

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



## Πτυχιακή Εργασία

ΥV/VIS ΚΑΙ FTIR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΟΣ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ  
Cu-BLEOMYCIN, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΥΣΙΑ DNA

Κωνσταντίνα Μηνά

Λεμεσός 2014



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

## **Πτυχιακή Εργασία**

UV/VIS ΚΑΙ FTIR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΟΣ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ  
Cu-BLEOMYCIN, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΥΣΙΑ DNA

Κωνσταντίνα Μηνά

Επιβλέποντες καθηγητές  
κ. Κωνσταντίνος Βαρότσης  
κ. Κωνσταντίνος Κουτσουπάκης

Λεμεσός 2014

## **Πνευματικά δικαιώματα**

Copyright © Κωνσταντίνα Μηνά, 2014

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου Κωνσταντίνο Κουτσουπάκη, για την παραχώρηση του συγκεκριμένου θέματος της διπλωματικής εργασίας, καθώς και για την καθοδήγηση και την συνεχή επίβλεψή του καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής. Επίσης, τον ευχαριστώ για την υποστήριξη, για το αμείωτο ενδιαφέρον και τη συμπαράστασή του, τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και κατά την συγγραφή του, γιατί χωρίς την βοήθεια του η ολοκλήρωση αυτής της μελέτης θα ήταν αδύνατη. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου και κυρίως στον κύριο Κωνσταντίνο Βαρώτση, πρόεδρο του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος για την παραχώρηση του συγκεκριμένου θέματος, την διάθεση του εργαστηριακού χώρου Περιβαλλοντικής Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και την παραχώρηση των οργάνων και μηχανημάτων για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους, καθώς και το προσωπικό του εργαστηρίου που ήταν πρόθυμο να με βοηθήσει σε ότι πρόβλημα προέκυπτε. Θερμές ευχαριστίες στην καθηγήτρια των Νέων Ελληνικών, κυρία Αντιγόνη Παρμαζή για το αμέριστο ενδιαφέρον και την ηθική συμπαράσταση που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας εργασίας και κυρίως την ευχαριστώ για τον χρόνο που μου αφιέρωσε για την διόρθωση, συντακτικά και ορθογραφικά, της παρούσας πτυχιακής εργασίας καθώς και για την βοήθεια που μου πρόσφερε στην συγγραφή της βιβλιογραφίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η bleomycin (μπλεομυκίνη, BLM) είναι ένα αντιβιοτικό που δρα κατά των όγκων και ανήκει σε μια τάξη γλυκοπεπτιδικών, αντικαρκινικών παραγόντων. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1966 από το βακτήριο *Streptomyces verticillus*. Η ενδοκυτταρική τοξική δράση της bleomycin στους ανθρώπους είναι αποτέλεσμα της ικανότητας δέσμευσης του σιδήρου ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) και της οξειδοαναγωγικής ενεργοποίησης του μοριακού οξυγόνου ( $\text{O}_2$ ). Συγκεκριμένα, η bleomycin αντιδρά με τα ιόντα μετάλλου ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) παράγοντας ένα ψευδοένζυμο, το οποίο αντιδρά με την σειρά του με το οξυγόνο. Αυτό οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών υπεροξειδίου και υδροξειδίου και στην απαγωγή ενός ατόμου υδρογόνου από την βάση των νουκλεϊκών οξέων. Αυτή η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση της διπλής έλικας του DNA, καθώς και τις ασυνήθιστες τριτοταγείς δομές του RNA.

Αντικείμενο της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του συμπλόκου  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin. Η μελέτη βασίζεται στην δέσμευση του χαλκού (Cu) στο ενεργό κέντρο της bleomycin. Μετά τον χαρακτηρισμό του συμπλόκου  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin σε συνθήκες ισορροπίας, σειρά είχε ο χαρακτηρισμός των δομικών διακυμάνσεων που παρατηρούνται κατά την συναρμογή ενός υποκαταστάτη. Ο υποκαταστάτης στην παρούσα μελέτη είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), το οποίο δεσμεύεται στο μέταλλο και δημιουργεί το σύμπλοκο  $\text{HOO-Cu}^{\text{II}}$ -bleomycin. Στην συνέχεια, η όλη μελέτη επαναλήφθηκε σε συνθήκες παρουσίας αναγωγικού, οξυγόνου και μετά DNA, έτσι ώστε να εξακριβωθεί ο επιλεκτικός τρόπος αλληλεπίδρασης της bleomycin με το DNA, καθώς και η επίδραση που αυτό ασκεί στην δυναμική του συστήματος  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin.

Βασικά εργαλεία για την παραπάνω μελέτη είναι η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV/Vis) και η υπέρυθη φασματοσκοπία (IR). Με την χρήση της UV/Vis φασματοσκοπίας γίνεται ο αρχικός χαρακτηρισμός της βασικής ηλεκτρονικής κατάστασης των συμπλόκων της bleomycin, παρουσία και απουσία DNA, ούτως ώστε να εξακριβωθεί ο τρόπος με τον οποίο η bleomycin δρα επιλεκτικά με το DNA. Στην συνέχεια, γίνεται η χρήση της IR φασματοσκοπίας, η οποία είναι μία πολύ ευαίσθητη τεχνική και γίνεται ο χαρακτηρισμός της δονητικής κατάστασης των συμπλόκων της bleomycin. Επίσης, εξετάζεται η χημεία του συμπλόκου  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin, παρουσία και απουσία DNA, με σκοπό να παρατηρηθεί η δέσμευση του μετάλλου στην bleomycin και η αντίδραση του συμπλόκου με DNA.

Αρχικά μελετήθηκε η αντίδραση του συμπλόκου  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin, παρουσία και απουσία DNA με την χρήση UV/Vis φασματοσκοπίας, όπου παρατηρήθηκε η αντίδραση του συμπλόκου και η απορρόφηση των ενώσεων σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (nm). Η αντίδραση του συμπλόκου υπό την παρουσία οξυγόνου δεν φαίνεται ότι γίνεται ξεκάθαρα αφού δεν έχει δείξει κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Το ίδιο έγινε με την αντίδραση του συμπλόκου  $\text{Cu}^{2+}$ -BLM-DNA με το  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι από την φύση του ο χαλκός έχει ασθενείς μεταβάσεις, δηλαδή δεν έχει ισχυρή ένταση. Στην συνέχεια, έγινε η μελέτη του συμπλόκου με την χρήση της IR φασματοσκοπίας. Με αυτήν την τεχνική, οι δονήσεις των ενώσεων φαίνονται λίγο πιο ξεκάθαρα και παρατηρήθηκε η αντίδραση του συμπλόκου σε συγκεκριμένους κυματαριθμούς ( $\text{cm}^{-1}$ ). Η διαφορά με την UV/Vis φασματοσκοπία είναι ότι η φασματοσκοπία IR είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον χαρακτηρισμό των ενώσεων, γι' αυτό χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, κυρίως στις δονήσεις που παρουσιάζονται λόγω θορύβου ή αέρα.

Καταλήγοντας, απώτερος σκοπός-στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η χρήση του χαλκού για την δημιουργία του συμπλόκου  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin, ούτως ώστε να παρατηρηθεί ο σχηματισμός κάποιων ενδιάμεσων με βάση τις αντιδράσεις του συμπλόκου με  $\text{O}_2$  ή  $\text{H}_2\text{O}_2$  καθώς, και η ικανότητα του συμπλόκου να διασπάσει το DNA και το RNA. Χρησιμοποιήθηκε ο χαλκός γιατί αποτελεί μέταλλο με φυσιολογική σημασία μαζί με τον σίδηρο (Fe). Επομένως, σημαντικό σημείο αναφοράς της παρούσας πτυχιακής είναι ο οπτικός και δονητικός χαρακτηρισμός του συμπλόκου  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin, παρουσία και απουσία DNA.

## ABSTRACT

Bleomycin (BLM) is an antibiotic that acts against tumors and belongs to a class of glycopeptidic, anticancer agents. It was first isolated in 1966 from the bacterium *Streptomyces verticillus*. The intracellular toxic effect of bleomycin in humans is a result of the binding capacity of iron ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) and of redox activation of molecular oxygen ( $\text{O}_2$ ). Specifically, bleomycin reacts with the metal ions ( $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) generating a pseudo enzyme which reacts in turn with oxygen. This leads to the production of free superoxide and hydroxide radicals and in the abduction of a hydrogen atom from the base of the nucleic acids. This process results in the cleavage of the double-stranded DNA, as well as the unusual tertiary structures of RNA.

Subject of the thesis is to study the complex  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin. The study is based on the binding of copper (Cu) in the active center of bleomycin. After the characterization of the complex  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin at equilibrium conditions, the characterization of the structural variations observed during ligand assembly took place. The ligand in this study is hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), which binds to the metal and creates the physiologically active complex  $\text{HOO-Cu}^{\text{II}}$ -bleomycin. Thereafter, the whole study was repeated in the presence of reducing conditions, oxygen and after DNA, so that ascertain the selective interaction of bleomycin to DNA, and the influence as this exerts on the dynamics of the system  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin.

Basic tools for this study are the ultraviolet-visible spectroscopy (UV/Vis) and infrared spectroscopy (IR). The use of UV/Vis spectroscopy comprises the initial characterization step of the basic electronic state complexes of bleomycin, in the presence or absence of DNA, in order to determine the manner in which bleomycin selectively interacts with DNA. The analysis continues with the use of IR spectroscopy, which is a very sensitive technique and allows the characterization of the vibrational state of bleomycin complexes. Additionally, this spectroscopic technique allows the examination of the  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin specific chemistry, in the presence or absence of DNA. Therefore, the binding of the metal to bleomycin and the reaction between the complex and DNA can be observed.

Firstly, we studied the reaction of complex  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin, in the presence or absence of DNA, using UV/Vis spectroscopy, in which we observed the reaction of the complex and the absorption of the compounds at specific wavelengths. The reaction of the complex in the presence of oxygen had not clearly seemed since there was no clear positive



evidences. The same was done by the reaction of complex  $\text{Cu}^{2+}$ -BLM-DNA with  $\text{H}_2\text{O}_2$ . This is because the copper of its nature has patients transitions, that means that its transitions have weak intensities. Subsequently, we studied the complex with the use of IR spectroscopy. With this technique, the vibrations of the compounds appear slightly more clearly and then we followed the reaction of the complex. The difference between IR and UV/Vis spectroscopy is that IR spectroscopy is a sensitive technique for the characterization of compounds, so it needs special attention, especially to the vibrations that occur due to noise or air.

In conclusion, the ultimate objective-aim of this thesis is using copper to create the complex  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin, in order to observe the formation of some intermediate based on the reactions of the complex with  $\text{O}_2$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$  as well, and the ability of the complex to cleave DNA and RNA. We used copper because is a metal with physiological significance as iron (Fe). Therefore, an important reference point of this thesis is the optical and vibrational characterization of complex  $\text{Cu}^{2+}$ -bleomycin, in the presence or absence of DNA.