισαν το εκχύλισμα σε διαφορετικά κλάσματα και μελέτησαν τη δραστικότητα του κάθε κλάσματος. Αποδείχτηκε ότι το κλάσμα που περιείχε το DNA ήταν αυτό που προκαλούσε τις κληρονομικές μεταβολές από τον ένα πνευμονιόκοκκο στον άλλο. Το εύρημα αυτό ήταν θεμελιώδες και αποτέλεσε την αρχή μιας νέας εποχής στις βιολογικές επιστήμες με σταθμούς την ανακάλυψη τις τρισδιάστατης δομής του DNA από τους Watson και Crick το 1953, την ανακάλυψη του μηχανισμού σύνθεσης του DNA από τον Kornberg το 1956 και τέλος την ανακάλυψη του γενετικού κώδικα από το Nirenberg to 1961. Σήμερα λοιπόν γνωρίζουμε ότι ο βιολογικός ρόλος των νουλεϊνικών οξέων είναι η αποθήκευση, η μετάδοση και η έκφραση των γενετικών πληροφοριών.[75]

1.4.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Τα νουκλεϊνικά οξέα είναι μακρομόρια που αποτελούνται από πολλά νουκλεοτίδια που ενώνονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Το κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μία φωσφορική ομάδα, μία πεντόζη και μία οργανικη βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης. Αν το νουκλεϊνικό οξύ περιέχει D-ριβόζη ως υδατάνθρακα ονομάζεται ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA) , ενώ αν περιέχει D-2-δεοξυριβόζη ονομάζεται δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (σχ.Ι.16).



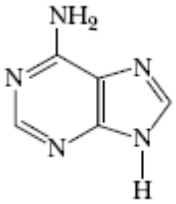
D-ριβόζη



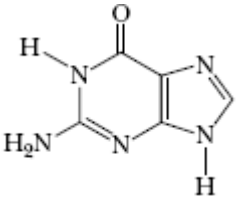
D-2-δεοξυριβόζη

Σχήμα Ι.16: ***Πεντόζες του RNA και του DNA αντίστοιχα***

Οι βάσεις πουρίνης που βρίσκονται στο RNA είναι η αδενίνη και η γουανίνη, οι δε βάσεις πυριμιδίνης η ουρακίλη και η κυτοσίνη.



αδενίνη(A)

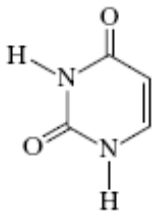


γουανίνη (G)

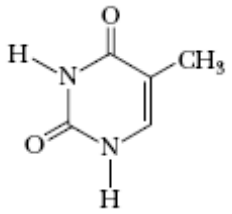
σχήμα Ι.17: ***Βάσεις πουρίνης***

Τα μόρια του DNA έχουν τις ίδιες βάσεις με τη διαφορά ότι αντί για ουρακίλη θα βρούμε την πυριμιδίνη : θυμίνη που είναι η 5-μεθυλοουρακίλη. Εκτός όμως από αυτές τις βάσεις στα νουκλεϊνικά οξέα υπάρχουν και πολύ μικρά ποσά., ίχνη θα λέγαμε και άλλων υποκαταστημένων πουρινών και πυριμιδινών. Π.χ. στο RNA βρίσκουμε αδενίνες με διάφορους υποκαταστάτες στην αμινομάδα, όπως N-μέθυλο – και N- διμεθυλοαδενίνη , υποξανθίνη , θειοουρακίλη, θειογουανίνη, ακόμα

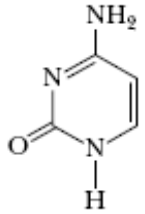
και θυμίνη. Η τροποποίηση αυτή των βάσεων δε γίνεται τυχαία αλλά παίζει κάποιο ρόλο συνήθως στην έκφραση των βιολογικών ιδιοτήτων των νουκλεϊνικών οξέων.



ουρακίλη (U) rna



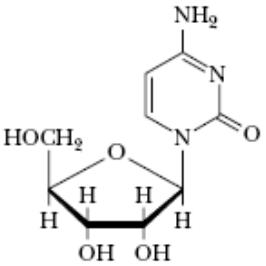
θυμίνη (T)dna



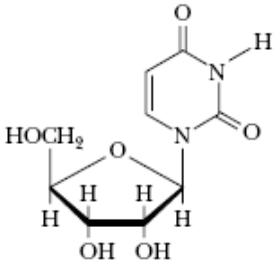
κυτοσίνη (C)

Σχήμα Ι.18: ***Βάσεις πυριμιδίνη***

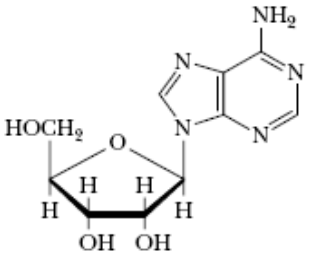
Η ένωση βάσης και πεντόζης μέσω ενός γλυκοζιτικού δεσμού καλείται νουκλεοζίτης και συγκεκριμένα ριβονουκλεοζίτης ή δεοξυριβονουκλεοζίτης , ανάλογα εάν η πεντόζη είναι ριβόζη ή δεοξυριβόζη.



κυτιδίνη



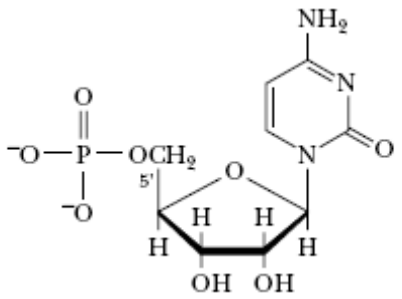
ουριδίνη



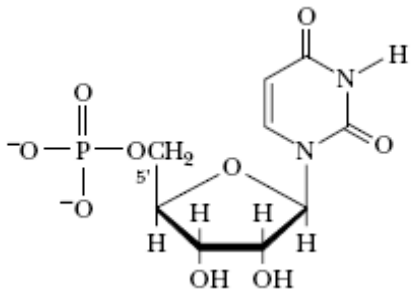
αδενοσίνη

Σχήμα Ι.19 : ***Νουκλεοζίτες***

Η ένωση νουκλεοζίτη με φωσφορικό οξύ ονομάζεται νουκλεοτίδιο ή μονονουκλεοτίδιο που πάλι ανάλογα με τη φύση της πεντόζης είναι ριβονουκλεοτίδιο ή δεοξυριβονουκλεοτίδιο. Τα νουκλεοτίδια εκείνα που η φωσφορική ομάδα είναι εστεροποιημένη στο πέμπτο υδροξύλιο του υδατάνθρακα ονομάζονται 5΄-νουκλεοτίδια και εκείνα που η φωσφορική ομάδα είναι στο τρίτο υδροξύλιο 3΄-νουκλεοτίδια. Τα νουκλεοτίδια επίσης καλούνται , όπως και είναι , εστέρες των αντίστοιχων νουκλεοζιτών. Το αδενυλικό οξύ λ.χ. ονομάζεται και αδενοσινομονοφωσφορικό οξύ. Εκτός από μονοφωσφορικοί εστέρες υπάρχουν και διφωσφορικοί καθώς και τριφωσφορικοί εστέρες.



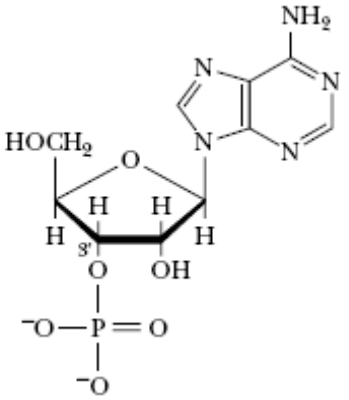
μονοφωσφορική κυτιδίνη



μονοφωσφορική ουριδίνη

Σχήμα Ι. 20: ***5΄-νουκλεοτίδια***

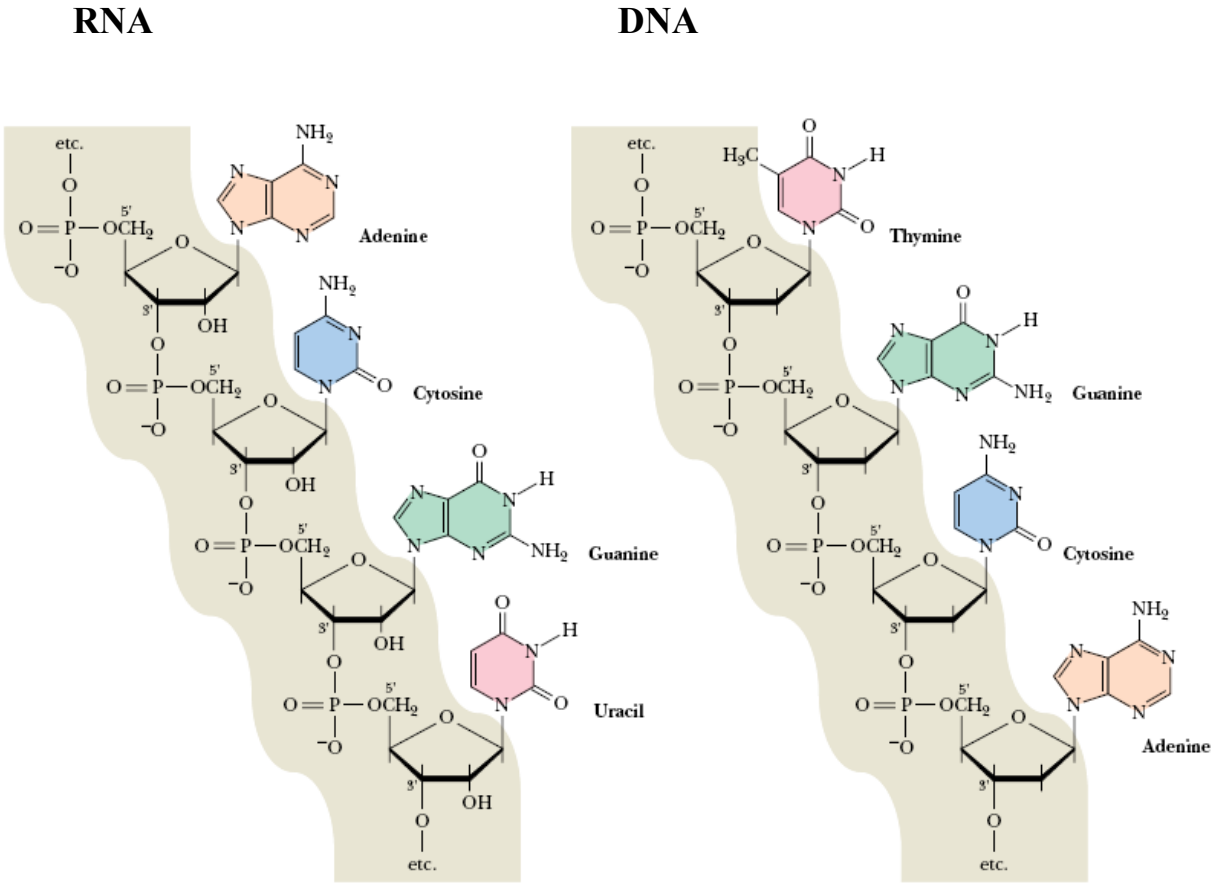
Τα νουκλεϊνικά οξέα αποτελούνται από μονονουκλεοτίδια που είναι ενωμένα μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Η φωσφορική ομάδα ενός μονονουκλεοτιδίου που βρίσκεται στην 5΄ θέση εστεροποιείται με την ελεύθερη υδροξυλομάδα στη 3΄ θέση ενός άλλου νουκλεοτιδίου. Η φωσφορική ομάδα στην 5΄ θέση του δεύτερου νουκλεοτιδίου ,εστεροποιείται με την ελεύθερη υδροξυλομάδα στην 3΄ θέση ενός άλλου νουκλεοτιδίου κ.ο.κ.



Σχήμα Ι. 21: ***3΄-νουκλεοτίδιο***

Μ' αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται δινουκλεοτίδια , τρινουκλεοτίδια και τέλος πολυνουκλεοτίδια. Δημιουργείται δηλαδή στα νουκλεϊνικά οξέα ένα μόρφωμα που έχει σα ραχοκοκκαλιά μια αλληλουχία από φωσφορικά και ριβόζες που επάνω τους είναι αγκιστρωμένες οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης. Έτσι σαν αρχή πρέπει να ξέρουμε ότι τα RNA είναι πολυνουκλεοτίδια που αποτελούνται κυρίως από μονοκλεοτίδια AMP,GMP, CMP, UMP, το δε DNA είναι πολυνουκλεοτίδιο που αποτελείται κυρίως από τα μονονουκλεοτίδια dAMP, dGMP, dCMP και dTMP. Η

αλληλουχία των νουκλεοτιδίων στα μόρια των νουκλεϊνικών οξέων δεν είναι τυχαία αλλά σαφώς καθορισμένη και αποτελεί την πρωτοταγή δομή των νουκλεϊνικών οξέων. Τέλος , στα νουκλεοτίδια στο ένα άκρο (γνωστό ως 3΄ άκρο) υπάρχει μία ελεύθερη υδροξυλομάδα και στο άλλο (γνωστό ως 5΄ άκρο) μια μονοεστεροποιημένη φωσφορική ομάδα.[76,77]

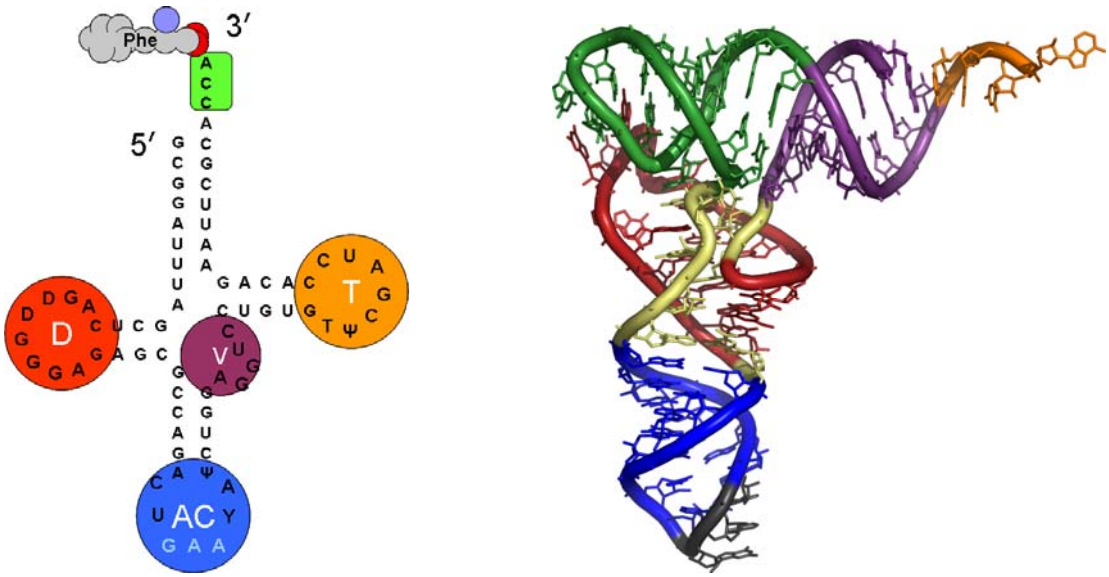


Σχήμα Ι. 21: ***Νουκλεϊνικά οξέα***

1.4.2. ΔΟΜΗ ΤΟΥ RNA

Η αλληλουχία των βάσεων στα νουκλεϊκά οξέα ,όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελεί την πρωτοταγή δομή τους. Ο αριθμός των νουκλεοτιδίων στο RNA κυμαίνεται από 25 νουκλεοτίδια έως μερικές χιλιάδες. Τα μόρια του RNA είναι συνήθως μονόκλωνα μόρια . Δεν μπορούν να σχηματίσουν διπλή έλικα τύπου Β γιατί υπάρχει παρεμπόδιση από το 2΄-υδροξύλιο της ριβόζης . Εξαίρεση αποτελεί το RNA

ορισμένων ιών. Επομένως, ένα μόριο RNA δε χρειάζεται να έχει συμπληρωματικούς λόγους βάσεων. Στην πραγματικότητα στα περισσότερα μόρια RNA το ποσοστό της αδενίνης διαφέρει από αυτό της ουρακίλης και το ποσοστό της γουανίνης διαφέρει από αυτό της κυτοσίνης. Εντούτοις όμως μέσα στα μονόκλωνα μόρια, παρουσιάζονται αναδιπλώσεις που οφείλονται σε δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων. Στις περιοχές αυτές (όπου το RNA γίνεται δίκλωνο) η δομή θυμίζει την Α-μορφή του DNA και ονομάζεται A-RNA ή RNA-11 επειδή για μία πλήρη στροφή απαιτούνται 11 ζεύγη βάσεων.



Σχήμα Ι.22: *Πρωτοταγής , δευτεροταγής και τριτοταγής δομή του RNA που μεταφέρει φαινυλαλανίνη.*

Το βήμα της έλικας είναι 30Α και τέλος, τα επίπεδα των ζευγών βάσεων εμφανίζουν κλίση περίπου 14° .Από πλευράς δομής τα RNA είναι πολύ πιο ετερογενή από το DNA και η ετερογένεια στη δομή αντανακλά την ετερογένεια στη λειτουργικότητα. Σαν παράδειγμα θα περιγράψουμε τη δομή ενός μορίου RNA γνωστού και ως tRNA που δουλειά του είναι να μεταφέρει αμινοξέα στο σημείο που γίνεται η σύνθεση των πρωτεϊνών. Στο σχήμα φαίνεται η πρωτοταγής ,η δευτεροταγής καθώς και η τριτοταγής δομή του μορίου. Παρατηρούμε ότι μολονότι το μόριο αποτελείται από ένα κλώνο με 76 μονονουκλεοτίδια εν τούτοις αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου

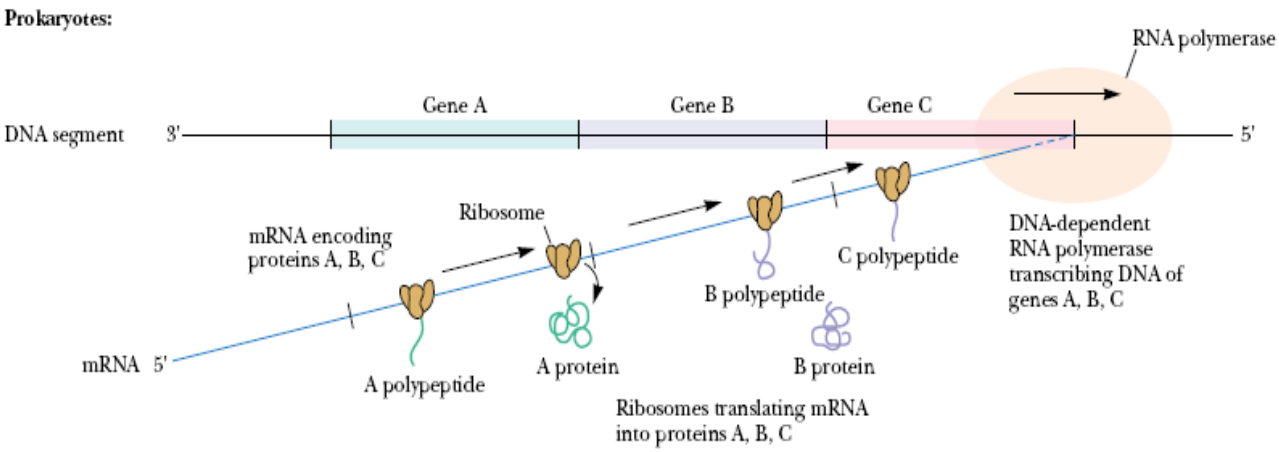
μεταξύ συμπληρωματικών βάσεων έτσι ώστε σε δύο διαστάσεις να μοιάζει με τριφύλλι. Για να πάρει την τελική τρισδιάσταση διαμόρφωσή του , αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ βάσεων σε διαφορετικά φύλλα του τριφυλλιού.[77]

1.4.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΟΥ RNA

Τα κύτταρα περιέχουν διάφορα είδη RNA. Το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) είναι το εκμαγείο για την πρωτεϊνοσύνθεση. Για κάθε γονίδιο ή ομάδα γονιδίων που χρειάζεται να εκφραστεί , παράγεται και ένα mRNA. Επομένως το mRNA είναι μία πολύ ετερογενής τάξη μορίων. Στο *E.coli* το μέσο μήκος του mRNA είναι περίπου 1,2 kb. Τα mRNA αποτελούν το 5% των νουκλεϊνικών οξέων. Το μοριακό τους βάρος είναι από 500 μέχρι 2500 kd.

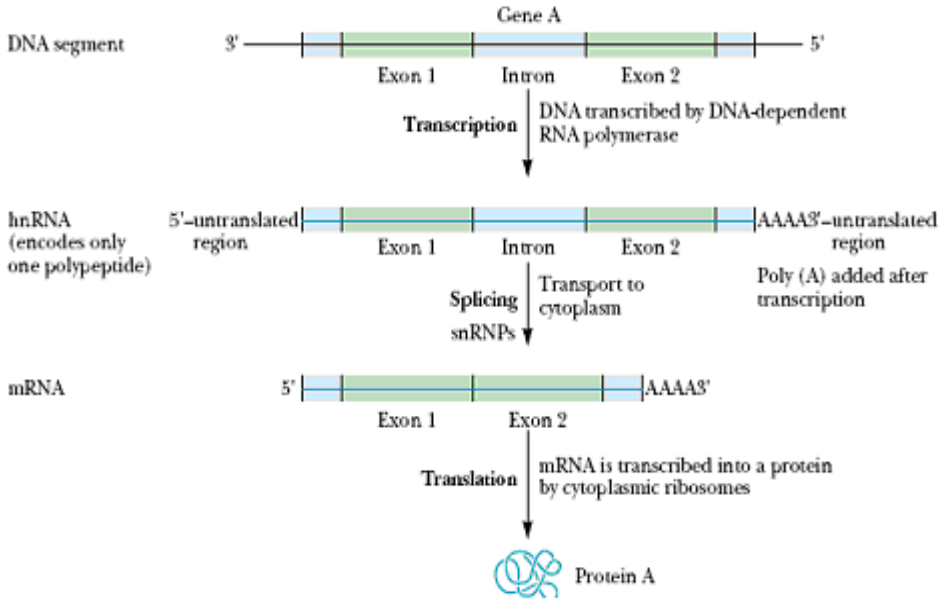
Το μεταφορικό RNA (t RNA, t = transfer) μεταφέρει ενεργοποιημένα αμινοξέα στο ριβόσωμα για το σχηματισμό πεπτιδικού δεσμού όπως καθορίζεται από το εκμαγείο m RNA. Υπάρχει τουλάχιστον ένα είδος tRNA για το καθένα από τα είκοσι αμινοξέα. Το t RNA αποτελείται από εβδομήντα πέντε περίπου νουκλεοτίδια (με μάζα 25 kd) περίπου , πράγμα που το καθιστά το μικρότερο μόριο RNA. Το ριβοσωμικό RNA (r RNA , r = ribosomal) είναι το κύριο συστατικό των ριβοσωμάτων , αλλά ο ακριβής του ρόλος στη πρωτεϊνοσύνθεση δεν είναι ακόμη γνωστός .Η ανακάλυψη του καταλυτικού RNA κάνει την ερώτηση του ρόλου ακόμη πιο ενδιαφέρουσα. Στο *E.coli* υπάρχουν τρία είδη rRNA που λέγονται 23S, 16S και 5S RNA επειδή έχουν διαφορετικό συντελεστή καταβύθισης. Στο κάθε ριβόσωμα υπάρχει ένα μόριο από το καθένα από αυτά τα τρία είδη r RNA. Το ριβοσωμικό RNA είναι το πιο άφθονο από τους τρεις τύπους RNA. Ακολουθεί το μεταφορικό RNA σε αφθονία και στο τέλος βρίσκεται το αγγελιοφόρο RNA.

Τα ευκαριωτικά κύτταρα περιέχουν και άλλα μικρά μόρια RNA. Τα μικρά πυρηνικά RNA (sn RNA, sn = small nuclear) , για παράδειγμα , συμμετέχουν στη διάσπαση των εξονίων του RNA. Ένα μικρό μόριο RNA στο κυροδιάλυμα παίζει ρόλο στην κατεύθυνση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στη σωστή τους θέση.



Σχήμα Ι.23: *Οι ιδιότητες του mRNA στα προκαρυωτικά κύτταρα κατά την αντιγραφή.*

Σχήμα Ι.23: *Οι ιδιότητες του mRNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα*



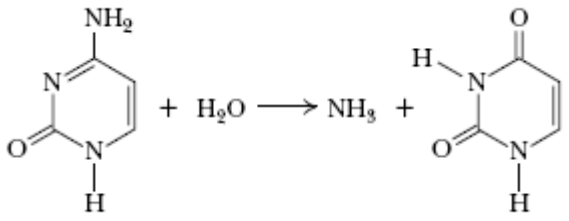
α κατά τη μετάφραση

1.4.4 ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΜΕΤΑΞΥ RNA ΚΑΙ DNA

Δύο θεμελιώδεις διαφορές διακρίνονται μεταξύ των μορίων RNA – DNA.Η πρώτη είναι ότι το DNA εμπεριέχει 2-δεοξυριβόζη αντι ριβόζη, και η δεύτερη είναι ότι έχει σαν βάση τη θυμίνη , ενώ το RNA την ουρακίλη.Οι συνέπειες αυτών των διαφορών είναι σημαντικές όσον αφορά στη βιολογική δραστηριότητα των μορίων.

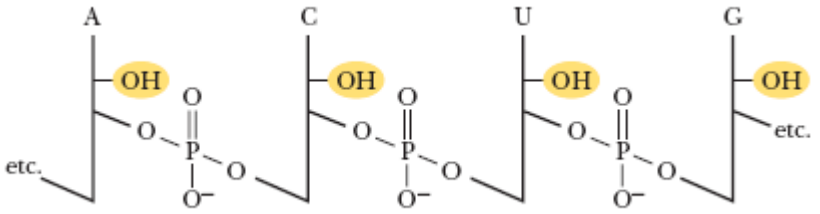
Ένα συμπέρασμα που μπορεί να δημιουργηθεί λόγω των διαφορών αυτών είναι ότι το RNA είναι ένα πολύ πιο ασταθές μόριο από το DNA. Η μεγάλη σταθερότητα του δεύτερου είναι συνυφασμένη με τον ιδιαίτερο ρόλο που έχει στην κληρονομικότητα και στην μεταβίβαση πληροφοριών.

Ας εξετάσουμε αρχικά γιατί το DNA περιέχει θυμίνη αντί για ουρακίλη. Τη κυτοσίνη απαμινώνεται προς σχηματισμό της ουρακίλης σε καθορισμένη αναλογία in vivo.Επειδή η C στην αλυσίδα του DNA ενώνεται με τη G της άλλης αλυσίδας , αν και η U θα ήταν με την A , η μετατροπή της C σε U πιθανώς θα οδηγούσε σε κληρονομική αλλαγή από CG σε UA. Μία τέτοια αλλαγή στη νουκλεοσιδική διαδοχή θα οδηγούσε σε μετάλλαξη του DNA. Για την αποφυγή αυτής της αντίδρασης, ένας κυτταρικός μηχανισμός proofread DNA και όταν η U προερχόμενη από τη απαμίνωση της C συναντάται , αντιμετωπίζεται σαν μη κατάλληλη και αντικαθίσταται από C. Αν το DNA εμπεριείχε Uαντί για T , αυτός ο μηχανισμός δεν θα μπορούσε εύκολα να διακρίνει την U προερχόμενη από απαμίνωση της C από την U που σωστά θα ταίριαζε με την A. Έτσι η U στο DNA είναι ουσιαστικά η 2-μέθυλο-ουρακίνη, γνωστή ως θυμίνη.

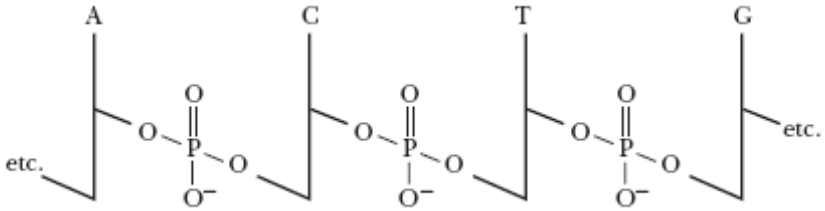


Σχήμα Ι.24: *Απαμίνωση της κυτοσίνης προς σχηματισμό ουρακίλης.*

Η ομάδα 2-OH της ριβόζης στο μόριο του RNA δεν υπάρχει στο DNA. Επομένως, η ομάδα 3-O του βασικού σκελετού του πολυνουκλεϊτιδίου στερείται ενός γειτονικού υδροξυλίου .Αυτή η διαφορά οδηγεί σε μία πολύ μεγάλη αντίσταση του DNA στην αλκαλική υδρόλυση. Από την άλλη μεριά, το RNA είναι πολύ πιο ασταθές από το DNA , γιατί η 2-OH ομάδα καθιστά τον 3-φωσφοδιεστερικό δεσμό πολύ ευαίσθητο σε μία νουκλεοφιλική τμήση.[77]



RNA



DNA

Σχήμα Ι.25: *Δομές του RNA και DNA όπου ξεχωρίζει η ύπαρξη ή μη του 2-OH.*

1.4.5 ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΤΟΥ RNA

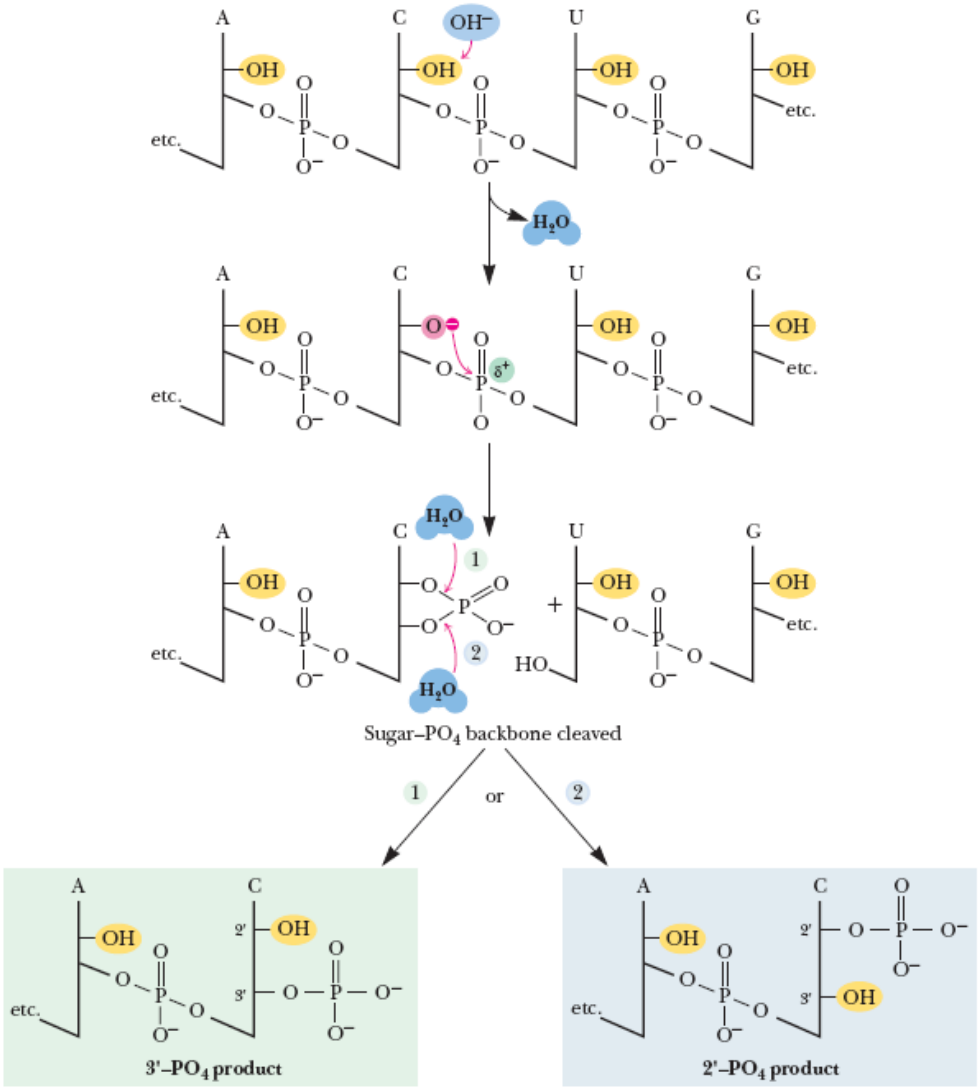
Οι περισσότερες αντιδράσεις υδρόλυσης νουκλεϊνικών οξέων σπάνε τους δεσμούς στη ραχοκοκκαλιά του πολυνουκλεοτιδίου. Τέτοιες αντιδράσεις είναι πολύ σημαντικές γιατί χρησιμοποιούνται για να διαφοροποιήσουμε αυτά τα μόρια. Π.χ, η υδρόλυση των πολυνουκλεοτιδίων δημιουργεί μικρότερα θραύσματα τα οποία μπορούν ευκολότερα να προσδιοριστούν.

α)Υδρόλυση από οξύ ή βάση:

Το RNA είναι σχετικά ανθεκτικό στην επίδραση διαλύματος οξέος αλλά ήπια επεξεργασία του DNA με 1 Mm HCl οδηγεί στην υδρόλυση των γλυκοσιδικών δεσμών της πουρίνης και απώλεια των πουρινικών βάσεων από το DNA. Οι γλυκοσιδικοί δεσμοί μεταξύ των βάσεων της πυριμιδίνης και της 2-δεοξυριβόζης δεν επηρεάζονται και σ'αυτήν την περίπτωση η ραχοκοκκαλιά του πολυνουκλεοτιδίου παραμένει άθικτη. Τα πολυνουκλεοτίδια που έχουν χάσει την πουρίνη ονομάζονται απουρινικά οξέα.

Το DNA είναι ευαίσθητο στην αλκαλική υδρόλυση. Το RNA όμως είναι αλκαλικά ασταθές και εύκολα υδρολύεται από διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου. Η τμήση του RNA είναι τυχαία και τα τελικά προϊόντα είναι ένα μίγμα 2– και 3-

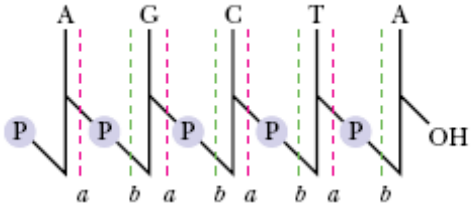
μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη. Αυτά τα προϊόντα παρέχουν μία ένδειξη για το μηχανισμό της αντίδρασης. Αποβολή του υδρογόνου του 2-OH από το υδροξυλικό ανιόν αφήνει το 2-O^- που εκτελεί πυρηνόφιλη προσβολή στο άτομο του φωσφόρου της φωσφορικής ομάδας με αποτέλεσμα την τμήση του 5-δωσφοδιεστερικού δεσμού και τη δημιουργία ενός κυκλικού φωσφορικού εστέρα. Αυτός ο κυκλικός 2,3-φωσφορικός διεστέρας είναι πολύ ασταθής και αποσυνθέτεται αυτόματα σε 2- ή 3 – φωσφορικό εστέρα. Το DNA δεν έχει 2_-OH με αποτέλεσμα να είναι σταθερό σε αλκαλικό περιβάλλον.[77]



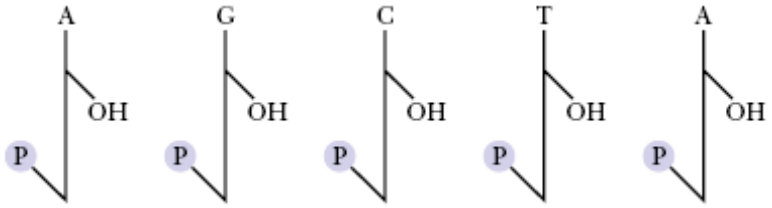
Σχήμα Ι.26: *Βασική υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού.*

β) Ενζυμική υδρόλυση:

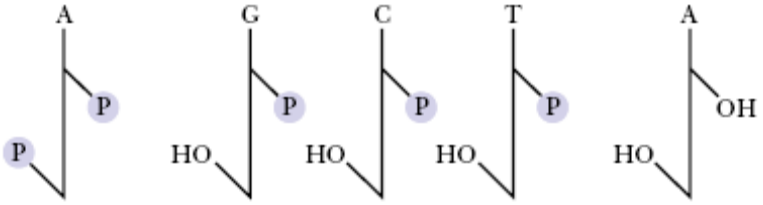
Τα ένζυμα καταλύουν την υδρόλυση των νουκλεϊνικών οξέων ονομάζονται νουκλεάσες. Σχεδόν όλα τα κύτταρα περιέχουν διάφορες νουκλεάσες που εξυπηρετούν βασικούς ρόλους στη φυσιολογική πορεία του μεταβολισμού των νουκλεϊνικών οξέων. Τα όργανα που παρέχουν πεπτικά υγρά, όπως το πάγκρεας, είναι πλούσια σε νουκλεάσες και κρύβουν άφθονες ποσότητες για να υδρολύουν τα νουκλεϊνικά οξέα που προέρχονται από την πέψη. Οι μύκητες και το δηλητήριο των φιδιών είναι συχνά πηγές νουκλεασών. Η κατηγορία νουκλεασών που καταλύουν την τμήση των φωσφοδιεστερικών δεσμών μέσω του νερού ονομάζονται φωσφοδιεστεράσες. Λόγω του ότι κάθε εσωτερικός εστέρας στη βάση ενός πολυνουκλεοτιδίου αποτελείται από δύο φωσφοεστερικούς δεσμούς , η τμήση μπορεί να προκύψει είτε από τη μία είτε από την άλλη μεριά του φωσφόρου.[77]



Σχήμα Ι.27: *Το 3- άκρο ορίζεται a και το 5- άκρο b.*



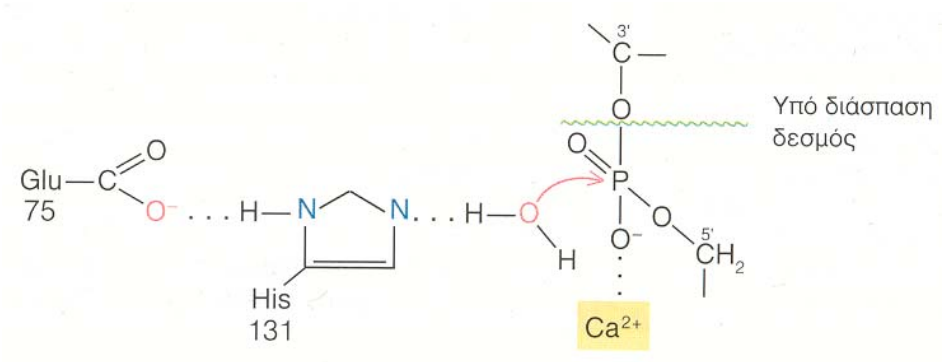
Σχήμα Ι.27: *Υδρόλυση του a δεσμού οδηγεί σε 5- PO_4 παράγωγα.*



Σχήμα Ι.27: *Υδρόλυση του b δεσμού οδηγεί σε 3-PO_4 παράγωγα.*

Το 3-άκρο ορίζεται ως ***a*** και το 5-άκρο ως ***b***. Τμήση στην α πλευρά αφήνει το φωσφορικό εστέρα συνδεδεμένο στην 5-θέση από το γειτονικό νουκλεοτίδιο , ενώ η υδρόλυση στη **b** πλευρά οδηγεί σε 3-φωσφορικά παράγωγα.. Τα ένζυμα όπως και οι αντιδράσεις που υδρολύουν νουκλεϊνικά οξέα χαρακτηρίζονται αντίστοιχα **a** ή **b** .Κατά συνθήκη δεχόμαστε την αλυσίδα του νουκλεϊνικού οξέος που υποβλήθηκε σε τμήση σε εσωτερική τοποθεσία ως **endo** ή αν ένα ακράιο νουκλεοτίδιο αφαιρέθηκε υδρολυτικά ως **exo** οπότε αντίστοιχα υπάρχουν και οι ενδονουκλεάσες, και εξωνουκλεάσες. Να επισημάνουμε ότι μία **exo a** τμήση προκύπτει στο 3-ακρό του πολυμερούς, ενώ μία **exo b** τμήση εμπεριέχει προσβολή στο 5-τελικό άκρο.(παραπάνω σχήμα).

Η υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA, λαμβάνει χώρα έπειτα από την προσβολή του ατόμου του φωσφόρου από πυρηνόφιλα ιόντα υδροξυλίου. Οι φωσφοδιεστέρες είναι ισχυρά οξέα, τα οποία συναντώνται υπό την ανιονική τους μορφή σε φυσιολογικές συνθήκες (Pk_a=1,6). Κατ' αυτόν τον τρόπο, εμφανίζονται ιδιαίτερα ανθεκτικοί στις νουκλεόφιλες προσβολές από ιόντα OH^-, άρα η ενζυματική κατάλυση είναι απαραίτητη για την υδρόλυση τους. Στο σχήμα Ι.28, παρουσιάζεται ένα παράδειγμα υδρόλυσης φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA, καταλυόμενης από DNάση Ι.

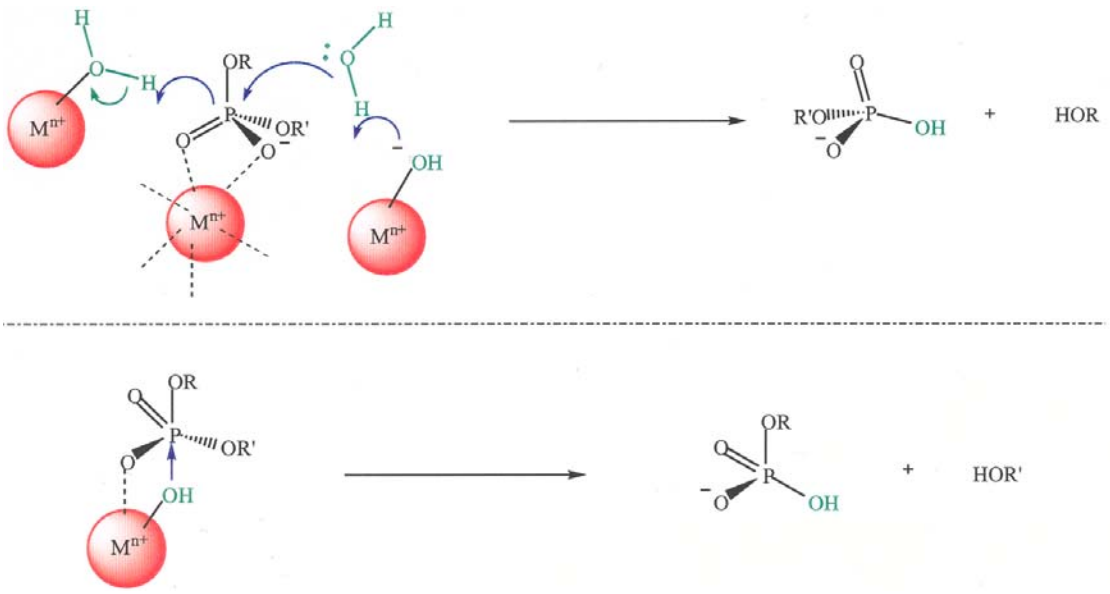


Σχήμα Ι.28 : *Ενζυμική υδρόλυση φωσφοδιεστερικού δεσμού καταλυόμενη από DNάση Ι.*

Κατά το μηχανισμό αυτό, ένα μόριο ύδατος ενεργοποιείται από τη μεταφορά ενός πρωτονίου στην ιστιδίνη και η θετικά φορτισμένη ιμιδαζολική πλευρά σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από την αρνητικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα του γλουταμινικού. Προκειμένου να υπάρξει όμως δραστικότητα του μηχανισμού, απαιτείται ένα δισθενές κατιόν, το οποίο στο επίπεδο του κρυστάλλου είναι ένα ιόν

Ca^{2+} που δεσμεύεται κοντά στον εύκολα διασπάσιμο φωσφοδιεστερικό δεσμό, ενώ στο επίπεδο του κυττάρου ένα ιόν Mg^{2+} μπορεί να εξυπηρετεί τον ίδιο ρόλο.[78]

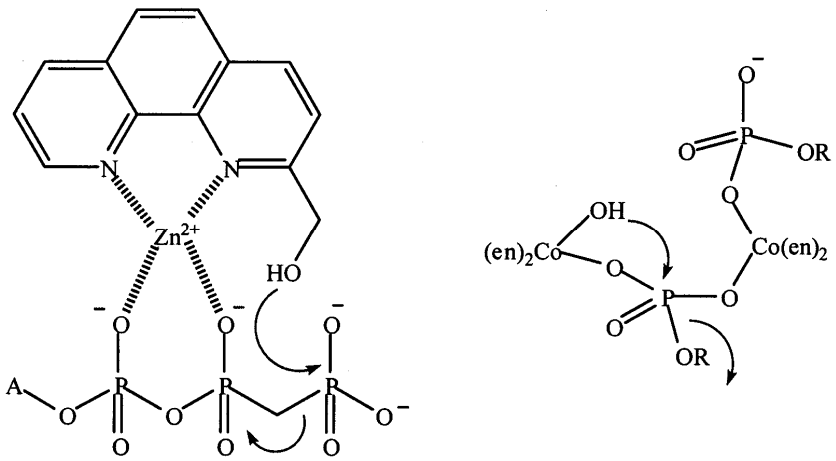
Γενικώς, το ηλεκτρόφιλο μέταλλο M^{n+} κατέχει δύο διακεκριμένους ρόλους κατά την τμήση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA. Από τη μια μεριά, ενεργοποιεί τις αδύναμες βάσεις κατά Lewis, όπως το νερό, και δημιουργεί πυρηνόφιλα αντιδραστήρια πολώνοντας την ένωση μετάλλου-οξυγόνου σε φυσιολογικές συνθήκες, ενώ από την άλλη μεριά αντισταθμίζει τα φερόμενα αρνητικά φορτία από τα φωσφορικά άλατα. Ο μηχανισμός της αντίδρασης τμήσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Δύο μηχανισμοί που εμπλέκουν την προσβολή ενός εξωτερικού υδροξυλίου στο φωσφορικό άλας και μπορούν να υφίστανται υπό φυσιλογικές συνθήκες, παρουσιάζονται στο σχήμα Ι.29.



Σχήμα Ι.29 : *Το μέταλλο κατά την ενζυματική υδρόλυση των φωσφοδιεστέρων, όπου είτε υπάρχει συνεργασία μεταξύ ενός μετάλλου που δρα σαν οξύ κατά Lewis και ενός μετάλλου δότη πυρηνόφιλων(πάνω), είτε ένα μέταλλο παίζει και τους δύο ρόλους συγχρόνως (κάτω).*

Στην πρώτη περίπτωση, η πυρηνόφιλη προσβολή αντιστοιχεί σε έναν SN_2 μηχανισμό, που οδηγεί στην αντιστροφή της μορφής του κέντρου του φωσφορικού άλατος. Στη δεύτερη περίπτωση, το μέταλλο παίζει και τους δύο ρόλους ανά φορά, όντας συντονισμένο σε ένα μόριο νερού και σε δύο άτομα οξυγόνου του φωσφόρου έπειτα. Κατ' αυτόν τον τρόπο, στο μεταβατικό στάδιο το άτομο του φωσφόρου γίνεται το

κέντρο μια τριγωνικής διπυραμίδας, όπου σε μία κορυφή της βάση της βρίσκεται η προσβαλλόμενη ομάδα. Διάφορα μοντέλα ενεργών κέντρων νουκλεασών έχουν συντεθεί στο εργαστήριο με σκοπό τη μελέτη της δράσης των φυσικών ενζύμων. Στο σχήμα Ι.30 παρουσιάζονται τα μεταλλικά σύμπλοκα που σχηματίζονται στο μεταβατικό στάδιο της δράσης δύο τέτοιων μορίων μοντέλων.[79]



Σχήμα Ι.30 : ***Παραδείγματα συμπλόκων μοντέλων νουκλεασών που καταλύουν την υδρόλυτική τμήση των φωσφοδιεστερικών δεσμών***

Τα χαρακτηριστικά διαφόρων κατιόντων που καταλύουν την in vitro υδρόλυση των φωσφοεστέρων, παρουσιάζονται στον πίνακα Ι.3. Η αναλογία του ιονικού φορτίου προς την ιονική ακτίνα (z/r) για τα κατιόντα που μελετήθηκαν δείχνει ότι μόνο τα Ca^{2+}, Mg^{2+} και τα ιόντα λανθανιδών Ln^{3+} αντιστοιχούν σε σκληρά οξέα, ένω τα Zn^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+} σε μέσα οξέα.[27,28]

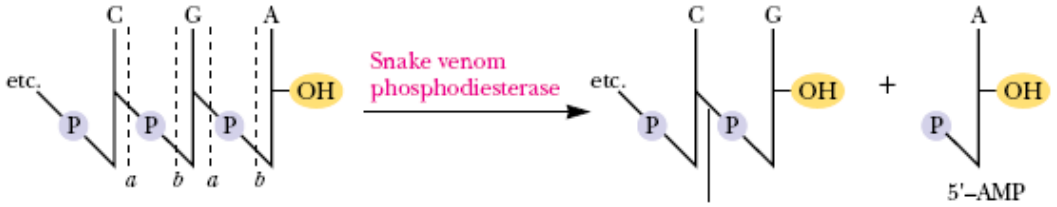
	Mg^{2+}	Zn^{2+}	Fe^{2+}	Mn^{2+}	Ca^{2+}	Ln^{3+}
Ιονική Ακτίνα (pm)	65	74	78	83	100	102-117
Αριθμός Συναρμογής	6	5-6	6	6	6-8	8-9

Πίνακας Ι.3: *Χαρακτηριστικά των διάφορων κατιόντων που χρησιμοποιήθηκαν in vitro για την κατάλυση της υδρόλυσης φωσφοδιεστερικών δεσμών.*

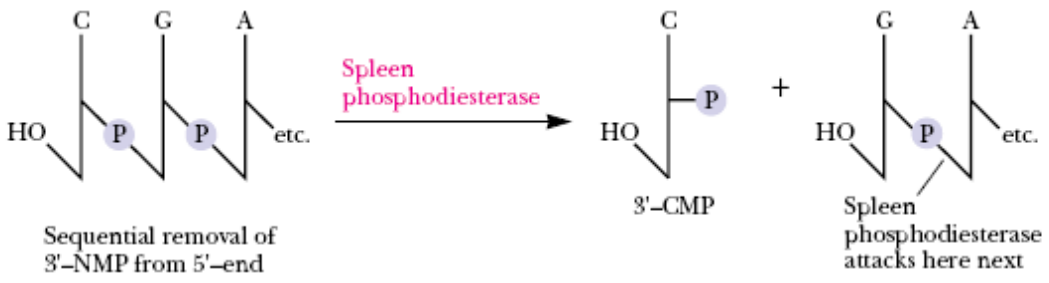
1.4.6 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΝΟΥΚΛΕΑΣΩΝ

Όπως όλα τα ένζυμα, οι νουκλεάσες επιδεικνύουν εκλεκτικότητα ή εξειδίκευση στη φύση του υποστρώματος στο οποίο δρουν. Έτσι, κάποιες νουκλεάσες δρουν μόνο στο DNA , και ονομάζονται δεοξυριβουνοκλεάσες και κάποιες άλλες είναι εξειδικευμένες στο RNA οπότε λέγοντα ριβονουκλεάσες ή πιο σύντομα R-Nases. Άλλες νουκλεάσες που δεν εμφανίζουν επιλεκτικότητα αναφέρονται απλά ως νουκλεάσες .Οι νουκλεάσες μπορεί επίσης να εμφανίσουν επιλεκτικότητα ως προς τα μονόκλωνα νουκλεϊνικά οξέα ή να δρουν μόνο σε διπλές έλικες, οπότε ονομάζονται αντίστοιχα ss ή ds νουκλεάσες (single stranded και double stranded). Μπορεί επίσης να επιδεικνύουν μία προτίμηση στη δράση σε συγκεκριμένες βάσεις πολυνουκλεοτιδίων ή κάποιες να ενεργούν μόνο σε συγκεκριμένης δομής νουκλεοτίδια. Για ένα μοριακό βιολόγο , οι νουκλεάσες είναι ένα χειρουργικό εργαλείο για τον τεμαχισμό και τη μετάλλαξη των νουκλεϊνικών οξέων στο εργαστήριο.

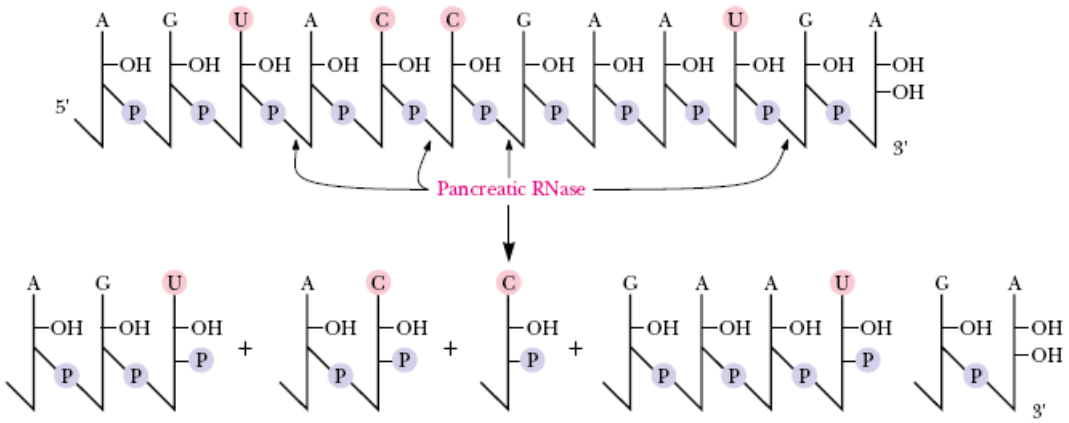
Οι εξωνουκλεάσες μεταλλάσσουν τα νουκλεϊνικά οξέα με επαναλαμβανόμενη μετακίνηση των νουκλεοτιδίων από τα άκρα τους. Δύο απ'αυτές είναι η φωσφοδιεστεράση του δηλητηρίου του φιδιού και η φωσφοδιεστεράση της σπλίνας του βοδιού. Πήραν το όνομα ΄΄ φωσφοδιεστεράση΄΄ γιατί ενεργούν τόσο στο DNA όσο και στο RNA. Αυτά τα δύο ένζυμα έχουν συμπληρωματικές προδιαγραφές. Η πρώτη δρα με **a** τμήση και ξεκινάει στο ελεύθερο 3-OH άκρο της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας, απελευθερώνοντας 5-μονοφωσφορικούς νουκλεοζίτες, ενώ η δεύτερη τελείως αντίθετα ξεκινά στο 5- άκρο του οξέος προκαλώντας τμήση **b** και ελευθερώνοντας 3_-NMPs.[77]



Σχήμα Ι.31: *Δράση της φωσφοδιεστεράσης του δηλητήριου του φιδιού.*



Σχήμα Ι.32: *Δράση της φωσφοδιεστεράσης της σπλίνας του βοδιού.*



Σχήμα Ι.33: *Δράση της φωσφοδιεστεράσης στο πάγκρεας.*

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα περισσότερα φυσικά περιοριστικά ένζυμα που συνήθως χρησιμοποιούνται αναγνωρίζουν 4 ή 6 ακολουθίες βάσεων στο DNA. Σύμφωνα με έναν στατιστικό υπολογισμό , τα σημεία τμήσης από αυτά τα περιοριστικά ένζυμα ανέρχονται σε κάθε 4^4 ή 6^4 ακολουθία βάσεων. Έτσι, περισσότερα από 240.000 ($=10^9/4^6$) θραύσματα θα σχηματίζονται όταν το τεράστιο ανθρώπινο DNA (το οποίο περιέχει πάνω από 10^9 νουκλεοτίδια) επεξεργάζεται με ένα περιοριστικό ένζυμο που αναγνωρίζει την ακολουθία 6-βάσεων. Τέτοια μίγματα δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω εφαρμογές. Τα τεχνητά ένζυμα, τα οποία δείχνουν υψηλή εκλεκτικότητα στην ακολουθία των βάσεων απαιτούνται για την επεξεργασία του DNA με μεγαλύτερη ακρίβεια. Για παράδειγμα, το σημείο τμήσης μιας τεχνητής DNA νουκλεάσης η οποία αναγνωρίζει μία ακολουθία 16 βάσεων, θα πρέπει να προκύπτει

κάθε 4^{16} ακολουθίες βάσεων. Αυτή η εκλεκτικότητα έχει ως αποτέλεσμα να κοπεί το ανθρώπινο DNA μόνο σε δύο κομμάτια τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω.

Οι τεχνητές RNA νουκλεάσες για συγκεκριμένης ακολουθίας τμήση του RNA μπορούν να ξεχωρίσουν τα ποικίλα RNA το ένα από το άλλο στα κύτταρα και να προκαλέσουν την τμήση μόνο σε μία κατηγορία από αυτά . Κατά συνέπεια αυτά θα είναι κατάλληλα για την επιλεγόμενη ρύθμιση της έκφρασης ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Επίσης , οι τεχνητές νουκλεάσες οι οποίες αναγνωρίζουν ογκογενή RNA ή DNA σε καρκινικά κύτταρα, θα προσέφεραν μια αποτελεσματική και ακίνδυνη θεραπεία του καρκίνου , αφού δεν θα είχαν καμία επίπτωση σε RNA και DNA των φυσιολογικών κυττάρων.

Τεχνητές νουκλεάσες έχουν παρασκευαστεί με ¨υβριδισμό¨ δύο βασικών χαρακτηριστικών. Το πρώτο είναι η καταλυτική δράση που πρέπει να έχουν, και το δεύτερο η ικανότητα αναγνώρισης συγκεκριμένων αλληλουχιών βάσεων. Διάφορα φυσικά και τεχνητά σύμπλοκα ,τα οποία εκλεκτικά δεσμεύονται σε συγκεκριμένες θέσεις είναι ήδη διαθέσιμα, όπως τα αντιβιοτικά , πρωτεϊνες παρεμβαλλόμενες στο DNA και πολλά άλλα. Οπότε μπορεί κανείς να κάνει την κατάλληλη επιλογή, ανάλογα με τον τελικό του στόχο.

Ο μοριακός σχεδιασμός των καταλυτών που υδρολύουν το RNA και το DNA ακριβώς όπως τις φυσικές νουκλεάσες είναι δύσκολος. Οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί είναι πολύ ανθεκτικοί στην υδρόλυση. Η ημιζωή των συνδέσεων των γονιδίων σε pH= 7 και 25° C με απουσία των φυσικών ενζύμων είναι στο DNA 200 εκατομμύρια χρόνια και στο RNA χίλια .[80]

Δέσμευση πορφυρινικών παραγώγων στο RNA

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η δέσμευση της μέσο –τετρακις(N-μέθυλοπυρίδυλο-4-υλ) πορφυρίνης (H_2TMPyP) σε δύο RNA πολυμερή : poly-(rG)·poly (rC) και poly(rI)·poly (rC) . Η δέσμευση διαπιστώθηκε με την υποχρωμία (περίπου 40%) και την βαθυχρωμία (περίπου 15 nm) που παρουσιάστηκε στην

απορρόφηση της Soret κορυφής της πορφυρίνης με την επεξεργασία της με το RNA . Οι μεγάλες τιμές αυτών των παραμέτρων υποδηλώνουν μία εντυπωσιακή διατάραξη στα π-ηλεκτρόνια της πορφυρίνης μετά τη δέσμευσή της στο RNA. Βρέθηκε ακόμη πως η δέσμευση γίνεται με ένα βήμα, λόγω παρουσίασης ενός ισοσβεστικού σημείου.[81]

Αργότερα τα πειράματα επαναλήφθηκαν αλλά με χαλκό συναρμοσμένο στον πορφυρινικό δακτλύλιο, και η σταθερά δέσμευσης βρέθηκε ιδιαίτερα αυξημένη. Η εισαγωγή του χαλκού παρέχει μοναδικά χαρακτηριστικά στην κατιονική πορφυρίνη και αυτό χαρακτηρίστηκε από μία ισοπέδωση του πορφυρινικού δακτυλίου η οποία οδήγησε σε μία συσσωμάτωση της πορφυρίνης στην επιφάνεια του πολυμερούς. Το λιγότερο δύο διεργασίες δέσμευσης προστέθηκαν με την εισαγωγή του χαλκού. Η δέσμευση της πορφυρίνης παρουσίαζε αύξηση σε περιοχές πλούσιες σε ζεύγη βάσεων AT και AU , πολύ περισσότερο από IC. Η συσσωμάτωση αυτή προσδιορίζεται από πολλούς παράγοντες και η ελικοειδής δομή των πολυμερών εξαρτάται από την αλληλουχία των βάσεων. Έτσι, διάφορες τροποποιήσεις στην πορφυρίνη όπως η εισαγωγή του χαλκού μπορεί να προκαλέσει δραστικές αυξήσεις στην συγγένειά της με συγκεκριμένα πολύνουκλεοτίδια.[82]

Ήδη υπάρχουσες τεχνητές νουκλεάσες

Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλικών συμπλόκων που έχουν παρασκευαστεί στα εργαστήρια, οδηγεί σε υδρολυτικές τμήσεις των φωσφοδιεστερικών δεσμών, δημιουργώντας κατ'αυτόν τον τρόπο μόρια τεχνητών νουκλεασών. Περαιτέρω, ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων μπορεί να ρυθμιστεί μέσω υποκαταστατών που έχουν τη δυνατότητα να ενώνονται με εξειδικευμένες σειρές του νουκλεϊνικού οξέος , όπως συζυγή ψευτοπεπτίδια με δυνατότητα παρεμβολής και ειδικά ολιγονουκλεοτίδια..[83,84,85] Τα υβριδικά μόρια που σχηματίζονται από τέτοια ζεύγη υποκαταστατών σε μεταλλικά σύμπλοκα, επέδειξαν αυξημένη νουκλεοσιδική δραστικότητα σε εξειδικευμένες θέσεις.

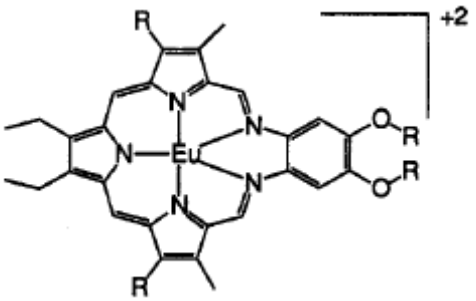
Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως πολυκατιονικά πολυπεπτίδια που περιέχουν αργινίνη ή λυσίνη και υδροφοβικά αμινοξέα μπορούν να επιταχύνουν την υδρόλυση

του ολιγοριβονουκλεοτιδίου. Η μεγαλύτερη επίδραση παρατηρείται όταν τα πολυπεπτίδια έχουν δομή *β*-φύλλου.[86]

Επίσης έχει βρεθεί ότι οι ολιγοαμίνες έχουν μεγάλη καταλυτική δράση στην υδρόλυση του RNA . Επομένως λόγω της απλότητας της δομής τους και της σταθερότητάς τους είναι υποσχόμενες τεχνητές ριβονουκλεάσες.[87] Στη συνέχεια σύμπλοκα μόρια των μετάλλων μετάπτωσης εξετάστηκαν ως καταλύτες της υδρόλυσης του φωσφορικού εστέρα σε μία προσπάθεια να μιμηθούν τις αντιδράσεις που καταλύονται από την ATPάση και τη φωσφατάση. Αυτές οι μελέτες χρησιμοποίησαν *p*-νιτροφαίνυλοφωσφορικό εστέρα ή φωσφορικούς ανυδρίτες (ATP) ως υποστρώματα. Οι ερευνητές πρότειναν πως ένας διπλά λειτουργικός μηχανισμός παίρνει μέρος στην υδρόλυση του RNA από σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης.[88] Έχει αναφερθεί επίσης ότι σύμπλοκα λανθανιδών με μακροκυκλική εξαϊμίνη υδρολύουν το tRNA περισσότερο εκλεκτικά από ιόντα λανθανιδών χωρίς συναρμοτή.[89]

Ο Morrow απέδειξε πως σύμπλοκα λανθανιδικών μετάλλων της εξααμίνης (Schiff-base) (HAM) έδρασαν πολύ στην υδρολυτική τμήση του RNA. Αυτά τα σύμπλοκα προκαλούν υδρολυτική τμήση του RNA και όχι οξειδωτική, και κατά συνέπεια υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα. Η υδρολυτική τμήση υπερτερεί της οξειδωτικής στο ότι υπάρχει επιλεκτικότητα στο RNA μεγαλύτερη από το DNA, και η πιθανότητα να επιτευχθούν θραύσματα του RNA που θα είναι κατάλληλα για ακολουθούμενες ενώσεις.[90]

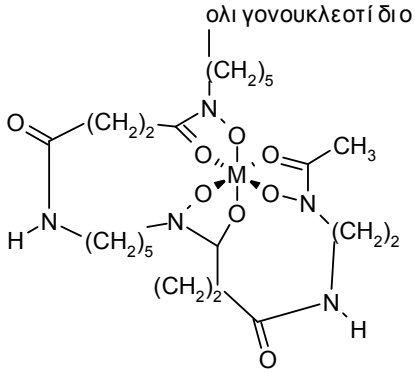
Υδατοδιαλυτά λαναθανιδικά σύμπλοκα της τεξαφυρίνης, έχουν παρασκευαστεί και έχει προσδιοριστεί η σταθερότητά τους ως προς τη μετάλλωση και την υδρόλυση.



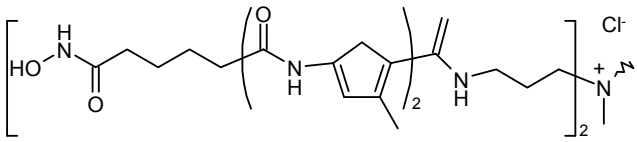
Σχήμα Ι.33: *Δομή κατιονικής τεξαφυρίνη (τεχνητή ριβονουκλεάση).*

Αυτά τα σύμπλοκα έχουν καλύτερη δράση από τα ΗΑΜ γιατί έχουν μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης με τα λανθανιδικά μέταλλα, είναι πολύ λιγότερο τοξικά και μπορούν εύκολα να συμπεριλάβουν διάφορες ομάδες περιφερειακά του δακτυλίου τους.[91]

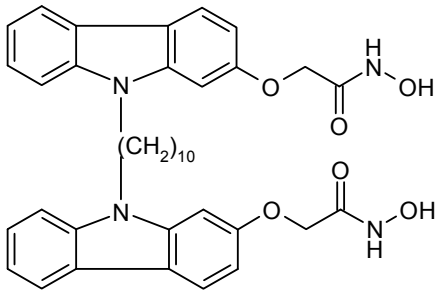
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος των μεταλλικών συμπλόκων των υδροξαμικών οξέων, τα οποία χρησιμοποιούνται ως τεχνητές νουκλεάσες. Τα υδροξαμικά οξέα που σχηματίζουν σύμπλοκα με μέταλλα μετάπτωσης οδηγούν σε οξειδωτικές τομές του DNA, παρουσία αναγωγικών μέσων και οξυγόνου, ενώ αντίθετα τα αντίστοιχα σύμπλοκα με λανθανίδες οδηγούν σε υδρολυτικές τομές. Τα κυριότερα σύμπλοκα που χρησιμοποιούνται σήμερα ως τεχνητές νουκλεάσες παρουσιάζονται στο σχήμα Ι.34.



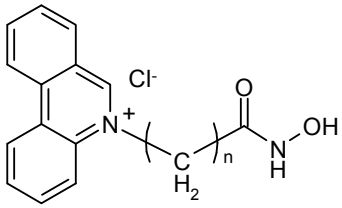
Δεσφερριοξαμίνη με μέταλλο



Δι-(νετροψίνη-υδροξαμικό οξύ)



Δι-(καρβαζόλιο-υδροξαμικό οξύ)



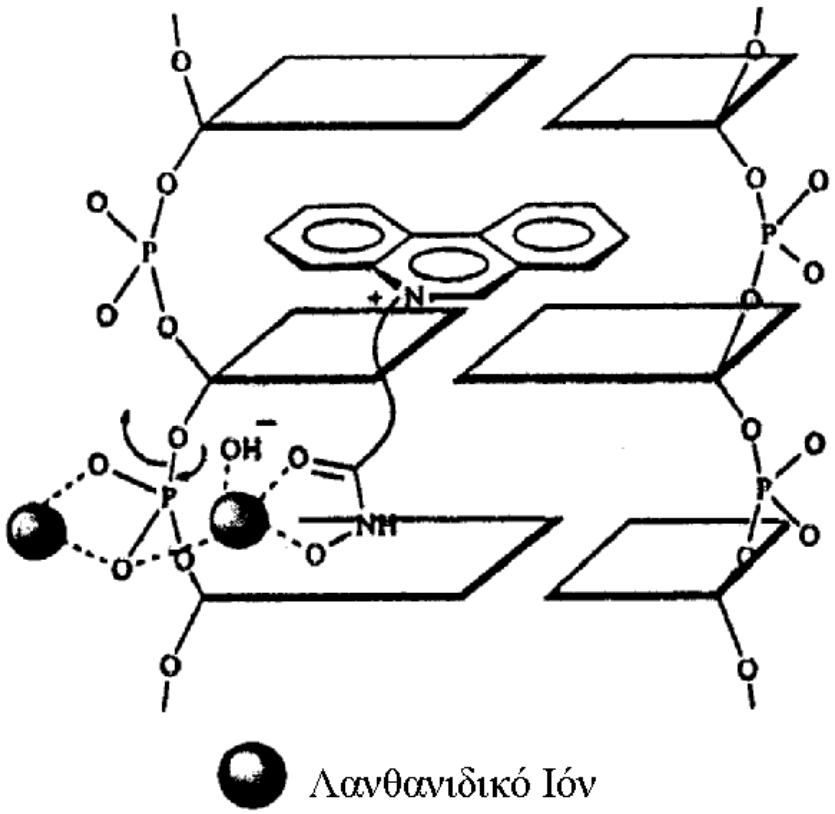
φαιναθριδίνη-υδροξαμικό οξύ

Σχήμα Ι.34 : *Δομές των παραγώγων υδροξαμικών οξέων που χρησιμοποιούνται ως τεχνητές νουκλεάσες.*

Ιδιαίτερα για το υβριδικό παράγωγο 1, 10-φαιναθριδίνη-υδροξαμικό οξύ έχει μελετηθεί η νουκλεοσιδική της δράση παρουσία πολλών ιόντων λανθανιδών. Η φαιναθριδίνη έχει μεγάλη συγγένεια με το DNA και μπορεί να παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζευγάρια βάσεων του, ενώ τα σύμπλοκα Ln (III)-φαιναθριδίνης έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν τομές μονού κλώνου στην αλυσίδα του DNA. Τα παραπάνω οδήγησαν στην παρασκευή πολυάριθμων παραγώγων φαιναθριδίνης-υδροξαμικού οξέος, στα οποία η αλειφατική αλυσίδα που συνδέει την ομάδα του υδροξαμικού οξέος με τη φαιναθριδίνη ποικίλλει από 3 εώς 7 άνθρακες.

Η νουκλεοσιδική τους δραστηριότητα μελετήθηκε σε συνάρτηση με το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας, παρουσία διαφόρων λανθανιδικών αλάτων. Τα αποτελέσματα των μελετών αποκάλυψαν ότι η νουκλεοσιδική δράση των ενώσεων αυτών ήταν άμεσα συνδεδεμένη με τη φύση των λανθανιδών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και με το μήκος της αλυσίδας. Άρα η συμπλοκοποίηση των λανθανιδικών ιόντων, τα οποία είναι απαραίτητα για την υδρόλυση, με την ομάδα υδροξαμικού οξέος λαμβάνει χώρα κοντά στις θέσεις τομής του DNA.

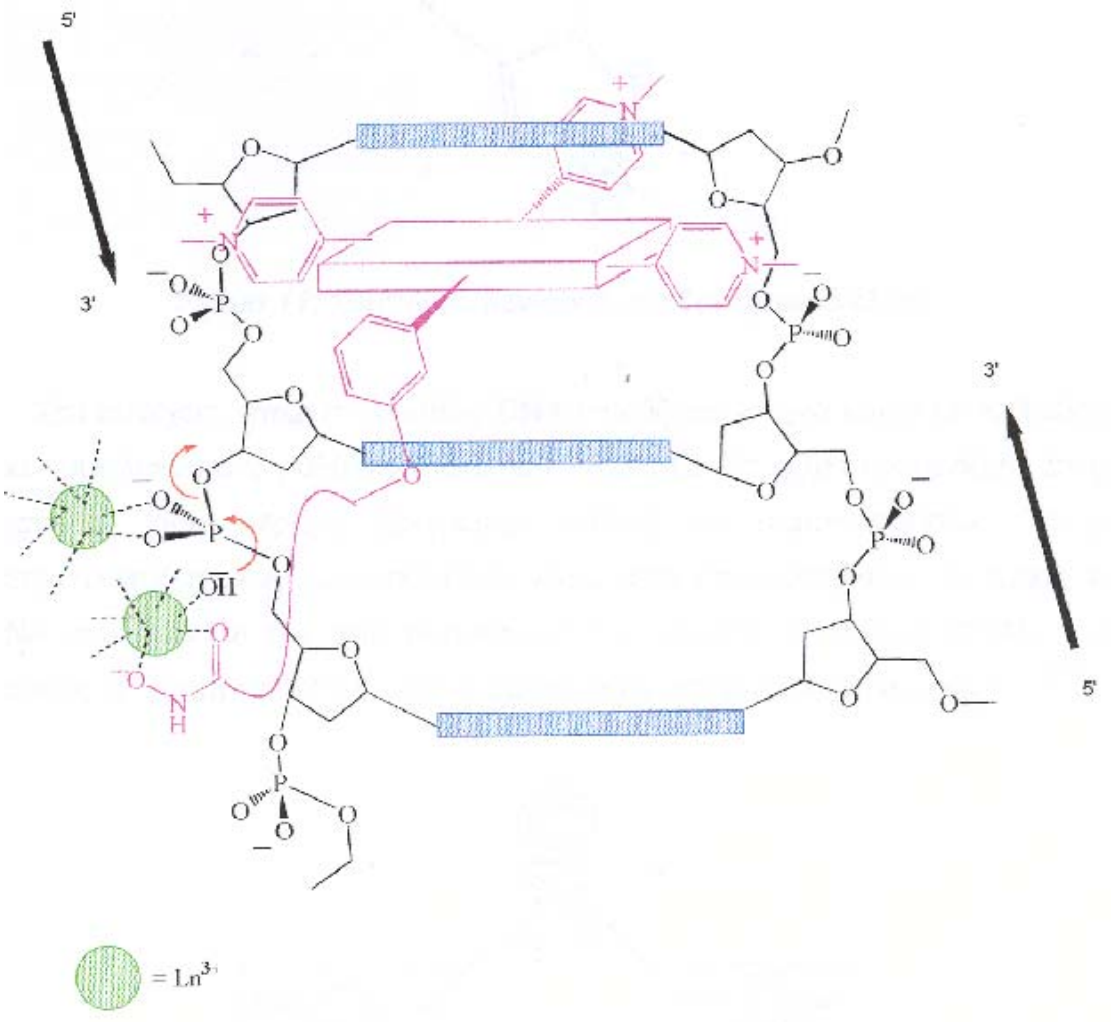
Μελέτη της νουκλεοσιδικής δράσης των ενώσεων σε συνάρτηση με την αναλογία λανθανιδικών ιόντων προς υδροξαμικές ομάδες, έδειξε ότι ο μηχανισμός υδρολυτικής τμήσης απαιτεί τη συνεργασία δύο λανθανιδικών ιόντων. Κατ' αυτόν τον τρόπο, ένα λανθανιδικό ιόν που δρα ως οξύ κατά Lewis συναρμόζεται με δύο οξυγόνα φωσφορικού άλατος και πολώνει το δεσμό φωσφόρου οξυγόνου, αυξάνοντας έτσι τον ηλεκτρόφιλο χαρακτήρα του φωσφόρου. Ταυτόχρονα, ένα άλλο λανθανιδικό ιόν που είναι συναρμοσμένο με την ομάδα του υδροξαμικού οξέος, συνδέεται με το υδροξυλικό ιόν ενός μορίου νερού, το οποίο προσβάλει το φωσφορικό άλας. Στο σχήμα Ι.35 περιγράφεται σχηματικά ο προτεινόμενος μηχανισμός υδρόλυσης του DNA.[92,93,94]



Σχήμα Ι.35: *Προτεινόμενος μηχανισμός υδρολυτικής τμήσης φωσφοδιεστερικών δεσμών από σύμπλοκο υδροξαμικού οξέος-λανθανιδικού ιόντος.*

Γενικά, οι υδρολυτικές τμήσεις του DNA παρουσιάζουν πλεονεκτήματα έναντι των οξειδωτικών τμήσεων, οι οποίες προκαλούνται από την πλειονότητα των συνθετικών νουκλεασών που έχουν παρασκευαστεί μέχρι σήμερα. Για παράδειγμα, το 5'-OH άκρο του φωσφορικού άλατος που απελευθερώνεται έπειτα από τη δράση μιας συνθετικής ένωσης που προκαλεί υδρολυτικές τμήσεις, αναγνωρίζεται επίσης και σαν προϊόν διαχωρισμού των αντιδράσεων πολυμερισμού του DNA μέσω ενζύμων. Ακόμα, το ένζυμο λιγάση είναι σε θέση να επιδιορθώσει τον ανοιχτό διπλό κλώνο του DNA, ο οποίος έχει υποστεί υδρολυτική τμήση, αντίθετα από τις οξειδωτικές τομές που είναι ανεπανόρθωτες. Με βάση τις τελευταίες δύο αναφορές , δοκιμάστηκε αργότερα η παρασκευή πορφυρινικών παραγώγων που φέρουν ομάδες υδροξαμικών οξέων και παρουσία λανθανιδικών ιόντων και μη μελετήθηκε η νουκλεοσιδική τους δράση στο DNA. Οι πορφυρίνες έχουν την ικανότητα παρεμβολής ή εξωτερικής συσσωμάτωσης στην αύλακα της διπλής έλικας του DNA ,

ενώ οι ομάδες των υδροξαμικών οξέων έχουν νουκλεοσιδική δράση παρουσία λανθανιδικών ιόντων. Προτάθηκε λοιπόν ο εξής μηχανισμός νουκλεοσιδικής δράσης.



Σχήμα Ι.36: *Προτεινόμενος μηχανισμός για την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA από τα πορφυρινικά παράγωγα, παρουσία ιόντων λανθανιδών.*

Ο παραπάνω μηχαμισμός μελετήθηκε από το εργαστήριό μας με τα εξής πορφυρινικά παράγωγα : MeC4pCISH και MeC4pTRH. Το συμπέρασμα που προέκυψε από αυτή την εργασία ήταν πως η MeC4pCISH παρουσίασε έντονη νουκλεοσιδική δράση παρουσία λανθανιδικών ιόντων . Η νουκλεοσιδική δράση της πορφυρίνης γίνεται πιο αποτελεσματική παρουσία των λανθανιδικών ιόντων του Γαδολινίου και του Ευρωπίου, τα οποία έχουν παρόμοια ιονική ακτίνα. Αμέσως μετά κατατάσσεται το Σαμάριο που είναι γειτονικό με τα προηγούμενα στοιχείο και ύστερα το πιο ογκώδες Τέρβιο. Το Πρασεοδύμιο, το οποίο έχει τη μικρότερη ιονική ακτίνα, παρουσιάζει πιο

χαμηλή δραστικότητα από τις άλλες λανθανίδες. Αντίθετα η MeC4pTRH δεν παρουσίασε νουκλεοσιδική δράση.

Λόγω του ότι στη βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί η νουκλεοσιδική δράση πορφυρινών που φέρουν υδροξαμικά οξέα παρουσία λανθανιδών σε μόρια του RNA θελήσαμε να φέρουμε εις πέρας μία τέτοια μελέτη. Επομένως στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αρχικά η σύνθεση επιλεγμένων μελών από μία ευρύτατη σειρά πορφυρινικών παραγώγων. Η σειρά αυτή περιλαμβάνει πορφυρίνες ,οι οποίες είναι υποκατεστημένες στις μέσο-θέσεις με πυρίδινο- και φαίνυλο- ομάδες, ενώ οι ομάδες των υδροξαμικών οξέων που φέρουν συνδέονται με τη μεσολάβηση μιας αλειφατικής αλυσίδας 3-5 ανθράκων σε μία από τις θέσεις υποκατάστασης των φαινυλίων. Στο δεύτερο μέρος περιλαμβάνεται η φασματοσκοπική μελέτη των ενώσεων , όπου γίνεται χρήση των φασματοσκοπικών τεχνικών UV-Vis, και NMR. Το τρίτο μέρος αναφέρεται στη βιοχημική μελέτη των ενώσεων που επιλέχθηκαν. Αρχικά αποσαφηνίζεται με διάφορες μεθόδους η αλληλεπίδραση των συντιθέμενων πορφυρινών με το RNA και έπειτα γίνεται ο έλεγχος ικανότητας νουκλεοσιδικής δράσης, παρουσία διαφόρων ιόντων λανθανιδών. Το τελευταίο μέρος της εργασίας περιέχει τα συμπεράσματα καθώς και ορισμένες παρατηρήσεις που έγιναν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Κεφάλαιο 2: Σύνθεση Πορφυρινικών Παραγώγων

2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Η πρώτη σύνθεση μέσο-άρυλο πορφυρινών πραγματοποιήθηκε με συμπύκνωση αλδεύδης και πυρρολίου. Το 1941 η περαιτέρω μελέτη αυτής της μεθόδου για διάφορα είδη αλειφατικών, αρωματικών και ετεροκυκλικών αλδευδών οδήγησε τους Rothemund και Menotti στη σύνθεση της τετραφαίνυλο-πορφυρίνης (TPP) με συμπύκνωση βενζαλδεύδης και πυρρολίου σε πυριδίνη κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Η αντίδραση αυτή όμως δεν έδινε καλή απόδοση (1%-5%) γι αυτό το 1967 οι Alder και Longo κατάφεραν να επιτύχουν μια καλύτερη απόδοση της τάξεως 20% , με συμπύκνωση βενζαλδεύδης και πυρρολίου σε διαλύτη προπιονικό οξύ, υπό συνθήκες βρασμού για 30 λεπτά. Στη συνέχεια επιτεύχθηκε η παρασκευή τέτρα-άρυλο πορφυρινών με δύο διαφορετικά είδη μέσο υποκαταστατών, με βάση ένα μείγμα από δυο αλδεύδες. Η συμπύκνωση αυτή αποδίδει ένα μείγμα από 6 πορφυρίνες που διαφέρουν ως προς τη φύση και την κατανομή των τεσσάρων μέσο-υποκαταστατών.[95]

2.2 ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ

Στην ενότητα αυτή θα αναφερθούν οι εμπειρικές ονομασίες των πορφυρινών που αντιπροσωπεύουν την δομή, και το στάδιο σύνθεσης της κάθε πορφυρίνης. (πίνακας ΙΙ.1)

Υποκατάσταση N του Πυριδινίου		
ΙΔΙΟΤΗΤΑ	Μεθυλιωμένο	Μη μεθυλιωμένο
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	Me	-
Αριθμός ανθράκων αλειφατικής αλυσίδας		
ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΘΡΑΚΩΝ	4	5
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	C4	C5
Θέση υποκατάστασης αλειφατικής αλυσίδας στο φαινύλιο		

ΘΕΣΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	ΌΡΘΟ-	ΠΑΡΑ-	ΜΕΤΑ-
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	O	p	m

Υποκατάσταση φαινυλίων ως προς τον πορφυρινικό δακτύλιο

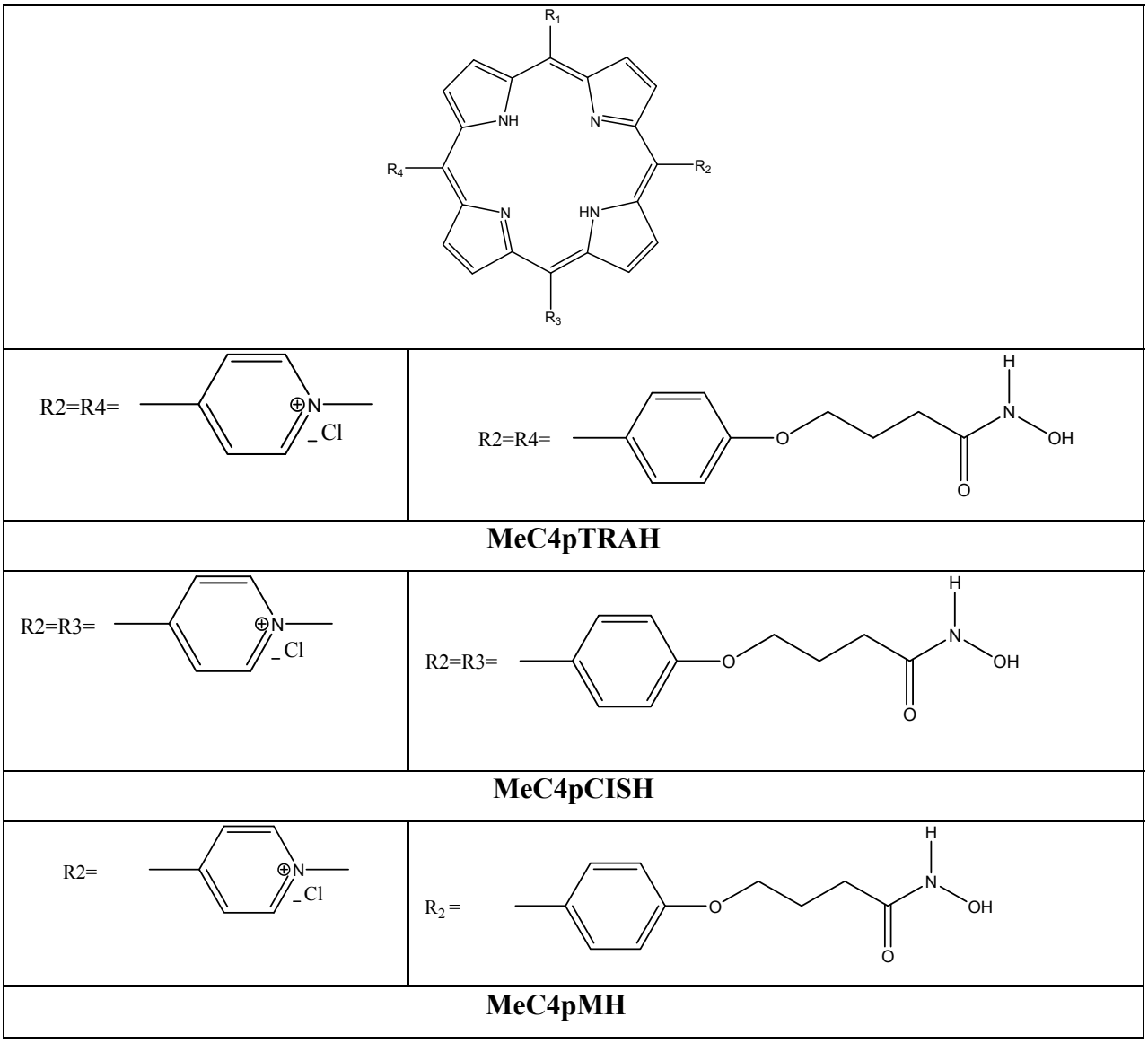
ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	ΜΟΝΗ-	ΔΙΠΛΗ (TPANS)	ΔΙΠΛΗ (CIS)	ΤΡΙΠΛΗ
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	M	TRANS	CIS	TRI

Υποκατάσταση αλειφατικής αλυσίδας

ΕΙΔΟΣ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	ΕΣΤΕΡΑΣ	ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟ ΟΞΥ	ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΟ ΟΞΥ
ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	E	A	H

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ.1: *Εμπειρική ονομασία πορφυρινών.*

Στη συνέχεια παρουσιάζεται η σύνθεση των πορφυρινικών ενώσεων που συντέθηκαν. Προκύπτουν από την H_2TMePyP-4 με αντικατάσταση των πυριδινικών δακτυλίων με φαινυλικές ομάδες, οι οποίες συνδέονται με μια αλειφατική αλυσίδα μήκους 4 ανθράκων που καταλήγει σε μια υδροξαμική ομάδα.



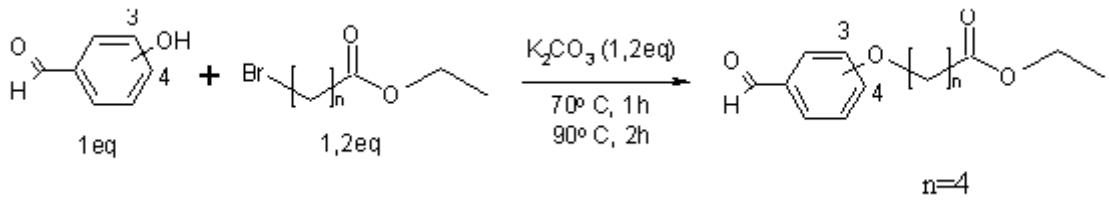
Σχήμα ΙΙ.1: *Δομές των συντιθέμενων πορφυρινικών συμπλόκων που φέρουν ομάδες υδροξαμικών οξέων.*

Η σύνθεση των πορφυρινικών συμπλόκων χωρίζεται σε δυο μέρη. Αρχικά στην παρασκευή της υποκατεστημένης βενζαλδεύδης και της αντίστοιχης πορφυρίνης στην εστερική μορφή της, και στη συνέχεια στη παρασκευή της ενεργής υδροξαμικής ομάδας καθώς και στη μεθυλίωση του πυρίδινο-αζώτου. Από τις συντιθέμενες πορφυρίνες η MeC4TRAH, MeC4CISH και η MeC4MH επιλέχθηκαν για την παρούσα εργασία

2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΕΣΤΕΡΑ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ

Α) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΗΣ ΒΕΝΖΑΛΔΕΥΔΗΣ

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100ml, στην οποία έχει τοποθετηθεί ψυκτήρας και μαγνήτης ανάδευσης, προστίθενται 1eq 4-υδροξυβενζαλδεύδης και 1,2eq ανθρακικό κάλιο σε 30ml άνυδρου DMF. Ακολουθεί η προσθήκη 1,2eq 4-βρωμοβουτιρικού του αιθυλενίου, στάγδην. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 70^0C για μία ώρα υπό ανάδευση και στη συνέχεια στους 90^0C για 2 ώρες. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ατμόσφαιρα αργού. Κατά τη σύνθεση λαμβάνει χώρα SN_2 πυρηνόφιλη προσβολή της υδροξυλικής ομάδας της υδροξυβενζαλδεύδης στον βρωμοαλειφατικό εστέρα του αιθυλενίου.



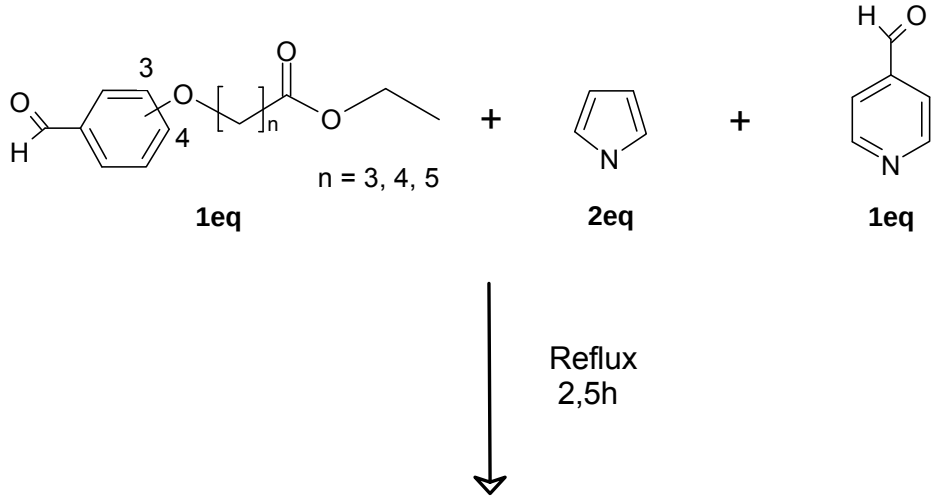
Σχήμα ΙΙ.2: *Αντίδραση παρασκευής υποκατεστημένης βενζαλδεύδης*

Ακολουθεί διήθηση και έκπλυση με διχλωρομεθάνιο. Τα άλατα που απομακρύνονται με τη διήθηση είναι το ανθρακικό κάλιο που δεν αντέδρασε και το βρωμιούχο κάλιο. Στη συνέχεια, το διάλυμα αποστάζεται υπό κενό στους 80^0C, για την απομάκρυνση του DMF και στους 60^0C για το CH_2Cl_2. Κατόπιν, επαναδιαλύουμε το στερεό υπόλειμμα σε CH_2Cl_2 και το διάλυμα διηθείται προκειμένου να απομακρυνθούν τα άλατα που πιθανόν να υπάρχουν. Για την ολική απομάκρυνση του DMF γίνεται εκχύλιση με νερό. Ακολουθεί προσθήκη άνυδρου θειϊκού νατρίου για την απομάκρυνση της υγρασίας, διήθηση και απόσταξη του διαλύτη μέχρι ξηρού.

Τέλος το προϊόν καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας σαν πληρωτικό υλικό SiO_2. Η εύρεση του κατάλληλου διαλύτη έκλουσης γίνεται με τη βοήθεια χρωματογραφίας TLC και τη χρήση διαφόρων διαλυτών. Οι βέλτιστες συνθήκες βρέθηκε ότι είναι διχλωρομεθάνιο/εξάνιο σε αναλογία 80/20.[96,97]

Β) ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ

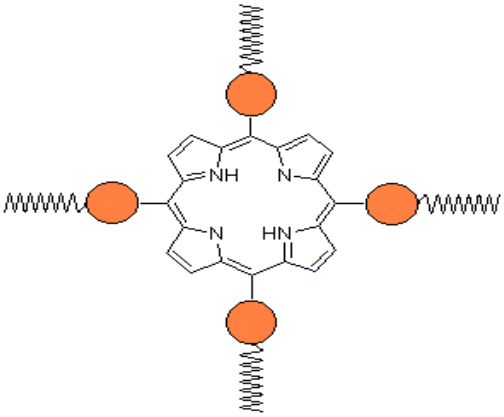
Σε σφαιρική του 1lt διαλύονται 1eq της υποκατεστημένης υδροξυβενζαλδεύδης που συντέθηκε στο προηγούμενο στάδιο και 1 eq 4-πυριδίνη-καρβοξαλδεύδη σε διαλύτη προπιονικό οξύ. Η ποσότητα του διαλύτη υπολογίζεται με το 20% του αριθμού των moles της υποκατεστημένης υδροξαλδεύδης πολλαπλασιασμένο με ένα συντελεστή 10^5 . Τοποθετείται στη φιάλη ψυκτήρας και θερμαίνεται το διάλυμα υπό ανάδευση μέχρι βρασμού, ενώ παράλληλα προστίθεται στάγδην 2 eq πυρρόλιο. Αφού προστεθεί όλη η ποσότητα του πυρρολίου και το μίγμα είναι ομογενές αφήνετε σε reflux για 2,5 ώρες.



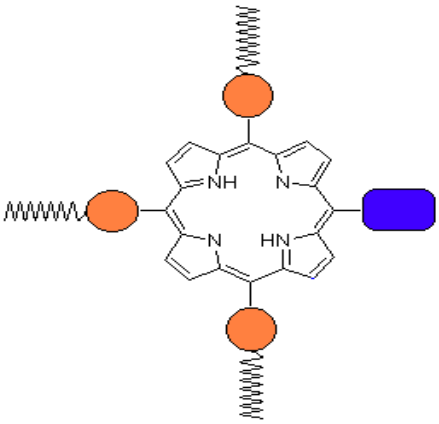
ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΜΕ ΠΥΡΙΔΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΦΑΙΝΥΛΕΣΤΕΡΙΚΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Σχήμα ΙΙ.3 : *Αντίδραση πορφυρινικής συμπύκνωσης*

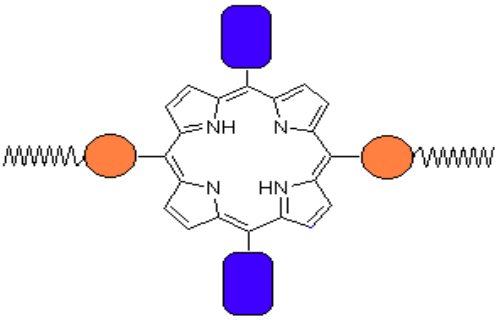
Η παραπάνω αντίδραση αποδίδει έξι πορφυρινικά παράγωγα, τους έξι δηλαδή πιθανούς συνδυασμούς που λαμβάνονται κατά την υποκατάσταση των μέσο-θέσεων του πορφυρινικού δακτυλίου από δυο διαφορετικούς υποκαταστάτες (όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα ΙΙ.4).



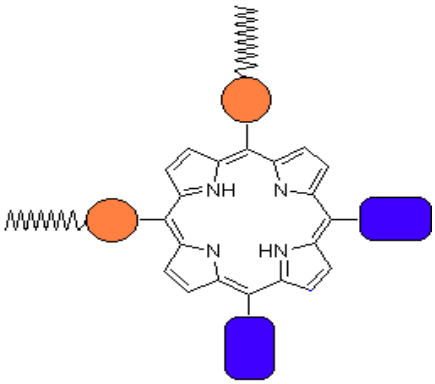
Τετραεστέρας-Πορφυρίνη



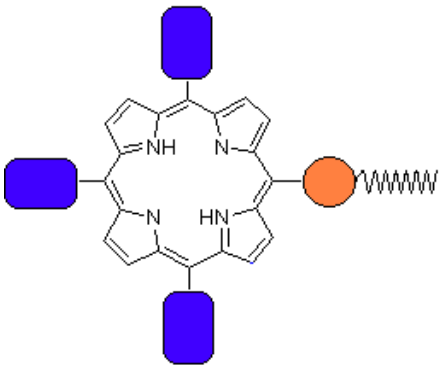
Τριεστέρας-Μονοπυρίδινο-Πορφυρίνη



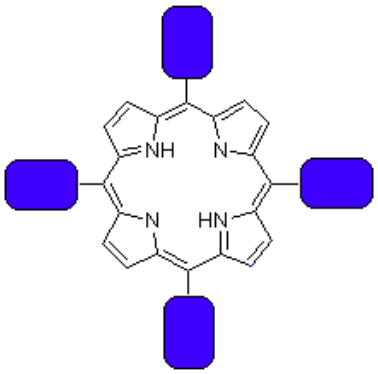
Διεστέρας-Διπυρίδινο-Πορφυρίνη (Trans)



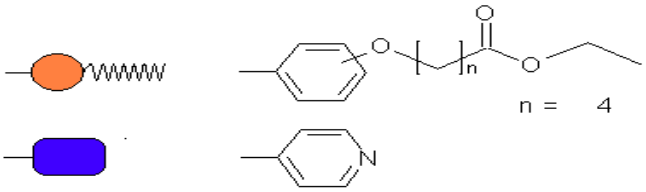
Διεστέρας-Διπυρίδινο-Πορφυρίνη (Cis)



Μονοεστέρας-Τριπυρίδινο-Πορφυρίνη



Τετραπυρίδινο-Πορφυρίνη

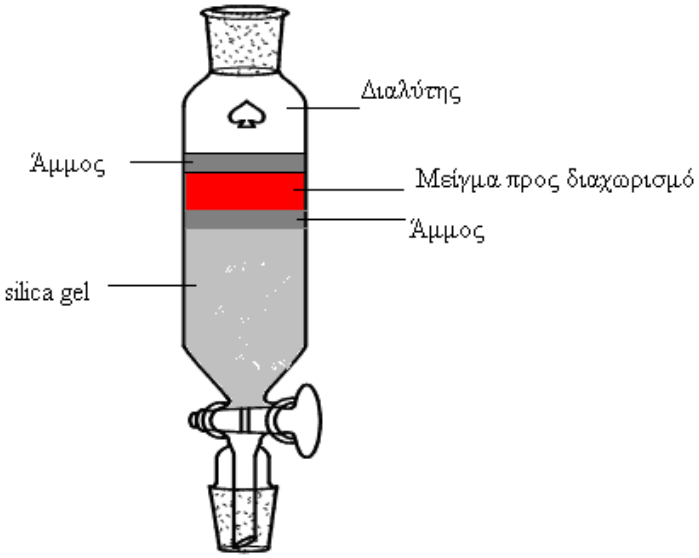


Σχήμα ΙΙ.4: *Πορφυρινικά προϊόντα της αντίδρασης συμπύκνωσης*

Πριν γίνει ο διαχωρισμός των έξι πορφυρινικών παραγώγων, πρέπει να απομακρυνθεί το προπιονικό οξύ. Αυτό επιτυνχάνεται με απόσταξη υπό κενό και θέρμανση στους 80^0C, ενώ το στερεό υπόλειμμα εκπλένεται παράλληλα πολλές φορές με απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα διηθείται και το στερεό προϊόν μεταφέρεται σε σφαιρική όπου διαλύεται σε μίγμα διαλυτών CH_2Cl_2 /αιθανόλη (80/20). Ο διαλύτης αποστάζεται αρχικά στους 70^0C και στη συνέχεια στους 90^0C υπό κενό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά αλλά με τη χρήση μόνο CH_2Cl_2 .

Γ) ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΕΣΤΕΡΩΝ ΤΩΝ ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

Ο διαχωρισμός και η απομόνωση των προϊόντων της παραπάνω αντίδρασης πραγματοποιείται με χρωματογραφία στήλης με πληρωτικό υλικό silica gel. Το silica gel εισάγεται στη στήλη σε μικρές ποσότητες διαλυμένο σε CH_2Cl_2 και πολύ σημαντικό είναι να πακεταριστεί καλά. Στη συνέχεια φορτώνεται η ουσία στη στήλη.



ΣχήμαΙΙ.5 : *Στήλη διαχωρισμού*

Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιείται το CH_2Cl_2 στο οποίο προστίθεται σταδιακά αιθανόλη σε ποσοστό από 1 εώς 6% ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός. Μ' αυτόν τον τρόπο εκλούονται αρχικά διάφορα παραπροϊόντα όπως χλωρίνες κτλ και κατόπιν οι έξι ουσίες με την παρακάτω σειρά:

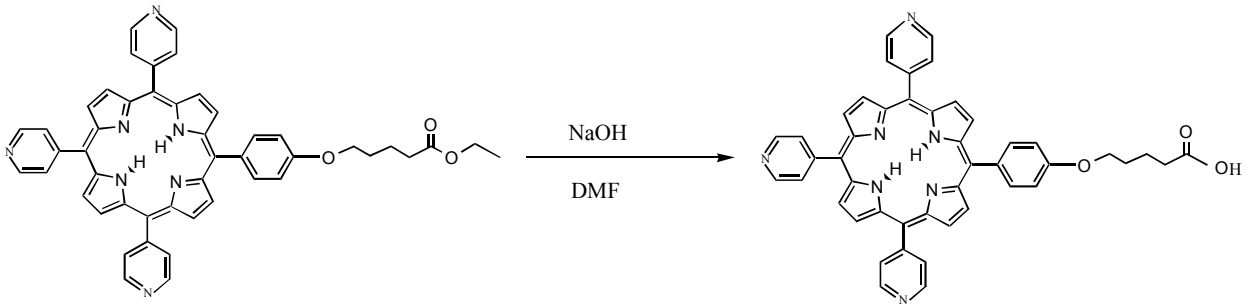
1. Τετραφαινυλεστέρας - πορφυρίνη
2. Τριεστέρας –μονοπυρίδιλο-πορφυρίνη
3. Διεστέρας –διπυρίδιλο-πορφυρίνη (trans)
4. Διεστέρας –διπυρίδιλο-πορφυρίνη (cis)
5. Μονοεστέρας-τριπυρίδιλο-πορφυρίνη
6. Τετραπυρίδιλο-πορφυρίνη

Παρατηρούμε ότι με την αύξηση τη πολικότητας του διαλύτη έκλουσης λαμβάνονται τα ισομερή με τον μεγαλύτερο αριθμό πυρίδιλο-ομάδων. Κάθε ισομερές που συλλέγεται υφίσταται επιπλέον καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης ,για την απομάκρυνση τυχόν προσμίξεων. Ακολουθεί απόσταξη των διαλυτών και συλλογή του προϊόντος υπό μορφή κρυσταλλικής σκόνης μωβ χρώματος. Στη συνέχεια ξηραίνεται στους 60^0C υπό κενό για 12 ώρες.[96,97]

2.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΙΟΝΙΚΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ ΜΕ ΟΜΑΔΑ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Α) ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ

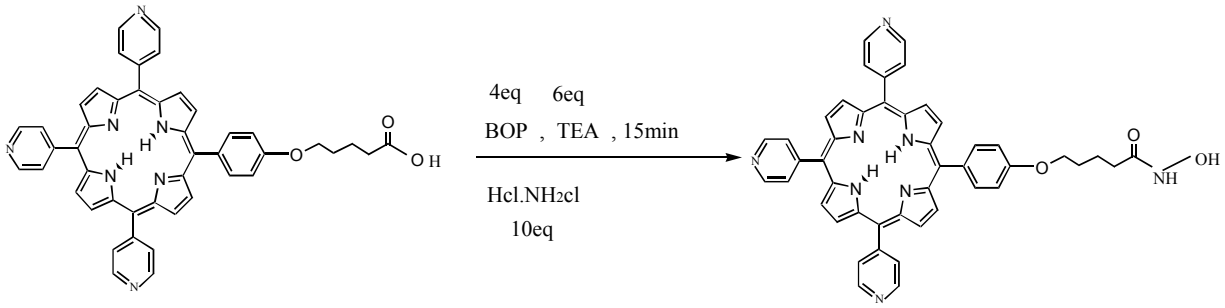
Σε σφαιρική φιάλη των 25ml προστίθενται ο εστέρας της πορφυρίνης και καυστικό νάτριο. Η αναλογία που χρησιμοποιείται ποικίλει ανάλογα με το ισομερές και με τον αριθμό αλυσίδων εστέρα. Για κάθε 1eq πορφυρίνης με μία αλυσίδα εστέρα, απαιτούνται 50eq NaOH. Πρόκειται για μία αντίδραση σαπωνοποίησης, η οποία πραγματοποιείται σε 10ml DMF, σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και με προστασία από το φως. Η διάρκειά της αντίδρασης είναι τρεις ώρες για κάθε αλυσίδα εστέρα της πορφυρίνης, ενώ η πορεία της ελέγχεται με TLC σε διαλύτη CH_2Cl_2/αιθανόλη. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη απεσταγμένου νερού και ρύθμιση του pH σε 5-6 με την προσθήκη HCl. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται, εκπλένεται με νερό για την απομάκρυνση του DMF και το προϊόν ξηραίνεται στους 60^0C για 12 ώρες.[98]



Σχήμα ΙΙ.6 : *Αντίδραση σαπωνοποίησης*

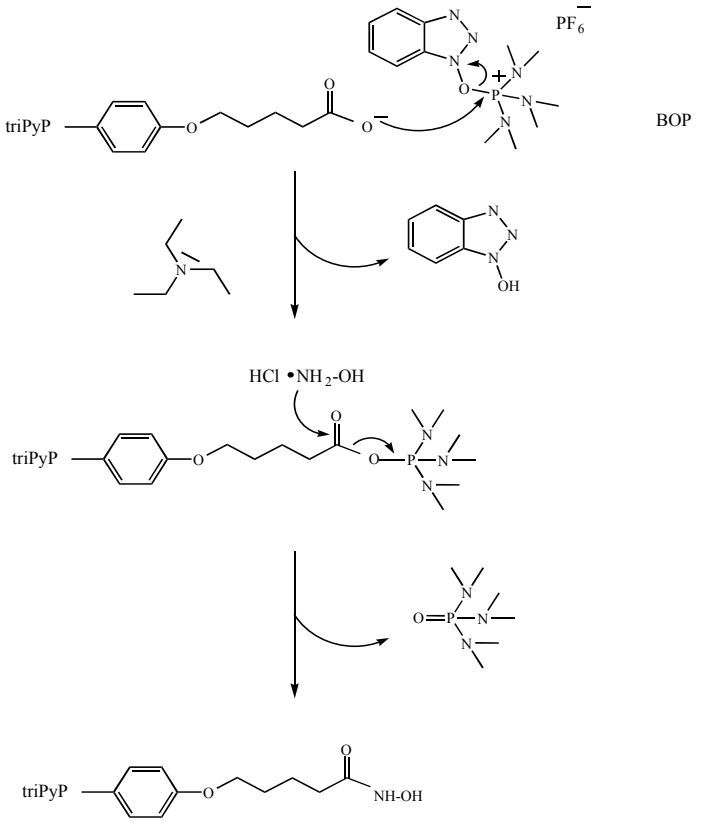
Β) ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΞΑΜΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΤΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ

Σε σφαιρική φιάλη των 25ml που φέρει ψυκτήρα διαλύεται το οξύ της πορφυρίνης σε 5ml άνυδρου DMF. Στη συνέχεια, προστίθενται 4eq τριαιθυλαμίνη (TEA) και 2eq του αντιδραστηρίου σύζευξης 3-(βρωμοτριαζολ-1-υλοξυ)τρι(διμεθυλαμινο)-φώσφορο-εξαφθοριούχος φώσφορος (BOP) για κάθε ομάδα καρβοξυλικού οξέος της πορφυρίνης . Το διάλυμα αναδεύεται και προστατεύεται από το φως. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ατμόσφαιρα αργού ή αζώτου. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία TLC σε διαλύτη CH_2Cl_2 /αιθανόλη (90/10) και μετά την ποσοτική αντίδραση του οξέος προστίθεται υδροχλωρική υδροξυλαμίνη ($HCl{\cdot}NH_2OH$). Η ολοκλήρωση της αντίδρασης διαπιστώνεται με TLC και κυμαίνεται από 2 εώς 6 ώρες. Στη συνέχεια το προϊόν καθιζάνει με την προσθήκη απεσταγμένου νερού (DMF/H_2 O 1/5), διηθείται υπό κενό σε φίλτρο No 4, εκπλένεται με απεσταγμένο νερό για την απομάκρυνση του DMF και ξηραίνεται στους 60^0C για 12 ώρες.[98]



Σχήμα ΙΙ.7 *: Αντίδραση σύνθεσης του υδροξαμικού οξέος της πορφυρίνης*

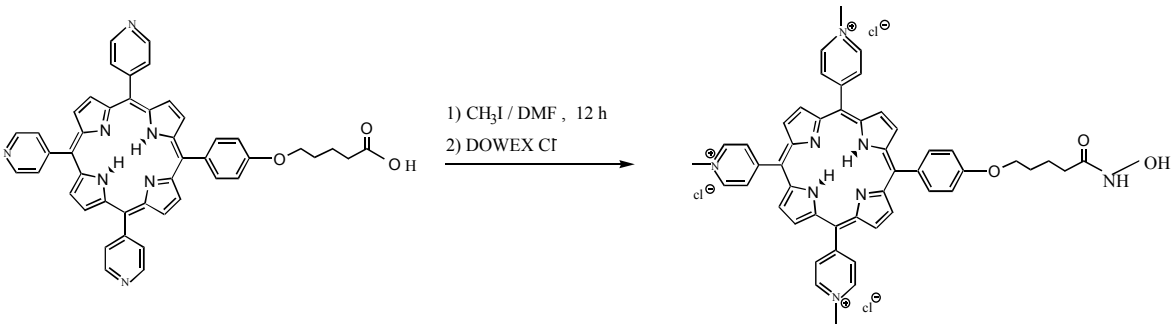
Ο μηχανισμός της παραπάνω αντίδρασης περιγράφεται στο σχήμα 12. Στο πρώτο στάδιο η καρβοξυλική ομάδα της πορφυρίνης αποπρωτονιώνεται από την TEA. Κατόπιν το πυρηνόφιλο αυτό προσλαμβάνει το ηλεκτρόφιλο κέντρο του BOP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του δεσμού φωσφόρου-οξυγόνου και τη δημιουργία ενός νέου μεταξύ του οξυγόνου του οξέος και του φωσφόρου του BOP. Το προϊόν που σχηματίζεται είναι ο ενεργοποιημένος εστέρας,ο οποίος στη συνέχεια προσβάλλεται από την ομάδα της υδροξυλαμίνης για την δημιουργία του υδροξαμικού οξέος. Τα παραπροϊόντα που σχηματίζονται είναι υδατοδιαλυτά και απομακρύνονται εύκολα μέσω της καθίζησης της πορφυρίνης στο μείγμα DMF/H_2 O.



Σχήμα ΙΙ.8 *: Μηχανισμός της αντίδραση σύνθεσης του υδροξαμικού οξέος της πορφυρίνης.*

Γ) ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΠΥΡΙΔΙΝΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ

Σε σφαιρική φιάλη των 50ml, η οποία φέρει ψυκτήρα, προστίθενται 5ml άνυδρου DMF, το υδροξαμικό οξύ που παρασκευάστηκε. Με τη βοήθεια μικροσύριγγας προστίθενται 100 eq ιωδομεθάνιο. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και το διάλυμα προστατεύεται από το φως. Η διάρκεια της αντίδρασης είναι 12 ώρες. Το πέρας της αντίδρασης επιβεβαιώνεται με TLC σε διαλύτη CH_2Cl_2 /αιθανόλη (90/10). Ακολουθεί απόσταξη υπό κενό χωρίς θέρμανση, λόγω της πιθανότητας διάσπασης των δεσμών μεταξύ των αζώτων και των μεθυλομάδων, με σκοπό την απομάκρυνση του ιωδομεθανίου που δεν αντέδρασε. Η απόσταξη συνεχίζεται με θέρμανση έως 60^0C, για την απομάκρυνση του DMF. Στη συνέχεια προστίθεται ακετόνη και το διάλυμα διηθείται και εκπλένεται με ακετόνη. Το προϊόν που λαμβάνεται είναι μερικώς διαλυτό στο νερό, λόγω των υδρόφιλων υδροξαμικών ομάδων. Ακολουθεί αντικατάσταση των ιόντων ιωδίου από ιόντα χλωρίου για να είναι πλήρως διαλυτό. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη ιοντοανταλλακτικής ρητίνης DOWEX Cl^-, διαλυμένης σε μικρή ποσότητα νερού. Το διήθημα που προκύπτει αποστάζεται μέχρι ξηρού υπό κενό, το προϊόν ανακρυσταλλώνεται με προσθήκη διαιθυλαιθέρα σε ένα διάλυμα μεθανόλης και λαμβάνεται με τη μορφή κρυσταλλικής σκόνης, η οποία ξηραίνεται στους 60^0C για 12 ώρες.[99,100]



Σχήμα ΙΙ.9 : *Αντίδραση μεθυλίωσης.*

Κεφάλαιο 3: Φασματοσκοπική Μελέτη

3.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μεγάλη ανάπτυξη της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) από τα τέλη της δεκαετίας του ‘50 επηρέασε σημαντικά την μελέτη σχεδόν όλων των κατηγοριών των οργανικών και οργανομεταλλικών ενώσεων. Ειδικότερα δε επηρέασε τις πορφυρίνες καθώς και τα παράγωγά τους.

Το πρώτο πυρηνικό μαγνητικό φάσμα (NMR) σε μόριο πορφυρίνης δημοσιεύτηκε από τους Becker και Bradley το 1959.[101] Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την φασματοσκοπία NMR χρησιμεύουν τόσο για την διευκρίνιση της δομής των πορφυρινών και των ενώσεών τους, όσο και για την μελέτη της δυναμικής τους μέσα σε διαλύματα ή ακόμη και τον έλεγχο της κινητικής μιας αντίδρασης. Αυτό συμβαίνει διότι η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται.

Κύριο χαρακτηριστικό του πορφυρινικού δακτυλίου είναι η μεγάλη μαγνητική ανισοτροπία που προκαλείται από το *π*–ηλεκτρονιακό νέφος του πορφυρινικού δακτυλίου. Το ηλεκτρονιακό “ρεύμα” (ring current) του πορφυρινικού δακτυλίου που προκύπτει απ’ το εκτεταμένο *π*–συζυγιακό κυκλικό σύστημα δημιουργεί είτε επιπλέον προστασία είτε περαιτέρω αποπροστασία στα πρωτόνια του δακτυλίου. Αυτό το γεγονός έχει σαν συνέπεια το πρωτονιακό φάσμα της ελεύθερης βάσης της πορφυρίνης να εκτείνεται σε μία περιοχή 15 ppm, περίπου.

3.2 ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ

Ένας ατομικός πυρήνας μπορεί να εμφανίζει πυρηνικό spin, υπό την έννοια ότι μπορεί να θεωρηθεί ως ένα περιστρεφόμενο ηλεκτρικό φορτίο και συνεπώς περιέχει στροφορμή. Η στροφορμή είναι ένα διάνυσμα που το μέγεθός της, σύμφωνα με την κβαντική θεωρία, είναι κβαντισμένο. Αυτός ο κβαντικός αριθμός συμβολίζεται με I.

Οι πυρήνες που ενδιαφέρουν την φασματοσκοπία NMR έχουν γωνιακή στροφορμή spin (I≠0). Τέτοιοι πυρήνες είναι αυτοί του 1H, και του 13C, και οι οποίοι ερευνήθηκαν για δύο κυρίως λόγους: α) επειδή ανιχνεύονται πιο εύκολα σε σχέση με άλλους πυρήνες και β) επειδή το άτομο υδρογόνου και του άνθρακα είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στην οργανική χημεία. Αυτά τα άτομα θεωρούνται σαν ηλεκτρικά φορτία που περιστρέφονται και κατέχουν πυρηνική μαγνητική ροπή. Η περιστροφή αυτών των θετικά φορτισμένων σωματιδίων δημιουργεί μικρά μαγνητικά πεδία τα οποία ευθυγραμμίζονται παράλληλα ή αντιπαράλληλα με ένα εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο.

Για την ανίχνευση σήματος και για όλα τα πειράματα NMR η βασική σχέση που ισχύει είναι η:

$$\nu = (\gamma / 2\pi)B_0$$

όπου γ είναι ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα που τοποθετείται μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο B_0. Αν και με μία πρώτη ματιά στη παραπάνω σχέση αναμένεται όλοι οι πυρήνες να συντονίζονται στην ίδια συχνότητα, στη πραγματικότητα το πεδίο που αισθάνεται κάθε πυρήνας τροποποιείται από το χημικό του περιβάλλον. Το τοπικά μαγνητικά πεδία που δημιουργούνται από τους γειτονικούς πυρήνες είναι ανάλογα του *Bo* και η παραπάνω σχέση μετασχηματίζεται στην:

$$\nu = (\gamma / 2\pi)(1-\sigma)B_o$$

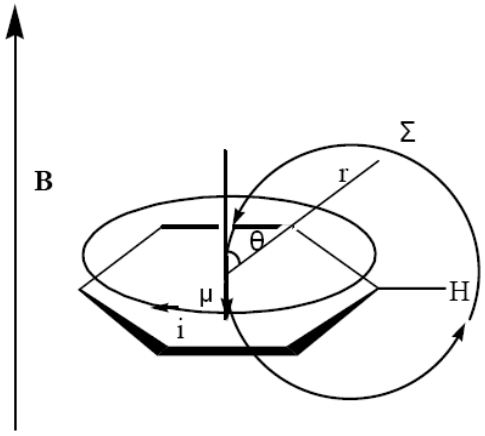
όπου σ είναι η σταθερά προστασίας (μέτρο της μετατροπής του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 από το χημικό περιβάλλον).

3.3 ΠΟΡΦΥΡΙΝΙΚΟ ΡΕΥΜΑ ΔΑΚΤΥΛΙΟΥ

Στα ^{1}H–NMR φάσματα των πορφυρινών, η συνεισφορά του ρεύματος του αρωματικού δακτυλίου στις χημικές μετατοπίσεις είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που κάνει τις πορφυρίνες να ξεχωρίζουν από παρόμοια μη–αρωματικά συστήματα.

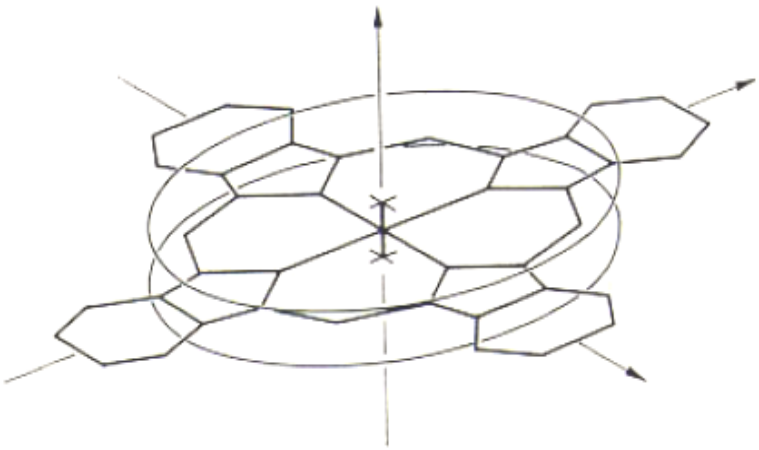
Όταν ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο εφαρμόζεται σ' ένα αρωματικό σύστημα η κίνηση των απεντοπισμένων π–ηλεκτρονίων έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία ρεύματος δακτυλίου. Το επαγόμενο αυτό ρεύμα, οδηγεί σ' ένα δεύτερο μαγνητικό πεδίο. Το αποτέλεσμα είναι ισχυρά ανισότροπο, δεν δίνει μέσο όρο μηδέν από την τυχαία κίνηση του μορίου και έτσι οδηγεί σε ανισότροπη προστασία των πυρήνων.

Το ρεύμα δακτυλίου είναι ένα φαινόμενο που εμφανίζεται σε μοριακά συστήματα τα οποία φέρουν βενζολικούς ή πολυπυρηνικούς αρωματικούς δακτυλίους. Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το ρεύμα δακτυλίου που δημιουργείται στο μόριο του βενζολίου.



Σχήμα ΙΙΙ.1. *Ρεύμα δακτυλίου στο βενζόλιο.*

Η πρώτη προσέγγιση για τον υπολογισμό της επίδρασης του ρεύματος δακτυλίου έγινε από τον Pople, ο οποίος θεώρησε έναν κύκλο στην περιφέρεια του πορφυρινικού δακτυλίου ως τροχιά της κίνησης των *π*–ηλεκτρονίων, όπου το δίπολο της μαγνητικής ροπής του πεδίου βρίσκεται στο κέντρο του δακτυλίου. Το μοντέλο αυτό αναθεωρήθηκε από τους Waugh–Fessenden4 και Johnson–Bovey, οι οποίοι αντί του ενός κύκλου του Pople, θεώρησαν δύο κύκλους, τοποθετημένους συμμετρικά, εκατέρωθεν του πορφυρινικού επιπέδου και σε απόσταση από το επίπεδο αυτό 0,45Å και 0,65Å αντίστοιχα.[102,103]



Σχήμα ΙΙΙ.2. *Θεωρητικό μοντέλο της τροχιάς των ηλεκτρονίων των Waugh–Fessenden και Johnson–Bovey, για το μόριο της φθαλοκυανίνης.*

Τέλος ο Abraham χρησιμοποίησε ένα πιο πολύπλοκο μοντέλο λαμβάνοντας υπ' όψιν του τους πυρρολικούς και τους άλλους χηλικούς δακτυλίους του μορίου της πορφυρίνης. Το μοντέλο όμως αυτό δεν κρίθηκε ικανοποιητικό καθώς προέβλεπε μεγάλες χημικές μετατοπίσεις που δεν συμβαδίζουν με τα πειραματικά δεδομένα. Τελικά μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με *N*–υποκατεστημένες πορφυρίνες και με αξονικούς υποκαταστάτες οδήγησε στην εξαγωγή ημιεμπειρικών τύπων που με αρκετή ακρίβεια έδιναν τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της πορφυρίνης.[104]

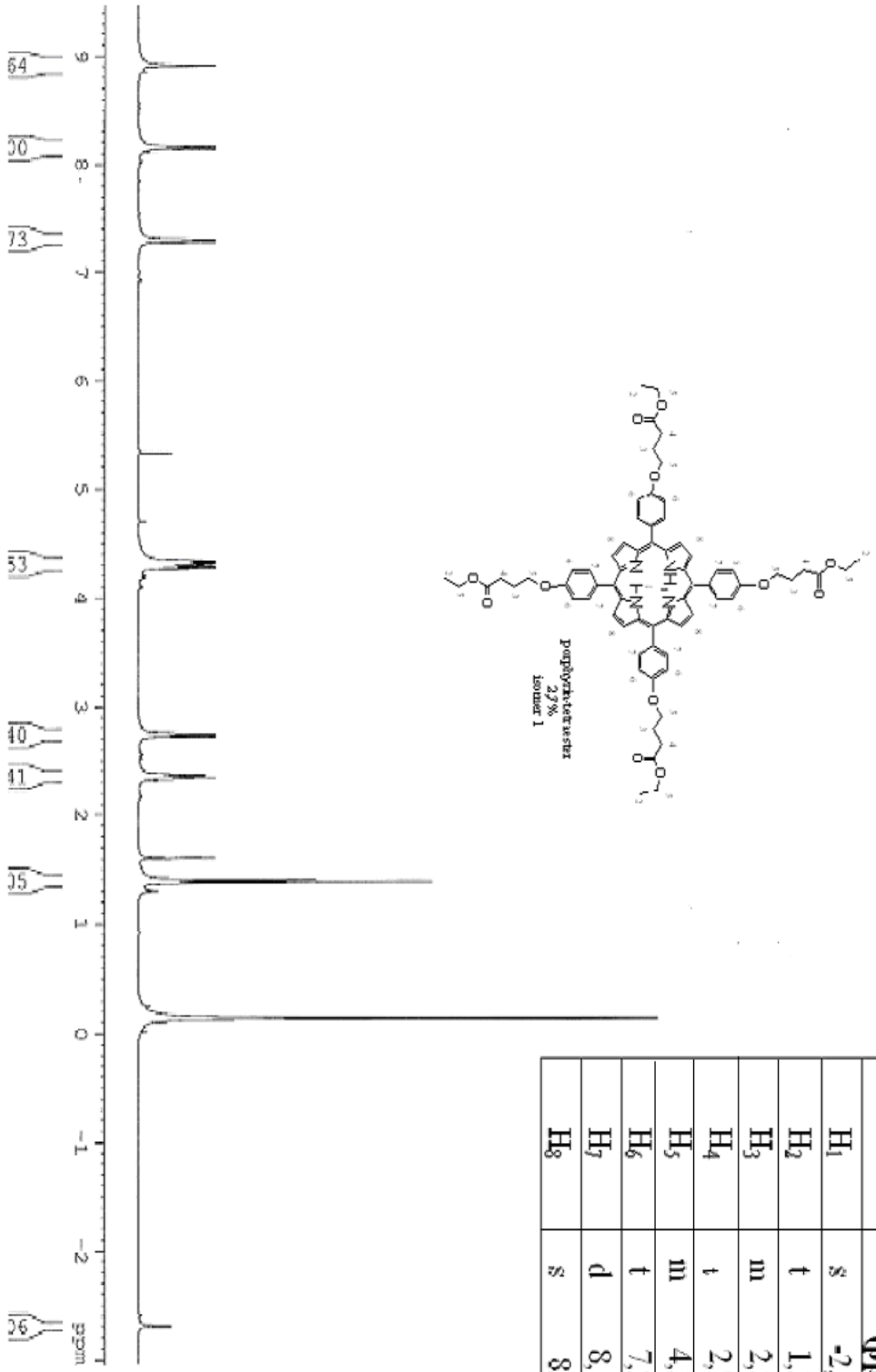
Το αποτέλεσμα του ρεύματος δακτυλίου στα πρωτόνια της πορφυρίνης είναι η μετατόπιση των *β*–πυρρολικών σε χαμηλότερα πεδία κατά 5ppm περίπου, σε σχέση με αυτά του πυρρολίου, ενώ αντίθετα τα N–H μετατοπίζονται κατά περίπου 11ppm σε υψηλότερα πεδία από τα αντίστοιχα του πυρρολίου.

3.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν καθώς προσδιορίζει τον αριθμό των πυριδικών ομάδων της πορφυρίνης και διαχωρίζει τα ισομερή trans και cis. Το φάσμα NMR πρωτονίου κάθε πορφυρινικού δακτυλίου περιέχει δυο περιοχές: α) τα αρωματικά πρωτόνια που συνδέονται με τα άτομα άνθρακα των ομάδων πυριδινίου, πυρολλίου και φαινυλίου τα οποία εμφανίζονται από 10 εώς 7 ppm (χαμηλό πεδίο) β) τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας τα οποία εμφανίζονται από 5 εώς 1 ppm (υψηλό πεδίο).

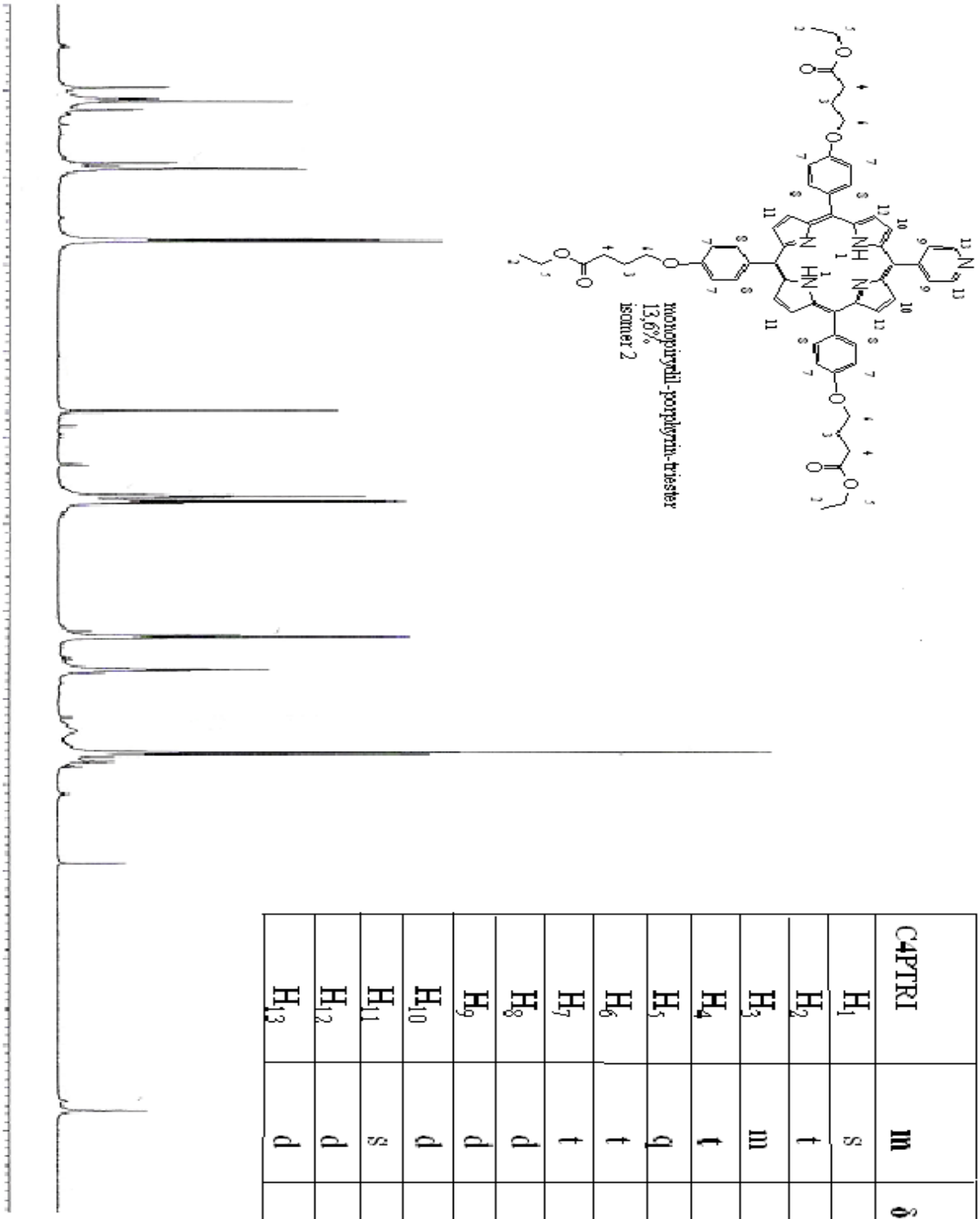
Μέσω της ανάλυσης των κορυφών των πυρρολικών πρωτονίων σε χαμηλές τιμές πεδίου ταυτοποιούμε τα έξι ισομερή που εκλούονται από τη στήλη διαχωρισμού. Η τετραπυρίδινο πορφυρίνη και η τετραφαινυλεστέρας έχουν συμμετρία D_{2h} . Τα 8 πυρρολικά πρωτόνια είναι ισοδύναμα και αποδίδουν στο φάσμα μια μονή κορυφή. Το φάσμα της τριφαινυλεστέρας –μονοπυρίδινο πορφυρίνη διακρίνεται από δύο διπλές κορυφές ,οι οποίες αντιστοιχούν στα δύο πυρρολικά πρωτόνια, και από μια μονή που αντιστοιχεί σε τέσσερα ισοδύναμα πρωτόνια. Η διφαινυλεστέρας –διπυρίδινο πορφυρίνη (trans) έχει μια συμμετρία D_{2h} η οποία αποδίδεται στο φάσμα με δύο διπλές κορυφές για κάθε ομάδα ισοδύναμων πρωτονίων. Ενώ η διφαινυλεστέρας –διπυρίδινο πορφυρίνη (cis) κατέχει μια

συμμετρία D_{2v} η οποία αποδίδεται στο φάσμα με δύο διπλές και δύο μονές κορυφές για κάθε δύο πρωτόνια. Τέλος το φάσμα της μονοφαινυλεστέρας-τριπυρίδινο πορφυρίνης εμφανίζει δύο διπλές κορυφές για κάθε ισοδύναμα πρωτόνια και μια μονή η οποία αντιστοιχεί σε τέσσερα πρωτόνια.



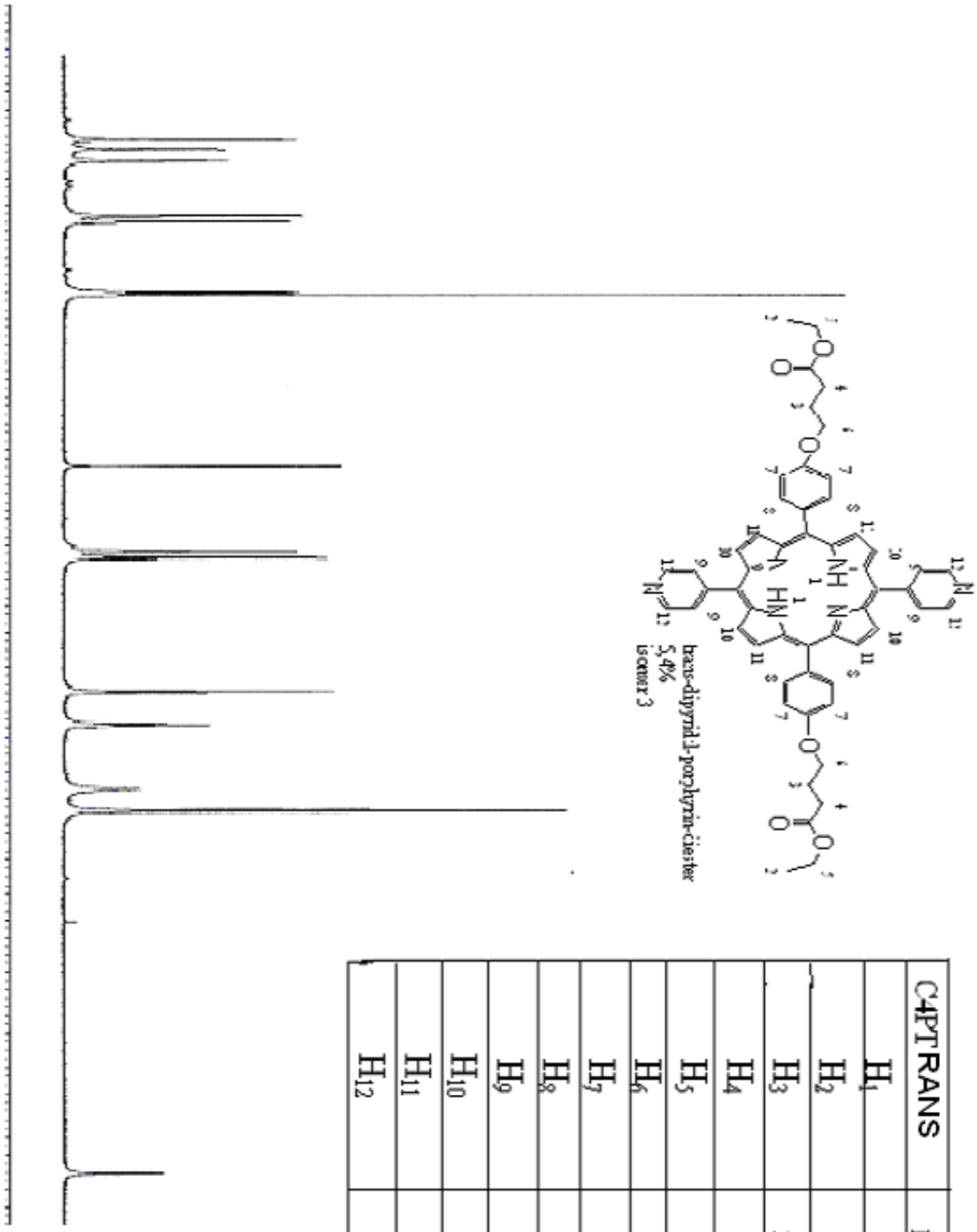
C4PTETRA	m	δ (ppm)
H_1	s	-2,70
H_2	t	1,39
H_3	m	2,35
H_4	t	2,73
H_5	m	4,30
H_6	t	7,29
H_7	d	8,14
H_8	s	8,9

<u>ΦΑΣΜΑ 1</u>: *Φάσμα ^{1}H NMR του Τετραεστέρα.*



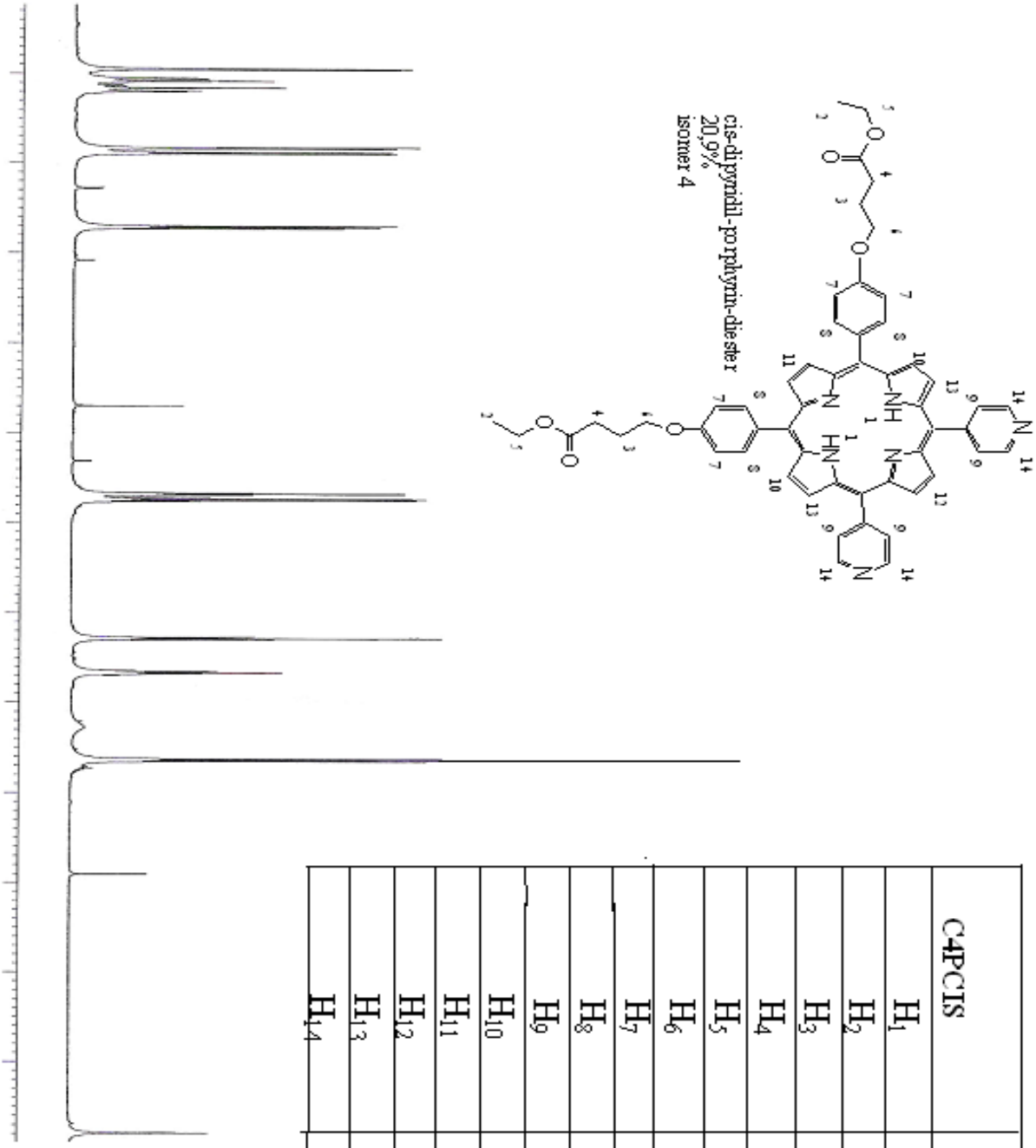
C4PTRI	m	δ (ppm)
H_1	s	-2,77
H_2	t	1,35
H_3	m	2,32
H_4	t	2,70
H_5	q	4,25
H_6	t	4,31
H_7	t	7,27
H_8	d	8,11
H_9	d	8,17
H_{10}	d	8,78
H_{11}	s	8,88
H_{12}	d	8,91
H_{13}	d	9,03

<u>ΦΑΣΜΑ 2</u>: *Φάσμα ^{1}H NMR του Τριεστέρα.*



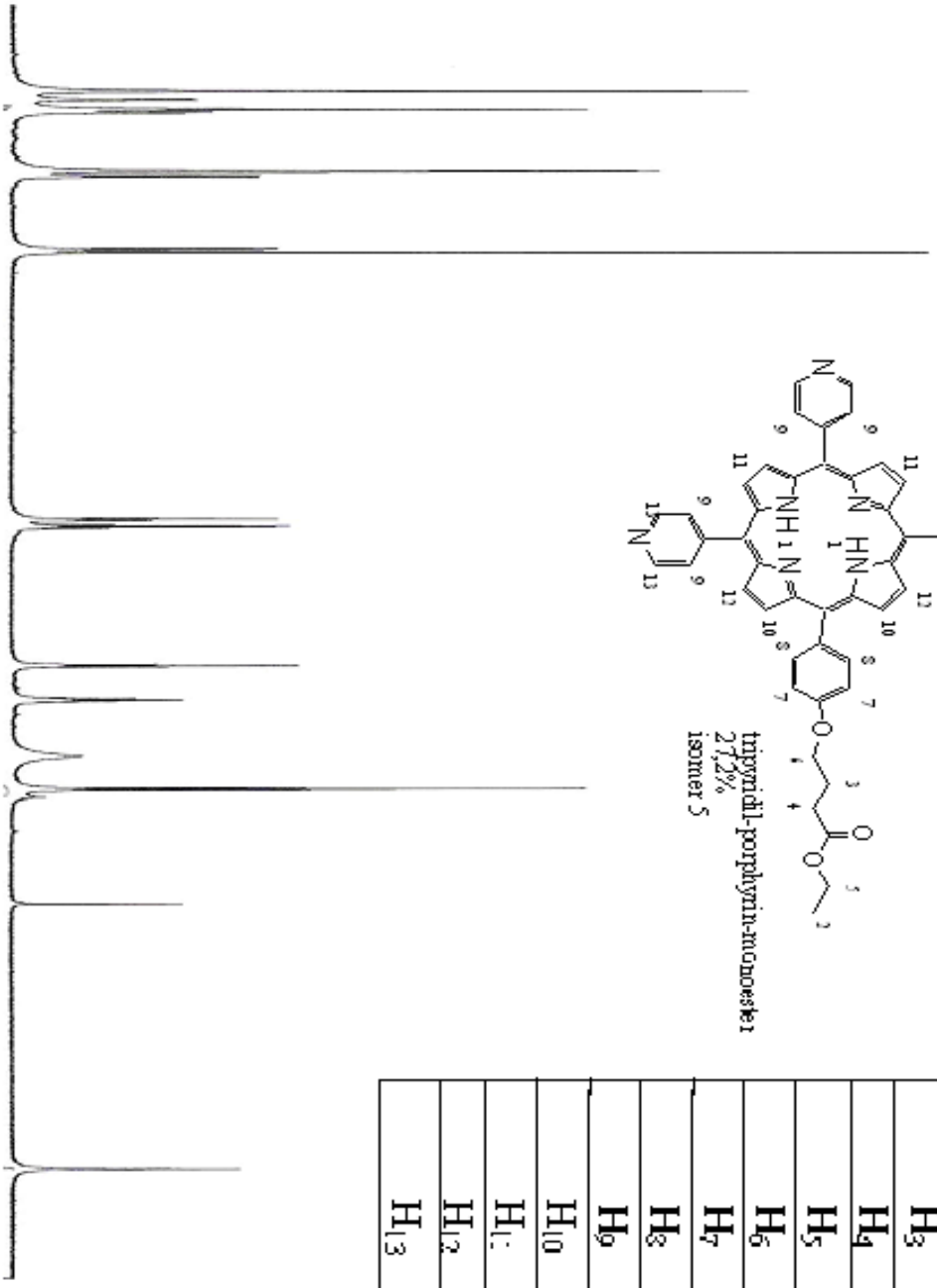
C4PTRANS	m	δ (ppm)
H_1	s	-2,82
H_2	t	1,35
H_3	m	2,33
H_4	t	2,70
H_5	q	4,25
H_6	t	4,32
H_7	t	7,28
H_8	d	8,10
H_9	d	8,17
H_{10}	d	8,80
H_{11}	d	8,93
H_{12}	d	9,04

<u>ΦΑΣΜΑ 3</u>: *Φάσμα ^{1}H NMR του Διεστέρα –trans.*



C4PCIS	m	δ (ppm)
H_1	s	-2,80
H_2	t	1,36
H_3	m	2,32
H_4	t	2,71
H_5	q	4,25
H_6	t	4,32
H_7	t	7,28
H_8	d	8,12
H_9	d	8,16
H_{10}	d	8,79
H_{11}	s	8,83
H_{12}	s	8,90
H_{13}	d	8,94
H_{14}	d	9,04

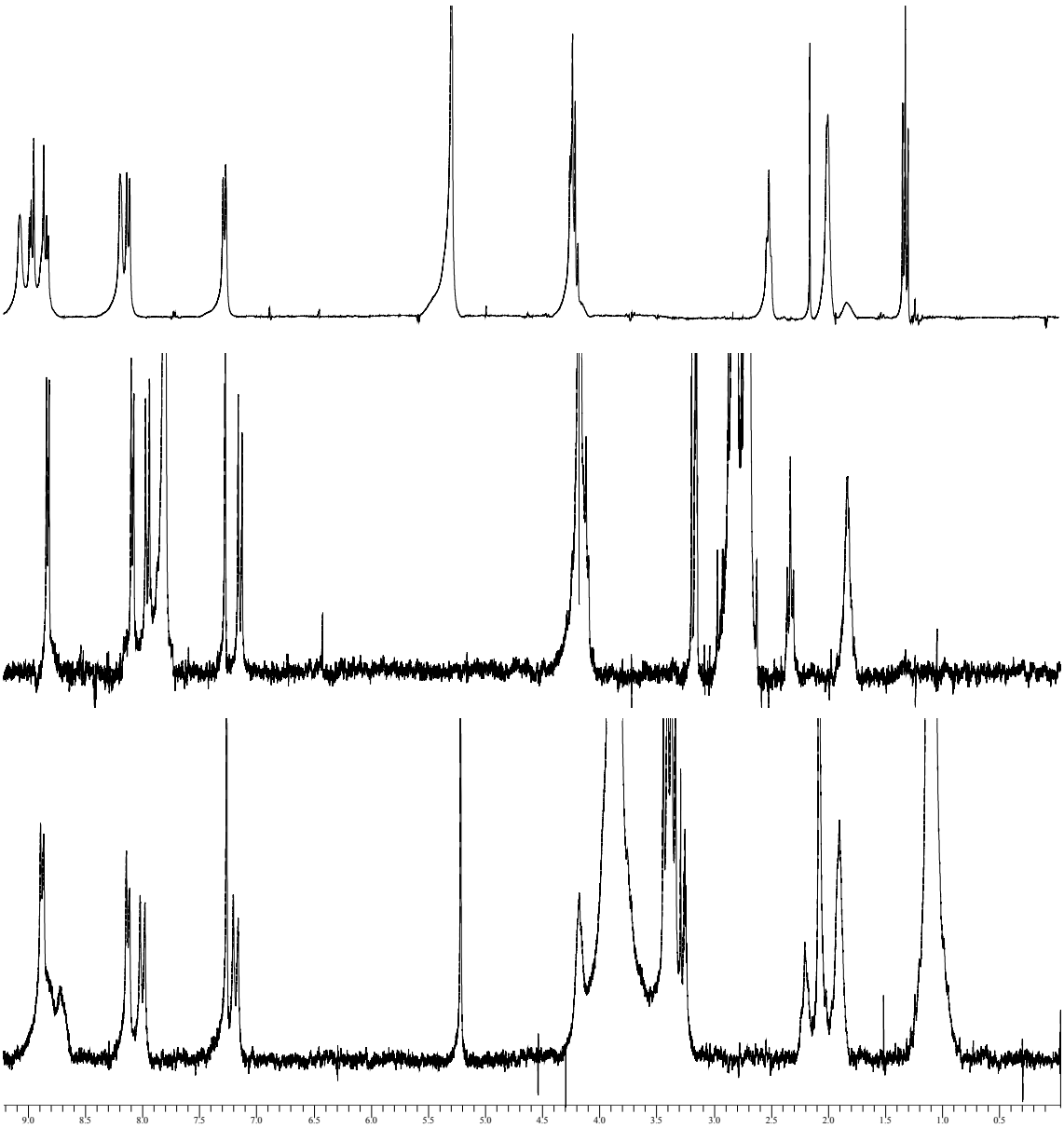
<u>ΦΑΣΜΑ 4</u>: *Φάσμα ^{1}H NMR του Διεστέρα –cis.*



CDCl3	m	δ (ppm)
H_1	s	-2,86
H_2	t	1,35
H_3	m	2,33
H_4	t	2,71
H_5	q	4,25
H_6	t	4,33
H_7	t	7,28
H_8	d	8,11
H_9	d	8,17
H_{10}	d	8,82
H_{11}	s	8,85
H_{12}	d	8,96
H_{13}	d	9,06

<u>ΦΑΣΜΑ 5</u>: *Φάσμα ^{1}H NMR του Μονοεστέρα.*

Χρησιμοποιήσαμε τη φασματοσκοπία NMR για τον έλεγχο των αντιδράσεων σύνθεσης της ομάδας του υδροξαμικού οξέος. Η σημαντικότερη διαφορά στη δομή του φάσματος του καρβοξυλικού παραγώγου από αυτού του εστερικού είναι η εξαφάνιση των κορυφών που οφείλονται στα πρωτόνια της εστερικής ομάδας. Επίσης παρατηρείται μια μετατόπιση όλων των κορυφών προς υψηλότερα πεδία ενώ κατά τη σύνθεση του υδροξαμικού οξέος παρατηρείται μια μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία.



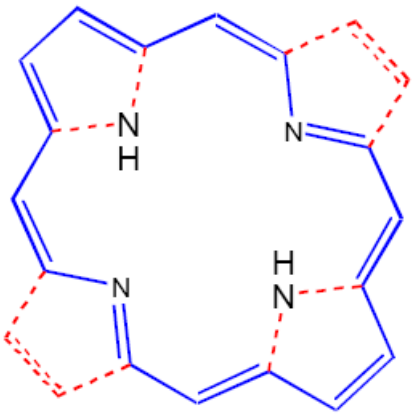
Σχήμα ΙΙΙ.3 : Φάσματα ^{1}H-NMR σε $CDCl_3$ + CD_3OD 2-3% των παραγώγων C4pCIS εστερικού (πάνω), καρβοξυλικού οξέος (μέση) και υδροξαμικού οξέος (κάτω).

Η σύνθεση του καρβοξυλικού οξέος της πορφυρίνης έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατόπιση της τριπλής κορυφής που οφείλεται στα πρωτόνια του άνθρακα της αλειφατικής αλυσίδας που είναι γειτονικός με την εστερική ομάδα από τα 2,53 ppm στα 2,35 ppm. Ενώ κατά τη σύνθεση του υδροξαμικού οξέος η κορυφή αυτή μετατοπίζεται σε υψηλότερες τιμές και συγκεκριμένα στα 2,20 ppm, δεν είναι όμως πλέον ορατή η σχάση της τριπλής κορυφής.

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι οι σχάσεις σχεδόν όλων των κορυφών, ιδιαίτερα των πυρρολικών πρωτονίων, κατά τη σύνθεση των παραγώγων δεν εμφανίζονται εξαιτίας της προσθήκης του CD_3OD για τη διάλυση των ουσιών προς ανάλυση των δειγμάτων NMR. Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα η διάλυση των ουσιών δεν επιτεύχθηκε με τη προσθήκη CD_3OD . Για το λόγο αυτό και εξαιτίας των ευρείων κορυφών που εμφανίζονται στο φάσμα (οι οποίες οφείλονται στους διαλύτες CD_3OD και $CD\,Cl_3$) εφαρμόζονται και άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές για την ταυτοποίηση των ενώσεων.

3.5 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

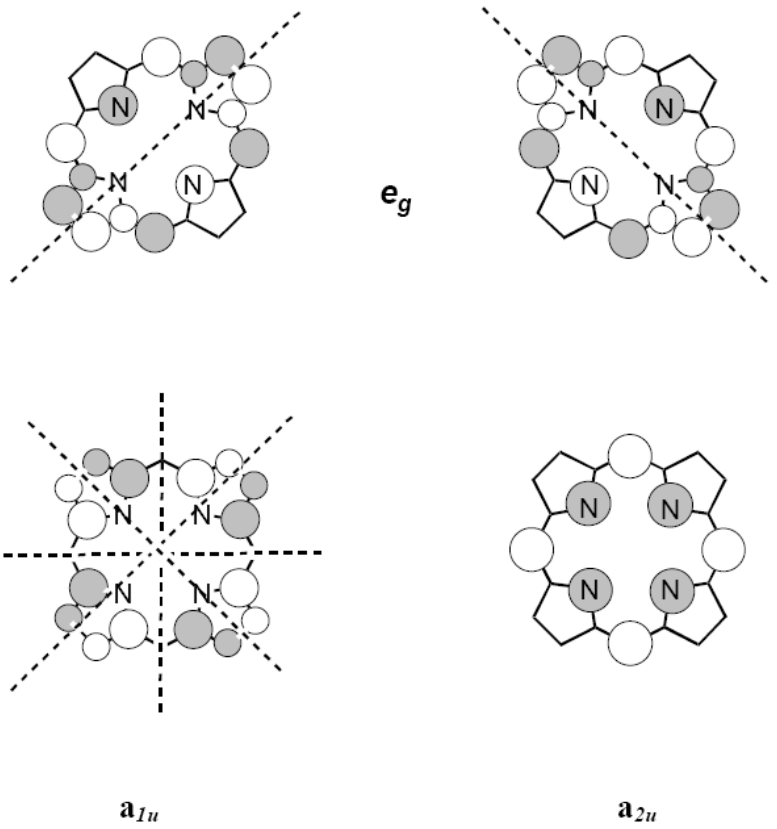
Κβαντοχημικές μελέτες σε πορφυρινικούς δακτυλίους άρχισαν περίπου 50 χρόνια πριν. Η πρώτη αναφορά για την εύρεση λεπτομερώς της μορφής του μορίου της πορφυρίνης, όπου και πρωτοαναφέρεται ότι ο δακτύλιος υπακούει στον κανόνα των 4n+2 του Hűckel, έγινε από τους Longuet–Higgins et al. το 1950.



Σχήμα ΙΙΙ.4: *Ο πορφυρινικός δακτύλιος υπακούει στον κανόνα του Hűckel των 4n+2 ηλεκτρονίων. Οι δεσμοί του συζυγιακού πολυενίου φαίνονται με συνεχή γραμμή.*

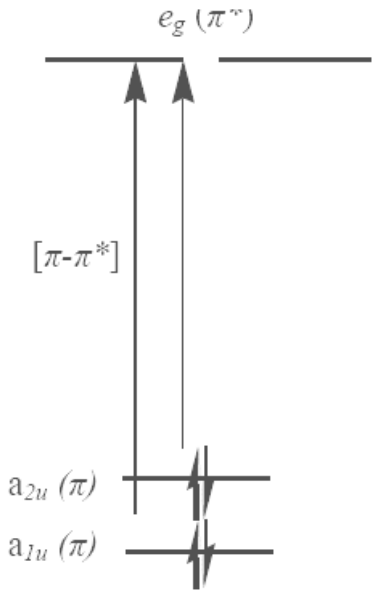
Οι ερευνητές αυτοί θεώρησαν ότι τα ηλεκτρόνια 16 ατόμων του πορφυρινικού δακτυλίου (14 άτομα άνθρακα και τα 2 κεντρικά άτομα αζώτου που δεν φέρουν πρωτόνια (Σχήμα 17), σχηματίζουν ένα συζυγιακό πολυένιο 18 e^- που υπακούει στον κανόνα του Hűckel και που ισχύει για τα πολυένια των 4n+2 ηλεκτρονίων.[105]

Κατά το διάστημα 1961–1963, ο Gouterman έδωσε με αρκετή λεπτομέρεια, ένα θεωρητικό μοντέλο, το ονομαζόμενο τεσσάρων τροχιακών για την περιγραφή των διαφόρων ηλεκτρονικών καταστάσεων των φασμάτων των πορφυρινών καθώς και των συμπλόκων τους.[106,107] Με βάση αυτό το μοντέλο τα δύο *HOMO* μοριακά τροχιακά ενός πορφυρινικού δακτυλίου είναι σχεδόν εκφυλισμένα, όπως άλλωστε και τα δύο *LUMO* μοριακά τροχιακά. Τα *HOMO* τροχιακά έχουν συμμετρία *a1u* και *a2u* ενώ τα *LUMO* έχουν συμμετρία *eg*. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζονται τα υψηλότερα κατειλημμένα μοριακά τροχιακά (*HOMO*) και τα χαμηλότερα μη κατειλημμένα μοριακά τροχιακά (*LUMO*), όπου 48 οι γραμμοσκιασμένες επιφάνειες αντιστοιχούν σε (+), ενώ οι μη σε (–) πρόσημο κυματοσυνάρτησης.[108,109,110,111,112]



Σχήμα ΙΙΙ.5: *Διαγράμματα HOMO (συμμετρίας a1u και a2u) και LUMO (συμμετρίας eg) τροχιακών.*

Τα τέσσερα αυτά τροχιακά είναι ευκρινώς διαχωρισμένα από όλα τα άλλα συμπληρωμένα και μη συμπληρωμένα μοριακά τροχιακά. Με το μοντέλο αυτό, όλα τα βασικά χαρακτηριστικά των ηλεκτρονικών φασμάτων στις πορφυρίνες, οφείλονται κατά προσέγγιση, σε ηλεκτρονικές μεταβάσεις που λαμβάνουν χώρα στα τέσσερα αυτά τροχιακά (Σχήμα 18).



Σχήμα ΙΙΙ.6: *Σχηματική παράσταση των τροχιακών του πορφυρινικού δακτυλίου.*

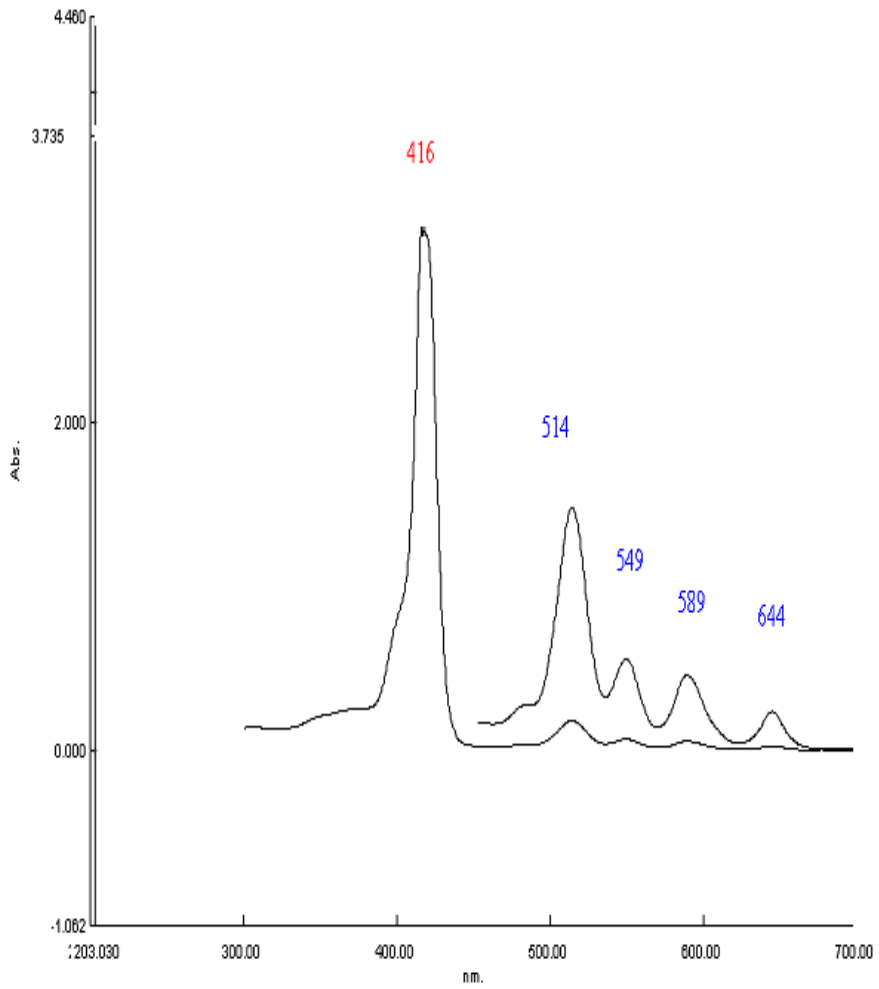
Η ελεύθερη πορφυρίνη έχει συμμετρία D_{2h} και τα φάσματα της είναι τύπου normal. Στα φάσματα αυτά εμφανίζεται μια ισχυρή απορρόφηση μεταξύ 320 και 450nm (Soret ή B-ταινία), και τέσσερις μικρότερης έντασης απορροφήσεις από τα 450 έως τα 700nm (Q-ταινίες ($Q_y(1,0)$, $Q_y(0,0)$, $Q_x(1,0)$, και $Q_x(0,0)$). Η ένταση των συγκεκριμένων κορυφών ελαττώνεται προς τα μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η *B*-ταινία αναφέρεται σε ισχυρώς επιτρεπτή διεγερμένη κατάσταση, ενώ η *Q* σε μία ημιεπιτρεπτή.

Σύμφωνα με το Gouterman, η B-ταινία που αναφέρεται σε μια ισχυρώς επιτρεπτή διεγερμένη κατάσταση, είναι το αποτέλεσμα της ανυσματικής πρόσθεσης των δίπολων της διεργασίας μετάβασης π→ π . Αντιθέτως η Q-ταινία η οποία οφείλεται στην δονητική αλληλεπίδραση, εμφανίζοντας τέσσερις καταστάσεις, είναι το αποτέλεσμα της αφαίρεσης των δύο δίπολων και γι' αυτό το λόγο έχουν μικρότερη ένταση.[113]

3.6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

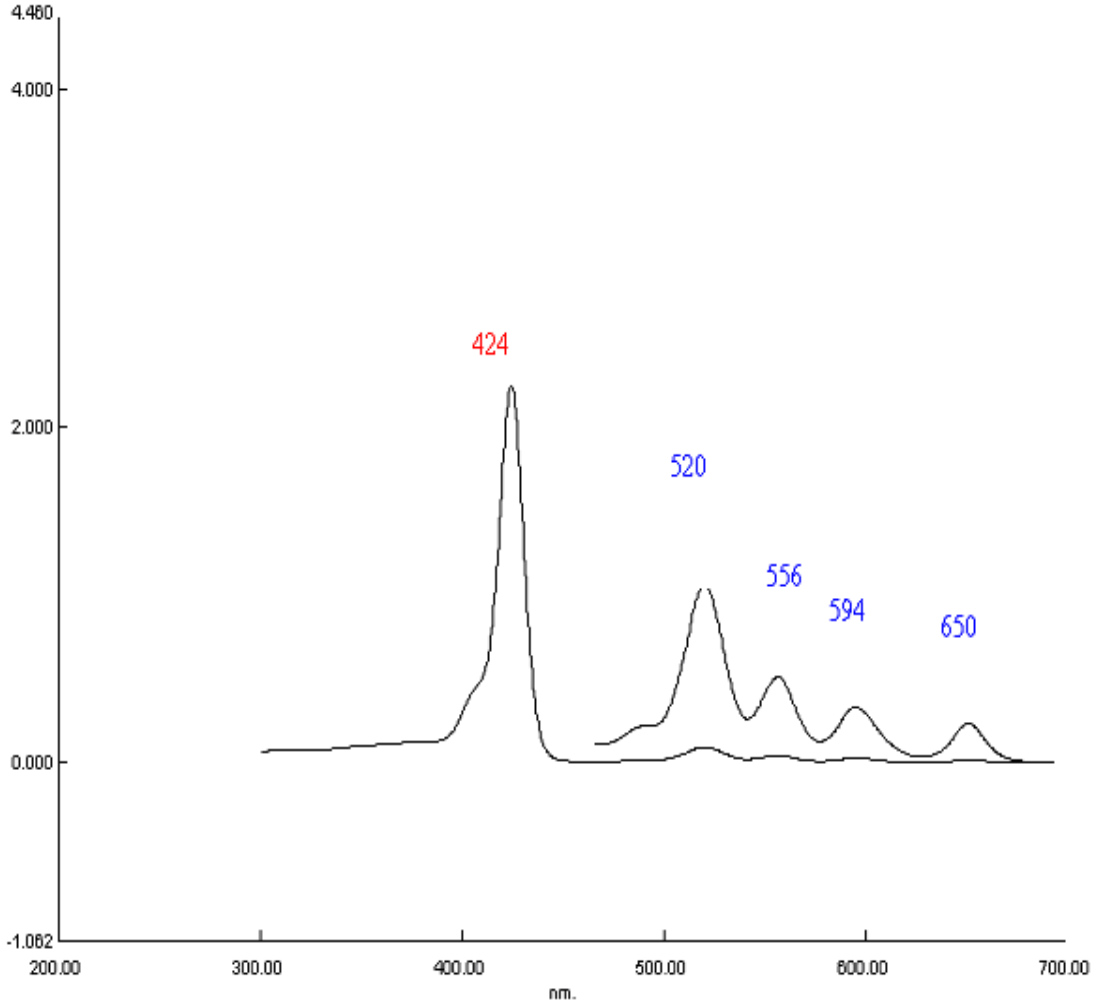
Αυτή η φασματοσκοπική μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των πορφυρινών έναντι των παραπροιόντων που εκλούονται από την στήλη διαχωρισμού κατά την αντίδραση συμπύκνωσης. Η ταυτοποίηση των παραγώμενων ενώσεων δεν θα ήταν ιδιαίτερα αξιόπιστη εξαιτίας των μικρών διαφορών στην απορρόφηση των παραγώγων. Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα UV-Vis των εστέρων.

		Q Bands				Soret
Μονοεστέρας $7,2*10^{-5}$M	λ (nm)	644	589	549,5	514	416
	A	0,238	0,460	0,557	1,480	3,175
	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	3296	6371	7715	20499	439751



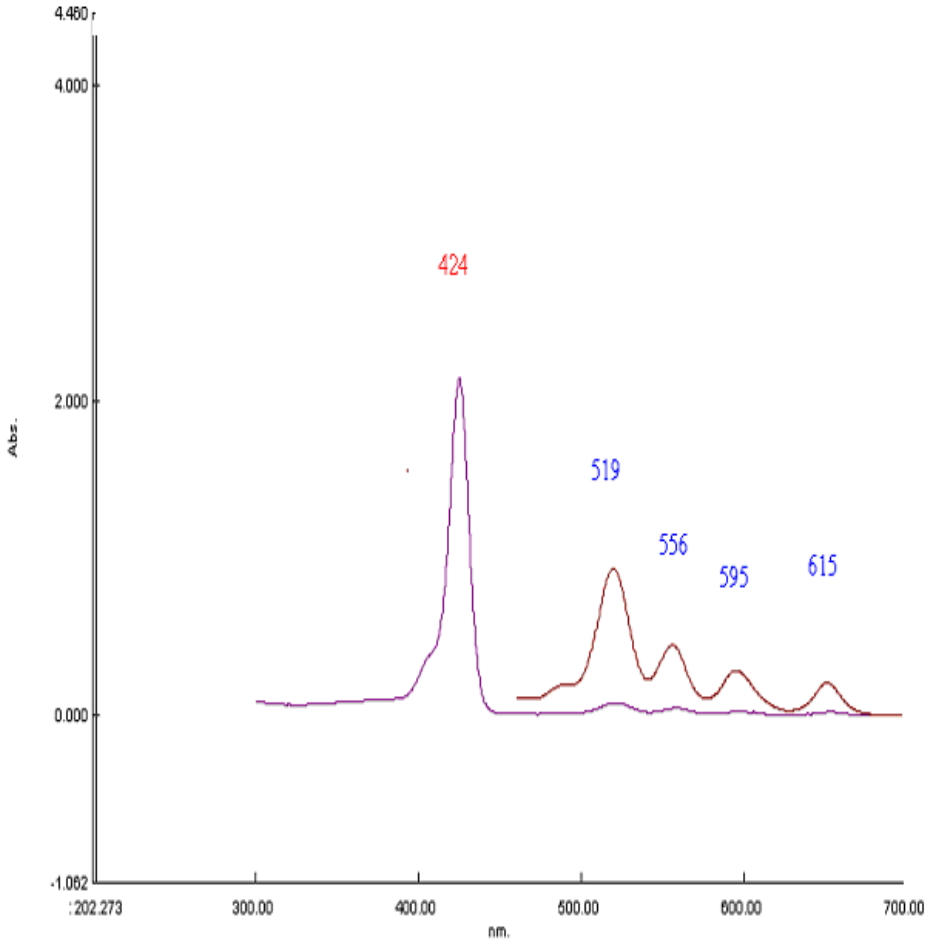
ΦΑΣΜΑ 6*: Φάσμα UV-Vis του μονοεστέρα*

cis-Διεστέρας $5,8*10^{-5}M$		Q Bands				Soret
	λ (nm)	650,5	594,5	556,5	520	424,5
	A	0,233	0,327	0,508	1,049	2,241
	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	4017	5638	8759	18086	386379



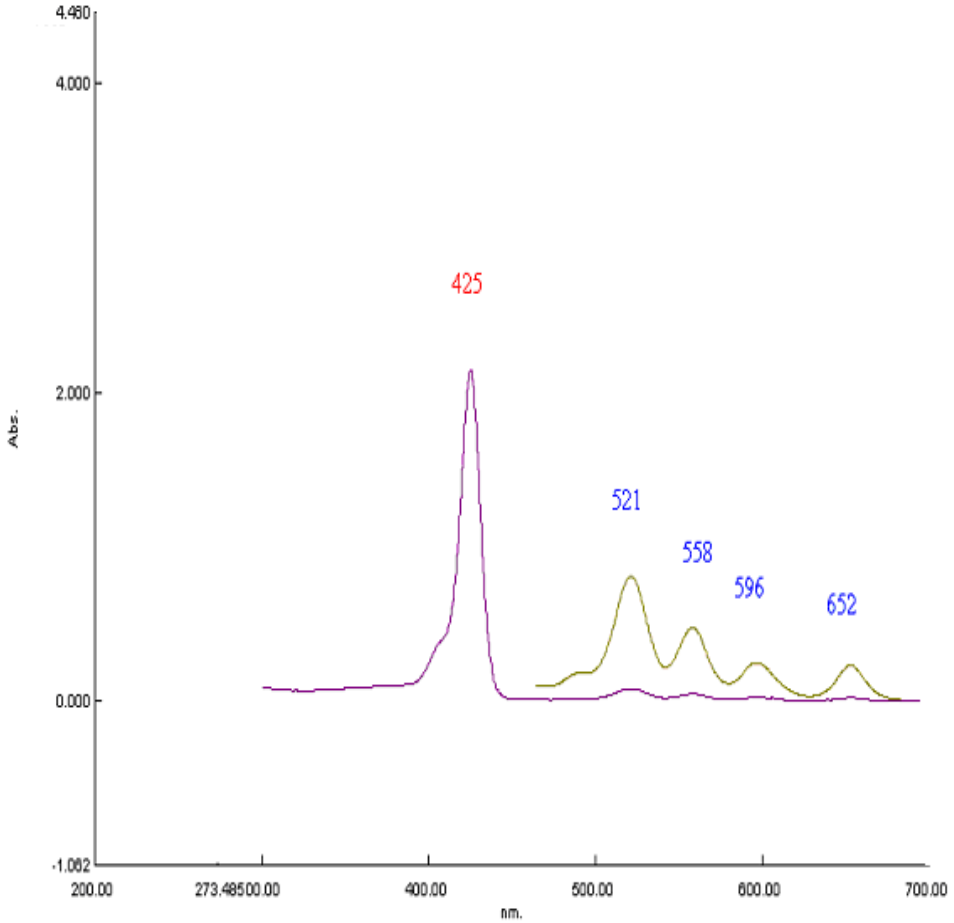
ΦΑΣΜΑ 7: *Φάσμα UV-Vis του cis-διεστέρα*

trans-Διεστέρας $6*10^{-5}$M		Q Bands				Soret
	λ (nm)	651	595	556	519,5	424
	A	0,208	0,282	0,447	0,931	1,992
	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	3467	4700	7450	15517	332000



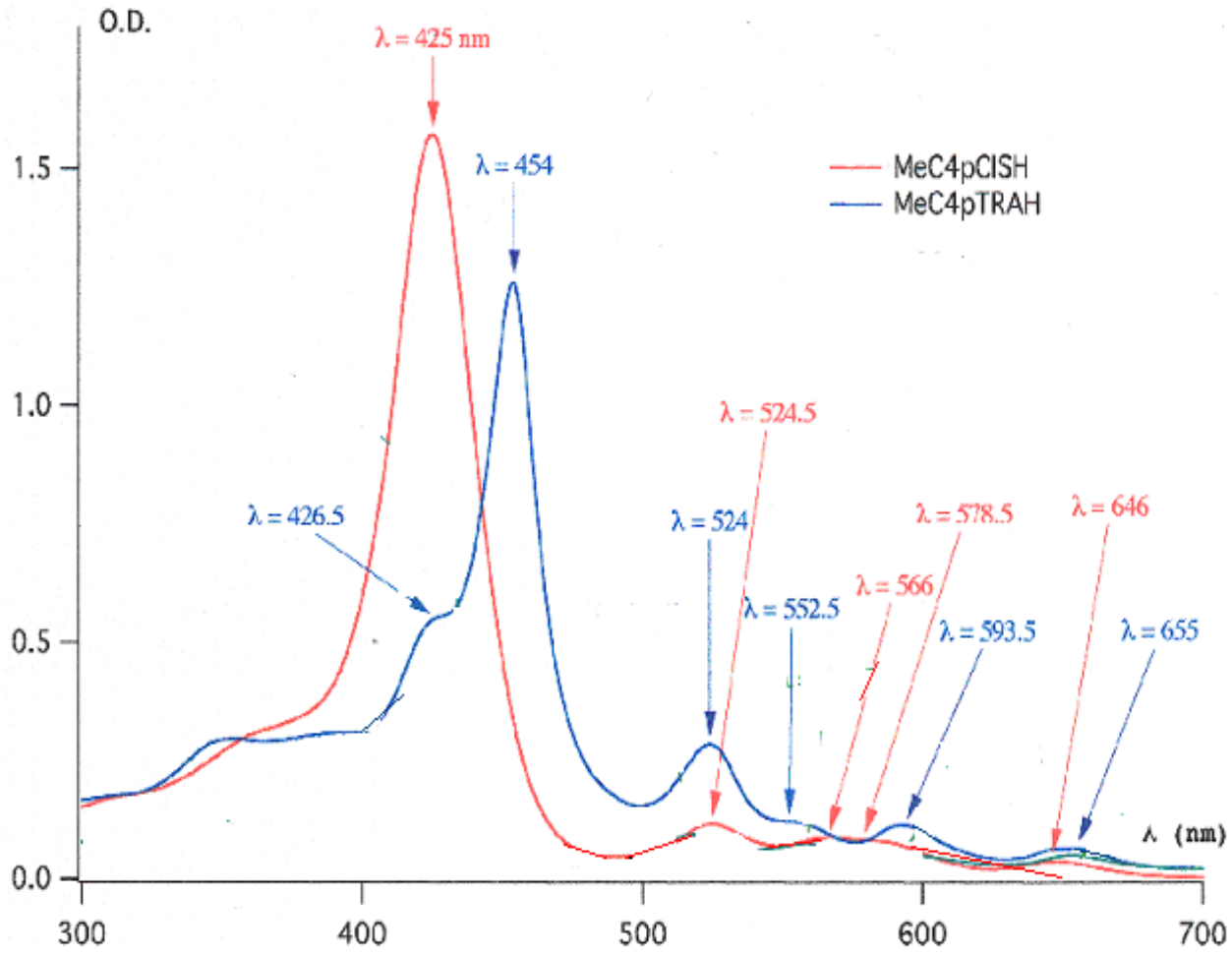
ΦΑΣΜΑ 8: *Φάσμα UV-Vis του trans -διεστέρα*

		Q Bands				Soret
Τριεστέρας $5,2*10^{-5}$M	λ (nm)	652,5	596,5	558	521	425
	A	0,232	0,249	0,476	0,805	2,135
	ε ($M^{-1}cm^{-1}$)	4462	4788	9154	15481	410577



ΦΑΣΜΑ 9: *Φάσμα UV-Vis του τριεστέρα*

Κατά τη μεθυλίωση των πυριδικών ομάδων παρατηρούμε μετατοπίσεις των ταινιών απορρόφησης και διαπλάτυνση της Β-ταίνιας. Αυτό οφείλεται στον απεντοπισμό του ηλεκτρονικού νέφους, λόγω του κατιονικού χαρακτήρα που προσδίδουν τα φορτία που εισάγονται στο μόριο. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα παρουσιάζεται παρακάτω στο Φάσμα 10.



ΦΑΣΜΑ 10: *Φάσματα απορρόφησης των πορφυρινών MeC_4pCISH και MeC_4pTRAH σε διαλύτη απ.H_2O.*

Κεφάλαιο 4: Βιοχημικές Μέλετες

4.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ-RNA ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των συντιθέμενων πορφυρινών με το RNA, με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού αποτελεί ένα πρώτο στάδιο ελέγχου της ικανότητας παρεμβολής των πορφυρινών αυτών ανάμεσα στα ζευγάρια βάσεων του RNA. Το φαινόμενο της παρεμβολής εκφράζεται κατά την προσθήκη RNA στο πορφυρινικό διάλυμα, μέσω της επακόλουθης βαθυχρωμίας και της υποχρωμίας στο φάσμα υπεριώδους-ορατού. Ο όρος βαθυχρωμία υποδηλώνει την μετατόπιση του μεγίστου της ταινίας απορροφήσεως σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, ενώ η υποχρωμία την ελάττωση της απορροφήσεως . Οι όροι αυτοί μεταφράζονται υπολογιστικά με τους παρακάτω τύπους :

- Βαθυχρωμία: $\Delta\lambda = \lambda-\lambda_0$, όπου λ_0 είναι το μήκος κύματος της ελεύθερης πορφυρίνης και λ το μήκος κύματος της πορφυρίνης παρουσία RNA
- Υποχρωμία: $H_{app}\% = [(A-A_0)]X100/A_0$, όπου A_0 είναι η απορρόφηση του διαλύματος της πορφυρίνης με αρχική συγκέντρωση $[P]_0$ στο λ_0 και A η απορρόφηση του διαλύματος της πορφυρίνης στην ίδια συγκέντρωση και παρουσία του RNA στο λ.

4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι φασματομετρικές μετρήσεις έλαβαν χώρα στην περιοχή της ζώνης της Soret ταινίας, δηλαδή μεταξύ 350 και 500 nm. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA yiest , ενώ σαν διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα HCl Tris 40 mM, pH = 8,0. Ο λόγος $1/r_0$ εκφράζει την αναλογία μεταξύ των αρχικών συγκεντρώσεων του RNA και της πορφυρίνης στο διάλυμα ($1/r_0 = [RNA]_0/[P]_0$).

Για την πραγματοποίηση του πειράματος παρασκευάζουμε τρία διαλύματα :

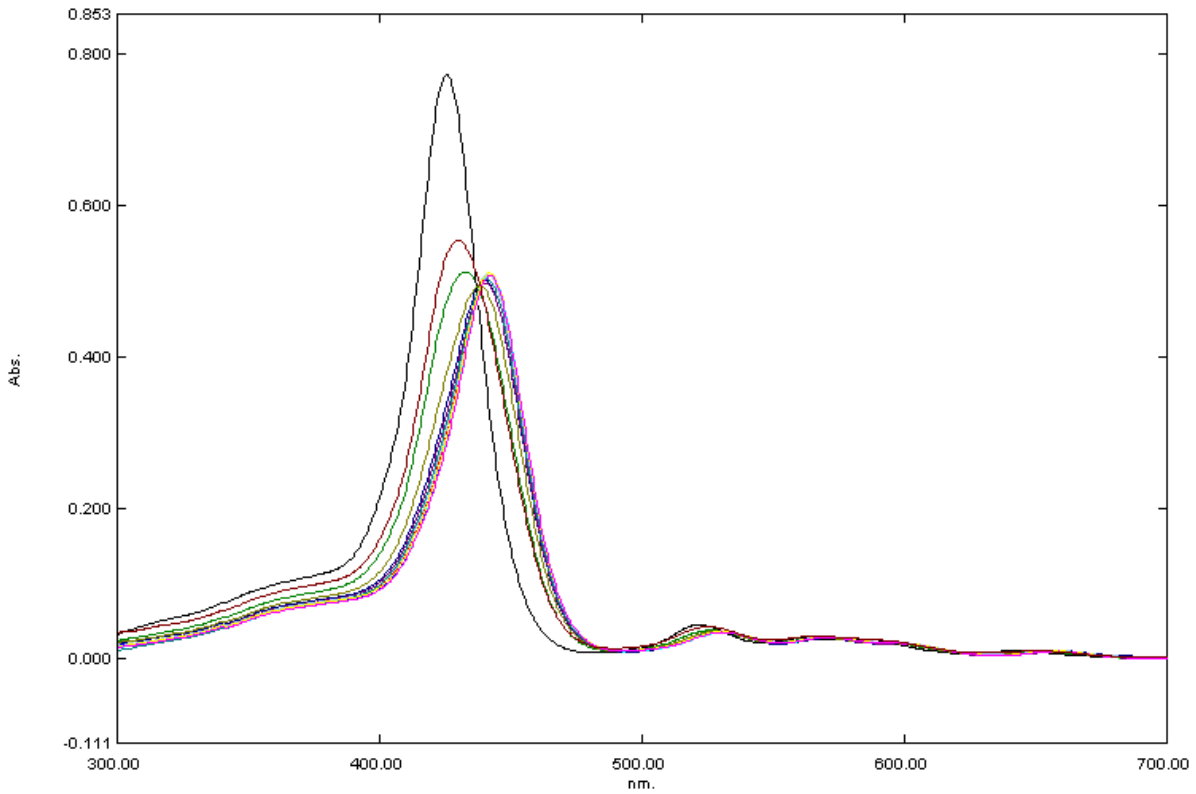
- P_o : Το διάλυμα αυτό περιέχει την προς μελέτη πορφυρίνη σε κατάλληλη συγκέντρωση, ώστε η ένταση της απορρόφησης (OD) να είναι μεταξύ 0,1 και 1,5,

όπου οι μετρήσεις στο χρησιμοποιούμενο φασματοφωτόμετρο είναι πιο αξιόπιστες.

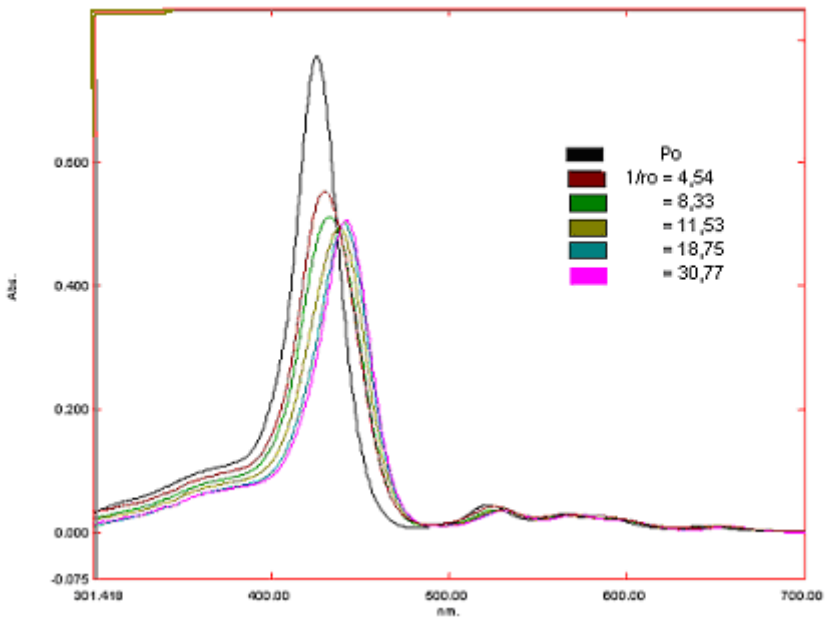
- P_x : Το διάλυμα αυτό περιέχει την προς μελέτη πορφυρίνη, σε ίδια συγκέντρωση με το διάλυμα P_o και κατάλληλη ποσότητα διαλύματος RNA, ώστε $1/r_0 = 50$.
- A_x : Το διάλυμα αυτό περιέχει RNA ίδιας συγκέντρωσης με το διάλυμα P_x και χρησιμοποιείται ως διάλυμα αναφοράς.

Αρχικά λαμβάνεται η μέτρηση του διαλύματος P_x με διάλυμα αναφοράς το A_x και έπειτα του διαλύματος P_o, με διάλυμα αναφοράς το buffer. Στη συνέχεια και όσο δυνατόν αμεσότερα, προστίθενται κατά σειρά συγκεκριμένες ποσότητες του διάλυματος P_x στην κυψελίδα που περιέχει το διάλυμα P_o και αντίστοιχες ποσότητες A_x στην κυψελίδα που περιέχει το διάλυμα αναφοράς, δηλαδή το buffer. Με την σταδιακή προσθήκη P_x στο διάλυμα P_o επιτυγχάνονται οι επιθυμητές τιμές $1/r_0$ στο διάλυμα που μετράτε στην κυψελίδα, ενώ με την αντίστοιχη προσθήκη A_x στο διάλυμα αναφοράς παρεμποδίζεται η αποσταθεροποίηση της γραμμής βάσης του φάσματος.

Στους πίνακες IV.1 , IV.2 και IV.3 συνοψίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που ελήφθησαν , ενώ στα σχήματα IV. 1 , IV.3 και IV.5 απεικονίζονται τα φάσματα UV-Vis των τριών πορφυρινών που μελετήθηκαν για κάθε αναλογία $1/r_o$. Για λόγους ευκρίνειας παρατίθενται οι καμπύλες τιτλοδότησης με επιλεγμένες κορυφές, σχήματα IV.2 , IV.4 και IV.6.



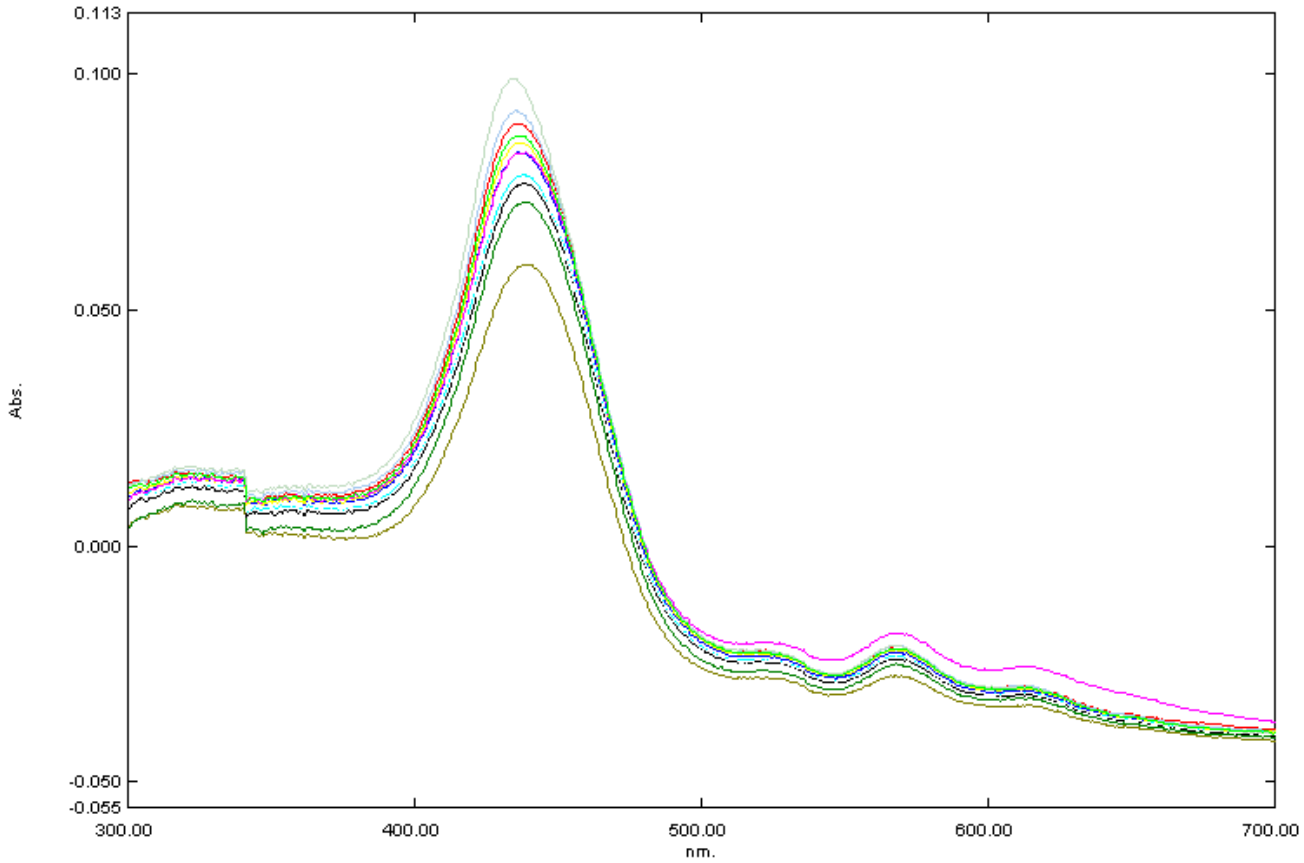
Σχήμα IV.1: *Φάσματα απορρόφησης ακτινοβολίας UV-Vis, διαλύματων της πορφυρίνης MeC4pMH με RNA, σε διάφορες τιμές του λόγου $1/r_0$.*



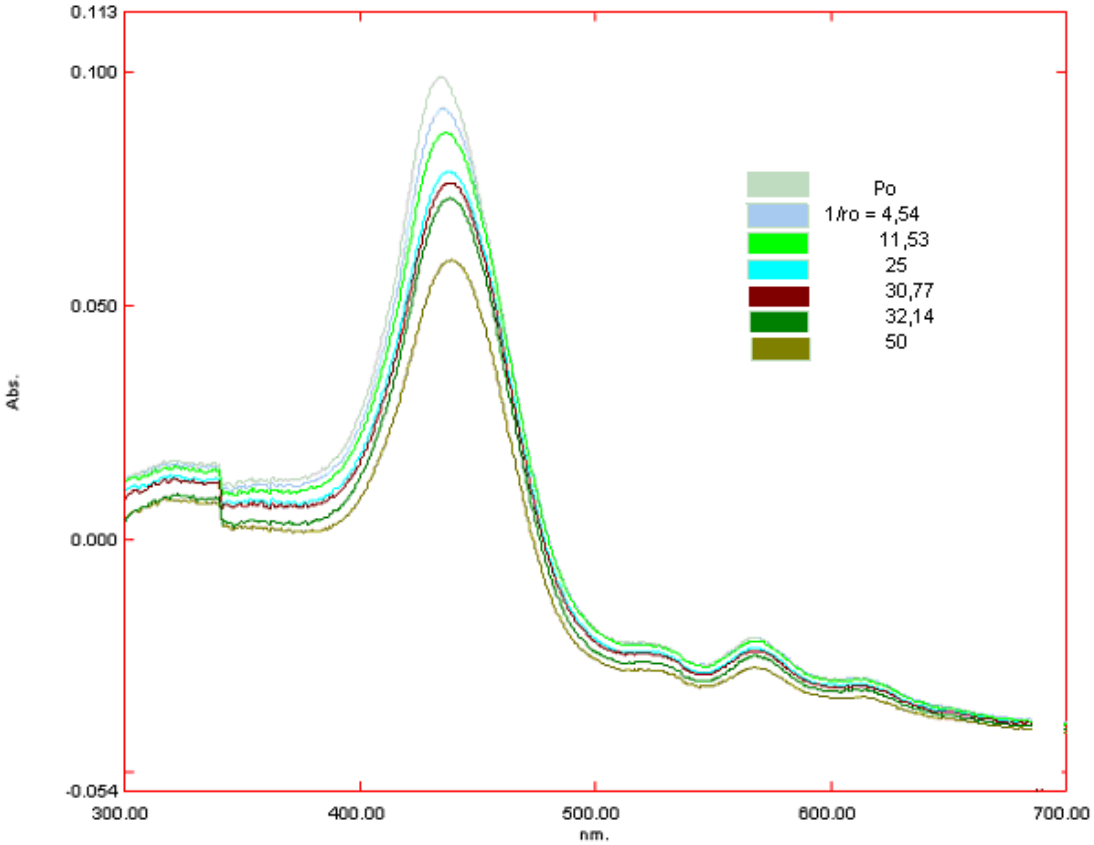
Σχήμα IV.2: *Φάσματα απορρόφησης ακτινοβολίας UV-Vis, διαλύματων της πορφυρίνης MeC4pMH με RNA, σε επιλεγμένες τιμές του λόγου $1/r_0$.*

		MeC4pMH	
1/r$_o$	***+P$_x$ (μl)***	***Δλ***	H$_{app}$%
0	*P$_O$*	-	-
4,54	100	4,2	-28,16
8,33	200	7,8	-33,98
11,53	300	12,8	-35,78
18,75	600	15,5	-34,75
30,77	1600	17	-34,50

Πίνακας IV.1: ***Αποτελέσματα των μετρήσεων της μελέτης αλληλεπίδρασης της πορφυρίνης MeC4pMH με RNA με φασματοσκοπία UV-Vis***



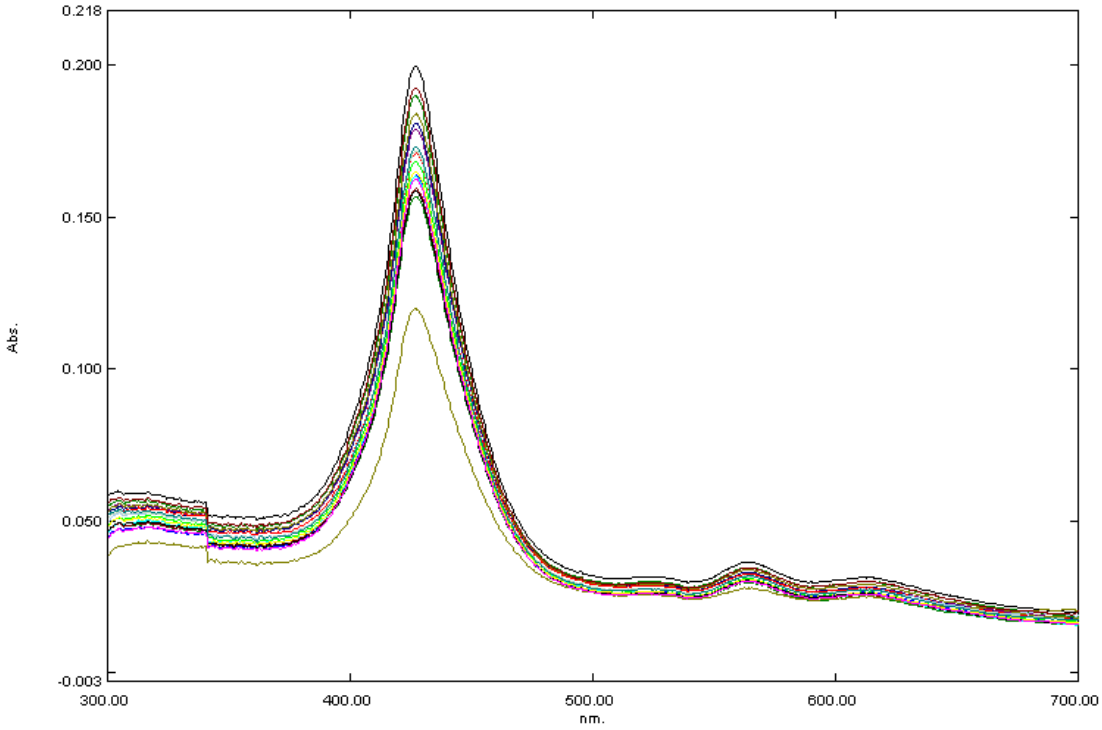
Σχήμα IV.3: *Φάσματα απορρόφησης ακτινοβολίας UV-Vis, διαλύματων της πορφυρίνης MeC4pCisH με RNA, σε διάφορες τιμές του λόγου 1/r$_0$.*



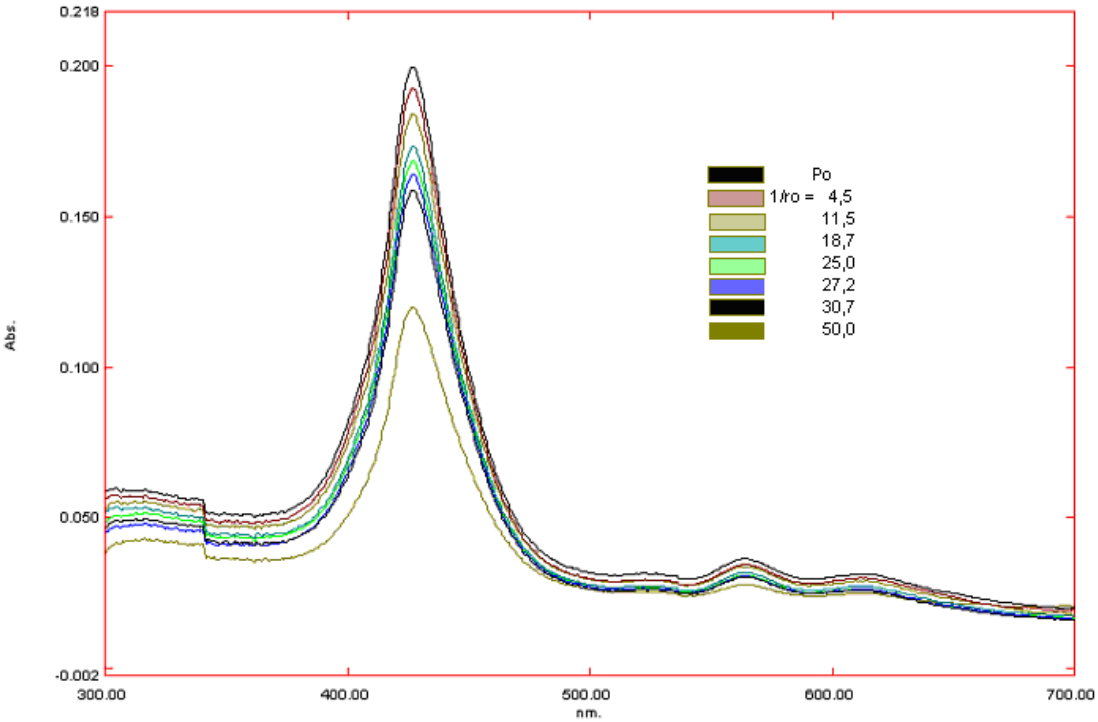
Σχήμα IV.4: *Φάσματα απορρόφησης ακτινοβολίας UV-Vis, διαλύματων της πορφυρίνης MeC4pCisH με RNA, σε επιλεγμένες τιμές του λόγου $1/r_0$.*

		MeC4pCISH	
$1/r_o$	***$+P_x$ (μl)***	***Δλ***	H_{app}%
0	P_O	-	-
4,54	100	1,5	-6,06
11,53	300	2,96	-12,12
25	1000	2,96	-21,12
30,77	1600	4,4	-23,23
32,14	1800	4,4	-26,26
50	P_X	5,19	-40,40

Πίνακας IV.2: *Αποτελέσματα των μετρήσεων της μελέτης αλληλεπίδρασης της πορφυρίνης MeC4pCisH με RNA με φασματοσκοπία UV-Vis.*



Σχήμα IV.5: *Φάσματα απορρόφησης ακτινοβολίας UV-Vis, διαλύματων της πορφυρίνης MeC4pTRH με RNA, σε διάφορες τιμές του λόγου $1/r_0$.*



Σχήμα IV.6: *Φάσματα απορρόφησης ακτινοβολίας UV-Vis, διαλύματων της πορφυρίνης MeC4pTRH με RNA, σε επιλεγμένες τιμές του λόγου $1/r_0$.*

		MeC4pTRH	
1/r$_o$	***+P$_x$ (ml)***	***Δλ***	H$_{app}$%
0	0	-	-
4,54	100	0	-3,5
11,53	300	0	-8
18,75	600	0,62	-13
25	1000	0	-15,5
27,27	1200	0,61	-18
30,77	1600	0	-20,5
50	P$_x$	0,61	-40

Πίνακας IV.3: *Αποτελέσματα των μετρήσεων της μελέτης αλληλεπίδρασης της πορφυρίνης MeC4pTRH με RNA με φασματοσκοπία UV-Vis.*

4.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για την πορφυρίνη MeC4pMH παρατηρείται μια έντονη βαθυχρωμία, της τάξεως των 17 nm, ενώ παράλληλα παρατηρείται και μια μεγάλη υποχρωμία έως και 34,5 %. Παρατηρείται επίσης ένα ισοσβεστικό σημείο κατά τη διάρκεια προσθήκης RNA στο διάλυμα της πορφυρίνης. Το ισοσβεστικό σημείο είναι μία απόδειξη πως η δέσμευση της πορφυρίνης στο RNA γίνεται σε ένα στάδιο. Επομένως οι παραπάνω παρατηρήσεις αρκούν για να είμαστε βέβαιοι για τη δέσμευση της πορφυρίνης στο RNA.

Επίσης για την πορφυρίνη MeC4pCisH η βαθυχρωμία φτάνει το 5,19 nm ενώ η υποχρωμία το 40,4%. Τέλος για την πορφυρίνη MeC4pTRH παρατηρείται αμυδρή βαθυχρωμία, ενώ και σ'αυτήν την περίπτωση η υποχρωμία φτάνει το 40%. Στις δύο τελευταίες πορφυρίνες δεν παρατηρήθηκε ισοσβεστικό σημείο. Παρ'όλα αυτά οι παρατηρούμενες βαθυχρωμίες και υποχρωμίες είναι μια πρώτη ένδειξη για τη δέσμευση των πορφυρινών στο μόριο του νουκλεϊνικού οξέος.

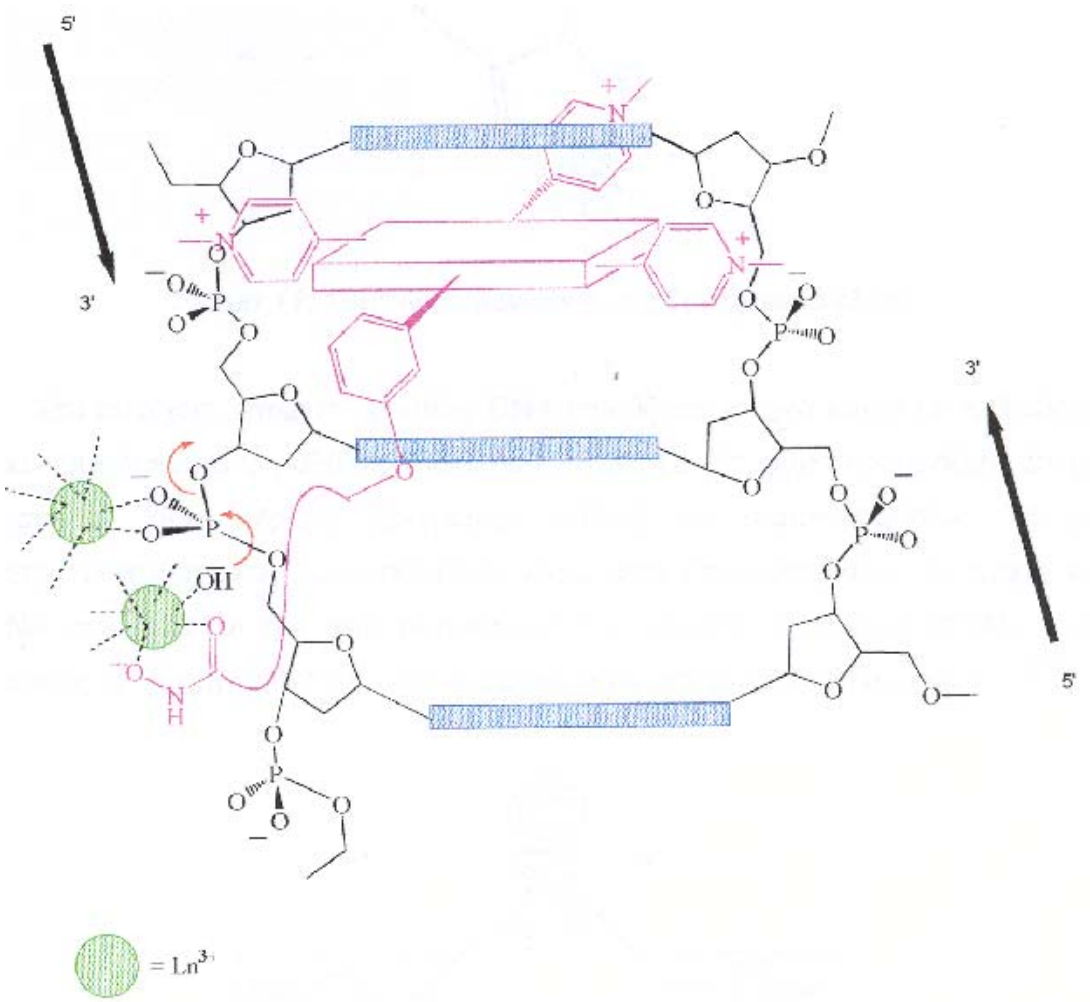
Γενικά αυτή η μέθοδος αποτελεί ένα πρώτο στάδιο ελέγχου του τρόπου αλληλεπίδρασης των προς μελέτη πορφυρινών με το RNA . Οι αρχικές ενδείξεις που

λαμβάνονται στο βήμα αυτό για τις συγκεκριμένες πορφυρίνες υποστηρίζονται στη συνέχεια σε πειράματα στα οποία λαμβάνει χώρα επώασή τους με ολικό RNA, για την αποσαφήνιση των ιδιοτήτων τους.

4.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΣΙΔΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΡΦΥΡΙΝΩΝ

Α. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΗΣ ΤΜΗΣΗΣ ΤΟΥ RNA

Ο μηχανισμός, ο οποίος προτείνεται για την υδρολυτική τμήση του RNA από τις συντιθέμενες πορφυρίνες, παρουσία ιόντων λανθανιδών παρουσιάζεται στο σχήμα IV.7



Σχήμα IV.7: *Προτεινόμενος μηχανισμός για την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του RNA από τα πορφυρινικά παράγωγα, παρουσία ιόντων λανθανιδών.*

Σύμφωνα με τον παραπάνω μηχανισμό, τα οξυγόνα του φωσφοδιεστερικού δεσμού του RNA συναγωνίζονται με τα οξυγόνα της ομάδας του υδροξαμικού οξέος της πορφυρίνης για τον σχηματισμό δεσμού με τα ιόντα των λανθανιδών. Ένα λανθανιδικό ιόν που είναι συναρμοσμένο με το υδροξαμικό οξύ θα μπορούσε να δράσει σαν βάση και να παρέχει υποκατεστημένα πυρηνόφιλα υδροξείδια, των οποίων η συγκέντρωση στις θέσεις αυτές εξαρτάται από το ποσοστό παρεμβολής της πορφυρίνης μεταξύ των ζευγών βάσεων του RNA. Ένα δεύτερο λανθανιδικό ιόν είναι δυνατόν να δράσει σαν οξύ κατά Lewis συνδεόμενο με το οξυγόνο του φωσφόρου, καθιστώντας έτσι το άτομο του φωσφόρου πιο ευάλωτο σε νουκλεόφιλη προσβολή από το υδροξείδιο. Κατ' αυτόν τον τρόπο, η συνεργατική δράση δύο λανθανιδικών ιόντων, που το ένα έχει το ρόλο του οξέος και το άλλο του βασικού καταλύτη, θα μπορούσε να οδηγήσει σε αποτελεσματική υδρολυτική τμήση του RNA. Η αρχή του προτεινόμενου μηχανισμού υποστηρίζεται και από άλλες μελέτες που αναφέρουν αξιοσημείωτη υδρολυτική δραστικότητα προς τους φωσφορικούς εστέρες με τη χρήση διμεταλλικών συστημάτων, μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει τη συνεργατική δράση ενεργοποιήσης από οξέα κατά Lewis και ενδομοριακής πυρηνόφιλης προσβολής από υδροξείδια .

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

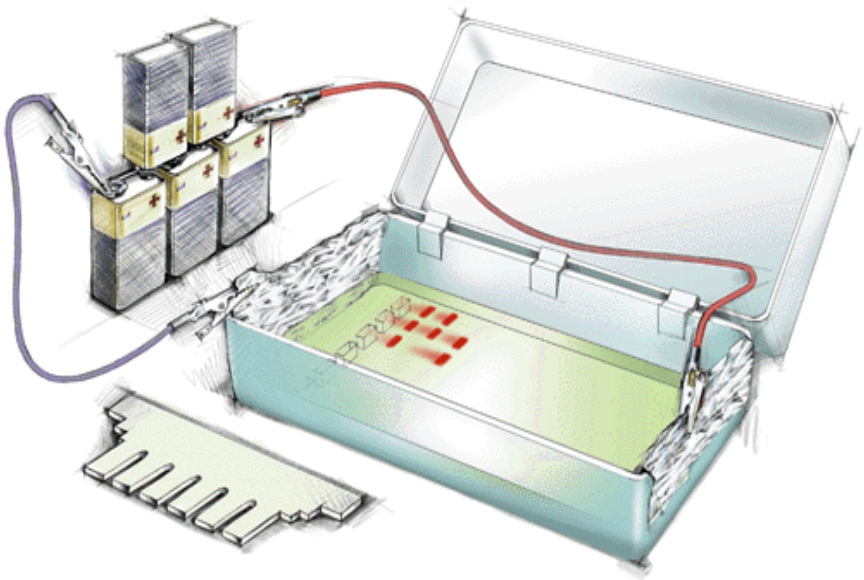
Η ηλεκτροφόρηση είναι η μελέτη κινητικότητας φορτισμένων μορίων σε ηλεκτρικό πεδίο. Η τεχνική αυτή, η οποία χρησιμοποιείται για βιοχημικά πειράματα πάνω από 50 χρόνια, βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στον χαρακτηρισμό και την ανάλυση φορτισμένων βιολογικών πολυμερών. Η αποδήμηση των μορίων κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου επηρεάζεται από το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο και τη χημική σύσταση του μορίου.

Κατ' αυτόν τον τρόπο, η ηλεκτροφόρηση, η οποία αποτελεί σχετικά φτηνή και εύκολη τεχνική, έχει τη δυνατότητα ανάλυσης και καθαρισμού διάφορων τύπων βιομορίων, αλλά ιδιαίτερα πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων.

Οι νέες τεχνικές ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούν μήτρες από κορεσμένα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα (buffer) σαν υπόβαθρο στήριξης. Το προς ανάλυση δείγμα εφαρμόζεται στο μέσο με τη μορφή κηλίδας ή λεπτής ζώνης, εξού και ο όρος «ηλεκτροφόρηση ζώνης». Η έκταση της αποδήμησης των μορίων ρυθμίζεται από το

εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο και το «χαρακτήρα» του πήγματος, ο οποίος επιλέγεται ανάλογα με τις ανάγκες. Παρόλο που δεν είναι εύκολο να υποστηριχθεί μια ακριβής θεωρητική περιγραφή της κίνησης των μορίων κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης σε πήγμα, η ηλεκτροφόρηση ζώνης είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στον καθαρισμό και ανάλυση βιομορίων καθώς και στον προσδιορισμό του μοριακού τους μεγέθους.

Η τυπική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό RNA και DNA στο εύρος των 200 με 50.000 ζευγών βάσεων (50 kb) είναι η ηλεκτροφόρηση με πήγμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές γαλακτοπυρανοζικών παραγώγων, το οποίο εξάγεται από θαλάσσια φύκη. Τα πήγματα παρασκευάζονται διαλύοντας αγαρόζη σε buffer ηλεκτροφόρησης, υπό θέρμανση. Κατά την ψύξη του μίγματος του πήγματος στους 50° C, το διάλυμα αγαρόζης αποχύνεται σε ειδικό γυάλινο ή πλαστικό καλούπι. Ιδιαίτερα πήγματα με λιγότερο από 0.5 % αγαρόζη είναι αρκετά εύθραυστα και χρησιμοποιούνται μόνο σε οριζόντια διάταξη. Το προς ανάλυση δείγμα εισάγεται σε μία από τις κοιλότητες οι οποίες σχηματίζονται από την τοποθέτηση ειδικής χτένας κατά την πήξη του πήγματος. Έπειτα μεταφέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, ένας τύπος της οποίας παρουσιάζεται στο σχήμα IV.8, όπου εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα ώσπου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός.



Σχήμα IV.8: *Συσκευή ηλεκτροφόρησης.*

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε του μοντέλου: agarosegel, electrophoresis system DNA, Pocket Bloc-UV Biozym diagnostic, Germany.

Πραγματοποιήθηκε η μελέτη της νουκλεοσιδικής δράσης των πορφυρινών MeC4pCISH, MeC4pTRAH και MeC4pMH χωριστά για πέντε διαφορετικές λανθανίδες (La, Eu, Sm, Pr, Lu), σε αναλογία [Πορφυρίνη]/[Ln]=1/2. Χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA τύπου VI (torula yeast) με αναλογία $1/r_o = 1$.
Για να παρασκευαστούν τα διαλύματα που θα λάβουν μέρος στην ηλεκτροφόρηση, απαιτείται η παρασκευή των εξής διαλυμάτων:

R-Nase Free νερό (DEPC):

Με 500 ml απιονισμένο νερό προστέθηκε 1ml diethyl pyrrocarbonate (DEPC).
(0,2% v/v). Το διάλυμα παρέμεινε υπό ανάδευση για μία ώρα στους 37° C.

Sample Buffer 10x:

Υδατικό (R-Nase Free) διάλυμα :
15% v/v Ficoll
0,25% w/v Xylene
0,25% w/v Blue Bromophenol

Για 1 ml διαλύματος 10x, αναμίχθηκαν 150 μl ficoll, 850 μl H_2O DEPC, 2,5 mg xylene και 2,5 mg blue bromophenol.
Λόγω του ότι στο τελικό gel της ηλεκτροφόρησης σε κάποια δείγματα το μπλε χρώμα υπερκάλυπτε τις μπάντες των δειγμάτων μας, στο sample buffer δεν προστέθηκε το blue bromophenol.

Διάλυμα HCl Tris 40 mM pH= 8.0.

Το διάλυμα αυτό θα χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστικό για τα τελικά διαλύματα.

TBE:

Παρασκευάστηκαν 50 ml TBE 10x :

890 mM Tris-Base (5,390 g)
890 mM Boric Acid (2,751 g)
20 mM EDTA (0,292 g)
Τελικά χρησιμοποιήθηκε TBE 1x κατόπιν καταλλήλων αραιώσεων.

Διάλυμα αγαρόζης 1% w/v.

Σε 100 ml TBE 1x προστίθεται 1 g αγαρόζη και 50 μg Ethidium Bromide. Το διάλυμα βράζει πολύ καλά για να διαλυθεί η αγαρόζη (πρέπει το διάλυμα να είναι απολύτως διαυγές) και έπειτα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Αφού το gel πήξει στη συσκευή, προστίθενται 60 ml TBE 1x στη συσκευή και αφαιρούνται τα χτενάκια. Έπειτα φορτώνονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης τα δείγματα προς ανάλυση. Η όλη διαδικασία γίνεται με πολλή προσοχή γιατί το Ethidium Bromide είναι καρκινογόνο. Χρησιμοποιούνται πάντα διπλά γάντια και τα σκεύη που έχουν έρθει σε επαφή με αυτό πλένονται στο τέλος με ειδικό τρόπο.

Παρασκευή διαλυμάτων της ηλεκτροφόρησης:

Στο κάθε πηγαδάκι θα πρέπει να υπάρχουν περίπου 1650 ng RNA(τα επιτρεπτά όρια είναι 700 έως 2000 ng) ώστε οι ζώνες που εμφανίζονται έπειτα από τη χρώση του πήγματος να είναι ικανοποιητικά διακριτές. Η χωρητικότητα του είναι περίπου 10 μl ,επομένως η συγκέντρωση του RNA θα πρέπει να είναι της τάξεως των $10^{-3}/2$ M. (Οι υπολογισμοί γίνονται δεχόμενοι το $Mr_{(RNA)}$ = 330).Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το HCl Tris 40 mM.

Για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση: [RNA] = [Por]= [Λανθ]/2 = $10^{-3}/2$ M δεδομένου ότι θα γίνουν αραιώσεις και αναμίξεις ,παρασκευάζονται αρχικά διαλύματα εξαπλάσιας συγκέντρωσης.

Αρχικά λοιπόν παρασκευάστηκαν :
Διάλυμα Α:0,5 ml διαλύματος πορφυρίνης $3 \cdot 10^{-3}$ M
Διάλυμα Β:0,5 ml διαλύματος RNA : $3 \cdot 10^{-3}$ M

Διάλυμα Γ: 0,5 ml διαλύματος λανθανίδας : $6 \cdot 10^{-3}$ M (συνολικά παρασκευάζονται πέντε διαλύματα Γ, ένα για κάθε λανθανίδα).

Το διάλυμα Β παραμένει σε πάγο καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος για να αποφευχθεί η αποδόμηση του RNA.

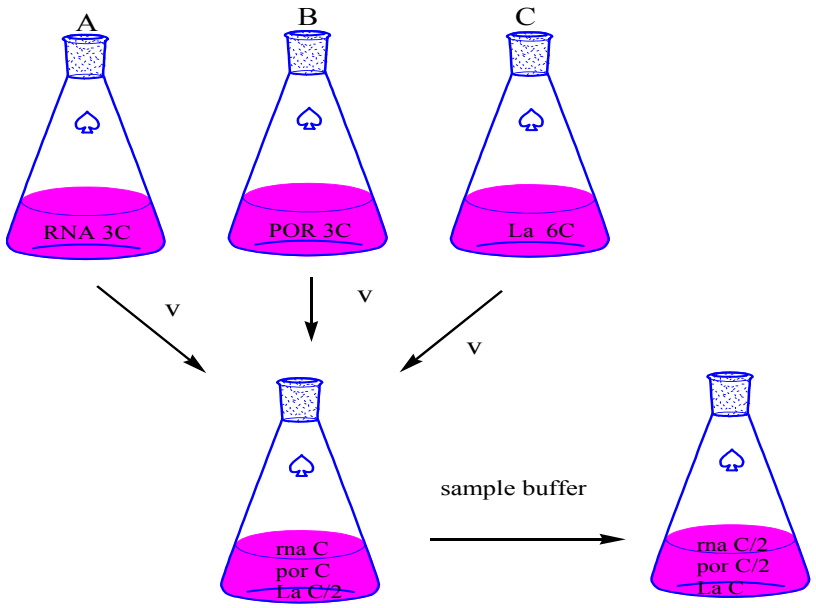
Από το διάλυμα Β λαμβάνονται 50 μl και αραιώνονται μέχρις τελικού όγκου 150 μl με το HCl Tris ούτως ώστε να επιτευχθεί [RNA]= 10^{-3} M

Από το διάλυμα Α λαμβάνονται 50 μl τα οποία αναμιγνύονται με 50 μl από το διάλυμα Β και αραιώνονται μέχρις τελικού όγκου 150 μl με HCl Tris.
Τα δύο παραπάνω διαλύματα χρησιμοποιούνται ως control.

Έπειτα αναμιγνύονται 50 μl από κάθε διάλυμα(Α, Β και Γ) παρασκευάζοντας έτσι 150 μl διαλύματος όπου θα περιέχει και τις τρεις ουσίες μαζί με τις διπλάσιες συγκεντρώσεις από τις επιθυμητές τελικές (συνολικά πέντε τέτοια διαλύματα, ένα για κάθε λανθανίδα).
Συνολικά για κάθε πορφυρίνη παρασκευάστηκαν 7 διαλύματα στα οποία το RNA έχει ακριβώς την ίδια συγκέντρωση.

Τα παραπάνω διαλύματα είναι τα διαλύματα προς ανάλυση αλλά με τις διπλάσιες συγκεντρώσεις γιατί θα στο τέλος προστίθεται sample buffer σε αναλογία 1:1 με αποτέλεσμα οι τελικές συγκεντρώσεις να υποδιπλασιαστούν. Πριν την προσθήκη του sample buffer, τα διαλύματα παραμένουν για επώαση. Ο χρόνος επώασης ήταν αρχικά 2 ώρες και σε κάποια πειράματα 24 ώρες.
Από τα τελευταία επτά διαλύματα αναμιγνύονται 25 μl από το καθένα με 25 μl sample buffer, παρασκευάζοντας έτσι τα τελικά επτά διαλύματα από τα οποία τα 10 μl θα εισάγονται στο κατάλληλο πηγαδάκι. Παραθέτεται στο σχήμα IV. 9 η όλη πειραματική διαδικασία για να γίνεται καλύτερα αντιληπτή.

Για την παρασκευή των παραπάνω διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν σωληνάρια eppendorf μίας χρήσεως και πιπέτες Gilson ενώ όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν, όπως επίσης και ο χώρος του πειράματος ήταν πλήρως αποστειρωμένα.



Σχήμα IV.9: *Διαδικασία παρασκευής διαλυμάτων προς ηλεκτροφόρηση.*

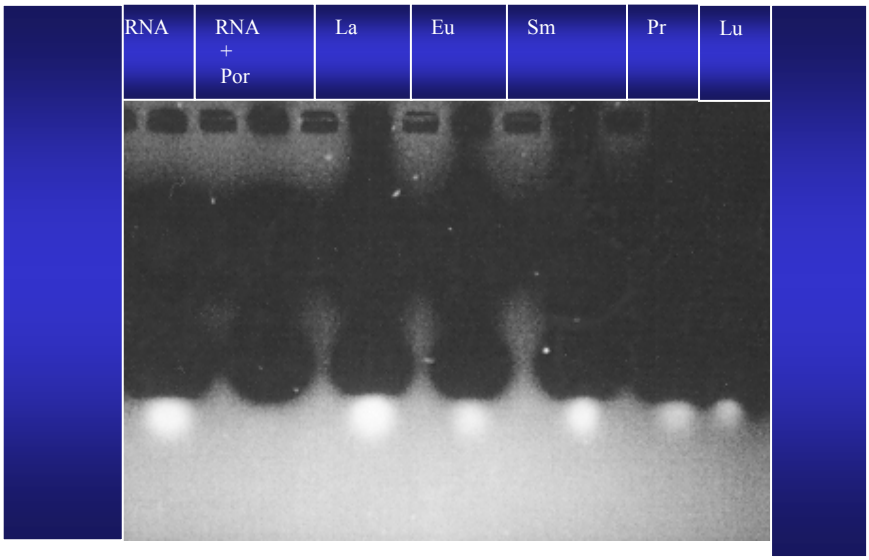
Τα επόμενα στάδια είναι η ηλεκτροφόρηση του RNA. Αφού τα δείγματα τοποθετηθούν στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, εφαρμόζεται δυναμικό 50 volt. Η βέλτιστη διάρκεια ηλεκρτοφορητικής πορείας κατόπιν πολλών δοκιμών κρίθηκε η μία ώρα.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ –ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

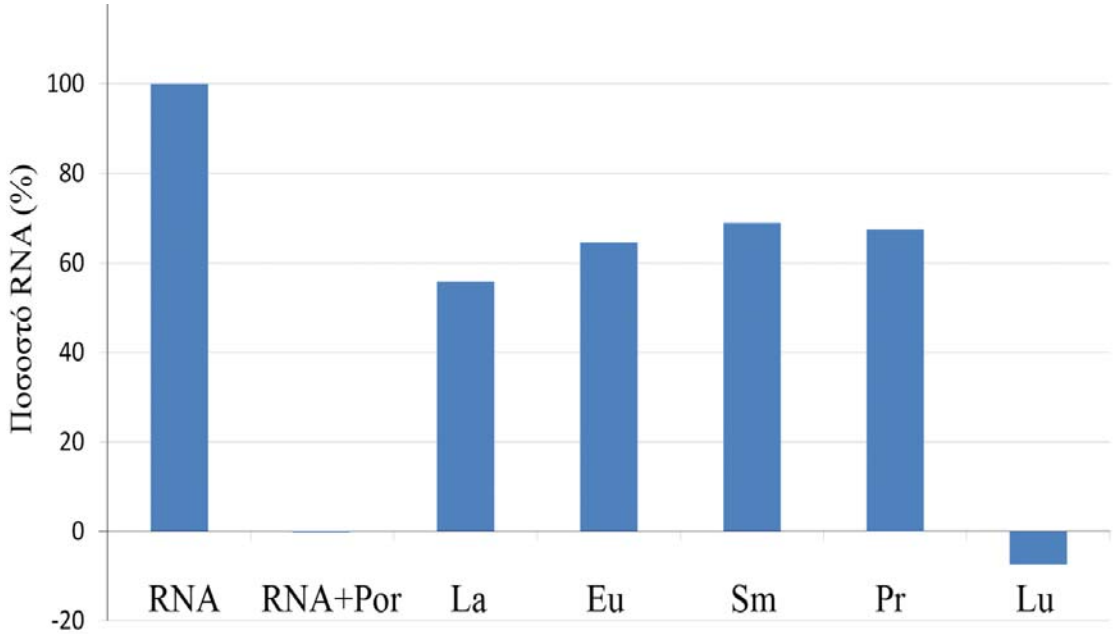
Στα παρακάτω σχήματα και πίνακες παρουσιάζονται οι ηλεκτροφορητικές πορείες των δειγμάτων RNA που επωάστηκαν για 2 ώρες με τις προς μελέτη πορφυρίνες, παρουσία πέντε διαφορετικών λανθανίδων. Στον πρώτο διάδρομο του σχήματος παρουσιάζονται οι ζώνες δείγματος RNA που ακολούθησε την ίδια ακριβώς πορεία επεξεργασίας με τα υπόλοιπα δείγματα, χωρίς όμως να προστεθεί σε αυτό κάποιο λανθανιδικό ιόν. Στο δεύτερο διάδρομο παρουσιάζονται οι ζώνες δείγματος RNA παρουσία πορφυρίνης χωρίς να προστεθεί επίσης λανθανιδικό ιόν. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιούνται σαν πρότυπα για τον προσδιορισμό της πραγματικής ποσότητας RNA.

Η ανάλυση των ζωνών RNA που εμφανίστηκαν έπειτα από την επεξεργασία του πήγματος της ηλεκτροφόρησης έγινε με τη χρήση ειδικού προγράμματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, το οποίο επιτρέπει την ολοκλήρωση των ζωνών RNA ανάλογα με το εύρος, το ύψος και την ένταση του φθορισμού τους. Η ολοκλήρωση των ζωνών επιτρέπει τον υπολογισμό του ποσοστού RNA που κατέχει κάθε μορφή και περαιτέρω στον προσδιορισμό της μείωσης της μορφής του RNA, η οποία οφείλεται στην υδρολυτική τμήση που έλαβε χώρα κατά την επώαση της με πορφυρινικό διάλυμα παρουσία ιόντων λανθανιδών. Το ποσοστό της μείωσης της μορφής RNA υπολογίζεται σε σχέση με τη ζώνη RNA του πρότυπου διαλύματος που αναλύθηκε χωρίς την προσθήκη λανθανιδικού ιόντος.

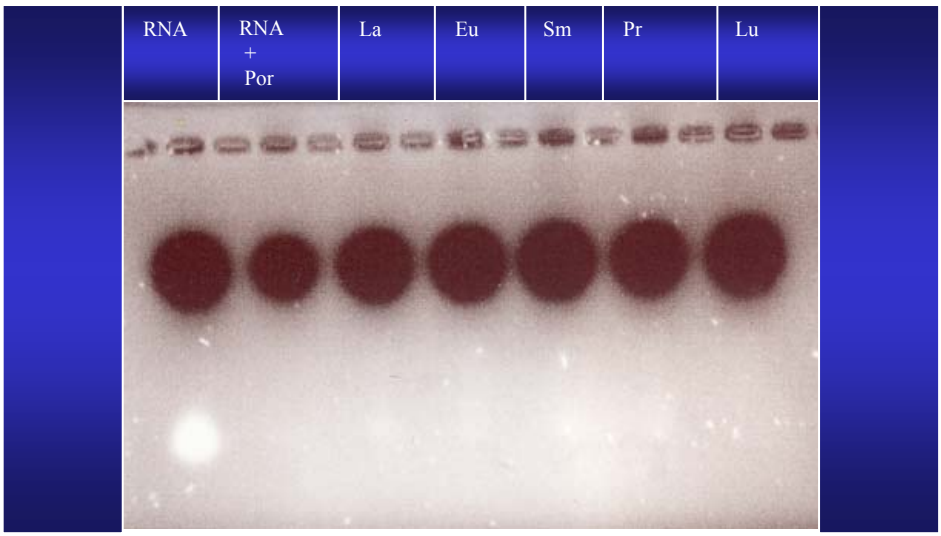
Στα παρακάτω σχήματα IV.10, IV.11, IV.12, IV.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης σε πήγμα αγαρόζης RNA που επωάστηκε για 2 ή 24 ώρες με τις πορφυρίνες: MeC4pCISH, MeC4pTRH και MeC4pMH παρουσία πέντε διαφορετικών λανθανίδων (La, Eu, Sm, Pr, Lu), σε αναλογία [Πορφυρίνη]/[Ln]=1/2. Στα σχεδιαγράμματα IV.4 , IV.5, IV6 , IV.7.παρατίθεται το ποσοστό εμφάνισης της ποσότητας του RNA με την παρουσία των αντίστοιχων πορφυρινικών διαλυμάτων.



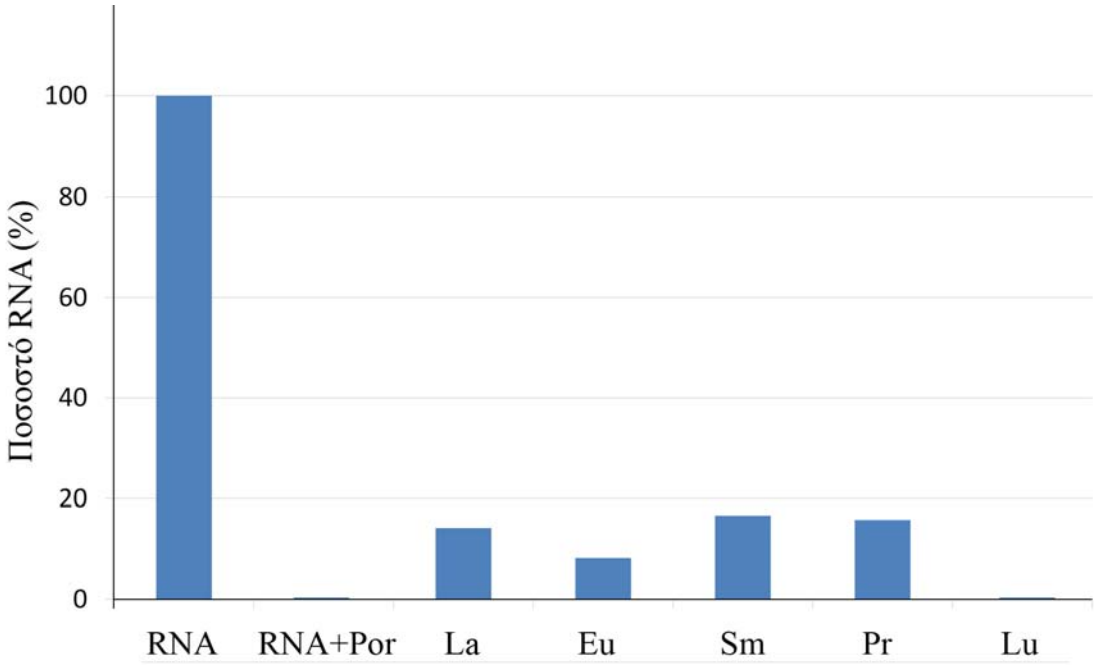
Σχήμα IV.10: *Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης, RNA που επωάστηκε για 2 ώρες με την πορφυρίνη MeC4pMH, παρουσία των λανθανίδων La, Eu, Sm, Pr, Lu, σε αναλογίες [Πορφυρίνη]/[Ln]=1/2, και παρουσία βρωμοφαίνόλης στο sample buffer.*



Πίνακας IV. 4 : *Συγκριτικά αποτελέσματα της μείωσης της έντασης της ζώνης του RNA, με προσθήκη διαλυμάτων MeC4pMH παρουσία πέντε διαφορετικών λανθανιδικών ιόντων.*



Σχήμα IV.11 : *Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης, RNA που επωάστηκε για 24 ώρες με την πορφυρίνη MeC4pMH, παρουσία των λανθανίδων La, Eu, Sm, Pr, Lu, σε αναλογίες [Πορφυρίνη]/[Ln]=1/2, και απουσία βρωμοφαίνόλης στο sample buffer.*

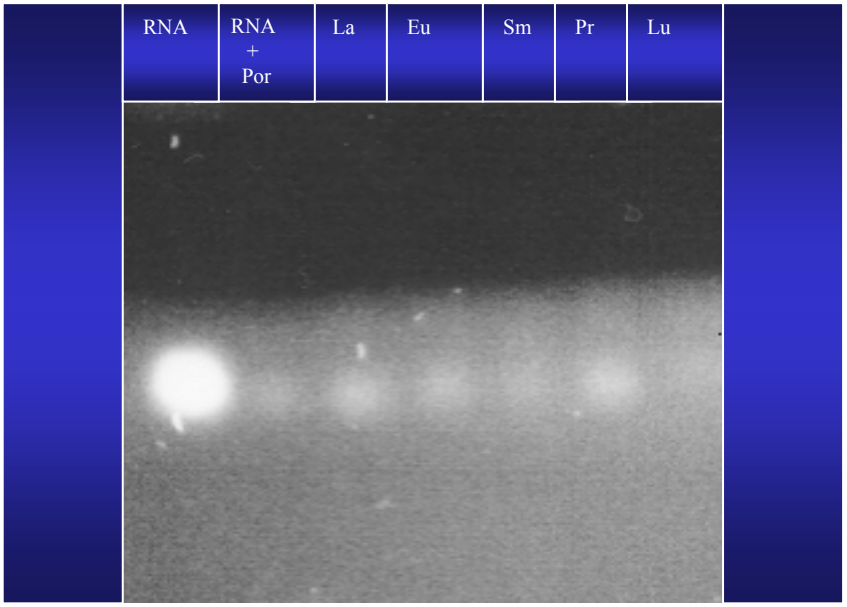


Σχεδιάγραμμα IV. 5: *Συγκριτικά αποτελέσματα της μείωσης της έντασης της ζώνης του RNA με την προσθήκη διαλυμάτων MeC4pMH και επώαση για 24 ώρες παρουσία πέντε διαφορετικών λανθανιδικών ιόντων.*

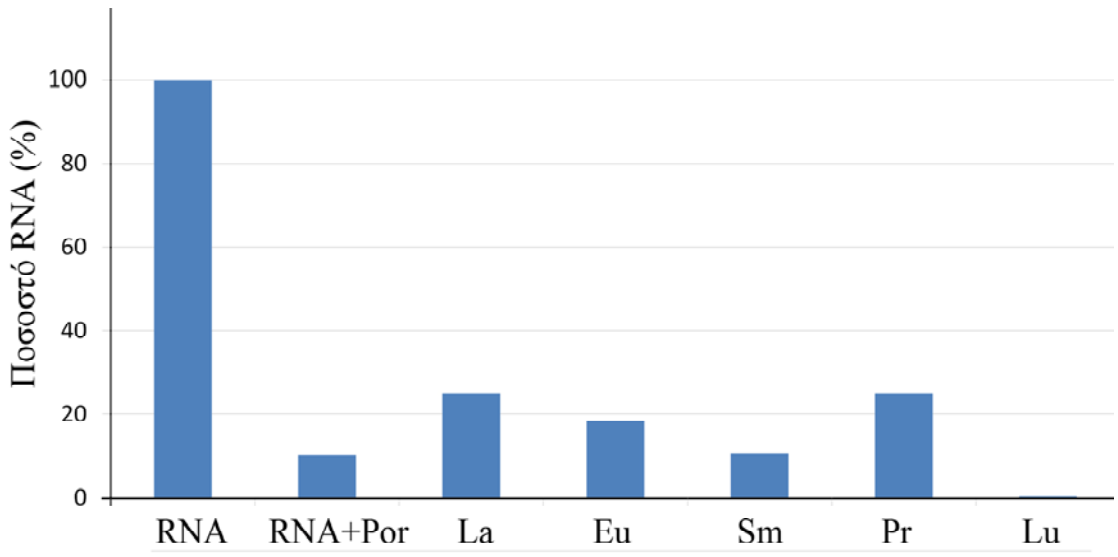
Όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα, η MeC4pMH παρουσιάζει νουκλεοσιδική δράση χωρίς την παρουσία λανθανιδικών ιόντων, η οποία εκφράζεται από την πλήρη απουσία μορφής του RNA . Η παρουσία στο διάλυμα λανθανιδικών ιόντων, μείωσε την ένταση της μορφής του RNA χωρίς όμως να επιτευχθεί απουσία αυτού. Εξαίρεση αποτελεί το λουτέτσιο όπου η παρουσία του ενίσχυσε την τμήση σε ποσοστό 100% σε σχέση με τα υπόλοιπα λανθανιδικά ιόντα. Δεύτερο στη σειρά έρχεται το λανθάνιο, και έπειτα το ευρώπιο. (σχ. IV.10 ,πίνακας IV.4)

Επίσης σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε κατά την επώαση των διαλυμάτων για 24 ώρες συγκριτικά με αυτή των 2 ωρών. Τα ποσοστά εμφάνισης της μορφής του RNA μειώθηκαν κατά πολύ, επομένως βγαίνει το συμπέρασμα ότι η τμήση δεν γίνεται στιγμιαία αλλά απαιτείται συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Επίσης αυτό που είναι αξιοσημείωτο είναι η μείωση της κορυφής του διαλύματος που περιέχει ευρώπιο η οποία ήταν αρχικά μικρότερη του διαλύματος του λανθάνιου αλλά μετά την πάροδο 24 ωρών έγινε αρκετά μεγαλύτερη. (σχήμα IV.11, πίνακας IV.5)

Γι'αυτό το λόγο τα πειράματα ηλεκτροφόρησης που ακολούθησαν για τα άλλα δύο πορφυρινικά παράγωγα πραγματοποιήθηκαν μετά από επώαση 24 ωρών των αντίστοιχων διαλυμάτων.



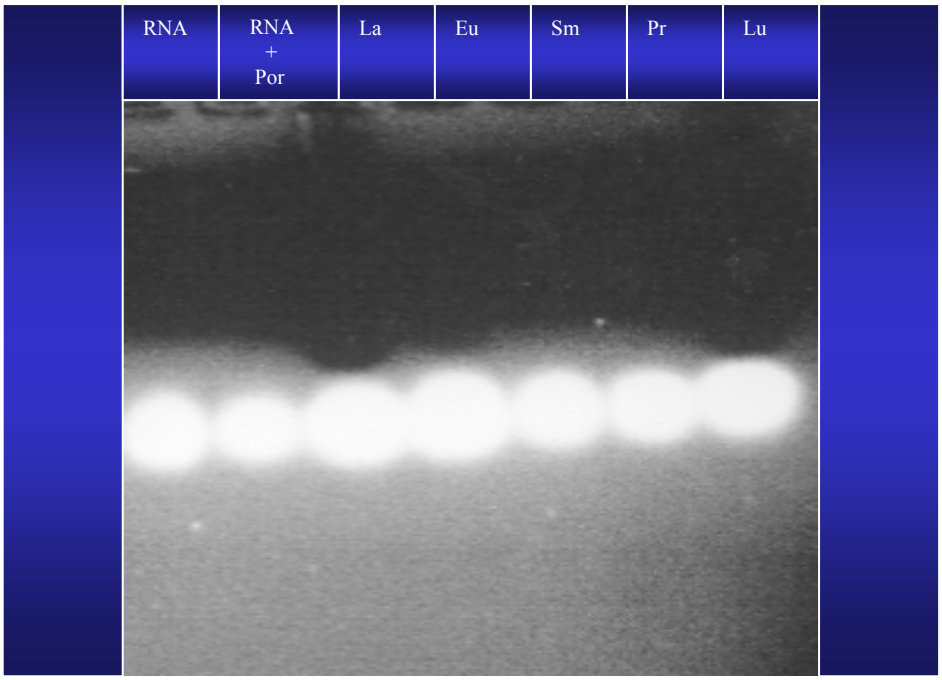
Σχήμα IV.12: *Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης, RNA που επωάστηκε για 24 ώρες με την πορφυρίνη MeC4pCisH, παρουσία των λανθανίδων La, Eu, Sm, Pr, Lu, σε αναλογίες [Πορφυρίνη]/[Ln]=1/2, και απουσία βρωμοφαίνόλης στο sample buffer.*



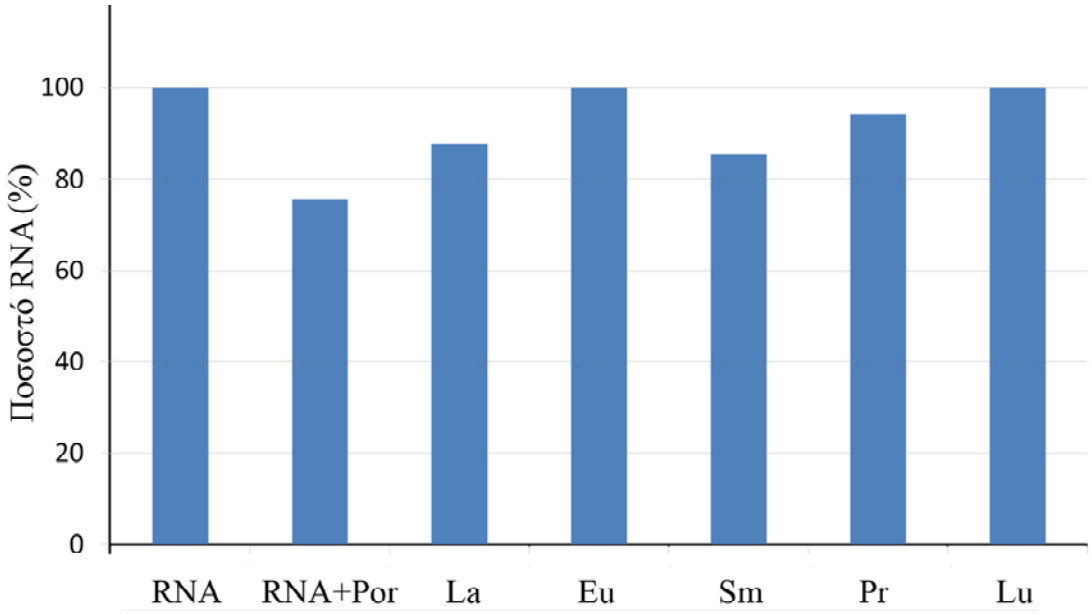
Σχεδιάγραμμα IV. 6: *Συγκριτικά αποτελέσματα της μείωσης της έντασης της ζώνης του RNA με την προσθήκη διαλυμάτων MeC4pCisH παρουσία πέντε διαφορετικών λανθανιδικών ιόντων.*

Παρατηρείται ότι η πορφυρίνη MeC4pCisH μείωσε το ποσοστό του RNA, όχι όμως στο 100%. Πλήρης απουσία RNA εμφανίζεται κατά την παρουσία ιόντων λουτέτσιου, όπου και πάλι βλέπουμε ότι ενισχύει τη νουκλεοσιδική δράση πολύ περισσότερο από τα υπόλοιπα λανθανιδικά ιόντα. Δεύτερο στη σειρά έρχεται το σαμάριο που όμως η παρουσία του δεν έπαιξε σημαντικό ρόλο, αφού επιτεύχθηκε παρόμοιο ποσοστό τμήσης με αυτό που προκάλεσε η πορφυρίνη χωρίς την παρουσία του.

Στην περίπτωση που πορφυρινικού παραγώγου MeC4pTRH, τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά. Η μεγαλύτερη μείωση που προκλήθηκε ήταν της τάξης του 25%, όταν σε αυτό προστέθηκε διάλυμα πορφυρίνης χωρίς την παρουσία λανθανιδών. Ακολουθεί η μείωση με τα ιόντα λανθανίου και σαμάριου, ενώ τα υπόλοιπα ιόντα δεν προκάλεσαν αισθητή αλλαγή στην ένταση του RNA.



Σχήμα IV.13: *Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης, RNA που επωάστηκε για 24 ώρες με την πορφυρίνη MeC4pTRH, παρουσία των λανθανίδων La, Eu, Sm, Pr, Lu, σε αναλογίες [Πορφυρίνη]/[Ln]=1/2, και απουσία βρωμοφαίνόλης στο sample buffer.*



Σχεδιάγραμμα IV. 7: *Συγκριτικά αποτελέσματα της μείωσης της έντασης της ζώνης του RNA με την προσθήκη διαλυμάτων MeC4pTRH, παρουσία πέντε διαφορετικών λανθανιδικών ιόντων.*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[1] D. Dolphin, *"The Porphyrins"*, **1978**, Academic Press, Vol. 1-8
[2] A. Jasat, D.Dolphin, *Chem.Rev.*, **1997**, 97, 2267
[3] D. Dolphin, *The Porphyrins,* **1978**, Academic Press, Vol. 1
[4] *"Porphyrins and Metalloporphyrins"*, Elsevier Scientific Publishing Company, **1975**, 2-28
[5] J. A. S. Cavaleiro, A. M. d' A. Rocha Consalves, G. W. Kenner, K. M .Smith, *J. Chem. Soc. Trans. I*, **1973**, 2471
[6] F. Hoppe-Seyler, *Phys. Chem.*, **1987-1988**, 1, 121
[7] A. H. Corwin, *Organic Chemistry*, **1943**, Vol. II, 1272, Willey, New York
[8] IUPAC, *Nomenclature Of Organic Chemistry*, **1979**, Pergamon
[9] G. P. Moss, *"Nomenclature of tetrapyrroles"*, *Pure Appl. Chem.,* **1987**, 59, 779.
[10] J. J. R. Frausto da Silva, R. J. P. Williams, *"The Biological Chemistry of Elements"*, **1998**, Oxford University Press, New York
[11] R. J. Fiel, J. C. Howard, E. H. Mark, N. Datta Gupta, *Nucleic Acids Res.*, **1979**, 6, 3093
[12] J. C. Wang, *J. Mol. Biol.*, **1974**, 89, 783
[13] E. J. Gibbs, R. F. Pasternack, *Seminars in Hematology*, **1989**, 2, 77
[14] R. F. Pasternack, E. J. Gibbs, *"Metal Ions in Biological Systems"*, **1996**, A. Sigel and H. Sigel eds. Marcel Decker, Inc., New York, 33, 367
[15] M. J. Carvlin, E. Mark, R. J. Fiel, J. C. Howard, *Nucleic Acids Res.*, **1983**, 11, 614
[16] N. E. Mukundan, G. Pethö, D. W. Dixon, M. S. Kim, L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.*, **1994**, 33, 4676
[17] E. J. Gibbs, Tinoco Jr., M. F. Maestre, P. A. Ellinas, R. F. Pasternack, *Biochem. Biophys. Res. Chem. Comm.*, **1988**. 24, 350
[18] M. A. Sari, J. P. Battioni, D. Dupre, D. Mansuy, J. B. Le Pecq, *Biochem.*, **1990**, 29, 4205.
[19] C. Verchere-Beaur, M. Perre-Fauvet, E. Tarnaud, G. Anneheim-Herbelin, N. Bone, A. Gaudemer, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 13589.
[20] W. Lossen, *Ann. Chem.*, **1869**, 150, 314
[21] Sandler & Karo, *"Organic Functional Group Preparation (III)"*, **1972**, Academic Press, NY and London, 406-411.
[22] O. Exner, *Dan. Tidsskr. Farm.*, **1968**, 42, 145.
[23] *Chem. Abstr.*, **1962**, 56, 30N
[24] *Chem. Abstr.*, **1962**, 56, 52N.
[25] P. A. S. Smith, *"The Chemistry of Open Chain Organic Nitrogen Compounds"*, **1966**, Vol. 2, p.68, Benjamin, New York.
[26] W.Lossen, *Ann. Chem.*, **1895**, 281, 176.
[27] M. A. Stolberg, W. A. Mosher, T. Wagner-Jauregg, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 2615.
[28] J. B. Summers, B. P. Gunn, H. Mazdiyasni, A. M. Goetze, P. R. Young, J. B. Bouska, R. D. Dyer, D. W. Brooks, G. W. Carter, *Med. Chem.*, **1978**, 30, 2121.
[29] S. X. Peng, M. J. Strojnowski, J. K. Hu, B. J. Smith, T. H. Eihold, K. R. Wehnmeyer, S. Pikul, N. J. Almstead, *J. of Chromatogr. B*, **1999**, 724, 181.
[30] *"Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids"*, **1982**, ed. H. Kehl, Karger, New York.
[31] E. Farkas, D. A. Brown, R. Cittaro, W. K. Glass, *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, **1993**, 3903
[32] D. A. Brown, R. A. Coogan, N. J. Fitzpatrick, W. K. Glas, D. E. Abukshima, L. Shiels, M. Ahlgren, K. Smolander, T. T. Pakkanen, T. A. Pakkanen, M. Perakyla, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1996**, 2673
[33] A. J. Stemmler, J. W. Kampf, M. L. Kirk, V. L. Pecoraro, *J. Am.Chem. Soc.*, **1995**, 117, 6368
[34] D. A. Brown, A.L. Roche, T. T. Pakkanen, T. A. Pakkanen, K. Smolander, *J. Chem. Soc. Commun.*, **1982**, 676
[35] M. Julien-Pouzol, S. Jaulmes, P. Laruelle, S. Carvalho, E. D. Paniago, *Acta Crystallogr., Sect. C*, **1985**, 41, 712
[36] C. O. B. de Miranda-Pinto, E. B. Paniago, S. Carvalho, M. Tabak, A. P. Mascarenhas, *Inorg. Chim. Acta*, **1987**, 137, 145

[37] T. T. Pakkanen, T. A. Pakkanen, K. Smolander, D. A. Brown, W. K. Glas, A. L. Roche, *J. Mol. Struct.*, **1987**, 162, 313.
[38] T. Glowiak, B. Kurzak, *J, Crystallogr. Spectrosc. Res.*, **1992**, 22, 341
[39] M. S. Lah, V. L. Pecoraro, *Comments Inorg. Chem.*, **1990**, 11, 59
[40] ″ B. Chatterjee, *Coord. Chem. Rev.*, **1978**, 26, 281
[41] G. M. Steinberg, R. Swidler, *J. Org. Chem.*, **1965**, 30, 2362
[42] F. A. Kuehl, Jr., F. J. Wolf, N. R. Trenner, R. L. Peck, R. P. Buhs, E. Howe, I. Putter, B. D. Hunnewell, R. Ormond, G. Downing, J, E. Lyons, E. Newstead, L. Chaiet, K. Folkers, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 2344
[43] T. Emery, J. B. Neilands, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 3658
[44] B.E. Hackley, Jr., R. Plapinger, M. Stolberg, T. Wagner-Jauregg, *J. Amer. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 3651
[45] H. L. Yale, *Chem. Rev.*, **1943**, 33, 209
[46] F. Mathis, *Sci. Math. Sci. Phys.*, **1961**, 25, 125
[47] B. Kurzak, H. Kozlowski, E. Farkas, *Coord. Chem. Rev.*, **1992**, 114, 169.
[48] J.B. Neilands, *Science*, **1967**, 156, 1443.
[49] R. J. Bergeron, *Chem. Rev.*, **1984**, 84, 587.
[50] K. N. Raymond, *Coord. Chem. Rev.*, **1990**, 105, 135.
[51] R. J. Bergeron, C. Z. Liu, J. S. McManis, M. X. B. Xia, S. E. Algee, J. Weigand, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 1411.
[52] P. Hoffmann, J. B. Doucet, W. Li, L. Vergnes, S. Labidalle, *J. Chem. Research (S)*, **1997**, 218.
[53] M. J. Miller, *Chem. Rev.*, **1989**, 89, 1563.
[54] *"Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths"*, **1979**, K. A. Geschneider Jr and Le Roy Eyring, North-Holland Publishing Company.
[55] F. A. Cotton, G. Wilkinson, "*Advanced Inorganic Chemistry*", **1996**, Sixth Edition, Willey & Sun, New York.
[56] J. E. Huheey, *Ανόργανη Χημεία*, **1993**, Εκδόσεις «ΙΩΝ».
[57] R. B. Hesley, K. Jones, *Inorganic Chemistry*, **1976**, New York.
[58] Γ. Ε. Μανουσάκης, «*Γενική και Ανόργανη Χημεία*», **1981**, Εκδ. Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη.
[59] B. Chatterjee, *Coord. Chem. Rev.*, **1978**, 26, 281.
[60] K. Bhatt, Y. K. Agrawal, *Synth. Inorg. Met.-Org. Chem.*, **1972**, 175.
[61] E. Galdecka, Z. Galdecki, P. Gawryszewska, J. Legendziemicz, *New. J. Chem.*, **1998**, 9, 941.
[62] D. Parker, J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1996**, 3613.
[63] J. C. G. Bunzli, "*Lanthanides Probes in Life, Chemical and Earth Sciences*", **1989**, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands
[64] R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, **1987**. 87. 901
[65] S. Aime, M. Botta. D. Parker, J. A. G. Williams, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1996**, 17.
[66] S. H. Koenig, R. D. Brown. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **1990**, 22, 487.
[67] K. Kumar, M. F. Tweedle, *Pure Appl. Chem.*, **1993**, 65. 515.
[68] M. Shibasaki, H. Sasai, T. Arai, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1997**, 36, 1236.
[69] R. Wietzke, M. Mazzanti, J. M. Latour, J. Pecaut, P. Y. Cordier, C. Madic, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 6690.
[70] C. E. Mathieu, D. Parker, *Chem. Commun.*, **1999**, 1699
[71] C. Formoso, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1973**, 53, 1083
[72] Ι. Πλακατούρας, «*Βιοανόργανη Χημεία ΙΙ*», **1999**, ΕΠΕΑΕΚ Βιοανόργανης Χημείας, Ιωάννινα.
[73] H. Gries, H. Miklautz, *Physiol. Chemi. Phys. Medl. NMR*, **1984**, 16, 105
[74] K. Wang, R. Li, Y. Cheng, B. Zhu, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 190-192, 297.
[75] *Βικιπαιδεία* , Νουκλεϊνικά οξέα- Ιστορική ανασκόπηση.
[76] «*Εισαγωγή στη Βιοχημεία*» Ι.Γ.Γεωργάτσου,**2001**, Εκδ.Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη.
[77] R.H.Garett, C.M.Grisham-*Biochemistry*, Chapter II.
[78] L.Stryer « *Βιοχημεία*» ,**1995**, Τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
[79] J.A.Cowan, ''*Inorganic Biochemistry an Introduction*'', **1993**, VCH Publishers Inc.
[80] *J.Biochem.*118 , 665-670 (**1995**).
[81] *Inorg.Chem.***1997** , 36 , 1676-1673.
[82] *Biochemistry* **2002** , 41, 13059-13066.

[83] C. Baily, N. Helbecque, J. P. Henichart, P. Colson, C. Houssier, K. E. Rao, R. G. Shea, J. W. Lown, *J. Mol. Recognition*, **1990**, 3, 26.
[84] M. J. Waring, C. Bailly, *J. Mol. Recognition*, **1994**, 7, 109.
[85] J. J. Toulme, C. Helene, *Gene*, **1988**, 72, 51.
[86] *J.Am.Chem.Soc.* 110 , No20, **1988** (6880-6882).
[87] *J.Am.Chem.Soc.* 113, No 15 , **1991** (5899-5901).
[88] *J.Am.Chem.Soc.* 112, No13 , **1990** (5357-5359).
[89] *Inorg.Chem.* **1993** , 32, 5899-5900.
[90] *J.Am.Chem.Soc, U*, 1903-1904 (**1992**).
[91] *Pure&Appl.Chem* , 66 ,No 4 , 845-850.
[92] S. Hashimoto, K. Yamamoto, T. Yamada, Y. Nakamura, *Heterocycles*, **1998**, 48, 939.
[93] S. Hashimoto, Y. Nakamura, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1413.
[94] S. Hashimoto, Y. Nakamura, *J. Chem. Soc.,Perkin Trans. 1*, **1996**, 2623.
[95] G. Dougherty, *J. Inorg. Biochem.*, **1988**, 34, 95.
[96] M. Perree-Fauvet, N. Gresh, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 4227.
[97] M. Perree-Fauvet, C. Verchere-Beaur, E. Tarnaud, G. Anneheim-Herbelin, N. Bone, A. Gaudemer, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 13569.
[98] Sadler & Karo, *Organic Functional Group Preparation (III)*, **1972**, Academic Press NY and London, 406-432.
[99] C. Casa, B. Saint-Jalmes, C. Loup, C. Jeffrey Lacey, B. Meunier, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 2913.
[100] L. Ding, C. Casa, G. Etemad-Moghadam, B. Meunier, *New J. Chem.*, **1990**, 14, 421.
[101] E.D.Becker,R.B.Brandley,*J.Chem.Phys.*, **1959**,31,1413.
[102] J.S.Waugh,R.W.Fessenden,*J.Am.Chem.Soc.*,**1958**,79,846.
[103] C.E.Johnson,F.A.Bovey,*J.Chem.Phys*., **1958**,28,1012.
[104] Storm C.B., CorwinA.H ., *J.Organomet.Chem* ., **1964**,29,3700.
[105] H.C.Longuet-Higgins,C.W.Rector, J.R.Platt, *J.Chem.Phys*.,**1950**,18,1174.
[106] M. Gouterman, *J. Mol. Spectrosc.*, **1961**, 6, 138.
[107] M. Gouterman, G. H. Wagniere, L. C. Snyder, *J. Mol. Spectrosc.*, **1963**, 11, 108.
[108] D. Dolphin, "The porphyrins", **1978**, Academic Press, Vol.III.
[109] M. Gouterman, *J.Chem. Phys.*, **1959**, 30, 5.
[110] A. H. Corwin, A. B. Chivvis, R. W. Poor, D. G. Whitten and E. W. Baker, *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 6577.
[111] J. A. Shelnutt and V. Ortiz, *J. Phys. Chem.*, **1985**, 89, 4733.
[112] J. W. Buchler, W. Kokisch and P. D. Smith, *Struct. Bonding*, **1978**, 34, 80.
[113] K. S. Suslick, R. A. Watson, *New J. Chem.*, **1992**, 16, 633.