ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΥΝΑΡΜΟΓΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ - ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Πρόδρομες Ενώσεις για Βιομιμητικά Μοντέλα Κυτοχρωμικής *c* Οξειδάσης»

Χαραλαμπίδης Γιώργος

Ηράκλειο 2005

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα σημαντικό βιολογικό μόριο, το οποίο καταλύει την αναγωγή του O_2 προς το σχηματισμό H_2O είναι η κυτοχρωμική *c* οξειδάση. Η ενέργεια που εκλύεται χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP, καθώς τα πρωτόνια ρέουν πίσω στη μιτοχονδριακή μήτρα μέσω της ATP συνθάσης. Η δομή του ενεργού της κέντρου είναι γνωστή από κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Παρόλα αυτά, αρκετά σημεία παραμένουν ανεξιχνίαστα όπως για παράδειγμα ο ρόλος του χαλκού Cu_B και της τυροσίνης, στη δέσμευση και την αναγωγή του O_2. Επομένως, για να κατανοήσουμε καλύτερα το μηχανισμό κατάλυσης, είναι σημαντικό να συνθέσουμε βιομιμητικές ενώσεις-μοντέλα, που θα προσομοιάζουν δομικά το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν δυο καινούργιες πορφυρίνες **1**, **2**, ως ενώσεις-μοντέλα για την κυτοχρωμική *c* οξειδάση, φέροντας ένα μόριο τυροσίνης συνδεδεμένο με το πορφυρινικό δακτύλιο. Η σύνθεση της πορφυρίνης **1** έγινε με αντίδραση νιτροβενζαλδεΰδης και διπυρρομεθανίου, το οποίο φέρει ογκώδεις ομάδες, ώστε να γίνεται ευκολότερα ο διαχωρισμός των *α*,*α*- και *α*,*β*-ισομερών. Έπειτα ένα μόριο που αποτελούνταν από πυριδίνες (θέση δέσμευσης του Cu) και ένα μόριο τυροσίνης προστέθηκαν στον πορφυρινικό δακτύλιο με αμιδικούς δεσμούς. Από την άλλη πλευρά η πορφυρίνη **2** είχε σαν βάση το *α*,*α*,*α*,*α*-ισομερές της τέτρα-αμινοπορφυρίνης. Τέλος, ένα μόριο N,N΄,N΄΄-τριβένζυλο-τρις(αμινοέθυλο)αμίνης και ένα μόριο τυροσίνης προστέθηκαν στην πορφυρίνη με δεσμό ουρίας και αμιδικό δεσμό αντίστοιχα.

ABSTRACT

Cytochrome c oxidase is an important porphyrin-containing enzyme, that catalyzes the four-electron ($4e^-$), four-proton ($4H^+$) reduction of O_2 to H_2O. The resulting energy is used to generate ATP as protons flow back through the membrane via ATP synthase. The structure of its active site is well known thanks to X-ray crystallography. Nonetheless, many issues such as the roles of copper Cu_B and Tyr residue in O_2 binding, and reduction remain subjects of debate. In order to better understand the catalytic mechanism it is important to synthesize model compounds that closely resemble the native enzyme active sites. In this study novel porphyrins **1**, **2** have been prepared as model compounds of cytochrome *c* oxidase active site, bearing a tyrosine molecule covalently attached to the porphyrin ring. The synthesis of porphyrin **1** involved the condensation reaction of nitrobenzaldehyde and dipyrromethane bearing bulky groups, in order to facilitate the separation of *α*,*α*- and *α*,*β*-atropisomers. Then a pyridine based ligand (potential copper binding site) and a tyrosine molecule were attached via amide bonds to the central scaffold. On the other hand, porphyrin **2** was synthesized using *α*,*α*,*α*,*α*-isomer of the aminoporphyrin as a template. N,N',N''-tribenzyl-tris(aminoethyl)amine and a tyrosine molecule were attached to the aminoporphyrin via urea and amide bonds respectively.

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *Το οξυγόνο στην αναπνευστική αλυσίδα* 1

1.2 *Η οικογένεια των αιμο-χαλκών οξειδασών* 2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ *c* ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

2.1 *Δομή της κυτοχρωμικής c οξειδάσης* 4

2.1.1 *Υπομονάδα I* 5

2.1.2 *Υπομονάδα II* 8

2.1.3 *Υπομονάδα III* 9

2.2 *Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων* 9

2.3 *Μηχανισμός καταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου* 9

2.3.1 *Όξυ ενδιάμεσο A* 11

2.3.2 *Περόξο ενδιάμεσο P* 12

2.3.3 *Φέρυλ ενδιάμεσο F* 13

2.3.4 *Υδρόξυ ενδιάμεσο O'* 13

2.4 *Ο ρόλος της τυροσίνης 244 στην καταλυτική δράση του ενζύμου* 13

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ *c* ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

3.1 *Εισαγωγή* 18

3.2 *Μοντέλα με μ-όξο και μ-ύδροξο γέφυρες* 19

3.2.1 *Σύνθεση* 21

3.2.2 *Δομικές μελέτες* 21

3.2.3 *Μελέτες Mössbauer και μαγνητικής επιδεκτικότητας* 22

3.2.4 *Μελέτες με φασματοσκοπία NMR* 22

3.2.5 *Τιτλοδοτήσεις στα μ-όξο και μ-ύδροξο μοντέλα* 23

3.3 *Μουτέλα με γέφυρα κυανίου (CN)*..... 24
3.3.1 *Σύνθεση* 24
3.3.2 *Δομικές μελέτες* 25
3.3.3 *Μελέτες Mössbauer και μαγνητικής επιδεκτικότητας*..... 26
3.3.4 *Μελέτες με φασματοσκοπία NMR* 27
3.3.5 *Μελέτες με φασματοσκοπία IR* 27
3.4 *Μουτέλα με περόξο γέφυρα* 28
3.4.1 *Μελέτη της αντίδρασης δέσμευσης του O_2* 29
3.4.2 *Φασματοσκοπικές μελέτες των μ-περόξο συμπλόκων* 30
3.4.3 *Παράγουτες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των μ-περόξο συμπλόκων*..... 30
3.4.4 *Μελέτη της δομής της μ-περόξο γέφυρας*..... 31
3.5 *Μελέτη της καταλυτικής δράσης των βιομημιτικών μουτέλων*..... 32
3.5.1 *Μεθοδολογία των ηλεκτροκαταλυτικών μελετών* 32
3.5.2 *Δομικοί πεσριορισμοί των μουτέλων που μελετώνται ηλεκτροχημικά* 33
3.5.3 *Διερεύνηση του ρόλου του χαλκού*..... 35
3.6 *Μουτέλα με σκοπό τον προσδιορισμό του ρόλου της τυροσίνης* 37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

5.1 *Ανάλυση συνθετικής πορείας για το μουτέλο 1*..... 43
5.2 *Ανάλυση συνθετικής πορείας για το μουτέλο 2*..... 48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.1 *Σύνθεση του 5-μεσιτυλδιπυρρομεθανίου (3)*..... 53

6.2 *Σύνθεση 5,15-διμεσίτυλο-10,20(2-νιτροφαίνυλο)πορφυρίνης (4a,4b)*..... 54

6.3 *Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-αμινοφαίνυλο)-20(2νιτροφαίνυλο) πορφυρίνης (5)*..... 56

6.4 Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-χλωροακεταμιδοφαίνυλο)-20(2-νιτροφαίνυλο) πορφυρίνης (6)..... 57

6.5 *Σύνθεση της δις(2-(2-πυριδυλ)αιθυλ)αμίνης (BPEA)*..... 58

6.6 *Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-(NHCOCH$_2$-BPEA)-φαίνυλο)-20(2-νιτροφαίνυλο) πορφυρίνης (7)*..... 59

6.7 *Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-(NHCOCH$_2$-BPEA)-φαίνυλο)-20(2- αμινοφαίνυλο) πορφυρίνης (8)*..... 60

6.8 *Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-(NHCOCH$_2$-BPEA)-φαίνυλο)-20(2-(Fmoc-(tBu)Tyr)-φαίνυλο) πορφυρίνης (9)* 61

6.9 *Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-(NHCOCH$_2$-BPEA)-φαίνυλο)-20(2-((tBu)Tyr)-φαίνυλο) πορφυρίνης (10)*..... 62

6.10 *Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-(NHCOCH$_2$-BPEA)-φαίνυλο)-20(2-(Tyr)-φαίνυλο) πορφυρίνης (1)* 64

6.11 *Σύνθεση της 5,10,15,20-τετρακις-(2-νιτροφαίνυλο) πορφυρίνης (11)* 65

6.12 *Σύνθεση της 5,10,15,20-τετρακις-(2-αμινοφαίνυλο) πορφυρίνης (12)* 66

6.13 *Μετατροπή του μίγματος των ατροποϊσομερών της 12 προς την a,a,a,a-5,10,15,20-τετρακις-(2-αμινοφαίνυλο) πορφυρίνη 12a*..... 67

6.14 *Σύνθεση της τρις(2-βενζυλ-αμινο-αιθυλ)αμίνης (TBTREN)* *68*

6.15 *Σύνθεση της 5,10,15(2-(NHCO-TBTREN)-φαινυλο)-20(2-αμινοφαίνυλο) πορφυρίνης (13)*..... 69

6.16 *Σύνθεση της 5,10,15(2-(NHCO-TBTREN)-φαινυλο)-20(2-(Fmoc-(tBu)Tyr)-φαίνυλο) πορφυρίνης (14)*..... 70

6.17 *Σύνθεση της 5,10,15(2-(NHCO-TBTREN)-φαινυλο)-20(2-((tBu)Tyr)-φαίνυλο) πορφυρίνης (2)*..... 71

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

7.1 *Διάκριση των ατροποϊσομερών 4a και 4b μέσω της φασματοσκοπίας ^{1}H-NMR* 72

7.2 *Προσδιορισμός της δομής των μοντέλων μέσω της φασματοσκοπίας ^{1}H-NMR* 73

7.3 *Συμπεράσματα* 75

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΣΥΝΤΕΘΗΚΑΝ 77

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

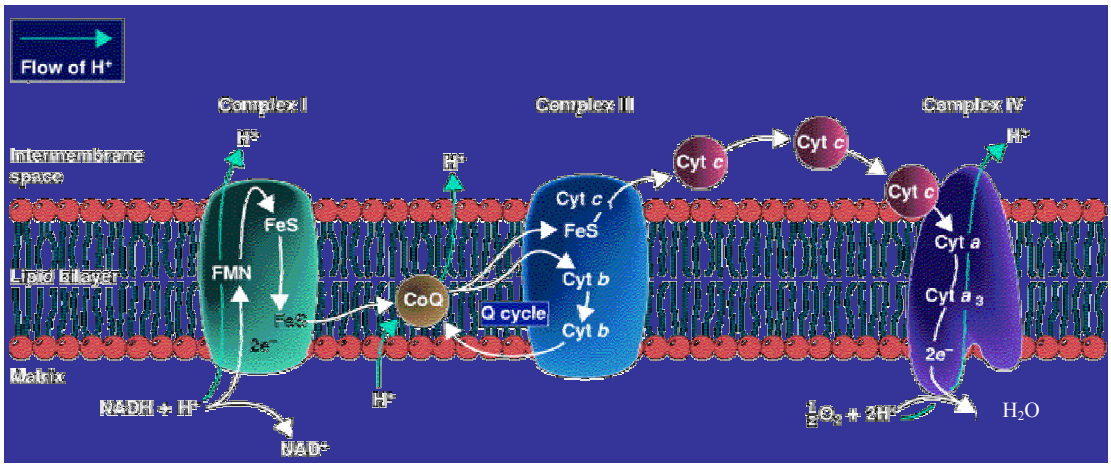
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το οξυγόνο στην αναπνευστική αλυσίδα

Το μοριακό οξυγόνο εμφανίστηκε στη γη πριν περίπου 2.5 δισεκατομμύρια χρόνια και έφτασε στα σημερινά του επίπεδα συγκέντρωσης, μετά από 2 δισεκατομμύρια χρόνια. Η ακριβής ιστορία της αύξησης του ποσοστού του οξυγόνου δεν είναι γνωστή, αλλά η γενική θεωρία που επικρατεί υποστηρίζει ότι η αύξηση του οφείλεται σε κάποια αρχέγονα κυανοβακτήρια τα οποία ήταν ικανά να πραγματοποιούν τη φωτοσυνθετική διαδικασία.[1] Το οξυγόνο απελευθερωνόταν ως προϊόν της φωτοσύνθεσης με αποτέλεσμα τα επίπεδά του να ανέβουν πολύ γρήγορα. Αυτή η απότομη αλλαγή προς μια οξυγονωμένη ατμόσφαιρα οδήγησε σε μια καταστροφική «ρύπανση», αλλά οι οργανισμοί εξελίχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να εκμεταλλευθούν την παρουσία του οξυγόνου.[2] Οι ενεργές θέσεις των ενζύμων που ήταν ικανές να προσδένουν και να ενεργοποιούν το οξυγόνο εξελίχθηκαν και η αποτελεσματικότητα του μεταβολισμού της τροφής άλλαξε δραματικά. Για παράδειγμα το ποσό του ATP το οποίο παράγεται από τον αερόβιο μεταβολισμό της γλυκόζης αυξήθηκε κατά 20%. Αυτή η εξελικτική πορεία είναι προφανής σήμερα καθώς όλοι οι ανώτεροι οργανισμοί είναι σχεδιασμένοι για τη δέσμευση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου, τη διανομή του στα κύτταρα και την αναγωγή του σε νερό με τη διαδικασία της κυτταρικής αναπνοής.[3]

Το 95% του οξυγόνου το οποίο καταναλώνουν οι άνθρωποι χρησιμοποιείται στην αναπνοή. Κατά τη διάρκεια της αναπνοής υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια τα οποία προέρχονται από την τροφή καταλήγουν στα μιτοχόνδρια, όπου διασχίζουν μια σειρά ενζυμικών κέντρων συμμετέχοντας σε διαδοχικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις (Σχήμα 1.1). Η ελεύθερη ενέργεια που εκλύεται από αυτές τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις χρησιμοποιείται για τη μεταφορά πρωτονίων από την εσωτερική (μιτοχονδριακή μήτρα) προς την εξωτερική πλευρά (διαμεμβρανικός χώρος) της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η διαβάθμιση πρωτονίων που δημιουργείται με τον τρόπο αυτό χρησιμοποιείται από τη συνθάση του ATP για τη μετατροπή του

ADP και του ορθοφωσφορικού προς ATP.[4] Το οξυγόνο αποτελεί τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα δεσμεύοντας τα ηλεκτρόνια, ενώ ταυτόχρονα ανάγεται προς νερό. Η αναγωγή του οξυγόνου καταλύεται από μια οικογένεια ενζύμων τις τελικές αιμο-χαλκο-οξειδάσες.



Σχήμα 1.1: *Αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων*

1.2 Η Οικογένεια των αιμο-χαλκο οξειδασών

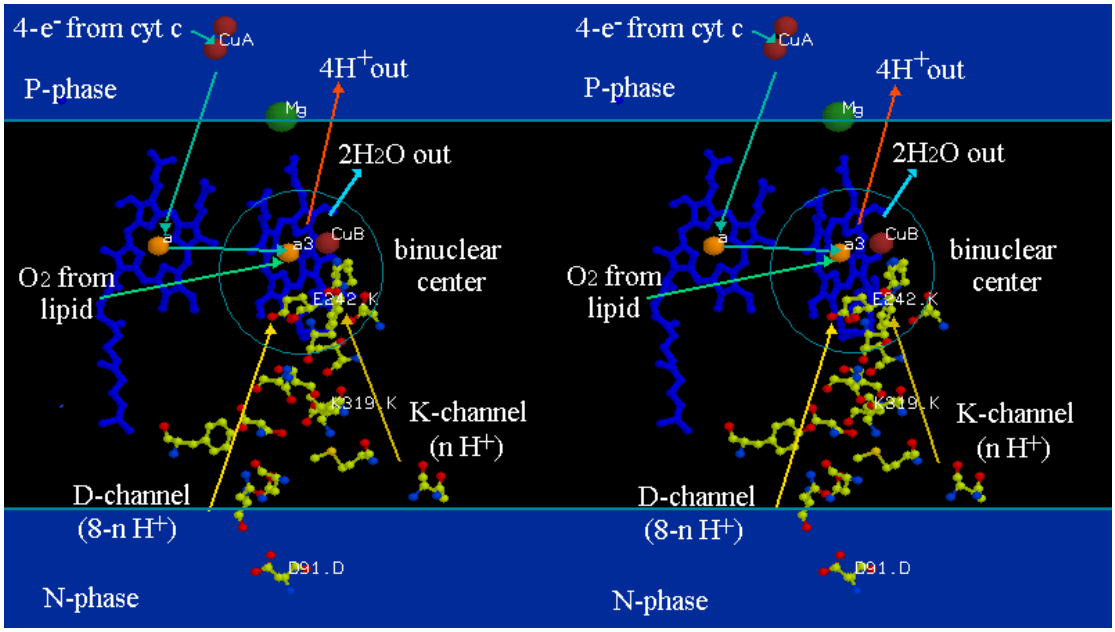
Οι αιμο-χαλκο οξειδάσες αποτελούν τα τελικά αναπνευστικά ένζυμα (Σχήμα 1.1) τα οποία καταλύουν την αναγωγή του οξυγόνου προς νερό χωρίς την απελευθέρωση βλαβερών ενδιαμέσων.[5] Υπάρχουν αρκετά είδη οξυγόνου (υπεροξείδιο, περοξείδιο και διάφορες ρίζες) τα οποία εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα και παράγονται από τη μερική αναγωγή του οξυγόνου. Όλα αυτά τα είδη είναι βλαβερά για τα κύτταρα και ικανά να καταστρέψουν ακόμη και το ίδιο το ένζυμο. Οι αιμο-χαλκο οξειδάσες κατά τη διαδικασία της αναγωγής διατηρούν δεσμευμένα αυτά τα είδη οξυγόνου προφυλάσσοντας τα κύτταρα.

Η ενέργεια που απελευθερώνεται από την αναγωγή του οξυγόνου είναι αρκετά μεγάλη και συζεύγνυται με τη μεταφορά πρωτονίων μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Κατά την αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου αντλούνται συνολικά οκτώ πρωτόνια από την εσωτερική πλευρά της μεμβράνης εκ των οποίων τα τέσσερα από αυτά χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό του νερού και τα υπόλοιπα τέσσερα απελευθερώνονται στον διαμεμβρανικό χώρο (Σχήμα 1.2) συμβάλλοντας στη

δημιουργία διαβάθμισης πρωτονίων. Συνεπώς, η συνολική αντίδραση που καταλύουν οι τελικές αιμο-χαλκο οξειδάσες έχει ως εξής:

$$8H^{+}_{in} + 4e^{-} + O_2 \rightarrow 4H^{+}_{out} + 2H_2O$$

Ο δότης των τεσσάρων ηλεκτρονίων που απαιτούνται για την αναγωγή του οξυγόνου προς νερό είναι το κυτόχρωμα *c* το οποίο βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο.



Σχήμα 1.2: *Σχηματική αναπαράσταση των λειτουργιών του ενζύμου*

Η υπερ-οικογένεια των αιμο-χαλκο οξειδασών καθορίζεται από δυο κριτήρια:[6] i) την υψηλού βαθμού ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων της μεγαλύτερης υπομονάδας (υπομονάδα I) και ii) ένα μοναδικό διμεταλλικό κέντρο αποτελούμενο από μια υψηλού σπιν αίμη και ένα χαλκό. Η υπερ-οικογένεια μπορεί να διαχωριστεί στις κινολικές και στις κυτοχρωμικές *c* οξειδάσες βάση της ταυτότητας του δότη ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται. Οι κινολικές οξειδάσες χρησιμοποιούν ως πηγή ηλεκτρονίων την ουβικινόνη ενώ οι κυτοχρωμικές το κυτόχρωμα *c*. Οι κυτοχρωμικές οξειδάσες απαντώνται στα μιτοχόνδρια όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών και σε πολλά αεροβικά βακτήρια ενώ οι κινολικές απαντώνται μόνο σε κάποιους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι κυτοχρωμικές οξειδάσες παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον και στο επόμενο κεφάλαιο περιγράφεται αναλυτικά η δομή και η καταλυτική δράση αυτών των ενζύμων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

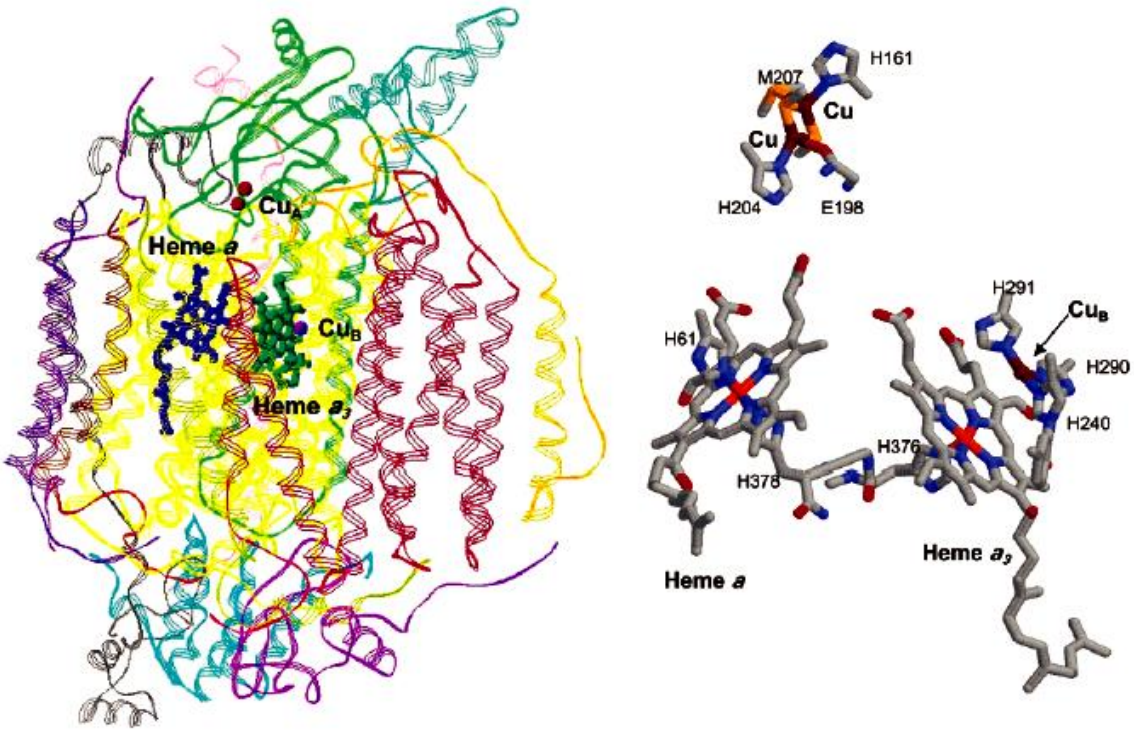
ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ *c* ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

2.1 Δομή της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης

Η οικογένεια των κυτοχρωμικών *c* οξειδασών λόγω της σημαντικής θέσης που κατέχει στο μεταβολισμό έχει μελετηθεί εκτεταμένα χρησιμοποιώντας βιοχημικές, γενετικές, φασματοσκοπικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους.[5] Αρκετά χρόνια πριν βρεθεί η τρισδιάστατη δομή του ενζυμικού αυτού συμπλόκου είχαν προταθεί πιθανοί μηχανισμοί για τη λειτουργία του, στηριζόμενοι σε φασματοσκοπικές μελέτες[3] καθώς και σε πειράματα μετάλλαξης.[7] Αυτό που συνέβαλε σημαντικά στην κατανόηση της εσωτερικής λειτουργίας του ενζύμου τα τελευταία χρόνια, ήταν ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του.

Η δομή της οξειδωμένης κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης που απομονώθηκε από το βακτήριο *Paraccocus Denitrificans*[8] και από την καρδιά βοοειδούς[9] προσδιορίστηκε το 1995 με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ (Σχήμα 2.1). Σύντομα ακολούθησαν βελτιωμένες, υψηλότερης ανάλυσης δομές των δυο αυτών ενζύμων[10,11] καθώς και της ανηγμένης μορφής τους.[12,13] Στα επόμενα έτη, τρεις επιπλέον οξειδωμένες δομές αιμο-χαλκο οξειδασών έχουν περιγραφεί: από τα βακτήρια *Thermus thermophilus*,[14] *Rhodobacter sphaeroides*[15] και *E. coli*.[16]

Ο αριθμός των υπομονάδων παρουσιάζει μεγάλη διαφορά ανάμεσα στα βακτηριακά ένζυμα (4 υπομονάδες) και τη μιτοχονδριακή οξειδάση (13 υπομονάδες).[17] Τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά εμφανίζονται κυρίως στην υπομονάδα Ι, στην υπομονάδα ΙΙ και την υπομονάδα ΙΙΙ, οι οποίες διατηρούνται σε όλη την οικογένεια των τελικών οξειδασών. Όλα τα ενεργά κέντρα της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης (Σχήμα 2.1) περιέχονται στις υπομονάδες Ι και ΙΙ. Παρακάτω, αναλύεται η δομή των τριών βασικότερων υπομονάδων του ενζύμου από καρδιά βοοειδούς.[10,12]



Σχήμα 2.1: *(Αριστερά) Η δομή της κυτοχρωμικής c οξειδάσης από καρδιά βοοειδούς, όπου κάθε μια από τις 13 υπομονάδες απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα. (Δεξιά) Τα μεταλλικά κέντρα του ενζύμου*

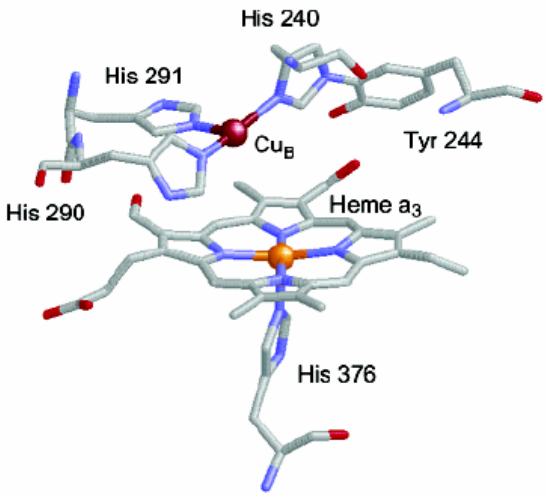
2.1.1 Υπομονάδα Ι

Η υπομονάδα Ι είναι η μεγαλύτερη και η καλύτερα διατηρημένη πολυπεπτιδική αλυσίδα στις τελικές οξειδάσες. Αποτελείται από 12 διαμεμβρανικές έλικες οι οποίες είναι διευθετημένες με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν τρεις κύκλους συμμετρικά τοποθετημένους. Η υπομονάδα Ι περιέχει μια υψηλού σπιν αίμη a_3 η οποία μαζί με ένα ιόν χαλκού σχηματίζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου και μια χαμηλού σπιν αίμη *α* η οποία αποτελεί τον άμεσο δότη ηλεκτρονίων προς το καταλυτικό κέντρο. Οι δυο αίμες απέχουν από την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης περίπου 13 Å με τα επίπεδα τους κάθετα προς αυτή. Η απόσταση ανάμεσα στις δυο αίμες είναι 13.4 Å (απόσταση μεταξύ των δυο ιόντων σιδήρου) ενώ η πλησιέστερη μεταξύ τους απόσταση είναι 4.5 Å. Η γωνία που σχηματίζουν οι δυο πορφυρινικοί δακτύλιοι μεταξύ τους είναι 104^o.

Η αίμη *α* είναι χαμηλού σπιν τόσο στην οξειδωμένη (S=1/2) όσο και την ανηγμένη (S=0) μορφή του ενζύμου, όπως αποδεικνύεται από μελέτες μαγνητικού κυκλικού διχρωισμού (MCD) και συντονισμού Raman.[18] Εκτός από τα τέσσερα άζωτα του πορφυρινικού δακτυλίου, η αίμη *α* φέρει ως αξονικούς υποκαταστάτες δυο

κατάλοιπα ιστιδίνης την His–61 και την His–378 (Σχήμα 2.1). Η αίμη *α* δεν είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη στην πρωτεΐνη και χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας φορμυλομάδας και μιας υδρόφοβης υδροξυαιθυλο–φαρνεσυλικής ομάδας, με αποτέλεσμα να αποκλείεται η πρόσβαση της αίμης στην μιτοχονδριακή μήτρα ή το κυτταρόπλασμα.

Η αίμη a_3 μαζί με ένα άτομο χαλκού (Cu_B) σχηματίζουν το διμεταλλικό κέντρο (Σχήμα 2.2) στο οποίο πραγματοποιείται η δέσμευση καθώς και η καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου, συνεπώς είναι αυτό που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Η αίμη a_3 θεωρείται υψηλού σπιν τόσο στην οξειδωμένη μορφή (S=5/2) όσο και στην πλήρως ανηγμένη (S=2) κατάσταση του ενζύμου. Παρουσιάζει αριθμό συναρμογής πέντε με αξονικό υποκαταστάτη την His–376. Ο σίδηρος είναι περίπου 0.7 Å εκτός του επιπέδου της πορφυρίνης, προς το μέρος της His–376. Αντίθετα από την αίμη *α*, η φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης a_3 δεν κατευθύνεται προς την εσωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, αλλά διαπερνά την λιπιδική διπλοστοιβάδα της μεμβράνης με αποτέλεσμα το διπυρηνικό κέντρο να είναι προσβάσιμο σε πρωτόνια από την περιπλασμική μεμβράνη.



Σχήμα 2.2: *Δομή του διπυρηνικού κέντρου της κυτοχρωμικής c οξειδάσης*

Η απόσταση ανάμεσα στο άτομο του χαλκού (Cu_B) και του σιδήρου της αίμης a_3 κυμαίνεται από 4.9-5.3 Å ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση του ενζύμου. Οι υποκαταστάτες του Cu_B είναι τρία διατηρημένα κατάλοιπα ιστιδίνης τα His–240, His–290 και His–291. Μελέτες με EXAFS στην οξειδωμένη μορφή του

ενζύμου προτείνουν την ύπαρξη ενός τέταρτου υποκαταστάτη στο Cu_B, πιθανώς ενός μορίου νερού ή ενός ιόντος υδροξυλίου.[19]

Φασματοσκοπικές μελέτες με συντονισμό Raman[18], Mössbauer[20] και MCD[21] έδειξαν ότι ο σίδηρος της αίμης a_3 είναι υψηλού σπιν Fe(III) (S=5/2) ενώ η κατάσταση του σπιν του χαλκού Cu_B είναι Cu(II) (S=1/2). Ο χαλκός Cu_B όμως δε δίνει σήμα EPR.[22] Για την εξήγηση της απουσίας των αναμενόμενων EPR σημάτων και τη μείωση του παραμαγνητισμού στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου, προτάθηκε η ύπαρξη μιας αντισιδηρομαγνητικής σπιν–σπιν σύζευξης μεταξύ του Fe_{a3}^{3+} και του Cu_B^{2+}, η οποία οδηγεί σε ένα σύστημα συνολικού σπιν S=2. Η ύπαρξη της αντισιδηρομαγνητικής σύζευξης επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις μαγνητικής επιδεκτικότητας, οι οποίες δείχνουν καθαρά την παρουσία ενός συστήματος με S=2 στην οξειδωμένη μορφή της κυτοχρωμικής οξειδάσης.

Οι παρατηρήσεις αυτές εξηγήθηκαν με την παρουσία ενός κέντρου της μορφής $[Fe^{III}–X–Cu^{II}]$, στο οποίο το X αντιπροσωπεύει έναν υποκαταστάτη-γέφυρα. Πιθανές ομάδες, οι οποίες θα μπορούσαν να σχηματίζουν γέφυρα μεταξύ των δύο μετάλλων είναι το H_2O, OH^-, COO^-, S^{2-} , Cl^-, PhO^- και το ιμιδαζόλιο.[19]

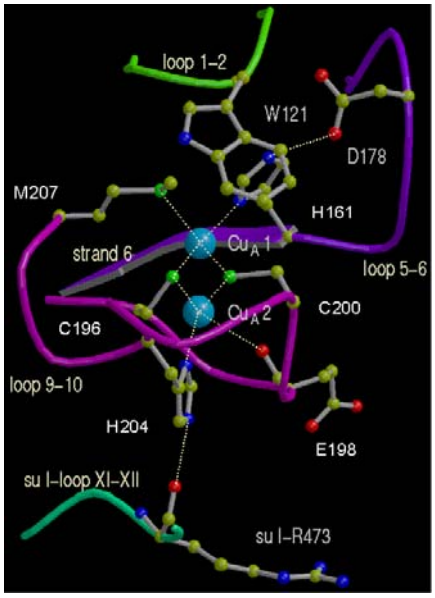
Οι αρχικές κρυσταλλογραφικές μελέτες της δομής του ενζύμου δεν ανίχνευσαν κάποιον υποκαταστάτη γέφυρα μεταξύ των δύο μεταλλικών κέντρων, λόγω της παρουσίας των βαρέων ιόντων σιδήρου και χαλκού. Ωστόσο, οι πιο πρόσφατες δομές υποδηλώνουν μια συνεχόμενη ηλεκτρονική πυκνότητα μεταξύ των μεταλλικών ιόντων. Έτσι, για την κυτοχρωμική οξειδάση από τα μιτοχόνδρια έχει προταθεί μια περοξειδική γέφυρα μεταξύ των δυο αυτών μεταλλικών κέντρων,[12] ενώ για την οξειδάση από το βακτήριο *P. Denitrificans* έχει προταθεί ένα μόριο νερού ως έκτος υποκαταστάτης της αίμης και ένα ιόν υδροξυλίου για το Cu_B.[11]

Μια από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις της κρυσταλλικής δομής της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης θεωρείται ο ομοιοπολικός δεσμός της Tyr–244 με έναν από τους τρεις υποκαταστάτες του Cu_B και συγκεκριμένα με την His–240 (Σχήμα 2.2). Η Tyr–244 αποτελεί ένα από τα πλέον διατηρημένα αμινοξέα στην οικογένεια των αιμο-χαλκο οξειδασών. Οι κρυσταλλικές δομές δείχνουν ότι βρίσκεται 3.2 Å μακριά από το Fe της αίμης a_3 και ότι αλληλεπιδρά με την φαρνεσυλική αλυσίδα της αίμης a_3 σχηματίζοντας ένα δεσμό υδρογόνου. Η ύπαρξη του ομοιοπολικού δεσμού μειώνει σημαντικά το pKa της τυροσίνης και τη συγκρατεί με τέτοιο τρόπο ώστε η υδροξυλική ομάδα να κατευθύνεται προς το διπυρηνικό

κέντρο. Για όλους τους παραπάνω λόγους έχει προταθεί ότι η Tyr–244 συμμετέχει στην καταλυτική αναγωγή του O_2.[23]

2.1.2 Υπομονάδα ΙΙ

Η υπομονάδα ΙΙ αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές έλικες και μια μεγάλη εξωμεμβρανική περιοχή στην οποία είναι τοποθετημένος ο χαλκός Cu_A (Σχήμα 2.3). Όπως είχε προβλεφθεί από προηγούμενες μελέτες EPR και επιβεβαιώθηκε από την κρυσταλλική δομή, ο Cu_A είναι ουσιαστικά ένα διπυρηνικό κέντρο μεικτού σθένους της μορφής $[Cu_A^{1.5+} – Cu_A^{1.5+}]$.[24] Τα δύο άτομα χαλκού γεφυρώνονται από δύο άτομα θείου, από τις δύο κυστεΐνες (Cys–196 και Cys–200), με τις ενδοατομικές αποστάσεις (Cu–Cu)=2.7 Å και $(S_\gamma–S_\gamma)$=3.8 Å. Το ένα από τα άτομα του χαλκού συναρμόζεται επιπλέον με το ιμιδαζολικό άζωτο της His–161 και το θείο της Met–207, σχηματίζοντας ένα τετράεδρο. Η συναρμογή του άλλου χαλκού είναι επίσης τετραεδρική και συμπεριλαμβάνει το άζωτο της His–204 και το καρβονύλιο της Glu–298. Ο Cu_A απέχει από το Fe της αίμης *α* 20.7 Å, από το Fe της αίμης a_3 23.1 Å και από τον Cu_B 22.5 Å. Η αίμη *α* «επικοινωνεί» με τον Cu_A μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου.



Σχήμα 2.3: *Διπυρηνικό κέντρο του χαλκού Cu_A*

2.1.3 Υπομονάδα ΙΙΙ

Η υπομονάδα ΙΙΙ υπάρχει σε όλες τις κυτοχρωμικές οξειδάσες αλλά η λειτουργία της είναι άγνωστη. Δεν περιέχει κάποιο οξειδοαναγωγικό κέντρο και η απομάκρυνσή της από το ένζυμο δεν επηρεάζει την καταλυτική του δράση. Παρόλα αυτά έχει προταθεί ότι σχηματίζει την είσοδο ενός καναλιού μεταφοράς του οξυγόνου στο διπυρηνικό κέντρο.[10] Επίσης είναι πιθανό να έχει και δομικό ρόλο συμβάλλοντας στη συγκρότηση της πρωτεΐνης.

2.2 Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

Για να πραγματοποιηθεί η αναγωγή του οξυγόνου σε νερό είναι απαραίτητη η μεταφορά ηλεκτρονίων από το κυτόχρωμα *c* προς το διμεταλλικό κέντρο του ενζύμου (Σχήμα 1.2). Κινητικές μελέτες απέδειξαν ότι ο αρχικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων του κυτοχρώματος *c* είναι ο χαλκός Cu_A.[25] Η φύση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στο κυτόχρωμα *c* και το ένζυμο δεν έχει προσδιοριστεί αλλά έχει προταθεί ότι ο σχηματισμός αυτού του συμπλόκου αποτελεί το καθοριστικό στάδιο στην πορεία της αντίδρασης ανάμεσα στο ανηγμένο κυτόχρωμα *c* και την κυτοχρωμική *c* οξειδάση.

Από το χαλκό Cu_A τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην αίμη *α* και στη συνέχεια διερχόμενα από την αίμη α_3 καταλήγουν στο διμεταλλικό κέντρο, όπου πραγματοποιείται η αναγωγή του οξυγόνου.[26] Επομένως, η ροή των ηλεκτρονίων έχει ως εξής:

$$\text{cyt } c \rightarrow Cu_A \rightarrow \text{heme } \alpha \rightarrow \{\text{heme } \alpha_3 - Cu_B\}$$

2.3 Μηχανισμός καταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου

Πολλές φασματοσκοπικές αλλά και βιοχημικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί για τον χαρακτηρισμό των ενδιαμέσων της καταλυτικής αναγωγής του οξυγόνου που πραγματοποιείται στο διμεταλλικό κέντρο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης.[5] Στην προσπάθεια προσδιορισμού αυτών των ενδιαμέσων έχουν χρησιμοποιηθεί τρεις διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις του ενζύμου:

το πλήρες οξειδωμένο ένζυμο: όπου όλα μέταλλα έχουν οξειδωθεί ($\{Cu^{I}Cu^{II}\}_{A}$, Fe_{α}^{III}, Fe_{a3}^{III}, Cu_{B}^{II}),

το μεικτού σθένους ένζυμο: όπου το διμεταλλικό κέντρο παραμένει ανηγμένο και έχει οξειδωθεί ο χαλκός Cu_A και η αίμη *α* ($\{Cu^{I}Cu^{II}\}_{A}$, Fe_{α}^{III}, Fe_{a3}^{II}, Cu_{B}^{I}) και

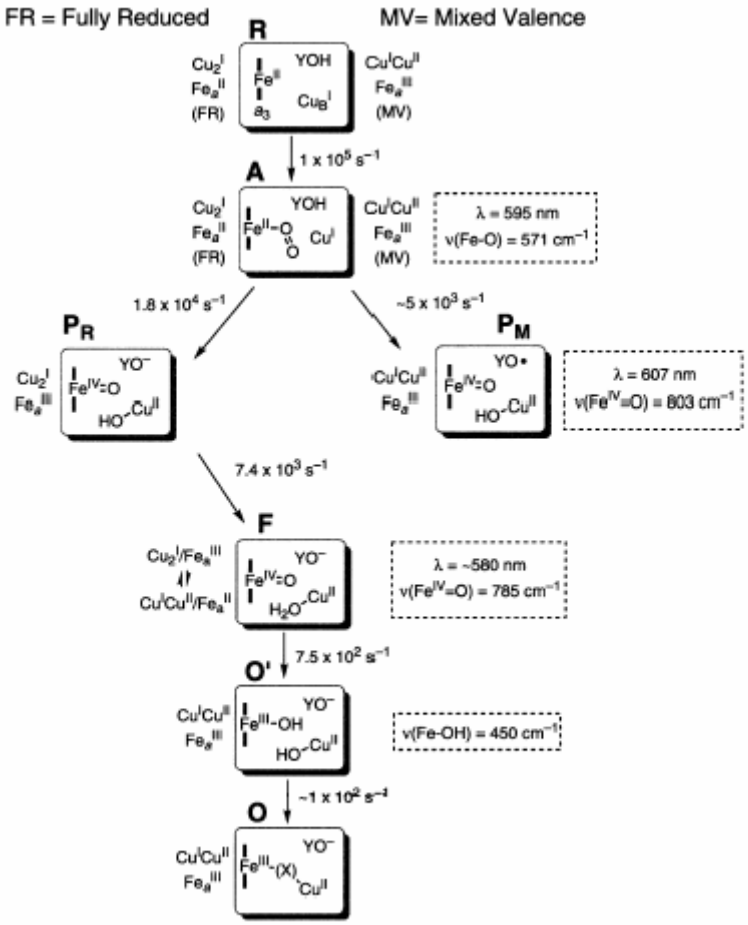
το πλήρες ανηγμένο ένζυμο: όπου όλα τα μεταλλικά κέντρα είναι ανηγμένα ($\{Cu^{I}Cu^{I}\}_{A}$, Fe_{α}^{II}, Fe_{a3}^{II}, Cu_{B}^{I}).

Το πλήρως οξειδωμένο ένζυμο δεν είναι σε θέση να ανάγει το οξυγόνο προς νερό. Για αυτό το λόγο μελετάται η αντίδρασή του με το υπεροξείδιο το υδρογόνου (H_2O_2) καθώς έχει βρεθεί ότι τα ενδιάμεσα αυτής της αντίδρασης είναι όμοια με αυτά που σχηματίζονται κατά την αντίδραση των δυο άλλων μορφών με το οξυγόνο.[27] Στην περίπτωση του μεικτού σθένους, το ένζυμο φέρει τα μισά από τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την πλήρη αναγωγή του οξυγόνου προς νερό, οπότε η αντίδρασή του με το οξυγόνο προχωρά μέχρι τη μέση του καταλυτικού κύκλου, κάνοντας ευκολότερη την παρατήρηση και τον προσδιορισμό του ενδιαμέσου που σχηματίζεται στο στάδιο αυτό. Τέλος το πλήρως ανηγμένο ένζυμο είναι σε θέση να ανάγει το οξυγόνο προς νερό και στην περίπτωση αυτή μελετάται ο πλήρης καταλυτικός κύκλος του ενζύμου.

Κατά τον καταλυτικό κύκλο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης καταναλώνονται 100 μόρια οξυγόνου ανά δευτερόλεπτο και η διάρκειά του είναι περίπου 10 ms. Λόγω της μεγάλης ταχύτητας του καταλυτικού κύκλου είναι πολύ δύσκολη η παρατήρηση των ενδιαμέσων που σχηματίζονται. Για την παρακολούθηση μιας τόσο γρήγορης διεργασίας χρησιμοποιείται η τεχνική της φωτόλυσης του μονοξειδίου του άνθρακα.[28] Κατά την τεχνική αυτή στο ενεργό κέντρο του ενζύμου πριν από τη συναρμογή του οξυγόνου δεσμεύεται CO, σχηματίζοντας ένα σχετικά σταθερό σύμπλοκο (a_3 – CO), εμποδίζοντας την αντίδραση του ενζύμου με το O_2. Η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιείται με την φωτοδιάσπαση του CO παρουσία οξυγόνου. Με αυτό τον τρόπο η αντίδραση μπορεί να μελετηθεί με χρονοεξαρτημένες μεθόδους, χωρίς να υφίσταται το πρόβλημα του νεκρού χρόνου μίξης που θα περιόριζε τη μελέτη σε κλίμακα ms. Με τη χρήση της τεχνικής αυτής καθίσταται δυνατή η παρατήρηση των ενδιαμέσων του καταλυτικού κύκλου του ενζύμου τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

2.3.1 Όξυ ενδιάμεσο A

Η αντίδραση του πλήρους ανηγμένου και του μεικτού σθένους ενζύμου με O_2 οδηγεί αρχικά στο σχηματισμό του όξυ-ενδιαμέσου **A** με συντελεστή ταχύτητας $k = 1 \times 10^5\ s^{-1}$ (Σχήμα 2.4). Το ενδιάμεσο αυτό εμφανίζει ταινία απορρόφησης στα 595 nm. Με τη χρήση χρονοεξαρτημένης φασματοσκοπίας συντονισμού Raman προσδιορίστηκε η δομή αυτού του ενδιαμέσου και η δόνηση στα 571 cm^{-1} αποδόθηκε στο φέρους-όξυ σύμπλοκο της μορφής $Fe^{II}–O_2$.[29] Το οξυγόνο συναρμόζεται στο σίδηρο σε μια τερματική (end-on) διαμόρφωση, όμοια με αυτή που απαντάται στην μυογλοβίνη και την αιμοσφαιρίνη.[30] Μελέτες με φασματοσκοπία UV-visible και FT-IR κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι πριν την δέσμευση του οξυγόνου στο σίδηρο της αίμης αυτό συναρμόζεται στο χαλκό Cu_B με $k = 3.7 \times 10^8\ M^{-1}s^{-1}$.[31]



Σχήμα 2.4: *Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου καταλυτικού κύκλου*

2.3.2 Περόξο ενδιάμεσο P

Το δεύτερο ενδιάμεσο που ανιχνεύεται κατά τον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου, ονομάζεται περόξο **P**. Αυτό το ενδιάμεσο εμφανίζει μια ταινία απορρόφησης στα 607 nm και μπορεί να παρατηρηθεί ξεκινώντας είτε από το μεικτού σθένους ένζυμο είτε από την πλήρως ανηγμένη μορφή του.[32] Στην πρώτη περίπτωση σχηματίζεται σε χρόνο 150 μs και ονομάζεται $\mathbf{P_M}$ ενώ στη δεύτερη σε 30 μs και ονομάζεται $\mathbf{P_R}$. Η χημική δομή των ενδιαμέσων $\mathbf{P_M}$ και $\mathbf{P_R}$ έχει αποτελέσει θέμα έντονων αντιπαραθέσεων. Αρχικά, προτάθηκε στο στάδιο αυτό, σχηματίζεται ένα περόξο είδος του τύπου (Fe^{III}–O=O^{-2}).[3] Ωστόσο πρόσφατες μελέτες συντονισμού Raman της δομής του $\mathbf{P_M}$ ενδιαμέσου έδειξαν ότι η σχάση του οξυγόνου έχει ήδη πραγματοποιηθεί στο στάδιο αυτό.[23] Μελέτες με φασματοσκοπία μάζας επιβεβαίωσαν ότι ο δεσμός O–O έχει σπάσει και προτάθηκε ότι η δομή του ενδιαμέσου είναι Fe^{IV}=O.[33] Το ενδιάμεσο $\mathbf{P_M}$ εμφανίζει μια ισοτοπικά ευαίσθητη Raman κορυφή στα 804 cm^{-1} που αποδίδεται στην $\nu(Fe^{IV}=O)$ δόνηση.[23] Η χημική δομή του $\mathbf{P_R}$ ενδιαμέσου δεν είναι τόσο ξεκάθαρη όσο του $\mathbf{P_M}$. Το οπτικό φάσμα απορρόφησης, καθώς και το ασυνήθιστο φάσμα EPR που εμφανίζει το $\mathbf{P_R}$, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο δεσμός O–O έχει διασπαστεί και ότι η δομή του είναι όμοια με αυτή του $\mathbf{P_M}$.[34]

Για τη διάσπαση του προσδεδεμένου οξυγόνου απαιτούνται συνολικά τέσσερα ηλεκτρόνια. Στο διμεταλλικό κέντρο τρία είναι τα άμεσα διαθέσιμα ηλεκτρόνια: δυο από το σίδηρο της αίμης a_3 ($Fe^{II} \rightarrow Fe^{IV}$) και ένα από τον χαλκό Cu_B ($Cu^{I} \rightarrow Cu^{II}$). Στην περίπτωση του $\mathbf{P_M}$ ενδιαμέσου προτάθηκε ότι ο δότης του επιπλέον ηλεκτρονίου είναι η τυροσίνη (Tyr-244) που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με μια από τις ιστιδίνες του Cu_B (Σχήμα 2.2), σχηματίζοντας μια τυροσυλο-ρίζα.[35] Αντίθετα, στην περίπτωση του $\mathbf{P_R}$ ενδιαμέσου ο δότης του ηλεκτρονίου φέρεται να είναι η αίμη *a*. Οπτικές[32] και Raman[36] μελέτες επιβεβαιώνουν το γεγονός αυτό δείχνοντας ότι ο σχηματισμός του $\mathbf{P_R}$ ενδιαμέσου συνοδεύεται από τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από την αίμη *a* στο διμεταλλικό κέντρο. Επομένως, η διαφορά ανάμεσα στο $\mathbf{P_M}$ και στο $\mathbf{P_R}$ ενδιάμεσο είναι η προέλευση του τέταρτου ηλεκτρονίου και ο σχηματισμός ή μη σχηματισμός της τυροσυλο-ρίζας.

2.3.3 Φέρυλ ενδιάμεσο F

Σε αντίθεση με το $\mathbf{P_M}$, το $\mathbf{P_R}$ ενδιάμεσο είναι ασταθές και γρήγορα μετασχηματίζεται στο φέρυλ ενδιάμεσο **F** χωρίς επιπλέον μεταφορά ηλεκτρονίου στο διμεταλλικό κέντρο. Το ενδιάμεσο **F** εμφανίζει μια ευρεία ταινία απορρόφησης στα 580 nm και μια δόνηση Raman στα 785 cm^{-1} που αποδίδεται στη $\nu(Fe^{IV}=O)$.[37] Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες EPR, τόσο το $\mathbf{P_R}$ όσο και το **F** ενδιάμεσο έχουν την ίδια φέρυλ-όξο δομή ($Fe^{IV}=O$).[34] Η κύρια διαφορά συνίσταται στο γεγονός ότι ο υποκαταστάτης του Cu_B στο **F** δεν είναι το OH^- όπως στο $\mathbf{P_R}$, αλλά ένα μόριο H_2O, όπου το ένα άτομο υδρογόνου σχηματίζει έναν ισχυρό δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της αίμης a_3. Η ύπαρξη του δεσμού υδρογόνου εξηγεί τις διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στα δυο ενδιάμεσα και ερμηνεύει την αυξημένη ηλεκτρονιακή σύζευξη ανάμεσα στα μέταλλα του διπυρηνικού κέντρου που παρατηρείται στο φάσμα EPR.

2.3.4 Υδρόξυ ενδιάμεσο O΄

Με την προσθήκη ενός επιπλέον ηλεκτρονίου στο διμεταλλικό κέντρο σχηματίζεται το υδρόξυ ενδιάμεσο **O΄** (Fe^{III}–OH). Η δομή του ενδιαμέσου προσδιορίστηκε με χρονοεξαρτημένη φασματοσκοπία συντονισμού Raman αποδίδοντας την κορυφή στα 450 cm^{-1} στην δόνηση $\nu(Fe^{III} – OH)$.[38] Τέλος, ένα από τα δυο υδροξύλια που υπάρχουν δεσμευμένα στο διμεταλλικό κέντρο αποδεσμεύεται με ρυθμό ~1 x 10^2 s^{-1} και προκύπτει το πλήρως οξειδωμένο ένζυμο **O**.[39] Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι αυτής της κατάστασης, γνωστοί ως «γρήγορη» και «αργή» ή «pulsed» και «resting» αντίστοιχα.[40] Η Soret έχει μέγιστο στα 424 nm στην «γρήγορη» μορφή ενώ στην «αργή» στα 417 nm. Η διαφορά ανάμεσα στους δύο αυτούς τύπους του οξειδωμένου ενζύμου δεν έχει προσδιοριστεί, αλλά κατά πάσα πιθανότητα υπεύθυνος είναι ένας εσωτερικός υποκαταστάτης δεσμευμένος στο διμεταλλικό κέντρο.

2.4 Ο ρόλος της τυροσίνης 244 στην καταλυτική δράση του ενζύμου

Η ανακάλυψη του ομοιοπολικού δεσμού της Tyr-244 με μια από τις ιστιδίνες που είναι συναρμοσμένος ο χαλκός Cu_B (Σχήμα 2.2) έδωσε το έναυσμα για την πραγματοποίηση μελετών για τον προσδιορισμό του ρόλου του συγκεκριμένου

αμινοξέος. Η ύπαρξη αυτού του ομοιοπολικού δεσμού επιβεβαιώθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας μάζας (ESI-MS)[41] καθώς και με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR.[42]

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για τη μετάβαση από το μεικτού σθένους ένζυμο προς το $\mathbf{P_M}$ ενδιάμεσο απαιτούνται συνολικά τέσσερα ηλεκτρόνια από τα οποία τα τρία από αυτά είναι άμεσα διαθέσιμα από το διμεταλλικό κέντρο. Η πηγή του τέταρτου ηλεκτρονίου παραμένει αδιευκρίνιστη, ωστόσο έχουν προταθεί διάφοροι υποψήφιοι δότες: i) τα π ηλεκτρόνια του πορφυρινικού δακτυλίου σχηματίζοντας π κατιονική ρίζα,[43] ii) την οξείδωση του σιδήρου της αίμης a_3 ($Fe^{IV} \rightarrow Fe^{V}$),[38] iii) την οξείδωση του χαλκού Cu_B ($Cu^{II} \rightarrow Cu^{III}$)[44] iv) ένα αμινοξικό κατάλοιπο το οποίο μετατρέπεται σε ρίζα.[45] Για τους τρεις πρώτους δότες δεν υπάρχουν επαρκή πειραματικά δεδομένα που να αποδεικνύουν την ύπαρξη τους.

Επομένως, προτάθηκε ότι πηγή του επιπλέον ηλεκτρονίου είναι κάποιο αμινοξύ και συγκεκριμένα η τυροσίνη 244.[35] Η τελευταία εκδοχή επιβεβαιώνεται από πρόσφατα EPR δεδομένα που υποδηλώνουν την παρουσία τυροσυλο-ριζών κατά την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου στην πλήρως οξειδωμένη μορφή του ενζύμου.[46] Η σπουδαιότητα του καταλοίπου της τυροσίνης στην καταλυτική δράση του ενζύμου επιβεβαιώθηκε με πειράματα μετάλλαξης. Στην κυτοχρωμική *c* οξειδάση από το βακτήριο *R. sphaeroides* στο οποίο είχε πραγματοποιηθεί αντικατάσταση της τυροσίνης με φαινυλαλανίνη, παρατηρήθηκε η απώλεια της καταλυτικής δράσης του ενζύμου. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αποδέσμευση ενός υποκαταστάτη του Cu_B και τη συναρμογή του στο σίδηρο της αίμης a_3.[47]

Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες έρχεται μια νέα αναφορά,[48] κατά την οποία μελετάται μεταλλαγμένο ένζυμο από το βακτήριο *P. Denitrificans*. Το ένζυμο παρότι δε διαθέτει τον ομοιοπολικό δεσμό His–Tyr διατηρεί την καταλυτική του δράση. Στη μελέτη αυτή αποδείχθηκε ότι κατά την αντίδραση του μεταλλαγμένου ενζύμου με O_2 σχηματίζονται οξυγονωμένα παράγωγα που εμφανίζουν όμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά με αυτά που παρατηρούνται στην αντίδραση του φυσικού ενζύμου, γεγονός που υποδηλώνει ότι η τυροσίνη δε συμμετέχει στην καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου. Τέλος προτάθηκε ότι ο ρόλος της τυροσίνης συνίσταται στο να διατηρεί το χαλκό Cu_B σε μια συγκεκριμένη διαμόρφωση και απόσταση από την αίμη a_3. Επομένως, ο ακριβής ρόλος της τυροσίνης παραμένει ασαφής και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον προσδιορισμό του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G.T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 12971-12973
2. G.T. Babcock, B.A. Barry, R.J. Debus, C.W. Hoganson, M. Atamian, L. McIntosh, I. Sithole, C.F. Yocum, *Biochemistry* **1989**, 28, 9557-9565
3. G.T. Babcock, M. Wikström, *Nature* **1992**, 356, 301-309
4. P. Mitchell, *Nature* **1961**, 191, 141-148
5. S. Ferguson-Miller, G.T. Babcock, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2889-2907
6. J.A. Garcia-Horsman, B. Barquera, J. Rumbley, J. Ma, R.B. Gennis, *J. Bacteriol.* **1994**, 176, 5587-5600
7. J.P. Hosler, S. Ferguson-Miller, M.W. Calhoun, J.W. Thomas, J. Hill, L. Lemieux, J. Ma, C. Georgiou, J. Fetter, J.P. Shapleigh, M.M.J. Tecklenburg, G.T. Babcock, R.B. Gennis,. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, 25, 121-136
8. S. Iwata, C. Ostermeier, B. Ludwig, H. Michel, *Nature* **1995**, 376, 660-669
9. T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1995,** 269, 1069-1074
10. T. Tsukihara, H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, S. Yoshikawa, *Science* **1996,** 272, 1136-1144
11. C. Ostermeier, A. Harrenga, U. Ermler, H. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10547-10553
12. S. Yoshikawa, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono, E. Yamashita, N. Inoue, M. Yao, M.J. Fei, C.P. Libeu, T. Mizushima, H. Yamaguchi, T. Tomizaki, T. Tsukihara, *Science* **1998**, 280, 1723-1729
13. A. Harrenga, H. Mitchel, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 33296-33299
14. T. Soulimane, G. Buse, G.P. Bourenkov, H.D. Bartunik, R. Huber, M.E. Than, *EMBO J.* **2000**, 19, 1766-1776
15. M. Svensson-Ek, J. Abramson, G. Larsson, S. Tornorth, P. Brzezinski, S. Iwata, *J. Mol. Biol.* **2002**, 321, 329-339
16. J. Abramson, S. Riistama, G. Larsson, A. Jasaitis, M. Svensson-Ek, L. Laakkonen, A. Puustinen, S. Iwata, M. Wikström, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, 7, 910-917
17. R.A. Capaldi, *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, 59, 569-596
18. G.T. Babcock, P.M. Callahan, M.R. Ondrias, I. Salmeen, *Biochemistry* **1981**, 20, 959-966
19. Y.C. Fann, I. Ahmed, N.J. Blackburn, J.S. Boswell, M.L. Verkhovskaya, B.M. Hoffman, M. Wikström, *Biochemistry* **1995**, 34, 10245-10255
20. W.H. Woodruff, R.F. Dallinger, T.M. Antalis, G. Palmer, *Biochemistry* **1981**, 20, 1332-1338

21. D.G. Eglinton, M.K. Johnson, A.J. Thomson, P.E. Gooding, C. Greenwood, *Biochem. J.* **1980**, 191, 319-331
22. E.P. Day, J. Peterson, M.S. Sendova, J. Schoonover, G. Palmer, *Biochemistry* **1993**, 32, 7855-786
23. D.A. Proshlyakov, M.A. Pressler, G.T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *9*5, 8020-8025
24. M. Kelly, P. Lappalainen, G. Talbo, T. Haltia, J. van der Oost, M. Saraste, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 16781-16787
25. B.C. Hill, *J. Biol. Chem.,* **1991**, 266, 2219-2226
26. J.R. Winkler, B.G. Malmström, H.B. Gray, *Biophys. Chem.* **1995**, 54, 199-209
27. D.A. Proshlyakov, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *Biochemistry* **1996**, 35, 8580-8586
28. G., Greenwood, Q.H. Gibson, *J. Biol. Chem.* **1967**, 242, 1782-1787
29. C. Varotsis, W.H. Woodruff, G.T. Babcock, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6439-6440
30. T. Ogura, S. Takahashi, S. Hirota, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, E.H. Appelman, T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**,115, 8527-8536
31. M. Oliveberg, B.G. Malmstroem, *Biochemistry,* **1992**, 31, 3560-3563
32. J.E. Morgan, M.I. Verkhovsky, M. Wikström, *Biochemistry,* **1996**, 35, 12235-12240
33. M. Fabian, W.W. Wong, R.B. Gennis, G. Palmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 13114-13117
34. J.E. Morgan, M.I. Verkhovsky, G. Palmer, M. Wikström, *Biochemistry* **2001**, 40, 6882-6892
35. D.A. Proshlyakov, M.A. Pressler, C. DeMaso, J.F. Leykam, D.L. DeWitt, G.T. Babcock, *Science* **2000**, *29*0, 1588-1591
36. S. Han, Y.C. Ching, D.L. Rousseau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *8*7, 8408-8412
37. C. Varotsis, G.T. Babcock, *Biochemistry* **1990**, 29, 7357-7362
38. T. Ogura, S. Hirota, D.A. Proshlyakov, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 5443-5449
39. S. Hallén, T. Nilsson, *Biochemistry* **1992**, 31, 11853-11859
40. A.J. Moody, C.E. Cooper, P.R. Rich, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1059, 189-207
41. G. Buse, T. Soulimane, M. Dewor, H.E. Meyer, M. Bloggel, *Prot. Sci.* **1999**, 8, 985-990
42. P. Hellwig, U. Pfitzner, J. Behr, B. Rost, R.P. Pesavento, W. von Donk, R.B. Gennis, H. Michel, B. Ludwig, W. Maentele, *Biochemistry* **2002**, 41, 9116-9125
43. D.A. Proshlyakov, T. Ogura, K. Shinzawa-Itoh, S. Yoshikawa, T. Kitagawa, *Biochemistry* **1996**, 35, 76-82
44. M. Fabian, G. Palmer, *Biochemistry,* **1995**, 34, 13802-13810

45. D.A. Svistunenko, M.T. Wilson, C.E. Cooper, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1665, 372-380
46. F. MacMillan, A. Kannt, J. Behr, T. Prisner, H. Michel, *Biochemistry* **1999**, 38, 9179-9184
47. T.K. Das, C. Pecoraro, F.L. Tomson, R.B. Gennis, D.L. Rousseau, *Biochemistry* **1998**, 37, 14471-14476
48. E. Pinakoulaki, U. Pfitzner, B. Ludwig, C. Varotsis, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 13563-13568

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΤΗΣ ΚΥΤΟΧΡΩΜΙΚΗΣ *c* ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

3.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στη διαλεύκανση της δομής και της λειτουργίας του ενζύμου της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης. Η πρόοδος αυτή έχει επιτευχθεί μέσα από την εφαρμογή διαφόρων τεχνικών, συμπεριλαμβανομένων μεταξύ άλλων της πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας, των φασματοσκοπικών μεθόδων, της τοπο-κατευθυνόμενης μετάλλαξης, της μηχανιστικής ενζυμολογίας καθώς και θεωρητικούς υπολογισμούς όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Παρόλα αυτά, αρκετά σημεία της καταλυτικής δράσης του ενζύμου παραμένουν αδιευκρίνιστα όπως για παράδειγμα: ο ρόλος του χαλκού Cu_B στην αναγωγή του οξυγόνου, ο ρόλος της τυροσίνης, ο υποκαταστάτης-γέφυρα στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου καθώς και ο σχηματισμός του πέροξυ ενδιαμέσου.

Ένας διαφορετικός τρόπος προσέγγισης για την πλήρη κατανόηση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου περιλαμβάνει τη σύνθεση και το λεπτομερή δομικό και ηλεκτρονικό χαρακτηρισμό συνθετικών αναλόγων (μοντέλων), τα οποία προσεγγίζουν ή επιτυγχάνουν μία ή και περισσότερες βασικές ιδιότητες του πρωτεϊνικού ενεργού κέντρου. Η χημική μοντελοποίηση αποτελεί μια χρήσιμη στρατηγική, διότι: i) το μοντέλο είναι μικρότερου μοριακού βάρους ένωση από το φυσικό ένζυμο και είναι πιο εύκολο να μελετηθεί, ii) είναι δυνατή η συστηματική τροποποίηση ορισμένων χαρακτηριστικών του μοντέλου (π.χ. αλλαγή στο περιβάλλον συναρμογής των μεταλλικών ιόντων), iii) είναι δυνατή η αλλαγή των μετάλλων του ενεργού κέντρου και παρατηρώντας τις διαφορές από αυτή την αλλαγή είναι πιθανόν να προκύψουν χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την καταλυτική δράση του κάθε μετάλλου και iv) είναι δυνατή η μελέτη της χημείας του ενεργού κέντρου, ανεπηρέαστη από το πρωτεϊνικό περιβάλλον. Τα συνθετικά ανάλογα μπορούν να διακριθούν σε i) *δομικά μοντέλα* τα οποία αναπαριστούν πιστά τη δομή, τον τύπο των υποκαταστατών και τις οξειδωτικές καταστάσεις και ii) σε *λειτουργικά*

μοντέλα τα οποία δεν αναπαριστούν πιστά τη δομή αλλά μιμούνται την καταλυτική δράση του ενζύμου μετατρέποντας το υπόστρωμα προς το επιθυμητό προϊόν. Ιδανική φυσικά θεωρείται η περίπτωση που ένα μοντέλο συγκεντρώνει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά και ανήκει και στις δυο κατηγορίες.

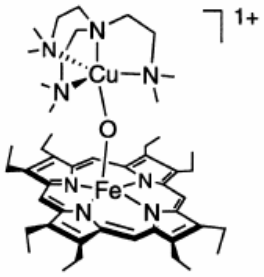
Όπως είναι αναμενόμενο τα βιομιμητικά μοντέλα δεν μπορούν να μιμηθούν το ενζυμικό περιβάλλον και τους δομικούς περιορισμούς που προκαλεί ο πρωτεϊνικός σκελετός. Για αυτό το λόγο δε μπορούν να καταλήξουν σε απόλυτα συμπεράσματα σχετικά με το μηχανισμό δράσης του ενζύμου. Σκοπός των μοντέλων είναι να δώσουν απαντήσεις σε ορισμένα ερωτήματα που αφορούν τη δομή, τη δραστικότητα καθώς και τις ηλεκτρονικές και μαγνητικές ιδιότητες του ενζύμου.

Τα τελευταία χρόνια ένας μεγάλος αριθμός βιομιμητικών μοντέλων της CcO έχει συντεθεί.[1,2] Τα μοντέλα αυτά μιμούνται πιστά το περιβάλλον συναρμογής του διπυρηνικού κέντρου και είναι σε θέση να αναπαράγουν με ακρίβεια μερικά σημεία κλειδιά της λειτουργίας του ενζύμου. Τα περισσότερα συνθετικά ανάλογα που έχουν συντεθεί αποτελούνται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο που δεσμεύει το σίδηρο και έναν υποκαταστάτη που φέρει τουλάχιστον τρία άζωτα και είναι σε θέση να συναρμόζεται με το χαλκό. Παρακάτω περιγράφονται ορισμένα από τα μοντέλα που έχουν συντεθεί και μελετηθεί. Αρχικά παρουσιάζονται τρεις ομάδες μοντέλων οι οποίες εμφανίζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με το ένζυμο και διαφοροποιούνται ως προς το μόριο που αποτελεί τον υποκαταστάτη γέφυρα ανάμεσα στο σίδηρο και το χαλκό. Στη συνέχεια περιγράφονται οι ηλεκτροκαταλυτικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στα μοντέλα κατά τις οποίες εξετάζεται η καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου προς νερό. Τέλος παρουσιάζονται ορισμένα μοντέλα που έχουν ως στόχο την διευκρίνηση του ρόλου της τυροσίνης.

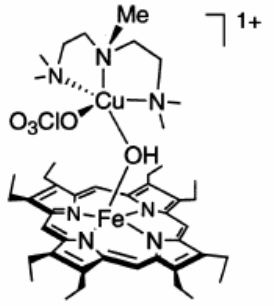
3.2 Μοντέλα με *μ*-όξο και *μ*-υδρόξο γέφυρες

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο σε μελέτες EPR της οξειδωμένης μορφής του ενζύμου δεν παρατηρήθηκε κάποιο σήμα αν και ο χαλκός Cu_B διαθέτει μονήρες ηλεκτρόνιο. Προτάθηκε συνεπώς ότι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου τα δυο μέταλλα συζευγνύονται αντισιδηρομαγνητικά και ότι αυτή η σύζευξη επιτυγχάνεται μέσω ενός υποκαταστάτη-γέφυρα. Η τρισδιάστατη δομή του ενζύμου μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ δείχνει μια συνεχόμενη ηλεκτρονική πυκνότητα μεταξύ των δυο μετάλλων. Η ακριβής όμως δομή του υποκαταστάτη-

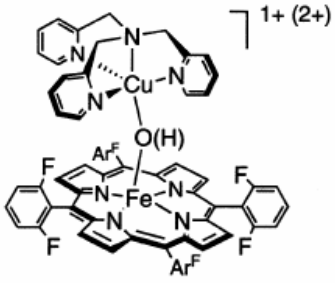
γέφυρα δεν μπορεί να προσδιοριστεί λόγω της παρουσίας των βαρέων ιόντων σιδήρου και χαλκού. Όπως ήδη αναφέρθηκε έχει προταθεί ότι ο υποκαταστάτης γέφυρα μπορεί να είναι μια όξο- ή υδρόξο-ομάδα καθώς και ένα μόριο νερού.[3] Με σκοπό τον προσδιορισμό του υποκαταστάτη γέφυρα έχουν συντεθεί αρκετά *μ*-όξο [Fe(III)–O–Cu(II)] και *μ*-υδρόξο [Fe(III)–(OH)–Cu(II)] διπυρηνικά σύμπλοκα (Σχήμα 3.1).



$[(OEP)Fe^{III}–O–Cu^{II}(Me_6tren)]^+$ **(1)**

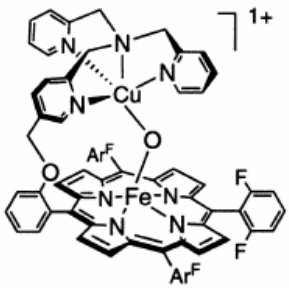


$[(OEP)Fe^{III}–(OH)–Cu^{II}(Me_5dien)(ClO_4)]^+$ **(2)**

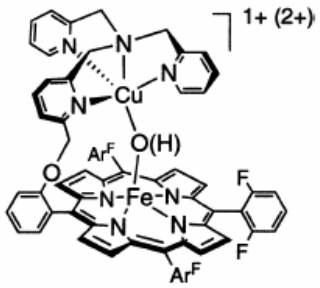


$[(F_8TPP)Fe^{III}–O–Cu^{II}(TMPA)]^+$ **(3a)**

$[(F_8TPP)Fe^{III}$-(OH)-$Cu^{II}(TMPA)]^{2+}$ **(3b)**

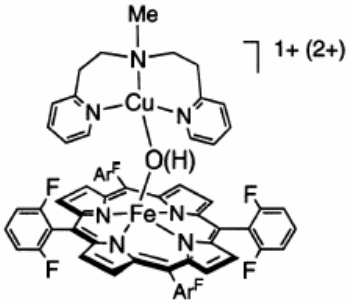


$[(^5L)Fe^{III}–O–Cu^{II}]^+$ **(4)**



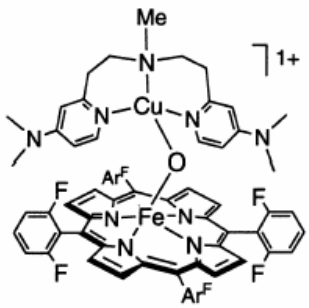
$[(^6L)Fe^{III}–O–Cu^{II}]^+$ **(5a)**

$[(^6L)Fe^{III}–(OH)–Cu^{II}]^{2+}$ **(5b)**



$[(F_8TPP)Fe^{III}–O–Cu^{II}(MePY2)]^+$ **(6a)**

$[(F_8TPP)Fe(III)–(OH)–Cu(II)(MePY2)]^{2+}$ **(6b)**



$[(F_8TPP)Fe(III)–O–Cu(II)(L^{Me2N})]^+$ **(7)**

Σχήμα 3.1: *Μοντέλα με μ-όξο και μ-υδρόξο γέφυρες που συντέθηκαν*

3.2.1 Σύνθεση

Τα πρώτα μοντέλα αυτής της κατηγορίας που συντέθηκαν, αποτελούνται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο και ένα σύμπλοκο χαλκού τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω του υποκαταστάτη γέφυρα (**1**, **2**, **3a**, **3b**, **6a**, **6b**, **7**). Η σύνθεση αυτών των συμπλόκων πραγματοποιείται με σύζευξη ανάμεσα στην σιδηροπορφυρίνη [(P)–Fe(III)–X] και σε ένα ύδροξο-σύμπλοκο του χαλκού [L–Cu(II)–OH] παρουσία μιας βάσης. Ανάλογα με τη βάση λαμβάνεται το *μ*-όξο[4] ή το *μ*-υδρόξο[5] σύμπλοκο. Ακολούθως, δημιουργήθηκαν συνθετικά ανάλογα (**4**, **5a**, **5b**) όπου το σύμπλοκο του χαλκού είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τον πορφυρινικό δακτύλιο.[6] Η σύνθεση αυτών των *μ*-όξο ενώσεων περιλαμβάνει την προσθήκη O_2 στην πλήρως ανηγμένη μορφή του συμπλόκου [Fe(II), Cu(I)]. Προσθήκη οξέος στη συνέχεια οδηγεί στα αντίστοιχα *μ*-ύδροξο παράγωγα.

3.2.2 Δομικές μελέτες

Γενικά τα *μ*-όξο γεφυρωμένα διμεταλλικά σύμπλοκα εμφανίζουν σχεδόν γραμμική Fe–O–Cu συναρμογή με την απόσταση Fe–Cu στα 3.57–3.60 Å. Οι αποστάσεις Fe–O είναι τυπικές για *μ*-όξο πορφυρινικά σύμπλοκα και είναι σύμφωνες με την παρουσία ενός πεντα-συναρμοσμένου υψηλού σπιν άτομο σιδήρου. Από τη γραμμικότητα του Fe–O–Cu τμήματος έχουν αναφερθεί δυο εξαιρέσεις. Η πρώτη αφορά το σύμπλοκο **7** το οποίο εμφανίζει εμφανώς κεκαμένη διαμόρφωση (143º) και μικρότερη Fe–Cu απόσταση (3.42 Å).[7] Η δεύτερη εξαίρεση εμφανίζεται στο μοντέλο **4** όπου το σύμπλοκο του χαλκού συνδέεται με τον πορφυρινικό δακτύλιο μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού.[8] Είναι αξιοσημείωτο ότι το δομικό ανάλογο **5a** το οποίο διαφέρει μόνο στη θέση του ατόμου μέσω του οποίου πραγματοποιείται η σύνδεση της πορφυρίνης με το σύμπλοκο του χαλκού, εμφανίζει ένα σχεδόν γραμμικό Fe–O–Cu τμήμα. Αυτό καταδεικνύει ότι μικρές τροποποιήσεις στην αρχιτεκτονική των υποκαταστατών μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές δομικές αλλαγές.

Η σύγκριση των δομικών παραμέτρων των *μ*-όξο και *μ*-υδρόξο συμπλόκων αποκαλύπτει ορισμένα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά.[9] Στα Fe(III)–(OH)–Cu(II) σύμπλοκα παρατηρείται μια σημαντική κάμψη του Fe–O–Cu τμήματος (~155º). Επίσης, οι αποστάσεις Fe–O και Cu–O αυξάνονται σημαντικά από ~1.74 σε 1.90 Å και από ~1.84 σε 1.92 Å αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη αύξηση αποδίδεται στη μείωση του ανιονικού φορτίου του οξυγόνου (από –2 σε –1). Ωστόσο, στην

περίπτωση της απόστασης Fe–O ένας επιπλέον παράγοντας συμβάλει στην επιμήκυνση του δεσμού. Κατά τη μετάβαση από τη γραμμική στην κεκκαμένη δομή, εμφανίζεται απώλεια ενός ποσοστού του π-δεσμού επαναφοράς από το οξυγόνο στο σίδηρο λόγω της επαναϋβριδοποίησης του οξυγόνου από sp σε sp^2.

Μελέτες με EXAFS και ENDOR του Cu_B της κινολικής οξειδάσης *αα*$_3$–600 από το βακτήριο *B. Subtilus* έδειξαν ότι το περιβάλλον συναρμογής του Cu_B συνίσταται από τρεις ιστιδίνες και έναν υποκαταστάτη δότη οξυγόνου που φέρει ένα ανταλλάξιμο πρωτόνιο όπως το νερό ή το υδροξείδιο.[3] Η απόσταση του δεσμού Cu–O προσδιορίστηκε στα 1.92 Å, η τιμή αυτή είναι παρόμοια με αυτή που εμφανίζεται στα *μ*-υδρόξο συνθετικά ανάλογα. Ωστόσο οι Fe–Cu αποστάσεις στα *μ*-ύδροξο μοντέλα (3.7–3.8 Å) είναι αρκετά μικρότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες Fe_{a3} –Cu_B αποστάσεις των οξειδωμένων αιμο-χαλκο οξειδασών (4.4–4.9 Å). Συνεπώς ένα ιόν OH^- συναρμοσμένο μόνο στο χαλκό Cu_B και όχι σαν υποκαταστάτης γέφυρα είναι η πιθανότερη δομή για τη συγκεκριμένη κινολική οξειδάση.

3.2.3 Μελέτες Mössbauer και μαγνητικής επιδεκτικότητας

Η φασματοσκοπία Mössbauer χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης των *μ*-όξο και *μ*-υδρόξο συμπλόκων.[10] Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο σίδηρος σε όλα τα μοντέλα είναι υψηλού σπιν με S=5/2. Οι μελέτες μαγνητικής επιδεκτικότητας έδειξαν ότι ανάμεσα στο σίδηρο και το χαλκό υπάρχει ισχυρή αντισιδηρομαγνητική σύζευξη, οδηγώντας σε μια βασική κατάσταση με S=2.[11] Επίσης παρατηρήθηκε ότι στα *μ*-υδρόξο σύμπλοκα η σύζευξη αυτή είναι μικρότερη σε σχέση με τα αντίστοιχα *μ*-όξο μοντέλα.

Το φυσικό ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης έχει μελετηθεί με τη φασματοσκοπία Mössbauer[12] και η τιμές της τετραπολικής σχάσης (ΔE_Q) είναι παρόμοιες με αυτές που εμφανίζουν τα *μ*-υδρόξο μοντέλα. Επομένως η αντισιδηρομαγνητική σύζευξη του ενζύμου είναι πιθανόν να οφείλεται σε μια *μ*-ύδροξο γέφυρα. Ωστόσο οι δομικοί περιορισμοί που αναφέρθηκαν παραπάνω καθιστούν απίθανη την ύπαρξη μιας *μ*-υδρόξο γέφυρας.

3.2.4 Μελέτες με φασματοσκοπία NMR

Η φασματοσκοπία NMR είναι σε θέση να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα ηλεκτρονικά χαρακτηριστικά του σιδήρου στις σιδηροπορφυρίνες. Το σήμα των

πυρρολικών πρωτονίων είναι χαρακτηριστικό και εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση καθώς και το σπιν του σιδήρου.[13] Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι οι χαμηλού σπιν Fe(III) πορφυρίνες εμφανίζουν ένα πυρρολικό σήμα στα –20 ppm, ενώ στις υψηλού σπιν Fe(III) πορφυρίνες τα πυρρολικά πρωτόνια εμφανίζονται στα 80 ppm.

Στο φάσμα NMR των *μ*-όξο συμπλόκων **3a** και **6a** παρατηρούνται τα πυρρολικά πρωτόνια στα 65 και 67.5 ppm αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι μετατοπισμένες προς χαμηλότερες συχνότητες σε σχέση με τις τυπικές τιμές των συμπλόκων που έχουν Fe(III) υψηλού σπιν. Η μετατόπιση αυτή έχει αποδοθεί στη μείωση του παραμαγνητισμού λόγω της αντισιδηρομαγνητικής σύζευξης που αναπτύσσεται ανάμεσα στο σίδηρο και το χαλκό. Στα *μ*-υδρόξο σύμπλοκα το σήμα των πυρρολικών πρωτονίων βρίσκεται στα ~70 ppm ενώ η μετατόπιση σε αυτή την περίπτωση είναι μικρότερη και υποδηλώνει την ασθενέστερη σύζευξη που υπάρχει σε αυτά τα μοντέλα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τις δομικές και μαγνητικές παρατηρήσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω.

3.2.5 Τιτλοδοτήσεις στα μ-όξο και μ-υδρόξο μοντέλα

Όπως αναφέρθηκε προσθήκη οξέος στα *μ*-όξο σύμπλοκα **3a**, **5a**, και **6a** οδηγεί στη σύνθεση των αντίστοιχων *μ*-υδρόξο συμπλόκων **3b**, **5b** και **6b**. Στη συνέχεια προσθήκη κάποιας βάσης στα *μ*-υδρόξο ανάλογα έχει ως αποτέλεσμα την επανάκτηση των αρχικών *μ*-όξο αναλόγων. Επομένως, υπάρχει μια αντιστρεπτή ισορροπία οξέος-βάσεως, η οποία επιβεβαιώθηκε από NMR και UV-visible τιτλοδοτήσεις.[14] Όσον αφορά τη βασικότητα των συμπλόκων υπάρχουν διαφοροποιήσεις.

Βρέθηκε ότι τα μοντέλα στα οποία το σύμπλοκο του χαλκού είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με τον πορφυρινικό δακτύλιο είναι περισσότερο βασικά και πρωτονιώνονται ευκολότερα. Το σύμπλοκο με τη μεγαλύτερη τιμή pK_a είναι το **4** στο οποίο το Fe–O–Cu τμήμα είναι κεκαμένο.[15] Η αυξημένη βασικότητα που εμφανίζει έχει ως αποτέλεσμα το σπάσιμο της γέφυρας κατά την αντίδραση πρωτονίωσης. Τέλος προσδιορίστηκε ότι η αντίδραση πρωτονίωσης είναι μια σχετικά αργή διαδικασία ($k_{H^+} = 12700 M^{-1}s^{-1}$ για το σύμπλοκο **1**), γεγονός που οφείλεται στην επανυβριδοποίηση του οξυγόνου.

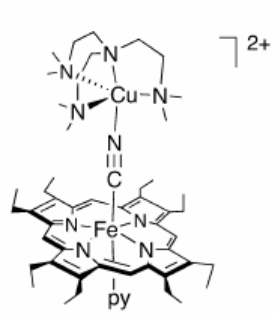
Η κατανόηση της χημείας τέτοιων είδους αντιδράσεων πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης είναι σημαντική διότι έχει προταθεί ότι τέτοιου είδους αντιδράσεις πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου του φυσικού ενζύμου.[16] Επίσης η βασικότητα των ενδιαμέσων του καταλυτικού κύκλου επηρεάζει την ικανότητα του ενζύμου στη μεταφορά πρωτονίων από την εσωτερική μεμβράνη προς τον διαμεμβρανικό χώρο.[17]

3.3 Μοντέλα με γέφυρα κυανίου (CN)

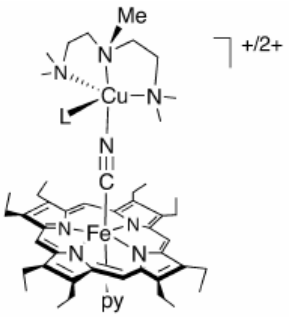
Η αυξημένη τοξικότητα του κυανίου αποδίδεται στη γρήγορη και μη αντιστρεπτή δέσμευσή του στο ενεργό κέντρο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης. Η πρόσδεση αυτή εμποδίζει τη συναρμογή του οξυγόνου και συνεπώς αναστέλλεται η καταλυτική λειτουργία του ενζύμου. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε το έναυσμα για την πραγματοποίηση εκτεταμένων θερμοδυναμικών και κινητικών μελετών σχετικά με τη δέσμευση του κυανίου.[18] Η πρόσδεση του κυανίου οδήγησε στην αλλαγή της διαμόρφωσης του σιδήρου της αίμης a_3 από υψηλού σπιν σε χαμηλού σπιν, καθώς επίσης και στην τροποποίηση της σύζευξης άμεσα στα δυο μέταλλα από αντισιδηρομαγνητική σε σιδηρομαγνητική.[19] Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο συναρμόζεται στο διμεταλλικό κέντρο καθώς και το αν γεφυρώνει τα δυο μέταλλα είναι υπό αμφισβήτηση.[20] Με σκοπό τον προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο συναρμόζεται το κυάνιο στο ενεργό κέντρο του φυσικού ενζύμου, συντέθηκαν αρκετά συνθετικά ανάλογα (Σχήμα 3.2) της γενικής μορφής [Fe–(CN)–Cu]. Στα μοντέλα αυτά το σύμπλοκο του χαλκού είναι δεσμευμένο με τη σιδηροπορφυρίνη μέσω της γέφυρας κυανίου.

3.3.1 Σύνθεση

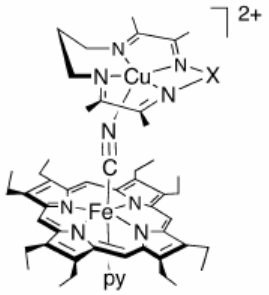
Η σύνθεση αυτών των μοντέλων περιλαμβάνει την αντίδραση σύζευξης ανάμεσα σε ένα σύμπλοκο χαλκού [Cu(I) ή Cu(II)] και μια σιδηροπορφυρίνη που φέρει ως αξονικό υποκαταστάτη ένα ιόν κυανίου [(P)–Fe(III)–CN]. Η σιδηροπορφυρίνη αυτή παράγεται από το αντίστοιχο *μ*-όξο διμερές $[(P)–Fe(III)]_2O$ με προσθήκη τριμεθυλο-σιλανο κυανιδίου παρουσία κάποιας βάσης. Σε περίπτωση που το ιόν του κυανίου είναι συναρμοσμένο με το σύμπλοκο του χαλκού η αντίδραση σύζευξης οδηγεί σε τριπυρηνικά σύμπλοκα [Cu(II)–NC–Fe(III)–CN–Cu(II)].



$[(py)(OEP)Fe^{III}\text{-}CN\text{-}Cu^{II}(Me_6tren)]^{2+}$ **(8)**

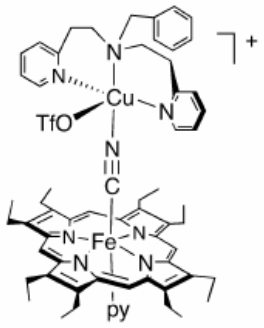


$[(py)(OEP)Fe^{III}\text{-}CN\text{-}Cu^{II}(Me_5dien)(L)]^{n+}$ $L=(OSO_2CF_3)^{1-}$ **(9)** $L=(Me_2CO)$ **(10)**

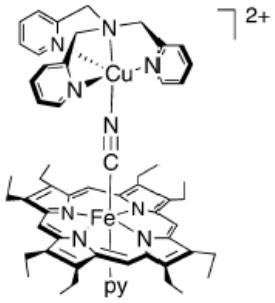


$[(py)(OEP)Fe^{III}\text{-}CN\text{-}Cu^{II}(TIM)]^{2+}$ $X=(CH_2)_3$ **(11)**

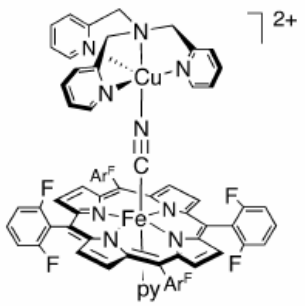
$[(py)(OEP)Fe^{III}\text{-}CN\text{-}Cu^{II}(cyclops)]^{2+}$ $X=OBF_2O$ **(12)**



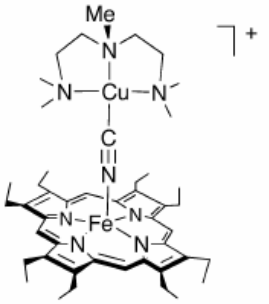
$[(py)(OEP)Fe^{III}\text{-}CN\text{-}Cu^{II}(bnpy_2)(OTf)]^{1+}$ **(13)**



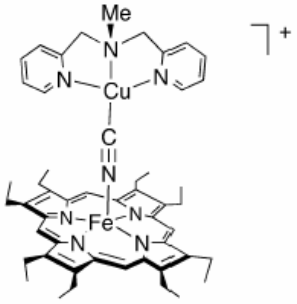
$[(py)(OEP)Fe^{III}\text{-}CN\text{-}Cu^{II}(TMPA)]^{2+}$ **(14)**



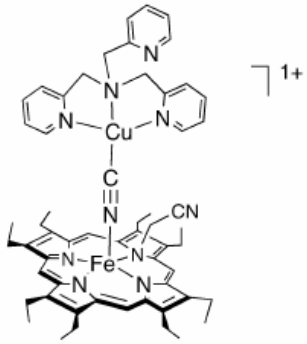
$[(py)(F_8TPP)Fe^{III}\text{-}CN\text{-}Cu^{II}(TMPA)]^{2+}$ **(15)**



$[(OEP)Fe^{III}\text{-}NC\text{-}Cu^{I}(Me_5dien)]^{n+}$ **(16)**



$[(py)(OEP)Fe^{III}\text{-}NC\text{-}Cu^{I}(MeNpy_2)]^{+}$ **(17)**



$[(OEP\text{-}CH_2CN)Fe^{III}\text{-}NC\text{-}Cu^{I}(TMPA)]^{+}$ **(18)**

Σχήμα 3.2: *Μοντέλα με γέφυρα κυανίου που συντέθηκαν*

3.3.2 Δομικές μελέτες

Ανάλογα με τον τρόπο συναρμογής της γέφυρας κυανίου και την οξειδωτική κατάσταση των μεταλλικών ιόντων, τα μοντέλα μπορούν να διαχωριστούν σε τρεις ομάδες:

i) **[Fe(III)–CN–Cu(II)]**. Στα σύμπλοκα αυτά ο άνθρακας του κυανίου συναρμόζεται με το σίδηρο και το άζωτο με το χαλκό.[21] Τα περισσότερα μοντέλα (**8**–**15**) ανήκουν σε αυτή την κατηγορία και η δομή τους έχει πιστοποιηθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Σε όλα τα σύμπλοκα αυτής της ομάδας η διάταξη Fe–C–N είναι σχεδόν

γραμμική (176º–180º) ενώ ο δεσμός Fe–C κυμαίνεται από 1.86 Å ως 1.92 Å. Αντίθετα, στην περίπτωση της Cu–N–C γωνίας εμφανίζονται κάποιες διαφοροποιήσεις. Τα σύμπλοκα **8**, **9**, **10**, **14** και **15** είναι πολύ κοντά στη γραμμικότητα (170º–175º), ενώ τα σύμπλοκα **11**, **12** και **13** αποκτούν μια εμφανώς κεκαμένη διαμόρφωση Cu–N–C με γωνίες 147º –163º. Το μήκος του δεσμού Cu–N διαφοροποιείται από 1.88 Å ως 2.17 Å και έχει βρεθεί ότι η μείωση του μήκους του δεσμού Cu–N έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της γωνίας Cu–N–C.

ii) **[Fe(III)–NC–Cu(I)]**. Στα σύμπλοκα αυτά ο χαλκός έχει αναχθεί κατά ένα ηλεκτρόνιο και το κυάνιο εμφανίζει ένα αντίστροφο τρόπο συναρμογής όπου δεσμεύεται με το σίδηρο μέσω του αζώτου και με το χαλκό μέσω του άνθρακα.[22] Τα μοντέλα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι το **16** και το **17**. Στα σύμπλοκα αυτά οι γωνίες Fe–N–C και Cu–C–N αποκλίνουν από τη γραμμικότητα και έχουν τιμές 164º και 171º αντίστοιχα. Είναι αξιοσημείωτο ότι κατά τη σύνθεση αυτών των μοντέλων πραγματοποιείται αναστροφή του τρόπου συναρμογής του κυανίου, η αντίδραση σύνθεσης ξεκινά με το κυάνιο να είναι δεσμευμένο στο σίδηρο της πορφυρίνης μέσω του άνθρακα, ενώ στο τελικό προϊόν συναρμόζεται μέσω του αζώτου.

iii) **[Fe(II)–NC–Cu(I)]**. Στην ομάδα αυτή ανήκει το μοντέλο **18** στο οποίο έχει αναχθεί τόσο ο χαλκός όσο και ο σίδηρος και προσομοιάζει την πλήρως ανηγμένη κατάσταση του ενζύμου.[23] Το κυάνιο και πάλι συναρμόζεται με το σίδηρο μέσω του αζώτου και με το χαλκό μέσω του άνθρακα. Σε αυτή την περίπτωση οι γωνίες Fe–N–C και Cu–C–N είναι σχεδόν γραμμικές με τιμές 176º και 175º αντίστοιχα.

3.3.3 Μελέτες Mössbauer και μαγνητικής επιδεκτικότητας

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο σύμπλοκο **8** βρέθηκε ότι ο σίδηρος είναι χαμηλού σπιν και η βασική ηλεκτρονική κατάσταση του συμπλόκου είναι S=1.[24] Η τιμή αυτή προκύπτει από τη σιδηρομαγνητική σύζευξη που αναπτύσσεται ανάμεσα στο σίδηρο και το χαλκό λόγω της ύπαρξης της γέφυρας κυανίου. Γενικότερα, σε όλα τα μοντέλα της πρώτης κατηγορίας ο σίδηρος είναι χαμηλού σπιν ενώ στις δυο υπόλοιπες κατηγορίες ο σίδηρος εμφανίζεται σε κατάσταση υψηλού σπιν. Το ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης από καρδιά βοοειδούς[12] και από το βακτήριο *T. Thermophilus*,[19] στο οποίο έχει συναρμοστεί κυάνιο, εμφανίζει τιμές τετραπολικής σχάσης όμοιες με αυτές του συμπλόκου **8**. Συνεπώς, τα συνθετικά

μοντέλα προσομοιώνουν σε ικανοποιητικό βαθμό τον τρόπο συναρμογής του κυανίου στο φυσικό ένζυμο.

3.3.4 Μελέτες με φασματοσκοπία NMR

Μια σιδηροπορφυρίνη που φέρει ως αξονικό υποκαταστάτη ένα ιόν κυανίου εμφανίζει πυρρολικό σήμα στα –19.6 ppm και η τιμή αυτή είναι χαρακτηριστική για χαμηλού σπιν Fe(III) πορφυρίνες. Στο σύμπλοκο **15** το σήμα των πυρρολικών πρωτονίων έχει μετατοπιστεί προς χαμηλότερα πεδία στα –11.1 ppm.[25] Αυτή η μετατόπιση οφείλεται στην ύπαρξη μιας σιδηρομαγνητικής σύζευξης ανάμεσα στο σίδηρο (S=1/2) και το χαλκό (S=1/2) οδηγώντας σε μια βασική κατάσταση με S=1.

3.3.5 Μελέτες με φασματοσκοπία IR

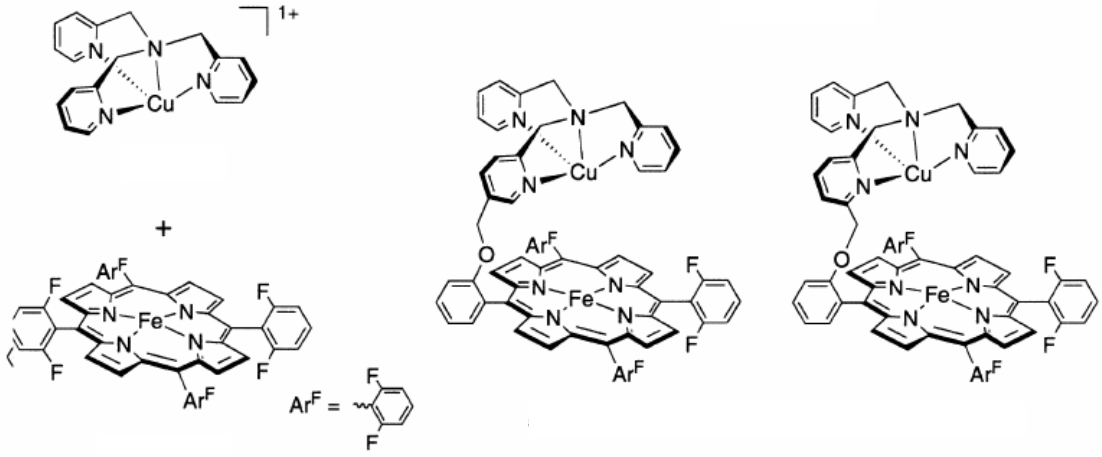
Η φασματοσκοπία IR χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης στην οποία έχει προσδεθεί κυάνιο.[26] Στο πλήρως ανηγμένο ένζυμο η δόνηση του κυανίου (ν_{CN}) εμφανίζεται στα 2058 cm^{-1} και αναφέρθηκε ότι το κυάνιο δεσμεύεται μόνο στο σίδηρο μέσω του άνθρακα, χωρίς να σχηματίζει γέφυρα. Στο πλήρως οξειδωμένο ένζυμο η ταινία στα 2151 cm^{-1} αποδόθηκε στη ν_{CN} και αρχικά προτάθηκε ότι το κυάνιο είναι δεσμευμένο μόνο στο χαλκό μέσω του άνθρακα. Ωστόσο, σε μετέπειτα μελέτες διαπιστώθηκε ότι η δέσμευση του κυανίου πραγματοποιείται στο σίδηρο μέσω του άνθρακα και ότι το άζωτο του κυανίου σχηματίζει έναν ισχυρό δεσμό υδρογόνου με ένα γειτονικό αμινοξύ.

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα μοντέλα[27] βρέθηκε ότι στα σύμπλοκα του τύπου [Fe(III)–CN–Cu(II)] και όταν η διάταξη Cu–N–C είναι γραμμική η δόνηση ν_{CN} εμφανίζεται στα ~2177 cm^{-1} και απέχει αρκετά από την αντίστοιχη του ενζύμου (2151 cm^{-1}). Εντούτοις όταν η γωνία του δεσμού Cu–N–C μειωθεί (σύμπλοκα **11** και **12**) μειώνεται και η δόνηση ν_{CN} (~2148 cm^{-1}) πλησιάζοντας την τιμή του φυσικού ενζύμου. Συνεπώς προτείνεται ότι στην οξειδωμένη μορφή του ενζύμου το κυάνιο έχει μια κεκαμένη διάταξη και είναι συναρμοσμένο στο σίδηρο μέσω του άνθρακα. Στην περίπτωση των συμπλόκων **16** και **17** όπου τόσο η γωνία Fe–N–C όσο και η Cu–C–N αποκλίνουν από τη γραμμικότητα, η δόνηση ν_{CN} μειώνεται στα ~2081 cm^{-1} και προτείνεται ότι προσομοιάζουν την πλήρως ανηγμένη κατάσταση του ενζύμου.

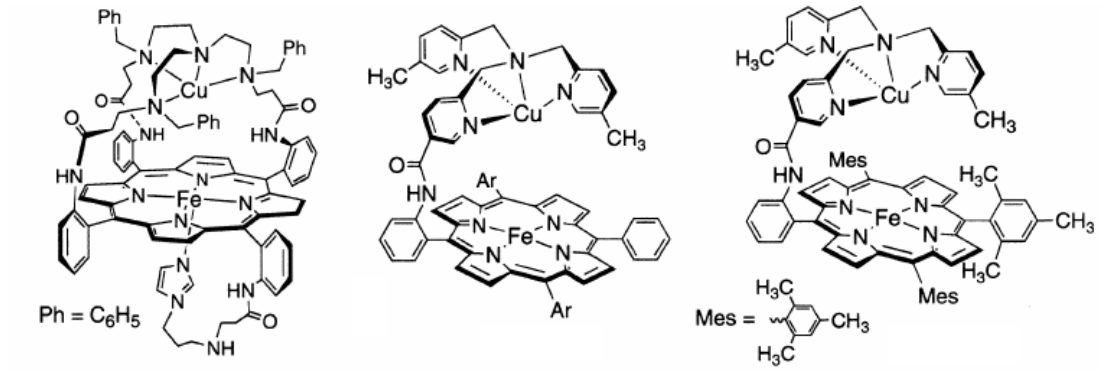
3.4 Μοντέλα με περόξο γέφυρα

Κατά την αντίδραση του φυσικού ενζύμου με οξυγόνο αρχικά σχηματίζεται το όξυ ενδιάμεσο **A** το οποίο στη συνέχεια μετασχηματίζεται στο περόξυ ενδιάμεσο **P**. Αν και οι πρώτες μελέτες έδειξαν ότι η δομή του **P** αποτελείται από μια περόξο γέφυρα [Fe(III)–O–O–Cu(II)] σήμερα είναι γενικά αποδεκτό ότι στο **P** ενδιάμεσο ο δεσμός O–O έχει σπάσει και η δομή του είναι Fe(IV)=O. Ωστόσο έχει προταθεί ότι το περόξο ενδιάμεσο[Fe–O–O–Cu] αποτελεί ένα μεταβατικό ενδιάμεσο, το οποίο λόγω της μεγάλης του αστάθειας δεν ανιχνεύεται.[28]

Στην προσπάθεια μίμησης των παραπάνω ενδιαμέσων έχουν πραγματοποιηθεί αντιδράσεις δέσμευσης οξυγόνου σε βιομιμητικά μοντέλα.[29] Όλα τα μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί βρίσκονται στην πλήρως ανηγμένη μορφή τους [Fe(II) Cu(I)] και ο υποκαταστάτης στον οποίο συναρμόζεται ο χαλκός μπορεί να είναι είτε τετραδραστικός (Σχήμα 3.3) είτε τριδραστικός (Σχήμα 3.4). Στις περισσότερες περιπτώσεις το ενδιάμεσο που παρατηρείται κατά την αντίδραση με το οξυγόνο είναι ένα διπυρηνικό σύμπλοκο με περόξο γέφυρα.

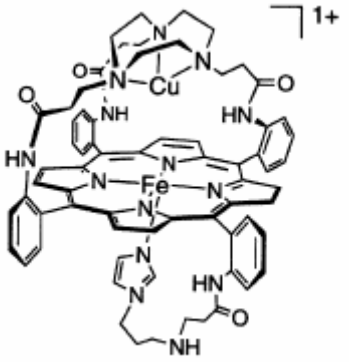


$[(F_8TPP)Fe^{II}\ Cu^{I}(TMPA)]^+$ **(19)** $[(^5L)Fe^{II}\ Cu^{I}]^+$ **(20)** $[(^6L)Fe^{II}\ Cu^{I}]^+$ **(21)**

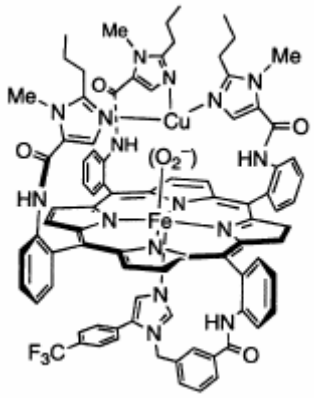


$[(\alpha_3Tren_{Ph}\beta Im_{alk})Fe^{II}\ Cu^{I}]^+$ **(22)** $[(L)Fe^{II}\ Cu^{I}]^+$ **(23)** $[(L_{Me})Fe^{II}\ Cu^{I}]^+$ **(24)**

Σχήμα 3.3: *Μοντέλα με τετραδραστικό υποκαταστάτη για το χαλκό*

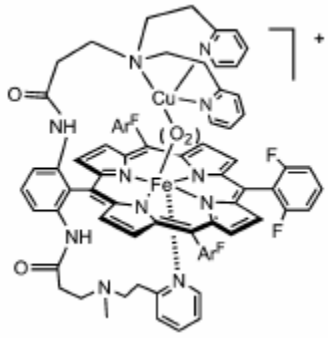


$[(\alpha_3\text{TACN}\beta\text{Im}_{alk})\text{Fe}^{II}\ \text{Cu}^{I}]^+$ **(25)**



$[(\alpha_3\text{NmePr}\beta\text{Im}_{PhF})\text{Fe}^{III}\text{–}(O_2^{-})\cdots\text{Cu(I)}]^+$ **(26)**

$[(F_8\text{TPP})\text{Fe}^{III}\text{–}(O_2^{2-})\text{–}\text{Cu}^{II}(L^{Me2N})]^+$ **(27)**



$[(^4\text{L})\text{Fe}^{III}\text{–}\ (O_2^{2-})\text{–}\text{Cu}^{II}]^+$ **(28)**

Σχήμα 3.4: *Μοντέλα με τριδραστικό υποκαταστάτη για το χαλκό*

3.4.1 Μελέτη της αντίδρασης δέσμευσης του O_2

Η προσθήκη οξυγόνου στα διπυρηνικά σύμπλοκα και με την διατήρηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης αρκετά χαμηλά (–70º C) έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση περόξο γεφυρωμένων συμπλόκων.[30] Εξαίρεση αποτελεί το σύμπλοκο **26** το οποίο κατά την αντίδραση με O_2 σχηματίζει ένα σταθερό υπερόξο σύμπλοκο $[(P)\text{–Fe–}(O_2^{-})\ \text{Cu(I)}]$ στο οποίο το οξυγόνο είναι συναρμοσμένο μόνο στο σίδηρο.[31] Στην περίπτωση των μοντέλων **19**, **21** και **28** όταν η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε χαμηλότερη θερμοκρασία εμφανίστηκε πριν από το περόξο σύμπλοκο ένα υπερόξο ενδιάμεσο.[32] Το ενδιάμεσο αυτό είναι ασταθές και γρήγορα μετατρέπεται στο αντίστοιχο περόξο σύμπλοκο. Η ταυτοποίηση αυτού το ενδιαμέσου έγινε με φασματοσκοπία UV-visible και συντονισμού Raman και έχει προταθεί ότι προσομοιάζει το όξυ ενδιάμεσο **A** του ενζύμου.[33] Τα *μ*-περόξο σύμπλοκα **19**, **21**, **27** και **28** κατά τη θέρμανσή τους μετατρέπονται στα αντίστοιχα *μ*-όξο παράγωγα. Ο

μηχανισμός αυτής της μετατροπής δεν έχει προσδιοριστεί, αλλά αποτελεί θέμα αρκετών ερευνών, διότι περιλαμβάνει τη διάσπαση του δεσμού O–O.

3.4.2 Φασματοσκοπικές μελέτες των μ-περόξο συμπλόκων

Η ταυτοποίηση των περόξο συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με τη φασματομετρία μάζας και απεδείχθη ότι η αναλογία οξυγόνου ως προς το διπυρηνικό σύμπλοκο είναι 1:1.[34] Επίσης ο σχηματισμός της περόξο γέφυρας επιβεβαιώθηκε με μελέτες συντονισμού Raman στις οποίες ανιχνεύθηκε η δόνηση ν(O–O), η τιμή της οποίας κυμαίνεται από 809 cm^{-1} ως 759 cm^{-1} και είναι χαρακτηριστική για *μ*-περόξο γεφυρωμένα σύμπλοκα.[35] Μελέτες με φασματοσκοπία Mössbauer έδειξαν ότι στα περισσότερα μοντέλα ο σίδηρος είναι σε κατάσταση υψηλού σπιν. Εξαίρεση αποτελούν τα σύμπλοκα **25** και **28** στα οποία λόγω του βασικού αξονικού υποκαταστάτη ο σίδηρος είναι σε κατάσταση χαμηλού σπιν.[36] Από τη φασματοσκοπία NMR[37] και EPR[38] προέκυψε ότι ανάμεσα στο σίδηρο και το χαλκό αναπτύσσεται ισχυρή αντισιδηρομαγνητική σύζευξη, η οποία οδηγεί σε ένα σύστημα με S=2 βασική κατάσταση.

3.4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των μ-περόξο συμπλόκων

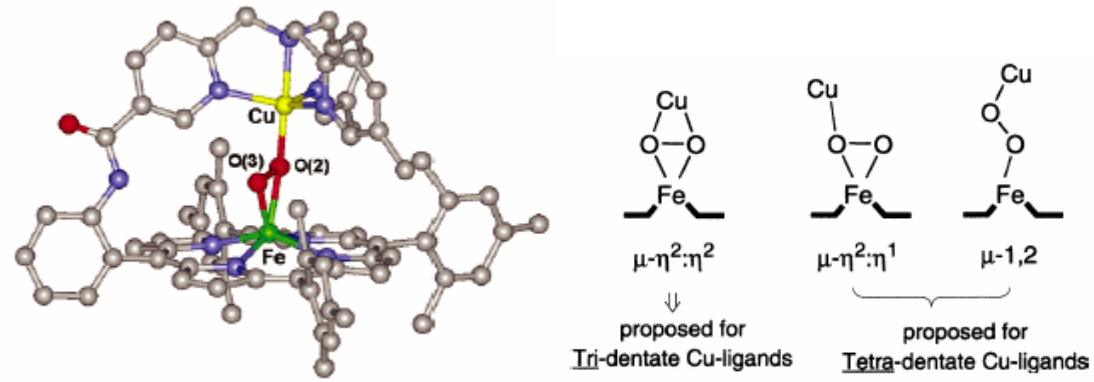
Όπως έχει αναφερθεί ο σχηματισμός των μ-περόξο συμπλόκων απαιτεί χαμηλές θερμοκρασίες, θέρμανση αυτών σε θερμοκρασία δωματίου έχει ως αποτέλεσμα είτε το σχηματισμό του *μ*-όξο παραγώγου είτε την καταστροφή του συμπλόκου. Τα μοντέλα στα οποία το σύμπλοκο του χαλκού είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στην πορφυρίνη, εμφανίζουν μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα σε σχέση με αυτά στα οποία το σύμπλοκο του χαλκού ενώνεται με την πορφυρίνη μέσω της περόξο γέφυρας.[39] Έτσι, το σύμπλοκο **19** έχει χρόνο ημίσειας ζωής $t_{1/2}$ = 16 min σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ για το σύμπλοκο **21** είναι $t_{1/2}$ = 60 min.

Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει τη θερμική σταθερότητα των συμπλόκων είναι η ύπαρξη μεθυλικών ομάδων, τόσο στο σύμπλοκο του χαλκού όσο και στον πορφυρινικό δακτύλιο. Συγκρίνοντας τα σύμπλοκα **20**, **23** και **24** παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται ο αριθμός των μεθυλίων αυξάνεται και η θερμική σταθερότητα των *μ*-περόξο συμπλόκων. Επιπρόσθετα τα μεθύλια αποτελούν δότες ηλεκτρονίων και επηρεάζουν τη δόνηση ν(O–O) της περόξο γέφυρας η οποία είναι

809 cm^{-1} στο σύμπλοκο **20** που δεν έχει κάποιο μεθύλιο και μειώνεται στα 790 cm^{-1} για το σύμπλοκο **24** το οποίο διαθέτει 11 μεθύλια.

3.4.4 Μελέτη της δομής της μ-περόξο γέφυρας

Στη μελέτη της χημείας της δέσμευσης του οξυγόνου από συνθετικά ανάλογα, σημαντικό επίτευγμα αποτελεί ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου **24** μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ (Σχήμα 3.5).[40] Η περόξο γέφυρα συναρμόζεται με το σίδηρο και το χαλκό με ένα ασύμμετρο μ-η^2:η^1 τρόπο. Σε αυτήν τη διαμόρφωση και τα δυο άτομα οξυγόνου συναρμόζονται με το σίδηρο ενώ μόνο ένα άτομο οξυγόνου είναι δεσμευμένο στο χαλκό. Το μήκος του δεσμού O–O είναι 1.46 Å, τιμή η οποία είναι αναμενόμενη για περόξο γέφυρα. Οι δυο δεσμοί του σιδήρου με το οξυγόνο δεν είναι όμοιοι μεταξύ τους [Fe–O(2) = 2.03Å και Fe–O(3) = 1.89Å] ενώ η απόσταση ανάμεσα στο χαλκό και στο οξυγόνο είναι Cu–O(2) = 1.91Å. Τέλος η απόσταση ανάμεσα στα δυο μέταλλα είναι 3.2 Å. Οι αποστάσεις αυτές είναι πολύ μικρότερες σε σχέση με αυτές που συναντώνται στη κυτοχρωμική *c* οξειδάση. Επομένως, η ύπαρξη μιας *μ*-περόξο γέφυρας στο φυσικό ένζυμο δεν θεωρείται πιθανή.



Σχήμα 3.5: *(Αριστερά) Η δομή του συμπλόκου **23** (Δεξιά) οι προτεινόμενοι τρόποι συναρμογής της περόξο γέφυρας*

Κατά τη μελέτη της δόνησης *ν*(O–O) με φασματοσκοπία συντονισμού Raman παρατηρήθηκε ότι η δοντικότητα του υποκαταστάτη του χαλκού επηρεάζει τη τιμή της δόνησης *ν*(O–O). Στα μοντέλα στα οποία ο χαλκός είναι συναρμοσμένος με έναν τριδοντικό υποκαταστάτη η τιμή της *ν*(O–O) είναι κατά 40 cm^{-1} μικρότερη από αυτή

που εμφανίζουν τα μοντέλα στα οποία ο χαλκός είναι συναρμοσμένος με έναν τετραδραστικό υποκαταστάτη. Προτάθηκε ότι η διαφορά στην τιμή της ν(O–O) οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο συναρμογής της περόξο γέφυρας (Σχήμα 3.5).[41]

Οι προτεινόμενες δομές στηρίζονται σε σύμπλοκα στα οποία είναι γνωστός ο τρόπος συναρμογής της περόξο γέφυρας. Το σύμπλοκο **24**, στο οποίο υπάρχει τετραδοντικός υποκαταστάτης για το χαλκό, όπως απεδείχθη με την κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ υιοθετεί μια μ-η^2:η^1 διαμόρφωση. Επίσης είναι γνωστό ότι διπυρηνικά μ-περόξο σύμπλοκα του χαλκού [Cu–O–O–Cu] τα οποία διαθέτουν τετραδοντικό υποκαταστάτη εμφανίζουν μια μ-1,2 διαμόρφωση. Τέλος σε πρόσφατες μελέτες EXAFS στο σύμπλοκο **28** βρέθηκε ότι αυτό υιοθετεί μια μ-η^2:η^2 διαμόρφωση.[42]

Η τιμή της ν(O–O) αντιπροσωπεύει την ισχύ του δεσμού O–O και μείωση της τιμής της σημαίνει εξασθένιση του δεσμού O–O. Συνεπώς παρατηρείται ότι στα σύμπλοκα με τριδραστικό υποκαταστάτη η σχάση του δεσμού O–O ευνοείται περισσότερο σε σχέση με αυτά που διαθέτουν τετραδραστικό υποκαταστάτη.

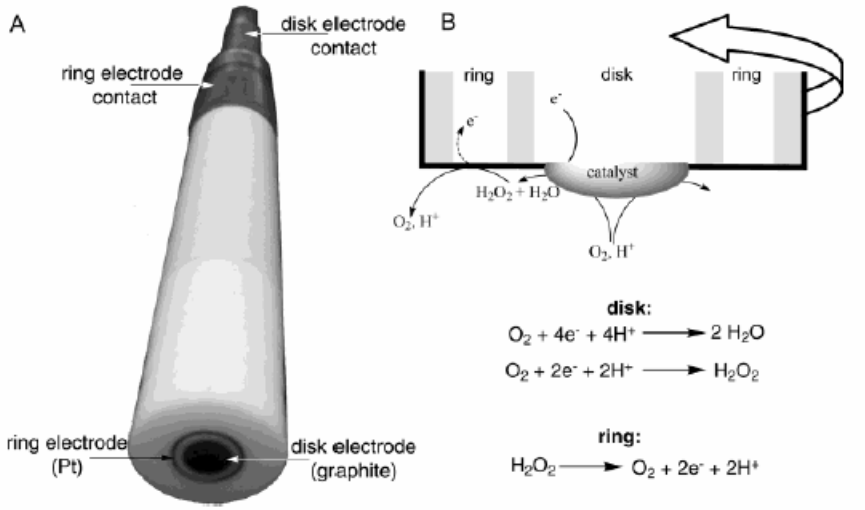
3.5 Μελέτη της καταλυτικής δράσης των βιομιμητικών μοντέλων

Εκτός από τις δομικές ομοιότητες που πρέπει να διαθέτει ένα βιομιμητικό μοντέλο είναι σημαντικό να προσομοιάζει και την καταλυτική δράση του φυσικού ενζύμου. Το ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης καταλύει την 4e^- αναγωγή του οξυγόνου προς νερό χωρίς την απελευθέρωση διαφόρων βλαβερών ενδιαμέσων όπως H_2O_2. Με σκοπό τη μίμηση αυτής της καταλυτικής δράσης παρασκευάσθηκαν μια σειρά από διμεταλλικά συνθετικά ανάλογα (Σχήμα 3.7), στα οποία μελετήθηκε ηλεκτροχημικά, η καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου.

3.5.1 Μεθοδολογία των ηλεκτροκαταλυτικών μελετών

Η πιο ενδεδειγμένη τεχνική για τη μελέτη της καταλυτικής συμπεριφοράς των βιομιμητικών μοντέλων είναι η βολταμετρία περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου (Σχήμα 3.6).[36] Το κεντρικό ηλεκτρόδιο αποτελείται από ένα δίσκο γραφίτη πάνω στον οποίο εναποτίθενται οι μη υδατοδιαλυτοί καταλύτες (μοντέλα) και έρχεται σε επαφή με ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει οξυγόνο. Γύρω από το δίσκο

υπάρχει ομόκεντρα ένα ηλεκτρόδιο πλατίνας (Pt) σε σήμα δακτυλίου, ενώ ανάμεσά τους παρεμβάλλεται ένας κύλινδρος αδρανούς υλικού (τεφλόν) που μονώνει αποτελεσματικά το δίσκο από το δακτύλιο.



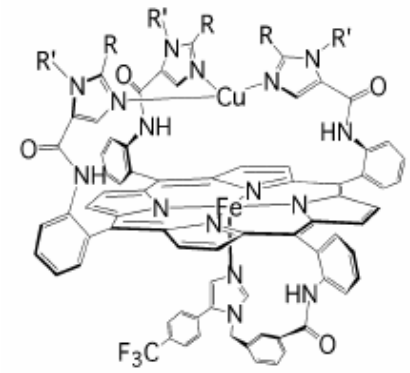
Σχήμα 3.6: *(Αριστερά) Το ηλεκτρόδιο περιστρεφόμενου δίσκου-δακτυλίου, (Δεξιά) Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του ηλεκτροδίου*

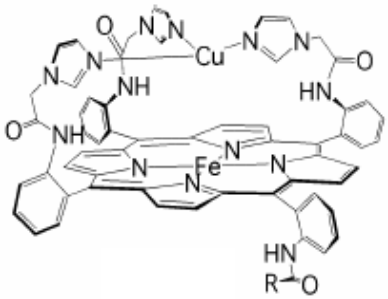
Η συνολική διάταξη περιστρέφεται με ελεγχόμενη ταχύτητα και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας ροής του διαλύματος προς το ηλεκτρόδιο. Με αυτό τον τρόπο μεταφέρεται το υπόστρωμα (οξυγόνο) προς την επιφάνεια του καταλύτη. Αύξηση της ταχύτητας περιστροφής οδηγεί στη μεταφορά περισσότερου O_2 προς το ηλεκτρόδιο. Το ρεύμα που ανιχνεύεται από το ηλεκτρόδιο του γραφίτη οφείλεται στην καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου. Τα προϊόντα της κατάλυσης διαχέονται στο ηλεκτρόδιο δακτυλίου, το οποίο λειτουργεί σε υψηλά οξειδωτικά δυναμικά έτσι ώστε να είναι σε θέση να οξειδώνει το H_2O_2. Σε περίπτωση που ο καταλύτης δεν είναι 100% αποτελεσματικός στην $4e^-$ αναγωγή του O_2 προς H_2O, παρατηρείται ο σχηματισμός ενός ποσοστού H_2O_2. Το H_2O_2 δεσμεύεται από το ηλεκτρόδιο πλατίνας και οξειδώνεται γρήγορα προς O_2. Συνεπώς το ηλεκτρόδιο δακτυλίου λειτουργεί σαν αισθητήρας H_2O_2. Η εκλεκτικότητα των καταλυτών όσον αφορά την τεσσάρων ηλεκτρονίων αναγωγή του οξυγόνου σε οποιοδήποτε ηλεκτροχημικό δυναμικό ποσοτικοποιείται από τον λόγο του ρεύματος δακτυλίου προς το ρεύμα του καταλύτη.

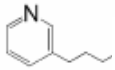
3.5.2 Δομικοί περιορισμοί των μοντέλων που μελετώνται ηλεκτροχημικά

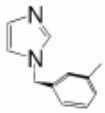
Τα βιομιμητικά μοντέλα πρέπει να διατηρούν τη δομική τους ακεραιότητα κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου. Αυτή η απαίτηση καθιστά μη ικανούς καταλύτες

τα μοντέλα στα οποία το σύμπλοκο του χαλκού είναι δεσμευμένο με τον πορφυρινικό δακτύλιο μέσω ενός υποκαταστάτη γέφυρα. Συνεπώς το σύμπλοκο του χαλκού θα πρέπει να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με την πορφυρίνη.[43] Παράλληλα έχει βρεθεί ότι η σταθερότητα του καταλύτη αυξάνεται όταν ο αξονικός υποκαταστάτης του σιδήρου (ιμιδαζόλιο ή πυριδίνη) είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένος με την πορφυρίνη.[44]

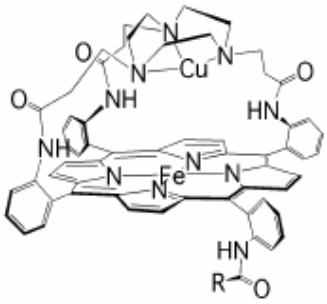


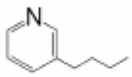


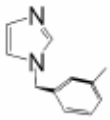
R=  **(32)**

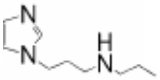
R=  **(33)**

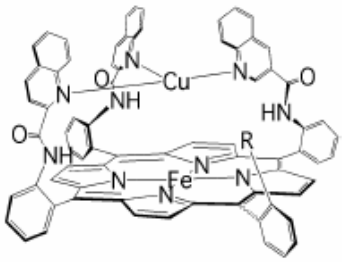
R=H, R'=Me **(29)**
R=Pr, R'=H **(30)**
R=Pr, R'=Me **(31)**



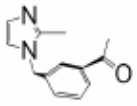
R=  **(34)**

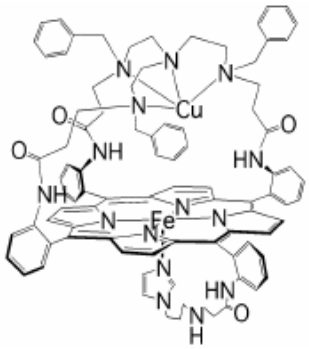
R=  **(35)**

R=  **(36)**

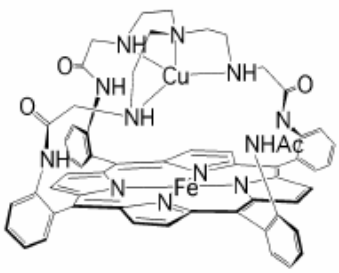


R=Ac **(37)**

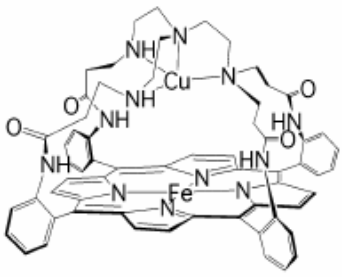
R=  **(38)**



(39)



(40)



(41)

Σχήμα 3.7: *Μοντέλα που μελετήθηκαν ηλεκτροκαταλυτικά*

3.5.3 Διερεύνηση του ρόλου του χαλκού

Κύριο στόχο των ηλεκτροκαταλυτικών μελετών με βιομιμητικά μοντέλα αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου του χαλκού κατά την καταλυτική αναγωγή του οξυγόνου. Αυτό επιτυγχάνεται συγκρίνοντας την ηλεκτροκαταλυτική συμπεριφορά του μοντέλου, όταν αυτό περιέχει το σίδηρο μαζί με το χαλκό, σε σχέση με τη συμπεριφορά που εμφανίζει όταν απουσιάζει ο χαλκός.[45] Στα περισσότερα μοντέλα η παρουσία του χαλκού είναι σημαντική και οδηγεί σε εκλεκτικότερους καταλύτες.[46] Τα σύμπλοκα αυτά όταν περιέχουν χαλκό καταλύουν την $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου προς νερό χωρίς την απελευθέρωση H_2O_2.

Ωστόσο υπάρχουν και κάποιες περιπτώσεις (σύμπλοκα **40** και **41**) στις οποίες ο χαλκός μειώνει την καταλυτική ικανότητα του μοντέλου και η αναγωγή του οξυγόνου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή H_2O_2.[47] Για την εξήγηση της ασυνήθιστης συμπεριφοράς των συμπλόκων **40** και **41** προτάθηκε ότι ο χαλκός δεν αλληλεπιδρά με το οξυγόνο που είναι δεσμευμένο στο σίδηρο ή ότι ο χαλκός κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου αποδεσμεύεται από το μοντέλο. Παράλληλα, δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση ότι το συνθετικό ανάλογο που περιέχει το χαλκό αποικοδομείται γρηγορότερα σε σχέση με αυτό που δεν περιέχει χαλκό.

Τέλος υπάρχουν και κάποιες περιπτώσεις (σύμπλοκα **37**, **38** και **39**) που το μοντέλο παρουσιάζει την ίδια καταλυτική δράση τόσο κατά την παρουσία όσο και κατά την απουσία του χαλκού.[48] Σε όλα τα μοντέλα που συντέθηκαν χρησιμοποιείται ο ίδιος πορφυρινικός δακτύλιος για τη συναρμογή του σιδήρου. Συνεπώς παρατηρείται ότι μικρές τροποποιήσεις στο περιβάλλον συναρμογής του χαλκού προκαλούν σημαντικές αλλαγές στην καταλυτική συμπεριφορά των μοντέλων.[49]

Τα μοντέλα που προσομοιάζουν καλύτερα την καταλυτική δράση του φυσικού ενζύμου είναι τα **29**, **30** και **31**.[50] Στα μοντέλα αυτά τα δυναμικά οξειδοαναγωγής του χαλκού και του σιδήρου είναι παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στην κυτοχρωμική *c* οξειδάση. Καταλύουν την $4e^-$ αναγωγή του οξυγόνου σε σχετικά φυσιολογικά δυναμικά (>50 mV) και εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα ~96% την οποία διατηρούν για περίπου 10000 καταλυτικούς κύκλους. Η ταχύτητα αναγωγής του οξυγόνου είναι παρόμοια με αυτή που έχει υπολογιστεί για το φυσικό ένζυμο.

Αναλύοντας την επιρροή του pH στα καταλυτικά ρεύματα προτάθηκε ότι η αναγωγή του οξυγόνου πραγματοποιείται μέσω ενός υδροπερόξο ενδιαμέσου (Fe–O–OH). Η υδρόλυση του υδροπερόξο ενδιαμέσου είναι η κύρια πηγή παραγωγής H_2O_2. Ο ρυθμός παραγωγής αυτού του ενδιαμέσου είναι μικρότερος από το ρυθμό καταστροφής του και με αυτό τον τρόπο εξηγείται η υψηλή εκλεκτικότητα του καταλύτη. Ο σχηματισμός του υδροπερόξο ενδιαμέσου έχει προταθεί ότι περιλαμβάνεται και στον καταλυτικό κύκλο του φυσικού ενζύμου.[51]

Συγκρίνοντας την καταλυτική συμπεριφορά των μοντέλων που περιέχουν χαλκό και των αντίστοιχων χωρίς χαλκό προκύπτουν ορισμένα χρήσιμα συμπεράσματα ως προς το ρόλο του συγκεκριμένου μεταλλικού ιόντος. Στις περιπτώσεις όπου απουσιάζει ο χαλκός τα μοντέλα εμφανίζουν μειωμένη σταθερότητα και αποικοδομούνται μέσα σε λίγους καταλυτικούς κύκλους. Η αποικοδόμηση αυτή αποδίδεται στη μεταφορά ενός πρωτονίου από κάποιο γειτονικό ιμιδαζόλιο προς το οξυγονωμένο ενδιάμεσο. Η συναρμογή του χαλκού στα ιμιδαζόλια παρεμποδίζει τη διαδικασία αυτή αυξάνοντας τη σταθερότητα του καταλύτη. Παρόμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί και στο φυσικό ένζυμο της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης, το οποίο έχει μεταλλαχθεί και απουσιάζει ο χαλκός Cu_B.

Οι καταλύτες **29**, **30** κα **31** που δεν περιέχουν χαλκό παρουσιάζουν μειωμένη εκλεκτικότητα ως προς την $4e^-$ αναγωγή του O_2 προς νερό και απελευθερώνουν μεγάλα ποσά H_2O_2. Για την εξήγηση αυτού του φαινομένου προτάθηκε ότι ο χαλκός λειτουργεί σαν μια «αποθήκη» ηλεκτρονίων, τα οποία προσφέρει κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου.[52] Επίσης έχει βρεθεί ότι η ταχύτητα δέσμευσης του οξυγόνου είναι μεγαλύτερη στα σύμπλοκα που περιέχουν το χαλκό. Ο χαλκός αποτελεί την αρχική θέση δέσμευσης του οξυγόνου και διευκολύνει στη συνέχεια τη συναρμογή του O_2 στο σίδηρο.

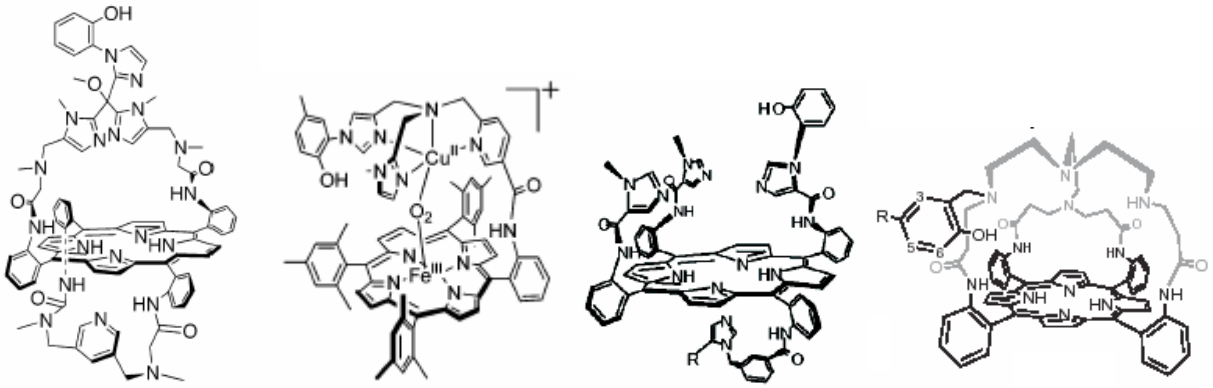
Το ιόν του κυανίου (CN^-) καθώς και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) είναι γνωστό ότι αποτελούν ανταγωνιστές του οξυγόνου και η δέσμευσή τους στην κυτοχρωμική *c* οξειδάση έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της λειτουργίας του ενζύμου. Τα μοντέλα που περιέχουν το ιόν του χαλκού εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα ως προς την αναστολή από τα συγκεκριμένα ιόντα.[53] Συνεπώς ο χαλκός προστατεύει τον καταλύτη εμποδίζοντας τη δέσμευση μικρών εξωτερικών μορίων ή ιόντων.

3.6 Μοντέλα με σκοπό τον προσδιορισμό του ρόλου της τυροσίνης

Με τη βοήθεια της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ αποκαλύφθηκε ότι μια από τις ιστιδίνες με τις οποίες είναι συναρμοσμένος ο χαλκός Cu_B, είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με μια τυροσίνη. Η τυροσίνη αυτή αποτελεί ένα καλά διατηρημένο αμινοξύ στην οικογένεια των τελικών αιμο-χαλκο οξειδασών και έχει προταθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο κατά τον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου, είτε λειτουργώντας ως δότης ενός ηλεκτρονίου και ενός πρωτονίου,[54] είτε τοποθετώντας το χαλκό σε μια κατάλληλη διαμόρφωση και απόσταση σε σχάση με το σίδηρο της αίμης a_3.[55]

Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου της τυροσίνης στην κυτοχρωμική *c* οξειδάση συντέθηκαν μερικά βιομιμητικά μοντέλα τα οποία κοντά στο περιβάλλον συναρμογής του χαλκού διαθέτουν μια ομοιοπολικά συνδεδεμένη φαινόλη (Σχήμα 3.8).[56,57,58] Όλα αυτά τα μοντέλα έχουν δημοσιευτεί μέσα στο 2004 και στα περισσότερα από αυτά δεν έχουν πραγματοποιηθεί ακόμη οι αντιδράσεις μετάλλωσης με το σίδηρο και το χαλκό.

Το μόνο σύμπλοκο στο οποίο έχουν πραγματοποιηθεί οι μεταλλώσεις είναι το **43**.[59] Στο μοντέλο αυτό πραγματοποιήθηκαν μελέτες δέσμευσης του οξυγόνου και βρέθηκε ότι σχηματίζει ένα *μ*-περόξο ενδιάμεσο η θέρμανση του οποίου οδηγεί στο αντίστοιχο *μ*-όξο σύμπλοκο. Ωστόσο απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο της τυροσίνης. Ο μελέτη του ρόλου της τυροσίνης μέσα από βιομιμητικές μελέτες έχει μόλις αρχίσει και απαιτούνται πολλά βήματα μέχρι να προκύψουν κάποια αποτελέσματα. Συνεπώς είναι απαραίτητη η σύνθεση νέων βιομιμητικών μοντέλων που θα διαθέτουν σε κοντινή απόσταση από το διμεταλλικό κέντρο το μόριο της τυροσίνης.



(42) **(43)** **(44)** **(45)**

Σχήμα 3.8: Μοντέλα που περιέχουν ένα φαινολικό δακτύλιο

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. E. Kim, E.E. Chufán, K. Kamaraj, K.D. Karlin, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1077-1133
2. J.P. Collman, R. Boulatov, C.J. Sunderland, L. Fu, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 561-588
3. T. Soulimane, G. Buse, G.P. Bourenkov, H.D. Bartunik, R. Huber, M.E. Than, *EMBO J.* **2000**, 19, 1766-1776
4. S.C. Lee, R.H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5833-5834
5. M.J. Scott, H.H. Zhang, S.C. Lee, B. Hedman, K.O. Hodgson, R.H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 568-569
6. C.F. Martens, N.N. Murthy, H.V. Obias, K.D. Karlin, *Chem. Commun.* **1996**, 629-630
7. E. Kim, M.E. Helton, I.M. Wasser, K.D. Karlin, S. Lu, H. Huang, P.M. Loccoz, C.D. Incarvito, A.L. Rheingold, M. Honecker, S. Kaderli, A.D. Zuberbühler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 3623-3628
8. T.D. Ju, R.A. Ghiladi, D.H. Lee, G.P.F. Strijdonck, A.S. Woods, R.J. Cotter, V.G. Young Jr, K.D. Karlin, *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 2244-2245
9. S. Fox, A. Nanthakumar, M. Wikström, K.D. Karlin, N.J. Blackburn, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 24-34
10. K.D. Karlin, A. Nanthakumar, S. Fox, N.N. Murthy, N. Ravi, B.H. Huynh, R.D. Orosz, E.P. Day, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4753-4763
11. S.C. Lee, R.H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11789-11798
12. T.A. Kent, L.J. Young, G. Palmer, J.A. Feel, E. Munck, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 8543-8546
13. A. Nanthakumar, S. Fox, N.N. Murthy, K.D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3898-3906
14. M.A. Kopf, Y.M. Neuhold, A.D. Zuberbu1hler, K.D. Karlin, *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 3093-3102
15. H.V. Obias, G.P.F. Strijdonck, D.H. Lee, M. Ralle, N.J. Blackburn, K.D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9696-9697
16. S. Hallén, T. Nilsson, *Biochemistry* **1992**, 31, 11853-11859
17. M. Wikström, J.E.Morgan, M.I.Verkhovsky, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1998**, 30, 139-145
18. R. Mitchell, S. Brown, P. Mitchell, P.R. Rich, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1100, 40-48
19. T.A. Kent, E. Muenck W.R. Dunham, W.F. Filter, K.L. Findling, T. Yoshida, J.A. Fee, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 12489-12492
20. G. Palmer. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1993**, *2*5, 145-151
21. M.J. Scott, S.C. Lee, R.H. Holm, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 4651-4662

22. M.J. Scott, R.H.Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 11357-11367
23. B.S. Lim, R.H. Holm, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 4898-4908
24. S.C. Lee, M.J. Scott, K. Kauffmann, E. Münck, R.H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 401-402
25. D.M. Corsi, N.N. Murthy, V.G. Young, K.D. Karlin, *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 848-858
26. S. Yoshikawa, W.S Caughey, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 7945-7958
27. M.T. Gardner, G. Deinum, Y. Kim, G.T. Babcock, M.J. Scott, R.H. Holm, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 6878-6884
28. M.R.A. Blomberg, P.E.M. Siegbahn, M. Wikström, *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 5231-5243
29. Y. Naruta, T. Sasaki, F. Tani, Y. Tachi, N. Kawato, N. Nakamura, *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, 83, 239-246
30. M.A. Kopf, K.D. Karlin, *Inorg Chem*. **1999**, 38, 4922-4923
31. J.P. Collman, C.J. Sunderland, K.E. Berg, M.A. Vance, E.I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc*. **2003**, 125, 6648-6649
32. R.A. Ghiladi, K.R. Hatwell, K.D. Karlin, H. Huang, P.M. Loccoz, C. Krebs, B.H. Huynh, L.A. Marzilli, R.J. Cotter, S. Kaderli, A.D. Zuberbühler, *J. Am. Chem Soc* **2001**, 123, 6183-6184
33. E.E. Chufán, K.D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 16160-16161
34. T. Sasaki, N. Nakamura, Y. Naruta, *Chem. Lett.* **1998**, 351-352
35. R.A. Ghiladi, T.D. Ju, D.H. Lee, P.M. Loccoz, S. Kaderli, Y.M. Neuhold, A.D. Zuberbühler, A.S. Woods, R.J. Cotter, K.D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9885-9886
36. J.P. Collman, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 5145-5155
37. R.A. Ghiladi,K.D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 2400-2407
38. J.P. Collman, C.J. Sunderland, R. Boulatov, *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 2282-2291
39. R.A. Ghiladi, R.M. Kretzer, I. Guzei, A.L. Rheingold, Y.M. Neuhold, K.R. Hatwell, A.D. Zuberbühler, K.D. Karlin, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 5754-5767
40. T. Chishiro, Y. Shimazaki, F. Tani, Y. Tachi, Y. Naruta, S. Karasawa, S. Hayami, Y. Maeda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2788-2791
41. K.D. Karlin, E. Kim, *Chem. Lett.* **2004**, 33, 1226-1231
42. E. Kim, J. Shearer, S. Lu, P.M. Loccoz, M.E. Helton, S. Kaderli, A.D. Zuberbühler, K.D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12716-12717
43. J.P. Collman, M. Rapta, M. Bröring, L. Raptova, R. Schwenninger, B. Boitrel, L. Fu, M. L'Her, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1387-1388
44. J.P. Collman, R. Schwenninger, M. Rapta, M. Bröring, L. Fu, C*hem. Commun.* **1999**, 137-138

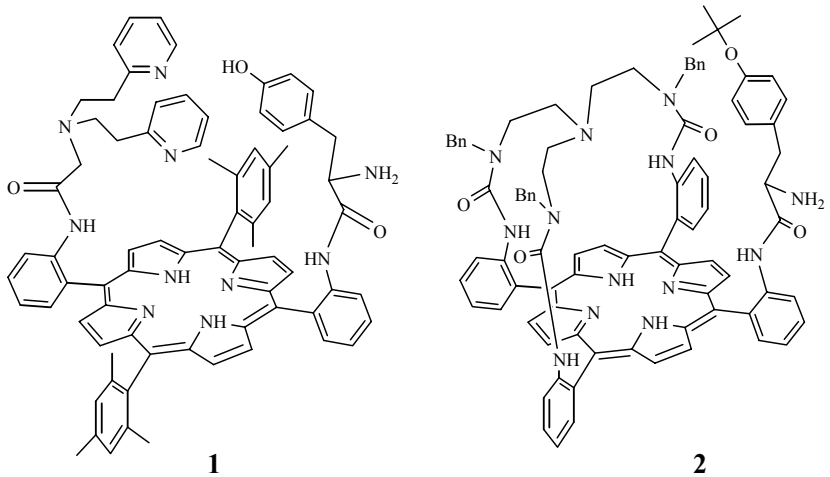
45. A. Didier, M. L'Her, B. Boitrel, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1274-1276
46. J.P. Collman, L. Fu, P.C. Herrmann, X. Zhang, *Science* **1997**, 275, 949-951
47. D. Ricard, B. Andrioletti, M. L'Her, B. Boitrel, *Chem. Commun.* **1999**, 1523-1524
48. D. Ricard, A. Didier, M. L'Her, B. Boitrel, *ChemBioChem* **2001**, 2, 144-148
49. J.P. Collman, L. Fu, P. Herrmann, Z. Wang, M. Rapta, M. Bröring, R. Schwenninger, B. Boitrel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 3397-3400
50. R. Boulatov, J.P. Collman, I.M. Shiryaeva, C.J. Sunderland, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 124, 11923-11935
51. M.R.A. Blomberg, P.E.M. Siegbahn, G.T. Babcock, M. Wikstrom, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12848-12858
52. J.P. Collman, R. Boulatov, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3487-3489
53. J.P. Collman, R. Boulatov,I.M. Shiryaeva, C.J. Sunderland, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4139-4142
54. D.A. Proshlyakov, M.A. Pressler, C. DeMaso, J.F. Leykam, D.L. DeWitt, G.T. Babcock, *Science* **2000**, *29*0, 1588-1591
55. E. Pinakoulaki, U. Pfitzner, B. Ludwig, C. Varotsis, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 13563-13568
56. J.P. Collman, R.A. Decréau, C. Zhang, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 3546-3549
57. J.P. Collman, R.A. Decréau, *Org. Lett.* **2004**, 6, 1033-1036
58. D. Gueyrard, A. Didier, C. Ruzié, A. Bondon, B. Boitrel, *Syn. Lett.* **2004**, 7, 1158-1162
59. J.G. Liu, Y. Naruta, F. Tani, T.Chishiro, Y. Tachi, *Chem. Commun.* **2004**, 120-121

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση δυο βιομιμητικών μοντέλων που να προσομοιάζουν τη δομή του ενεργού κέντρου της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης (Σχήμα 4.1). Τα μοντέλα αυτά αποτελούνται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο στον οποίο θα συναρμοστεί ο σίδηρος, καθώς και από έναν υποκαταστάτη που φέρει αζωτούχες ομάδες οι οποίες είναι σε θέση να δεσμεύσουν το χαλκό. Επίσης και τα δυο μοντέλα σε κοντινή απόσταση από τη θέση δέσμευσης των δυο μεταλλικών ιόντων διαθέτουν ένα μόριο τυροσίνης.

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο ο ρόλος της τυροσίνης παραμένει αδιευκρίνιστος και οι βιομημιτικές μελέτες που εξετάζουν το ρόλο της, είναι σε πρωταρχικό στάδιο. Συνεπώς, η σύνθεση νέων συνθετικών αναλόγων που θα περιλαμβάνουν το μόριο της τυροσίνης καθίσταται αναγκαία. Η μελέτη των μοντέλων **1** και **2** τόσο κατά την παρουσία όσο και κατά την απουσία της τυροσίνης αναμένεται να δώσει χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο του συγκεκριμένου αμινοξέος.



Σχήμα 4.1: *Τα δυο βιομιμητικά μοντέλα που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία*

Στο μοντέλο **1** ο υποκαταστάτης του χαλκού είναι η δις(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμίνη (BPEA). Η BPEA είναι ένας τριδοντικός υποκαταστάτης και είναι γνωστό ότι σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με το χαλκό. Ο τρόπος σύνδεσης της

BPEA με τον πορφυρινικό δακτύλιο της παρέχει τη δυνατότητα περιστροφής. Συνεπώς η απόσταση ανάμεσα στην πορφυρίνη και τη BPEA μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τις συνθήκες.

Αντίθετα το μοντέλο **2** διαθέτει ένα τετραδοντικό υποκαταστάτη, την τρις(2-βενζυλο-αμινο-αιθυλο)αμίνη (TBTREN). Το TBTREN συναρμόζεται με τρία από τα τέσσερα φαινύλια της πορφυρίνης. Με αυτόν τον τρόπο δεν υπάρχει δυνατότητα περιστροφής του υποκαταστάτη και η απόστασή του από την πορφυρίνη δεν μπορεί να μεταβάλλεται.

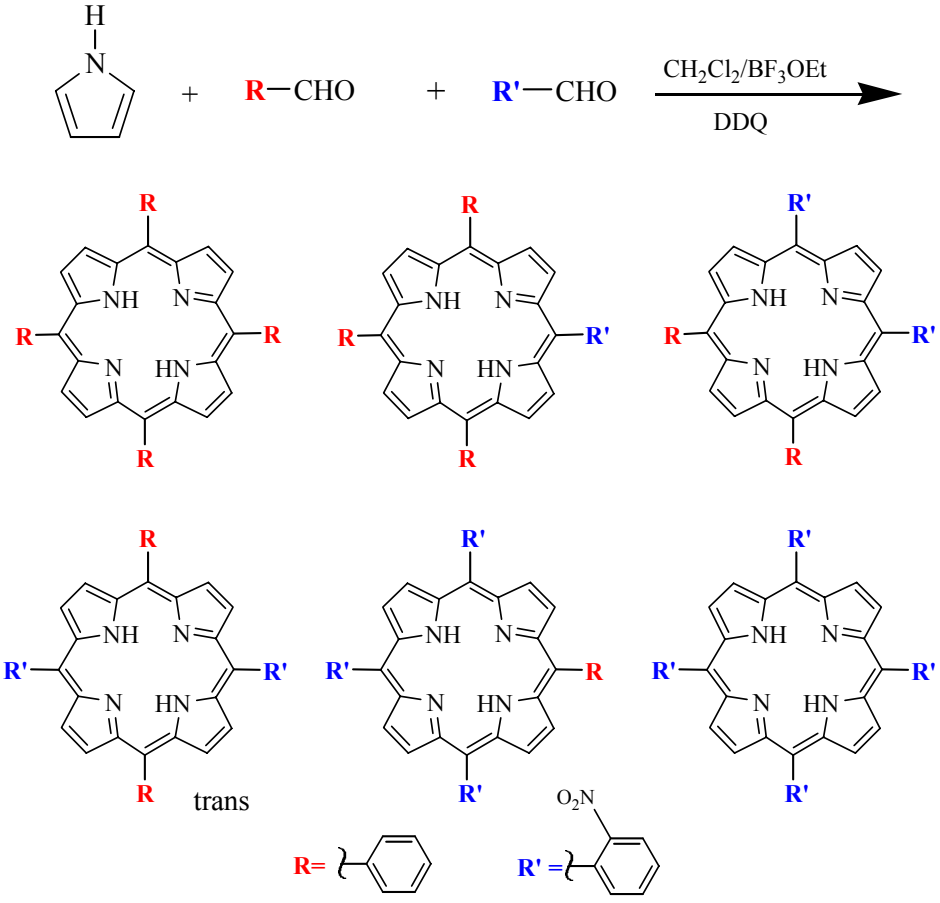
Οι τυχόν διαφορές που θα παρατηρηθούν ανάμεσα στα δυο μοντέλα αναμένεται να παρέχουν χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση της δοντικότητας του υποκαταστάτη του χαλκού ως προς τον τρόπο συναρμογής του οξυγόνου, και ως προς την καταλυτική δράση του μοντέλου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΝΘΕΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

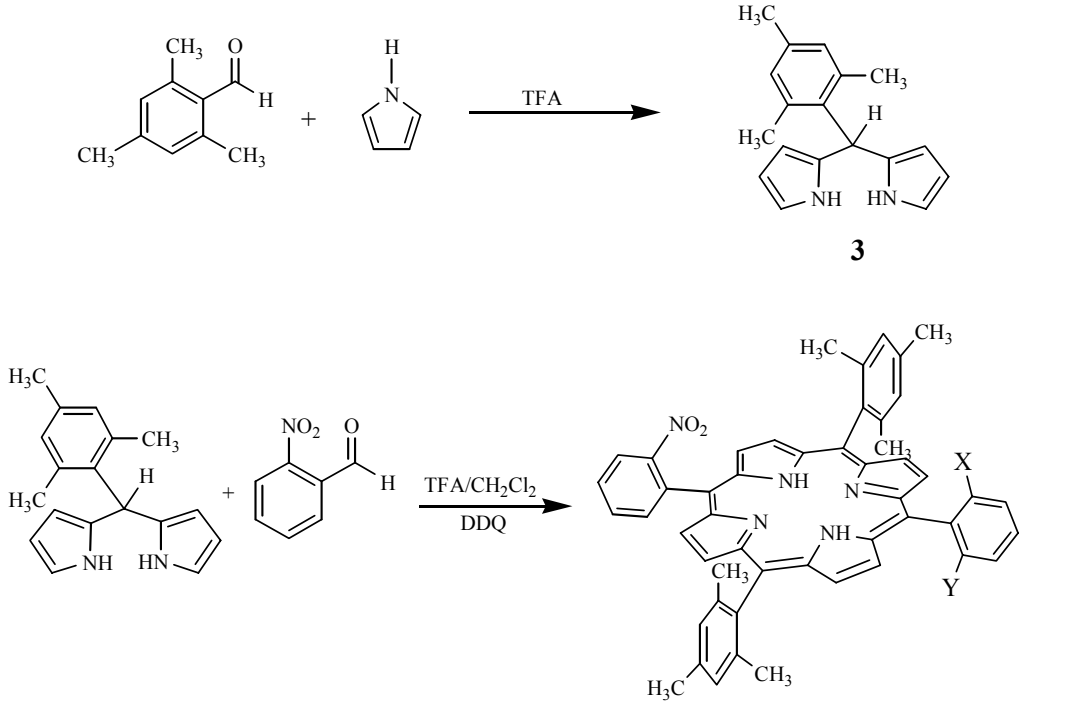
5.1 Ανάλυση συνθετικής πορείας για το μοντέλο 1

Ο πορφυρινικός δακτύλιος που αποτελεί τη βασική δομική μονάδα στη σύνθεση του συμπλόκου **1** είναι η 5,15-διμεσίτυλο-10,20(2-νιτροφαίνυλο) πορφυρίνη, μια *trans-meso* υποκατεστημένη πορφυρίνη. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος παρασκευής πορφυρινών περιλαμβάνει συμπύκνωση του πυρρολίου με ένα μίγμα δυο αλδεϋδών.[1] Με τη μέθοδο αυτή εκτός από την *trans-meso* υποκατεστημένη πορφυρίνη που είναι το επιθυμητό προϊόν, λαμβάνονται και άλλες πέντε πορφυρίνες (Σχήμα 5.1).



Σχήμα 5.1: *Σύνθεση πορφυρίνης με ανάμειξη πυρρολίου με δυο αλδεΰδες*

Η συγκεκριμένη συνθετική προσέγγιση δοκιμάστηκε αλλά ο διαχωρισμός αυτών των ενώσεων αποτελεί μια αρκετά επίπονη διαδικασία και οι αποδόσεις είναι εξαιρετικά χαμηλές. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε μια μέθοδος που οδηγεί στην αποκλειστική σύνθεση *trans-meso* υποκατεστημένων πορφυρινών.[2] Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει δυο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται συμπύκνωση ανάμεσα στο πυρρόλιο και μια αλδεΰδη προς το σχηματισμό ενός *meso* υποκατεστημένου διπυρρομεθανίου. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει μια αντίδραση [2+2] κυκλοπροσθήκης τύπου MacDonald ανάμεσα στο διπυρρομεθάνιο και μια αλδεΰδη (Σχήμα 5.2).



Σχήμα 5.2: *Σύνθεση πορφυρίνης με τη μέθοδο του διπυρρομεθανίου*

Στη συγκεκριμένη περίπτωση αρχικά συντέθηκε το 5-μεσιτυλδιπυρρομεθάνιο (**3**) με μια όξινα καταλυόμενη αντίδραση συμπύκνωσης σε θερμοκρασία δωματίου ανάμεσα στο πυρρόλιο και τη μεσιτυλαλδεΰδη.[3] Στο επόμενο στάδιο, η ένωση **3** αντιδρά με τη 2-νιτροβενζαλδεΰδη σχηματίζοντας αρχικά το πορφυρογενές, η οξείδωση του οποίου με 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη (DDQ) οδηγεί στην πορφυρίνη **4**.[4] Όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.2, στην πορφυρίνη **4** τα φαινύλια που φέρουν τις νιτροομάδες συνδέονται με τον πορφυρινικό δακτύλιο με έναν απλό

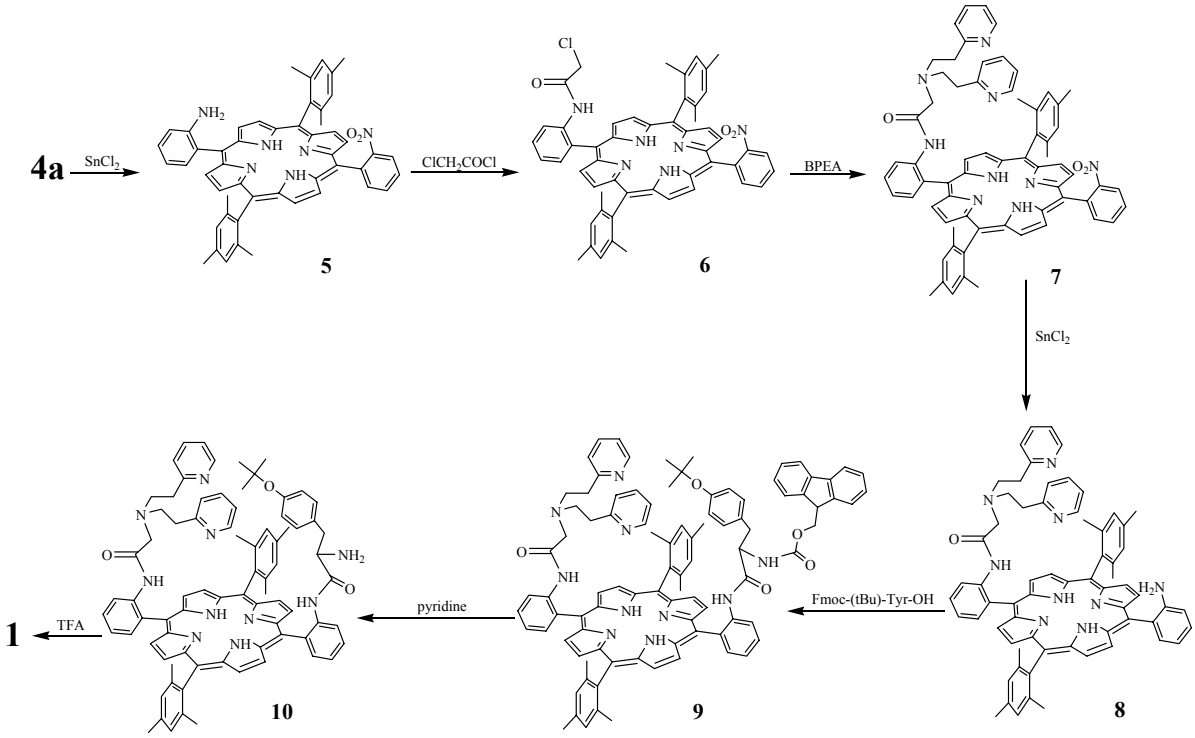
δεσμό, γεγονός που τους παρέχει τη δυνατότητα περιστροφής γύρω από αυτόν τον δεσμό. Εντούτοις, η παρουσία των δυο νιτροομάδων σε όρθο θέση εμποδίζει την περιστροφή αυτή σε θερμοκρασία δωματίου. Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή την απομόνωση δυο διαφορετικών ισομερών με χρωματογραφία στήλης. Στο *α,α* ατροποϊσομερές, οι δυο νιτροομάδες βρίσκονται στην ίδια πλευρά του πορφυρινικού δακτυλίου ενώ στο *α,β* ατροποϊσομερές σε αντίθετες πλευρές. Με θέρμανση πάνω από τους 55 – 60 ºC σε διαλύτη τολουόλιο είναι δυνατή η περιστροφή των δυο δακτυλίων και πραγματοποιείται αλληλομετατροπή των δυο ισομερών.

Η επιλογή ενός παρεμποδισμένου διπυρρομεθανίου όπως το **3** για τη σύνθεση της πορφυρίνης **4** οφείλεται σε συγκεκριμένους λόγους. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία, ότι όταν χρησιμοποιείται μη παρεμποδισμένο διπυρρομεθάνιο λαμβάνει χώρα μια σειρά όξινα καταλυόμενων αντιδράσεων πολυπυρρολικής επαναδιευθέτησης (scrambling) που είναι δύσκολο να κρατηθούν σε χαμηλά επίπεδα.[5] Το γεγονός αυτό έχει σαν συνέπεια την ύπαρξη πολλών παραπροϊόντων καθώς και τη μειωμένη απόδοση της αντίδρασης. Η παρουσία του 5-μεσιτυλοδιπυρρομεθανίου μειώνει το scrambling και καθιστά δυνατή την σύνθεση καθαρών *trans-meso* υποκατεστημένων πορφυρινών σε ικανοποιητικές αποδόσεις. Επίσης, η ύπαρξη των μεθυλίων της μεσιτυλ-ομάδας, λόγω της ισχυρής στερεοχημικής παρεμπόδισης που παρέχουν εμποδίζει την περιστροφή των φαινυλίων που φέρουν τις νιτροομάδες. Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό διότι για την επίτευξη των αντιδράσεων που ακολούθησαν για τη σύνθεση του μοντέλου **1** είναι επιτρεπτή η θέρμανση μέχρι τους 55 ºC - χωρίς να παρατηρείται αλληλομετατροπή των ατροποϊσομερών - απουσία των μεθυλίων θα ήταν δυνατή η θέρμανση μέχρι τους 40 ºC. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι η παρουσία μεθυλίων στον πορφυρινικό δακτύλιο αυξάνει τη θερμική σταθερότητα των ενδιαμέσων που σχηματίζονται κατά την αντίδραση των βιομιμητικών μοντέλων με το οξυγόνο.[6]

Οι μετέπειτα αντιδράσεις που ακολουθήθηκαν και οδήγησαν στη σύνθεση του μοντέλου **1** παρουσιάζονται συνοπτικά στο σχήμα 5.3. Η πορφυρίνη **5** συντίθεται με εκλεκτική αναγωγή μιας εκ των δυο νιτροομάδων της πορφυρίνης **4a**.[7] Η αναγωγή αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση μικρής σχετικά περίσσειας (6 ισοδύναμα) διχλωριούχου κασσιτέρου σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (0.5mM) και διατηρώντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης στους 0 ºC.

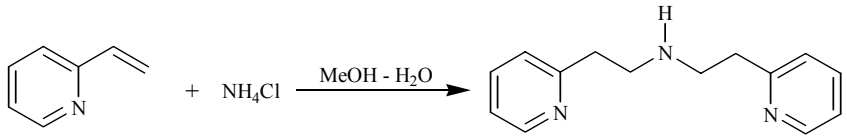
Για να γίνει η αμινομάδα περισσότερο λειτουργική και να είναι δυνατή η συναρμογή του συμπλόκου που θα δεσμεύει το χαλκό παρασκευάζεται η πορφυρίνη

6. Η σύνθεση αυτή περιλαμβάνει την αντίδραση ανάμεσα στην πορφυρίνη **5** και το χλωρο-ακέτυλο χλωρίδιο σε θερμοκρασία δωματίου.[8]



Σχήμα 5.3: *Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του μοντέλου **1***

Ο υποκαταστάτης στον οποίο θα συναρμοστεί το ιόν του χαλκού είναι η δις(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμίνη (BPEA). Η σύνθεση της BPEA (Σχήμα 5.4) πραγματοποιείται με αντίδραση της 2-βινυλοπυριδίνης με το χλωριούχο αμμώνιο υπό βρασμό σε διαλύτη μίγμα νερού-μεθανόλης (7:1).[9] Ο καθαρισμός της BPEA επιτυγχάνεται με κλασματική απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται εύκολος καθαρισμός μεγάλων ποσοτήτων BPEA.



Σχήμα 5.4: *Αντίδραση σχηματισμού της BPEA*

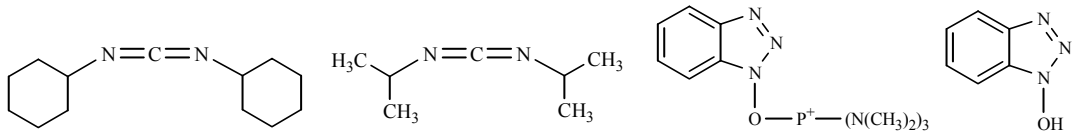
Η συναρμογή της BPEA στην πορφυρίνη **6** πραγματοποιείται παρουσία διισοπροπυλοαιθυλαμίνης (DIPEA) και οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου **7**. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αυτής απαιτείται θέρμανση στους 80 ºC.[10] Η θερμοκρασία αυτή είναι απαγορευτική στην

προκειμένη περίπτωση διότι σε τέτοια θερμοκρασία αναμένεται περιστροφή των φαινολικών δακτυλίων γύρω από τον απλό δεσμό που τους συνδέει με τον πορφυρινικό δακτύλιο και θα εμφανιζόταν αλληλομετατροπή των ατροποϊσομερών. Για να αποφευχθεί η υψηλή θερμοκρασία χρησιμοποιείται μεγάλη περίσσεια BPEA (100 ισοδύναμα). Με αυτό τον τρόπο θέρμανση στους 40 ºC για 18 ώρες, οδηγεί στη σύνθεση της πορφυρίνης **7** με ικανοποιητική απόδοση.

Με αναγωγή και της δεύτερης νιτροομάδας συντίθεται η ένωση **8**.[7] Οι συνθήκες αντίδρασης αυτή τη φορά είναι περισσότερο δραστικές επειδή δεν υπάρχει το πρόβλημα της εκλεκτικότητας. Για τη σύνθεση της πορφυρίνης **8** χρησιμοποιούνται 19 ισοδύναμα διχλωριούχου κασσιτέρου και η θερμοκρασία της αντίδρασης είναι θερμοκρασία δωματίου.

Η σύνθεση της πορφυρίνης **9** περιλαμβάνει τη σύζευξη ενός μορίου τυροσίνης στην πορφυρίνη **8**. Για την αποφυγή παράπλευρων ανεπιθύμητων αντιδράσεων, η τυροσίνη που χρησιμοποιείται έχει προστατευμένη την αμινομάδα της με την 9-φλουορενυλμεθοξυκαρβονυλ-ομάδα (Fmoc) και το υδροξύλιό της με ένα τεταρτοταγές βουτύλιο (tBu).

Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης αντίδρασης και την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών δοκιμάστηκαν τα αντιδραστήρια σύζευξης: δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίο (DCC), διισοπροπυλοκαρβοδιιμίδιο (DIC), εξαφθοροφωσφορικό άλας του βενζοτριαζολυλο-τρις(διμεθυλαμινο)φωσφονίου (BOP), καθώς και συνδυασμός αυτών με τη χρήση πρόσθετων αντιδραστηρίων όπως το 1-υδροξυβενζοτριαζόλιο (HOBt) (Σχήμα 5.5).



DCC DIC BOP HOBt

Σχήμα 5.5: *Τα αντιδραστήρια σύζευξης που δοκιμάστηκαν*

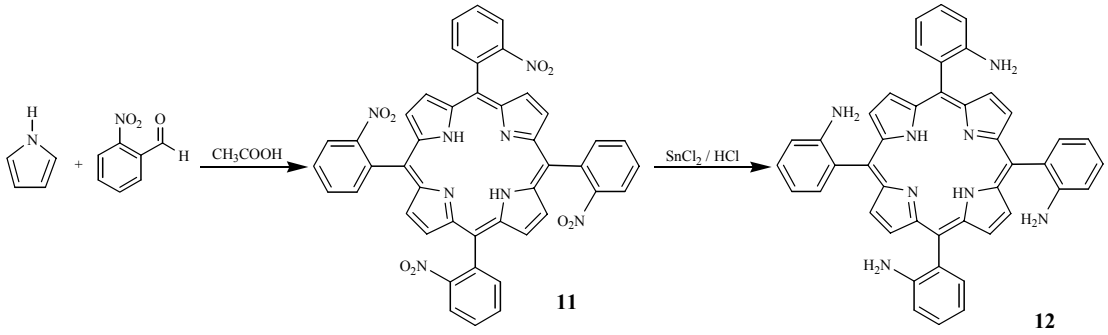
Η χρήση των αντιδραστηρίων DIC και BOP καθώς και ο συνδυασμός αυτών με το HOBt δεν οδήγησε στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν κατά τη χρήση του DCC και όταν απουσιάζει το HOBt. Η αδυναμία πραγματοποίησης της αντίδρασης με τη χρήση του BOP και του DIC οφείλεται στη μειωμένη βασικότητα της αμινομάδας λόγω του αρωματικού χαρακτήρα που έχει.

Επομένως η ένωση **9** παρασκευάστηκε με τη μέθοδο του συμμετρικού ανυδρίτη και χρήση του DCC.[11] Ανάμιξη της πορφυρίνης **8** με την τυροσίνη παρουσία του DCC οδήγησε στο σχηματισμό της πορφυρίνης **9** με ικανοποιητική απόδοση. Οι συνθήκες αντίδρασης που ευνοούν τη σύζευξη με το DCC είναι η υψηλή συγκέντρωση αντιδρώντων, η χαμηλή θερμοκρασία και η χρήση μη πολικών διαλυτών. Επίσης κατά την αντίδραση σύζευξης της τυροσίνης στην πορφυρίνη **5**, παρατηρήθηκε ότι μετά την πάροδο ~24 ωρών σταματά η πρόοδος της αντίδρασης. Στο σημείο αυτό, προσθήκη επιπλέον ποσότητας τυροσίνης και DCC έχει ως αποτέλεσμα τη συνέχιση της αντίδρασης και το σχηματισμό του προϊόντος σχεδόν ποσοτικά. Για την εφαρμογή των βέλτιστων συνθηκών, η αντίδραση σύνθεσης της πορφυρίνης **9** πραγματοποιήθηκε σε έναν μη πολικό διαλύτη όπως το διχλωρομεθάνιο, κρατώντας τη θερμοκρασία χαμηλά (~5 ºC) και προσθέτοντας επιπλέον ποσότητες αντιδραστηρίων μετά τις 24 ώρες.

Στο επόμενο στάδιο πραγματοποιείται η αποπροστασία της αμινομάδας της τυροσίνης. Η απομάκρυνση της Fmoc ομάδας πραγματοποιείται εύκολα σε βασικές συνθήκες και ιδιαίτερα με τη χρήση δευτεροταγών αμινών. Συνεπώς, ανάμειξη της πορφυρίνης **9** με πιπεριδίνη σε διαλύτη DMF έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό της **10**.[12] Τέλος, αποπροστασία του υδροξυλίου κάτω από όξινες συνθήκης και τη χρήση TFA[13] οδηγεί στο σχηματισμό του μοντέλου **1**.

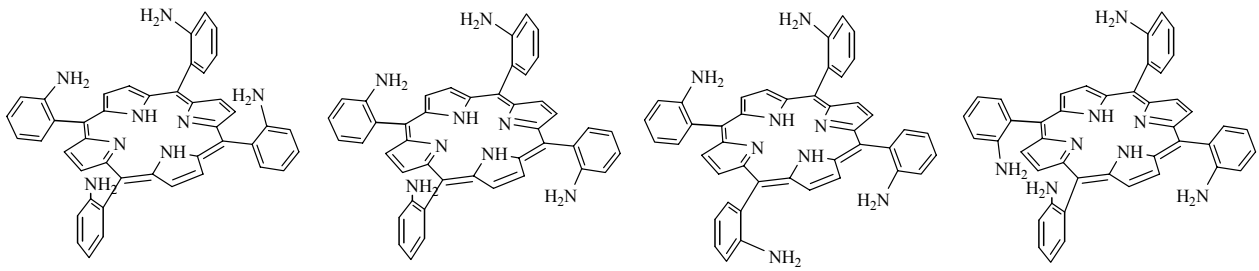
5.2 Ανάλυση συνθετικής πορείας για το μοντέλο 2

Ο πορφυρινικός δακτύλιος που αποτελεί τη βασική δομική μονάδα του μοντέλου **2** είναι η 5,10,15,20-τετρακις-(2-αμινοφαίνυλο) πορφυρίνη **12** (Σχήμα 5.6). Αρχικά συντίθεται η αντίστοιχη νιτροφαίνυλο πορφυρίνη **11** με μια αντίδραση συμπύκνωσης ανάμεσα στο πυρρόλιο κα τη 2-νιτροβενζαλδεΰδη.[14] Η αναγωγή των νιτροομομάδων με διχλωριούχο κασσίτερο ($SnCl_2$) σε ισχυρά όξινες συνθήκες οδηγεί στο σχηματισμό της τέτρα-αμινο πορφυρίνης **12**.[14]



Σχήμα 5.6: *Σύνθεση της πορφυρίνης **12***

Λόγω της όρθο υποκατάστασης των φαινυλίων εμποδίζεται η περιστροφή τους γύρω από τον απλό δεσμό που τα ενώνει με την πορφυρίνη. Για αυτό το λόγο η πορφυρίνη **12** αποτελεί ένα μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών, τα οποία αντιστοιχούν σε τέσσερις διαφορετικές διευθετήσεις των αμινομάδων πάνω και κάτω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου (Σχήμα 5.7). Η σχετική αναλογία των ισομερών όπως φαίνεται από τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι *α,α,α,α* - *α,α,α,β* - *α,α,β,β* - *α,β,α,β* (1 – 4 – 2 – 1). Έχουν πραγματοποιηθεί εκτεταμένες έρευνες σχετικά με το διαχωρισμό, την αλληλομετατροπή και τον χαρακτηρισμό των ατροποϊσομερών. Από τις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι θερμική ενέργεια που απαιτείται για την περιστροφή του φαινυλίου εξαρτάται από το μέγεθος του όρθο υποκαταστάτη καθώς και από το κεντρικό μεταλλικό ιόν όταν αυτό υπάρχει.

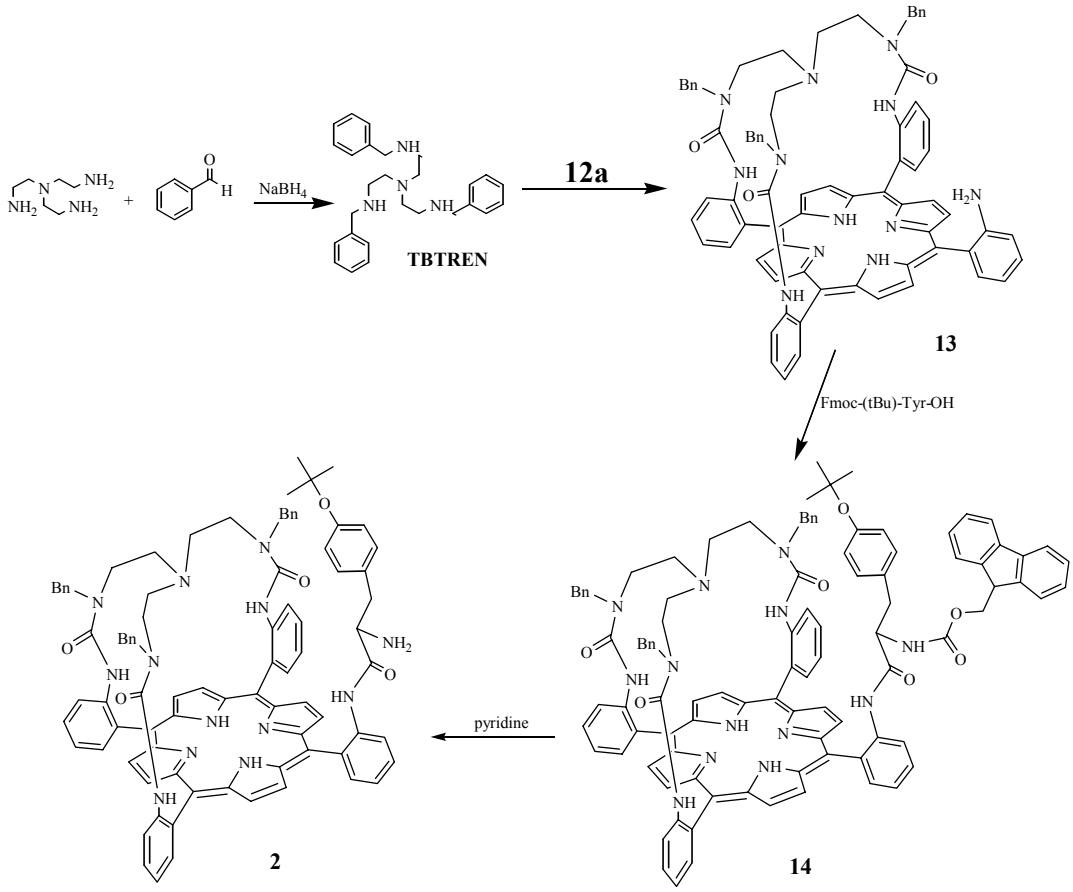


Σχήμα 5.7: *Τα τέσσερα διαφορετικά ατροποϊσομερή που σχηματίζονται*

Το ατροποϊσομερές που χρησιμοποιείται στα επόμενα στάδια είναι το *α,α,α,α* (**12a**). Με σκοπό την αύξηση του ποσοστού του **12a** χρησιμοποιείται μια μέθοδος κατά την οποία το μίγμα της πορφυρίνης **12** διαλύεται σε τολουόλιο παρουσία

οξειδίου του πυριτίου (SiO_2) και θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού.[15] Με αυτή τη διαδικασία το 68% του μίγματος μετατρέπεται προς το επιθυμητό *α,α,α,α* ισομερές. Η απόδοση αυτή μπορεί να αυξηθεί εάν μετά το διαχωρισμό των ατροποϊσομερών επαναληφθεί η ίδια διαδικασία στο μίγμα των υπόλοιπων τριών ισομερών.

Οι αντιδράσεις που ακολουθήθηκαν για τη σύνθεση του μοντέλου **1** παρουσιάζονται συνοπτικά στο σχήμα 5.8. Το σύμπλοκο που χρησιμοποιείται για τη δέσμευση του χαλκού είναι η τρις(2-βενζυλο-αμινο-αιθυλο)αμίνη (TBTREN). Η ένωση αυτή παρασκευάζεται με μια αντίδραση ανάμεσα στην τρις(2-αμινοαιθυλο)αμίνη (TREN) και την βανζαλδεΰδη παρουσία βοροϋδριδίου του νατρίου ($NaBH_4$).[16] Για τη συναρμογή του χαλκού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και η TREN, όμως σε προσπάθειες συναρμογής της με την πορφυρίνη παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πολλών παραπροϊόντων. Η ύπαρξη των παραπροϊόντων οφείλεται στην αυξημένη δραστικότητα που εμφανίζουν οι πρωτοταγείς αμίνες της TREN. Αντίθετα στην TBTREN οι τρεις αμίνες είναι δευτεροταγείς και παρουσιάζουν μειωμένη δραστικότητα με αποτέλεσμα κατά τη συναρμογή με την πορφυρίνη να λαμβάνεται κυρίως το επιθυμητό προϊόν.



Σχήμα 5.8: *Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του μοντέλου **2***

Η σύζευξη της TBTREN με την πορφυρίνη **12a** πραγματοποιείται μέσω τριών δεσμών ουρίας.[17] Αρχικά οι τρεις αμινομάδες μετατρέπονται σε ισοκυανιόυχες ομάδες χρησιμοποιώντας τριφωσγένιο παρουσία τραιθυλαμίνης. Η τριαιθυλαμίνη είναι απαραίτητη για την εξουδετέρωση του υδροχλωρίου που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Το ισοκυανιούχο ενδιάμεσο είναι ευαίσθητο στην υγρασία και δεν απομονώνεται αλλά αντιδρά αμέσως με τις αμινομάδες της TBTREN οδηγώντας στο σχηματισμό της πορφυρίνης **13**. Λόγω της ευαισθησίας του ισοκυανιούχου ενδιαμέσου είναι απαραίτητο όλες οι συσκευές και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται να έχουν ξηρανθεί καλά

Με τη σύζευξη ενός μορίου τυροσίνης στην πορφυρίνη **13** σχηματίζεται η ένωση **14**.[18] Το αντιδραστήριο σύζευξης που χρησιμοποιείται είναι το DCC για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τέλος, με απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας της τυροσίνης χρησιμοποιώντας πιπεριδίνη λαμβάνεται το μοντέλο **2**.[12]

Όλες οι παραπάνω ενώσεις ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας ^{1}H-NMR σε διαλύτη $CDCl_3$. Προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης αποτίμηση των σημάτων συντονισμού, λήφθηκαν και φάσματα δυο διαστάσεων 2D-NMR COSY και NOESY. Επίσης για την αποτίμηση του φάσματος ^{13}C χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι ετεροπυρηνικού μαγνητικού συντονισμού HMQC και HMBC. Σε ορισμένες περιπτώσεις για την επιπλέον ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε και η φασματομετρία μαζών ESI-MS. Τα φάσματα NMR όλων των ενώσεων που συντέθηκαν παρατίθενται στο Παράρτημα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

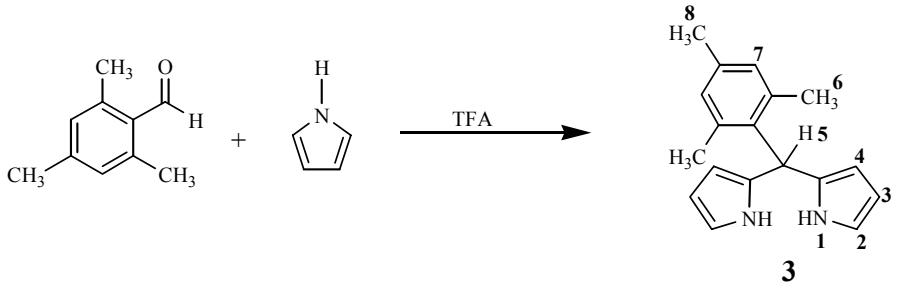
1. J.S. Lindsey, I.C. Schreiman, H.C. Hsu, P.C. Kearney, A.M. Marguerettaz, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 827-836
2. C.H. Lee, J.S. Lindsey, *Tetrahedron* **1994**, 50, 11427-11440
3. B.J. Littler, M.A. Miller, C.H. Hung, R.W. Wagner, D.F. O'Shea, P.D. Boyle, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 1391-1396
4. B.J. Littler, Y. Ciringh, J.S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2864-2872
5. P.D. Rao, B.J. Littler, G.R. Geier, J.S. Lindsey, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 1084-1092
6. E. Kim, E.E. Chufan, K. Kamaraj, K.D. Karlin, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1077-1133
7. J.P. Collman, M. Zhong, Z. Wang, M. Rapta, *Org. Lett.* **1999**, 1, 2121-2124
8. J.P. Collman, B. Boitrel, L. Fu, J. Galanter, A. Straumanis, M. Rapta, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2308-2309
9. L.E. Brady, M. Freifelder, G.R. Stone, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 4757-4758
10. M.A. Kopf, K.D. Karlin, *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 4922-4923
11. V. Sol, J.C. Blais, V. Carré, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 4431-4444
12. Ν. Χατζηλιάδης, "*Χημεία Αμινοξέων και πρωτεϊνών*", Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 1999
13. R.M. Wang, T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* **2005,** 16, 23-26
14. J.P. Collman, R.R. Gagne, C.A. Reed, T.R. Halbert, G. Lang, W.T. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1427-1439
15. J. Lindsey, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 5215-5215
16. A.A. Naiini, W.M.P.B. Menge, J.G. Verkade, *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 5009-5012
17. J.P. Collman, Z. Wang, A. Straumanis, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2424-2425
18. T. Arai, A. Tsukuni, K. Kawazu, H. Aoi, T. Hamada, N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin trans. 2* **2000**, 2, 1381-1390

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.1 Σύνθεση του 5-μεσιτυλοδιπυρρομεθανίου (3)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



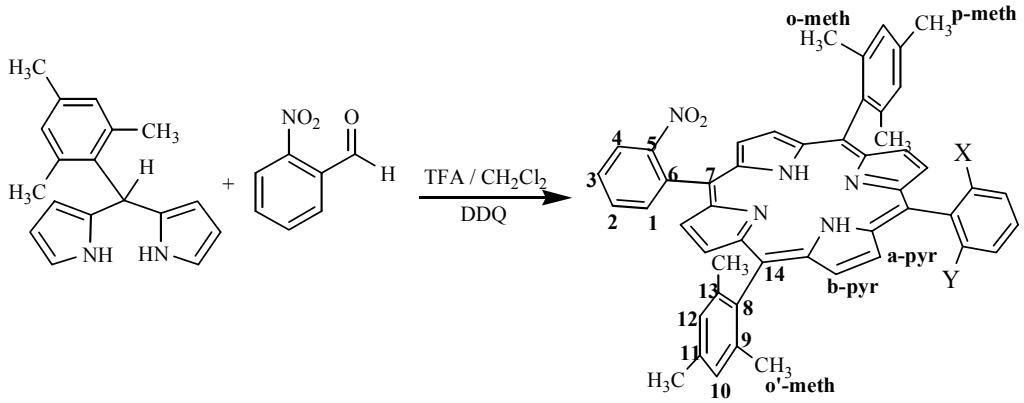
3

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 100 ml, προστίθενται 18 mmole μεσιτυλαλδεΰδης και 720 mmole πυρρολίου. Το μίγμα υπόκειται σε ανάδευση για 15 λεπτά, υπό ατμόσφαιρα Αργού και στη συνέχεια προστίθενται 1.8 mmole τριφθορooξικού οξέος (TFA). Ακολουθεί ανάδευση για 1 ώρα. Τέλος, για την εξουδετέρωση του TFA προστίθενται 2.6 mmole τριαιθυλαμίνης. Στη συνέχεια προστίθενται 150 ml τολουόλιο και πραγματοποιούνται εκπλύσεις (2 x 100 ml) με υδατικό διάλυμα NaCl 10% κ.β. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με την προσθήκη άνυδρου $MgSO_4$ και αποστάζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα, διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2) και φιλτράρεται μέσω κολώνας χρωματογραφίας με υλικό πληρώσεως οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) και διαλύτη εκλούσεως CH_2Cl_2. Το διάλυμα, που συλλέγεται, αποστάζεται υπό ελαττωμένη πίεση μέχρι ξηρού και στο στερεό υπόλειμμα πού απομένει, προστίθενται 30ml διαλύματος εξανίου-κυκλοεξανίου (1:1) ώστε να επιτευχθεί η κρυστάλλωση του προϊόντος. Το μίγμα ψύχεται στους 0 ºC για 12 ώρες και ακολούθως, υπόκειται σε διήθηση υπό κενό και ξήρανση. Τελικά, λαμβάνεται καθαρό το προϊόν, το οποίο είναι στερεό και φέρει υποκίτρινο χρώμα. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 70%.

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_1}$ (7.95 s br, 2H), $\mathbf{H_2}$ (6.67 dd, 2H), $\mathbf{H_3}$ (6.18 dd, 2H), $\mathbf{H_4}$ (6.02 d, 2H), $\mathbf{H_5}$ (5.93 s, 1H), $\mathbf{H_6}$ (2.06 s, 6H), $\mathbf{H_7}$ (6.87 s, 3H) $\mathbf{H_8}$ (2.27 s, 3H)

6.2 Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10,20(2-νιτροφαίνυλο) πορφυρίνης (4a, 4b)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



4a: X=NO_2, Y=H *α,α* ατροποϊσομερές
4b: X=H, Y=NO_2 *α,β* ατροποϊσομερές

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 1000 ml και υπό αδρανείς συνθήκες (ατμόσφαιρα Αργού), τοποθετούνται 7.6 mmole 5-μεσιτυλοδιπυρρομεθανίου και 7.6 mmole 2-νίτρο βενζαλδεΰδης. Επίσης, προστίθενται 780 ml CH_2Cl_2, ώστε οι συγκεντρώσεις των δύο παραπάνω αντιδραστηρίων να μην ξεπερνούν τα 10 mmole/lt. Τέλος, προστίθενται με αργό ρυθμό (t > 30 sec), 14.5 mmole TFA και το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια στο διάλυμα προστίθενται 8.4 mmole 2,3-διχλωρο-5,6-δικυανο-1,4-βενζοκινόνη (DDQ) και ακολουθεί επιπλέον ανάδευση για 1 ώρα. Κατά την προσθήκη της DDQ παρατηρείται χρωματική αλλαγή του μίγματος από κόκκινο-μαύρο σε πράσινο. Ακολούθως, πραγματοποιείται απόσταξη του διαλύτη και το στερεό υπόλειμμα φιλτράρεται μέσω χρωματογραφικής στήλης, χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης, οξείδιο του αλουμινίου (Al_2O_3) και ως διαλύτη έκλουσης, CH_2Cl_2. Τα κλάσματα που προκύπτουν συλλέγονται και ο διαλύτης απομακρύνεται με απόσταξη. Το στερεό υπόλειμμα διαλύεται σε 200 ml τολουόλιο, ενώ προστίθενται και 8.4 mmole DDQ. Ακολουθεί βρασμός για 1 ώρα. Όταν το μίγμα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, φιλτράρεται μέσω χρωματογραφικής στήλης, που φέρει Al_2O_3 ως υλικό πλήρωσης, ενώ χρησιμοποιείται CH_2Cl_2, ως διαλύτης έκλουσης. Συγκεντρώνεται το διήθημα και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το μίγμα των δυο ατροποϊσομερών που προκύπτει διαχωρίζεται με χρωματογραφία

στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2 και ο διαλύτης έκλουσης είναι CH_2Cl_2-εξάνιο (6:4). Αρχικά εκλούεται το *α,β* ισομερές και ακολουθεί το *α,α*. Η συνολική απόδοση της αντίδρασης είναι 20% ενώ οι επιμέρους αποδόσεις είναι 7% για το **4a** και 13% για το **4b**. Το επιθυμητό προϊόν που χρησιμοποιείται στις επόμενες αντιδράσεις είναι το **4a**. Θέρμανση του **4b** σε τολουόλιο στους 100 ºC έχει ως αποτέλεσμα την περιστροφή των φαινυλικών δακτυλίων, οπότε προκύπτει ένα μίγμα των δυο ισομερών. Ακολουθεί διαχωρισμός με χρωματογραφία στήλης και λαμβάνεται έτσι επιπλέον ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος **4a**.

4a:

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{a\text{-}pyr}}$ (8.58 d, 4H), $\mathbf{H_{b\text{-}pyr}}$ (8.67 d, 4H), $\mathbf{H_1}$ (8.21 dd, 2H), $\mathbf{H_2}$ (7.92 dt, 2H), $\mathbf{H_3}$ (7.97 dt, 2H), $\mathbf{H_4}$ (8.47 dd, 2H), $\mathbf{H_{10}}$ (7.26 s, 2H), $\mathbf{H_{12}}$ (7.29 s, 2H), $\mathbf{H_{p\text{-}meth}}$ (2.62 s, 6H), $\mathbf{H_{o'\text{-}meth}}$ (1.82 s, 6H), $\mathbf{H_{o\text{-}meth}}$ (1.87 s, 6H), **NH** (–2.50 s br, 2H)

^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{C_{a\text{-}pyr}}$ (130.48), $\mathbf{C_{b\text{-}pyr}}$ (131.00), $\mathbf{C_1}$ (137.43), $\mathbf{C_2}$ (131.29), $\mathbf{C_3}$ (129.95), $\mathbf{C_4}$ (124.50), $\mathbf{C_5}$ (152.01), $\mathbf{C_6}$ (136.88), $\mathbf{C_7}$ (114.37), $\mathbf{C_8}$ (139.52), $\mathbf{C_9}$ (138.28), $\mathbf{C_{10}}$ (128.03), $\mathbf{C_{11}}$ (140.15), $\mathbf{C_{12}}$ (128.35), $\mathbf{C_{13}}$ (138.38), $\mathbf{C_{14}}$ (119.50), $\mathbf{C_{p\text{-}meth}}$ (21.86), $\mathbf{C_{o'\text{-}meth}}$ (22.03), $\mathbf{C_{o\text{-}meth}}$ (22.25)

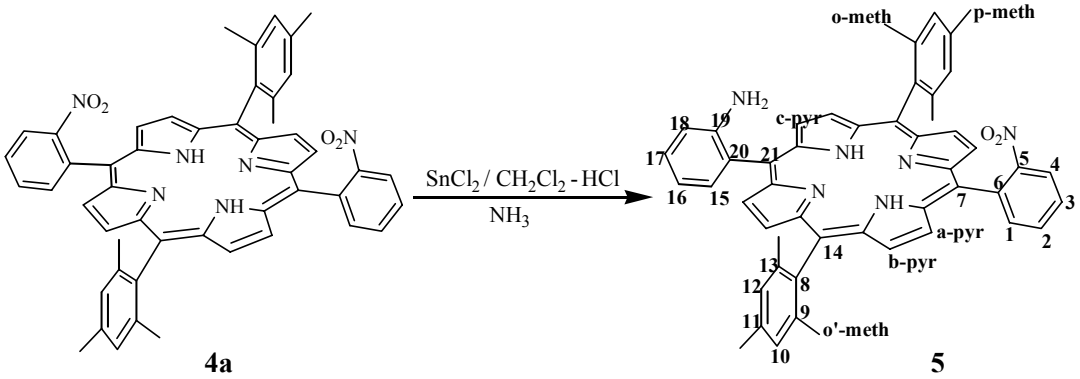
4b:

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{a\text{-}pyr}}$ (8.57 d, 4H), $\mathbf{H_{b\text{-}pyr}}$ (8.65 d, 4H), $\mathbf{H_1}$ (8.23 dd, 2H), $\mathbf{H_2}$ (7.94 dt, 2H), $\mathbf{H_3}$ (7.95 dt, 2H), $\mathbf{H_4}$ (8.46 dd, 2H), $\mathbf{H_{10,12}}$ (7.26 s, 4H), $\mathbf{H_{p\text{-}meth}}$ (2.61 s, 6H), $\mathbf{H_{o,o'\text{-}meth}}$ (1.83 s, 12H), **NH** (–2.52 s br, 2H)

^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{C_{a\text{-}pyr}}$ (130.42), $\mathbf{C_{b\text{-}pyr}}$ (130.79), $\mathbf{C_1}$ (137.38), $\mathbf{C_2}$ (131.39), $\mathbf{C_3}$ (129.94), $\mathbf{C_4}$ (124.57), $\mathbf{C_5}$ (152.00), $\mathbf{C_6}$ (136.90), $\mathbf{C_7}$ (114.14), $\mathbf{C_8}$ (138.40), $\mathbf{C_{9,13}}$ (138.20), $\mathbf{C_{10,12}}$ (128.16), $\mathbf{C_{11}}$ (139.80), $\mathbf{C_{14}}$ (119.00), $\mathbf{C_{p\text{-}meth}}$ (21.94), $\mathbf{C_{o,o'\text{-}meth}}$ (22.12)

6.3 Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-αμινοφαίνυλο)-20(2-νιτροφαίνυλο) πορφυρίνης (5)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται δίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



4a **5**

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 500 ml και υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύονται 0.14 mmole πορφυρίνης **4a** σε 280 ml CH_2Cl_2 και προστίθενται 5.6 mmole υδροχλωρικού οξέος (HCl) και 0.84 mmole διχλωριούχου κασσίτερου ($SnCl_2$). Το διάλυμα προστατεύεται από το φως και αφήνεται υπό ανάδευση για 10 ώρες στους 0 ºC. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και διαλύτη ανάπτυξης CH_2Cl_2-εξάνιο (7:3). Μετά το τέλος της αντίδρασης εξουδετερώνεται το HCl με προσθήκη 3 ml διαλύματος αμμωνίας (NH_3) 20% κ.β. Ακολουθούν εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ (3 x 100 ml) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 100 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο $MgSO_4$ και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται σε χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2, ο διαλύτης έκλουσης είναι μίγμα CH_2Cl_2-εξάνιο (7:3). Αρχικά εκλούεται η πορφυρίνη **4a** που δεν έχει αντιδράσει και ακολουθεί το προϊόν. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 65%. (ESI-MS): 758.9 $[M]^+$.

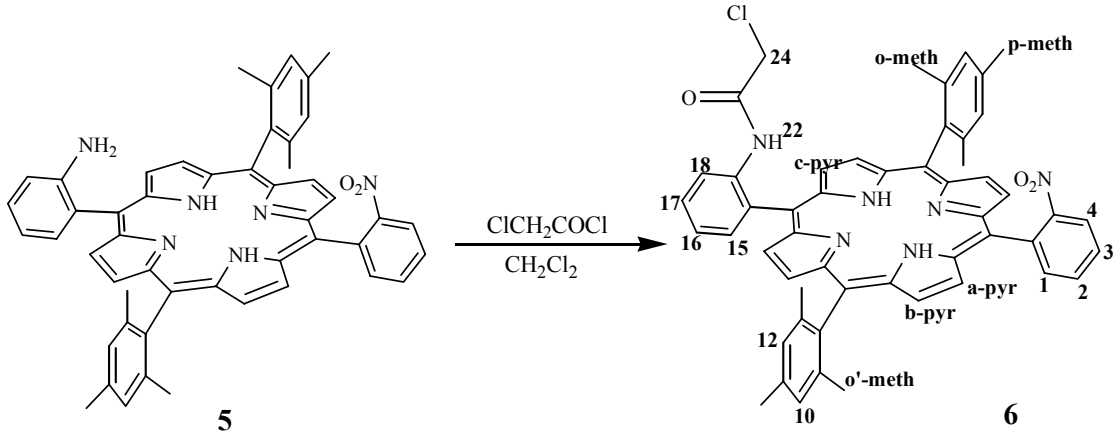
^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{a\text{-}pyr}}$ (8.60 d, 2H), $\mathbf{H_{b\text{-}pyr}}$ (8.70 m, 4H), $\mathbf{H_{c\text{-}pyr}}$ (8.86 d, 2H), $\mathbf{H_1}$ (8.26 dd, 1H), $\mathbf{H_2}$ (7.94 m, 1H), $\mathbf{H_3}$ (7.97 m, 1H), $\mathbf{H_4}$ (8.46 dd, 1H), $\mathbf{H_{10}}$ (7.28 s, 2H), $\mathbf{H_{12}}$ (7.30 s, 2H), $\mathbf{H_{15}}$ (7.90 dd, 1H), $\mathbf{H_{16}}$ (7.17 t, 1H), $\mathbf{H_{17}}$ (7.60 dt, 1H), $\mathbf{H_{18}}$ (7.12 d, 1H), $\mathbf{H_{p\text{-}meth}}$ (2.64 s, 6H), $\mathbf{H_{o'\text{-}meth}}$ (1.82 s, 6H), $\mathbf{H_{o\text{-}meth}}$ (1.89 s, 6H), $\mathbf{NH_2}$ (3.64 s br, 2H), **NH** (–2.53 s br, 2H)

^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{C_{a\text{-}pyr}}$ (130.19), $\mathbf{C_{b\text{-}pyr}}$ (131.14), $\mathbf{C_{c\text{-}pyr}}$ (131.67), $\mathbf{C_1}$ (137.39), $\mathbf{C_2}$ (131.20), $\mathbf{C_3}$ (130.30), $\mathbf{C_4}$ (124.48), $\mathbf{C_5}$ (152.00), $\mathbf{C_6}$ (136.98), $\mathbf{C_7}$ (114.00), $\mathbf{C_8}$ (138.40), $\mathbf{C_9}$ (138.15), $\mathbf{C_{10}}$ (128.13), $\mathbf{C_{11}}$ (139.80), $\mathbf{C_{12}}$ (128.27), $\mathbf{C_{13}}$ (138.20), $\mathbf{C_{14}}$ (119.08), $\mathbf{C_{15}}$ (134.97), $\mathbf{C_{16}}$ (117.79), $\mathbf{C_{17}}$ (124.89), $\mathbf{C_{18}}$ (115.51),

C_{19} (147.10), **C_{20}** (127.00), **C_{21}** (116.00), **$C_{p\text{-meth}}$** (21.94), **$C_{o'\text{-meth}}$** (22.05), **$C_{o\text{-meth}}$** (22.20)

6.4 Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-χλωροακεταμιδοφαίνυλο)-20(2-νιτροφαίνυλο) πορφυρίνης (6)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



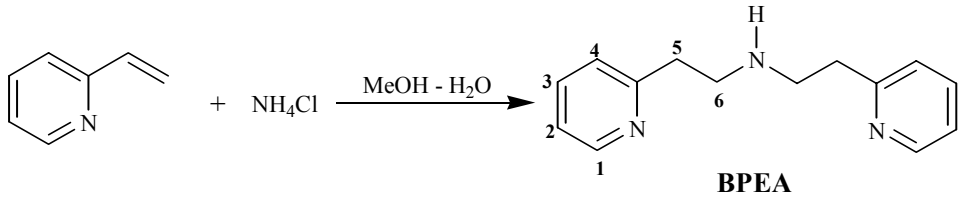
5 **6**

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 10 ml και υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύονται 0.068 mmole πορφυρίνης **5** σε 6 ml ξηρό CH_2Cl_2. Το διάλυμα ψύχεται στους 0 ºC και προστίθενται 0.567 mmole χλωρο-ακέτυλο χλωριδίου. Κατά την προσθήκη αυτή το χρώμα του διαλύματος αλλάζει από κόκκινο σε πράσινο. Αφαιρείται το παγόλουτρο και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 5 ml μεθανόλης για την εξουδετέρωση της περίσσειας του χλωρο-ακέτυλο χλωριδίου. Ακολουθούν εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ (2 x 20 ml) και κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 20 ml). Με την προσθήκη του $NaHCO_3$ το διάλυμα αποκτά και πάλι κόκκινο χρώμα. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο $MgSO_4$ και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2, ο διαλύτης έκλουσης είναι μίγμα CH_2Cl_2-εξάνιο (10:3). Αρχικά εκλούεται το χλωρο-αιθανοϊκό μεθύλιο (προϊόν αντίδρασης ανάμεσα στο χλωρο-ακέτυλο χλωρίδιο και τη μεθανόλη) και ακολουθεί το επιθυμητό προϊόν. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 93%.

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{a\text{-}pyr}}$ (8.61 d, 2H), $\mathbf{H_{b,c\text{-}pyr}}$ (8.72 m, 6H), $\mathbf{H_1}$ (8.21 dd, 1H), $\mathbf{H_2}$ (7.94 dt, 1H), $\mathbf{H_3}$ (7.97 dt, 1H), $\mathbf{H_4}$ (8.48 dd, 1H), $\mathbf{H_{10}}$ (7.28 s, 2H), $\mathbf{H_{12}}$ (7.30 s, 2H), $\mathbf{H_{15}}$ (8.08 dd, 1H), $\mathbf{H_{16}}$ (7.57 dt, 1H), $\mathbf{H_{17}}$ (7.85 dt, 1H), $\mathbf{H_{18}}$ (8.74 m, 1H), $\mathbf{H_{22}}$ (8.29 s, 1H), $\mathbf{H_{24}}$ (3.49 s, 2H), $\mathbf{H_{p\text{-}meth}}$ (2.64 s, 6H), $\mathbf{H_{o'\text{-}meth}}$ (1.84 s, 6H), $\mathbf{H_{o\text{-}meth}}$ (1.87 s, 6H), **NH** (–2.50 s, 2H)

6.6 Σύνθεση της δις(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμίνης (BPEA)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



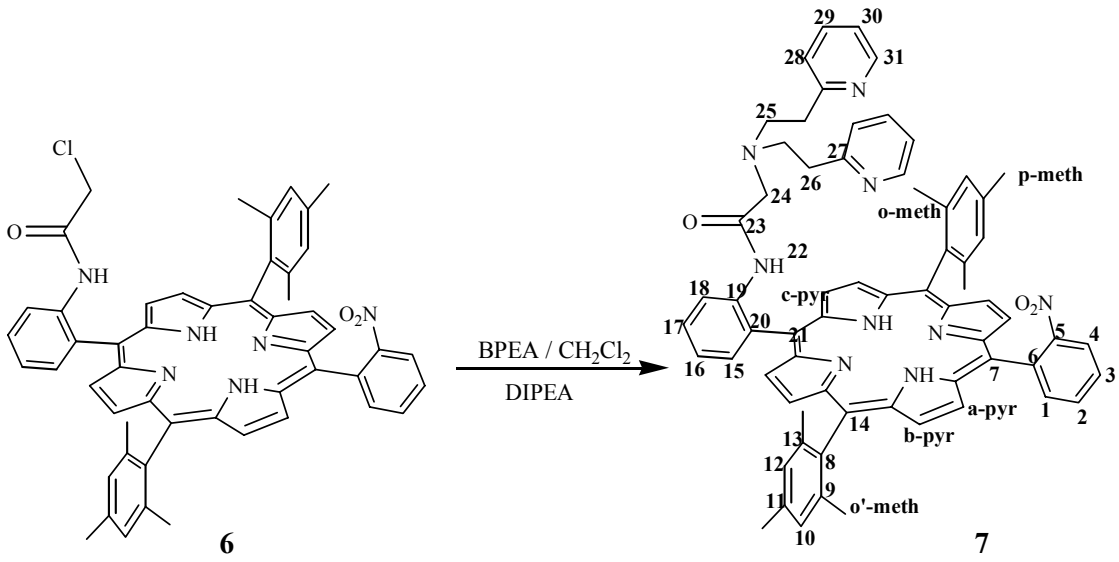
BPEA

Σε σφαιρική φιάλη των 250 ml τοποθετούνται 0.23 mmole 2-βινυλοπυριδίνη και 0.46 mmole χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) σε 70 ml H_2O και 10 ml μεθανόλη (MeOH). Το μίγμα αφήνεται υπό βρασμό για 8 ώρες. Ακολουθεί ψύξη στους 0 ºC και προθήκη 60 ml υδατικού διαλύματος NaOH 30% κ.β. έτσι ώστε το διάλυμα να γίνει ισχυρά βασικό. Στη συνέχεια εκπλένεται διαδοχικά η υδατική στοιβάδα με (5 x 20 ml) χλωροφόρμιο ($CHCl_3$). Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται, ξηραίνονται με άνυδρο $MgSO_4$ και μετά την απομάκρυνση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση, προκύπτει ένα κίτρινο ελαιώδες υγρό. Το υγρό αυτό υπόκεινται σε κλασματική απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση (~0.07 Torr). Αρχικά αποστάζει η 2-πυριδυλο-αιθυλαμίνη στους 100-120 ºC και ακολουθεί η BPEA στους 130-150 ºC. Το προϊόν είναι ένα ελαιώδες υγρό υποκίτρινου χρώματος. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 50%.

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_1}$ (8.48 d, 2H), $\mathbf{H_2}$ (7.08 t, 2H), $\mathbf{H_3}$ (7.55 t, 2H), $\mathbf{H_4}$ (7.12 d, 2H), $\mathbf{H_5}$ (3.03 t, 4H), $\mathbf{H_6}$ (2.95 t, 4H)

6.6 Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-(NHCOCH$_2$-BPEA)-φαίνυλο)-20(2-νιτροφαίνυλο) πορφυρίνης (7)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται δίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



6 **7**

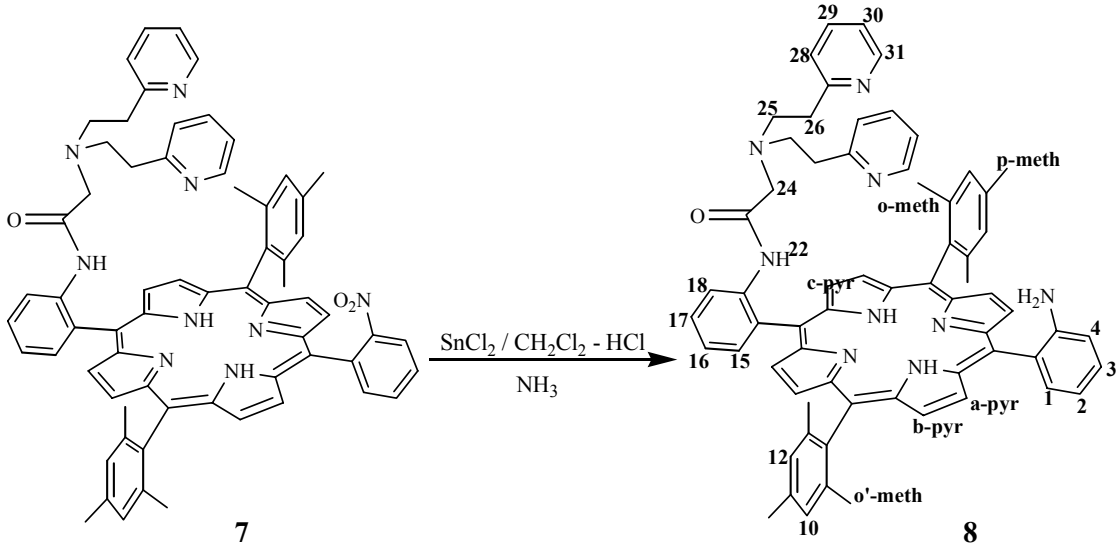
Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 5 ml και υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύονται 0.054 mmole πορφυρίνης **6** σε 3 ml ξηρό CH_2Cl_2 και προστίθενται 0.6 ml διισοπροπυλοαιθυλαμίνη (DIPEA) και 5.45 mmole δις(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμίνη (BPEA). Το διάλυμα θερμαίνεται στους 40 ºC για 18 ώρες. Προστίθενται επιπλέον 30 ml CH_2Cl_2 και ακολουθούν εκπλύσεις (4 x 30 ml) με νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο $MgSO_4$, διηθείται για την απομάκρυνση του ξηραντικού και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα μεταφέρεται σε χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα αιθανόλης (EtOH). Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2-EtOH (5:3). Η απόδοση της αντίδρασης είναι 88%.

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{a\text{-}pyr}}$ (8.66 d, 2H), $\mathbf{H_{b\text{-}pyr}}$ (8.63 m, 4H), $\mathbf{H_{c\text{-}pyr}}$ (8.77 d, 2H), $\mathbf{H_1}$ (8.19 d, 1H), $\mathbf{H_2}$ (7.96 m, 1H), $\mathbf{H_3}$ (8.00 t, 1H), $\mathbf{H_4}$ (8.49 d, 1H), $\mathbf{H_{10}}$ (7.14 s, 2H), $\mathbf{H_{12}}$ (7.20 s, 2H), $\mathbf{H_{15}}$ (7.93 m, 1H), $\mathbf{H_{16}}$ (7.46 t, 1H), $\mathbf{H_{17}}$ (7.84 m, 1H), $\mathbf{H_{18}}$ (8.86 d, 1H), $\mathbf{H_{22}}$ (9.59 s, 1H), $\mathbf{H_{24}}$ (2.69 s, 2H), $\mathbf{H_{25}}$ (1.38 m, 4H), $\mathbf{H_{26}}$ (0.50 m, 4H), $\mathbf{H_{28}}$ (3.68 d, 2H), $\mathbf{H_{29}}$ (5.91 t, 2H), $\mathbf{H_{30}}$ (6.51 t, 2H), $\mathbf{H_{31}}$ (7.85 d, 2H) $\mathbf{H_{p\text{-}meth}}$ (2.58 s, 6H), $\mathbf{H_{o'\text{-}meth}}$ (1.41 s, 6H), $\mathbf{H_{o\text{-}meth}}$ (1.67 s, 6H), **NH** (–2.40 s, 2H)

^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{C_1}$ (137.79), $\mathbf{C_2}$ (131.30), $\mathbf{C_3}$ (129.90), $\mathbf{C_4}$ (124.30), $\mathbf{C_5}$ (152.20), $\mathbf{C_6}$ (136.75), $\mathbf{C_7}$ (114.42), $\mathbf{C_8}$ (138.32), $\mathbf{C_{9,13}}$ (138.01), $\mathbf{C_{10,12}}$ (128.15), $\mathbf{C_{11}}$ (139.55), $\mathbf{C_{14}}$ (120.01), $\mathbf{C_{15}}$ (135.14), $\mathbf{C_{16}}$ (123.02), $\mathbf{C_{17}}$ (130.18), $\mathbf{C_{18}}$ (120.59), $\mathbf{C_{19}}$ (139.10), $\mathbf{C_{20}}$ (131.83), $\mathbf{C_{21}}$ (114.80), $\mathbf{C_{23}}$ (170.76), $\mathbf{C_{24}}$ (58.96), $\mathbf{C_{25}}$ (54.78), $\mathbf{C_{26}}$ (35.14), $\mathbf{C_{27}}$ (157.96), $\mathbf{C_{28}}$ (122.12), $\mathbf{C_{29}}$ (135.68), $\mathbf{C_{30}}$ (120.71), $\mathbf{C_{31}}$ (148.47), $\mathbf{C_{p\text{-}meth}}$ (21.90), $\mathbf{C_{o'\text{-}meth}}$ (21.66), $\mathbf{C_{o\text{-}meth}}$ (22.02)

6.7 Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-(NHCOCH$_2$-BPEA)-φαίνυλο)-20(2-αμινοφαίνυλο) πορφυρίνης (8)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



7 **8**

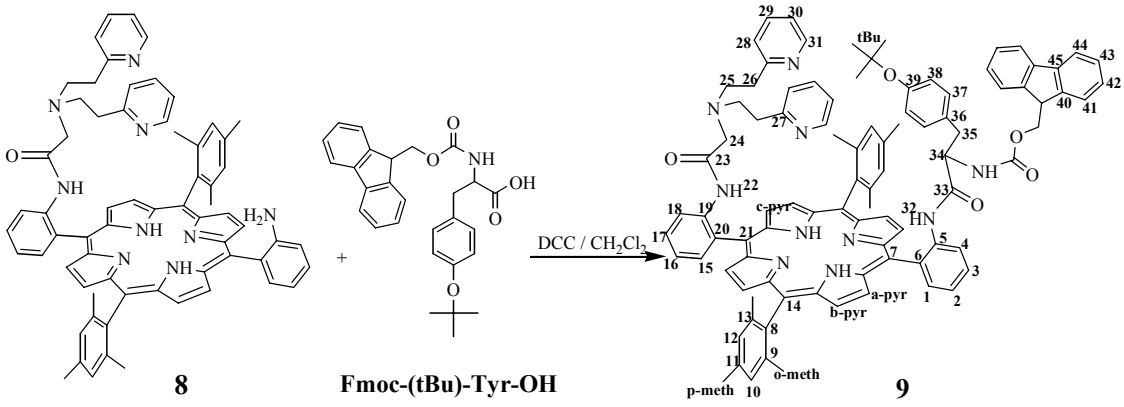
Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 ml και υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύονται 0.056 mmole πορφυρίνης **7** σε 120 ml CH_2Cl_2 και προστίθενται 3.55 mmole HCl και 1.58 mmole $SnCl_2$. Το διάλυμα προστατεύεται από το φως και αφήνεται υπό ανάδευση για 18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης το διάλυμα ψύχεται στους 0 ºC και εξουδετερώνεται το HCl με προσθήκη 2 ml διαλύματος NH_3 20% κ.β. Ακολουθούν εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ (2 x 100 ml) και με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (2 x 100 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο $MgSO_4$, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει καθαρίζεται επιπλέον με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2. Ο διαλύτης

έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 στον οποίο σταδιακά προστίθεται ποσότητα EtOH. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2-EtOH (5:3). Η απόδοση της αντίδρασης είναι 94%.

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{a\text{-}pyr}}$ (8.86 d, 2H), $\mathbf{H_{b\text{-}pyr}}$ (8.67 m, 4H), $\mathbf{H_{c\text{-}pyr}}$ (8.77 d, 2H), $\mathbf{H_1}$ (7.87 m, 1H), $\mathbf{H_2}$ (7.18 m, 1H), $\mathbf{H_3}$ (7.61 t, 1H), $\mathbf{H_4}$ (7.15 m, 1H), $\mathbf{H_{10}}$ (7.17 s, 2H), $\mathbf{H_{12}}$ (7.23 s, 2H), $\mathbf{H_{15}}$ (7.99 d, 1H), $\mathbf{H_{16}}$ (7.49 t, 1H), $\mathbf{H_{17}}$ (7.83 m, 1H), $\mathbf{H_{18}}$ (8.82 d, 1H), $\mathbf{H_{22}}$ (9.48 s, 1H), $\mathbf{H_{24}}$ (2.63 s, 2H), $\mathbf{H_{25}}$ (1.39 m, 4H), $\mathbf{H_{26}}$ (0.54 m, 4H), $\mathbf{H_{28}}$ (4.28 d, 2H), $\mathbf{H_{29}}$ (6.30 dd, 2H), $\mathbf{H_{30}}$ (6.57 dd, 2H), $\mathbf{H_{31}}$ (7.90 d, 2H) $\mathbf{H_{p\text{-}meth}}$ (2.60 s, 6H), $\mathbf{H_{o'\text{-}meth}}$ (1.55 s, 6H), $\mathbf{H_{o\text{-}meth}}$ (1.71 s, 6H), $\mathbf{NH_2}$ (3.60 s br, 2H), **NH** (–2.44 s, 2H)

6.8 Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-(NHCOCH$_2$-BPEA)-φαίνυλο)-20(2-(Fmoc-(tBu)Tyr)-φαίνυλο) πορφυρίνης (9)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



Σε σφαιρική φιάλη των 10 ml διαλύονται 0.052 mmole πορφυρίνης **8** σε 2.5 ml CH_2Cl_2. Στη συνέχεια προστίθενται 0.145 mmole προστατευμένης τυροσίνης [Fmoc-(tBu)-Tyr-OH] και 0.145 mmole δικυκλοεξυλοκαρβοδιιμιδίου (DCC). Το μίγμα αναδεύεται στους 5 ºC για 24 ώρες. Στη συνέχεια προστίθενται στο διάλυμα επιπλέον 0.145 mmole τυροσίνης και 0.145 mmole DCC και ακολουθεί ανάδευση στους 5 ºC για επιπλέον 48 ώρες. Έπειτα προστίθενται 20 ml CH_2Cl_2 και πραγματοποιούνται εκπλύσεις (4 x 30 ml) με νερό. Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο $MgSO_4$, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη

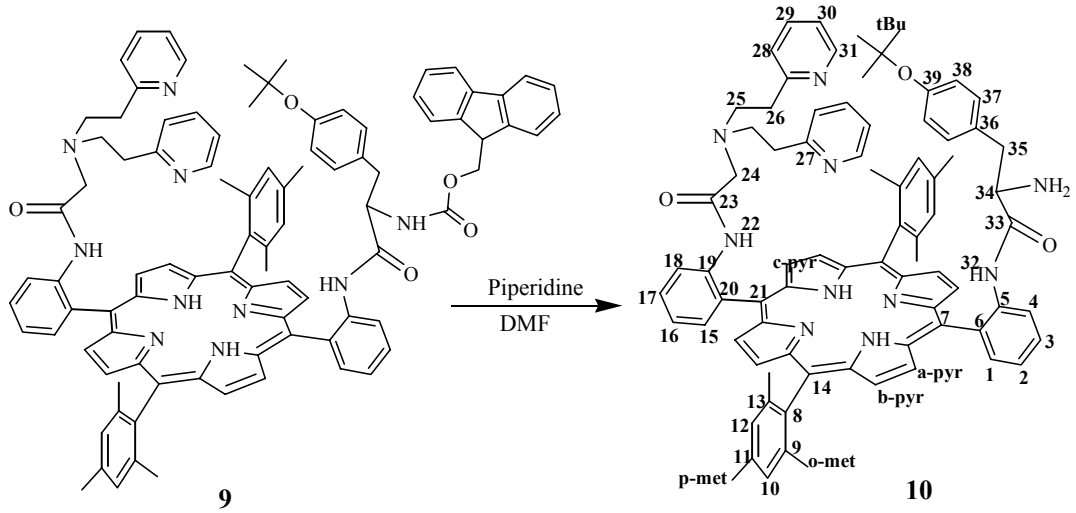
πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 και σταδιακά πραγματοποιείται προσθήκη EtOH. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2-EtOH (5:3). Η απόδοση της αντίδρασης είναι 75%.

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{a,b\text{-}pyr}}$ (8.64 m, 6H), $\mathbf{H_{c\text{-}pyr}}$ (8.76 m, 2H), $\mathbf{H_1}$ (7.97 m, 1H), $\mathbf{H_2}$ (7.48 t, 1H), $\mathbf{H_3}$ (7.82 m, 1H), $\mathbf{H_4}$ (8.82 m, 1H), $\mathbf{H_{10,12}}$ (7.20 s, 2H, 7.07 s, 2H), $\mathbf{H_{15}}$ (8.08 dd, 1H), $\mathbf{H_{16}}$ (7.54 t, 1H), $\mathbf{H_{17}}$ (7.87 m, 1H), $\mathbf{H_{18}}$ (8.64 m, 1H), $\mathbf{H_{22}}$ (9.44 s, 1H), $\mathbf{H_{24}}$ (2.60 s, 2H), $\mathbf{H_{25}}$ (1.33 m, 4H), $\mathbf{H_{26}}$ (0.72 m, 4H), $\mathbf{H_{28}}$ (5.00 s br, 2H), $\mathbf{H_{29}}$ (6.46 s br, 2H), $\mathbf{H_{30}}$ (6.58 m, 2H), $\mathbf{H_{31}}$ (7.77 d, 2H), $\mathbf{H_{34}}$ (1.71 m, 1H), $\mathbf{H_{35}}$ (1.96 s br, 1H, 2.33 s br, 1H), $\mathbf{H_{37}}$ (6.39 s br, 2H), $\mathbf{H_{38}}$ (6.55 m, 2H), $\mathbf{H_{41}}$ (7.30 m, 2H), $\mathbf{H_{42}}$ (7.14 m, 2H), $\mathbf{H_{43}}$(7.24 m, 2H), $\mathbf{H_{44}}$(7.66 s br, 2H), $\mathbf{H_{tBu}}$(1.17 s, 9H), $\mathbf{H_{p\text{-}meth}}$(2.62 s, 3H, 2.59 s, 3H), $\mathbf{H_{o\text{-}meth}}$ (1.74 s, 3H, 1.72 s, 3H, 1.44 s, 3H, 1.38 s, 3H), **NH** (–2.40 s, 2H)

^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{C_1}$ (135.29), $\mathbf{C_2}$ (123.27), $\mathbf{C_3}$ (130.26), $\mathbf{C_4}$ (120.85), $\mathbf{C_5}$ (138.98), $\mathbf{C_6}$ (132.04), $\mathbf{C_7}$ (114.94), $\mathbf{C_8}$ (138.06), $\mathbf{C_{9,13}}$ (138.10), $\mathbf{C_{10,12}}$ (128.41), $\mathbf{C_{11}}$ (139.06), $\mathbf{C_{14}}$ (119.28), $\mathbf{C_{15}}$ (135.83), $\mathbf{C_{16}}$ (123.88), $\mathbf{C_{17}}$ (129.99), $\mathbf{C_{18}}$ (122.58), $\mathbf{C_{19}}$ (139.07), $\mathbf{C_{20}}$ (131.89), $\mathbf{C_{21}}$ (114.40), $\mathbf{C_{23}}$ (170.06), $\mathbf{C_{24}}$ (58.87), $\mathbf{C_{25}}$ (54.86), $\mathbf{C_{26}}$ (34.71), $\mathbf{C_{27}}$ (158.47), $\mathbf{C_{28}}$ (122.59), $\mathbf{C_{29}}$ (135.83), $\mathbf{C_{30}}$ (121.23), $\mathbf{C_{31}}$ (148.73), $\mathbf{C_{34}}$ (57.70), $\mathbf{C_{35}}$ (38.12), $\mathbf{C_{36}}$ (124.88), $\mathbf{C_{37}}$ (129.79), $\mathbf{C_{38}}$ (124.36), $\mathbf{C_{39}}$ (149.14), $\mathbf{C_{40}}$ (144.19), $\mathbf{C_{41}}$ (128.01), $\mathbf{C_{42}}$ (127.46), $\mathbf{C_{43}}$ (123.81), $\mathbf{C_{44}}$ (127.85), $\mathbf{C_{45}}$ (141.74), $\mathbf{C_{tBu}}$ (29.26), $\mathbf{C_{p\text{-}meth}}$ (21.95), $\mathbf{C_{o\text{-}meth}}$ (22.24)

6.9 Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-(NHCOCH$_2$-BPEA)-φαίνυλο)-20(2-((tBu)Tyr)-φαίνυλο) πορφυρίνης (10)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται δίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Σε σφαιρική φιάλη των 10 ml διαλύονται 0.037 mmole πορφυρίνης **9** σε 3 ml DMF και προστίθενται 0.6 ml πιπεριδίνης. Το διάλυμα αναδεύεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απόσταξη του διαλύτη υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 20 ml CH_2Cl_2 και εκπλένεται με νερό (3 x 25 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο $MgSO_4$, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα EtOH. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2-EtOH (5:3). Η απόδοση της αντίδρασης είναι 92%. (ESI-MS): 1216.8 $[M+1]^+$.

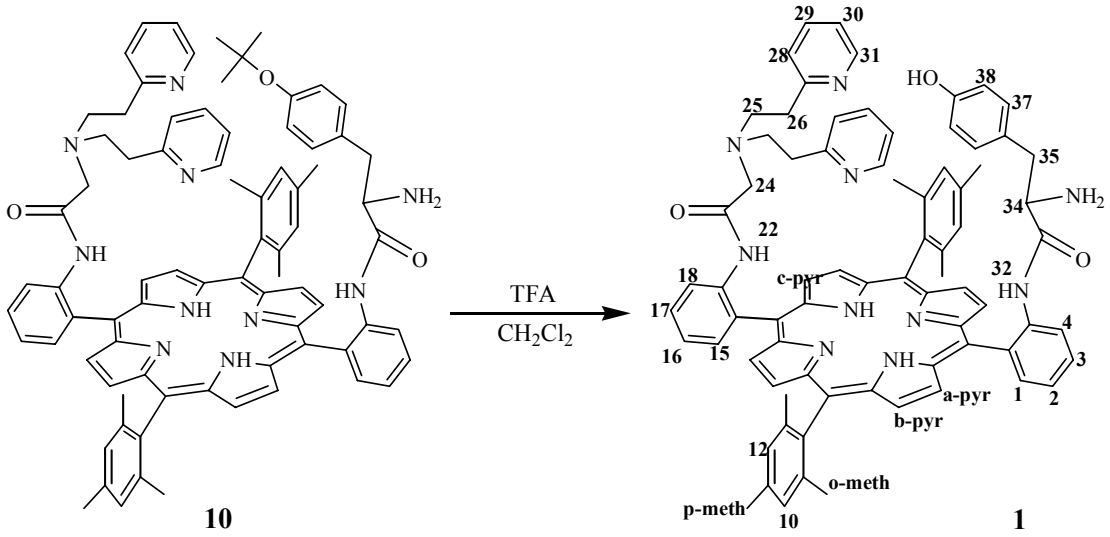
^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{a\text{-}pyr}}$ (8.56 d, 1H, 8.62 d, 1H), $\mathbf{H_{b\text{-}pyr}}$ (8.67 m, 4H), $\mathbf{H_{c\text{-}pyr}}$ (8.77 m, 2H), $\mathbf{H_1}$ (8.08 dd, 1H), $\mathbf{H_2}$ (7.53 dt, 1H), $\mathbf{H_3}$ (7.86 m, 1H), $\mathbf{H_4}$ (8.90 d, 1H), $\mathbf{H_{10,12}}$ (7.26 s, 1H, 7.23 s, 1H, 7.19 s, 1H, 7.14 s, 1H), $\mathbf{H_{15}}$ (8.00 dd, 1H), $\mathbf{H_{16}}$ (7.46 dt, 1H), $\mathbf{H_{17}}$ (7.83 m, 1H), $\mathbf{H_{18}}$ (8.79 m, 1H), $\mathbf{H_{22}}$ (9.39 s, 1H), $\mathbf{H_{24}}$ (2.60 s, 2H), $\mathbf{H_{25}}$ (1.31 m, 4H), $\mathbf{H_{26}}$ (0.47 m, 4H), $\mathbf{H_{28}}$ (4.22 d, 2H), $\mathbf{H_{29}}$ (6.18 dt, 2H), $\mathbf{H_{30}}$ (6.51 m, 2H), $\mathbf{H_{31}}$ (7.82 d, 2H), $\mathbf{H_{32}}$ (9.56 s, 1H), $\mathbf{H_{34}}$ (2.81 m, 1H), $\mathbf{H_{35}}$ (2.72 m, 1H, 2.11 m, 1H), $\mathbf{H_{37}}$ (6.41 d, 2H), $\mathbf{H_{38}}$ (6.58 d, 2H), $\mathbf{H_{tBu}}$ (1.15 s, 9H), $\mathbf{H_{p\text{-}meth}}$ (2.62 s, 3H, 2.59 s, 3H), $\mathbf{H_{o\text{-}meth}}$ (1.74 s, 3H, 1.72 s, 3H, 1.44 s, 3H, 1.38 s, 3H), **NH** (–2.40 s, 2H)

^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{C_1}$ (135.83), $\mathbf{C_2}$ (123.22), $\mathbf{C_3}$ (130.09), $\mathbf{C_4}$ (120.35), $\mathbf{C_5}$ (139.20), $\mathbf{C_6}$ (131.75), $\mathbf{C_7}$ (114.47), $\mathbf{C_8}$ (138.22), $\mathbf{C_{9,13}}$ (138.01), $\mathbf{C_{10,12}}$ (128.11), $\mathbf{C_{11}}$ (139.84), $\mathbf{C_{14}}$ (119.23), $\mathbf{C_{15}}$ (134.99), $\mathbf{C_{16}}$ (123.10), $\mathbf{C_{17}}$ (130.09), $\mathbf{C_{18}}$ (120.70), $\mathbf{C_{19}}$ (139.10), $\mathbf{C_{20}}$ (131.83), $\mathbf{C_{21}}$ (114.62), $\mathbf{C_{23}}$ (170.86), $\mathbf{C_{24}}$ (58.68), $\mathbf{C_{25}}$ (54.38),

C_{26} (34.64), **C_{27}** (158.20), **C_{28}** (122.04), **C_{29}** (135.69), **C_{30}** (120.82), **C_{31}** (148.72), **C_{33}** (172.15), **C_{34}** (56.43), **C_{35}** (39.70), **C_{36}** (131.92), **C_{37}** (129.51), **C_{38}** (124.27), **C_{39}** (154.53), **C_{tBu}** (29.23), **$C_{p\text{-}meth}$** (21.92), **$C_{o\text{-}meth}$** (22.01)

6.10 Σύνθεση της 5,15-διμεσίτυλο-10(2-(NHCOCH$_2$-BPEA)-φαίνυλο)-20(2-(Tyr)-φαίνυλο) πορφυρίνης (1)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



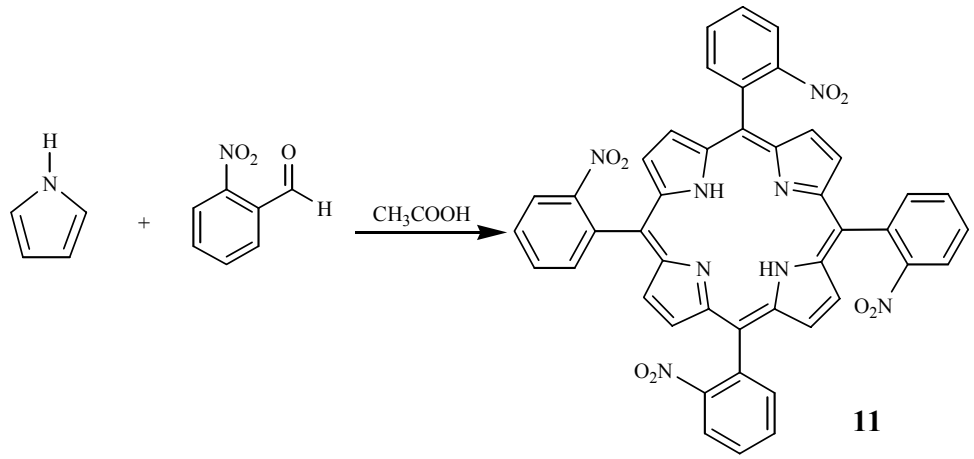
Σε σφαιρική φιάλη των 10 ml διαλύονται 0.012 mmole πορφυρίνης **10** σε 2 ml CH_2Cl_2 και προστίθεται 1 ml τριφθορικού οξέος (TFA). Με την προσθήκη του TFA το χρώμα του διαλύματος μετατρέπεται από κόκκινο σε πράσινο. Το διάλυμα αναδεύεται για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν εκπλύσεις με κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ (1 x 20 ml) και νερό (2 x 20 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο $MgSO_4$, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2-MeOH (5:3). Η απόδοση της αντίδρασης είναι 80%. (ESI-MS): 1159.9 $[M+H]^+$.

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): **$H_{a,c\text{-}pyr}$** (8.75 m, 4H), **$H_{b\text{-}pyr}$** (8.64 m, 4H), **H_1** (8.28 dd, 1H), **H_2** (7.60 dt, 1H), **H_3** (7.87 m, 1H), **H_4** (8.70 d, 1H), **$H_{10,12}$** (7.21 s, 2H, 7.11 s, 2H), **H_{15}** (8.00 dd, 1H), **H_{16}** (7.50 dt, 1H), **H_{17}** (7.85 m, 1H),

H_{18} (8.76 m, 1H), **H_{22}** (9.16 s, 1H), **H_{24}** (2.60 s, 2H), **H_{25}** (1.29 m, 4H), **H_{26}** (0.46 m, 4H), **H_{28}** (4.39 d, 2H), **H_{29}** (6.41 dt, 2H), **H_{30}** (6.68 m, 2H), **H_{31}** (7.91 d, 2H), **H_{32}** (9.37 s, 1H), **H_{34}** (1.22 m, 1H), **H_{35}** (2.62 m, 1H, 2.40 dd, 1H), **H_{37}** (5.61 d, 2H), **H_{38}** (5.96 d, 2H), **$H_{p\text{-}meth}$** (2.58 s, 3H, 2.57 s, 3H), **$H_{o\text{-}meth}$** (1.66 s, 3H, 1.64 s, 3H, 1.43 s, 3H, 1.30 s, 3H), **NH** (–2.42 s, 2H)

6.11 Σύνθεση της 5,10,15,20-τετρακις-(2-νιτροφαίνυλο) πορφυρίνης (11)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:

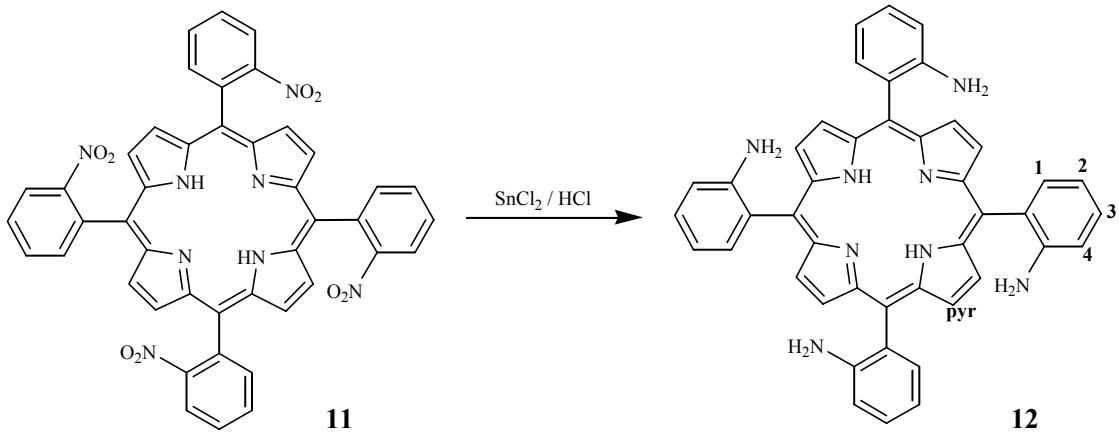


Μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών

Σε σφαιρική φιάλη των 2 lt διαλύονται 0.33 mole 2-νιτροβενζαλδεΰδη σε 1 lt οξικό οξύ και το διάλυμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού (~120 ºC). Ακολουθεί προσθήκη 0.33 mole πυρρολίου. Η προσθήκη του πυρρολίου πρέπει να είναι αργή, καθώς η αντίδραση είναι εξώθερμη. Το σκούρο διάλυμα που σχηματίζεται θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 20 min. Στη συνέχεια προστίθενται 120 ml χλωροφόρμιο και το μίγμα που προκύπτει ψύχεται σε παγόλουτρο στους 20 ºC. Η πορφυρίνη είναι αδιάλυτη σε αυτές τις συνθήκες και διαχωρίζεται με διήθηση υπό κενό. Στο ίζημα πραγματοποιούνται διαδοχικές εκπλύσεις με χλωροφόρμιο (5 x 50 ml) μέχρι το διήθημα να μην εμφανίζει έντονο χρώμα. Συλλέγεται το ίζημα και ξηραίνεται στους 100 ºC υπό κενό για αρκετές ώρες, έτσι ώστε να απομακρυνθεί το οξικό οξύ που έχει απομείνει. Η πορφυρίνη **11** αποτελεί μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 15%.

6.12 Σύνθεση της 5,10,15,20-τετρακις-(2-αμινοφαίνυλο) πορφυρίνης (12)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται δίνεται στο παρακάτω σχήμα:



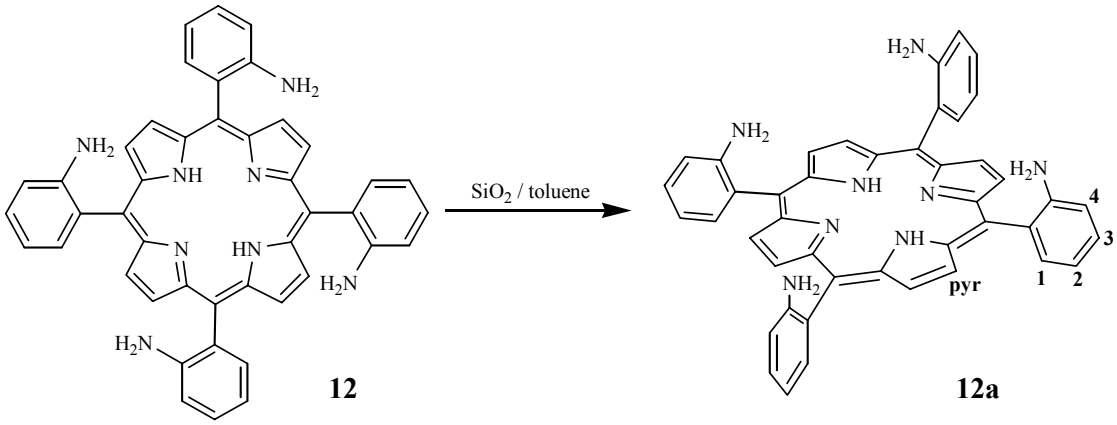
Μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών

Σε σφαιρική φιάλη των 2 lt διαλύονται 9.8 mmole πορφυρίνης **11** σε 400 ml υδροχλωρικό οξύ 37% κ.β. και προστίθεται περίσσεια 142 mmole διχλωριούχου κασσίτερου ($SnCl_2$). Το πράσινο μίγμα που προκύπτει θερμαίνεται στους 65-70 ºC για 25 min. Ακολουθεί εξουδετέρωση του οξέος με την προσθήκη 350 ml NH_3 25 % κ.β. Η προσθήκη της NH_3 πραγματοποιείται αργά και με προσοχή λόγω της μεγάλης θερμότητας που εκλύεται κατά την εξουδετέρωση. Στο διάλυμα που σχηματίζεται προστίθενται 350 ml οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) και αναδεύεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Διαχωρίζεται η υδατική στοιβάδα και εκπλένεται με EtOAc (5 x 300 ml). Όλες οι οργανικές στοιβάδες συλλέγονται μαζί και συμπυκνώνονται με απόσταξη μέχρι ο όγκος του διαλύτη να γίνει ~100 ml. Το διάλυμα αυτό εκπλένεται με υδατικό διάλυμα NH_3 (2 x 50 ml) και με νερό (1 x 60 ml). Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο $MgSO_4$, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης. Στο ίζημα που συλλέγεται πραγματοποιούνται εκπλύσεις με μεθανόλη και προκύπτει καθαρή η πορφυρίνη **12** που είναι μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 76 %.

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{pyr}}$ (8.90 s, 8H), $\mathbf{H_1}$ (7.83 m, 4H), $\mathbf{H_2}$ (7.16 m, 4H), $\mathbf{H_3}$ (7.60 t, 4H), $\mathbf{H_4}$ (7.11 m, 4H), $\mathbf{NH_2}$ (3.44 s br, 8H), **NH** (–2.80 s, 2H)

6.13 Μετατροπή του μίγματος των ατροποϊσομερών της 12 προς την *α,α,α,α*-5,10,15,20-τετράκις-(2-αμινοφαίνυλο) πορφυρίνη 12a

Η αντίδραση που πραγματοποιείται δίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



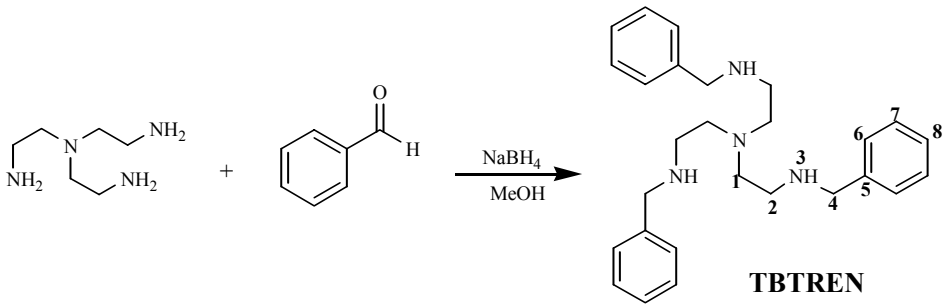
Μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών

α,α,α,α-ατροποϊσομερές

Σε σφαιρική φιάλη των 250 ml και κάτω από συνεχή ροή Αργού το οποίο είναι κορεσμένο σε τολουόλιο, τοποθετούνται 36 gr οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) και 100 ml τολουόλιο. Το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για 2 ώρες και ακολούθως προστίθενται 1.48 mmole από το μίγμα των ατροποϊσομερών της πορφυρίνης **12**. Το διάλυμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία βρασμού για επιπλέον 16 ώρες. Η πρόοδος της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και διαλύτη ανάπτυξης τολουόλιο-διαιθυλαιθέρα (1:1). Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί διαχωρισμός των ατροποϊσομερών με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH. Η σειρά με την οποία εκλούονται τα ατροποϊσομερή είναι: *α,β,α,β* – *α,α,β,β* – *α,α,α,β* – *α,α,α,α*. Το επιθυμητό *α,α,α,α* ατροποϊσομερές εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2-MeOH (98:2). Η απόδοση της μετατροπής είναι 70%.
^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{pyr}}$ (8.90 s, 8H), $\mathbf{H_1}$ (7.86 dd, 4H), $\mathbf{H_2}$ (7.17 dt, 4H), $\mathbf{H_3}$ (7.60 dt, 4H), $\mathbf{H_4}$ (7.10 d, 4H), $\mathbf{NH_2}$ (3.52 s, 8H), **NH** (–2.68 s, 2H)

6.14 Σύνθεση της τρις(2-βενζυλο-αμινο-αιθυλο)αμίνης (TBTREN)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



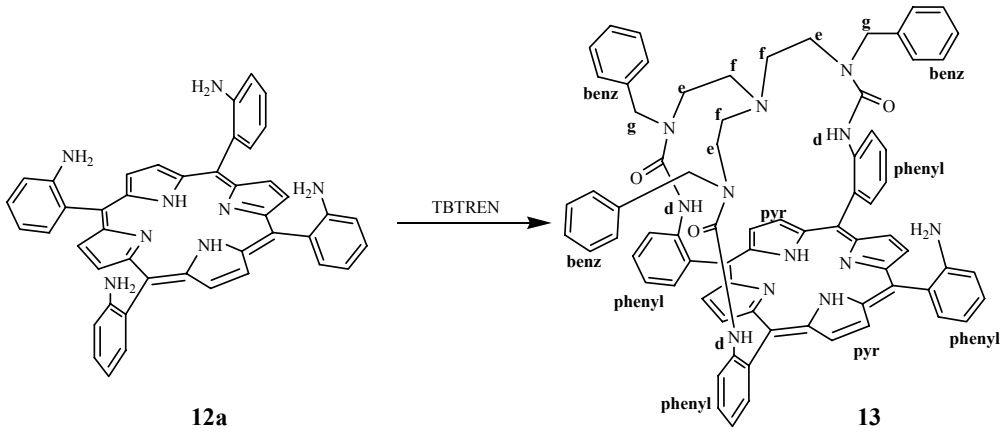
Σε ξηρή σφαιρική φιάλη των 10 ml και κάτω υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύονται 5 mmole τρις(2-αμινοαιθυλο)αμίνης σε 5 ml ξηρής μεθανόλης και προστίθενται στάγδην 16.5 mmole βενζαλδεΰδης. Το κίτρινο διάλυμα που σχηματίζεται αναδεύεται για 1 ώρα. Στη συνέχεια το διάλυμα ψύχεται στους 0 ºC σε παγόλουτρο, προστίθενται τμηματικά 19 mmole βοροϋδρίδιο του νατρίου ($NaBH_4$) και ακολουθεί ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για επιπλέον 2 ώρες. Το μίγμα της αντίδρασης διαλύεται σε 10 ml νερό και εκπλένεται με (3 x 10 ml) διαιθυλαιθέρα. Οι οργανικές φάσεις συλλέγονται και εκπλένονται (2 x 20 ml) με υδατικό διάλυμα HCl 1N. Υπό αυτές τις όξινες συνθήκες το προϊόν περνάει στην υδατική φάση, η οποία εκπλένεται με (2x10ml) διαιθυλαιθέρα. Στη συνέχεια, η υδατική στοιβάδα μετατρέπεται σε βασική με την προσθήκη K_2CO_3 (pH > 10) και εκπλένεται με (3 x 10 ml) διαιθυλαιθέρα. Λόγω των βασικών συνθηκών το προϊόν περνάει στην οργανική φάση, η οποία ξηραίνεται με την προσθήκη άνυδρου $MgSO_4$. Ακολουθεί απόσταξη του διαλύτη και απομένει το προϊόν το οποίο είναι ένα κίτρινο ελαιώδες υγρό. Η απόδοση της αντίδρασης είναι 80%.

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_1}$ (2.57 t, 6H), $\mathbf{H_2}$ (2.66 t, 6H), $\mathbf{H_3}$ (1.84 s br, 3H), $\mathbf{H_4}$ (3.73 s, 6H), $\mathbf{H_{6\text{-}8}}$ (7.25 m, 15H)

^{13}C NMR (125MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{C_1}$ (54.52), $\mathbf{C_2}$ (47.20), $\mathbf{C_4}$ (54.03), $\mathbf{C_5}$ (140.48), $\mathbf{C_6}$ (128.06), $\mathbf{C_7}$ (128.35), $\mathbf{C_8}$ (126.82)

6.15 Σύνθεση της 5,10,15(2-(NHCO-TBTREN)-φαινυλο)-20(2-αμινοφαίνυλο) πορφυρίνης (13)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα:

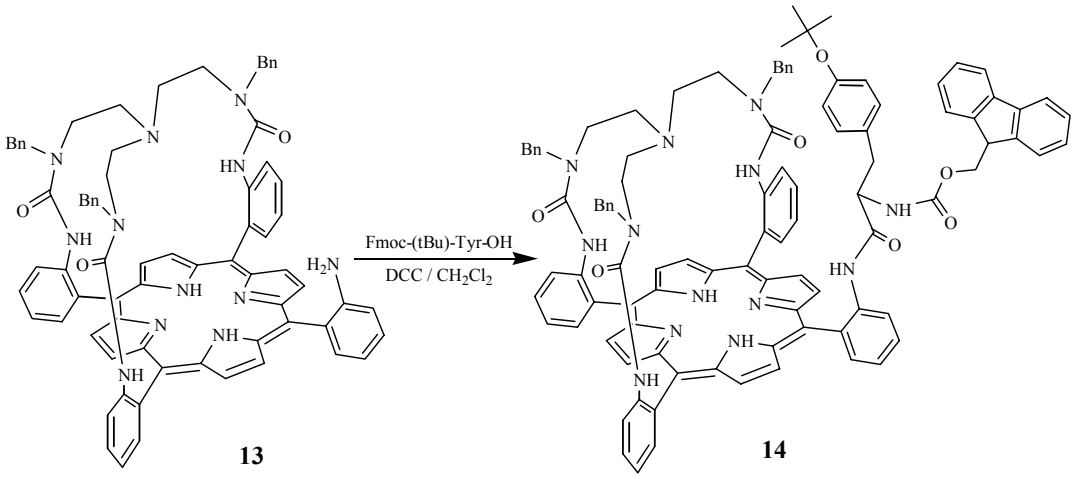


Σε ξηρή σφαιρική φιάλη των 50 ml και κάτω υπό ατμόσφαιρα Αργού διαλύονται 0.095 mmole της πορφυρίνης **12a** σε 20 ml ξηρό CH_2Cl_2 και προστίθενται 0.095 mmole τριφωσγένιο και 0.57 mmole τριαιθυλαμίνη. Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου ενδιαμέσου επιβεβαιώνεται μέσω της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας. Σε μια διαφορετική σφαιρική και υπό επίσης αδρανείς συνθήκες διαλύονται 0.095 mmole τρις(2-βενζυλο-αμινο-αιθυλο)αμίνης (TBTREN) σε 20 ml ξηρό CH_2Cl_2. Τα διαλύματα από τις δυο σφαιρικές μεταφέρονται σε δυο σύριγγες και πραγματοποιείται αργή προσθήκη αυτών σε μια τρίτη σφαιρική η οποία περιέχει 20 ml ξηρό CH_2Cl_2. Η διάρκεια της προσθήκης είναι ~1 ώρα και το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για επιπλέον 16 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης αποστάζεται ο διαλύτης και ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης που φέρει ως υλικό πλήρωσης βασικό οξείδιο του αλουμινίου (basic Al_2O_3). Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα EtOAc. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2-EtOAc (94:6). Η απόδοση της αντίδρασης είναι 63%. (ESI-MS): 1192.7 $[M+Na]^+$.

^{1}H NMR (500MHz, $CDCl_3$): $\mathbf{H_{pyr}}$ (8.96–8.78 m, 8H), $\mathbf{H_{phenyl}}$ (8.54 d, 2H, 8.40 d, 1H, 7.82 m, 5H, 7.68 m, 2H, 7.63 t, 1H, 7.54 m, 2H, 7.41 t, 1H, 7.36 m, 1H, 7.18 d, 1H), $\mathbf{H_{benz}}$ (7.14–6.87 m, 15H), $\mathbf{H_d}$ (6.42 s, 2H, 6.21 s, 2H), $\mathbf{H_{d,f,g}}$ (5.22 m, 2H, 5.01 m, 2H, 4.07 m, 2H, 1.85–1.20 m, 8H, –1.08 m, 2H, –2.42 m, 2H), $\mathbf{NH_2}$ (3.57 s, 2H), **NH** (–2.50 s, 2H)

6.16 Σύνθεση της 5,10,15(2-(NHCO-TBTREN)-φαίνυλο)-20(2-(Fmoc-(tBu)Tyr)-φαίνυλο) πορφυρίνης (14)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα:

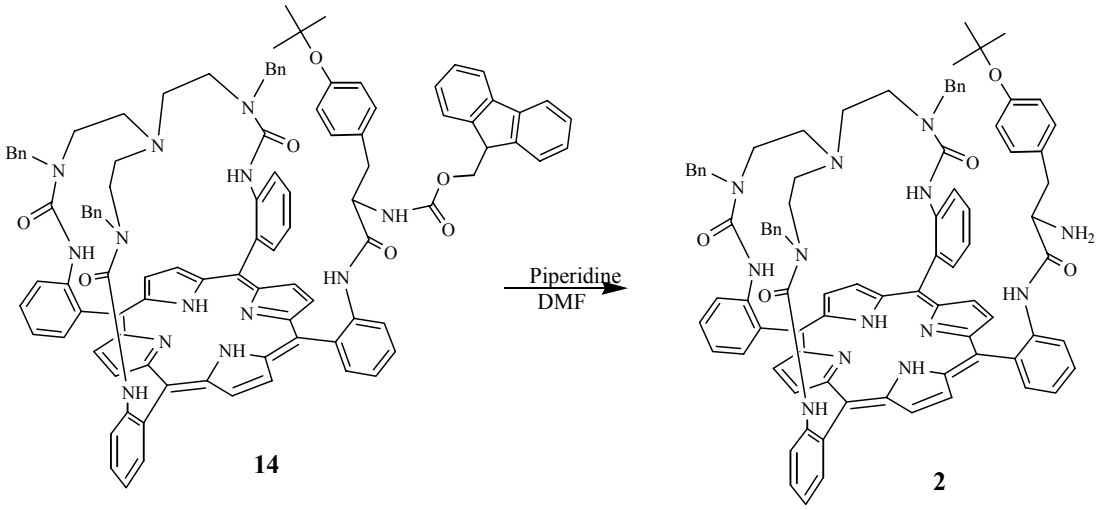


13 **14**

Σε σφαιρική φιάλη των 10 ml διαλύονται 0.052 mmole προστατευμένης τυροσίνης και 0.027 mmole DCC σε 1ml CH_2Cl_2. Το διάλυμα αναδεύεται στους 0 ºC για 30min και στη συνέχεια προστίθενται 0.013 mmole της πορφυρίνης **13**. Το μίγμα αναδεύεται για 24 ώρες στους 5 ºC. Έπειτα προστίθενται 20 ml CH_2Cl_2 και πραγματοποιούνται διαδοχικές εκπλύσεις με υδατικό διάλυμα κιτρικού οξέος (2x30ml), με κορεσμένο υδατικό διάλυμα $NaHCO_3$ (2 x 30 ml) και τέλος με νερό (1 x 30 ml). Η οργανική φάση συλλέγεται, ξηραίνεται με άνυδρο $MgSO_4$, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Το στερεό υπόλειμμα που λαμβάνεται καθαρίζεται περαιτέρω με χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 και σταδιακά πραγματοποιείται προσθήκη EtOAc. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2-EtOAc (9:1). Η απόδοση της αντίδρασης είναι 62%.Το φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **14** ήταν πολύπλοκο και δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός των σημάτων συντονισμού. Η ταυτοποίηση της πορφυρίνης **14** πραγματοποιήθηκε μέσω της φασματομετρίας μάζας (ESI-MS) όπου παρατηρείται μια κορυφή στα 1633.7 η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν μαζί με ένα νάτριο $[M+Na]^+$.

6.17 Σύνθεση της 5,10,15(2-(NHCO-TBTREN)-φαινυλο)-20(2-((tBu)Tyr)-φαίνυλο) πορφυρίνης (2)

Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής:



14 **2**

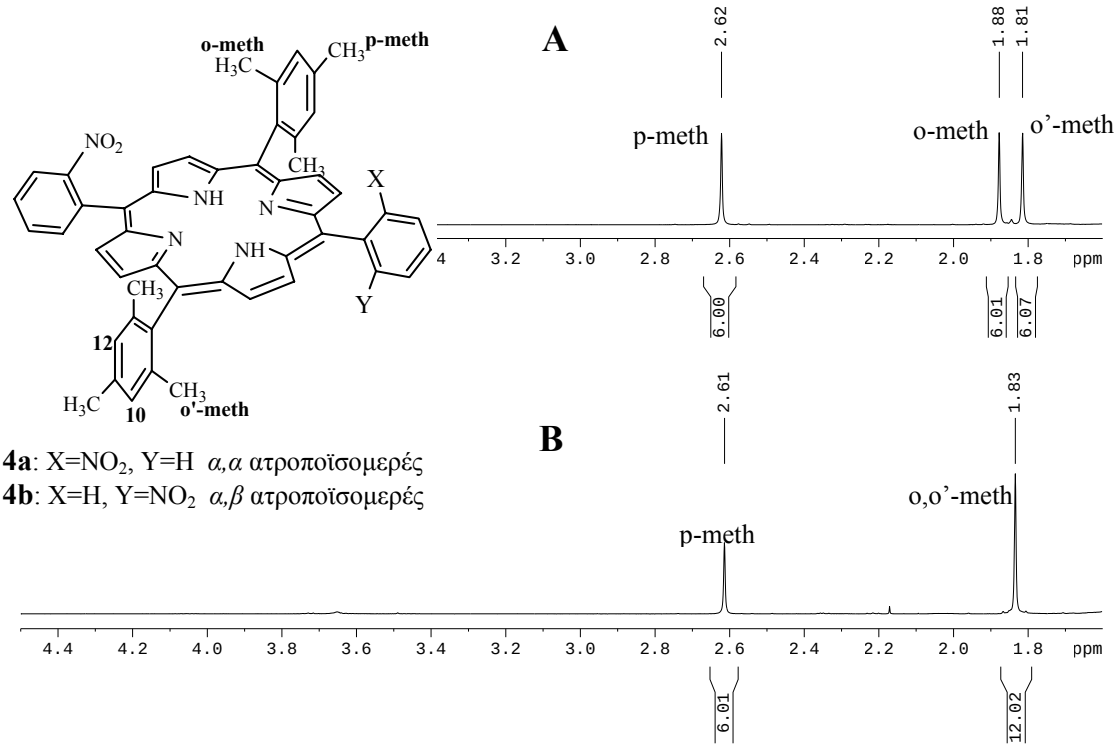
Σε σφαιρική φιάλη των 10 ml διαλύονται 0.025 mmole πορφυρίνης **14** σε 2 ml DMF και προστίθενται 0.4 ml πιπεριδίνης. Το διάλυμα αναδεύεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απόσταξη του διαλύτη υπό κενό. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 20 ml CH_2Cl_2 και εκπλένεται (3 x 25 ml) με νερό. Η οργανική φάση ξηραίνεται με άνυδρο $MgSO_4$, διηθείται και αποστάζεται ο διαλύτης υπό ελαττωμένη πίεση. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης, που φέρει ως υλικό πλήρωσης SiO_2. Ο διαλύτης έκλουσης αρχικά είναι CH_2Cl_2 ενώ σταδιακά προστίθεται ποσότητα MeOH. Το προϊόν εκλούεται με διαλύτη CH_2Cl_2-MeOH (8:2). Η απόδοση της αντίδρασης είναι 91%. Η ταυτοποίηση της ένωσης **2** δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί μέσω της φασματοσκοπίας ^{1}H-NMR και για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε η φασματομετρία μάζας (ESI-MS) όπου παρατηρήθηκε μια κορυφή στα 1389.7 η οποία αντιστοιχεί στο μοριακό ιόν +1 $[M+1]^+$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

7.1 Διάκριση των ατροποϊσομερών 4a και 4b μέσω της φασματοσκοπίας ^{1}H-NMR

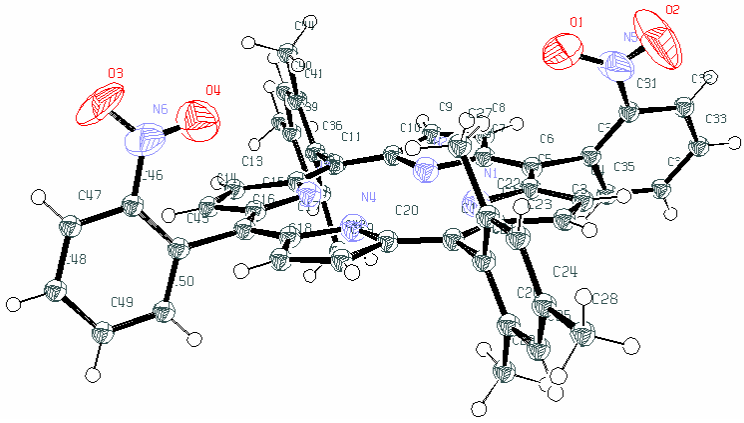
Για την ταυτοποίηση των ατροποϊσομερών **4a** και **4b** χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία ^{1}H-NMR. Συγκρίνοντας τα φάσματα ^{1}H-NMR των δυο ατροποϊσομερών, παρατηρείται ότι στην περίπτωση της πορφυρίνης **4a**, τα πρωτόνια των όρθο μεθυλίων της μεσίτυλο ομάδας ($H_{o\text{-}meth}$) εμφανίζουν δύο διαφορετικές κορυφές, ενώ τα αντίστοιχα πρωτόνια της πορφυρίνης **4b** εμφανίζουν μια κορυφή (Σχήμα 7.1). Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και για τα σήματα συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων της μεσίτυλο ομάδας ($H_{10,12}$). Αυτό εξηγείται ως εξής: στο *α,α* ατροποϊσομερές τα πρωτόνια $H_{o\text{-}meth}$ που βρίσκονται στην ίδια πλευρά του δακτυλίου με τις δυο νιτροομάδες έχουν διαφορετικό χημικό περιβάλλον από τα αντίστοιχα πρωτόνια $H_{o\text{-}meth}$ που βρίσκονται στην αντίθετη πλευρά. Ενώ στο *α,β* ατροποϊσομερές τα αντίστοιχα πρωτόνια βρίσκονται στο ίδιο χημικό περιβάλλον και είναι ισοδύναμα.



4a: X=NO_2, Y=H *α,α* ατροποϊσομερές
4b: X=H, Y=NO_2 *α,β* ατροποϊσομερές

Σχήμα 7.1: *Φάσμα ^{1}H-NMR της αλειφατικής περιοχής των ενώσεων Α)* **4a** *και Β)* **4b**

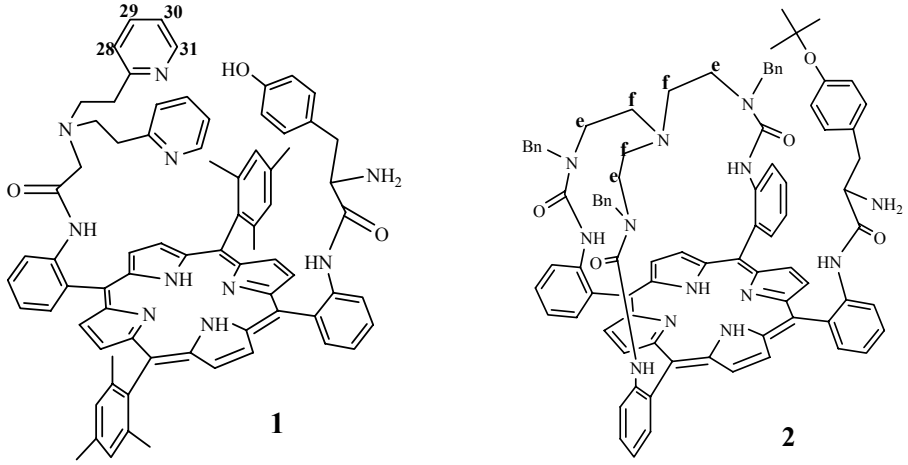
Το *α,α* ατροποϊσομερές το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του μοντέλου **1** μελετήθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Οι κρύσταλλοι προέκυψαν από μίγμα και των δύο ισομερών σε διαλύτη CH_2Cl_2 και αργή εξάτμιση του διαλύτη σε θερμοκρασία 5^{o}C. Η δομή του συμπλόκου αυτού (Σχήμα 7.2) δείχνει την ακριβή θέση των φαινυλικών υποκαταστατών ως προς το δακτύλιο της πορφυρίνης και επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για το *α,α* ισομερές.



Σχήμα 7.2: *Διάγραμμα ORTEP της πορφυρίνης **4α***

7.2 Προσδιορισμός της δομής των μοντέλων μέσω της φασματοσκοπίας ^{1}H-NMR

Στο ενεργό κέντρο του ενζύμου της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης ο χαλκός Cu_B βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου. Τα βιομιμητικά μοντέλα που συντέθηκαν είναι απαραίτητο να προσομοιάζουν αυτό το χαρακτηριστικό. Στο μοντέλο **2** ο τρόπος σύνδεσης του υποκαταστάτη του χαλκού (TBTREN) είναι τέτοιος που εμποδίζει την περιστροφή του και εξασφαλίζει την παρουσία του χαλκού πάνω από το επίπεδο της πορφυρίνης (Σχήμα 7.3). Αντίθετα στην περίπτωση του μοντέλου **1** ο τρόπος σύνδεσης του υποκαταστάτη του χαλκού (BPEA) επιτρέπει την περιστροφή του υποκαταστάτη σε σχέση με τον πορφυρινικό δακτύλιο (Σχήμα 7.3). Στην περίπτωση αυτή δεν είναι δυνατόν να προβλεφθεί η διαμόρφωση που θα αποκτήσει το μόριο. Ωστόσο η φασματοσκοπία ^{1}H-NMR είναι σε θέση να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη θέση του υποκαταστάτη του χαλκού.



Σχήμα 7.3: *Τα μοντέλα που συντέθηκαν*

Οι πορφυρίνες αποτελούν ένα αρωματικό σύστημα και παρουσιάζουν το φαινόμενο που καλείται ρεύμα δακτυλίου, το οποίο οφείλεται στην κίνηση των π-ηλεκτρονίων. Η κίνηση του π-ηλεκτρονιακού νέφους έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ανισοτροπικού μαγνητικού πεδίου. Το πεδίο αυτό ασκεί μεγάλη επίδραση στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων. Τα πρωτόνια που βρίσκονται πάνω και κάτω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου προστατεύονται και το σήμα τους μετατοπίζεται σε χαμηλότερες συχνότητες, ενώ τα πρωτόνια που βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με την πορφυρίνη αποπροστατεύονται. Συνεπώς η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του υποκαταστάτη του χαλκού πριν και μετά τη συναρμογή του με την πορφυρίνη παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη θέση του στο χώρο.

Στον πίνακα 1 αναγράφονται οι χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων της BPEA όταν είναι ελεύθερη και όταν βρίσκεται συναρμοσμένη με τον πορφυρινικό δακτύλιο στο μοντέλο **1**.

Πίνακας 1: *Χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων της BPEA, η αρίθμηση των πρωτονίων φαίνεται στο σχήμα 7.3*

	H_{28} (ppm)	H_{29} (ppm)	H_{30} (ppm)	H_{31} (ppm)
BPEA	7.12	7.55	7.08	8.48
Μοντέλο 1	4.39	6.41	6.68	7.91

Παρατηρείται ότι κατά τη συναρμογή της BPEA με την πορφυρίνη οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της μετατοπίζονται σε χαμηλότερες συχνότητες (τα πρωτόνια προστατεύονται). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η BPEA βρίσκεται πάνω από το επίπεδο της πορφυρίνης. Συνεπώς στο μοντέλο **1** η BPEA υιοθετεί μια διαμόρφωση η οποία προσομοιάζει αυτή του φυσικού ενζύμου. Φυσικά κατά τη συναρμογή των μετάλλων η διαμόρφωση αυτή μπορεί να διαφοροποιηθεί, το γεγονός αυτό θα πρέπει να εξεταστεί και πάλι με τη χρήση της φασματοσκοπίας ^{1}H-NMR.

Στην περίπτωση του μοντέλου **2** η παρουσία της TBTREN πάνω από το επίπεδο του πορφυρινικού δακτυλίου επαληθεύεται συγκρίνοντας τα αλειφατικά πρωτόνια της TBTREN (H_e και H_f). Στην ελεύθερη TBTREN συναντώνται στα 2.56 – 3.72 ppm ενώ στη δεσμευμένη μετατοπίζονται στα 1.85 έως – 2.42 ppm. Επομένως και στα δυο μοντέλα που συντέθηκαν ο υποκαταστάτης του χαλκού βρίσκεται πάνω από το επίπεδο της πορφυρίνης.

7.3 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία συντέθηκαν με επιτυχία δυο βιομιμητικά μοντέλα της κυτοχρωμικής *c* οξειδάσης. Τα μοντέλα αυτά διαθέτουν τα τρία βασικά μέρη του ενεργού κέντρου του φυσικού ενζύμου: i) έναν πορφυρινικό δακτύλιο που είναι σε θέση να δεσμεύσει το ιόν του σιδήρου, ii) έναν υποκαταστάτη που είναι σε θέση να συναρμόζεται με το χαλκό και iii) ένα μόριο τυροσίνης.

Ο πορφυρινικός δακτύλιος που αποτελεί τη βασική δομική μονάδα του μοντέλου **1** είναι το *α,α* ατροποϊσομερές της 5,15-διμεσίτυλο-10,20(2-νιτροφαίνυλο) πορφυρίνης και παρασκευάζεται με μια αντίδραση κυκλοπροσθήκης 2+2 τύπου McDonald χρησιμοποιώντας ένα παρεμποδισμένο διπυρρομεθάνιο. Η βασική δομική μονάδα του μοντέλου **2** είναι το *α,α,α,α* ατροποϊσομερές της 5,10,15,20-τετρακις-(2-αμινοφαίνυλο) πορφυρίνης η οποία παρασκευάζεται με μια αντίδραση συμπύκνωσης.

Το μοντέλο **1** διαθέτει έναν τριδραστικό υποκαταστάτη για το χαλκό την δις(2-(2-πυριδυλο)αιθυλο)αμίνη (BPEA), ενώ το μοντέλο **2** φέρει έναν τετραδραστικό υποκαταστάτη την τρις(2-βενζυλ-αμινο-αιθυλο)αμίνη (TBTREN). Παρά τον διαφορετικό τρόπο συναρμογής των δυο υποκαταστατών με την πορφυρίνη και οι δυο

υιοθετούν μια διαμόρφωση κατά την οποία βρίσκονται πάνω από το επίπεδο της πορφυρίνης και προσομοιάζουν τη διαμόρφωση του φυσικού ενζύμου.

Τα μοντέλα αυτά έχουν σαν σκοπό τον προσδιορισμό του ρόλου της τυροσίνης και για αυτό το λόγο φέρουν ομοιοπολικά συνδεδεμένο ένα μόριο τυροσίνης. Είναι τα πρώτα μοντέλα που περιλαμβάνουν ολόκληρο το μόριο της τυροσίνης καθώς τα μοντέλα που έχουν συντεθεί μέχρι σήμερα δεν το περιλαμβάνουν και περιορίζονται στην παρουσία ενός φαινολικού δακτυλίου.

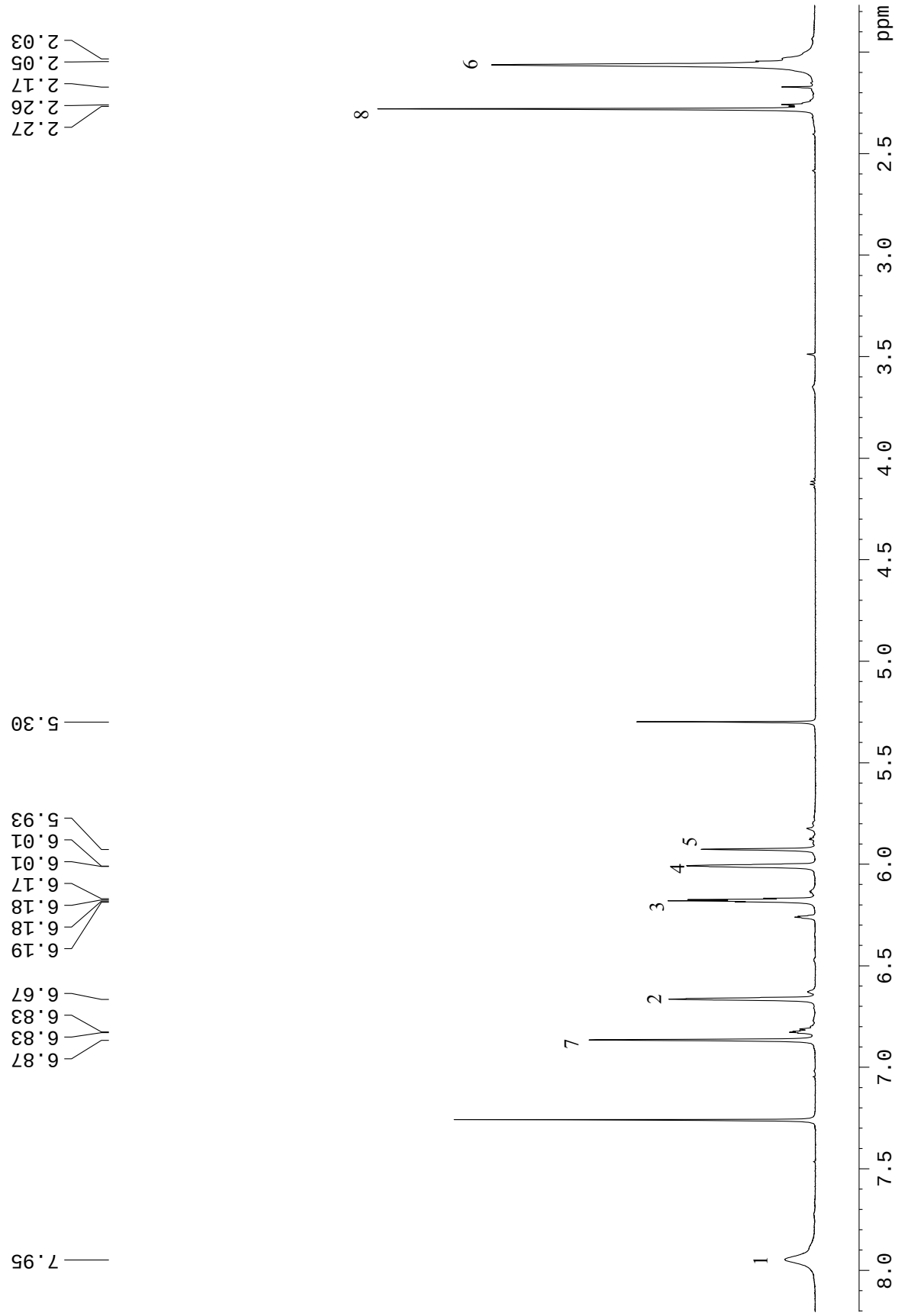
Η σύνθεση αυτών των μοντέλων περιλαμβάνει μια σειρά αντιδράσεων οι περισσότερες από τις οποίες έχουν καλή απόδοση και είναι δυνατή η παρασκευή ικανοποιητικών ποσοτήτων για τις περαιτέρω αντιδράσεις.

Με τη σύνθεση των συγκεκριμένων μοντέλων έχει γίνει ένα σημαντικό βήμα για τον προσδιορισμό του ρόλου της τυροσίνης μέσα από βιομιμητικές μελέτες. Απαιτούνται πολλά περαιτέρω βήματα μέχρι να προκύψουν κάποια τελικά συμπεράσματα και εργαζόμαστε προς αυτήν την κατεύθυνση.

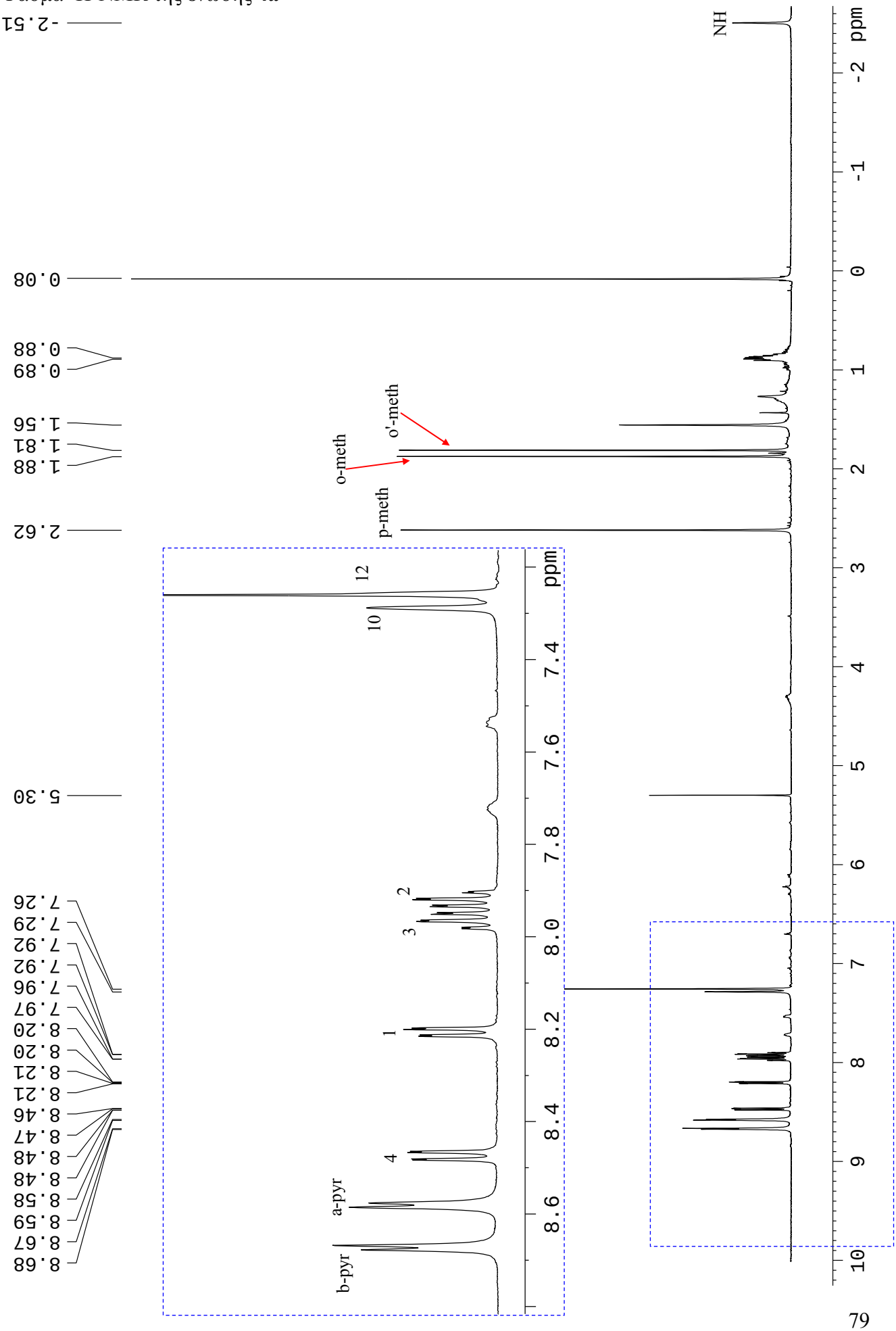
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΦΑΣΜΑΤΑ NMR ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΣΥΝΤΕΘΗΚΑΝ

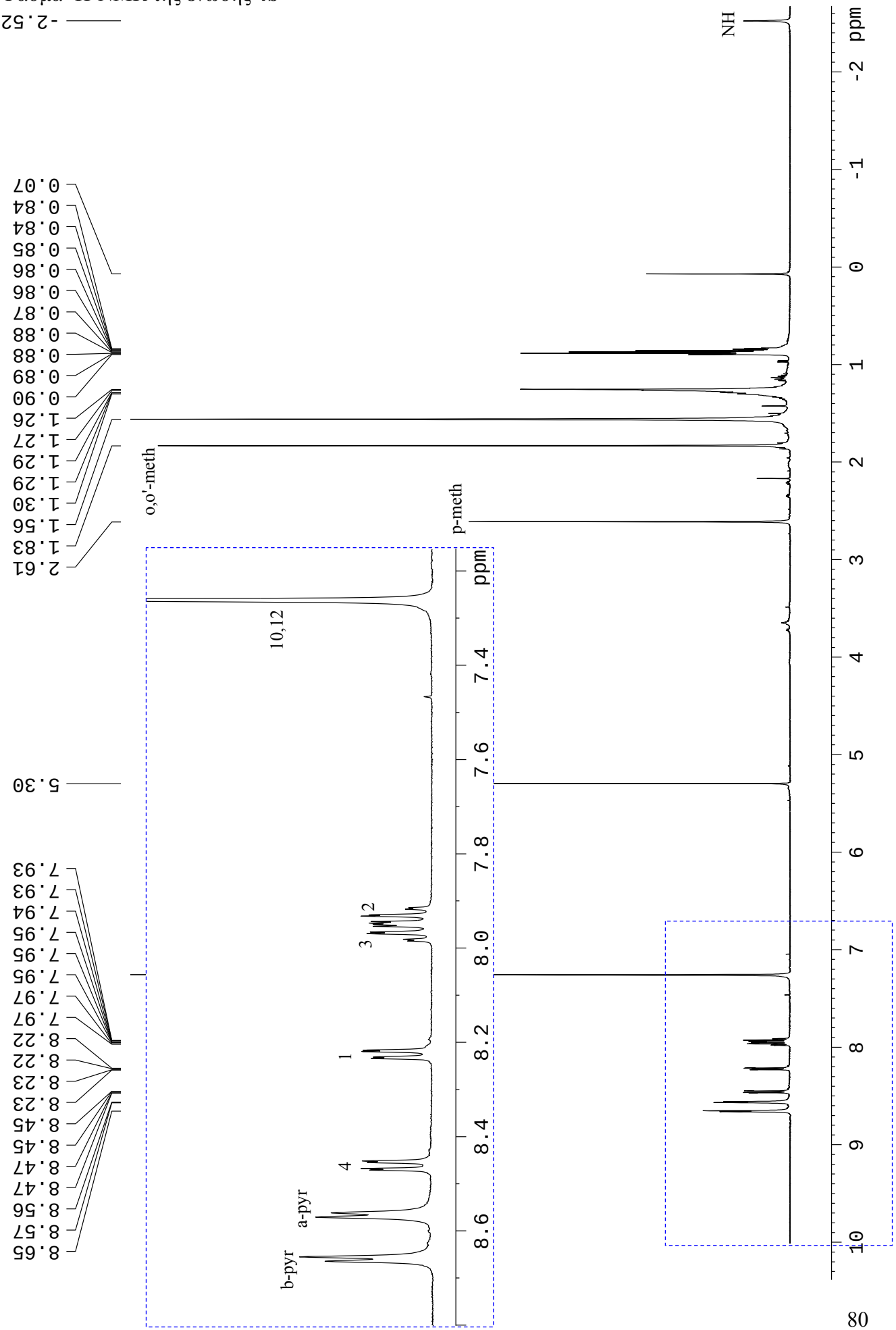
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **3**



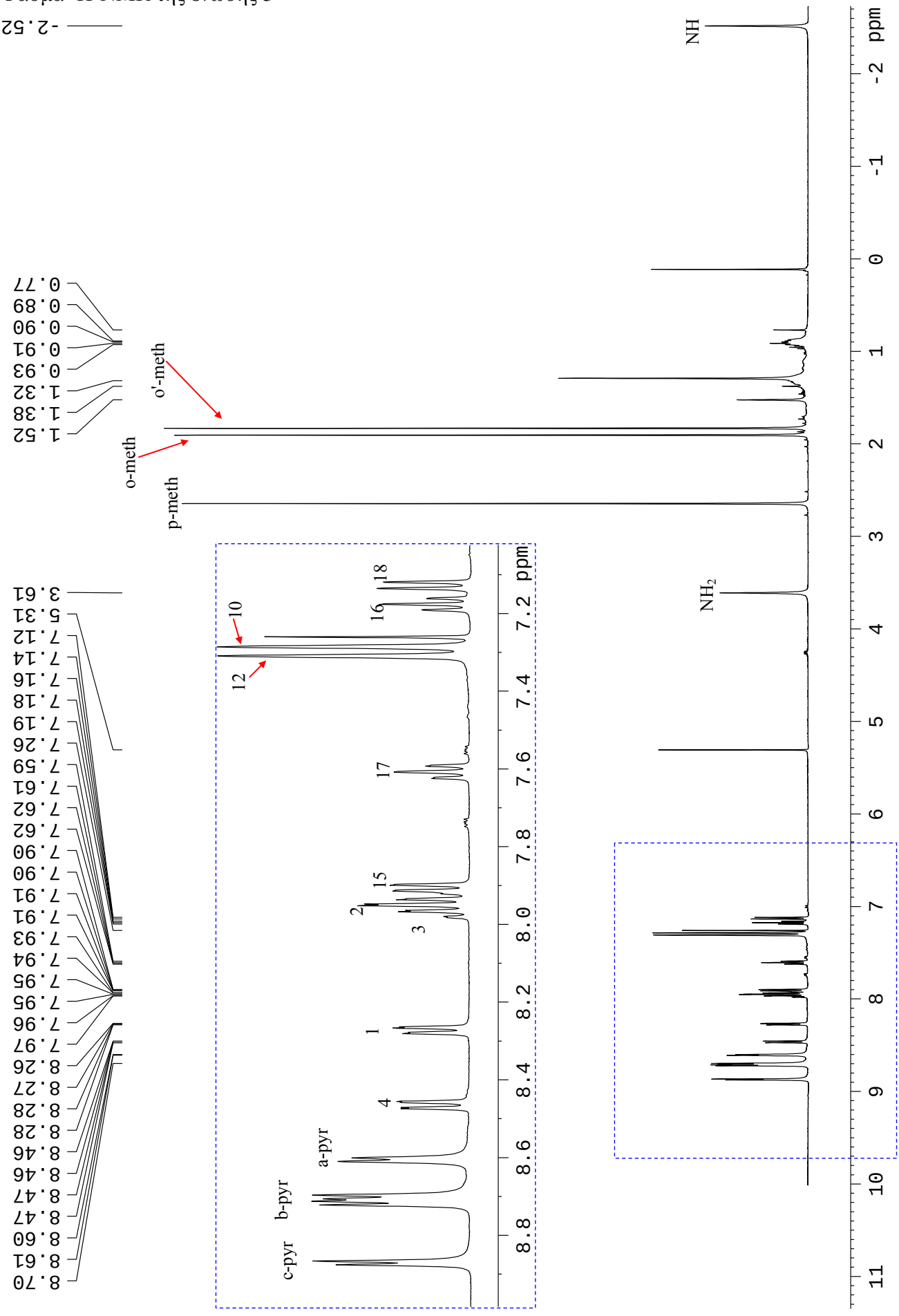
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **4a**



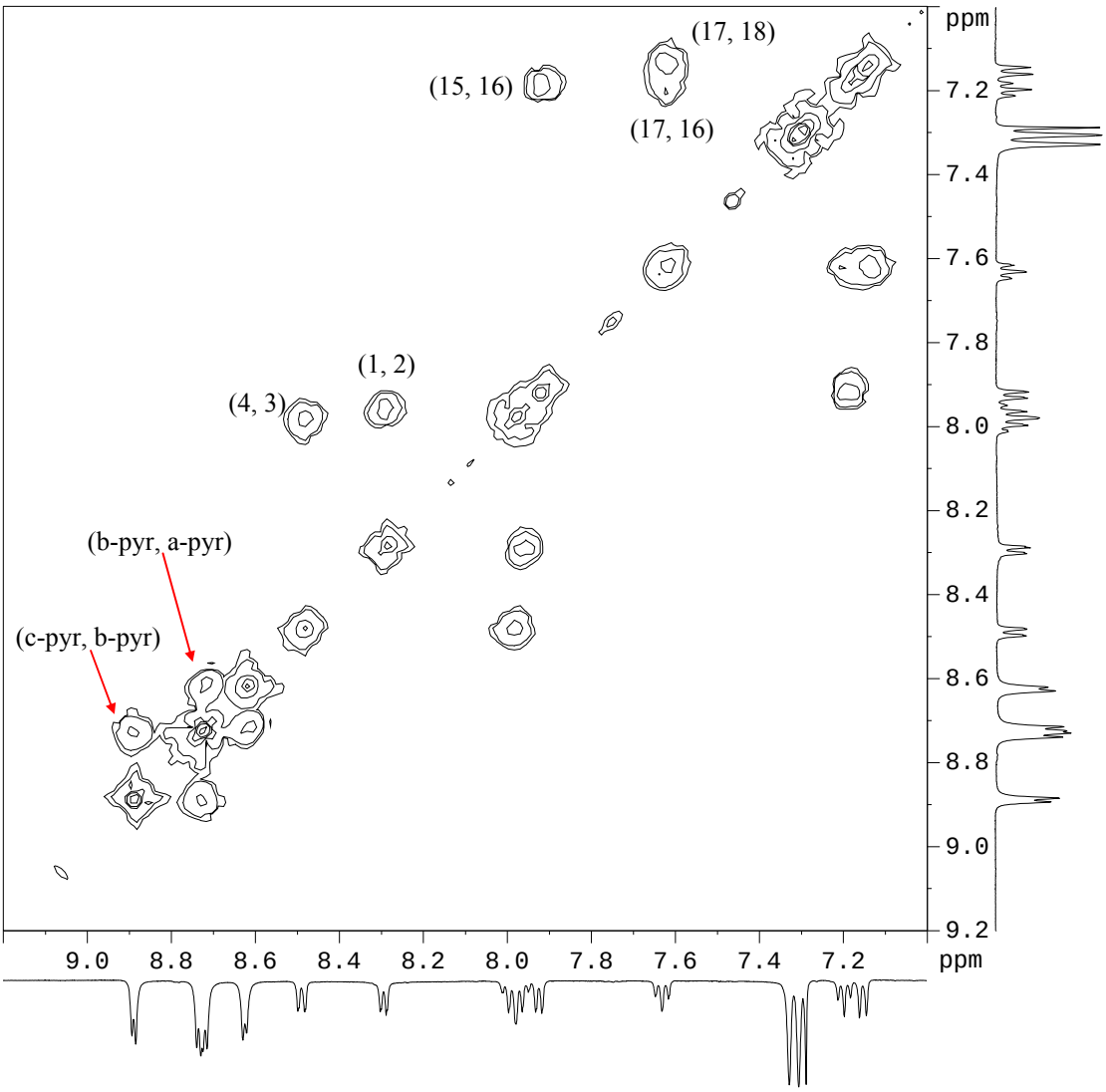
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **4b**



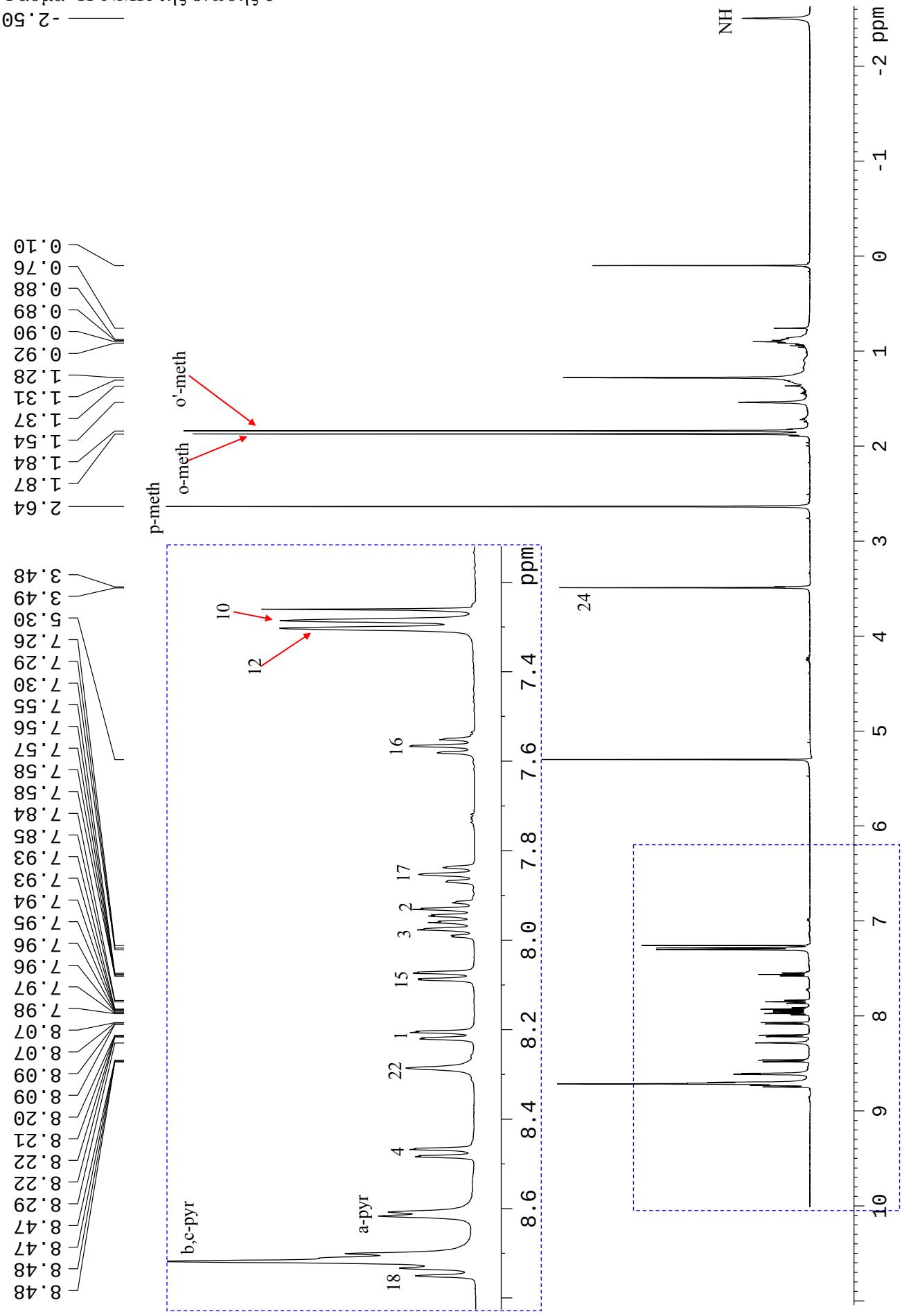
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **5**



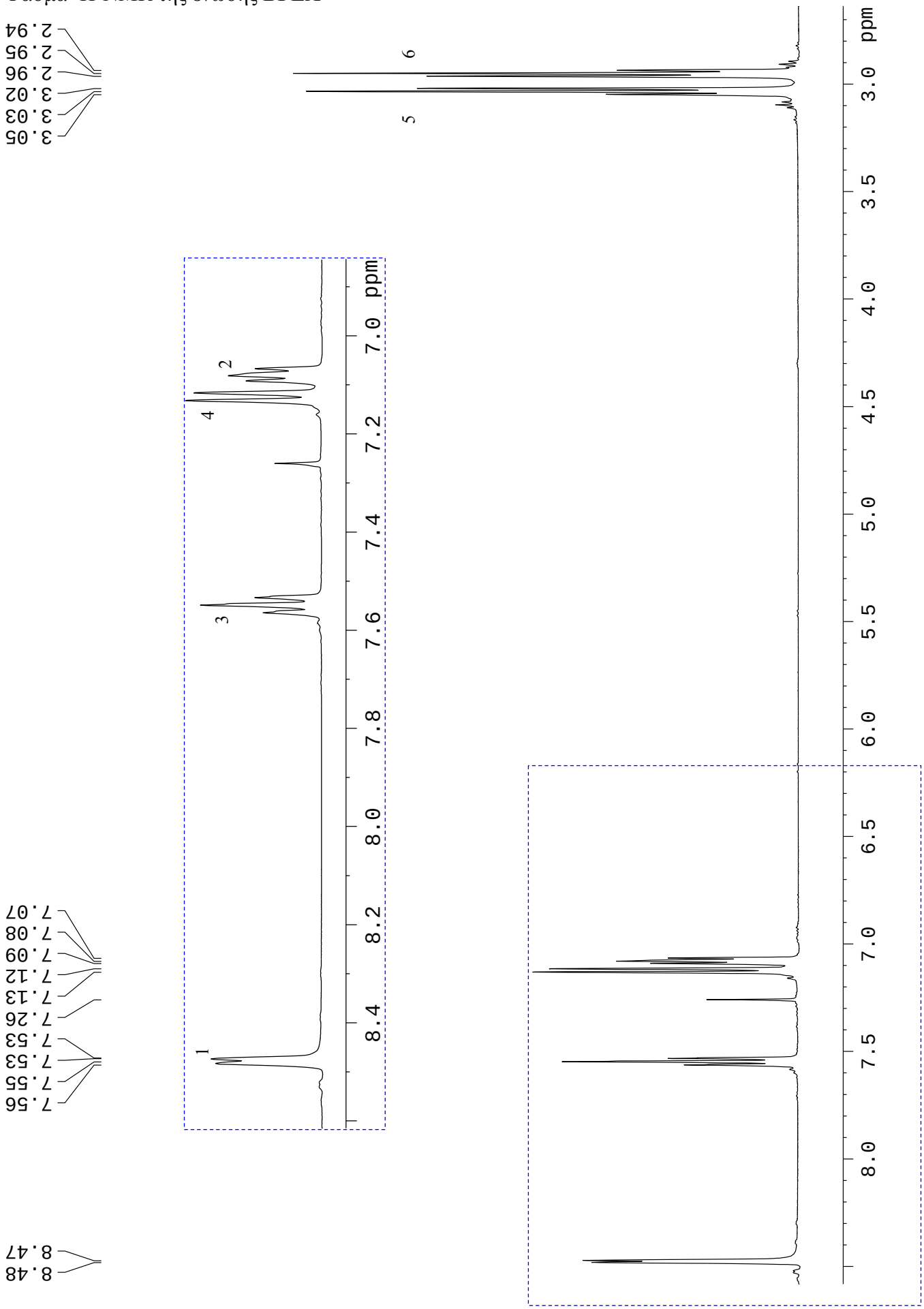
Φάσμα COSY της ένωσης **5**



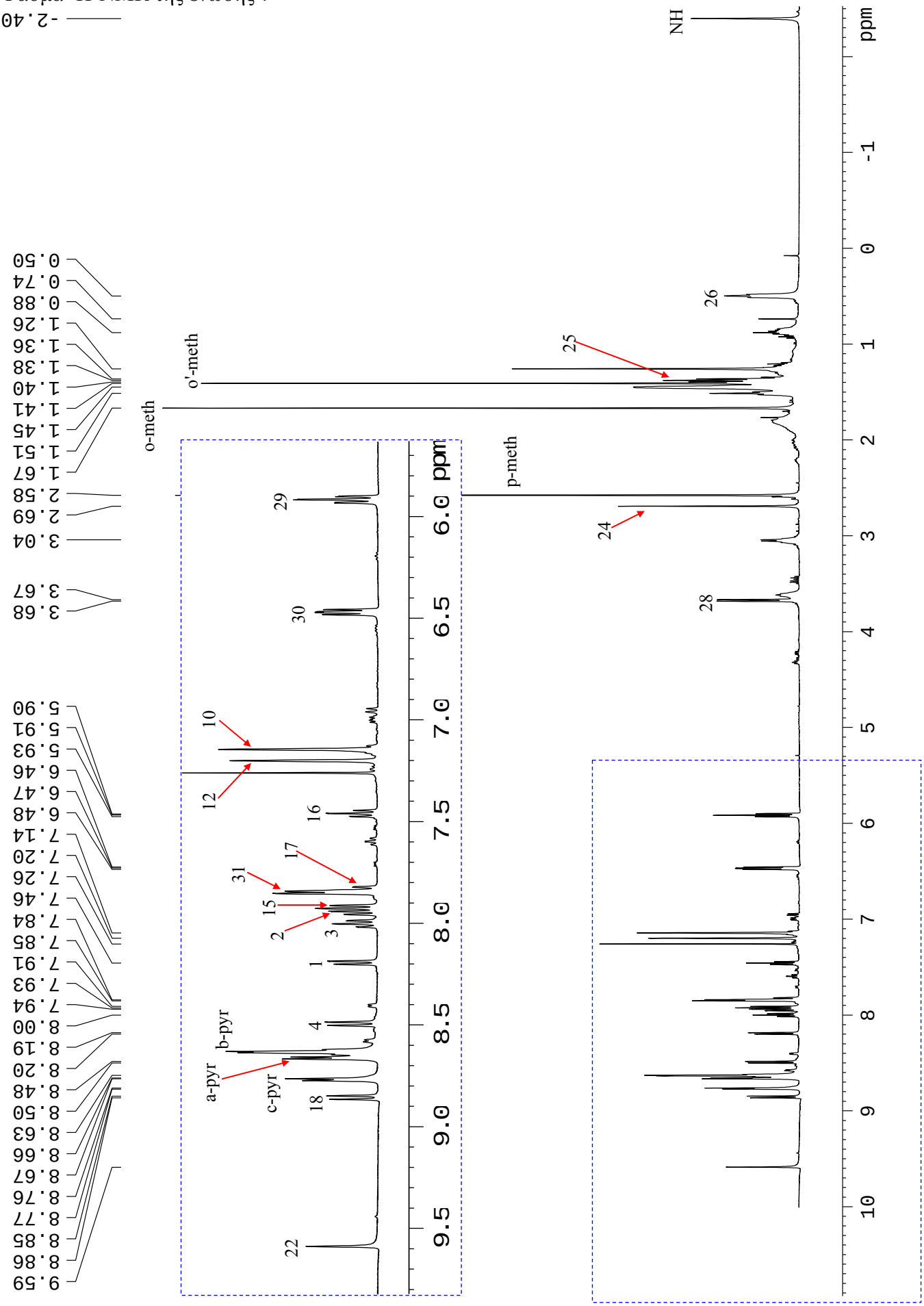
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **6**



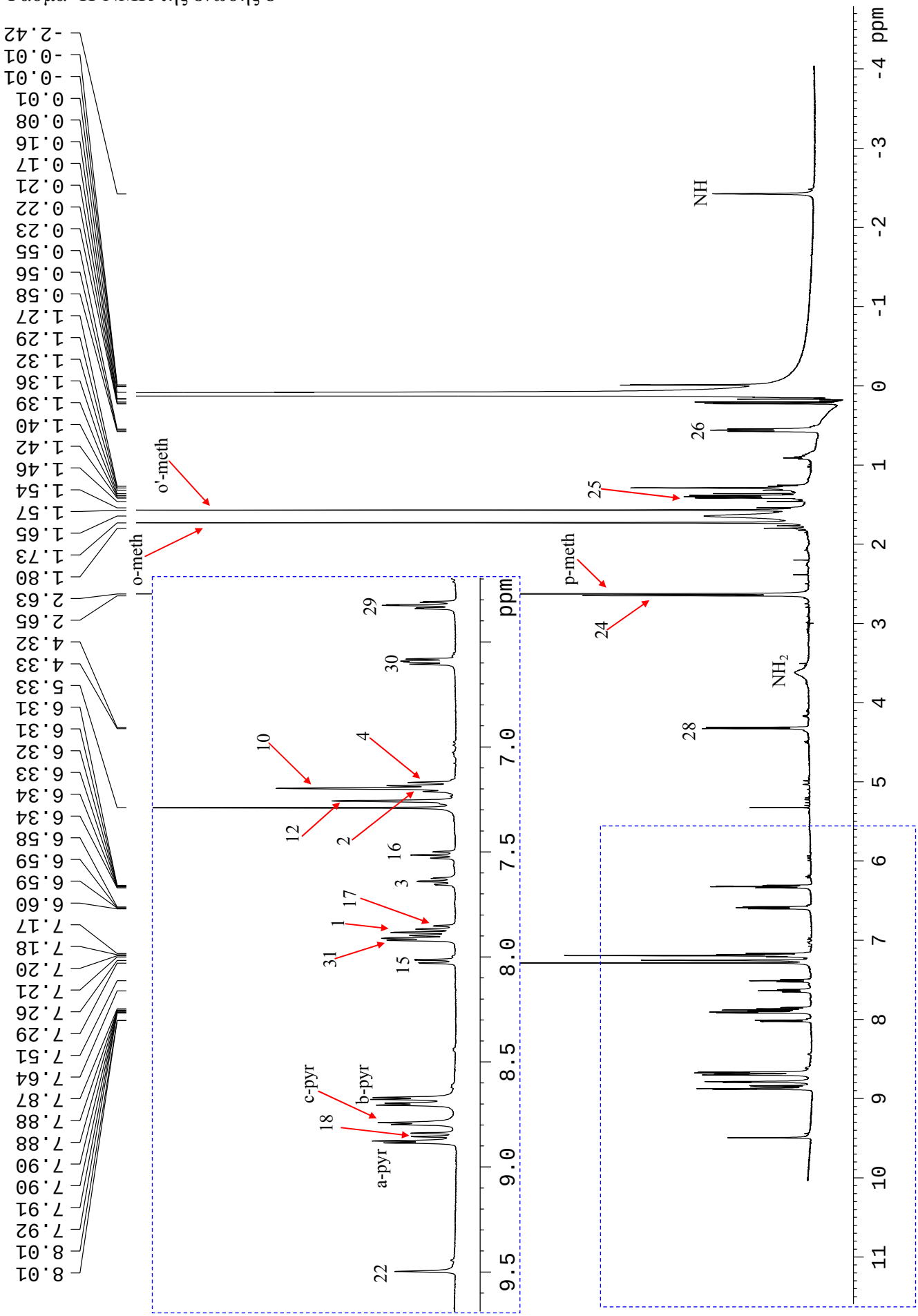
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **BPEA**



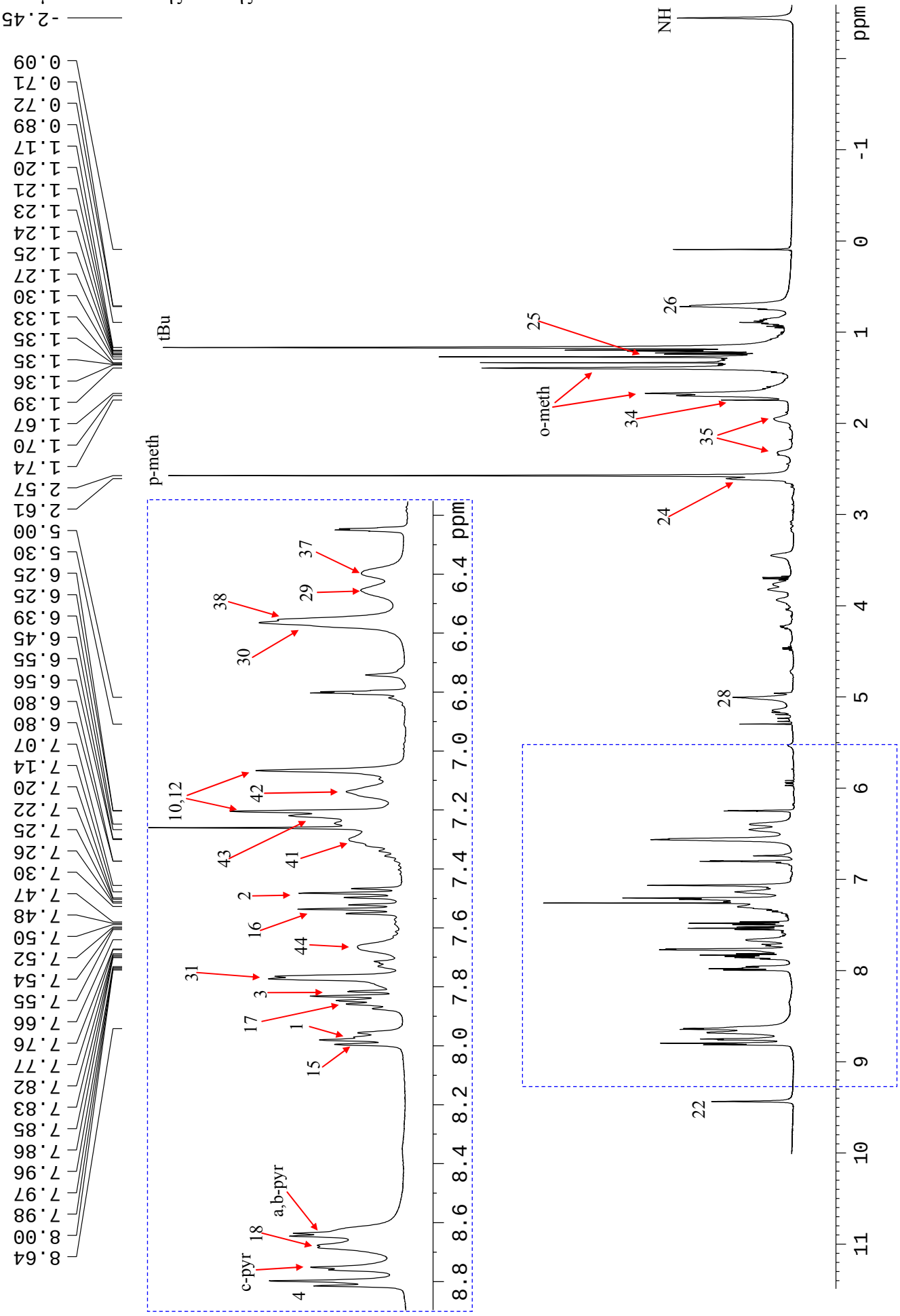
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **7**



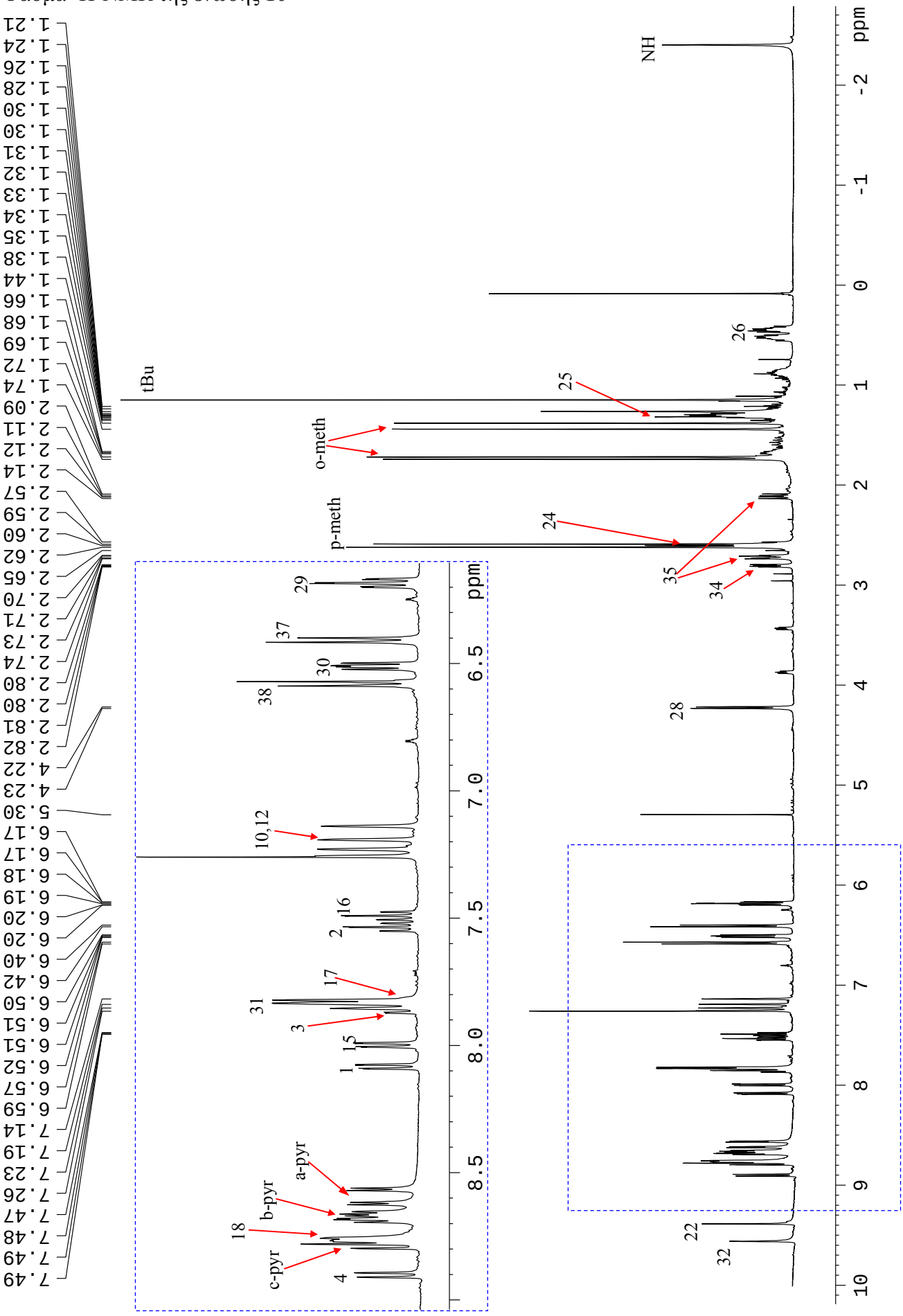
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **8**



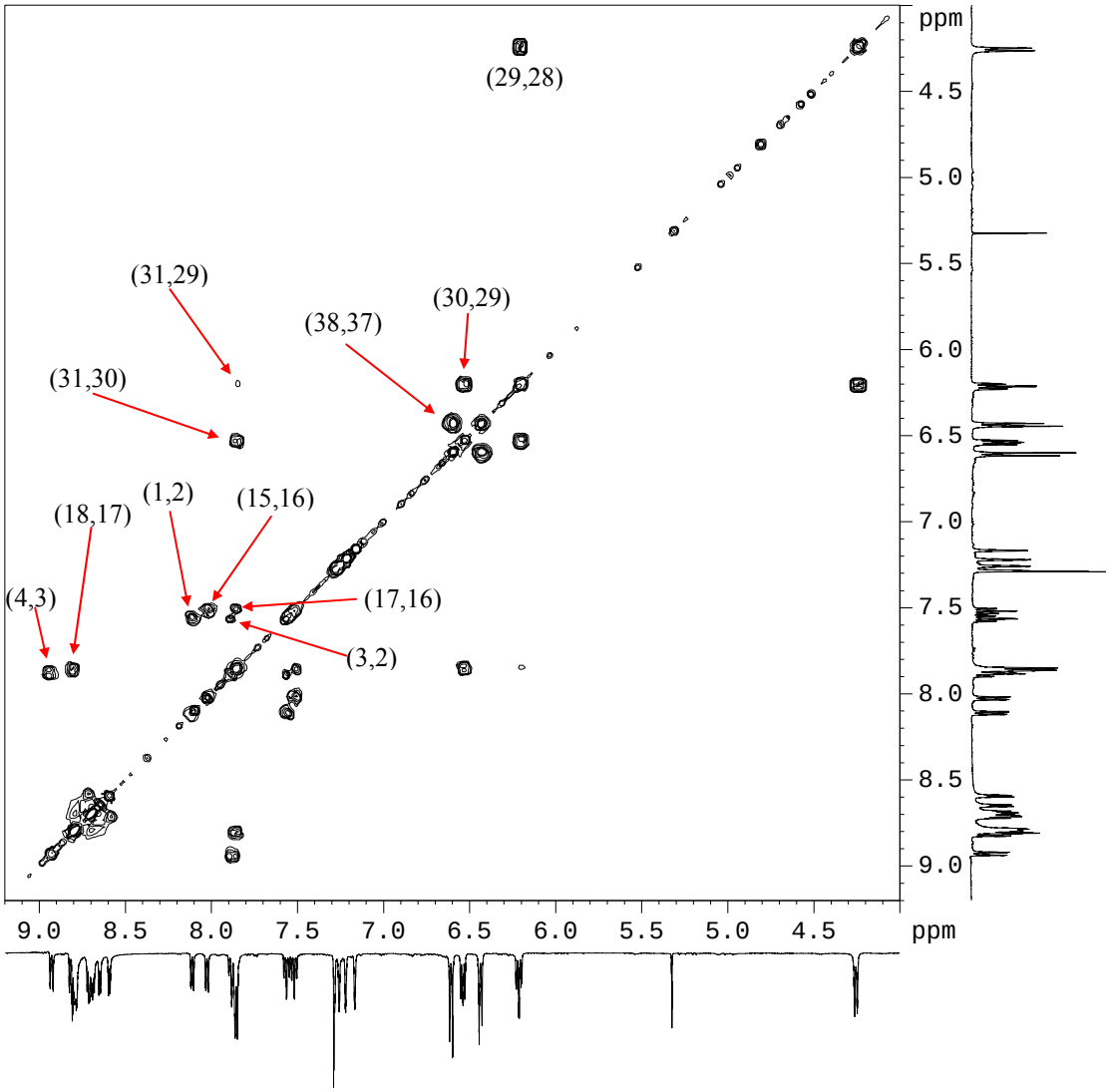
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **9**



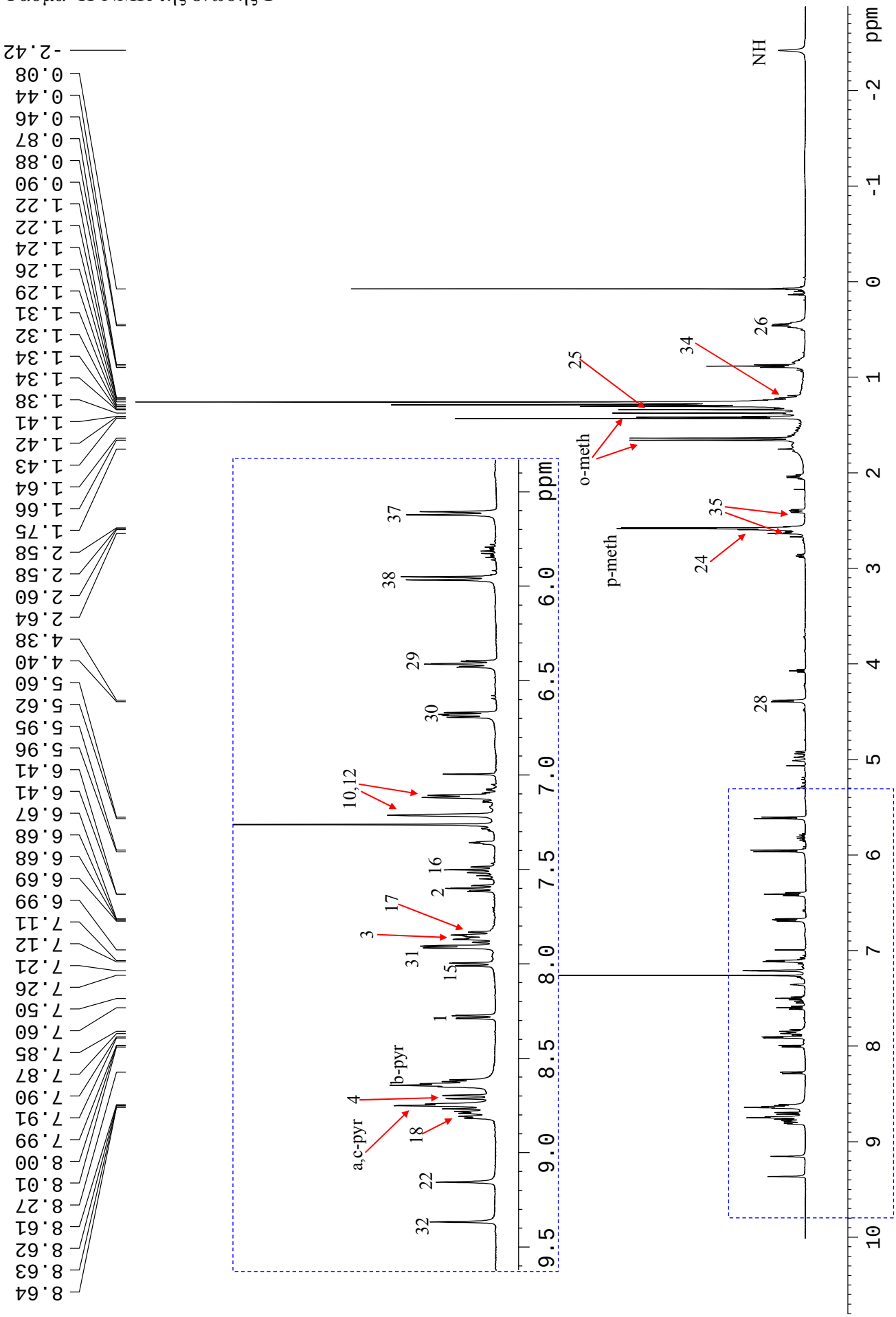
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **10**



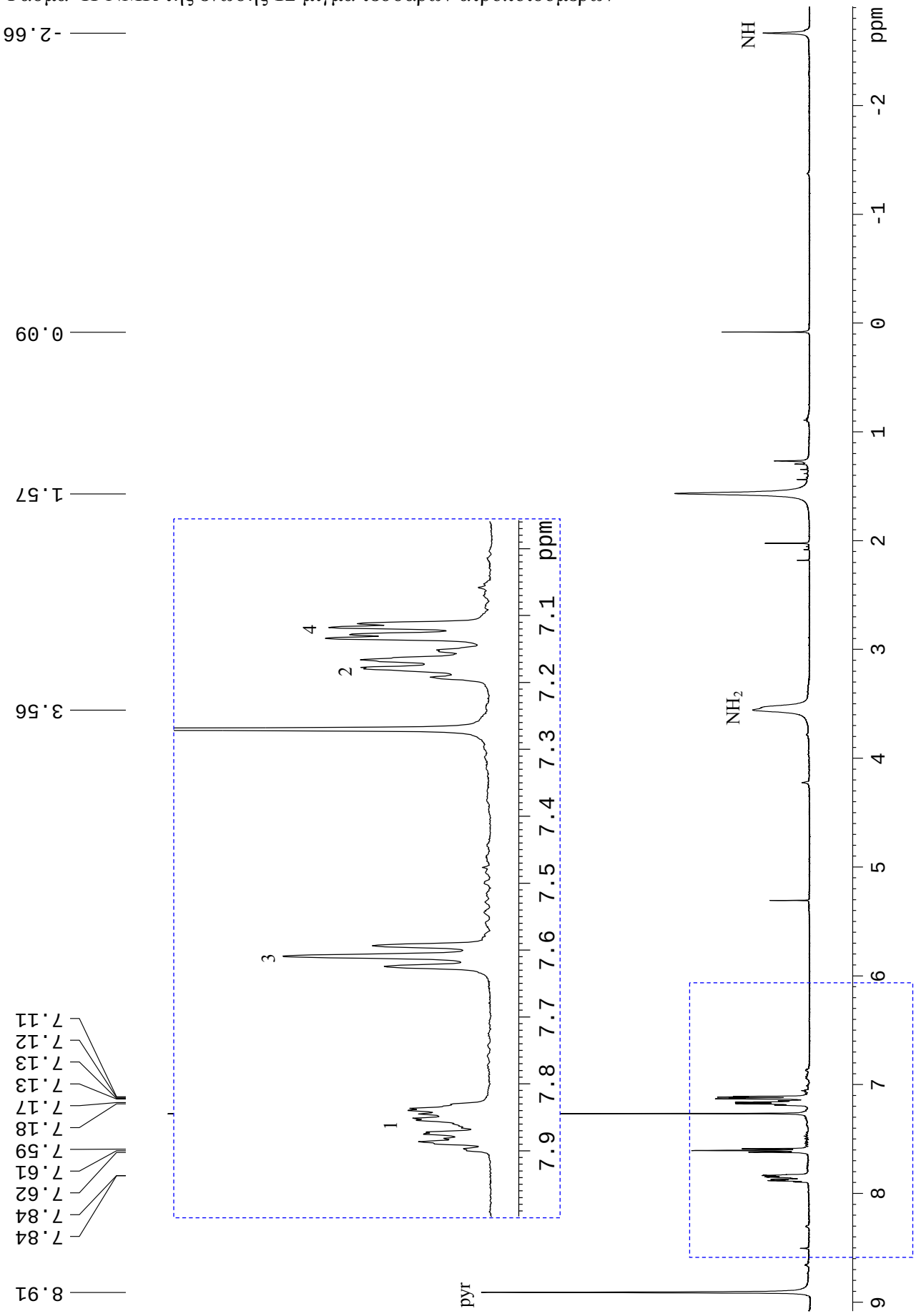
Φάσμα COSY της ένωσης **10**



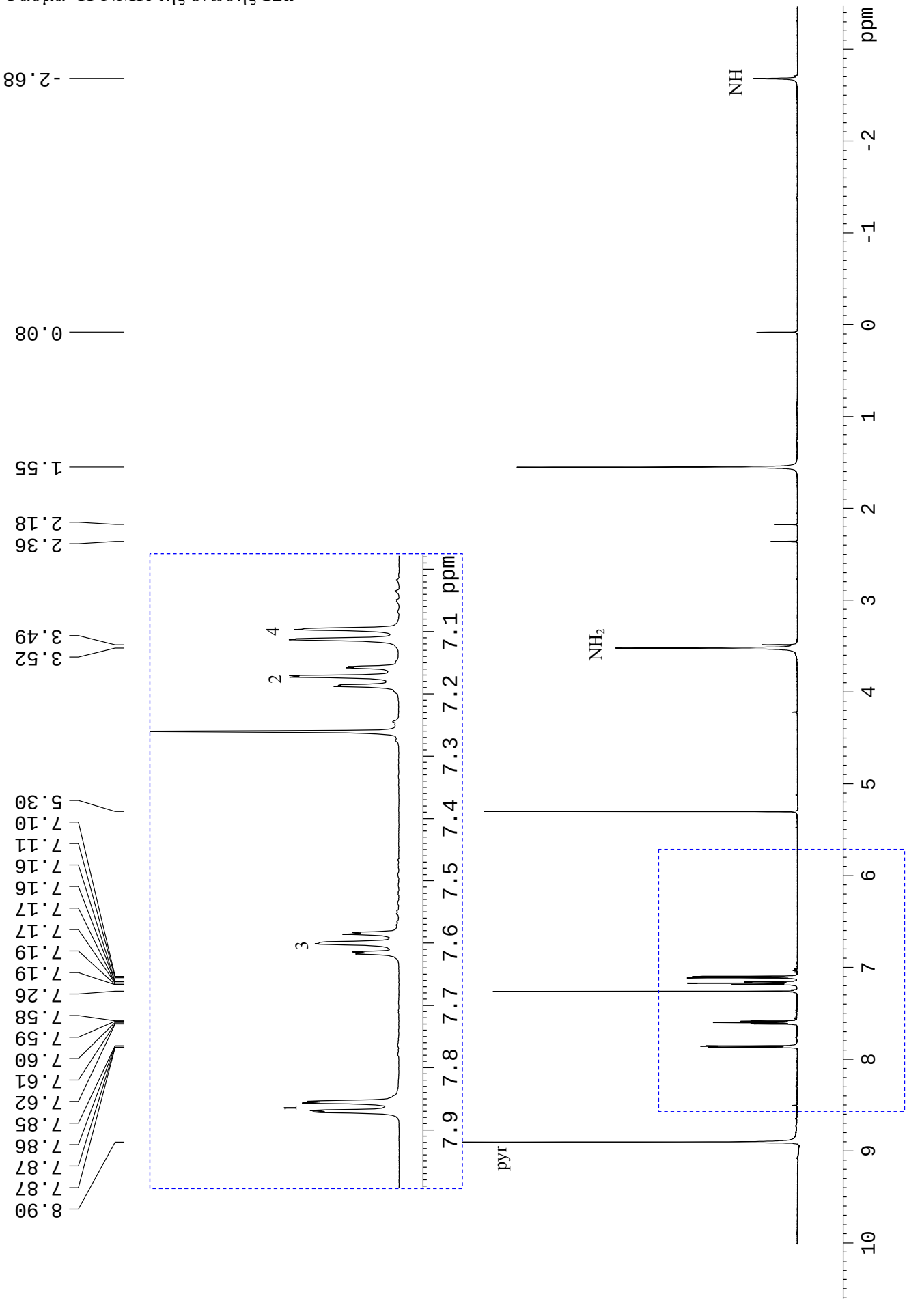
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **1**



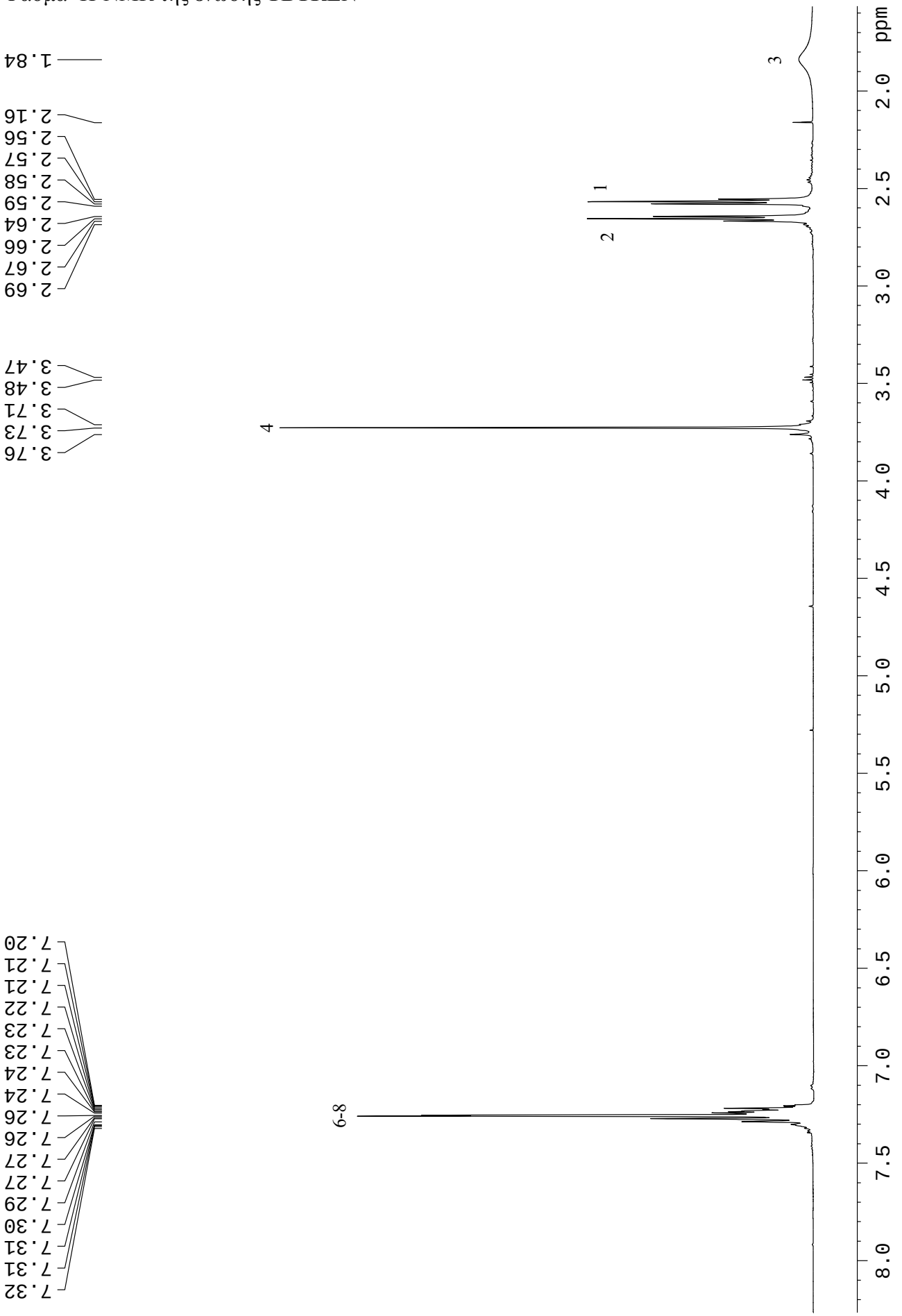
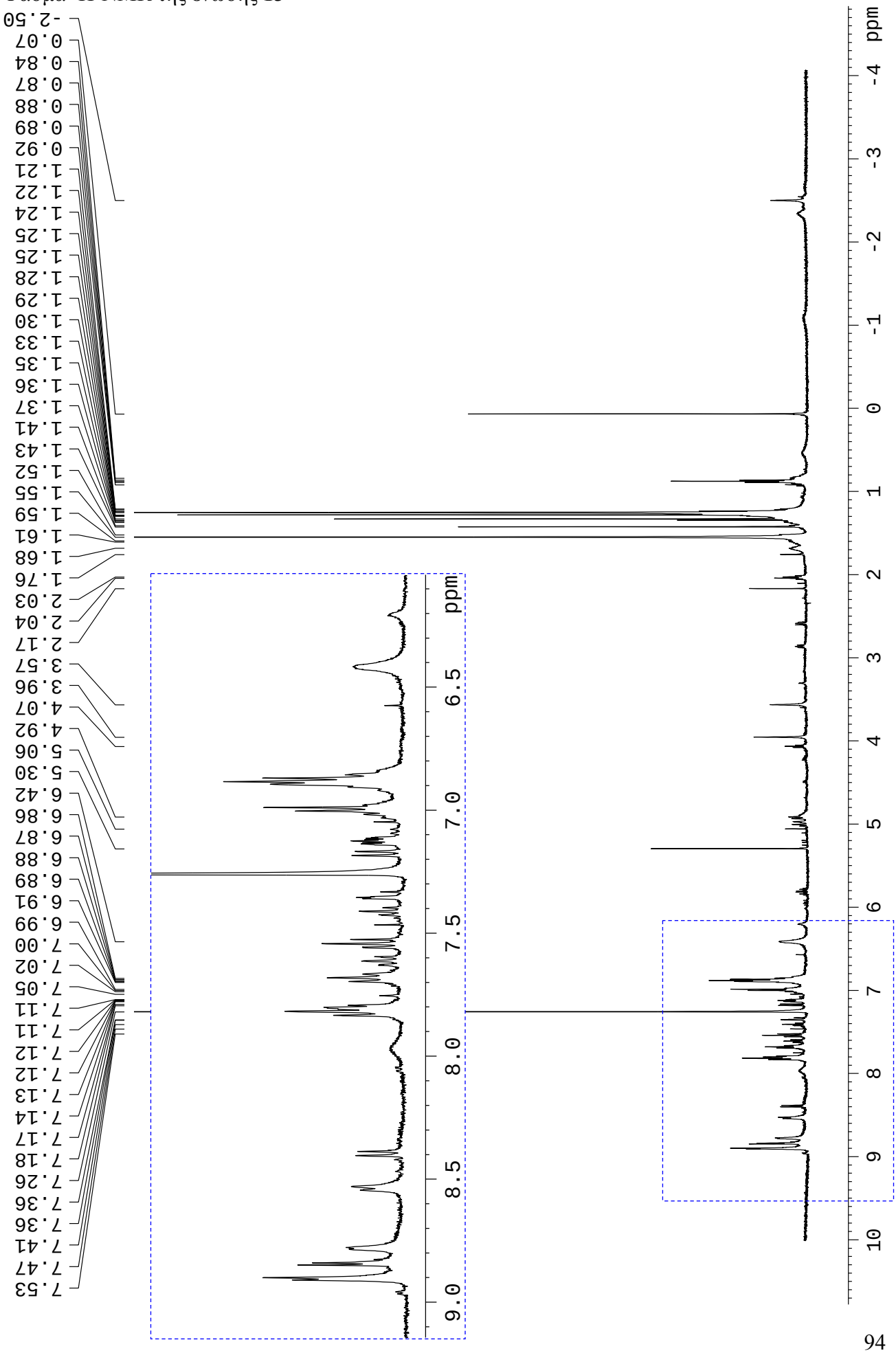
Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **12** μίγμα τεσσάρων ατροποϊσομερών



Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **12a**



Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **TBTREN**



Φάσμα ^{1}H-NMR της ένωσης **13**