

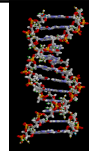
ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΒΙΟΜΟΡΙΑ

1

Βιομόρια που μελετώνται

- **DNA** (γραμμικό, πλασμιδιακό, κυκλικό)
- Πρωτεΐνες μεταφοράς (**αλβουμίνη**, τρανσφερίνη)
- Πρωτεΐνες που σχετίζονται με διάφορες ασθένειες (ως πιθανοί στόχοι) ή μονοπάτια δράσης (πιθανός μηχανισμός)

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ



Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (αντικατάσταση ευκίνητων ligands των συμπλόκων από **N** κάποιας βάσης του DNA)

Μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις (παρεμβολή, συναρμογή στις **αύλακες**, ηλεκτροστατικές **αλληλεπιδράσεις**)

Ρήξη (σπάσιμο κλώνων ή αλυσίδας)

3

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ

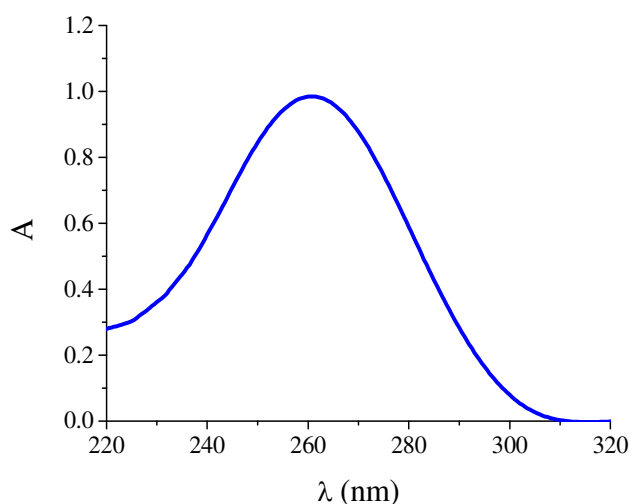


- **Φασματοσκοπία** υπεριώδους-ορατού (UV-vis)
- **Φασματοσκοπία** κυκλικού διχροϊσμού (CD)
- **Ιξωδομετρία**
- Κυκλική **βολταμμετρία**
- Προσδιορισμός της **θερμοκρασίας μετουσίωσης** του DNA
- **Ανταγωνιστική** δράση με ουσίες που έχουν γνωστό τρόπο δράσης με το DNA
- Ηλεκτροφόρηση
- **Molecular docking**

Φασματοφωτόμετρο UV-vis

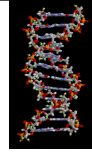


Φάσμα UV-vis διαλύματος DNA



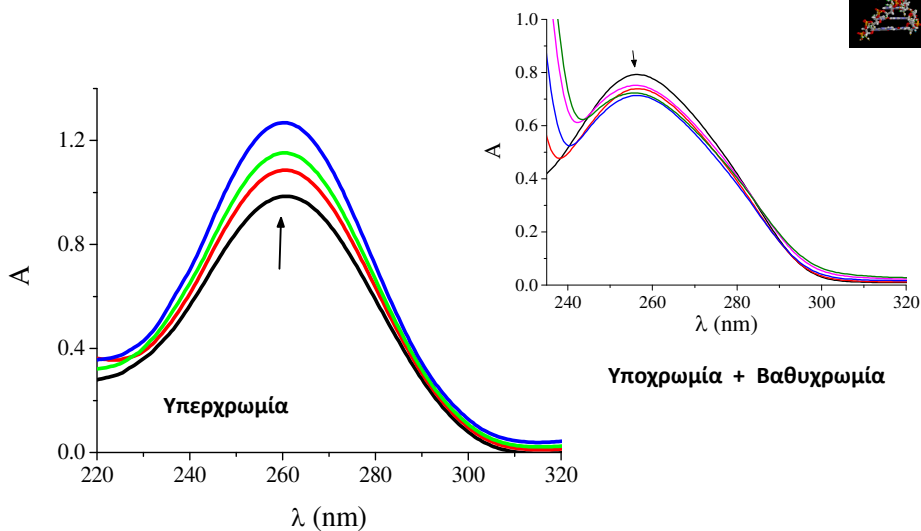
$\lambda_{\max} = 258-260 \text{ nm}, \quad \epsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
 $A = \epsilon C d \rightarrow C = A/(\epsilon d)$

Φασματοσκοπία UV

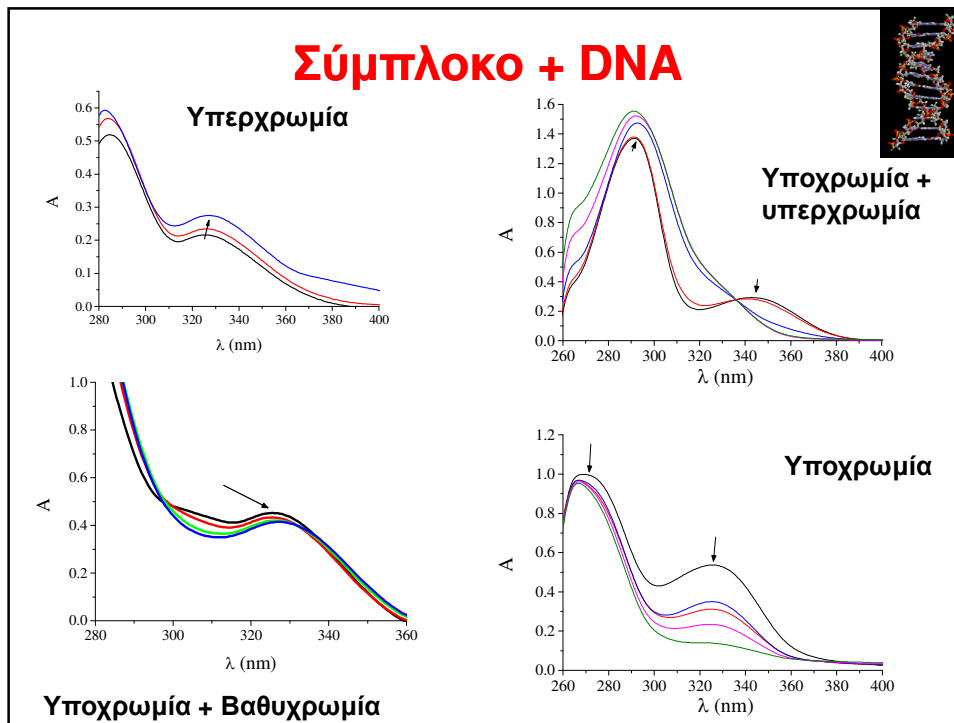


- **υπερχρωμία** (αύξηση της απορρόφησης) → ένδειξη **καταστροφής δεσμών** υδρογόνου μεταξύ των βάσεων (της δευτεροταγούς δομής DNA)
- **υποχρωμία** → **παρεμβολή**
- η μετατόπιση του λ_{\max} προς μεγαλύτερα λ (**βαθυχρωμία** ή **ερυθρή μετατόπιση, red-shift**) → **σταθεροποίηση** ελικοειδούς δομής DNA.
- η μετατόπιση του λ_{\max} μικρότερα λ (**υψιχρωμία** ή **κυανή μετατόπιση, blue-shift**) **αποσταθεροποίηση** της έλικας του DNA

DNA + ένωση



Οι μεταβολές της ταινίας του DNA είναι ένδειξη αλληλεπίδρασης

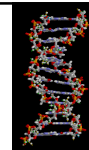


Εξίσωση Wolfe-Shimer

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

- [DNA] = συγκέντρωση διαλύματος DNA για κάθε μέτρηση
- $\epsilon_A = A/[\text{ένωση}]$ για κάθε μέτρηση
- ϵ_f = συντελεστής μοριακής απορρόφησης ελεύθερης ένωσης
- ϵ_b = συντελεστής μοριακής απορρόφησης πλήρως δεσμευμένης ένωσης
- K_b (M^{-1}) = σταθερά σύνδεσης στο DNA

Σταθερά σύνδεσης στο DNA (K_b)

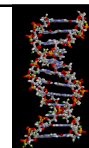


• Εξίσωση Wolfe-Shimer

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

- K_b (M^{-1}): Από λόγο της τεταγμένης επί της αρχής προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων σε διαγράμματα του $\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)}$ σε συνάρτηση με $[\text{DNA}]$

Παράδειγμα υπολογισμού

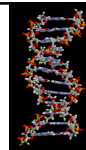


- $[\text{ΣΥΜΠΛΟΚΟ}] = 5 \times 10^{-5} M$, $\lambda_{\text{max}} = 327 \text{ nm}$

A (327 nm)	ϵ_A	$(\epsilon_A - \epsilon_f)$	[DNA]	$[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_f)$
0.692	13840		0	
0.445	8900	-4.94×10^3	1.34×10^{-6}	-2.71×10^{-10}
0.193	3860	-9.98×10^3	5.19×10^{-6}	-5.20×10^{-10}
0.08	1600	-1.22×10^4	6.43×10^{-6}	-5.25×10^{-10}
0.066	1320	-1.25×10^4	8.83×10^{-6}	-7.05×10^{-10}
0.075	1500	-1.23×10^4	1.11×10^{-5}	-9.03×10^{-10}
0.101	2020	-1.18×10^4	1.34×10^{-5}	-1.13×10^{-9}
0.116	2320	-1.15×10^4	1.55×10^{-5}	-1.35×10^{-9}
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ				

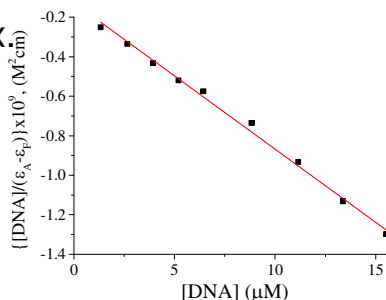
A. Tarushi, et al, J. Inorg. Biochem., 2017, 170, 85

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ K_b



- Η εξίσωση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων στο σχήμα βρέθηκε ίση με:
- $y = -1,27 \cdot 10^{-10} - 7,41 \cdot 10^{-5} \cdot x$

$$\frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)} = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

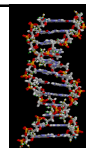


- Στην εξίσωση, $y = \frac{[\text{DNA}]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)}$ και $x = [\text{DNA}]$,

$$\rightarrow \frac{1}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} = -7,41 \times 10^{-5} \quad \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} = -1,27 \times 10^{-11}$$

$$\rightarrow K_b = 5.85 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$$

Συγκεντρωτικός πίνακας



	Band ($\Delta A/A_0^\alpha$, $\Delta \lambda^\beta$)	K_b (M^{-1})
$[\text{Zn}(\text{difl})_2(\text{MeOH})_4]$, 1	310(sh) (-15, +2)	$4.97(\pm 0.13) \times 10^4$
$[\text{Zn}(\text{difl})_2(\text{bipyam})]$, 2	319 (-6.8, -3)	$3.72(\pm 0.16) \times 10^4$
$[\text{Zn}(\text{difl})_2(\text{bipy})]$, 3	312 (-5.0, 0)	$3.53(\pm 0.22) \times 10^5$
$[\text{Zn}(\text{difl})_2(\text{phen})]$, 4	318 (-9.5, 0)	$3.88(\pm 0.18) \times 10^5$
$[\text{Zn}(\text{difl})_2(\text{Hrko})_2]$, 5	328 (-12.0, 0)	$5.85(\pm 0.11) \times 10^5$

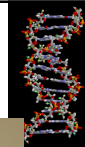
α "+" υπερχρωμία, "-" υποχρωμία
 β "+" red-shift, "-" blue-shift

A. Tarushi, et al, J. Inorg. Biochem., 2017, 170, 85

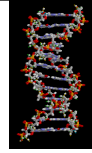
Ιξωδόμετρο



Ιξωδόμετρο για DNA



ΙΞΩΔΟΜΕΤΡΙΑ ΚΑΙ DNA



- Μέτρηση του ιξώδους
- Υδροδυναμική μέτρηση
- Ευαίσθητη στην αύξηση του μήκους του DNA

$$L/L_0 = (\eta/\eta_0)^{1/3}$$

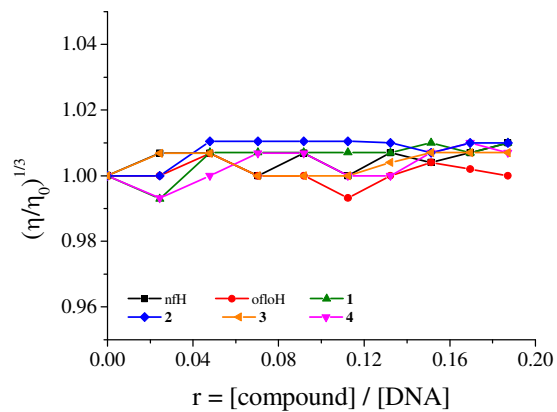
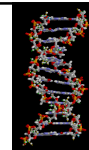
- Αρκετά αξιόπιστη μέθοδος για εξακρίβωση τρόπου σύνδεσης

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΙΞΩΔΟΜΕΤΡΙΑΣ



- **Παρεμβολή** στο DNA → το DNA επιμηκύνεται → το ιξώδες **αυξάνεται**.
- **Ηλεκτροστατική** σύνδεση με το DNA → καμιά επίδραση στο μήκος του DNA → **καμιά μεταβολή** στο ιξώδες.
- **Ρήξη** του DNA → το DNA κονταίνει → το ιξώδες **μειώνεται**.

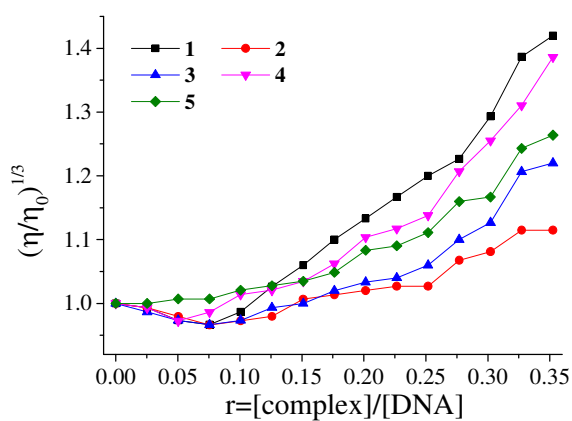
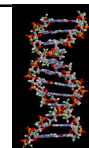
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΙΞΩΔΟΜΕΤΡΙΑΣ



Το ιξώδες παραμένει πρακτικά αμετάβλητο → όχι παρεμβολή

P. Zivec, etal, J. Inorg. Biochem., 2012, 117, 35

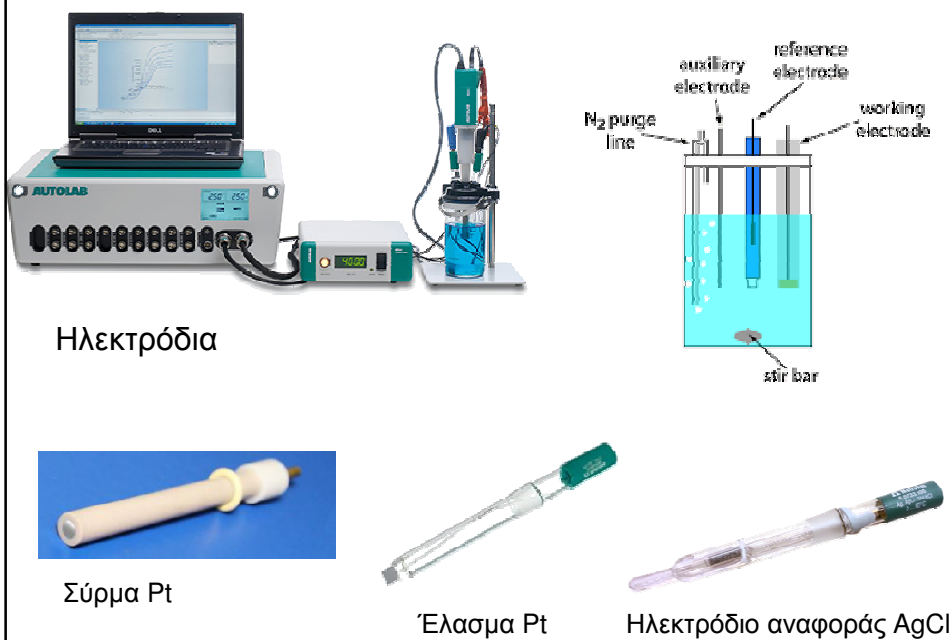
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΙΞΩΔΟΜΕΤΡΙΑΣ



Το ιξώδες αυξάνεται σημαντικά → παρεμβολή

A. Tarushi, etal, J. Inorg. Biochem., 2017, 170, 85

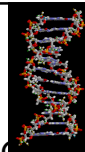
Διάταξη κυκλικής βολταμμετρίας



Διάταξη κυκλικής βολταμμετρίας

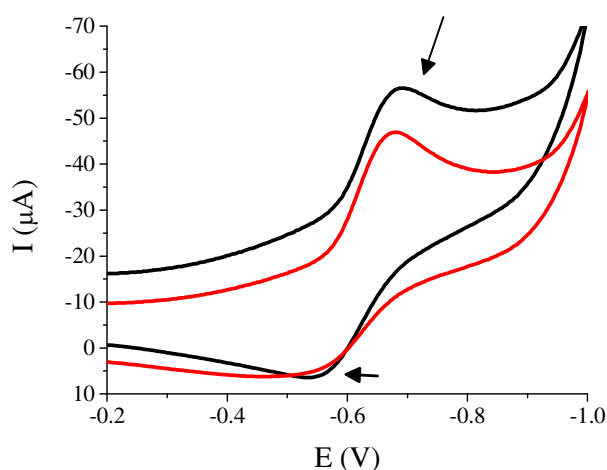
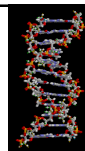


Κυκλική βολταμμετρία και DNA



- συμπληρωματικά στις φασματοσκοπικές μεθόδους
- πληροφορίες για οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή του μετάλλου.
- Μετατόπιση δυναμικού προς **θετικότερες** τιμές → αλληλεπίδραση μετάλλου ή συμπλόκου μέσω **παρεμβολής**
- Μετατόπιση δυναμικού προς **αρνητικότερες** τιμές → ύπαρξη **ηλεκτροστατικών** αλληλεπιδράσεων
- Θετική μετατόπιση κάποιου δυναμικού και αρνητική μετατόπιση κάποιου άλλου → αλληλεπίδραση μετάλλου ή συμπλόκου με το DNA με **δύο** τρόπους: μέσω παρεμβολής και ηλεκτροστατικά.

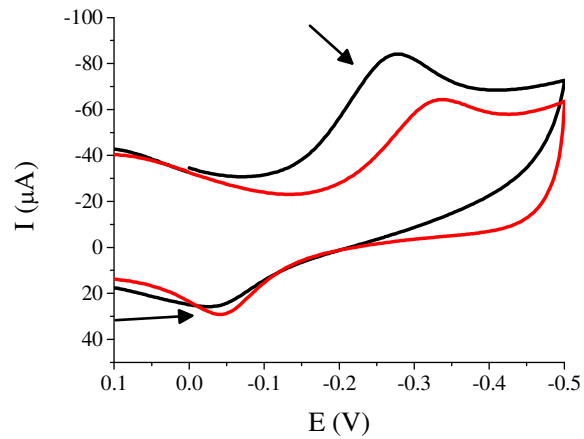
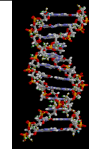
ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ ΣΤΟ DNA



Σύμπλοκο Ni(II) Οξειδοαναγωγικό ζεύγος : $[Ni(II)] \rightleftharpoons [Ni(I)]$

K.C. Skyrianou, J. Inorg. Biochem., 2010, 104, 740

ΗΛΕΚΤΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ DNA



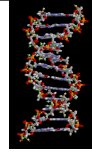
Σύμπλοκο Cu(II) Οξειδοαναγωγικό ζεύγος : $[Cu(II)] \rightleftharpoons [Cu(I)]$

P. Zivec, et al, J. Inorg. Biochem., 2012, 117, 35

Διάταξη



ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗ DNA (DENATURATION)



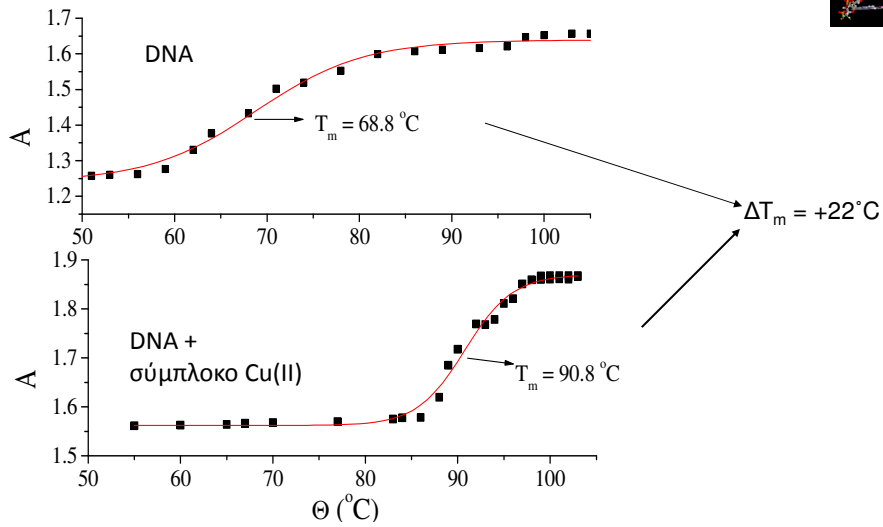
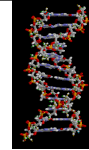
- οι δύο κλώνοι της έλικας του DNA **αλλάζουν δομή** στο χώρο αποκτώντας τυχαία διάταξη
- θέρμανση - ελάττωση της διηλεκτρικής σταθεράς του υδατικού περιβάλλοντος - ακραίες τιμές pH
- **Αντιστρεπτή διαδικασία** - απομάκρυνση του αιτίου → επανασυσπείρωση της έλικας (annealing) ή επαναδιάταξη (renaturation)

Θερμοκρασία μετουσίωσης του DNA (T_m)



- Μέτρο σταθερότητας δομής
- η θερμοκρασία όπου σπάζουν οι δεσμοί H μεταξύ των ζευγών βάσεων DNA → οι αλυσίδες διαχωρίζονται → στο διάλυμα ως δύο εντελώς ανεξάρτητα μόρια.
- Η **παρεμβολή** στις νουκλεοβάσεις σταθεροποιεί τη διπλή έλικα, **αυξάνοντας** το T_m .
- Όσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση της T_m , τόσο μεγαλύτερη είναι η παρεμβολή.

ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ και T_m



J. Inorg. Biochem., 2007, 101, 64

Φασματοσκοπία κυκλικού διχροϊσμού

Για διάγνωση μεταβολών στη
μορφολογία του DNA

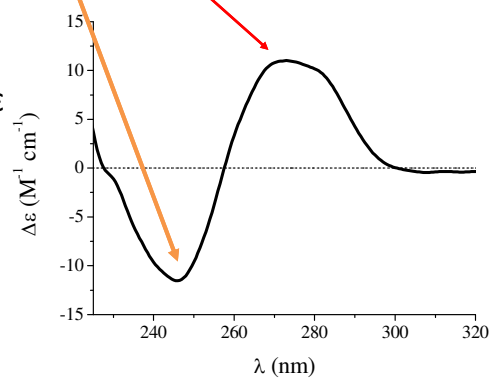
Φασματοφωτόμετρο CD



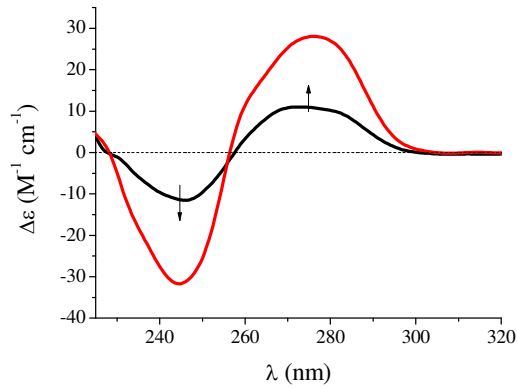
Φάσμα CD του DNA

- **Θετική ταινία**, $\lambda_{\max} = 275$ nm χαρακτηριστική της δεξιόστροφης έλικας
- **Αρνητική ταινία**, $\lambda_{\max} = 248$ nm, **π - π αλληλεπιδράσεις** μεταξύ των βάσεων

Ένταση και θέση κάθε ταινίας ευαίσθητες κατά την αλληλεπίδραση με μία χημική ένωση παρουσιάζουν **μεταβολές χαρακτηριστικές** του τρόπου αλληλεπίδρασης



Παρεμβολή και CD

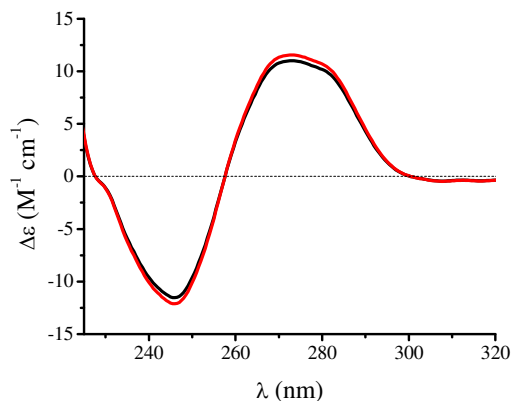


- Κατά τη συναρμογή μέσω παρεμβολής
- **αύξηση στην ένταση** των δύο ταινιών του DNA καθώς σταθεροποιείται η **δεξιόστροφη B-**διαμόρφωση και αυξάνονται οι **π-π αλληλεπιδράσεις**

Εξωτερική αλληλεπίδραση

Δεν παρατηρείται κάποια **σημαντική μεταβολή** στην καμπύλη του DNA, τότε

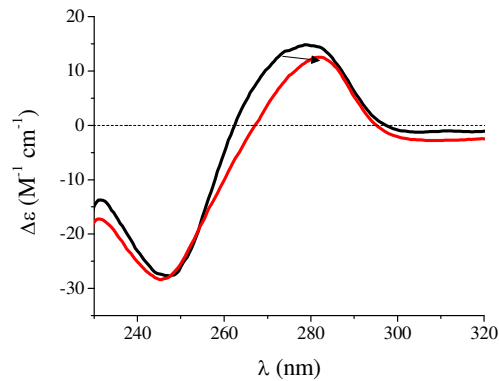
- Συναρμογή στην αύλακα ή
- Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις



Μεταβολή ελικότητας

- Θετική ταινία: προς μεγαλύτερα λ
- χαρακτηριστική μεταβολή της ελικότητας

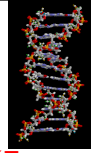
Μετάπτωση B- \rightarrow A-μορφή



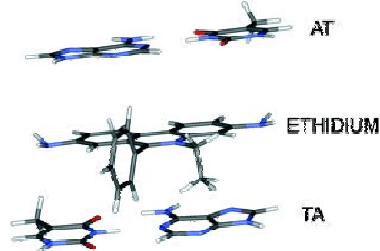
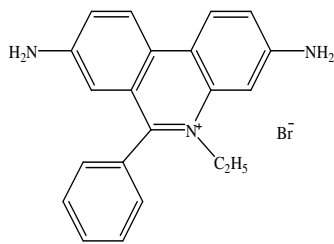
Ανταγωνιστική δράση με ενώσεις που συνδέονται στο DNA με γνωστό τρόπο

Η ένωση παρουσιάζει παραπλήσια K_b με την ένωση αναφοράς

Αιθίδιο βρωμίδιο - EB



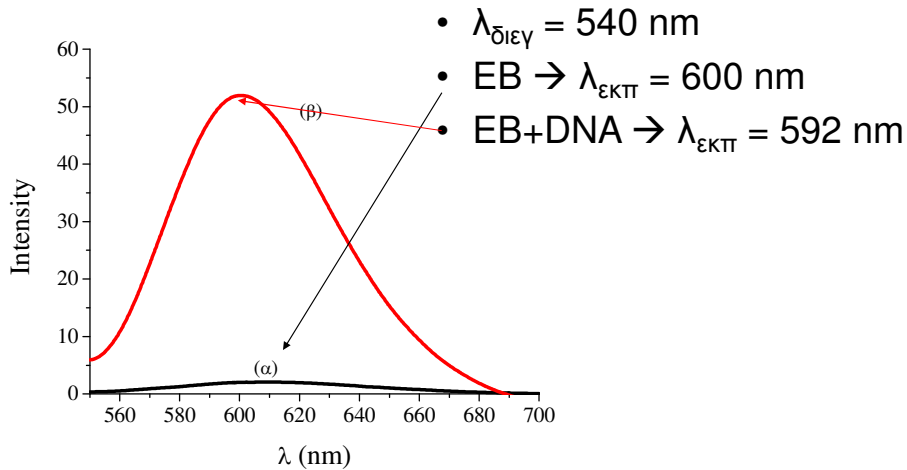
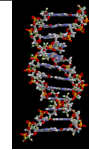
- **EB** (ethidium bromide, 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide) είναι ένα **φθορίζον** μόριο, μία φαινανθριδίνη με φθορίζουσες ιδιότητες, που μπορεί να σχηματίζει ευδιάλυτα σύμπλοκα με νουκλεϊκά οξέα.
- Το EB συνδέεται με το DNA με **παρεμβολή** του επίπεδου δακτυλίου της φαινανθριδίνης μεταξύ δύο γειτονικών βάσεων της διπλής έλικας του DNA



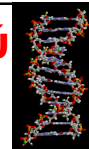
Φασματοφωτόμετρο φθορισμού



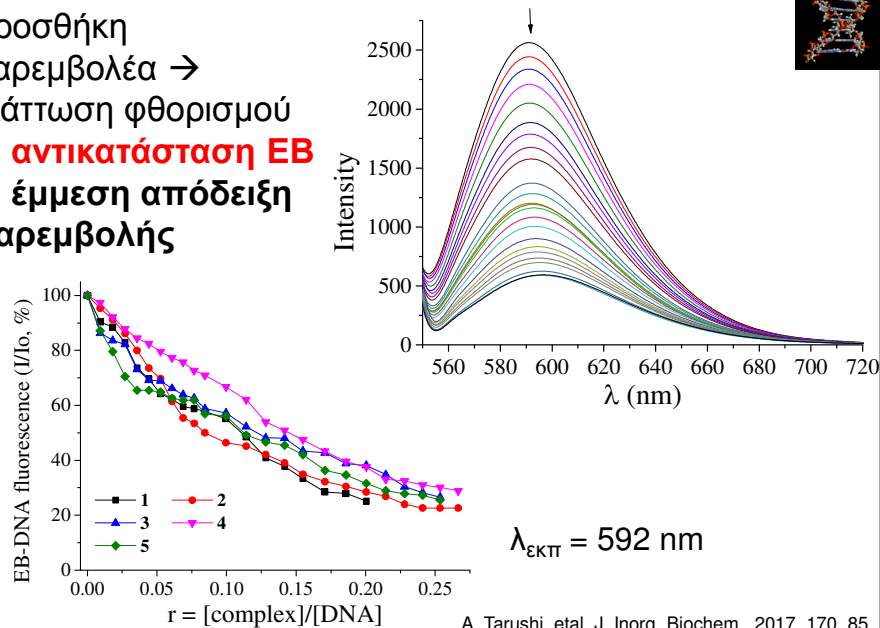
Ανταγωνιστική δράση EB με φασματοσκοπία φθορισμού



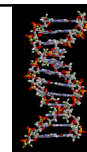
Κινητική με φασματοσκοπία φθορισμού



- Προσθήκη παρεμβολέα \rightarrow ελάττωση φθορισμού \rightarrow αντικατάσταση EB \rightarrow έμμεση απόδειξη παρεμβολής



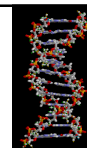
ΕΞΙΣΩΣΗ STERN-VOLMER



$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

- I_0 = αρχικός φθορισμός του EB-DNA
- I = φθορισμός του EB-DNA μετά την προσθήκη της ένωσης
- $[Q]$ = συγκέντρωση ένωσης (Quencher)
- τ_0 = ημιζωή φθορισμού (lifetime) του EB-DNA = 23 ns
- K_{SV} (σε M^{-1}) = σταθερά Stern-Volmer
- k_q (σε $M^{-1}s^{-1}$) = σταθερά απόσβεσης φθορισμού (quenching)
- K_{SV} από κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων

Παράδειγμα υπολογισμού



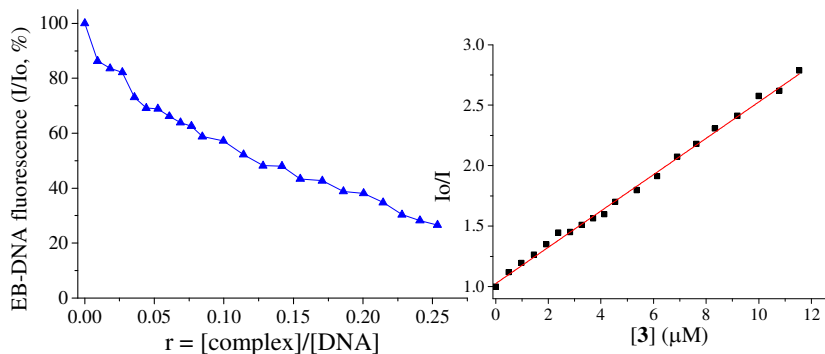
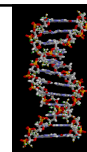
- $[DNA] = 5.4 \times 10^{-5} M$, $I_0 = 7300$

[Comp]f	I_{592}	r	%/I ₀	[comp]	I ₀ /I
0	7300	0.000	100.00	0	1.000
4.95x10 ⁻⁷	6300	0.009	86.30	4.95x10 ⁻⁷	1.159
9.804x10 ⁻⁷	6105	0.018	83.63	9.804x10 ⁻⁷	1.196
1.456x10 ⁻⁶	6001	0.027	82.21	1.456x10 ⁻⁶	1.216
1.923x10 ⁻⁶	5334	0.036	73.07	1.923x10 ⁻⁶	1.369
2.381x10 ⁻⁶	5051	0.044	69.19	2.381x10 ⁻⁶	1.445
2.83x10 ⁻⁶	5030	0.053	68.90	2.83x10 ⁻⁶	1.451
3.271x10 ⁻⁶	4832	0.061	66.19	3.271x10 ⁻⁶	1.511
3.704x10 ⁻⁶	4665	0.069	63.90	3.704x10 ⁻⁶	1.565
4.128x10 ⁻⁶	4569	0.077	62.59	4.128x10 ⁻⁶	1.598
4.545x10 ⁻⁶	4294	0.084	58.82	4.545x10 ⁻⁶	1.700
5.357x10 ⁻⁶	4177	0.100	57.22	5.357x10 ⁻⁶	1.748
6.14x10 ⁻⁶	3815	0.114	52.26	6.14x10 ⁻⁶	1.913

6.897x10 ⁻⁶	3519	0.128	48.21	6.897x10 ⁻⁶	2.074
7.627x10 ⁻⁶	3509	0.142	48.07	7.627x10 ⁻⁶	2.080
8.333x10 ⁻⁶	3164	0.155	43.34	8.333x10 ⁻⁶	2.307
9.184x10 ⁻⁶	3118	0.171	42.71	9.184x10 ⁻⁶	2.341
1x10 ⁻⁵	2833	0.186	38.81	1x10 ⁻⁵	2.577
1.078x10 ⁻⁵	2786	0.200	38.16	1.078x10 ⁻⁵	2.620
1.154x10 ⁻⁵	2541	0.214	34.81	1.154x10 ⁻⁵	2.873
1.23x10 ⁻⁵	2218	0.228	30.38	1.23x10 ⁻⁵	3.291
1.30x10 ⁻⁵	2061	0.241	28.23	1.30x10 ⁻⁵	3.542
1.36x10 ⁻⁵	1940	0.253	26.58	1.36x10 ⁻⁵	3.763
		100 % - r		Stern-Volmer	

A. Tarushi, etal, J. Inorg. Biochem., 2017, 170, 85

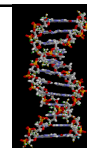
Διαγράμματα - Αποτελέσματα



$\Delta I/I_0$ (%)	73.4
K_{SV} (M^{-1})	$1.50(\pm 0.04) \times 10^5$
k_q ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$6.53(\pm 0.15) \times 10^{12}$

A. Tarushi, et al, J. Inorg. Biochem., 2017, 170, 85

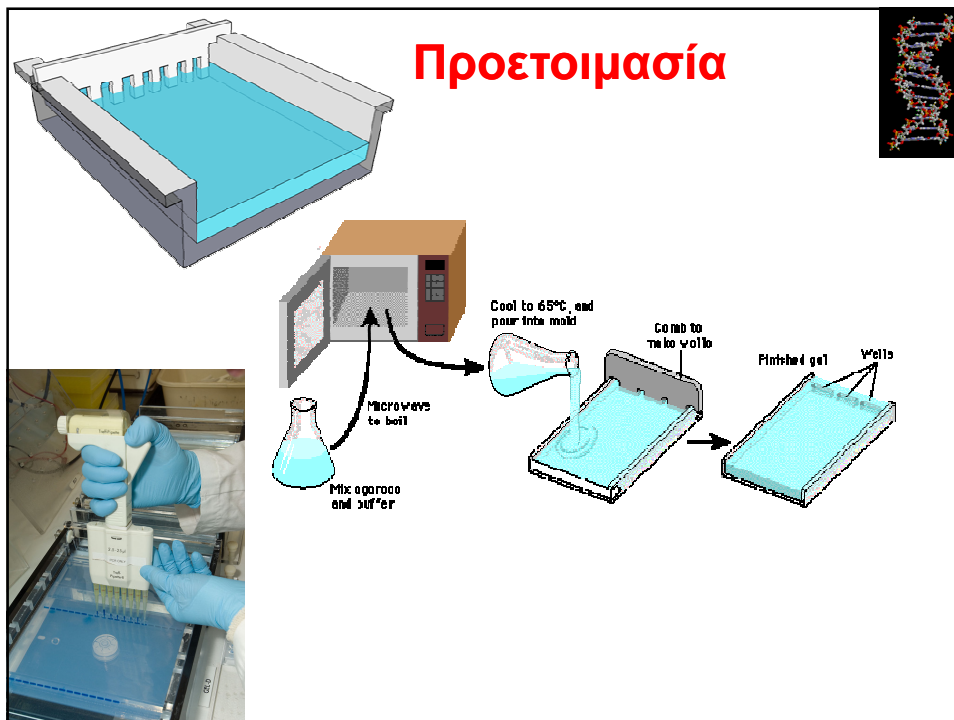
Συγκεντρωτικός πίνακας

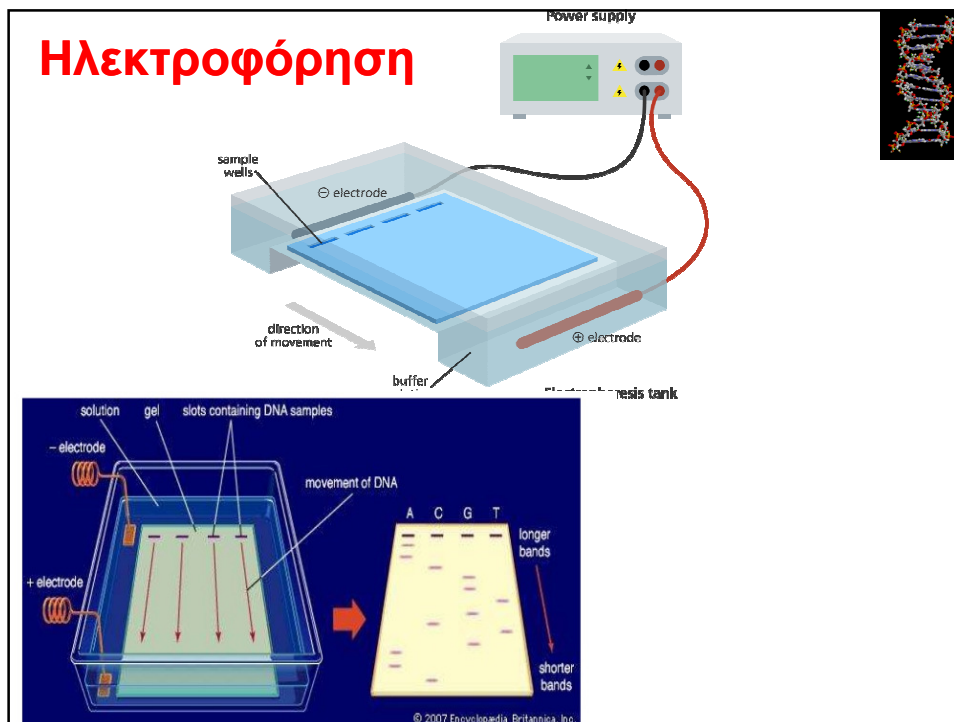


Complexes	$\Delta I/I_0$ (%)	K_{SV} (M^{-1})	k_q ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Hdifl	65.0	$8.59(\pm 0.35) \times 10^5$	$3.73(\pm 0.15) \times 10^{13}$
$[\text{Zn}(\text{difl})_2(\text{MeOH})_4]$, 1	74.9	$1.08(\pm 0.03) \times 10^5$	$4.69(\pm 0.11) \times 10^{12}$
$[\text{Zn}(\text{difl})_2(\text{bipyam})]$, 2	77.3	$5.16(\pm 0.14) \times 10^5$	$2.24(\pm 0.06) \times 10^{13}$
$[\text{Zn}(\text{difl})_2(\text{bipy})]$, 3	73.4	$1.50(\pm 0.04) \times 10^5$	$6.53(\pm 0.15) \times 10^{12}$
$[\text{Zn}(\text{difl})_2(\text{phen})]$, 4	71.1	$6.98(\pm 0.23) \times 10^4$	$3.04(\pm 0.10) \times 10^{12}$
$[\text{Zn}(\text{difl})_2(\text{Hpko})_2]$, 5	74.5	$2.10(\pm 0.05) \times 10^5$	$9.12(\pm 0.20) \times 10^{12}$

A. Tarushi, et al, J. Inorg. Biochem., 2017, 170, 85

Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης

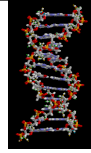
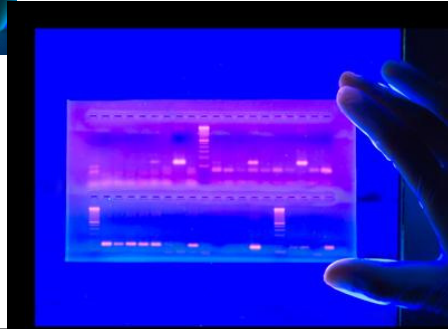
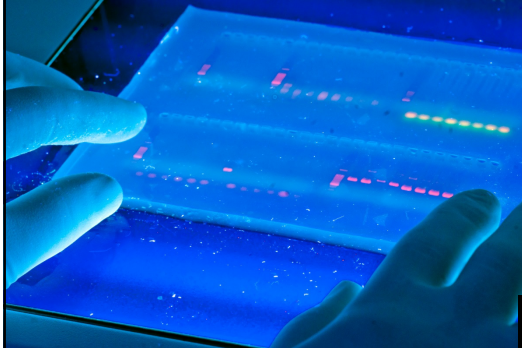




ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

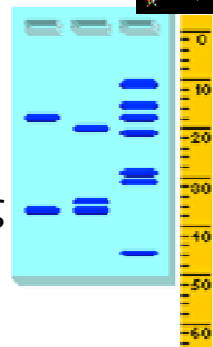
- **Agarose gel electrophoresis**
- Μελέτη της κινητικότητας του DNA, όταν αυτό έχει επωαστεί με τη χημική ένωση
- εφαρμογή διαφοράς δυναμικού κατά μήκος πηκτής αγαρόζης
- **μικρότερα θραύσματα διανύουν μεγαλύτερη απόσταση** κατά μήκος της πηκτής σε σχέση με το αρχικό DNA

Εμφάνιση



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

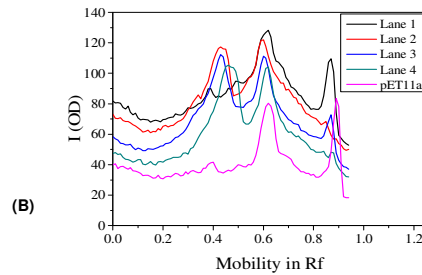
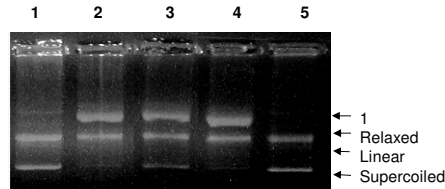
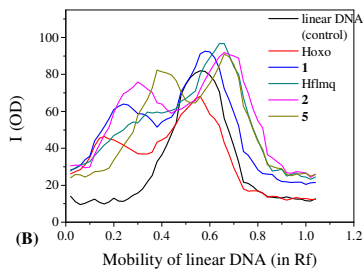
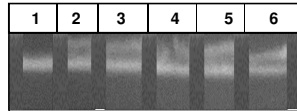
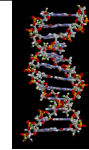
- μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση, και κυρίως κατά την **παρεμβολή** → αυξάνει το μέγεθος του DNA λόγω της συσσωμάτωσης → δεν εμφανίζει κινητικότητα, αλλά παρατηρείται **κατακρήμνιση στην αρχή** της διαδρομής
- **ρήξη** του DNA → προκύπτουν **θραύσματα** μικρότερου μεγέθους που κινούνται ταχύτερα από το DNA με αποτέλεσμα να διανύουν μεγαλύτερη διαδρομή.



Αποτελέσματα

Γραμμικό DNA

Coiled DNA

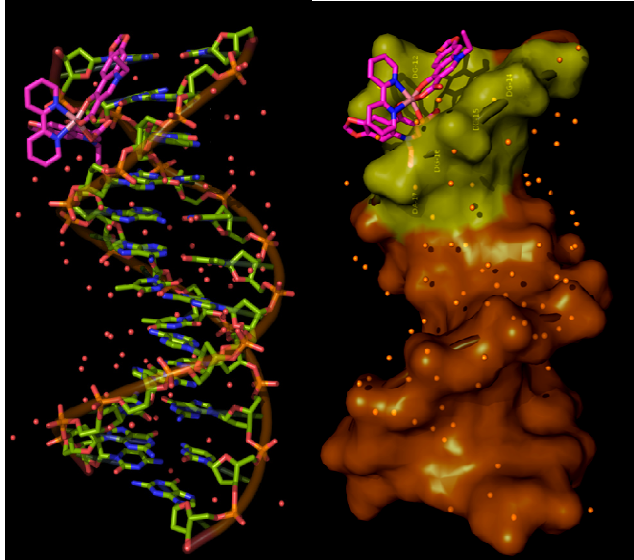


A. Tarushi, etal, J. Inorg. Biochem., 2013, 121, 53

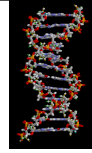
Molecular docking

Εύρεση τρόπου αλληλεπίδρασης και περιοχής σύνδεσης στο DNA με τη βοήθεια θεωρητικών υπολογισμών

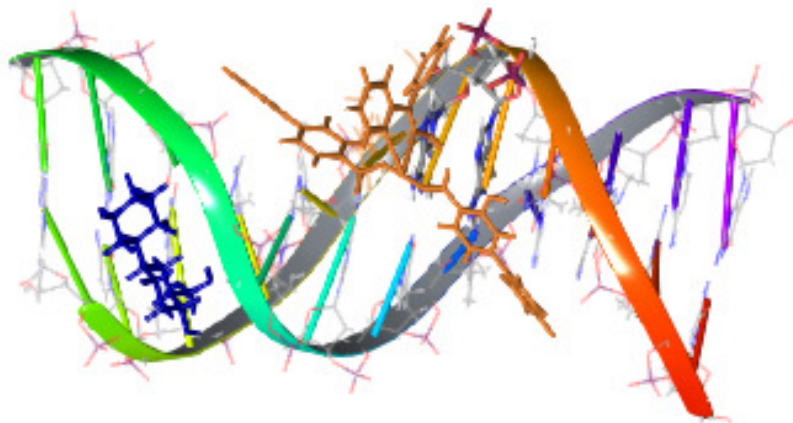
Molecular docking



E. Irgi, etal, RSC. Adv., 2015, 5, 36353



Molecular docking



A. Tarushi, etal, J. Inorg. Biochem., 2017, 170, 85

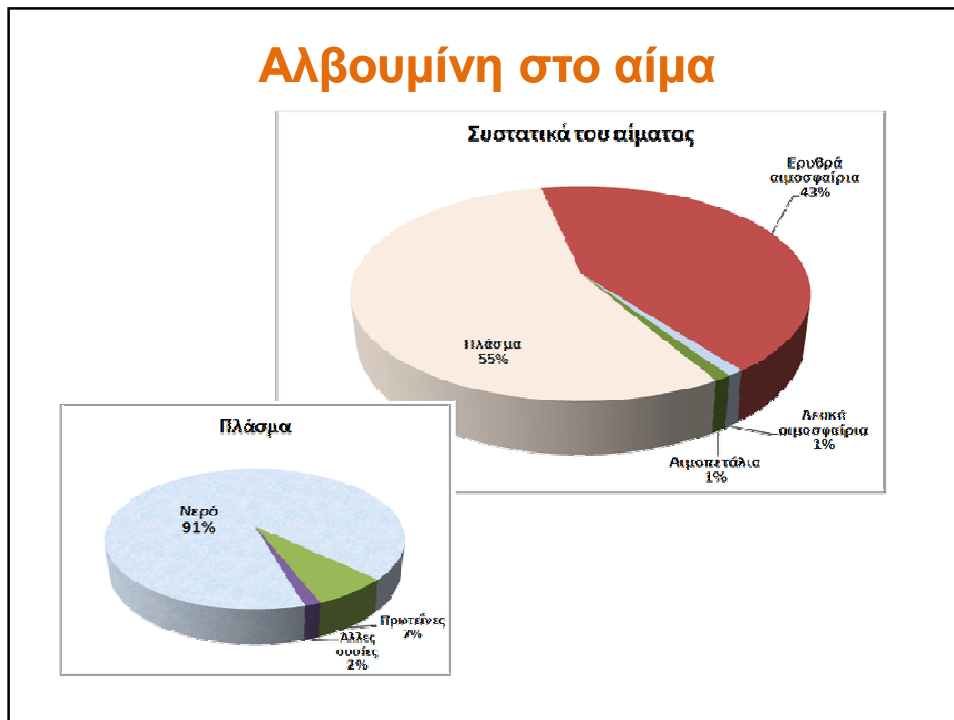


ΜΕΛΕΤΗ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΑΛΒΟΥΜΙΝΕΣ ΟΡΟΥ

Αλβουμίνη (Λευκωματίνη)

- Η σημαντικότερη πρωτεΐνη του πλάσματος
- Συντίθεται στο ήπαρ.
- Εισέρχεται στην κυκλοφορία διαμέσου της ηπατικής φλέβας, ελεύθερα στον εξωαγγειακό χώρο και επανέρχεται στην κυκλοφορία διαμέσου των λεμφικών αγγείων.
- Το περιεχόμενο της αλβουμίνης στο σύνολο του λευκώματος είναι περίπου 60% της συνολικής πρωτεΐνης. Η διάρκεια ζωής της στον ορό του αίματος είναι 17 μέρες.

Αλβουμίνη στο αίμα



Ρόλος Αλβουμίνης

Συμμετέχει σε σημαντικές λειτουργίες οργανισμού.

- **Μεταφορέας** πολλών μικρών μορίων: Δεσμεύει-μεταφέρει ουσίες (π.χ. ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, μεταλλικά ιόντα, αμινοξέα, φάρμακα, ορμόνες) + απαραίτητη για μεταβολισμό τους και αποτοξίνωση
- **Διατήρηση της οσμωτικής πίεσης**: διανομή των σωματικών υγρών μεταξύ των ενδοαγγειακών τμημάτων και των ιστών του σώματος, αποτρέπει τη διαρροή υγρών από τα αιμοφόρα αγγεία

Δράσεις της αλβουμίνης

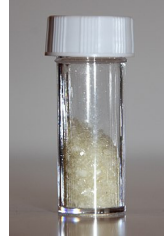
- Διατήρηση της οσμωτικής πίεσης
- Διατήρηση της ενδοαγγειακής πίεσης
- Συνοχή μικρών αγγείων
- Αντιπηκτική δράση
- Ισορροπία οξέων-βάσεων
- Αντιοξειδωτική δράση
- Μεταφορά φαρμάκων
- Μεταφορά ιόντων, λιπαρών οξέων, ορμονών

Μειωμένα επίπεδα αλβουμίνης

- Ηπατική δυσλειτουργία ή ανεπάρκεια
- Υποσιτισμός
- Γαστρεντεροπάθεια με απώλεια λευκωμάτων (protein-losing enteropathy και νόσος Menetrier)
- Νεφρωσικό σύνδρομο
- Χρόνιες συστηματικές φλεγμονές
- Ορμονικές διαταραχές

Είδη αλβουμινών

- Bovine serum albumin (BSA)



- Human serum albumin (HSA)

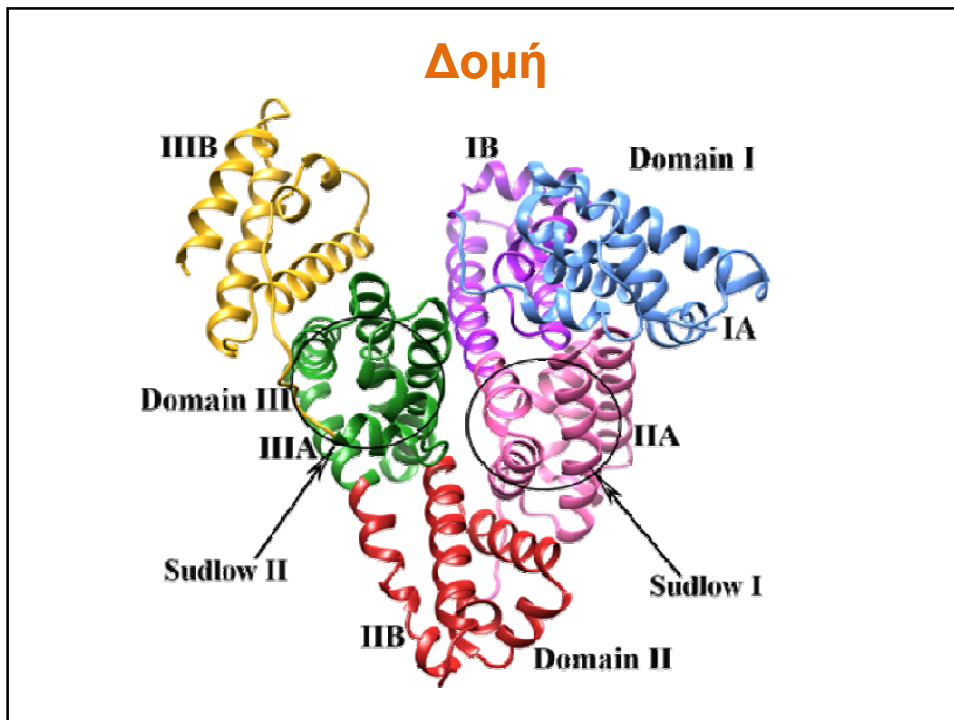


- Egg serum albumin

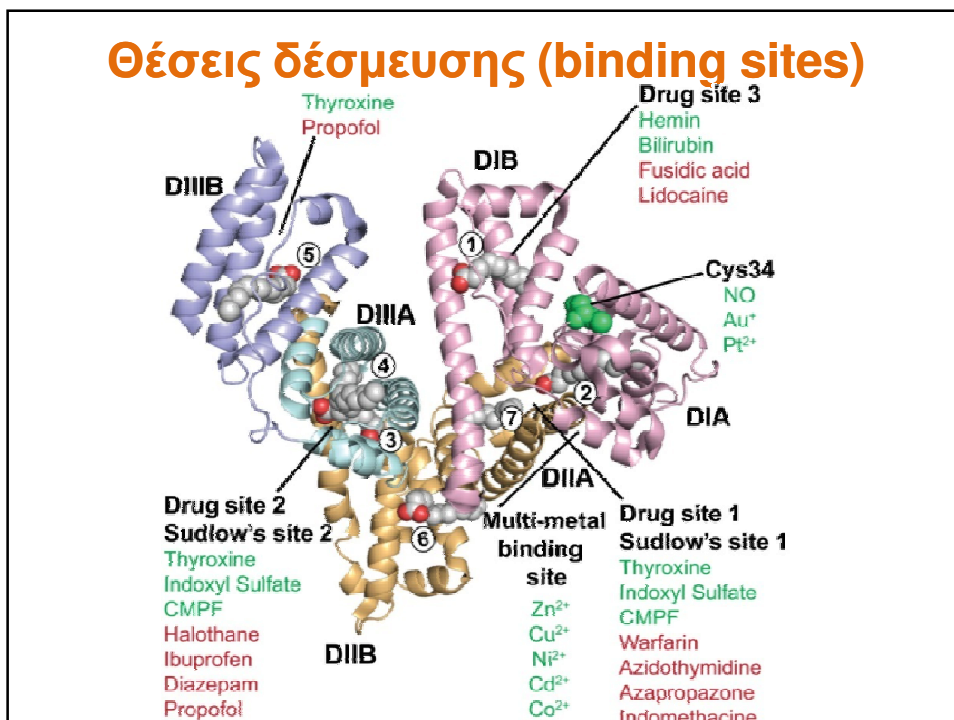
BSA - HSA

- Δομικά είναι ομόλογες
- Διαφέρουν ως προς τη θέση και τον αριθμό κάποιων αμινοξέων
- BSA: δύο τρυπτοφάνες στις θέσεις 134 και 212, **Trp-134 & Trp-212**
- HSA: μία τρυπτοφάνη στη θέση 214, **Trp-214**

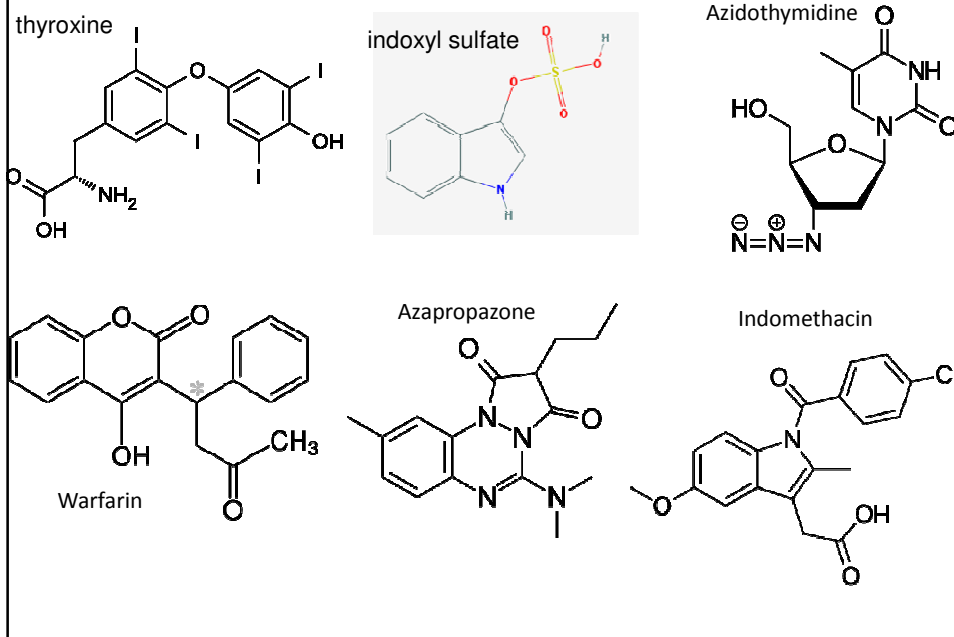
Δομή



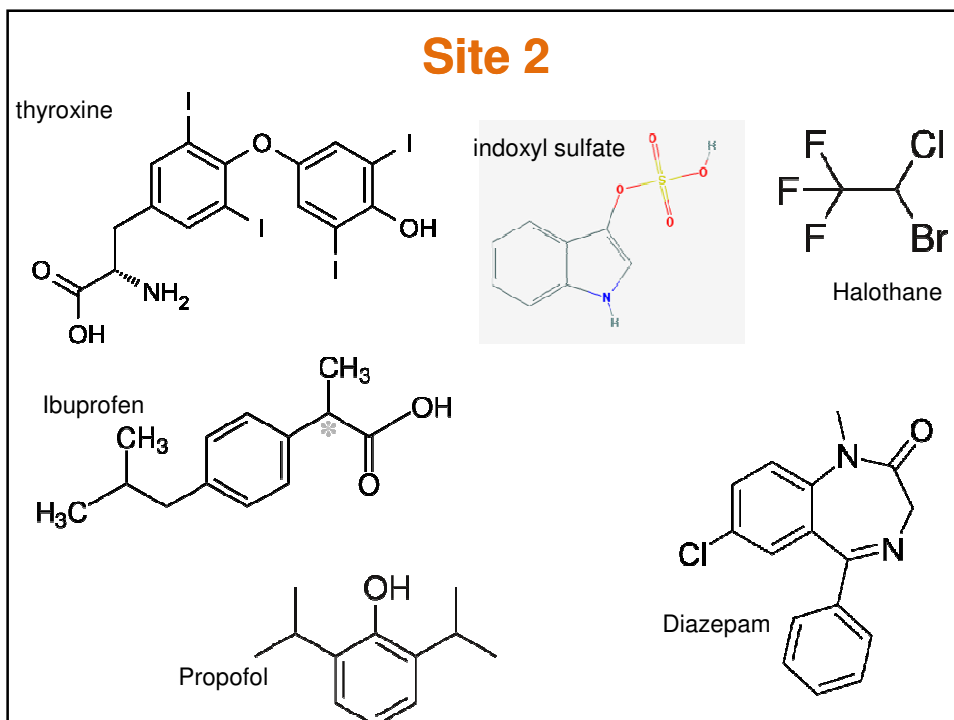
Θέσεις δέσμευσης (binding sites)



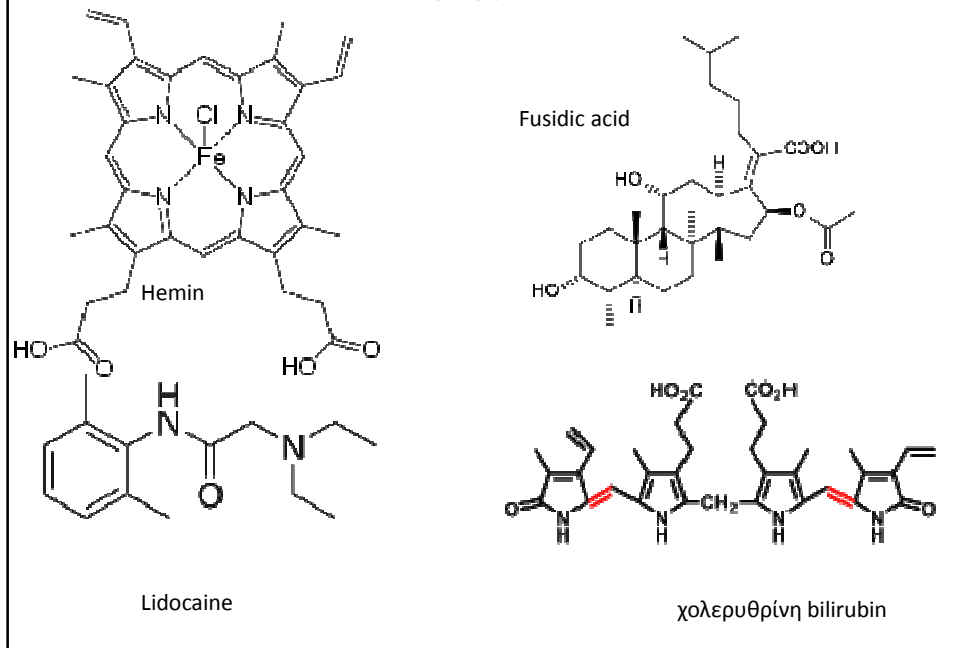
Site 1



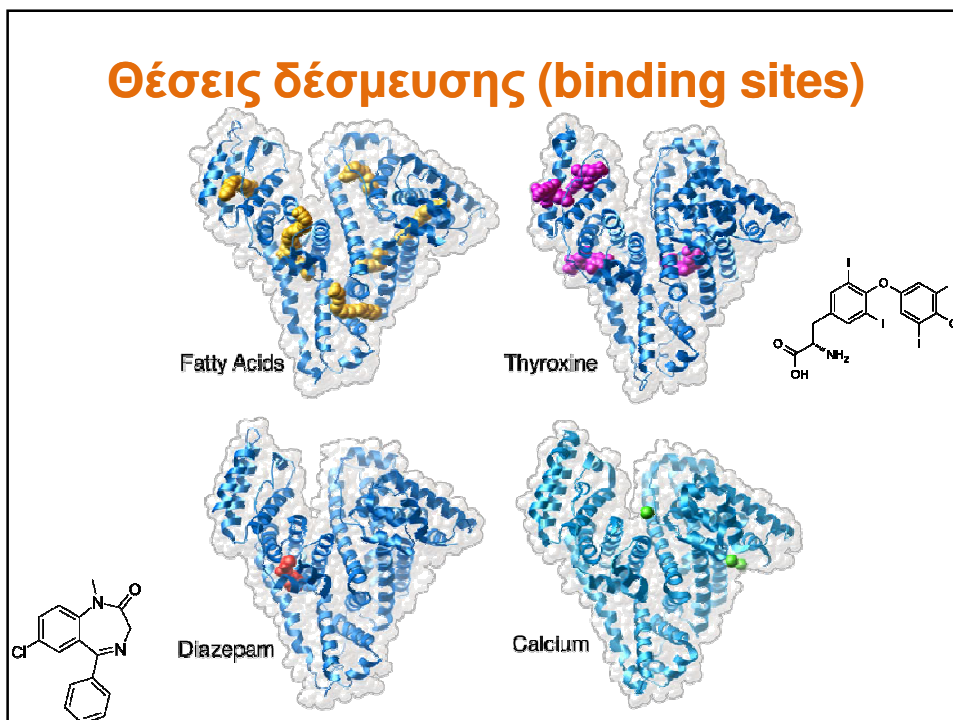
Site 2



Site 3



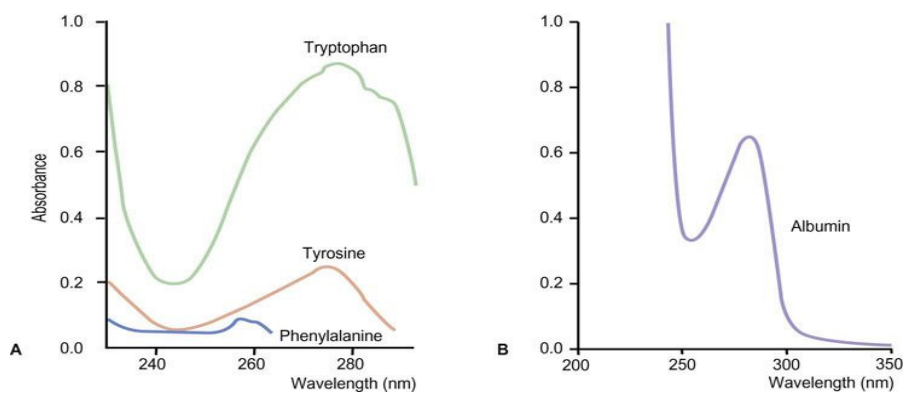
Θέσεις δέσμησης (binding sites)



Μελέτη αλληλεπίδρασης

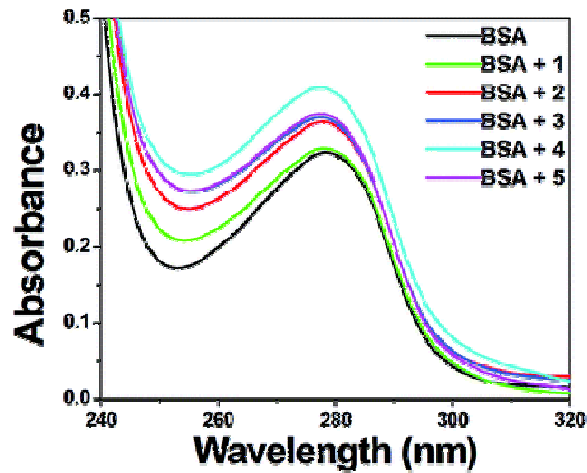
- Με φασματοσκοπία UV-vis
- Με φασματοσκοπία φθορισμού

Φάσμα UV αλβουμίνης



$\lambda_{\max} = 280-295 \text{ nm}$

Μελέτη με φασματοσκοπία UV-vis

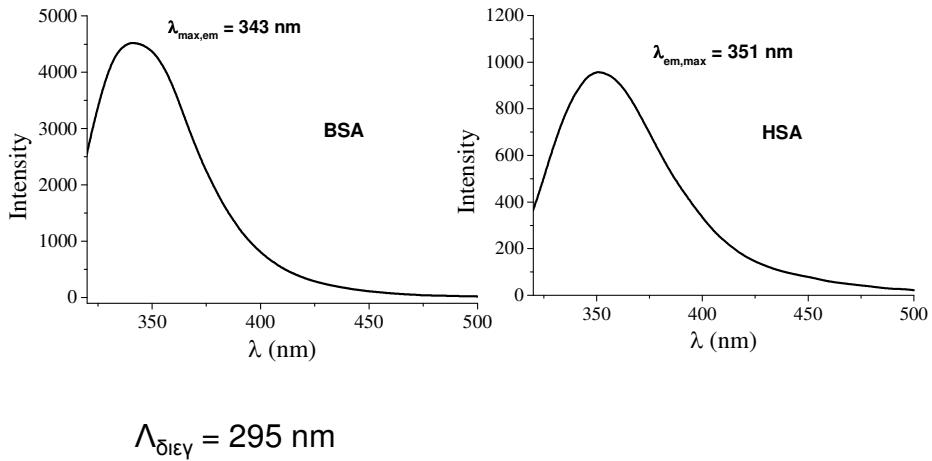


- Η μεταβολή στην ένταση της ταινίας υποδηλώνει μεταβολή της τριτοταγούς δομής

Μελέτη με φασματοσκοπία φθορισμού

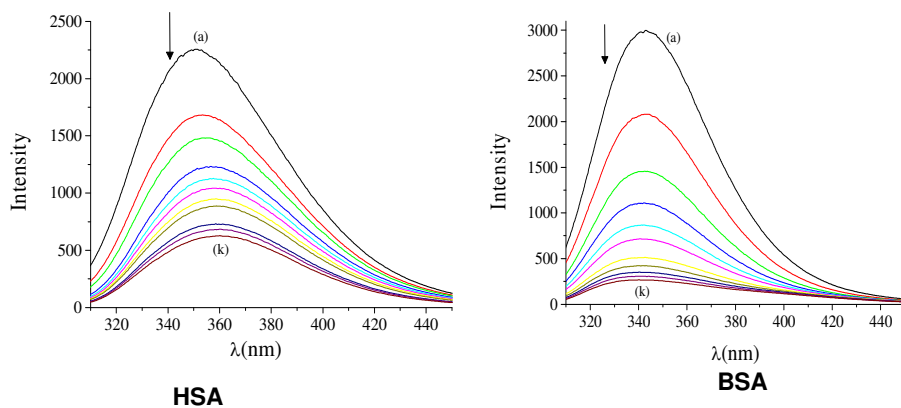
- Μήκος διέγερσης ($\lambda_{\text{διέγερσης}}, \lambda_{\text{excitation}}$) = 280-295 nm
- Το μέγιστο στο φάσμα εκπομπής εμφανίζεται ανάλογα με το $\lambda_{\text{διεγ}}$ και την αλβουμίνη

Φάσματα φθορισμού εκπομπής αλβουμίνης



Περιπτώσεις στο φθορισμό

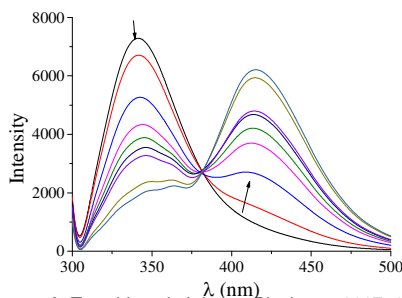
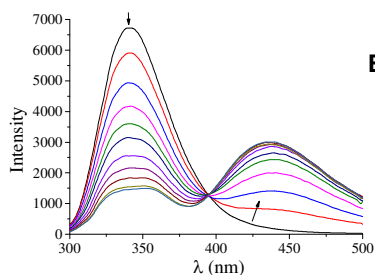
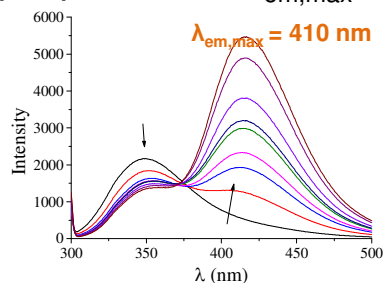
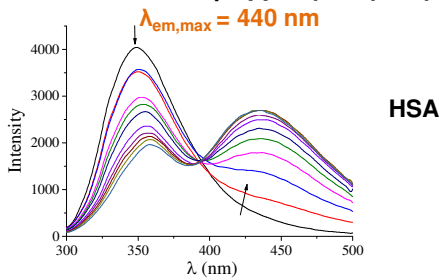
- Η ένωση δεν έχει φθορισμό στην περιοχή



X. Totta, et al, J. Inorg. Biochem., 2015, 145, 79

Περιπτώσεις στο φθορισμό

- Η ένωση έχει φθορισμό μακριά από το $\lambda_{em,max}$

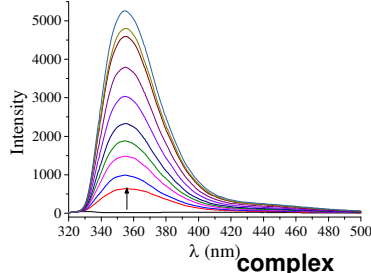
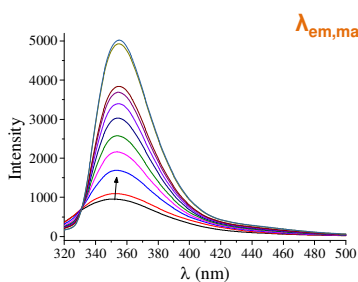


A. Kostelidou, etal, Polyhedron, 2016, 119, 359

A. Tarushi, etal, J. Inorg. Biochem., 2017, 170, 85

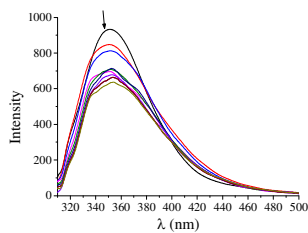
Περιπτώσεις στο φθορισμό

- Η ένωση έχει φθορισμό κοντά στο $\lambda_{em,max}$



HSA+ complex

complex



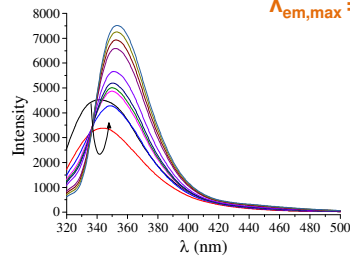
[HSA+ complex] - complex

X. Totta, etal, New J. Chem., 2017, 41, 4478

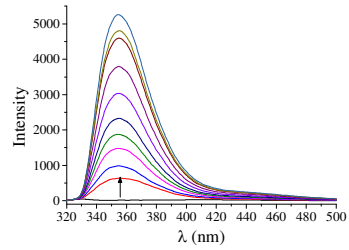
Περιπτώσεις στο φθορισμό

- Η ένωση έχει φθορισμό κοντά στο $\lambda_{em,max}$

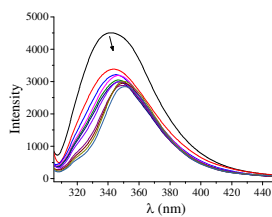
$$\lambda_{em,max} = 360 \text{ nm}$$



BSA+ complex



complex



[BSA+ complex] - complex

X. Totta, etal, New J. Chem., 2017, 41, 4478

Εξισώσεις μελέτης

- Εξίσωση Stern-Volmer
- Εξίσωση Scatchard

Εξίσωση Stern-Volmer

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

- I_0 = αρχικός φθορισμός του διαλύματος της αλβουμίνης
- I = φθορισμός του διαλύματος της αλβουμίνης μετά την προσθήκη της ένωσης
- $[Q]$ = συγκέντρωση ένωσης (Quencher)
- τ_0 = ημιζωή φθορισμού (lifetime) της αλβουμίνης = 10 ns = 10^{-8} s
- K_{SV} (σε M^{-1}) = σταθερά Stern-Volmer
- k_q (σε $M^{-1}s^{-1}$) = σταθερά απόσβεσης φθορισμού (quenching)
- K_{SV} από την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων

Εξίσωση Scatchard

$$\frac{\Delta I / I_0}{[Q]} = nK - K \frac{\Delta I}{I_0}$$

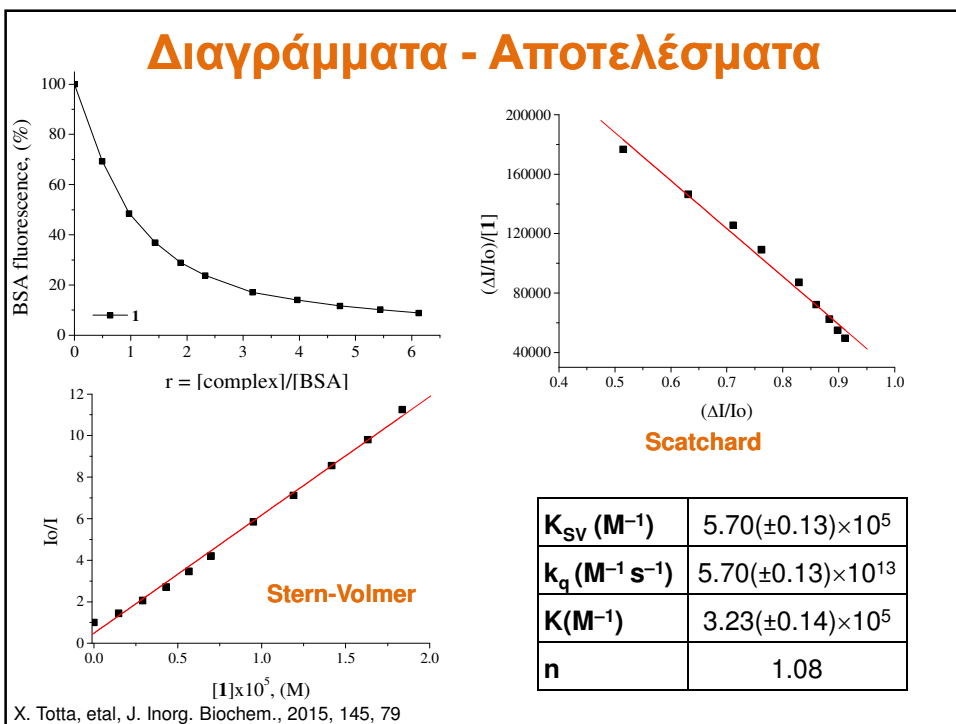
- K (σε M^{-1}) = σταθερά σύνδεσης της ένωσης στην αλβουμίνη
- n = αριθμός θέσεων σύνδεσης ανά αλβουμίνη
- K από την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων

Παράδειγμα υπολογισμού

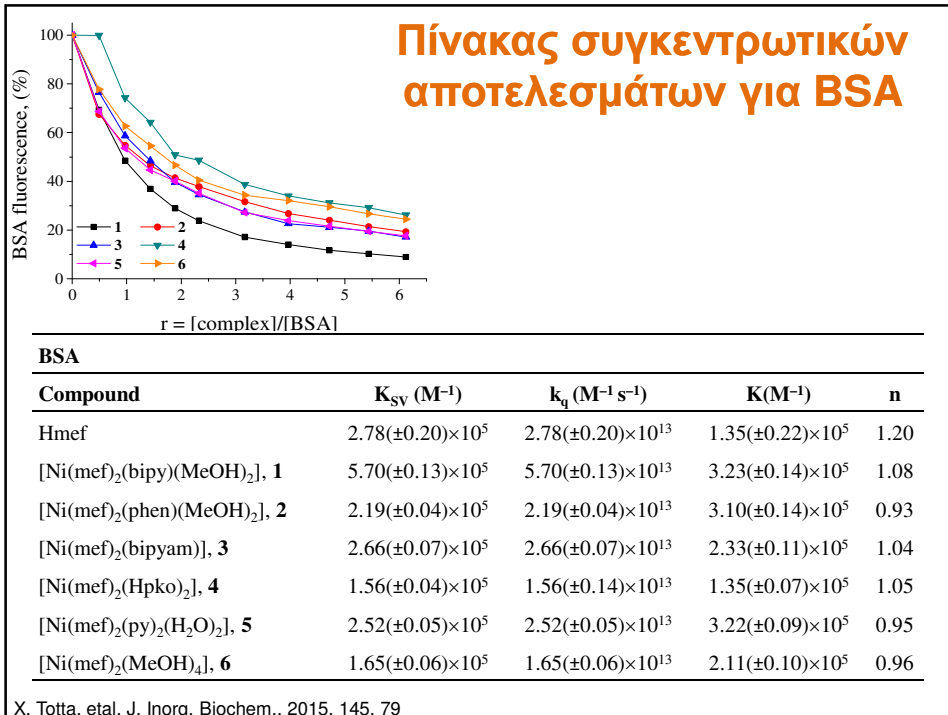
- $[BSA] = 3 \times 10^{-5} \text{ M}$, $I_0 = 3000$

[Complex] (M)	I	r	%	[Complex]	I_0/I	$\Delta I/I_0$	$\Delta I/(I_0[\text{Complex}])$
0	3000	0	100	0	1		
1.5×10^{-6}	2078	0.49261	69.3128753	1.5×10^{-6}	1.442733	0.3068712	207649.544
2.9×10^{-6}	1455	0.97087	48.5323549	2.9×10^{-6}	2.060481	0.5146765	176705.581
4.3×10^{-6}	1107	1.43541	36.9246164	4.3×10^{-6}	2.70822	0.6307538	146475.057
5.7×10^{-6}	865.6	1.88679	28.8725817	5.7×10^{-6}	3.463494	0.7112742	125658.439
7×10^{-6}	713.6	2.32558	23.802535	7×10^{-6}	4.201233	0.7619746	109216.366
9.5×10^{-6}	513.2	3.16742	17.1180787	9.5×10^{-6}	5.841777	0.8288192	87223.3553
12×10^{-6}	421	3.96476	14.0426951	12×10^{-6}	7.12114	0.859573	72267.8082
14×10^{-6}	350.2	4.72103	11.6811207	14×10^{-6}	8.560822	0.8831888	62358.4814
16×10^{-6}	305.9	5.43933	10.203469	16×10^{-6}	9.800588	0.8979653	55029.1562
18×10^{-6}	266.4	6.12245	8.88592395	18×10^{-6}	11.25375	0.9111408	49606.5525
				Stern-Volmer		Scatchard	

Διαγράμματα - Αποτελέσματα



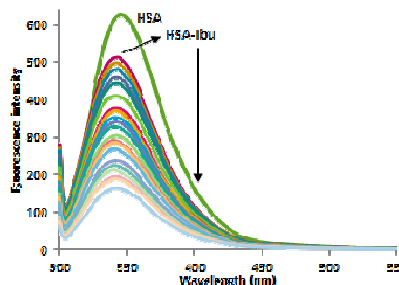
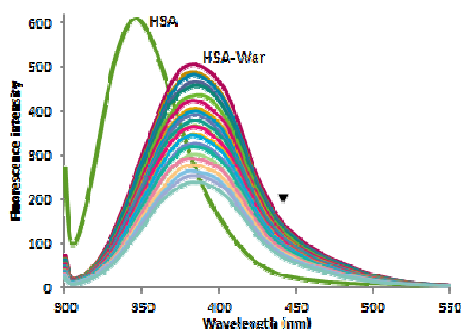
Πίνακας συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων για BSA



Προσδιορισμός περιοχής δέσμευσης

- Φασματοσκοπικά (ανταγωνιστική δράση)
- Υπολογιστικά (molecular docking)

Ανταγωνιστική δράση (warfarin και ibuprofen)



Compound	K (M ⁻¹)
Complex-HSA-Ibu	2.88×10 ⁴
Complex-HSA	3.12×10 ⁴
Complex-HSA-War	3.49×10 ³

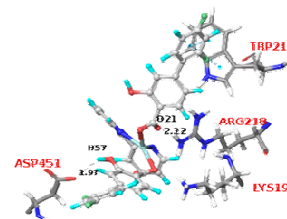
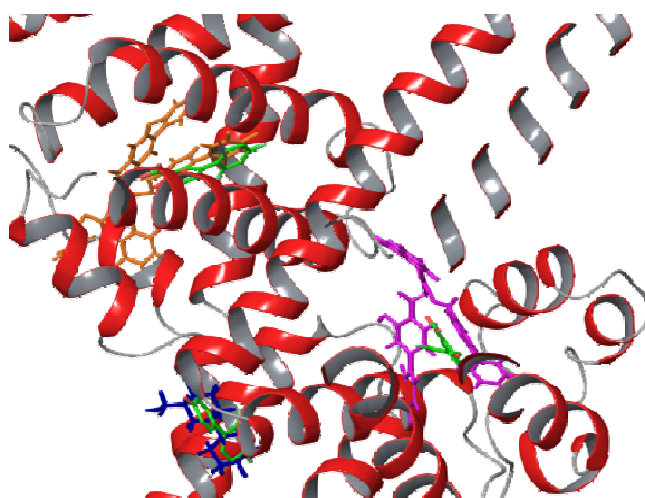
- Sudlow I: warfarin
- Sudlow II: Ibuprofen

Σύνδεση στη θέση της warfarin

N. Shahabadi, etal, J. Coord. Chem., 2017, 70, 3186

Molecular docking

Εύρεση αλληλεπιδράσεων και ελάχιστων ενεργειών



[Zn(diflunisal)₂(bipy)]

HSA

A. Tarushi, etal, J. Inorg. Biochem., 2017, 170, 85