

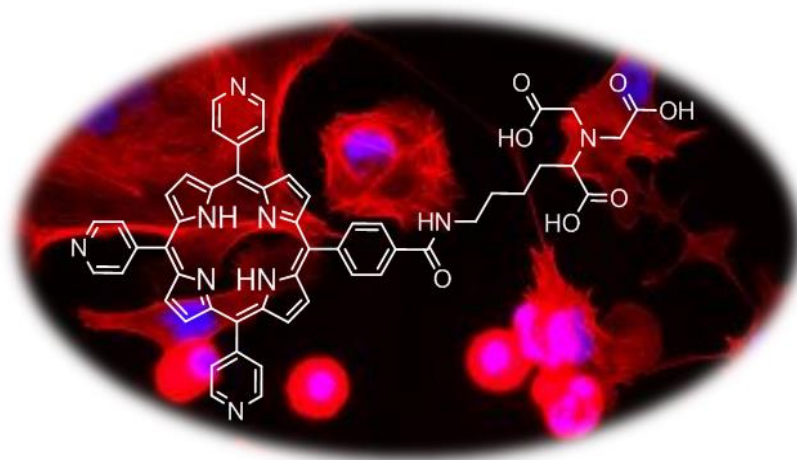


Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας και Ενώσεων Συναρμογής

Τομέας Ανόργανης Χημείας

Διπλωματική Εργασία

**Σύνθεση και χαρακτηρισμός υδατοδιαλυτών πορφυρινικών
παραγώγων με εφαρμογή στη φθορίζουσα σήμανση
πρωτεϊνών**



Μιχαήλ Παναγιώτα, 2168¹

Επιβλέπων καθηγητής: Κουτσολέλος Αθανάσιος

Ηράκλειο Κρήτης 2019

¹ Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, 71003, Ελλάδα, Α.Μ. 2168, email: chem2168@edu.chemistry.uoc.gr

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή κύριο Αθανάσιο Κουτσολέλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο βιοανόργανης χημείας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μαρία Κανδύλη για την αμέριστη βοήθεια της, την καθοδήγηση της και για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και της διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τις πολύτιμες συμβουλές τους και το ευχάριστο περιβάλλον.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για τη στήριξη και την εμπιστοσύνη που μου δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	Σελ. 3
Abstract	Σελ. 4
Ενότητα 1: Εισαγωγή.....	Σελ. 5
1.1. Πορφυρίνες	Σελ. 5
1.2. Μεταλλοπορφυρίνες	Σελ. 6 – 7
1.3. Φθορίζουσα σήμανση.....	Σελ. 7 – 11
Ενότητα 2: Βασικές αρχές μεθόδων χαρακτηρισμού.....	Σελ. 12
2.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	Σελ. 12 – 14
2.2. Maldi-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight)	Σελ. 14 – 15
Ενότητα 3: Σκοπός.....	Σελ. 16
Ενότητα 4: Πειραματικό μέρος.....	Σελ. 17
4.1. Σύνθεση της Tripyridyl-por-COOCH ₃	Σελ. 17
4.2. Σύνθεση της Tripyridyl-por-COOH.....	Σελ. 18
4.3. Σύνθεση της NH ₂ -lys-trimethyl-ester.....	Σελ. 18 – 19
4.4. Σύνθεση της Tripyridyl-por-lys-trimethyl-ester.....	Σελ. 19 - 22
4.5. Σύνθεση της Tripyridyl-por-lys- tricarboxy.....	Σελ. 23
Ενότητα 5: Αποτελέσματα.....	Σελ. 24 - 32
Ενότητα 6: Βιβλιογραφία.....	Σελ. 33

Περίληψη

Φθορίζουσα σήμανση ονομάζεται η σήμανση με φθορίζοντες ανιχνευτές η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των βιομορίων με σκοπό την παρακολούθησή τους, την διευκρίνιση της δομής τους και των αντιδράσεων που καταλύουν.

Οι πρωτεΐνες θεωρούνται τα πιο διαδεδομένα και πολυδιάστατα μακρομόρια για την ανίχνευση των οποίων μπορούν να χρησιμοποιούνται άλλες φθορίζουσες πρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύονται χημικά σε μια συγκεκριμένη περιοχή στο μόριο-στόχο. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι σύνδεσης μεταξύ των χρωμοφώρων και των βιομορίων, οπότε και διάφορα είδη φθορίζουσας σήμανσης όπως η επισήμανση πρωτεϊνών, η ενζυματική σήμανση, η χημική σήμανση και η γενετική επισήμανση.

Η πιο γνωστή μέθοδος φθορίζουσας σήμανσης είναι εκείνη με τη χρήση φθοροφόρων μορίων ενωμένων μέσω μεταλλοχηλικής σύζευξης με το αμινοξύ της πρωτεΐνης που αναλύεται. Τα ευρέως χρησιμοποιούμενα φθοροφόρα είναι μικρά οργανικά μόρια και μέχρι τώρα δεν υπάρχουν αναφορές για τη χρήση πορφυρινικών παραγώγων ως φθοροφόρα. Για την διεύρυνση της μελέτης που σχετίζεται με τη χρήση πορφυρινικών φθοροφόρων στη σήμανση μέσω μεταλλοχηλικής σύζευξης, συνθέσαμε την ένωση Tripyridyl-porphyrin-lysine-tricarboxy για σύζευξη μέσω του Ni^{2+} με πεπτίδιο με αλληλουχία ιστιδίνης.

Η ταυτοποίηση της ένωσης πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας (Maldi-TOF) και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Abstract

Fluorescent labeling is called the labeling with fluorescent tags, which is used for the detection of the biomolecules, in order to monitor them, to clarify their structure, and the reactions they catalyze.

Proteins are considered to be the most widespread and multidimensional macromolecules. In order to detect them, other fluorescent proteins can be used and chemically bind to a particular region in the target-molecule. There are several linking ways between chromophores and biomolecules, hence there are various types of fluorescent labeling, such as protein labeling, enzyme labeling, chemical labeling and genetic labeling.

The most commonly used method in fluorescent labeling, is the method for which is used metallochelate coupling that binds chromophores and the amino acids of the protein, which is analyzed. The widely used fluorophores are small organic molecules. Thus far, there are no reports regarding the usage of porphyrin derivatives as fluorophores. In order to broaden the study which is related with the usage of porphyrinoid fluorophores in fluorescent labeling through metallochelate coupling, we synthesized the Tripyridyl-porphyrin-lysine-tricarboxy for coupling with a peptide carrying a histidine sequence via Ni^{+2} .

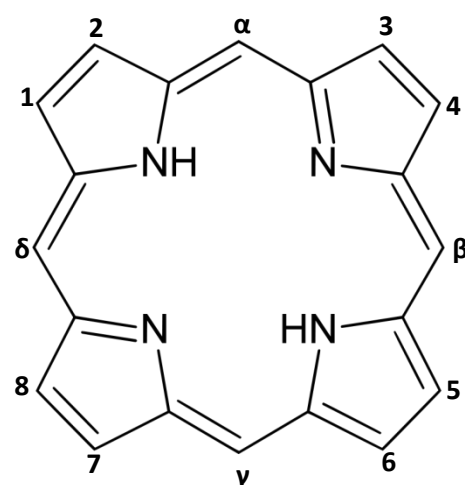
The identification of the compound was performed with mass spectrometry (Maldi-TOF) and with nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR).

Ενότητα 1: Εισαγωγή

1.1. Πορφυρίνες

Οι πορφυρίνες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις παράγωγες της πορφίνης. Αποτελούνται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους, οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με ομάδες μεθίνης (-CH=) στον α άνθρακα. Περιέχουν τα exo - υδρογόνα (1-8) και τα μεθινικά υδρογόνα (α-δ).

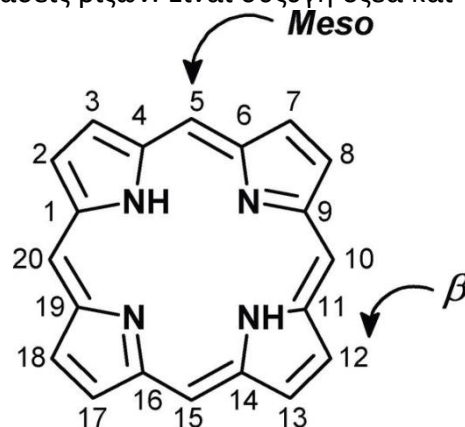
Η συμβολή των πορφυρινών έχει μεγάλη σημασία σε πρωτεϊνικά συστήματα. Παράγωγα της πορφυρίνης, όπως είναι η αίμη και οι χλωροφύλλες, χρησιμοποιούνται ως προσθετικές ομάδες στην αιμοσφαιρίνη, στην μυοσφαιρίνη, στα κυτοχρώματα και στα φωτοσυνθετικά κέντρα. Γενικά οι πορφυρίνες είναι ευέλικτες και μπορούν να υπόκεινται σε πολλές τροποποιήσεις.



Εικόνα 1: Δομή πορφυρινικού δακτυλίου.

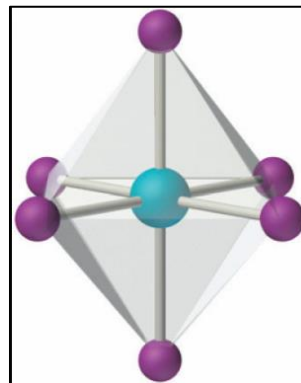
Χαρακτηριστικά των πορφυρινών:

1. Ο δακτύλιος της πορφυρίνης χαρακτηρίζεται ως αρωματικός, δηλαδή υπακούει στον κανόνα του Hückel $4n+2\pi$. Εξαιτίας της εκτεταμένης συζυγίας του δακτυλίου, οι ενώσεις εμφανίζουν έντονη απορρόφηση ακτινοβολίας μήκους κύματος που έγκειται στην περιοχή του ορατού υπεριώδους.
2. Οι πορφυρίνες εξαιτίας της αρωματικότητάς τους, έχουν την ικανότητα να λαμβάνουν μέρος σε ηλεκτρονιόφιλες αντιδράσεις και σε αντιδράσεις ριζών. Είναι συζυγή οξέα και συναρμολογούν μέταλλα σχηματίζοντας συνήθως σύμπλοκα σθένους +2 ή +3. Οι περισσότερο ενεργοποιημένες θέσεις του πορφυρινικού δακτυλίου για τέτοιου είδους αντιδράσεις είναι εκείνες με τη μεγαλύτερη ηλεκτρονιακή πυκνότητα (meso θέσεις). Δηλαδή, είναι μόρια ικανά να δίνουν και να παίρνουν ηλεκτρόνια με μεγάλη ευκολία προσδίδοντας στα προϊόντα των αντιδράσεων μεγάλη σταθερότητα. Όταν δεν συνδέονται με μέταλλα θεωρούνται ελεύθερες βάσεις.



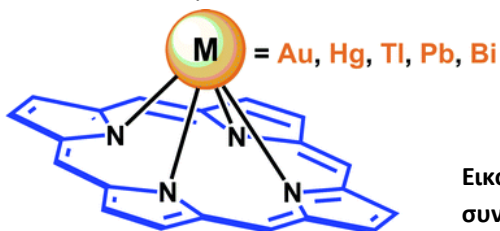
Εικόνα 2: Δομή πορφυρινικού δακτυλίου όπου παρουσιάζονται οι β και meso θέσεις.

3. Ο πορφυρινικός δακτύλιος προσδίδει σταθερότητα στο σύστημα και είναι σχεδόν επίπεδος. Σύμφωνα με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, τα άτομα του άνθρακα και του αζώτου είναι sp^2 υβριδισμένα και οι δεσμοί έχουν μήκος περίπου 134-145 pm σχηματίζοντας γωνίες 107-126°.
4. Οι πορφυρίνες είναι τετραδραστικοί υποκαταστάτες με επίπεδη διαμόρφωση όταν συναρμόζονται με μέταλλα. Όταν ο αριθμός συναρμογής είναι 6, δηλαδή έχουν οκταεδρική διαμόρφωση, οι αξονικές θέσεις παραμένουν κενές. Η συγκεκριμένη διαμόρφωση είναι κατάλληλη για στοιχειομετρικές και καταλυτικές αντιδράσεις, διότι εκμεταλλεύονται το φαινόμενο *trans* στις αντιδράσεις που διεξάγονται.



Εικόνα 3: Δομή οκταεδρικού συμπλόκου.

5. Οι πορφυρινικοί δακτύλιοι είναι σταθεροί λόγω της συζυγίας των διπλών δεσμών. Σύμφωνα με μελέτες, σφαιρικά ιόντα με ακτίνα μήκους 60-70 pm συναρμόζονται στο κέντρο των τετραπυρρολικών δακτυλίων, ενώ ιόντα με μεγαλύτερο μήκος ακτίνας συναντώνται έξω από το επίπεδο του δακτυλίου.



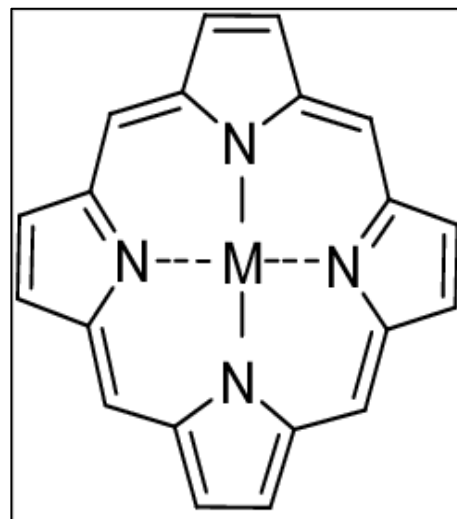
Εικόνα4: Παράδειγμα δομής πορφυρινικού δακτυλίου συνδεδεμένου με μέταλλο ακτίνας μεγαλύτερης από 60-70 pm.

1.2. Μεταλλοπορφυρίνες

Όλα τα τετροπυρρολικά συστήματα είναι ακόρεστοι μακροκυκλικοί υποκαταστάτες οι οποίοι όταν είναι αποπρωτονιωμένοι έχουν την δυνατότητα να δρουν ως υποκαταστάτες με μεταλλικά ιόντα. Συνεπώς, οι μεταλλοπορφυρίνες είναι οι ενώσεις που προκύπτουν από την συναρμογή των πορφυρινών με μεταλλικά ιόντα.

Η μετάλλωση θεωρείται εύκολη διαδικασία λόγω του ότι στο κέντρο του δακτυλίου υπάρχει κενή θέση και ισχυρά όξινα υδρογόνα από τα δύο άζωτα. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τον πορφυρινικό δακτύλιο κατάλληλο για συναρμογή με μεταλλικά ιόντα. Η αντίδραση πραγματοποιείται με την αποχώρηση δύο όξινων πρωτονίων λόγω του ότι οι πορφυρινικοί υποκαταστάτες μπορούν να δίνουν και να παίρνουν εύκολα ηλεκτρονιακή πυκνότητα.

Αρχικά οι αντιδράσεις μετάλλωσης πορφυρινών διεξάγονταν με μέταλλα όπως Fe, Co, Mn, Cu, Zn, Ni, Sn και Mg. Πλέον έχει εξελιχθεί η σύνθεση μεταλλοπορφυρινικών συμπλόκων και σχεδόν όλα τα μέταλλα και μερικά μεταλλοειδή, συναρμόζονται με τον πορφυρινικό δακτύλιο.



Εικόνα 5: Δομή μεταλλοπορφυρίνης.

Η αντίστροφη διαδικασία καλείται απομετάλλωση και επιτυγχάνεται με χρήση οξέος. Ανάλογα με το είδος του μετάλλου χρησιμοποιείται το κατάλληλο οξύ.

1.3. Φθορίζουσα σήμανση

Η ανίχνευση βιομορίων πολλές φορές απαιτεί τη χρήση κάποιας ένωσης ανιχνευτή (indicator) για τη διαλεύκανση των μοριακών δομών, των μοριακών αλληλεπιδράσεων, των λειτουργιών και διαφόρων διεργασιών. Κατά την φθορίζουσα σήμανση ένα δραστικό παράγωγο, το φθοροφόρο συνδέεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή ή λειτουργική ομάδα του μορίου-στόχου χημικά. Στα πλέον πιο γνωστά επισημασμένα μόρια ανήκουν τα αντισώματα, οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα και τα πεπτίδια που χρησιμοποιούνται ως ειδικοί ανιχνευτές για κάποιο συγκεκριμένο στόχο. Τεχνικές επισήμανσης όπως η ενζυματική σήμανση, η επισήμανση πρωτεϊνών, η χημική σήμανση και η γενετική σήμανση χρησιμοποιούνται ευρέως. Σήμερα οι πιο κοινές ετικέτες είναι το βρωμιούχο αιθίδιο, η φλουορεσκεΐνη και η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη.

Η φθορίζουσα σήμανση χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλές περιπτώσεις παρακολούθησης της διαδρομής ενός επισημασμένου μορίου το οποίο έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει μια αντίδραση μέσα στον οργανισμό. Επίσης, έχει μεγάλη ευαισθησία σε χαμηλές συγκεντρώσεις και μη καταστροφικές επιδράσεις στο μόριο στόχο. Για την επιλογή του κατάλληλου φθοροφόρου μορίου, λαμβάνονται υπόψη οι φασματικές ιδιότητες, η φωτεινότητα και η

φωτοσταθερότητα του. Στην ιατρική, η φθορίζουσα σήμανση χρησιμοποιείται κυρίως για τη θεραπεία ενός ασθενή αλλά και την παρακολούθηση της πορείας θεραπείας.

1.3.1. Φθορίζουσες πρωτεΐνες:

Οι φθορίζουσες πρωτεΐνες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την προέλευση του φθοροφόρου, το χημικό τμήμα που απορροφά το φως διέγερσης και αποκαθιστά το φως εκπομπής.

Στην πρώτη κατηγορία περιέχονται οι ενδογενώς φθορίζουσες πρωτεΐνες, των οποίων ο φθορισμός προέρχεται από δίπλωση χωρίς προσθήκη φθοροφόρου. Το μειονέκτημα αυτής της κατηγορίας είναι πως εξαιτίας της απουσίας εξωτερικού φθοροφόρου, η ευελιξία τους

είναι περιορισμένη. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), η οποία αποτελείται από 238 αμινοξέα

και έχει δομή β-βαρελίου με 11 κλώνους. Είναι σχεδόν μονομερές και έχει τη δυνατότητα να ενώνεται με ποικιλία πρωτεϊνών χωρίς να μεταβάλλεται η κατάσταση συσσωμάτωσής του. Όταν διπλωθεί, σχηματίζεται φθοροφόρο αυτοκαταλυτικά από τρία αμινοξέα του β-βαρελίου. Για τον σχηματισμό του φθοροφόρου απαιτείται οξυγόνο, οπότε αυτές οι πρωτεΐνες δεν καθίστανται φθορίζουσες σε αναερόβιο περιβάλλον.

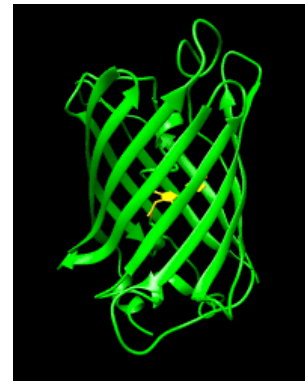
Στην δεύτερη κατηγορία περιέχονται οι εξωγενώς φθορίζουσες πρωτεΐνες, οι οποίες δεσμεύουν ένα ενδογενές βιομόριο ως φθοροφόρο. Προσφέρουν πιο φωτεινό φθορισμό σε μήκη κύματος τα οποία χρησιμοποιούνται για απεικόνιση. Λειτουργικά μονομερή μπορούν να παραχθούν από τέτοιες πρωτεΐνες με σύντηξη δύο αντίγραφων της αλληλουχίας.

Στην τελευταία κατηγορία ανήκουν οι εξωγενώς φθορίζουσες πρωτεΐνες για τις οποίες απαιτείται προσθήκη εξωγενούς συνθετικού μορίου ως φθοροφόρο. Οπότε σε αυτή την κατηγορία υπάρχει δυνατότητα μεταβολής των ιδιοτήτων του φθορισμού του tag με αλλαγή του φθοροφόρου. Οι χρωστικές ουσίες δεν είναι φθορίζουσες αλλά φθορίζουν όταν δεσμευτούν σε tag τετρασιστεΐνης. Η μη ειδική σύνδεση με κυστεΐνες οδηγεί σε φθορισμό υποβάθρου ο οποίος καταστέλλεται με έκπλυση με ενώσεις που περιέχουν σουλφιδρύλιο.

1.3.2. Είδη φθορίζουσας σήμανσης:

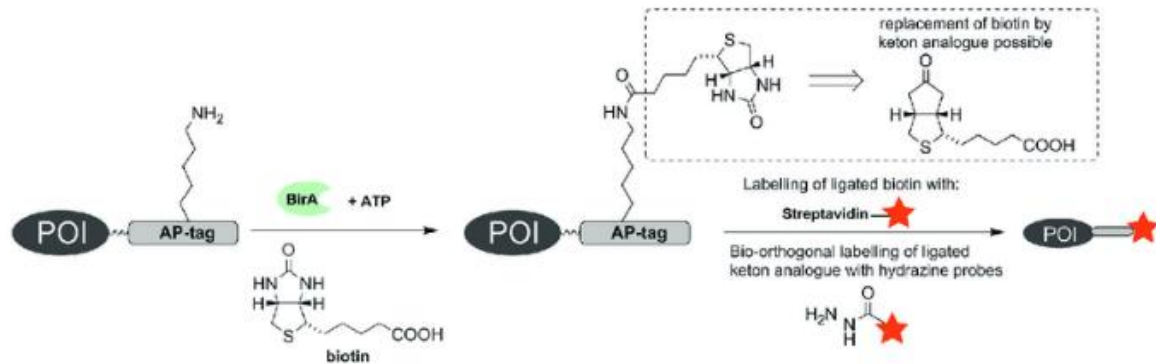
Υπάρχουν διάφορα είδη σήμανσης ανάλογα με τον τρόπο που συνδέεται το φθοροφόρο στο μόριο-στόχο.

Επισήμανση πρωτεϊνών: Χρησιμοποιούνται μικρά μόρια tags για ελαχιστοποίηση των διαταραχών αναδίπλωσης και λειτουργίας της πρωτεΐνης.



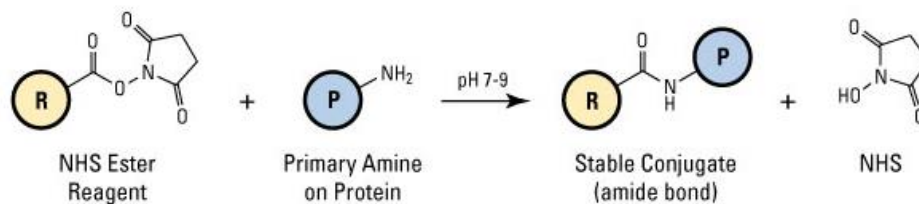
Εικόνα 6: Απεικόνιση δομής της GFP.

Ενζυματική σήμανση: Σε αυτή την περίπτωση, ένα γονίδιο και το DNA μιας φθορίζουσας πρωτεΐνης ενώνονται και ακολουθεί η μεταγραφή κατά την οποία σχηματίζεται ένα υβριδικό φθορίζον RNA. Το μόριο-στόχος ενώνεται με ένα ένζυμο που μπορεί να αναγνωρίσει το υβριδικό DNA. Συνήθως χρησιμοποιείται η φλουορεσκεΐνη ή η βιοτίνη ως φθοροφόρα.



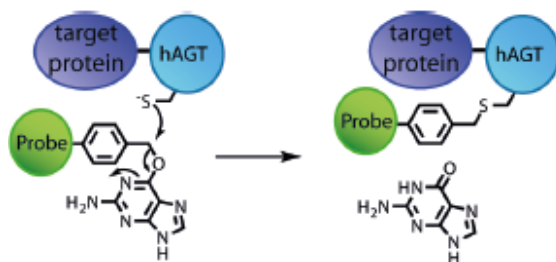
Εικόνα 7: Ενζυματική σήμανση με το ένζυμο biotin ligase (BirA) το οποίο αναγνωρίζει μια αλληλουχία αμινοξέων AP-tag και συνδέονται με την πρωτεΐνη POI σχηματίζοντας αμιδικό δεσμό. Στο δεύτερο βήμα παρουσιάζεται η ένωση της πρωτεΐνης με το φθοροφόρο (συμβολίζεται με το κόκκινο αστέρι).

Χημική επισήμανση: Σε αυτή την περίπτωση αλληλεπιδρά ένα μικρό μόριο με μια συγκεκριμένη γενετική αλληλουχία αμινοξέων. Οι χημικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές φθορισμού έχουν την δυνατότητα να λειτουργούν σε μεγάλη ποικιλία καταστάσεων, προσφέροντας ποικιλία χρωμάτων και φωτοχημικών ιδιοτήτων.



Εικόνα 8: Το φθοροφόρο συνδέεται μέσω της λειτουργικής ομάδας -NH₂ στο μόριο-στόχο.

Γενετική επισήμανση: Διάφορες φθορίζουσες χρωστικές με διακριτά μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής δεσμεύονται σε ανιχνευτή που υβριδοποιείται σε χρωμοσώματα. Ένα μικροσκόπιο φθορισμού μπορεί να ανιχνεύσει τις υπάρχουσες βαφές και να το στείλει σε έναν υπολογιστή που μπορεί να αποκαλύψει τον καρυότυπο ενός κυττάρου. Αυτή η τεχνική επιτρέπει να αποκαλύπτονται γενετικές ανωμαλίες όπως οι διαγραφές και οι επικαλύψεις.



Εικόνα 9: Το ένζυμο hAGT είναι συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη και ενώνεται με το φθοροφόρο μέδω θειοαιθερικού δεσμού.

1.3.3. Μεταλλοχηλική σύζευξη φθοροφόρων με αμινοξέα πεπτιδίου

Τα μικρά πεπτίδια αποτελούνται από συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων και λειτουργούν ως ετικέτες για σήμανση πρωτεϊνών εξαιτίας της ευελιξίας και του μεγέθους τους εφόσον δεν λαμβάνουν μέρος στην λειτουργία της πρωτεΐνης. Το φθοροφόρο συνδέεται επιλεκτικά και μη ομοιοπολικά με κατάλοιπα αμινοξέων της ετικέτας μέσω μετάλλου που περιέχεται στον χηλικό υποκαταστάτη. Η μεταλλοχηλική σύζευξη είναι από τις πιο σημαντικές τεχνικές σήμανσης μορίων-στόχων, καθώς προσφέρει μεγάλη επιλεκτικότητα και αποτελεσματικότητα.

His-tag

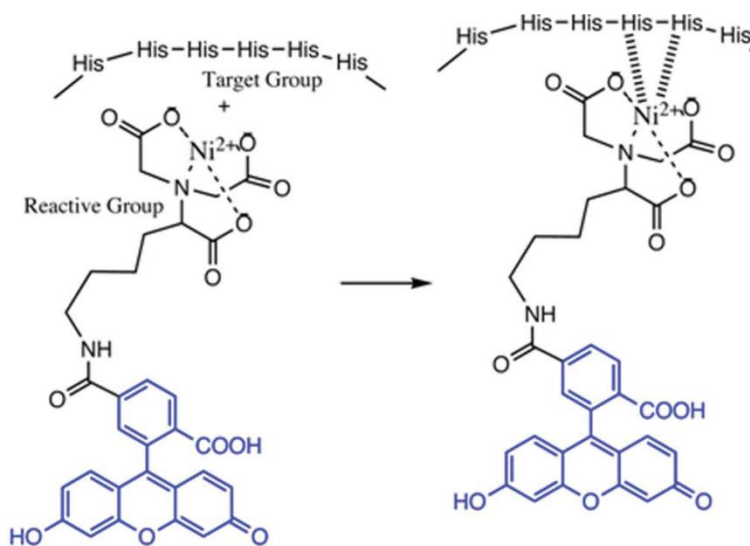
Πεπτίδια τα οποία είναι πλούσια σε ιστιδίνη αποτελούν ευρέως χρησιμοποιούμενα tags. Τα tags ιστιδίνης δεν κατέχουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία παραγωγής των πρωτεϊνών γι'αυτό έχουν την δυνατότητα να ενσωματώνονται εύκολα στην πρωτεΐνη.

Γενικά, το His-tag αποτελείται από αλληλουχία αμινοξέων ιστιδίνης. Στην περίπτωση του His-tag το φθοροφόρο τροποποιείται κατάλληλα και συνδέεται ομοιοπολικά με έναν χηλικό υποκαταστάτη, συνήθως το NTA (νιτριλοτριοξικό οξύ), μέσω του οποίου συναρμόζεται με ένα δισθενές μέταλλο μετάπτωσης, συνήθως το Ni^{2+} , που αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά μέσω δεσμού συναρμογής με τα αμινοξέα της ιστιδίνης, επιτυγχάνοντας έτσι τη σήμανση της πρωτεΐνης. Η ιστιδίνη έχει την πιο ισχυρή αλληλεπίδραση με το ακινητοποιημένο μεταλλικό κέντρο διότι οι ομάδες δότες ηλεκτρονίων σε δακτύλιο ιστιδίνης ιμιδαζόλης σχηματίζουν εύκολα δεσμούς συντονισμού με το ακινητοποιημένο σύμπλοκο.

Η μη ομοιοπολική μεταλλοχηλική σύνδεση του φθοροφόρου με το Ni^{2+} -NTA και του His-tag προσφέρει μεγάλη επιλεκτικότητα σήμανσης και εφαρμόζεται σε ζωντανά κύτταρα για σήμανση μεμβρανικών πρωτεϊνών. Εξαιτίας του παραμαγνητισμού του μεταλλικού ιόντος Ni^{2+} λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων, όταν συναρμόζεται με το φθοροφόρο-NTA η απόσβεση του φθορισμού αυξάνεται. Συνεπώς, η απόσβεση του φθορισμού κατά την συμπλοκοποίηση

εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το μέταλλο, το φθοροφόρο, τον αριθμό των συναρμοσμένων NTA και την απόσταση μεταξύ του φθοροφόρου και του NTA.

Φθοροφόρα που χρησιμοποιούνται για το σύστημα Ni^{2+} -NTA και His-tag περιλαμβάνουν φλουορεσκεΐνη και άλλα παράγωγα της, BODIPY, περυλένια και άλλα. Εάν στο φθοροφόρο συνδεθούν περισσότερες από μία ομάδες NTA, κατά την αλληλεπίδραση με το His-tag η συγγένεια σύνδεσης και η σταθερότητα που προσφέρεται θα είναι μεγαλύτερη. Επίσης, η ενδοκυττάρια σήμανση επιτυγχάνεται όταν το φθοροφόρο διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη ή όταν είναι ενωμένο με αλληλουχία αμινοξέων που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη.



Εικόνα 10: Στο οκταεδρικό σύμπλοκο Ni^{2+} οι τέσσερις από τις έξι θέσεις συναρμογής καταλαμβάνονται από το NTA και οι υπόλοιπες θέσεις από δύο χαρακτηριστικές ομάδες ιμιδαζολίου στο tag H6. Η φλουορεσκεΐνη παρουσιάζεται (συμβολίζεται με μπλε χρώμα) ενωμένη μέσω Ni^{2+} -NTA με His-tag για φθορίζουσα σήμανση.

Ενότητα 2: Βασικές αρχές μεθόδων χαρακτηρισμού

2.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία NMR είναι η πιο χρήσιμη φασματοσκοπική μέθοδος για τον προσδιορισμό της δομής μορίων. Έχει την ικανότητα να προσδιορίζει τον αριθμό και το είδος των ατόμων σε ένα μόριο, καθώς και τον τρόπο με τον οποίο αυτά συνδέονται μεταξύ τους.

Η λειτουργία αυτής της τεχνικής βασίζεται στο γεγονός ότι ο πυρήνας των ατόμων εμφανίζει δύο φαινόμενα, το πυρηνικό spin (nuclear spin) και τη στροφορμή (angular momentum) που είναι το αποτέλεσμα της περιστροφής του γύρω από τον άξονα. Αποτέλεσμα του πυρηνικού spin είναι η μαγνητική ροπή (μ) του πυρήνα, καθώς ένα περιστρεφόμενο σωματίδιο αποτελεί ένα κυκλικό ηλεκτρικό ρεύμα που δημιουργεί ένα μαγνητικό δίπολο.

Οι πυρήνες ως θετικά φορτισμένα σωματίδια (+) λόγω της ιδιοπεριστροφής τους συμπεριφέρονται ως μαγνητικά δίπολα. Η πυρηνική μαγνητική ροπή τους (μ) (nuclear magnetic moment) δίνεται από την εξίσωση:

$$\mu = \frac{\gamma \cdot I \cdot \hbar}{2\pi} = \gamma \cdot p ,$$

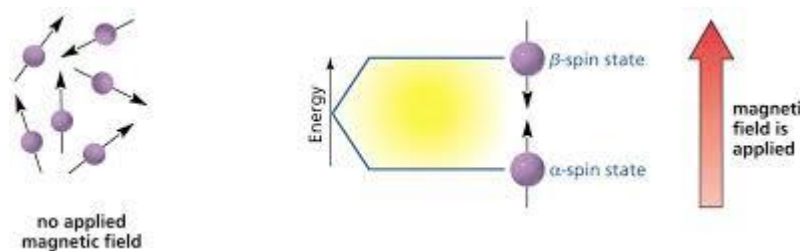
όπου p είναι η στροφορμή και γ ο γυρομαγνητικός λόγος.

Όταν ένα δείγμα που περιέχει πυρηνικά spin βρίσκεται εκτός μαγνητικού πεδίου, τα spin κατανέμονται με τυχαίο τρόπο. Όταν όμως τοποθετηθούν ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, προσανατολίζονται ανάλογα με το άνυσμα των μαγνητικών γραμμών. Σύμφωνα με την κβαντομηχανική, το άνυσμα της πυρηνικής μαγνητικής ροπής (μ) μπορεί να πάρει μόνο ορισμένες κατευθύνσεις σε σχέση με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Ανάλογα με το spin του, ένας πυρήνας μπορεί να πάρει μόνο $2I+1$ επιτρεπόμενους προσανατολισμούς.

Οι πυρήνες που έχουν θετικό m_I προσανατολίζονται προς την κατεύθυνση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και συνεπώς βρίσκονται σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, ενώ οι πυρήνες με αρνητικό m_I προσανατολίζονται αντίθετα από την κατεύθυνση των μαγνητικών γραμμών και βρίσκονται σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση.

Όταν οι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλη συχνότητα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, απορροφούν ενέργεια με αποτέλεσμα αναστροφή του spin τους. Συνεπώς, οι πυρήνες συντονίζονται με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία. Η συχνότητα που απαιτείται για τον

πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό εξαρτάται από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και από το είδος του πυρήνα.



Εικόνα 11: Παρουσιάζονται τα spin των πυρήνων κατά την παρουσία και μη του μαγνητικού πεδίου.

Ο κάθε πυρήνας στο φάσμα, απορροφά σε διαφορετική συχνότητα καθώς περιβάλλεται από ηλεκτρόνια τα οποία υπό την επίδραση του μαγνητικού πεδίου δημιουργούν το δικό τους τοπικό μαγνητικό πεδίο, δρώντας αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Με αυτό τον τρόπο οι πυρήνες προστατεύονται από το μέσω των ηλεκτρονίων τους. Συνεπώς, εφόσον ο κάθε πυρήνας έχει διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον θα προστατεύεται και διαφορετικά με αποτέλεσμα το πεδίο που εφαρμόζεται σε αυτόν στην πραγματικότητα να διαφέρει.

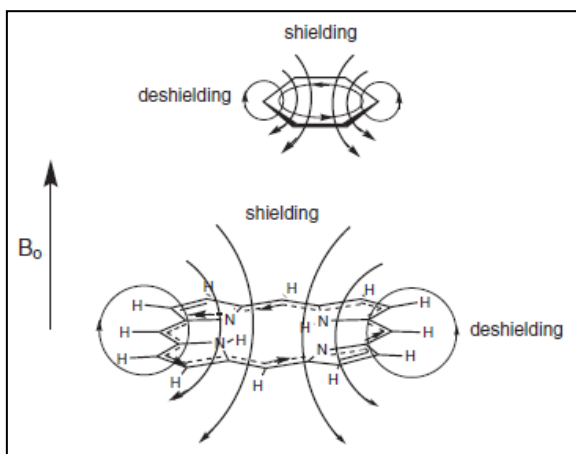
2.1.2. Οι πορφυρίνες στη φασματοσκοπία NMR

Στην περίπτωση των αρωματικών ενώσεων, είναι γεγονός ότι η χημική μετατόπιση του φαινυλίου ($C_6H_5^-$) επηρεάζεται από την ηλεκτραρνητικότητα των υποκαταστατών. Οι πιο ηλεκτραρνητικοί υποκαταστάτες αποθωρακίζουν τα πρωτόνια και σε περίπτωση που βρίσκονται σε ορθο- και παρα- θέσεις το φαινόμενο αποθωράκισης γίνεται εντονότερο λόγω συντονισμού. Το αντίθετο συμβαίνει με υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων ή μικρής ηλεκτραρνητικότητας.

Επιπλέον, η χημική μετόπιση των αρωματικών ενώσεων επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες με αποτέλεσμα να μην υπάρχει ακριβής ποσοτική εξήγηση της επίδρασης των υποκαταστατών. Μεγάλο μέρος της χημικής μετατόπισης στις αρωματικές ενώσεις οφείλεται στην κυκλοφορία των π ηλεκτρονίων μέσα από το επίπεδο του βενζολικού δακτυλίου, που σχηματίζει ένα μικρό μαγνητικό πεδίο αντίθετης κατεύθυνσης σε σχέση με το εφαρμοζόμενο, δημιουργώντας έτσι μεγάλη χημική μετατόπιση προς υψηλά μαγνητικά πεδία.

Σε αντίθεση με την κυκλοφορία των π ηλεκτρονίων μέσα από το επίπεδο του βενζολικού δακτυλίου, η κυκλική κίνηση των s ηλεκτρονίων γύρω από τα πρωτόνια του βενζολικού δακτυλίου δημιουργεί ηλεκτρικό ρεύμα που παράγει μαγνητικό πεδίο κατά την κατεύθυνση του εφαρμοζόμενου, προκαλώντας χημική μετατόπιση σε χαμηλά μαγνητικά πεδία. Πρακτικά,

τα μόρια περιστρέφονται ταχύτατα μέσα στο διάλυμα και η χημική μετατόπιση του NMR είναι ο μέσος όρος των διαφόρων κατευθύνσεων του μορίου ως προς το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο (εξωτερικό). Το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο στον πορφυρινικό δακτύλιο, διότι το π αρωματικό σύστημα του δακτυλίου είναι εντονότερο λόγω της ύπαρξης των 22π ηλεκτρονίων.



Εικόνα 12: Παρουσιάζεται η κίνηση του π-ηλεκτρονιακού νέφους στον πορφυρινικό δακτύλιο που προσφέρει ισχυρή θωράκιση στα εσωτερικά πρωτόνια του δακτυλίου και αποπροστασία στα πρωτόνια του εξωτερικού σκελετού του δακτυλίου.

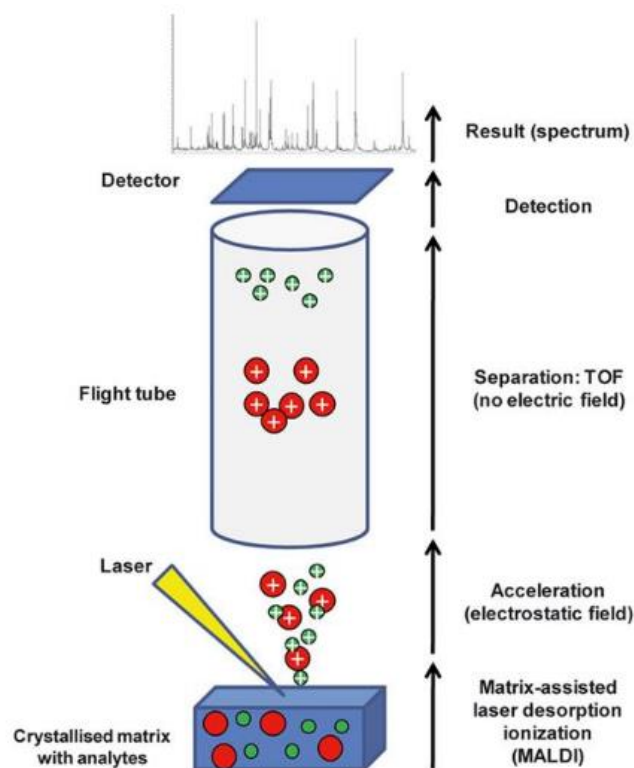
2.2. Maldi-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight)

Η φασματοσκοπία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική κατά την οποία οι χημικές ενώσεις ιονίζονται και μετράται η αναλογία του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z). Ένα φασματόμετρο μάζας αποτελείται από μια πηγή που προκαλεί τον ιοντισμό του δείγματος σε αέρια φάση, έναν αναλυτή μάζας ο οποίος διαχωρίζει τα ιόντα ανάλογα με το λόγο μάζας προς φορτίο και μια συσκευή ανίχνευσης για την παρακολούθηση των διαχωρισμένων ιόντων. Θεωρείται μια μέθοδος “μαλακού ιονισμού” καθώς ο σχηματισμός ιόντων δεν οδηγεί σε μεγάλη απώλεια της ακεραιότητας του δείγματος. Χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνική η ερμηνεία των φασμάτων είναι εύκολη διότι παράγει απλά φορτισμένα ιόντα. Επίσης, δεν απαιτείται κάποια προεργασία του δείγματος. Συνεπώς, η υψηλή απόδοση και η ταχύτητα σχετίζονται με την πλήρη αυτοματοποίηση και έχουν καταστήσει το Maldi ως επιλογή για ανίχνευση και χαρακτηρισμό μιγμάτων οργανικών και μη μορίων.

Κατά την τεχνική αυτή χρησιμοποιείται μήτρα (matrix) η οποία αναμιγνύεται με το δείγμα της ένωσης που αναλύεται. Ο ρόλος της μήτρας είναι η απορρόφηση της ενέργειας από τον παλμό λέιζερ και η μεταφορά της ενέργειας στο δείγμα προκαλώντας την εκρόφηση των μορίων της αναλυόμενης ουσίας με σκοπό τον ιονισμό των προσροφημένων μορίων της. Έτσι αποτρέπεται η συσσωμάτωση των μορίων της αναλυόμενης ουσίας. Η χρήση της μήτρας εφαρμόζεται κυρίως για μεγάλα οργανικά μόρια τα οποία είναι εύθραυστα. Ένα διάλυμα μήτρας συνήθως περιέχει νερό και μίγμα οργανικών διαλυτών που περιέχουν

αιθανόλη/μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο και ισχυρό οξύ. Όταν ο διαλύτης εξατμιστεί, κρυσταλλώνονται τα μόρια μαζί με την μήτρα.

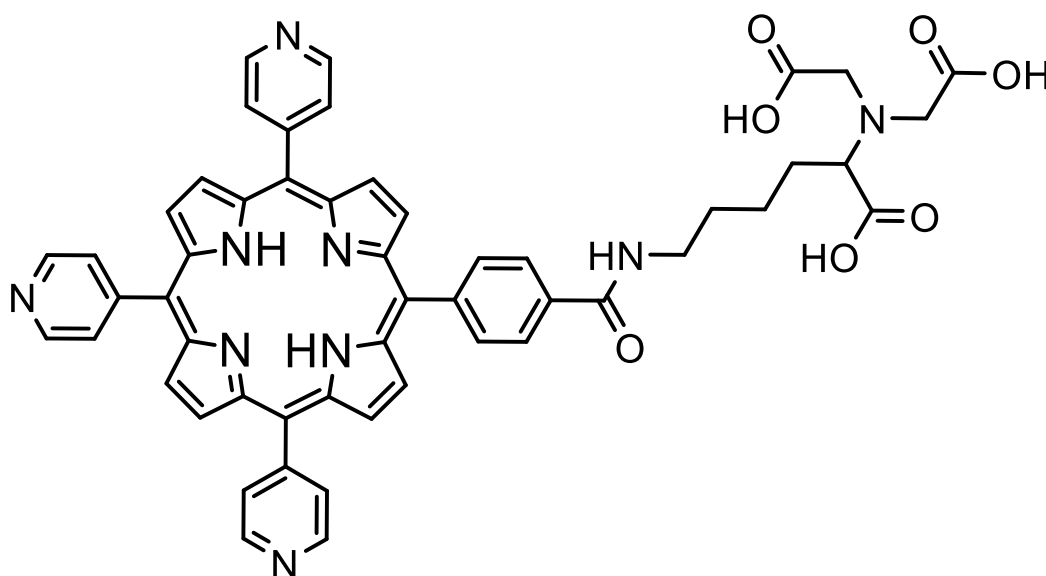
Η μέθοδος για την λήψη ενός φάσματος είναι σχετικά απλή. Το δείγμα της ένωσης αναμιγνύεται με τη μήτρα σε μια αγώγιμη μεταλλική πλάκα. Κατά την ξήρανση τους, η μήτρα κρυσταλλώνεται μαζί με το δείγμα το οποίο ιονίζεται με αυτοματοποιημένο τρόπο με δέσμη λέιζερ. Κατά την εκρόφηση και τον ιονισμό του δείγματος, παράγονται πρωτονιωμένα ιόντα τα οποία επιταχύνονται σε ένα σταθερό δυναμικό και διαχωρίζονται μεταξύ τους σύμφωνα με το λόγο μάζας προς φορτίο. Τα φορτισμένα μόρια ανιχνεύονται και μετρώνται με αναλύτη χρόνου πτήσης (TOF), ο οποίος μετρά το λόγο μάζας προς φορτίο του ιόντος ανάλογα με τον χρόνο που χρειάζεται για να ταξιδέψει στο μήκος του σωλήνα πτήσης. Τα μόρια με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος φτάνουν πιο αργά στον ανιχνευτή. Ανάλογα με τις πληροφορίες που συλλέγει το TOF, διαμορφώνεται χαρακτηριστικό φάσμα για την ένωση που αναλύεται. Κάθε κορυφή στο φάσμα αντιστοιχεί στη μάζα του σωματιδίου κατά μήκος του χρονικού άξονα, αρχίζοντας από τη στιγμή του ιονισμού. Το μέγεθος και οι εντάσεις των κορυφών των μορίων που ανιχνεύονται εξαρτώνται από την μήτρα που επιλέγεται. Παρόλο που σε όλα τα ιόντα του δείγματος δίνεται η ίδια κινητική ενέργεια, δεν αισθάνονται όλα τα ιόντα τον παλμό με την ίδια ένταση με αποτέλεσμα ιόντα που έχουν τον ίδιο λόγο μάζας προς φορτίο να φτάνουν στον ανιχνευτή σε διαφορετικό χρόνο. Οπότε για να λυθεί αυτό το πρόβλημα, εφαρμόζεται ανακλαστήρας ο οποίος αποτελείται από μια σειρά κοίλους δακτυλίου με υψηλή τάση και καταλήγει σε ένα πλέγμα. Τα ιόντα που εισέρχονται στον ανακλαστήρα επιβραδύνονται, σταματούν και ανακλώνται προς την αντίθετη πλευρά. Με αυτό τον τρόπο τα ιόντα που είχαν αρχικά μεγαλύτερη κινητική ενέργεια προχωρούν περισσότερο πριν ανακλαστούν και έτσι όλα τα ιόντα με την ίδια μάζα φτάνουν στο πλέγμα την ίδια χρονική στιγμή ανεξάρτητα με την ταχύτητα που είχαν στην αρχή.



Εικόνα 13: Απεικόνιση των σταδίων κατά την εκτέλεση της φασματοσκοπικής αναλυτικής τεχνικής Maldi-TOF.

Ενότητα 3: Σκοπός

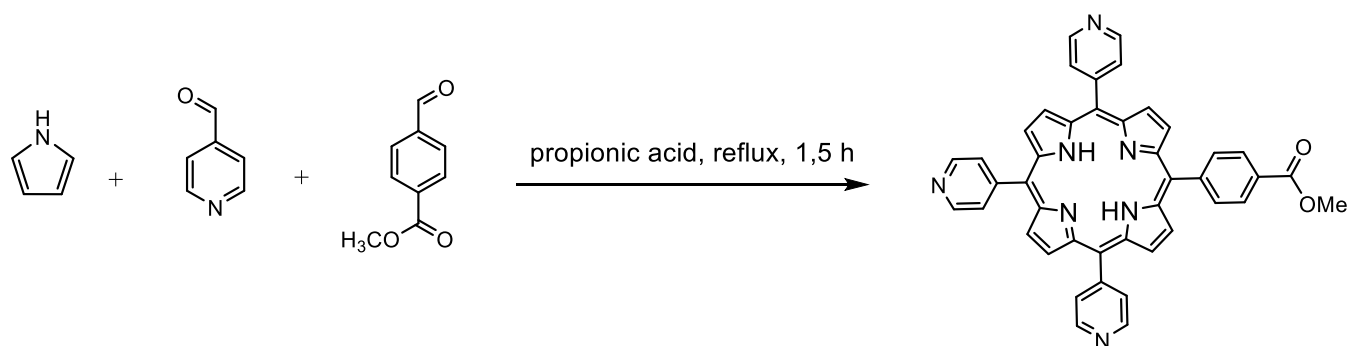
Στόχος της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η μελέτη για την εξέλιξη της χρήσης πορφυρινικών φθοροφόρων στη μεταλλοχηλική σύζευξη με Ni^{2+} -NTA για σήμανση πρωτεϊνών με πεπτίδιο His-tag. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός της δυάδας Tripyridyl-porphyrin-lysine-tricarboxy που φέρει ένα χηλικό υποκαταστάτη (ligand) νιτριλοτριοξικού οξέος (NTA) για σύζευξη μέσω του Ni^{2+} με πεπτίδιο που στο C-τερματικό άκρο φέρει ιστιδίνη (His) για να χρησιμοποιηθεί στην φθορίζουσα σήμανση πρωτεϊνών.



Εικόνα 14: Δομή της Tripyridyl-porphyrin-lysine-tricarboxy.

Ενότητα 4: Πειραματικό μέρος

4.1. Σύνθεση της Tripyridyl-por-COOCH₃



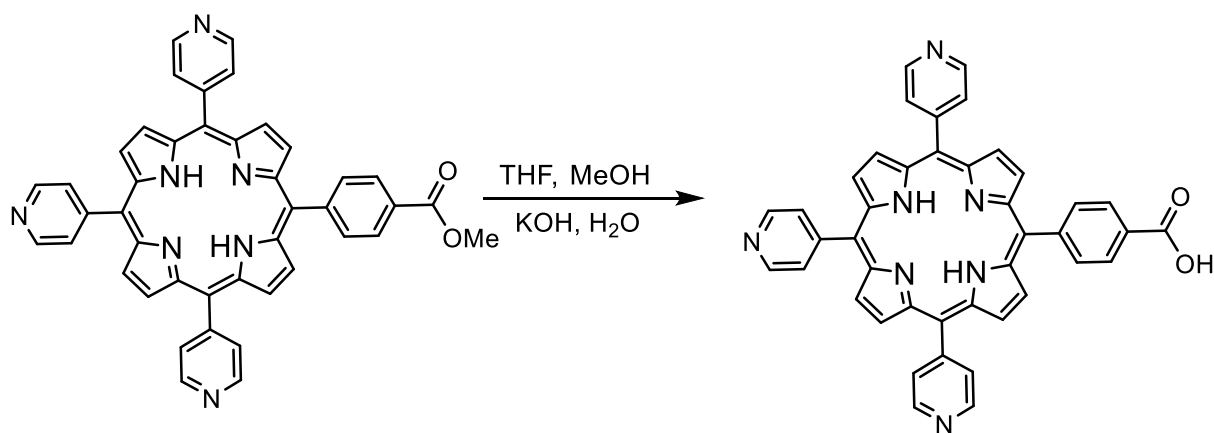
Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL προστέθηκαν 2,1gr μέθυλο-2-φόρμυλο βενζοϊκού εστέρα και 2,5 mL 4-πυριδίνη καρβόξυ-αλδεΐδης. Στη συνέχεια προστέθηκαν με αργή ροή 100 mL προπιονικού οξέος και το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι το σημείο βρασμού του προπιονικού οξέος, 140°C. Έπειτα προστέθηκαν 2,6 mL πυρρολίου και εφαρμόστηκε στο σύστημα της αντίδρασης κάθετος ψυκτήρας επιτυγχάνοντας συνθήκες reflux για μία ώρα και 30 λεπτά υπό ανάδευση. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απόσταξη του προπιονικού οξέος και του πυρρολίου που δεν αντέδρασαν, υπό κενό με ξηρό πάγο σε ακετόνη.

Μετά την ολοκλήρωση της απόσταξης, το προϊόν της αντίδρασης απομονώθηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας στήλης. Για την κλώνα υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε silica gel ως χρωματογραφικό υλικό και ως αρχικός διαλύτης έκλουσης το μίγμα CH₂Cl₂: MeOH (διχλωρομεθάνιο : μεθανόλη) με αναλογία, 95 mL CH₂Cl₂ και 5 mL MeOH. Οι διαστάσεις της κλώνας ήταν 8 cm x 4,5 cm.

Κατά τον διαχωρισμό συλλέχθηκαν 4 κλάσματα τα οποία αναμίχθηκαν και προστέθηκαν σε μία σφαιρική φιάλη. Για τον περαιτέρω καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιήθηκε δεύτερη κλώνα διαχωρισμού με διαστάσεις 13 cm x 3,5 cm, με αρχικό διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂: MeOH με αναλογία, 97 mL CH₂Cl₂ και 3 mL MeOH. Συλλέχθηκαν 6 κλάσματα με αυτή την αναλογία διαλυτών και έπειτα αυξήθηκε σταδιακά η πολικότητα του διαλύτη μέχρι το μίγμα των διαλυτών να είχε αναλογία, 95 mL CH₂Cl₂ και 5 mL MeOH. Με την αλλαγή της πολικότητας του διαλύτη, εκλούστηκε η Tripyridyl-por-mono methyl-ester.

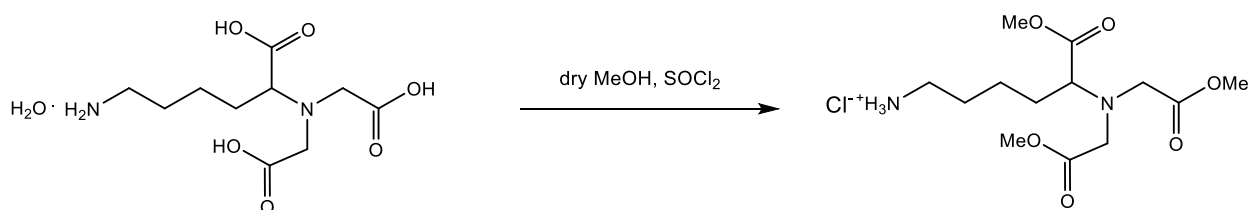
Τα κλάσματα συλλέχθηκαν σε σφαιρικές φιάλες και αποστάχθηκαν στον ρότορα ξεχωριστά.

4.2. Σύνθεση της Tripyridyl-por-COOH



Πραγματοποιήθηκε υδρόλυση της Tripyridyl-por-COOCH₃ σε σφαιρική φιάλη των 250 mL όπου προστέθηκαν 100 mg Tripyridyl-por-COOCH₃, 71,65 mL THF (τετραϋδροφουράνιο) και 28,95 mL MeOH. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα βάσης προσθέτοντας 2,15 gr KOH (υδροξείδιο του καλίου) και 35,85 mL H₂O. Προστέθηκε το διάλυμα βάσης στην αντίδραση και το σύστημα αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Όταν τελείωσε η αντίδραση αποστάχθηκαν οι διαλύτες στον ρότορα κενού (T = 70°C, p < 650 bar). Έπειτα προστέθηκαν στη σφαιρική φιάλη περίπου 70 mL νερού και τοποθετήθηκε η σφαιρική στο ψυγείο για μία ώρα περίπου. Μετά το πέρας της μίας ώρας η σφαιρική αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε εξουδετέρωση του βασικού διαλύματος με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος, HCl 1M. Ελέγχθηκε το pH του διαλύματος με πεχαμετρικό χαρτί για να επιτευχθεί το επιθυμητό, pH ~ 5. Τοποθετήθηκε η σφαιρική φιάλη στο ψυγείο για μισή ώρα και έπειτα διηθήθηκε το διάλυμα υπό κενό. Ακολούθως, ξηπλύθηκε η ένωση με διαλύτη εξάνιο και αφέθηκε στο φούρνο του κενού για 24 ώρες ώστε να στεγνώσει.

4.3. Σύνθεση της NH₂-lys-trimethylester

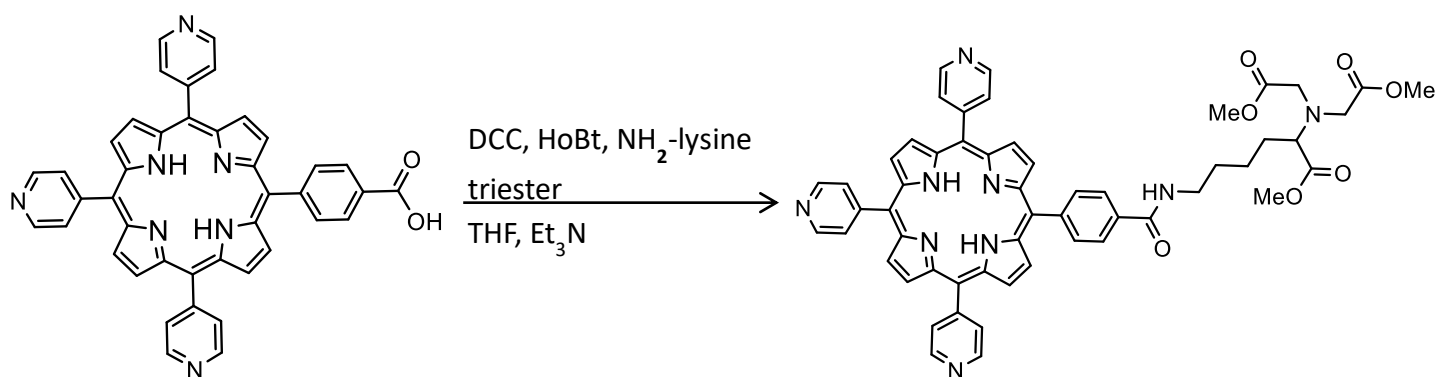


Σε σφαιρική φιάλη των 100 mL προστέθηκαν 101,2 mgr H₂O.NH₂-lys-tricarboxy και έπειτα συνδέθηκε με την αντλία κενού-αερίου Αζώτου (N₂). Ανοίχτηκε η αντλία και δημιουργήθηκε κενό στην πάνω μεριά του συστήματος και μετά ανοίχτηκε η στρόφιγγα της σφαιρικής φιάλης

για τη δημιουργία κενού στο εσωτερικό της. Όταν το σύστημα ήρθε σε ισορροπία έκλεισε η στρόφιγγα της φιάλης και η παροχή κενού και ανοίχτηκε η παροχή αερίου. Παράχθηκαν φυσαλίδες στην παγίδα λαδιού του αερίου και επιβεβαιώθηκε η ισορροπία του συστήματος, τότε ανοίχτηκε η στρόφιγγα και εισήλθε αέριο μέσα στη σφαιρική φιάλη. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 30 mL dry MeOH και το σύστημα της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο. Έπειτα, με σιφώνιο προστέθηκαν σταγόδην 0,62 mL SOCl₂ (thionyl chloride) και προσαρμόστηκε ελαιόλουτρο για θέρμανση της σφαιρικής μέχρι τους 60°C. Το σύστημα αφέθηκε υπό ανάδευση και θέρμανση για 72 ώρες. Μετά το πέρας των 72 ωρών, στήθηκε η διάταξη της απόσταξης υπό κενό με παγίδα ξηρού πάγου σε ακετόνη. Αρχικά αποστάχθηκε η μεθανόλη και με αύξηση της θερμοκρασίας περίπου στους 120°C αποστάχθηκε και το SOCl₂.

4.4. Σύνθεση της Tripyridyl-por-lysine-trimethyl-ester

Για την σύνθεση της Tripyridyl-por-lysine-trimethyl-ester, αρχικά ως αντιδραστήρια για το coupling χρησιμοποιήθηκαν το DCC και HoBt. Η απόδοση της συγκεκριμένης αντίδρασης ήταν αρκετά χαμηλή, οπότε ήταν αδύνατον να πραγματοποιηθεί το επόμενο πειραματικό στάδιο. Γι'αυτό το λόγο δοκιμάστηκε δεύτερη μέθοδος με τη χρήση αντιδραστηρίου BOP. Στη δεύτερη μέθοδο η απόδοση ήταν τετραπλάσια από την πρώτη αλλά και πάλι ήταν αρκετά χαμηλή. Οπότε, δοκιμάστηκε και τρίτη μέθοδος με το αντιδραστήριο HATU. Αυτή τη φορά η απόδοση της αντίδρασης ήταν μεγαλύτερη και μπορούσε να πραγματοποιηθεί το επόμενο στάδιο.



Σε σφαιρική φιάλη των 25 mL προστέθηκαν 60 mgr Tripyridyl-por-COOH και διαλύθηκαν σε 3,13 mL THF. Η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο (0°C). Κατόπιν στο σύστημα της αντίδρασης προστέθηκαν 20,65 mg DCC (NN'-dicyclohexyl-carbodiimone) και 13,53 mg HoBt (hydroxybenzotriazole). Το σύστημα αφέθηκε για 30 λεπτά σε παγόλουτρο και έπειτα

προστέθηκαν 30,46 mgr NH₂-lys-trimethylester και 29,7 μL Et₃N (triethylamine). Το σύστημα παρέμεινε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου overnight.

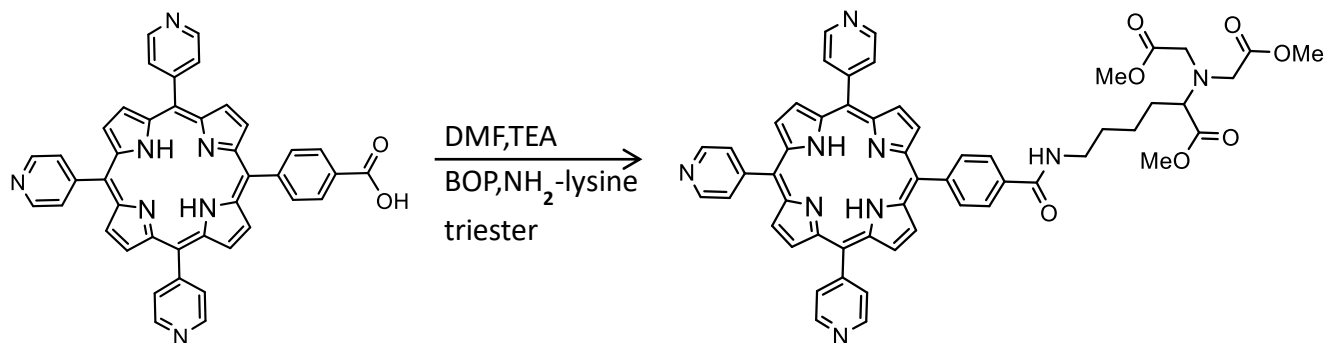
Με τη χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂: MeOH με αναλογία, 95mL CH₂Cl₂ και 5mL MeOH, παρατηρήθηκε πως η αντίδραση δεν είχε ολοκληρωθεί και πως περιείχε αρκετή ποσότητα από την αρχική πορφυρίνη. Γι'αυτό το λόγο προστέθηκαν επιπλέον 10,33 mg DCC και 6,77mg HOBt. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν τρεις εκχυλίσεις με CH₂Cl₂ - H₂O και μία εκχύλιση με CH₂Cl₂ - υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου, NaCl. Το διάλυμα αποστάχθηκε μέχρι ξηρού.

Για την απομόνωση του προϊόντος ακολουθήθηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας στήλης. Για την κολώνα υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε silica gel ως χρωματογραφικό υλικό και ως αρχικός διαλύτης έκλουσης το CH₂Cl₂: MeOH με αναλογία, 96mL CH₂Cl₂ και 4 mL MeOH. Οι διαστάσεις της κολώνας ήταν 11 cm * 3 cm. Με αυτή την αναλογία διαλυτών συλλέχθηκαν τρία κλάσματα και έπειτα αυξήθηκε σταδιακά η πολικότητα μέχρι η αναλογία των διαλυτών να γίνει 93mL CH₂Cl₂ και 7 mL MeOH. Πραγματοποιήθηκε δεύτερη κολώνα διαχωρισμού χρησιμοποιώντας λεπτή silica για περαιτέρω καθαρισμό της ένωσης. Η κολώνα είχε διαστάσεις 10 cm * 3 cm. Ως αρχικός διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το CH₂Cl₂: MeOH με αναλογία, 97,5mL CH₂Cl₂ και 2,5 mL MeOH.

Απόδοση αντίδρασης: 3,6%

Εφόσον η απόδοση της αντίδρασης ήταν πολύ χαμηλή, ακολούθησε εναλλακτική μέθοδος για την πραγματοποίηση της αντίδρασης.

2^η μέθοδος:



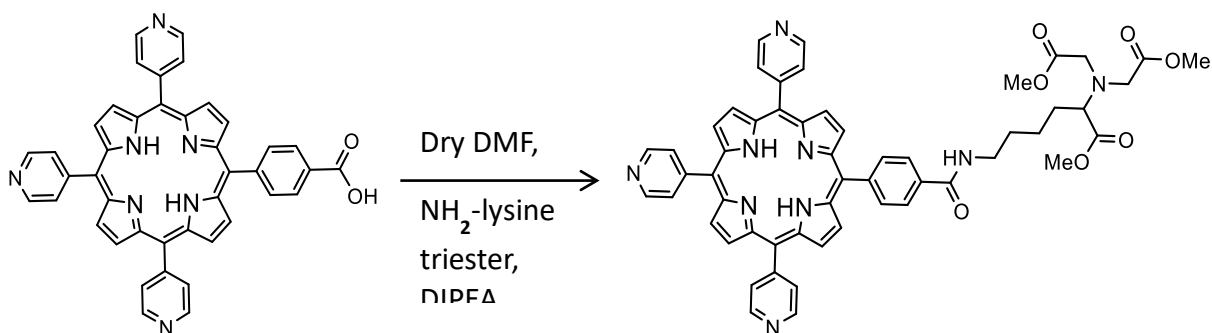
Σε δίλιαιμη σφαιρική φιάλη των 50 mL προστέθηκαν 20 mgr Tripyridyl-por-COOH και 5 mL dry DMF (διμεθυλομεθαναμίδιο). Η σφαιρική φιάλη συνδέθηκε με την αντλία κενού-αερίου Αζώτου (N₂). Ανοίχτηκε η αντλία και δημιουργήθηκε κενό στην πάνω μεριά του συστήματος και μετά ανοίχτηκε η στρόφιγγα της σφαιρικής φιάλης για τη δημιουργία κενού στο εσωτερικό της. Όταν το σύστημα ήρθε σε ισορροπία έκλεισε η στρόφιγγα της φιάλης και η παροχή κενού και ανοίχτηκε η παροχή αερίου. Παράχθηκαν φυσαλίδες στην παγίδα λαδιού του αερίου και επιβεβαιώθηκε η ισορροπία του συστήματος, τότε ανοίχτηκε η στρόφιγγα και εισήλθε αέριο μέσα στη σφαιρική φιάλη. Στη συνέχεια προστέθηκαν 15,31 mgr TEA (τριαιθυλαμίνη) και 26,7 mgr BOP ((Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate). Το διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση και προστατεύτηκε από το φώς. Η αντίδραση παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία TLC με διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂:EtOH (διχλωρομεθάνιο : αιθανόλη) με αναλογία 90 mL CH₂Cl₂ και 10 mL EtOH. Στο σημείο αυτό προστέθηκαν ακόμα 26,7 mg BOP. Αφού επαναλήφθηκε ο έλεγχος με TLC προστέθηκαν αυτή τη φορά 18,42 mgr NH₂-lysine trimester. Για να ολοκληρωθεί η αντίδραση χρειάστηκαν περίπου 24 ώρες. Στη συνέχεια το προϊόν καθίζανε με την προσθήκη μίγματος 30 mL DMF-H₂O (με αναλογία 1:5). Το διάλυμα διηθήθηκε υπό κενό και πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις με απεσταγμένο νερό για την απομάκρυνση του DMF. Το χωνί της διήθησης τοποθετήθηκε στο φούρνο του κενού για ξήρανση στους 40°C για 12 ώρες.

Για την απομόνωση του προϊόντος ακολουθήθηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας στήλης. Για την κολώνα υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε silica gel ως χρωματογραφικό υλικό και ως αρχικός διαλύτης έκλουσης το CH₂Cl₂: MeOH με αναλογία, 95mL CH₂Cl₂ και 5 mL MeOH. Οι διαστάσεις της κολώνας ήταν 12 cm * 3 cm. Η πολικότητα του διαλύτη αυξήθηκε σταδιακά κατά 0,5 mL. Το επιθυμητό κλάσμα συλλέχθηκε με μίγμα διαλυτών σε αναλογία, 93mL CH₂Cl₂ και 7 mL MeOH.

Απόδοση αντίδρασης: 12%

Με αυτή τη μέθοδο, η απόδοση της αντίδρασης ήταν τέσσερις φορές μεγαλύτερη από την πρώτη μέθοδο αλλά και πάλι ήταν πολύ χαμηλή. Γι'αυτό το λόγο δοκιμάστηκε άλλη μια μέθοδος coupling.

3^η μέθοδος:



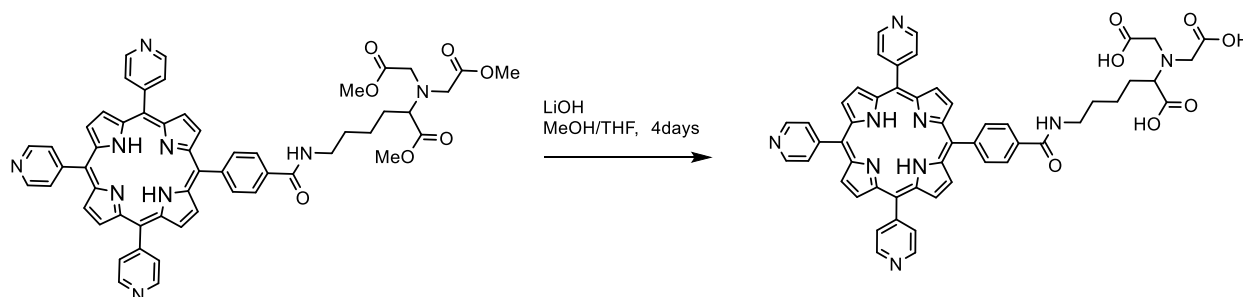
Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστέθηκαν 40 mgr Tripyridyl-por-COOH και 10 mL dry DMF και έπειτα συνδέθηκε με την αντλία κενού-αερίου Αζώτου (N₂). Ανοίχτηκε η αντλία και δημιουργήθηκε κενό στην πάνω μεριά του συστήματος και μετά ανοίχτηκε η στρόφιγγα της σφαιρικής φιάλης για τη δημιουργία κενού στο εσωτερικό της. Όταν το σύστημα ήρθε σε ισορροπία έκλεισε η στρόφιγγα της φιάλης και η παροχή κενού και ανοίχτηκε η παροχή αερίου. Παράχθηκαν φυσαλίδες στην παγίδα λαδιού του αερίου και επιβεβαιώθηκε η ισορροπία του συστήματος, τότε ανοίχτηκε η στρόφιγγα και εισήλθε αέριο μέσα στη σφαιρική φιάλη. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε παγόλουτρο και προστέθηκαν 92,048 mgr HATU (1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium-3-oxid hexafluorophosphate), το σύστημα αφέθηκε για μία ώρα υπό αυτές τις συνθήκες. Έπειτα προστέθηκαν 37,26 mgr NH₂-lysine triester και 200μL DIPEA (N'-N-Diisopropylethylamine). Η αντίδραση αφέθηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 72 ώρες. Μετά το πέρας των 72 ωρών, επιβεβαιώθηκε η ολοκλήρωση της αντίδρασης με τη χρήση χρωματογραφίας TLC σε διαλύτη CH₂Cl₂ : EtOH με αναλογία, 90mL CH₂Cl₂ και 10 mL EtOH. Το μίγμα της αντίδρασης αποστάχθηκε υπό κενό με υγρό άζωτο για απομάκρυνση του DMF. Το προϊόν της αντίδρασης διαλύθηκε σε 100mL Ethyl Acetate και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δύο εκχυλίσεις με 100 mL απεσταγμένου νερού κάθε φορά. Τέλος, το Ethyl Acetate αποστάχθηκε στον ρότορα κενού.

Για την απομόνωση του προϊόντος ακολουθήθηκε η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας στήλης. Για την κολώνα υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε λεπτή silica ως χρωματογραφικό υλικό και ως αρχικός διαλύτης έκλουσης το CH₂Cl₂: MeOH με αναλογία, 95mL CH₂Cl₂ και 5 mL MeOH. Οι διαστάσεις της κολώνας ήταν 10 cm x 3 cm. Με αυτή την αναλογία διαλυτών εκλούστηκε το επιθυμητό κλάσμα.

Απόδοση αντίδρασης: 60%

Σε αυτή την περίπτωση, η απόδοση της αντίδρασης ήταν αρκετά υψηλή. Συνεπώς, επιβεβαιώθηκε η επιτυχία της αντίδρασης και ακολούθησε το επόμενο στάδιο.

4.5. Σύνθεση της Tripyridyl-por-lys-tricarboxy

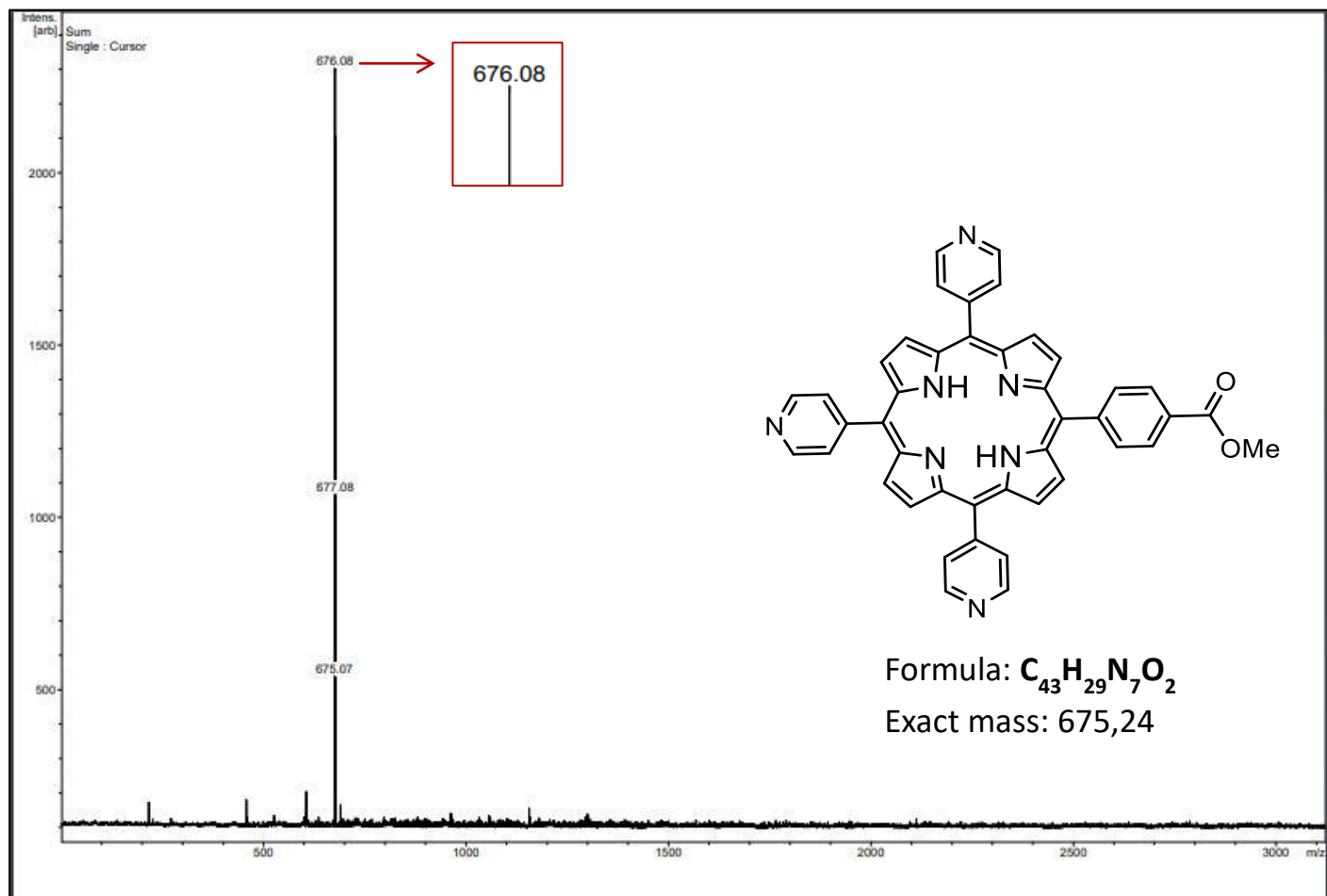


Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL προστέθηκαν 30 mgr Tripyridyl-por lys trimethyl-ester, 4,4 mL THF και 4,4 mL MeOH. Προσαρμόστηκε παγόλουτρο και προστέθηκαν 106,21 mgr LiOH.H₂O. Ακολουθήθηκε ανάδευση του μίγματος για 10 λεπτά και έπειτα απομακρύνθηκε το παγόλουτρο και εφαρμόστηκε ελαιόλουτρο. Το σύστημα αφέθηκε υπό ανάδευση στους 40 °C για 24 ώρες. Ελέγχθηκε η πορεία της αντίδρασης με TLC και διαλύτη έκλουσης CH₂Cl₂:MeOH, με αναλογία 95 mL CH₂Cl₂ και 5 mL MeOH. Φάνηκε πως υπήρχε μικρή ποσότητα της αρχικής πορφυρίνης στο σύστημα της αντίδρασης γι' αυτό προστέθηκαν επιπλέον 53,1 mg LiOH.H₂O. Το σύστημα αφέθηκε υπό ανάδευση στους 40 °C, προστατευμένο από το φώς, για 72 ώρες.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, προστέθηκαν 10 mL νερό στη σφαιρική φιάλη. Αποστάχθηκε το THF και η MeOH στον ρότορα του κενού. Έπειτα, εξουδετερώθηκε το βασικό διάλυμα με τη χρήση υδατικού διαλύματος HCl 3N και τοποθετήθηκε στο ψυγείο για καταβύθιση των κόκκων του στερεού. Το διάλυμα διηθήθηκε την επόμενη ημέρα υπό κενό και πραγματοποιήθηκαν εκπλύσεις με νερό και εξάνιο. Το χωνί της διήθησης τοποθετήθηκε στο φούρνο κενού για ξήρανση overnight.

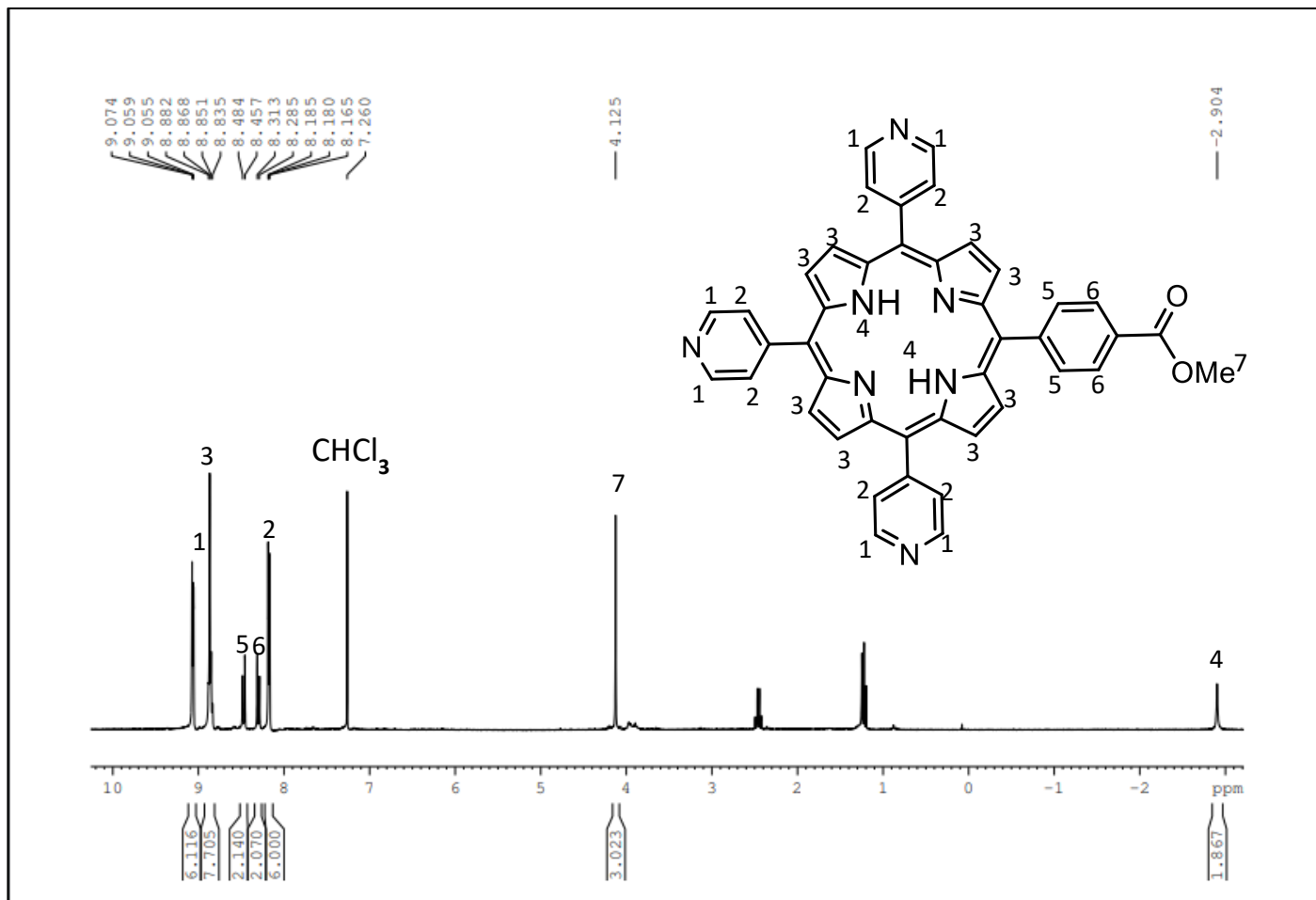
Ενότητα 5: Ανάλυση αποτελεσμάτων

Maldi-TOF: Tripyridyl-por-COOMe



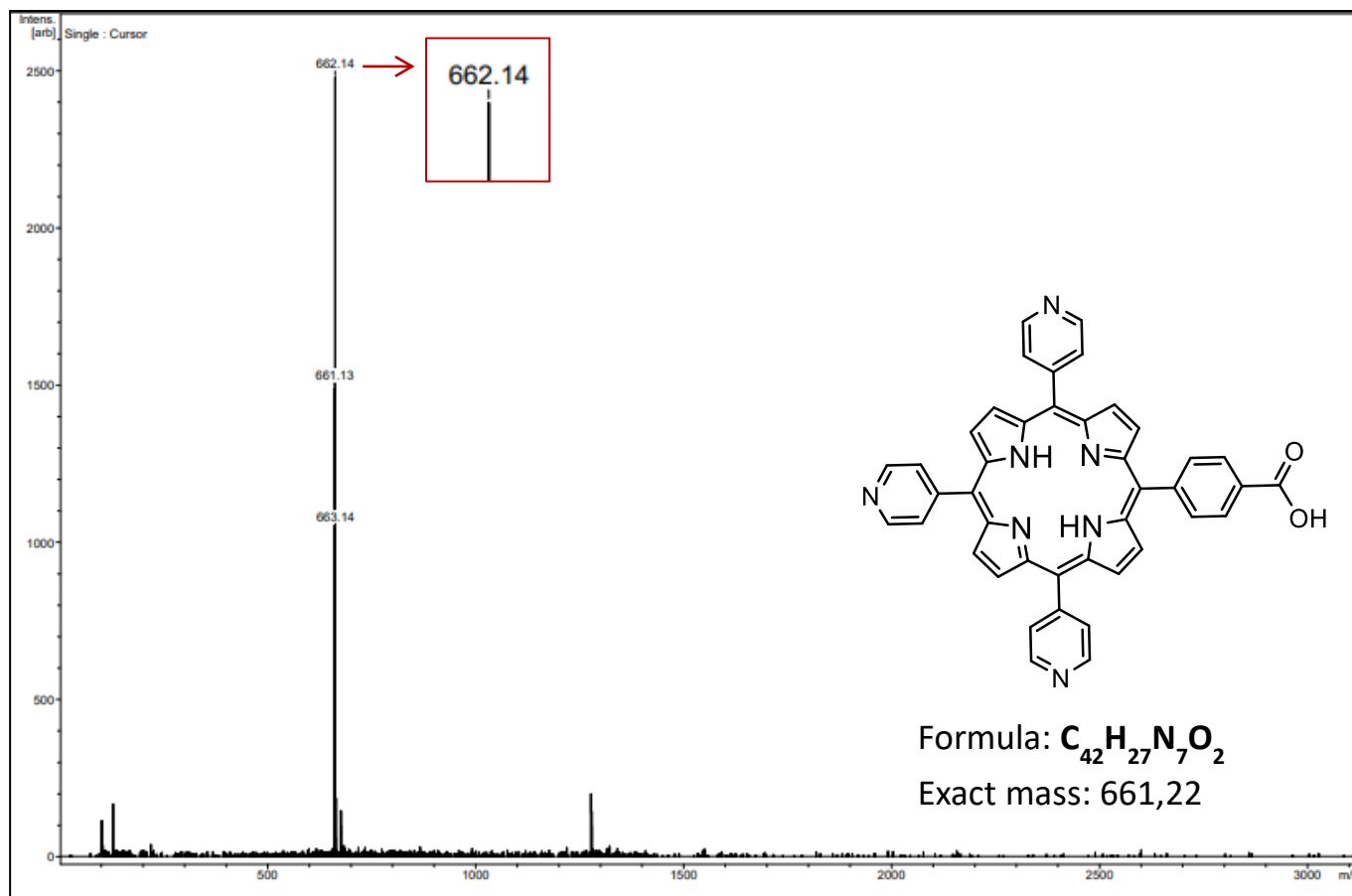
Στο φάσμα φαίνεται η κορυφή m/z για το exact mass της Tripyridyl-por-COOMe, με ένα επιπλέον υδρογόνο λόγω πρωτονίωσης κατά τον ιοντισμό.

NMR ^1H :Tripyridyl-por-COOMe



Στο φάσμα είναι αριθμημένες οι κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της πορφυρίνης που παρασκευάστηκε. Χαρακτηριστικές κορυφές είναι η 4 που αντιστοιχεί στα εσωτερικά πρωτόνια της πορφυρίνης και η 7 κορυφή που αντιστοιχεί στην μεθύλο-ομάδα της πορφυρίνης, οπότε επιβεβαιώνεται η επιτυχής παρασκευή της Tripyridyl-por-COOMe.

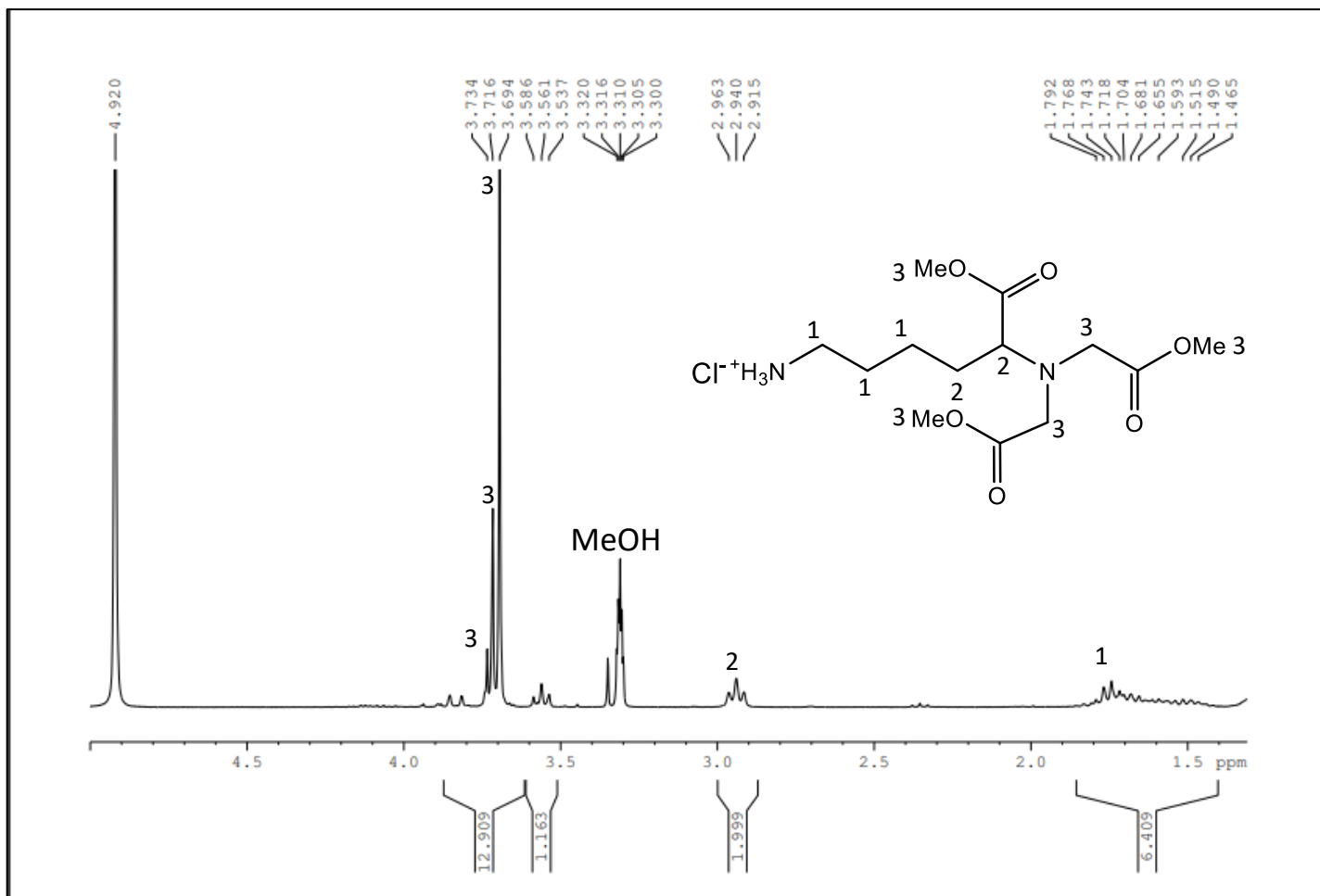
Maldi-TOF: Tripyridyl-por-COOH



Στο φάσμα φαίνεται η κορυφή m/z για το exact mass της Tripyridyl-por-COOH, με ένα επιπλέον υδρογόνο λόγω πρωτονίωσης κατά τον ιοντισμό.

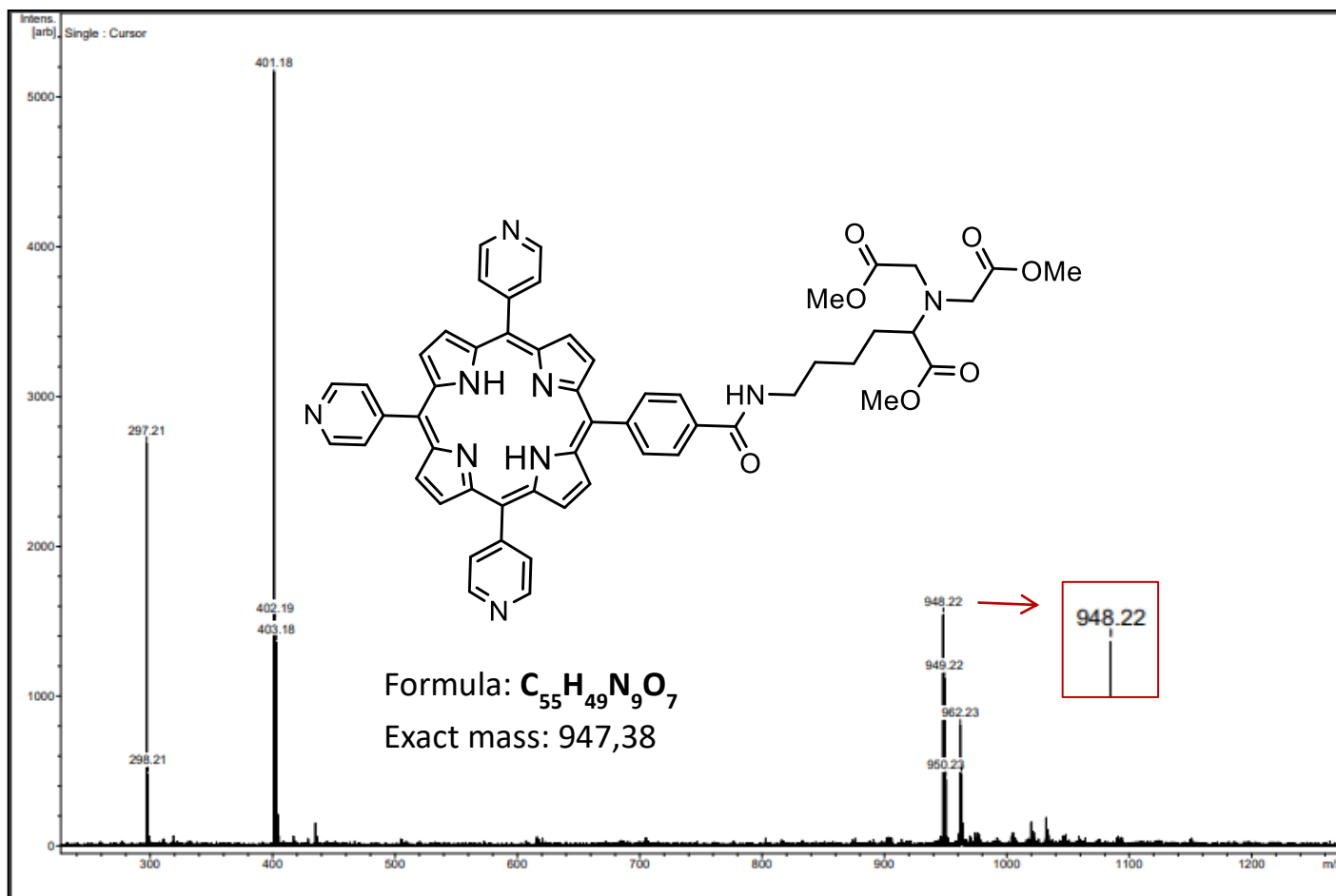
Λόγω της δυσδιαλυτότητας της ένωσης σε οργανικούς διαλύτες το φάσμα NMR ¹H δεν μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες για τη δομή.

*NMR*¹H: *NH*₂-lysine trimethyl-ester



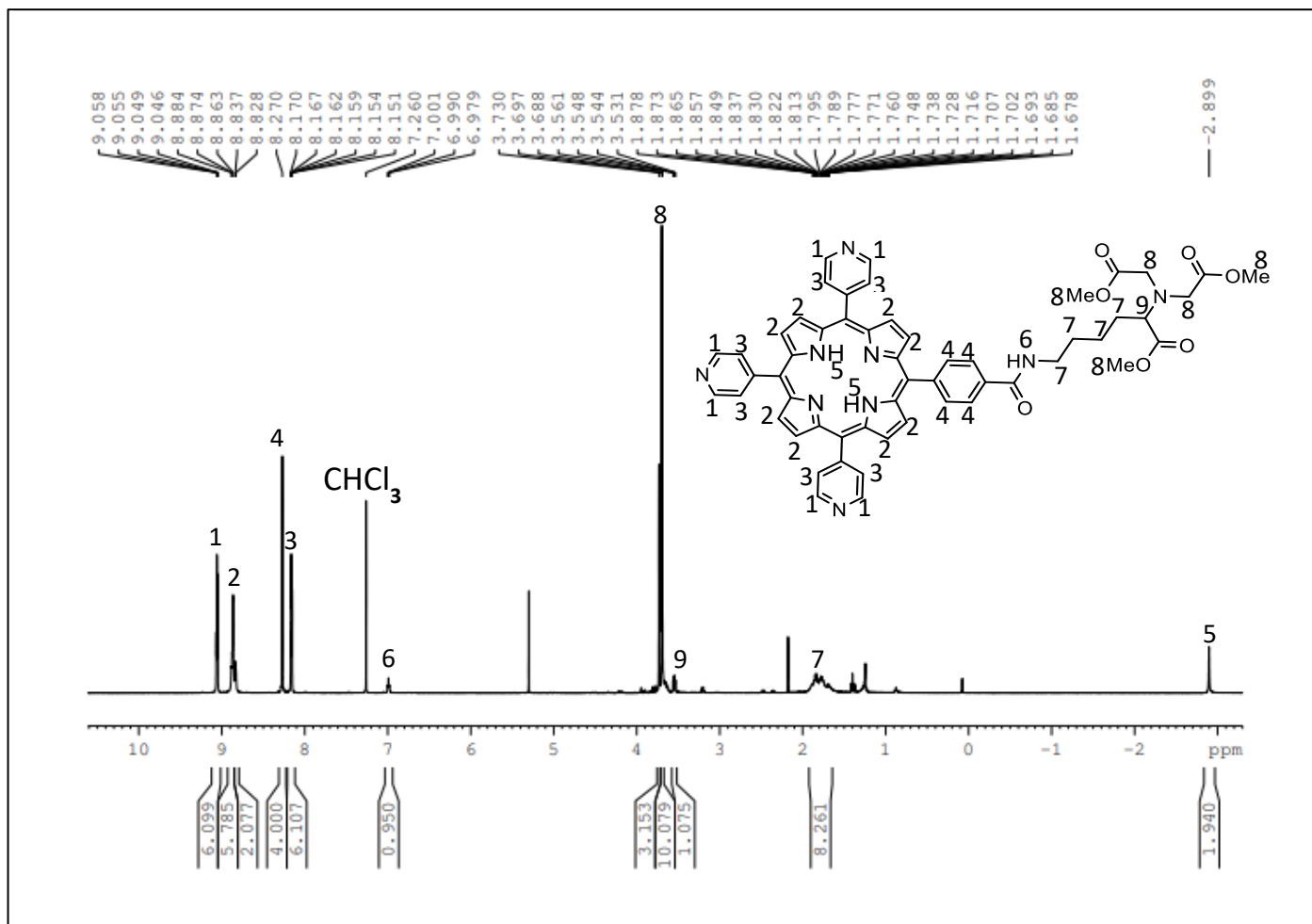
Στο φάσμα φαίνονται αριθμημένες οι χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων της *NH*₂-lysine trimethyl-ester.

Maldi-TOF: Tripyridyl-por-lysine-trimethyl ester



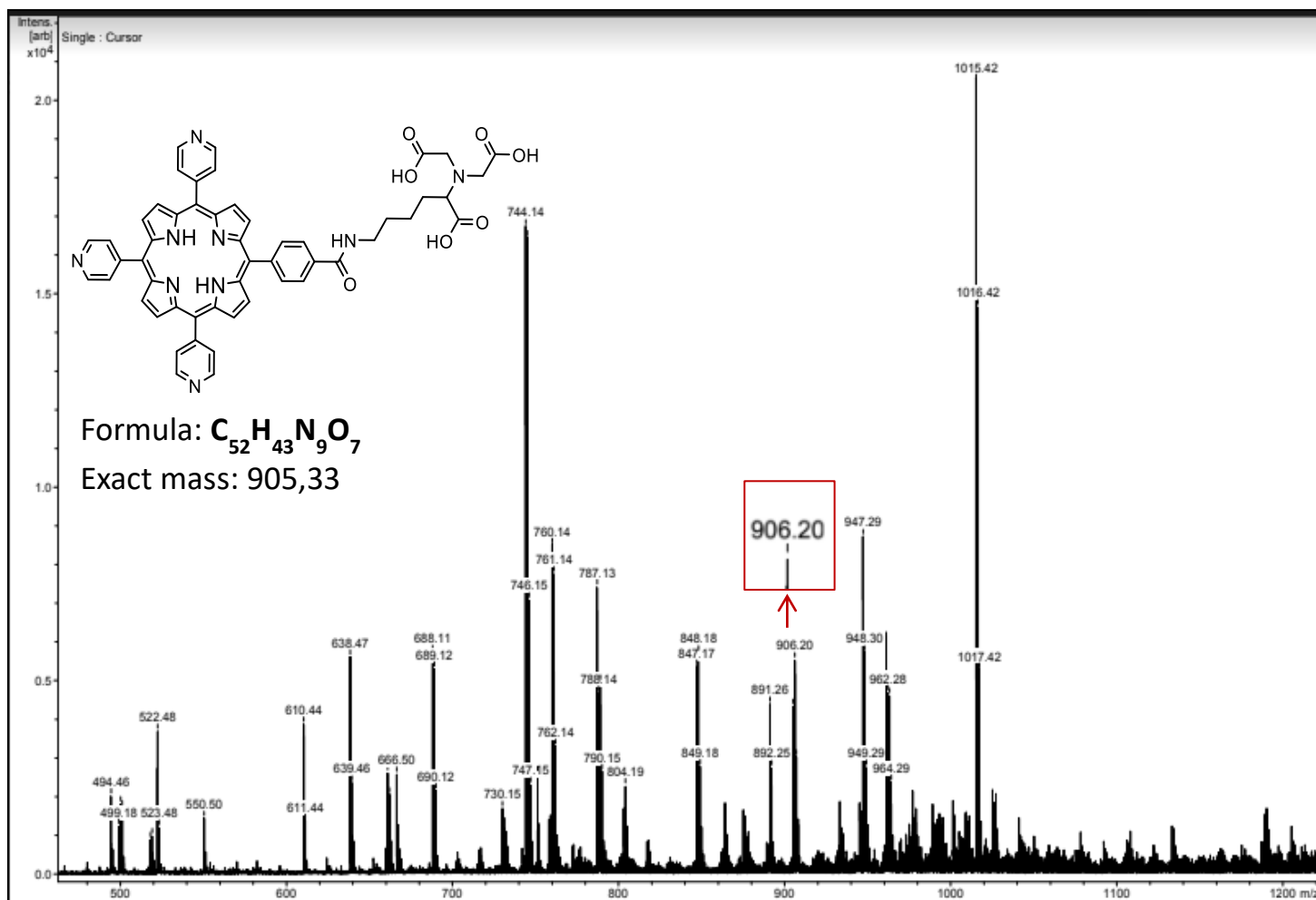
Στο φάσμα φαίνεται η κορυφή m/z για το exact mass της Tripyridyl-por-lysine-trimethyl ester με ένα πρωτόνιο λιγότερο λόγω αποπρωτονίωσης. Επίσης, φαίνονται και κάποιες κορυφές μικρότερης και μεγαλύτερης έντασης που ίσως να οφείλονται σε θραύσματα που έχουν προκύψει κατά τον ιοντισμό της ένωσης. Οπότε φαίνεται η επιτυχής παρασκευή της επιθυμητής ένωσης.

*NMR*¹H: Tripyridyl-por-lysine-trimethyl ester



Στο φάσμα φαίνονται αριθμημένες οι χαρακτηριστικές κορυφές της επιθυμητής ένωσης. Χαρακτηριστική κορυφή είναι η 6 η οποία αντιπροσωπεύει το πρωτόνιο του αμιδικού δεσμού που σχηματίστηκε μεταξύ του άνθρακα της καρβόξυ-ομάδας της πορφυρίνης και της αμινο-ομάδας της λυσίνης και αποδεικνύει την επιτυχή παρασκευή της Tripyridyl-por-lysine-trimethyl ester.

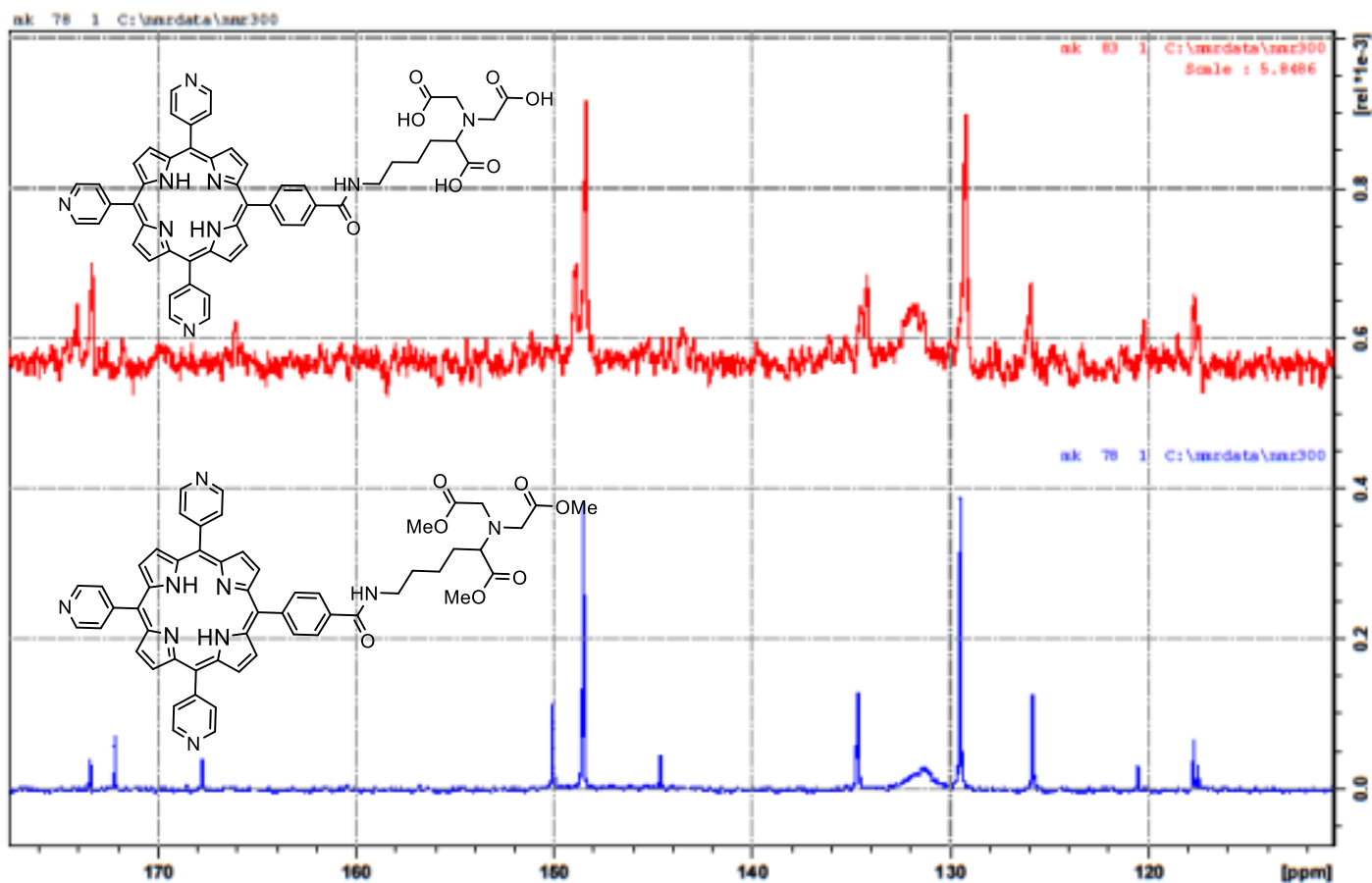
Maldi-TOF: Tripyridyl-por-lysine-tricarboxy



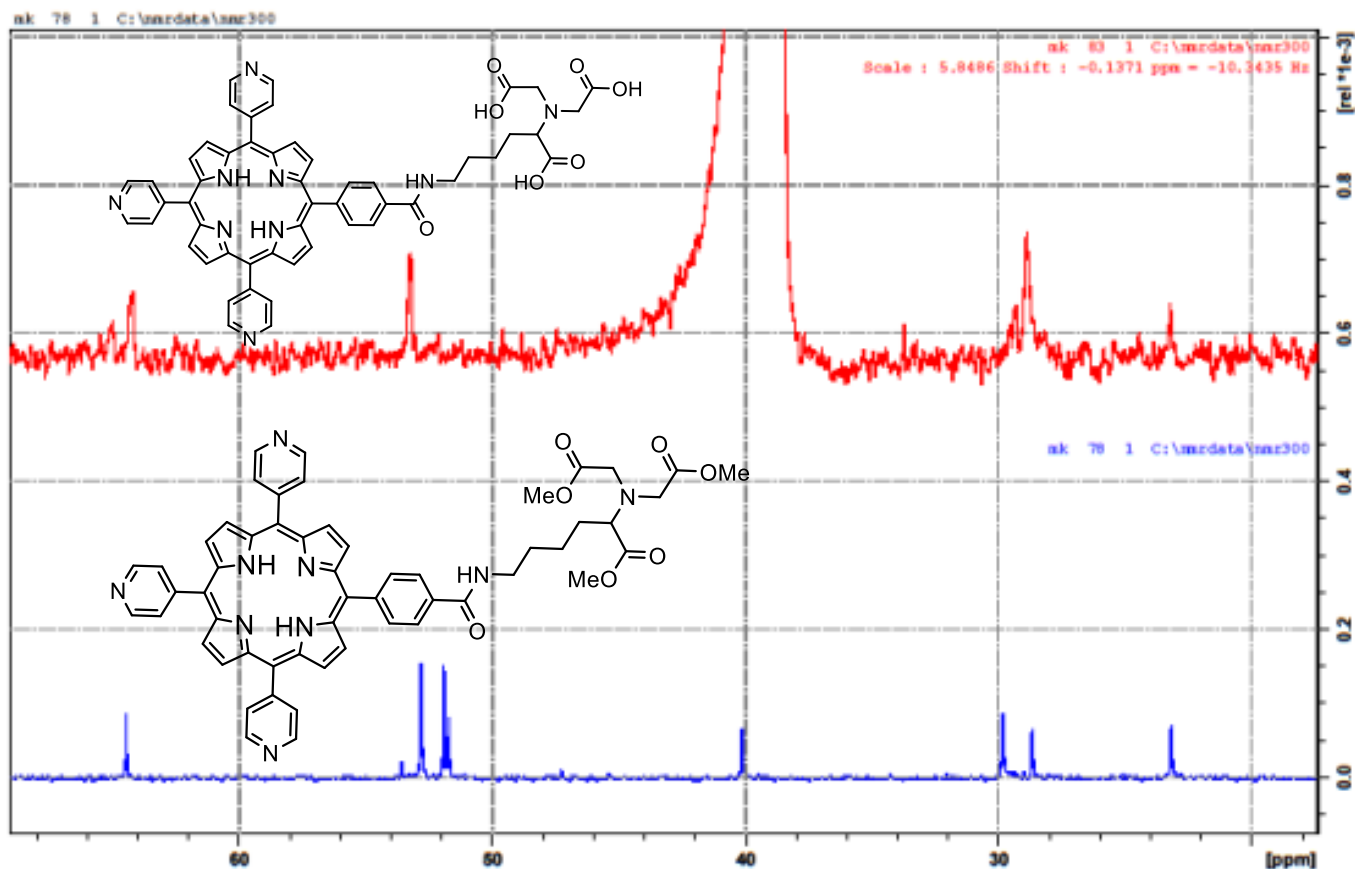
Στο φάσμα φαίνεται η κορυφή m/z για το exact mass της Tripyridyl-por-lysine-tricarboxy με ένα υδρογόνο επιπλέον λόγω πρωτονίωσης κατά τον ιοντισμό. Επίσης, φαίνονται και κάποιες κορυφές μικρότερης και μεγαλύτερης έντασης που ίσως να οφείλονται σε θραύσματα που έχουν προκύψει κατά τον ιοντισμό της ένωσης. Οπότε φαίνεται η επιτυχής παρασκευή της επιθυμητής ένωσης.

Σύγκριση φασμάτων NMR ^{13}C μεταξύ της Tripyridyl-por-lysine-tricarboxy και Tripyridyl-por-lysine-trimethyl ester.

Λόγω του ότι η τελικής μας ένωση είναι δυσδιάλυτη σε οργανικούς διαλύτες δεν μπορούμε να βγάλουμε συμπέρασμα από τα φάσματα πρωτονίου. Παρατηρώντας τα 2D φάσματα του τριεστέρα συμπαίρνουμε πως η κορυφή στα 52 ppm ανήκει στον μεθόξυ άνθρακα.



Τα δύο φάσματα που φαίνονται παραπάνω είναι φάσματα NMR ^{13}C της Tripyridyl-por-lysine-tricarboxy (κόκκινο φάσμα) και της Tripyridyl-por-lysine-trimethyl ester (μπλε φάσμα). Στην συγκεκριμένη εικόνα φαίνεται η αρωματική περιοχή των δύο ενώσεων και όπως είναι φανερό δεν υπάρχει καμία διαφορά μεταξύ τους. Έτσι παρατηρώντας τα δύο φάσματα υπάρχει πλήρης αντιστοιχία των κορυφών του ενός φάσματος με το άλλο.



Σε αυτή την εικόνα φαίνεται η χαρακτηριστική περιοχή 20-70 ppm των φασμάτων άνθρακα των πορφυρίνων. Στο φάσμα της Tripyridyl-porphyrin-lysine-trimethyl-ester στα 52 ppm περίπου φαίνονται δύο χαρακτηριστικές κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στους μεθόξυ-άνθρακες της πορφυρίνης. Η απουσία αυτών των δύο χαρακτηριστικών κορυφών στο φάσμα της Tripyridyl-porphyrin-lysine-tricarboxy αποδεικνύει την πλήρη υδρόλυση των εστέρων και την παρασκευή της επιθυμητής πορφυρίνης.

Ενότητα 6: Βιβλιογραφία

1. <https://www.britannica.com/science/porphyrin>
2. Schaeffer P., Callot J., Albrecht P., *Nature*, 364, 133, 1993
3. Fuhrhop J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* , 15, 321, 1974
4. Wong W., Zhang L., Wong W. et al., *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions*, (4), 615-622 , 1999
5. Spyroulias G, Despotopoulos A, Raptopoulou C, Terzis A, Coutsolelos A., *Chemical Communications*, 8, 783-784, 1997
6. Li L., Diao E., *Chem. Soc. Rev.*, 42(1), 291-304, 2013
7. Thorn K., *Mol Biol Cell*. 2017 Apr 1;28(7):848-857
8. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS., *Front Microbiol*. 2015 Aug 5;6:791.
9. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G., *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 36, Issue 2, March 2012
10. Diehn S., Zimmermann B., Bağcıoğlu M., Seifert S., Kohler A., Ohlson M., Fjellheim S., Weidner S., Kneipp J., *Scientific Reports* 8, Article number: 16591 (2018)
11. <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>
12. You, C.; Piehler, J. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406, 3345-3357
13. Goldsmith, C.R.; Jaworski, J.; Sheng, M.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 418-419
14. Salam, A.; Aoki, K. *Inorg. Chim. Acta*. 2000, 311, 15-24
15. Hochuli, E.; Bannwarth, W.; Döbeli, H.; Gentz, R.; Stüber, D. *Nat. Biotechnol.* 1988, 6 (11), 1321-1325
16. Guignet, E.G.; Hovius, R.; Vogel, H. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22, 440-444
17. Daniel C. Harris, Ποσοτική χημική ανάλυση, πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2010
18. John Mcmurry, Οργανική Χημεία, πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2015
19. Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 6^η έκδοση, Κωσταράκη εκδόσεις, 2007
20. Κεσίσογλου Δ., Ψωμάς Γ., Βιοανόργανη Χημεία, εκδόσεις ΖΗΤΗ, 2011