

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



025000200773



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

26

**Αλεξάνδρας Μύαρη
ΧΗΜΙΚΟΥ**

**ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ
ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ Cu(I) ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΤΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ WILSON ΚΑΙ
ΣΤΙΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΤΟ DNA ΤΡΙΣ-ΔΙΠΥΡΙΔΥΛΙΚΩΝ
ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ Ru(II)**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2006



ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στα πλαίσια της διδακτορικής μου διατριβής, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Χατζηγιάδη Νικόλαου, θα ήθελα να απευθίνω τις θερμές μου ευχαριστίες στους κάτωθι:

Στον επιβλέποντά μου, Καθηγητή κ. Νικόλαο Χατζηγιάδη, για την ευκαιρία που μου προσέφερε με την εισαγωγή μου στο διατμηματικό τμήμα της Βιοανόργανης Χημείας, για την ανάθεση του θέματος της διδακτορικής διατριβής και για την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγησή του που έκαναν δυνατή την εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Στο μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, επίκουρο Καθηγητή κ. Αχίλλεα Γαρούφη για την συνεπίβλεψη του στο Β' μέρος αυτής της διατριβής και την σημαντική συνεισφορά του τόσο στη διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και στην ερμηνεία των πειραματικών δεδομένων. Εκπιθικό επίσης να ευχαριστήσω και τον επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Πλακατούρα, επίσης μέλος της τριμελούς επιτροπής καθώς και το Λέκτορα κ. Γεράσιμο Μαλανδρίνο, για την συμμετοχή τους και τη βοήθεια τους κατά το διάστημα εκπόνησης αυτής της διδακτορικής διατριβής.

Ακόμη όλα τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ της Βιοανόργανης Χημείας καθώς και τους λοιπούς μεταπτυχιακούς συμφοιτητές μου, για το καλό κλίμα εργασίας του εργαστηρίου και τη συνεργασία τους, όποτε αυτό ήταν αναγκαίο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη ιδιαίτερα τον καθηγητή Dr B. Sarkar και τους συνεργάτες του για τη φιλοξενία τους στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Hospital for the Sick Children του Τορόντο στον Καναδά, για τη γενναιόδωρη προσφορά του στη διεξαγωγή πειραμάτων απαραίτητων για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής αλλά και για την απόκτηση αξιόλογων εμπειριών και τη μεταλαμπαδέυση γνώσεων στο τομέα της μοριακής βιολογίας.

Στους συντελεστές του κέντρου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (CERM) του Πανεπιστημίου Φλωρεντίας στην Ιταλία, όπου πραγματοποιήθηκε η λήψη σημαντικού αριθμού φασμάτων, για τον επαγγελματισμό που επέδειξαν και για την αιλόχερη προσφορά γνώσεων. Επίσης, προς τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας και την Ευρωπαϊκή Ένωση για το πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 01ΕΔ367, το οποίο στήριξε οικονομικά τις ερευνητικές μας δραστηριότητες.

Τέλος, από αυτές τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τον σύζυγό μου Βασίλειο Τσιατούρα, ο οποίος αποτέλεσε το στήριγμά μου καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της διατριβής.



ΜΕΡΟΣ Α'

**ΧΡΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΩΣ ΔΟΜΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΤΗΣ
ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ WILSON**



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°	Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ WILSON	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°	Η ΑΤΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ WILSON (ATP7B): ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	
2.1. Δομή της ATP7B		5
2.2. Βιολογικός ρόλος και λειτουργία της ATP7B		6
2.3. Μεταλλάξεις του γονιδίου της ATP7B		18
2.4. Δομή των αλληλουχιών σύνδεσης μετάλλου		20
2.5. Μηχανισμός μεταφοράς του χαλκού από τις πρωτεΐνες chaperone στις πρωτεΐνες Menkes/Wilson		26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°	ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
5.1. Σύνθεση των πεπτιδίων		35
5.2. Μέθοδοι προσδιορισμού		35
5.2.1. Μέθοδος BCA		35
5.2.2. Μέθοδος Ellman		36
5.2.3. Η μέθοδος του Cu(I)		36
5.3. Μελέτη της σταθερότητας των πεπτιδίων ως προς την οξείδωση		36
5.4. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD)		36
5.5. Φασματοσκοπία ¹ H NMR		37
5.6. Φασματοσκοπία μάζας (Electrospray Mass Spectrometry)		37
5.7. Δημιουργία μοντέλου με βάση την ομολογία μεταξύ πρωτεϊνών		38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	



6.1. Φασματοσκοπία ESI-MS	39
6.2. Σταθερότητα των πεπτιδίων ως προς την οξείδωση	41
6.3. Κατασκευή μοντέλου από την ομολογία πρωτεϊνών	41
6.4. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD)	43
6.5. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H NMR)	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	72
ABSTRACT	73



Κεφάλαιο

1

Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ WILSON



1. Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ WILSON

Η ασθένεια Wilson ή ηπατοφακοειδής εκφύλιση είναι μια διαταραχή στη μεταφορά του χαλκού, η οποία κληρονομείται με τον υπολειπόμενο αυτοσωματικό χαρακτήρα και οδηγεί στη συσσώρευση χαλκού στο ήπαρ και τον εγκέφαλο [1]. Η μειωμένη έκκριση χαλκού φαίνεται να είναι το μοναδικό και πιο σημαντικό αίτιο της συσσώρευσης του χαλκού στην ασθένεια Wilson [2].

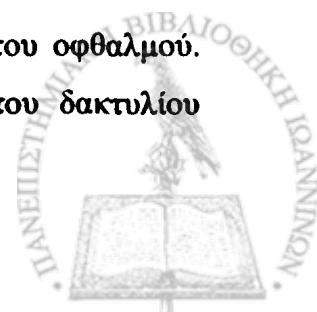
Οι ασθενείς με την ασθένεια Wilson μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις ομάδες [3]: αυτούς στους οποίους προεξάρχουν τα ηπατικά συμπτώματα, αυτούς στους οποίους προεξάρχουν τα νευρολογικά συμπτώματα και αυτούς που εμφανίζουν τόσο νευρολογικά όσο και ηπατικά συμπτώματα. Η ηλικία έναρξης της ασθένειας Wilson εκτείνεται από τα 8-9 ως τα 50 έτη. Η διάγνωση της ασθένειας Wilson γίνεται συνήθως ως μια μορφή ηπατικής δυσλειτουργίας στην αρχή της εφηβείας. Τα συμπτώματα που αποδίδονται ως ηπατική δυσλειτουργία είναι ποικίλα και περιλαμβάνουν τον ίκτερο, την ασυμπτωματική κίρρωση, τη χρόνια καλπάζουσα ηπατίτιδα και την υποξεία ηπατίτιδα. Εκτός από τα ηπατικά συμπτώματα, ένα μικρό ποσοστό ασθενών (περίπου 20%) αναπτύσσει διαταραχές των οστών και των αρθρώσεων όπως οστεοπόρωση και αρθρίτιδα στα τελευταία στάδια της νόσου.

Η πρόοδος της ασθένειας Wilson μπορεί να διαιρεθεί αδρά σε τρία στάδια [3]. Στο πρώτο στάδιο, ο χαλκός συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων. Στο δεύτερο στάδιο, τα αυξανόμενα επίπεδα του κυτταροπλασματικού χαλκού αναγκάζουν τα κύτταρα να μετακινήσουν κάποια ποσότητα χαλκού στα λυσοσώματα πιθανόν με τη μορφή των μεταλλοθειονινών χαλκού. Τα υψηλά επίπεδα χαλκού οδηγούν σε ηπατική νέκρωση και την απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων μη ενσωματωμένου στη σερουλοπλασμίνη χαλκού στην αιματική κυκλοφορία. Αυτή η ταχεία αύξηση του χαλκού του ορού προκαλεί βλάβη στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων οδηγώντας σε αιμολυτική αναιμία. Στο τελευταίο στάδιο της νόσου, ο χαλκός συσσωρεύεται και σε άλλα



Σχήμα 1.1. Δακτύλιος Kayser-Fleischer στον κερατοειδή οφθαλμού ασθενούς με ασθένεια Wilson [4].

όργανα όπως στον εγκέφαλο, στους νεφρούς και στον κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού. Χαρακτηριστικό σύμπτωμα της ασθένειας Wilson είναι ο σχηματισμός του δακτυλίου



2 1. Η ασθένεια Wilson

Kayser-Fleischer [4] (σχήμα 1.1). Ο δακτύλιος Kayser-Fleischer σχηματίζεται από εναποθέσεις χαλκού, χρώματος χρυσό-καφέ, σκούρο κόκκινο ή μπλε-πράσινο, στη μεμβράνη Descemet του κερατοειδούς χιτώνα του οφθαλμού και παρουσιάζεται στο 95% των ασθενών και στο 100% των ασθενών με νευρολογικά συμπτώματα. Στα επόμενα στάδια της νόσου, η εναπόθεση χαλκού στον εγκέφαλο έχει ως αποτέλεσμα τις νευρολογικές διαταραχές. Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι συμπτώματα ηπατικής δυσλειτουργίας είναι πιο συνηθισμένα σε ασθενείς που νοσούν σε μικρή ηλικία ενώ τα νευρολογικά συμπτώματα συνήθως προεξάρχουν σε ασθενείς που παρουσιάζουν τη νόσο σε μεγαλύτερη ηλικία. Τα νευρολογικά συμπτώματα που σχετίζονται με την ασθένεια Wilson ποικίλλουν και περιλαμβάνουν τρόμο, δυσαρθρία, παραφροσύνη, ψεύδισμα, προβλήματα συμπεριφοράς, απώλεια του συντονισμού των κινήσεων και δυσκαμψία. Τα νευρολογικά συμπτώματα σε πολλούς από αυτούς τους ασθενείς έχουν αποδοθεί σε εξωπυραμιδική ή παρεγκεφαλιδική συμβολή ή και τα δύο.

Τα βιοχημικά ευρήματα σε ασθενείς με ασθένεια Wilson δείχνουν διαταραχή της ομοιοστασίας των επιπέδων χαλκού στο σώμα. Η έκκριση του χαλκού μεταβάλλεται με ελάττωση στην έκκριση στη χολή και αύξηση στην απέκκριση στα ούρα. Τα επίπεδα της σερουλοπλασμίνης του ορού ελαττώνονται με αποτέλεσμα την αύξηση των συμπλόκων χαμηλού μοριακού βάρους του χαλκού καθώς και του χαλκού που συνδέεται στην αλβουμίνη. Ωστόσο, τα συνολικά επίπεδα χαλκού του ορού ελαττώνονται. Από την άλλη, ο εγκέφαλος, το ήπαρ και οι νεφροί έχουν εξαιρετικά αυξημένα επίπεδα χαλκού. Η συσσώρευση χαλκού στους νεφρούς οδηγεί σε νεφρική δυσλειτουργία η οποία μπορεί να πάρει τη μορφή της αλβουμινουρίας οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα χαλκού στα ούρα. Η μη αποτελεσματική έκκριση του χαλκού στη χολή μπορεί να είναι το μοναδικό και πιο σημαντικό αίτιο της συσσώρευσης του χαλκού στην ασθένεια Wilson. Η σερουλοπλασμίνη είναι μια εκκρινόμενη μπλε γλυκοπρωτεΐνη χαλκού η οποία φέρει το μεγαλύτερο ποσό του χαλκού στο πλάσμα. Τα χαμηλά επίπεδα σερουλοπλασμίνης που βρίσκονται στην ασθένεια Wilson είναι αποτέλεσμα μιας διαταραχής στη μεταφορά του χαλκού στην απο-πρωτεΐνη κατά τη σύνθεση της στο κυτταρόπλασμα. Μελέτες της ενσωμάτωσης του χαλκού στην απο-σερουλοπλασμίνη συνιστούν ότι αυτή πραγματοποιείται πιθανότατα στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και ότι δεν απαιτείται N-γλυκοζυλίωση για την ενσωμάτωση του χαλκού [3].



Η θεραπεία της ασθένειας Wilson έχει επικεντρωθεί στα χηλικά αντιδραστήρια ώστε να κινητοποιηθεί ο χαλκός από τα προσβεβλημένα όργανα και να απέκκριθεί στα ούρα. Το πρώτο από τα χηλικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκε ήταν το BAL (2,3-διμερκαπτοπροπανόλη). Σημαντική κλινική βελτίωση των ασθενών που έπαιρναν BAL παρατηρούνταν μετά από μακροχρόνια χρήση και ήταν λιγότερο σημαντική στις οξείες καταστάσεις της νόσου. Επιπλέον, οι ασθενείς έπρεπε να αντιμετωπίσουν τις επώδυνες ενδομυϊκές ενέσεις και τις συχνές τοξικές παρενέργειες. Το επόμενο σημαντικό χηλικό αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία της ασθένειας Wilson ήταν η D-πενικιλλαμίνη. Η D-πενικιλλαμίνη είναι ανώτερη του BAL ως χηλικό αντιδραστήριο στο ότι μπορεί να δοθεί από το στόμα, είναι λιγότερο τοξική και πιο αποτελεσματική. Η συνήθης δόση της D-πενικιλλαμίνης για ενηλίκους είναι 500 mg δύο φορές ημερησίως. Με αυτή τη δόση, η απέκκριση του χαλκού στα ούρα μπορεί να αυξηθεί σε 4-5 mg ημερησίως. Η θεραπεία με D-πενικιλλαμίνη είναι εφ' όρου ζωής και δίνει σημαντική κλινική και βιολογική βελτίωση σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων. Σε μερικούς ασθενείς, τα νευρολογικά συμπτώματα εξαφανίζονται, η ηπατική λειτουργία μπορεί να επανέλθει στο φυσιολογικό και οι δακτύλιοι Kayser-Fleischer συνήθως φθίνουν και εξαφανίζονται. Ωστόσο, όπως τα περισσότερα φάρμακα έχουν πάντα κάποιες παρενέργειες και η D-πενικιλλαμίνη δεν αποτελεί εξαίρεση. Οι πιο κοινές παρενέργειες στα αρχικά στάδια της θεραπείας περιλαμβάνουν πυρετό, ανορεξία, έλλειψη πυριδοξίνης και μια ήπια καταστολή των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων. Στις περιπτώσεις όπου οι ασθενείς αναπτύσσουν τοξικές αντιδράσεις έναντι της D-πενικιλλαμίνης ή η θεραπεία διακόπτεται, εναλλακτικά χηλικά αντιδραστήρια αποτελούν το trientine (τριοιθυλενο-τετρααμινο διϋδροχλωρίδιο), το τετραθειομολυβδενικό και η θεραπεία με ψευδάργυρο. Σε αντίθεση με άλλα χηλικά αντιδραστήρια τα οποία προάγουν την απέκκριση του χαλκού στα ούρα, η θεραπεία με ψευδάργυρο προάγει την απέκκριση του χαλκού στα κόπρανα. Πιστεύεται ότι ο ψευδάργυρος προάγει την απέκκριση του χαλκού επάγοντας τη σύνθεση μεταλλοθειονίνης στο έντερο παρεμποδίζοντας έτσι την απορρόφηση του χαλκού. Παρόλο που ο ψευδάργυρος έχει μεγαλύτερη ικανότητα στο να προάγει τη σύνθεση μεταλλοθειονίνης απ' ό,τι ο χαλκός, η μεταλλοθειονίνη έχει μεγαλύτερη συγγένεια προς το χαλκό. Έτσι, η μεταλλοθειονίνη συλλέγει το χαλκό στο έντερο προλαμβάνοντας την είσοδό του στην πυλαία κυκλοφορία. Η



4 1. Η ασθένεια Wilson

απόπτωση των εντερικών κυττάρων στον αυλό οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα χαλκού στα κόπρανα των ασθενών στους οποίους χορηγείται ο ψευδάργυρος [3].

Ο καννελί επίμυς Long-Evans (LEC) έχει ταυτοποιηθεί ως το ζώο μοντέλο της ασθένειας Wilson. Οι επίμυες LEC παρουσιάζουν πολλά από τα βιοχημικά και παθολογικά στοιχεία παρόντα στους ανθρώπους ασθενείς με την ασθένεια Wilson. Ο επίμυς LEC μαζί με άλλα ζώα μοντέλα της ασθένειας Wilson όπως ο μύς του τοξικού γάλακτος και το τεριέ bedlington αποτελούν σημαντικά ερευνητικά εργαλεία τα οποία μπορούν να συνεισφέρουν στην κατανόηση της ασθένειας Wilson στον άνθρωπο [3].

Το γονίδιο το οποίο είναι υπεύθυνο για την ασθένεια Wilson βρέθηκε στο χρωμόσωμα 13 [5-6]. Ακολούθησε η κλωνοποίηση του γονιδίου αυτού (ATP7B) από δύο ανεξάρτητες ομάδες [7-9]. Βρέθηκε ότι εκφράζει μια ATPάση Ρ-τύπου η οποία αποτελείται από 1411 αμινοξέα και εμπλέκεται στη μεταφορά του χαλκού. Η ATP7B εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, τον εγκέφαλο και τον πλακούντα. Εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την πρωτεΐνη Menkes (ATP7A), η οποία είναι και αυτή μία ATPάση χαλκού Ρ-τύπου, της οποίας η μετάλλαξη οδηγεί στην ασθένεια Menkes, μία διαταραχή που κληρονομείται με το φυλοσυνδετικό χαρακτήρα και χαρακτηρίζεται από μειωμένη δραστικότητα σημαντικών ενζύμων του χαλκού όπως η κυτοχρωμική οξειδάση c, η λυσυλ-οξειδάση και η β-υδροξυλάση της ντοπαμίνης. Η πρωτεΐνη Menkes εκφράζεται σε όλους τους ιστούς εκτός από το ήπαρ [3].



Κεφάλαιο



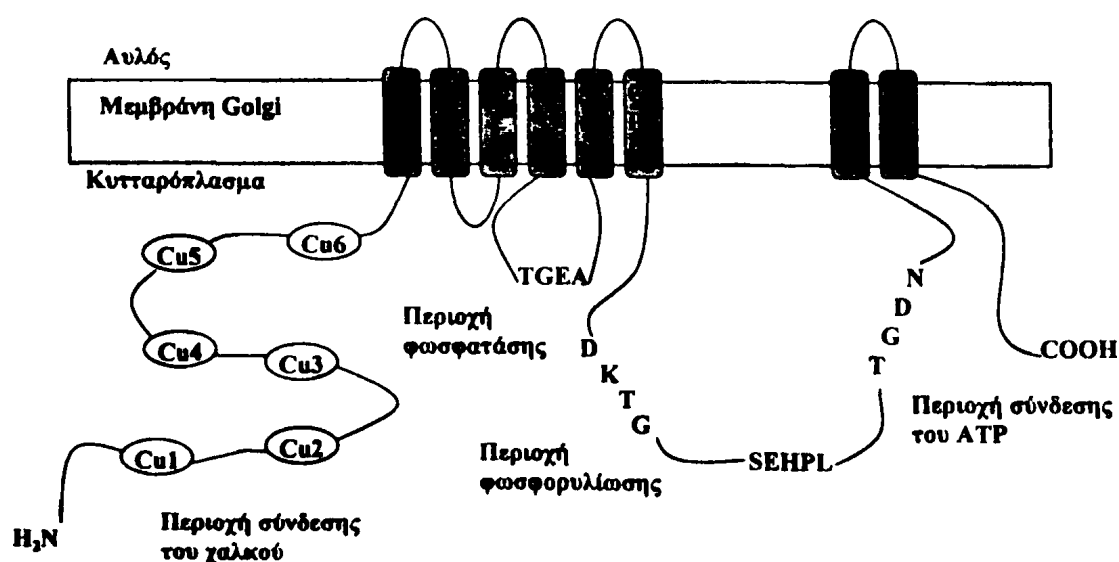
Η ΑΤΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ WILSON (ΑΤΡ7Β): ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ



2. Η ΑΤΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΑΣ WILSON (ATP7B): ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

2.1. Δομή της ATP7B

Έρευνα στις πρωτεϊνικές βάσεις δεδομένων έδειξε ότι η προβλεπόμενη αλληλουχία αμινοξέων της ATP7B παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την οικογένεια των ΑΤΡασών, η οποία περιλαμβάνει την πρωτεΐνη της ασθένειας Menkes (ATP7A), την ΑΤΡάση χαλκού του *Enterococcus hirae* (CorA) και τον προκαρυωτικό μεταφορέα καδμίου [9]. Ειδικότερα, η ομολογία της ATP7B με την ATP7A είναι πολύ υψηλή και φτάνει το 57%, ποσοστό το οποίο αυξάνεται μέχρι και το 79% στις περιοχές φωσφατάσης, φωσφορυλίωσης καθώς και στις περιοχές σύνδεσης του ATP και των μετάλλων [7]. Η προβλεπόμενη δομή της ATP7B απεικονίζεται στο σχήμα 2.1. Η ATP7B περιέχει μια περιοχή σύνδεσης μετάλλων και τρεις κυτταροπλασματικές περιοχές ΑΤΡάσης (περιοχή φωσφατάσης, φωσφορυλίωσης και σύνδεσης του ATP). Οι τρεις αυτές περιοχές είναι χαρακτηριστικές των ΑΤΡασών P-τύπου οι οποίες σχηματίζουν ένα ομοιοπολικά φωσφορυλιωμένο ενδιάμεσο στον κύκλο τους με τη μεταφορά ενός γ-φωσφορικού από το ATP σε ένα ασπαρτικό κατάλοιπο της πρωτεΐνης [10]. Τα γενικά χαρακτηριστικά των ΑΤΡασών P-τύπου, παρόντα και στην ATP7B, είναι το μοτίβο TGEA (περιοχή φωσφατάσης), το μοτίβο DKTG (περιοχή φωσφορυλίωσης), το μοτίβο TGDN (περιοχή σύνδεσης του ATP) και η αλληλουχία MXGDGXNDXP (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ), η οποία συνδέει την περιοχή δέσμευσης του ATP με το διαμεμβρανικό τμήμα.



Σχήμα 2.1. Προβλεπόμενη δομή της ΑΤΡάσης της ασθένειας Wilson.



6 2. Η ΑΤΡάση της ασθένειας Wilson (ATP7B): Δομή και λειτουργία

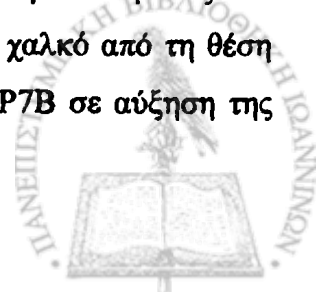
Επιπλέον, η ATP7B χαρακτηρίζεται ως ΑΤΡάση Ρ-τύπου η οποία μεταφέρει βαρέα μέταλλα, επειδή περιέχει έξι μοτίβα σύνδεσης μετάλλων, GMT/HCXXC (όπου Χ οποιοδήποτε αμινοξύ), στο Ν-τελικό άκρο του μορίου, το μοτίβο CPC σε μια ενδομεμβρανική περιοχή, το μοτίβο SEHPL και οκτώ διαμεμβρανικά τμήματα [11-12]. Το μοτίβο GMT/HCXXC είναι μια περιοχή σύνδεσης μετάλλων με ομολογία προς πλήθος πρωτεϊνών που δεσμεύουν βαρέα μέταλλα (Σχήμα 2.2). Τα μοτίβα αυτά της ATP7B είναι ειδικά για χαλκό και στοιχειομετρική ανάλυση έχει δείξει ότι έξι γραμμομόρια χαλκού δεσμεύονται από ένα γραμμομόριο της Ν-τελικής περιοχής, η οποία περιλαμβάνει τις έξι περιοχές σύνδεσης μετάλλου της πρωτεΐνης [13-14]. Τα μοτίβα CPC και SEHPL των ΑΤΡάσεων που μεταφέρουν βαρέα μέταλλα εμπλέκονται στη μετακίνηση των μετάλλων μέσω των μεμβρανών. Έχει προταθεί αυτή η τάξη πρωτεϊνών να ονομάζεται Ρ₁-ΑΤΡάσες ή CPX-τύπου ΑΤΡάσες.

Cu1	L G M T C Q S C V K S I E D R I S N L K Q I I S M K V S L
Cu2	E G M T C Q S C V S S I E G K V R K L Q G V V R V K V S L
Cu3	D G M H C K S C V L N I E E N I G Q L L Q V Q S I Q V S L
Cu4	A G M T C A S C V H S I E G M I S Q L E G V Q Q I S V S L
Cu5	K G M T C A S C V S N I E R N L Q K E A G V L S E L V A L
Cu6	T G M T C A S C V H N I E S K L T R T N Q I T V A S V A L
Atox1	V D M T C C C C A E A V S R V L N K L C Q V K Y D I D L P
Atx1	V V M T C S G C S G A V N K V L T K L E P D V S K I D I S
Mnk4	D G M T C N S C V Q S I E G V I S K K P G V K S I R V S L
CopZ	K G M S C N H C V A R I E E A V G R I S G V K K V K V Q L
CopA	T G M T C A N C S A R I E K E L N E Q P G V M S A T V N L
MerP	T G M T C D S C A V H V K D A L E K V P G V Q S A D V S T

Σχήμα 2.2. Το μοτίβο GMT/HCXXC είναι υψηλά διατηρημένο σε πολλές πρωτεΐνες που δεσμεύουν βαρέα μέταλλα, ανάμεσά τους η Atox1 = πρωτεΐνη chaperone χαλκού στον άνθρωπο, η Atx1 = πρωτεΐνη chaperone χαλκού στον *Saccharomyces cerevisiae*, η Mnk4 = τέταρτη περιοχή σύνδεσης του χαλκού στην ΑΤΡάση της ασθένειας Menkes, οι CopZ και CopA = πρωτεΐνες chaperone χαλκού στον *Enterococcus hirae*, MerP = περιπλασμική πρωτεΐνη από το βακτηριακό (*Shigella Flexneri*) σύστημα εξουδετέρωσης του οδραργόρου.

2.2. Βιολογικός ρόλος και λειτουργία της ATP7B

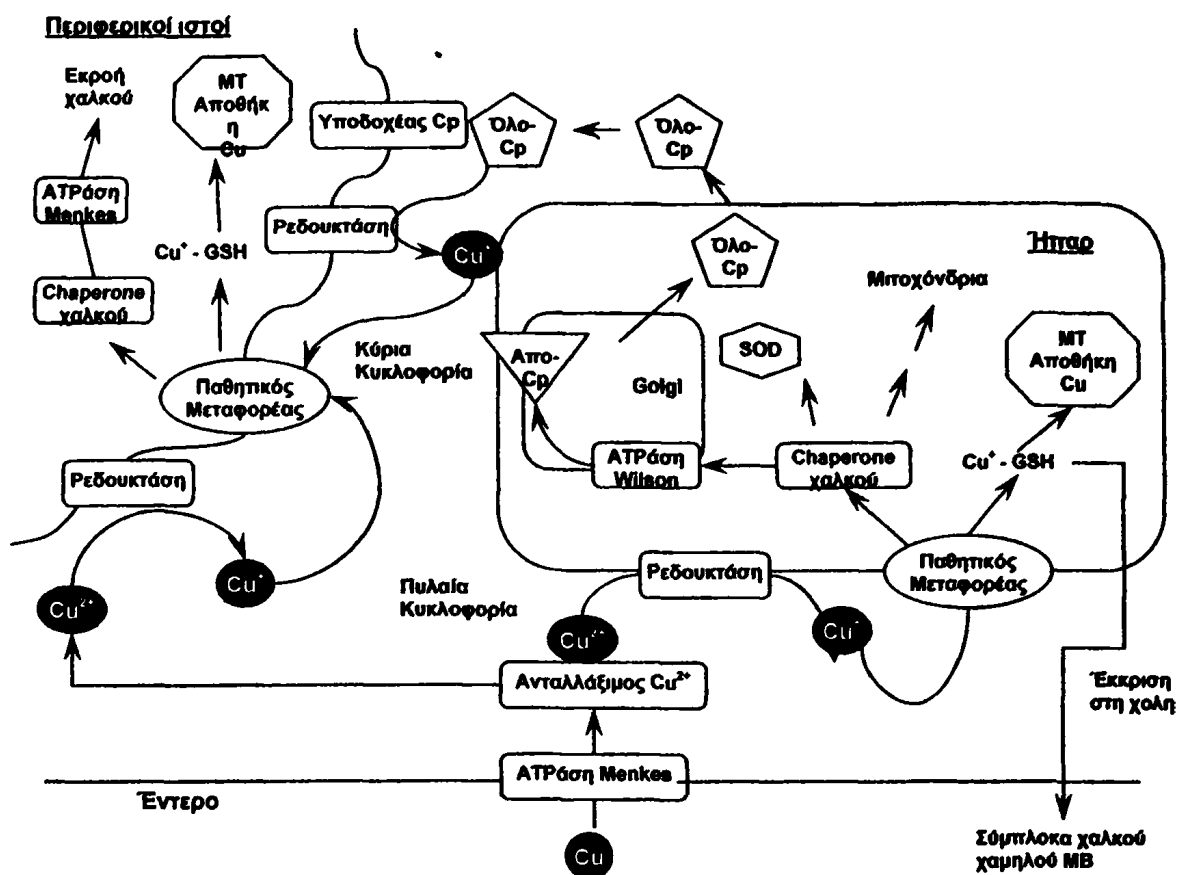
Η ATP7B συντίθεται ως ενδοκυττάρια μεμβρανική πρωτεΐνη απλής αλυσίδας 165 KDa στην κυτταρική σειρά του ανθρώπινου ηπατώματος [15-16]. Μελέτες *in vitro* αποκάλυψαν ότι η ATP7B βρίσκεται στη συσκευή Golgi κυττάρων ηπατοβλαστώματος υπό φυσιολογικές συνθήκες, συνιστώντας ότι η ATP7B πιθανόν μεταφέρει χαλκό από τη θέση αυτή [15-16]. Μελέτες *in vitro* επίσης αναφέρουν μετακίνηση της ATP7B σε αύξηση της



συγκέντρωσης χαλκού σε ένα κυτταροπλασματικό κυστικό τμήμα σε κύτταρα HepG2 [15], ενώ σε ηπατοκύτταρα φυσιολογικών επίμυων [17] και σε πολωμένα κύτταρα ηπατώματος [18] η ATP7B μετακινήθηκε σε κυτταροπλασματικά κυστίδια και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Μελέτες *in vivo* στις οποίες εισαγόταν στο ήπαρ επίμυων LEC πλασμίδιο που εκφράζει την ATP7B [19], έδειξαν την παρουσία της ATP7B τόσο στη συσκευή Golgi και/ή κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ηπατοκυττάρων ενώ σε ηπατικές τομές φυσιολογικού επίμυος με αυξημένο φορτίο χαλκού βρέθηκε κυριαρχία κυστικών δομών που περιέχουν ATP7B κοντά στην καναλική μεμβράνη [17]. Μετακίνηση από τη συσκευή Golgi στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, υπό την επίδραση του χαλκού, έχει επίσης αναφερθεί για την ομόλογο πρωτεΐνη της ασθένειας Menkes (ATP7A) [20].

Οι παραπάνω ιδιότητες της ATP7B συνιστούν ότι η πρωτεΐνη αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρια διακίνηση του χαλκού εντός του ηπατοκυττάρου. Υπάρχουν δύο κύριες οδοί εξαγωγής του χαλκού από το ηπατοκύτταρο: (1) Η έκκριση στο πλάσμα μέσω της ενσωμάτωσης του χαλκού στη σερουλοπλασμίνη και (2) η έκκριση στη χολή. Η τελευταία αυτή πορεία πιστεύεται ότι περιλαμβάνει την κυστική μεταφορά του χαλκού στα λυσοσώματα και από εκεί στην καναλική μεμβράνη [21]. Για την περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της ATP7B στη μεταφορά του χαλκού και τη βιοσύνθεση της σερουλοπλασμίνης *in vivo*, το cDNA της ATP7B εισήχθη σε ένα πειραματόζωο μοντέλο της ασθένειας Wilson, τον κανελλί αρουραίο Long-Evans (LEC), ο οποίος δεν εκφράζει την *atp7b*, την ομόλογη ATP7B των αρουραίων [22]. Η ATP7B που εκφράστηκε στο ήπαρ του αρουραίου LEC βρέθηκε στη συσκευή Golgi των ηπατοκυττάρων. Μετά από έγχυση ανασυνδυασμένου αδενοϊού που περιείχε το cDNA της ATP7B ανιχνεύτηκε έκκριση της ολοσερουλοπλασμίνης, δεικνύοντας ότι η λειτουργία της ATP7B στη μεταφορά του χαλκού σχετίζεται άμεσα και με τη σύνθεση της σερουλοπλασμίνης και ότι η πιθανή θέση που συμβαίνει η διαδικασία αυτή είναι η συσκευή Golgi όπου ενσωματώνεται ο χαλκός στη σερουλοπλασμίνη [22]. Επίσης βρέθηκε ότι το περιεχόμενο των λυσοσωμάτων σε χαλκό αυξάνει μετά από εισαγωγή της ATP7B συνιστώντας τη συμμετοχή της ATP7B σε εκκριτική πορεία του χαλκού μέσω των λυσοσωμάτων [22]. Τα δεδομένα αυτά στηρίζουν την αντίληψη ότι η ATP7B μετακινεί χαλκό τόσο στη συσκευή Golgi αλλά και στη χολή με έκκριση μέσω των λυσοσωμάτων, παίζοντας ρυθμιστικό ρόλο στην ομοιοστασία του χαλκού εντός του ηπατοκυττάρου





Σχήμα 2.3. Η φυσιολογική πορεία μεταφοράς του χαλκού στον ανθρώπινο οργανισμό [23].

Η φυσιολογική πορεία μεταφοράς του χαλκού στον ανθρώπινο οργανισμό απεικονίζεται στο σχήμα 2.3 [23]. Η απορρόφηση του χαλκού πραγματοποιείται στο στομάχι και το λεπτό έντερο. Η μεταφορά του χαλκού από τον εντερικό αυλό στο εντερικό βλεννογόνο πραγματοποιείται μέσω πρωτεΐνης φορέα. Παρόλο που η ταυτότητα του εντερικού μεταφορέα χαλκού δεν είναι γνωστή, πιθανή θεωρείται η ΑΤΡάση της ασθένειας Menkes λόγω φαινοτύπου της και της υψηλής έκφρασής της στο εντερικό βλεννογόνο. Όταν ο χαλκός εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος, συνδέεται με ποικιλία πρωτεϊνών και ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους. Περισσότερο από 90% του χαλκού είναι παρόν στο πλάσμα του αίματος με τη μορφή της σερουλοπλασμίνης όπου δεν ανταλλάσσεται *in vivo*. Το υπόλοιπο 5-10% είναι ανταλλάξιμο και δεσμευμένο με την αλβουμίνη και αμινοξέα με τη μορφή Cu(II).

Κατά την πρόσληψη από τα ηπατοκύτταρα, ο ανταλλάξιμος χαλκός ανάγεται σε Cu(I) από μια υποθετική μεμβρανική ρεδουκτάση και απορροφάται από το κύτταρο μέσω ενός παθητικού μεταφορέα. Στους εξωηπατικούς ιστούς, ο χαλκός προσλαμβάνεται από τη

σερουλοπλασμίνη (Cp). Σε αυτή την οδό, η Cp αλληλεπιδρά με έναν επιφανειακό κυτταρικό υποδοχέα και τα άτομα χαλκού ανάγονται σε Cu(I) από μια μεμβρανική ρεδουκτάση. Στη συνέχεια, ο Cu(I) προσλαμβάνεται από το κύτταρο μέσω ενός παθητικού μεταφορέα [3].

Καθώς εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα ο χαλκός μπορεί να συμπλεχθεί με διάφορους υποκαταστάτες. Ωστόσο, πιστεύεται ότι η πλειονότητα του κυτταροπλασματικού χαλκού συμπλέκεται με τη γλουταθειόνη (GSH) ως Cu(I). Το σύμπλοκο Cu(I)-GSH μπορεί έπειτα να μεταφέρει το χαλκό σε διάφορες ενδοκυττάρια πρωτεΐνες όπως η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και οι μεταλλοθειονίνες (MT). Υπάρχουν πρωτεΐνες όπως οι ATOX1, COX17 και Ccs1, οι οποίες έχει προταθεί ότι παραδίδουν το χαλκό στις ΑΤΡάσες που μεταφέρουν χαλκό, στην κυτοχρωμική οξειδάση και τη σουπεροξειδική δισμουτάση αντίστοιχα. Η ΑΤΡάση της ασθένειας Menkes είναι τοποθετημένη στην κυτταρική μεμβράνη του εντερικού βλεννογόνου και η μετάλλαξη του γονιδίου Menkes διακόπτει την απορρόφηση του χαλκού ο οποίος παγιδεύεται εντός του εντερικού βλεννογόνου οδηγώντας σε σοβαρή έλλειψη χαλκού στα περιφερικά όργανα. Επιπλέον, στην ασθένεια Menkes, διακόπτεται η μεταφορά χαλκού μέσω του αιματεγκεφαλικού φραγμού με αποτέλεσμα την έλλειψη χαλκού στο κεντρικό νευρικό σύστημα [24]. Στην ασθένεια Wilson, η διαταραχή της ενσωμάτωσης του κυτταροπλασματικού χαλκού στη συσκευή Golgi λόγω της έλλειψης λειτουργικής ATP7B, οδηγεί σε ελαττωμένη έκκριση χαλκού μέσω της σερουλοπλασμίνης στο αίμα και την ελαττωμένη έκκριση στο αίμα, οδηγώντας τελικά σε συσσώρευση του χαλκού στο ήπαρ του ασθενούς [23]. Η ΑΤΡάση της ασθένειας Menkes και η ΑΤΡάση της ασθένειας Wilson φαίνεται να έχουν παρόμοια λειτουργία όπως προκύπτει από το γεγονός ότι μπορεί η μία να υποκαταστήσει την άλλη στην απομάκρυνση του χαλκού από το κύτταρο [25].

Η μελέτη του J. R. Forbes και των συνεργατών του [26] έδειξε τη σημασία καθενός από τα έξι μοτίβα GMT/HCXXC της N-τελικής περιοχής στη μεταφορά του χαλκού από την ATP7B. Τα ευρήματα των παραπάνω ερευνητών συνιστούν ότι τα μοτίβα σύνδεσης χαλκού της N-τελικής περιοχής δεν είναι λειτουργικά ισοδύναμα και κυρίως τα μοτίβα πλησίον της διαμεμβρανικής περιοχής είναι τα πιο σημαντικά για τη μεταφορά του χαλκού. Η μετάλλαξη των πρώτων πέντε μοτίβων δεν οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας μεταφοράς της ATP7B. Ωστόσο, η παρουσία του έκτου μοτίβου ενώ είναι επαρκής για τη λειτουργία της ATP7B δεν είναι και απαραίτητη. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο χαλκός που δεσμεύεται από τη N-τελική



10 2. Η ΑΤΡάση της ασθένειας Wilson (ATP7B): Δομή και λειτουργία

περιοχή της ATP7B βρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα +1 και εντάσσεται στις δύο κυστεΐνες του μοτίβου GMT/HCXXC με παραμορφωμένη γραμμική γεωμετρία [14]. Η σύμπλεξη του χαλκού στις περιοχές αυτές γίνεται συνεργιστικά [14] και η σταδιακή ένταξη των ιόντων χαλκού στις έξι περιοχές σύνδεσης μετάλλου του N-τελικού τμήματος προκαλεί μεταβολές στη δευτεροταγή και την τεταρτοταγή δομή του [27]. Πιθανολογείται ότι η σύνδεση του χαλκού οδηγεί σε δομικές μεταβολές γύρω από αυτές τις θέσεις οι οποίες μέσω του πρωτεϊνικού σκελετού μεταδίδονται σε άλλα τμήματα του μορίου. Οι δομικές αυτές μεταβολές αποδίδονται στη διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών που προϋπήρχαν πριν τη σύνδεση του χαλκού. Ο M. DiDonato και οι συνεργάτες του [27] πρότειναν ότι φυσιολογικά η ATP7B βρίσκεται στη συσκευή Golgi όπου και μεταφέρει χαλκό εντός του αυλού της συσκευής. Όταν δεν συνδέεται με το χαλκό, η αμινο-τελική περιοχή αλληλεπιδρά με άλλα κυτταροπλασματικά τμήματα της πρωτεΐνης παρεμποδίζοντας τη μεταφορά του χαλκού. Η σύνδεση του χαλκού προκαλεί τέτοιες μεταβολές στη διαμόρφωση του N-τελικού τμήματος ώστε να διακόπτεται η αλληλεπίδραση με την υπόλοιπη πρωτεΐνη ξεκινώντας έτσι τον κύκλο μεταφοράς. Όταν αυξάνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση χαλκού, περισσότερα τμήματα της πρωτεΐνης συνδέονται με το χαλκό οδηγώντας σε περαιτέρω μεταβολές της διαμόρφωσης. Οι νέες μεταβολές στη διαμόρφωση πυροδοτούν τη μετακίνηση της πρωτεΐνης από τη συσκευή Golgi προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη ή ένα κενοτοπώδες τμήμα. Στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, η ATP7B απομακρύνει την περίσσεια του χαλκού από το ηπατοκύτταρο ενώ η εισαγωγή του χαλκού σε ένα κενोटόπιο από την ATP7B οδηγεί στην έκκρισή του μέσω εναλλακτικής οδού, πιθανόν στη χολή. Καθώς ελαττώνεται η συγκέντρωση του χαλκού, μικρότερος αριθμός τμημάτων της N-τελικής περιοχής είναι συνδεδεμένος με το χαλκό με αποτέλεσμα η ΑΤΡάση να επιστρέφει στη συσκευή Golgi.

Η επαγόμενη από το χαλκό μετακίνηση της ATP7B είναι μία αντιστρεπτή διαδικασία αφού η ATP7B επιστρέφει στη συσκευή Golgi όταν τα επίπεδα του χαλκού επιστρέφουν σε φυσιολογικές τιμές. Η ικανότητα αυτή της μετακίνησης πιθανόν έχει ως στόχο την αποκατάσταση της μεταφοράς του χαλκού στα εκκρινόμενα ένζυμα χαλκού όταν αποκατασταθούν τα φυσιολογικά επίπεδα χαλκού. Η επιστροφή της ATP7B στη συσκευή Golgi όταν τα κύτταρα μεταφερθούν από υψηλή σε χαμηλή συγκέντρωση χαλκού δείχνει την πιθανή ύπαρξη σήματος που καθορίζει την ενδοκυττάρια θέση της. Στην περίπτωση της



ΑΤΡάσης της ασθένειας Menkes, έχει βρεθεί ένα μοτίβο δι-λευκίνης στην κυτταροπλασματική καρβοξυ-τελική περιοχή το οποίο είναι γνωστό ότι συμμετέχει στην ενδοκύτωση των πρωτεϊνών μέσω κυστιδίων που επικαλύπτονται με κλαθρίνη [24]. Η μετάλλαξη των δύο αυτών λευκινών οδηγεί στη συσσώρευση της πρωτεΐνης Menkes στην κυτταροπλασματική μεμβράνη λόγω της παρεμπόδισης της ενδοκύτωσης. Η ATP7B έχει και αυτή τρεις λευκίνες σε αντιστοιχία με τις δύο λευκίνες της ATP7A. Η ομοιότητα αυτή συνιστά ότι πιθανόν και η ATP7B ανακυκλώνεται μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης [24].

Αρχικά προτάθηκε ότι η ATP7B απομακρύνει το χαλκό από κυτταροπλασματικούς υποκαταστάτες και συνδέεται με το χαλκό σε μεταβατικό στάδιο πριν τη μεταφορά [28-29]. Ωστόσο, ανακαλύφθηκε ότι ο χαλκός που συνδέεται στη N-τελική περιοχή της ATP7B προέρχεται από την πρωτεΐνη chaperone ATOX1 [30]. Επιπλέον βρέθηκε ότι έξι το πολύ άτομα χαλκού μπορούν να μεταφερθούν από την ATOX1 στη N-τελική περιοχή της ATP7B και ότι αυξανόμενα ποσά της ATOX1 έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της καταλυτικής δράσης της ATP7B. Αντίθετα, η απο-ATOX1 απομακρύνει χαλκό από την ATP7B ελαττώνοντας τη δραστηριότητα του μεταφορέα συνιστώντας ότι τόσο η ολο- όσο και η απο-μορφή της ATOX1 παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στη δράση της ATP7B. Ακόμα όμως και σε περίσσεια της απο-ATOX1, ένα άτομο χαλκού παραμένει συνδεδεμένο στη N-τελική περιοχή της ATP7B, συνιστώντας ότι κάποια από τις περιοχές σύνδεσης μετάλλου της N-τελικής περιοχής της ATP7B δεν είναι διαθέσιμο για αλληλεπίδραση με την ATOX1. Φαίνεται ότι η απο-ATOX1 μπορεί να απομακρύνει το χαλκό μόνο από τις υποθετικά ρυθμιστικές περιοχές σύνδεσης του χαλκού, ρυθμίζοντας έτσι τη δράση του ενζύμου, ενώ οι θέσεις που είναι απαραίτητες για τη δράση της ATP7B παραμένουν απρόσιτες στην απο-chaperone πιθανόν λόγω στερικών παρεμποδίσεων. Ο D. Larin και οι συνεργάτες παρατήρησαν ότι οι περιοχές σύνδεσης μετάλλου 1, 2 και 3 καθώς και διάφοροι συνδυασμοί των περιοχών 1-4 αλληλεπιδρούν επαρκώς με την ATOX1 ενώ οι περιοχές 5 και 6 δεν αλληλεπιδρούν με την ATOX1 και το τμήμα 1-4 αλληλεπιδρά πιο ισχυρά σε σχέση με το τμήμα 1-6. Η ερμηνεία που δόθηκε ήταν ότι το τμήμα που περιέχει τις περιοχές 5 και 6 αναδιπλώνεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα μοτίβα MT/HCXXC να μην εκτίθενται στην επιφάνεια και επομένως να μην είναι προσιτά για αλληλεπίδραση με την ATOX1 ενώ η παρουσία του τμήματος 5-6 επικαλύπτει τα μοτίβα MT/HCXXC του τμήματος 1-4. Είναι



12 2. Η ΑΤΡάση της ασθένειας Wilson (ATP7B): Δομή και λειτουργία

φανερό ότι το πέμπτο και το έκτο μοτίβο σύνδεσης του χαλκού δεν συμμετέχουν στην απευθείας ανταλλαγή του χαλκού από την ATOX1 και επομένως έχουν διαφορετική λειτουργία [31]. Επομένως, η ATOX1 μπορεί να διαδραματίζει ρόλο-κλειδί ελέγχοντας το ποσό του χαλκού που συνδέεται στο μεταφορέα και συνεισφέροντας με αυτό τον τρόπο στη ρύθμιση της ενδοκυττάριας θέσης ή της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης της ATP7B ενώ διατηρεί το μεταφορέα ενεργό σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων χαλκού [32]. Επιπλέον, η διαπίστωση ότι η αλληλεπίδραση της ATP7B με την ATOX1 εξαρτάται από τη συγκέντρωση του χαλκού μέσα στο κύτταρο ενισχύει την υπόθεση ότι η ATOX1 είναι μια πρωτεΐνη απαραίτητη για την ομοιοστάση του χαλκού [33].

Η σημασία της N-τελικής περιοχής των ΑΤΡασών Ρ-τύπου φαίνεται και στην εργασία του Z. Hou και των συνεργατών του [34]. Διερευνήθηκε η επίδραση της ανταλλαγής των αμινο-τελικών περιοχών μεταξύ της ATP7B και της ZntA, ΑΤΡάση Ρ₁ τύπου από το *Escherichia Coli*, ειδική για τη μεταφορά Pb(II), Cd(II) και Zn(II). Κατασκευάστηκαν λοιπόν δύο χμαιοτικές πρωτεΐνες στις οποίες η αμινο-τελική περιοχή της ZntA αντικαταστάθηκε είτε από ολόκληρη τη N-τελική περιοχή της ATP7B ή μόνο από το έκτο μοτίβο σύνδεσης μετάλλων. Τα χμαιοτικά μόρια παρουσίασαν δραστικότητα έναντι του μολύβδου, του καδμίου, του ψευδαργύρου και του υδραργύρου, υποστρωμάτων της ZntA. Δεν υπήρξε όμως δραστικότητα με το χαλκό ή τον άργυρο, τα οποία είναι υποστρώματα της ATP7B. Συνεπώς, η αμινο-τελική περιοχή των Ρ₁-ΑΤΡασών δεν επηρεάζει την ειδικότητα ως προς το μέταλλο η οποία καθορίζεται ως φαίνεται από το διαμεμβρανικό τμήμα. Επίσης, τα χμαιοτικά μόρια ήταν 2 με 3 φορές λιγότερο δραστικά σε σχέση με την ZntA. Η αμινο-τελική περιοχή της ATP7B δεν μπορεί να αντικαταστήσει την αντίστοιχη της ZntA ώστε να επιτευχθεί η πλήρης καταλυτική δράση. Επομένως, είναι φανερό ότι η N-τελική περιοχή αλληλεπιδρά με το υπόλοιπο μόριο με ειδικό τρόπο ο οποίος έχει άμεση σχέση με το είδος του μετάλλου.

Η άποψη αυτή ενισχύεται περαιτέρω από τα ευρήματα του R. Tsivkovskii και των συνεργατών του [35]. Σύμφωνα με αυτά, το τμήμα Lys¹⁰¹⁰-Lys¹³²⁵ (ATP-BD) της ATP7B συνδέεται με νουκλεοτίδια, υδρολύει το ATP και αλληλεπιδρά με τη N-τελική περιοχή με τέτοιο τρόπο που εξαρτάται από το χαλκό. Όταν η N-τελική περιοχή δεν συνδέεται με χαλκό τότε συνδέεται ισχυρά με το ATP-BD κρατώντας το σε μια συγκεκριμένη διαμόρφωση. Η σύνδεση του χαλκού ελαττώνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραπάνω περιοχών



επιτρέποντας στο ATP-BD να πάρει διαμόρφωση με υψηλότερη συγγένεια προς το ATP. Επιπλέον, βρέθηκε ότι ο χαλκός είναι απαραίτητος για να συμβεί η καταλυτική φωσφορυλίωση δεδομένου ότι χηλικές ενώσεις του χαλκού αναστέλλουν τη δράση της ATP7B [36].

Εκτός από τη ρύθμιση της ενδοκυττάριας θέσης της ATP7B, ο χαλκός βρέθηκε ότι ρυθμίζει και τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της. Πρόσφατα βρέθηκε ότι συγκεντρώσεις χαλκού που δεν υπερβαίνουν τις φυσιολογικές στον ανθρώπινο ορό (10-20 μM) έχουν την ικανότητα να επάγουν τη φωσφορυλίωση της ATP7B [37]. Η ATP7B φωσφορυλιώνεται σε θέση ανεξάρτητη από τη θέση της καταλυτικής φωσφορυλίωσης και πιθανολογείται αυτό είναι αποτέλεσμα της δράσης μιας κινάσης. Σε αντίθεση με το ακυλ-φωσφορικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται κατά την υδρόλυση του ATP από την ATP7B, το προϊόν της μη-καταλυτικής φωσφορυλίωσης είναι σταθερό. Σε κύτταρα εντόμων βρέθηκε ότι αποδέκτης της γ -φωσφορικής ομάδας είναι μία ή περισσότερες σερίνες. Η ύπαρξη ακέραιας N-τελικής περιοχής της ATP7B φαίνεται να είναι απαραίτητη ώστε να λάβει χώρα αυτή η εξαρτώμενη από το χαλκό φωσφορυλίωση [24]. Το εύρημα συνιστά ένα ακόμα ρόλο για τη N-τελική περιοχή στην εξαρτώμενη από το χαλκό φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης η οποία μπορεί να αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό βήμα για τη μετακίνηση της ATP7B από τη συσκευή Golgi στο κυστικό τμήμα του κυττάρου.

Ο φυσιολογικός ρόλος της εξαρτώμενης από το χαλκό φωσφορυλίωσης παραμένει άγνωστος. Ωστόσο, υπάρχει μία συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων φωσφορυλιωμένης ATP7B και της ενδοκυττάριας θέσης της. Στη βασική κατάσταση, όταν τα επίπεδα φωσφορυλιωμένης ATP7B είναι τα φυσιολογικά, η ATP7B βρίσκεται στη συσκευή Golgi. Η προσθήκη χαλκού στο μέσο καλλιέργειας διεγείρει την εξαρτώμενη από κινάση φωσφορυλίωση της ATP7B η οποία μετακινείται στο κυστικό τμήμα. Η αντικατάσταση του μέσου καλλιέργειας που περιέχει χαλκό με φυσιολογικό μέσο οδηγεί σε αποφωσφορυλίωση της ATP7B και την επιστροφή της στη συσκευή Golgi [24].

Το διαμεμβρανικό τμήμα φαίνεται να καθορίζει την ειδικότητα ως προς το μέταλλο των ΑΤΡασών P-τύπου. Η τέταρτη διαμεμβρανική περιοχή της Ca^{2+} -ΑΤΡάσης [38], της Na^+ , K^+ -ΑΤΡάσης [39] και της H^+ -ΑΤΡάσης [40] έχει προβλεφθεί ότι αντιστοιχεί στην έκτη διαμεμβρανική περιοχή της ATP7B και περιέχει μια διατηρημένη προλίνη που βρίσκεται σε όλες τις ΑΤΡάσεις P-τύπου [41]. Αυτή η διαμεμβρανική περιοχή σχετίζεται με το κανάλι



14 2. Η ΑΤΡάση της ασθένειας Wilson (ATP7B): Δομή και λειτουργία

μεταγωγής και περιέχει αμινοξέα κρίσιμα για τη δέσμευση των κατιόντων. Ο κεντρικός ρόλος αυτής της διαμεμβρανικής περιοχής φάνηκε σε ένα πείραμα στο οποίο μεταλάσσοντας αμινοξέα που βρίσκονται εντός του καναλιού, η ειδικότητα ως προς το κατιόν της Na^+ , K^+ -ΑΤΡάσης μεταβλήθηκε σε αυτή της H^+ , K^+ -ΑΤΡάσης [42]. Στις ΑΤΡάσες που μεταφέρουν βαρέα μέταλλα, ένα ζεύγος κυστεϊνών περιβάλλει τη διατηρημένη προλίνη σχηματίζοντας το υψηλά διατηρημένο μοτίβο CPC. Αναλύσεις με μεταλλάξεις έδειξαν ότι συγκεκριμένα αμινοξέα στις διαμεμβρανικές περιοχές των ΑΤΡάσεων χαλκού είναι κρίσιμα για τη λειτουργία μεταφοράς χαλκού και συγκεκριμένα το μοτίβο CPC το οποίο προβλέπεται ότι είναι μία από τις θέσεις σύνδεσης του χαλκού μέσα στο κανάλι [43-45]. Μεταλλάξεις των κυστεϊνών ή της προλίνης οδηγούν στο σχηματισμό μη λειτουργικών πρωτεϊνών [15, 44, 46], οι οποίες δεν μπορούν να ανακατανεμηθούν εντός του κυττάρου σε απόκριση στο χαλκό [47-48]. Οι ΑΤΡάσες των θηλαστικών που μεταφέρουν χαλκό διαθέτουν μία επιπλέον διατηρημένη κυστεΐνη, σχηματίζοντας το μοτίβο CXXCPC.

Η υπόθεση που περιγράφηκε παραπάνω σύμφωνα με την οποία η ATP7B στη βασική κατάσταση βρίσκεται στη συσκευή Golgi και μετά από έκθεση στο χαλκό μετακινείται σε περιφερικά κυστικά τμήματα, δεν υιοθετείται από όλους τους ερευνητές. Έτσι, ο M. Harada και οι συνεργάτες του [49] αναφέρουν ότι η ATP7B στη βασική κατάσταση βρίσκεται στα όψιμα ενδοσώματα. Επίσης, όσον αφορά τη μετακίνηση της ATP7B αναφέρεται ότι τόσο στη βασική κατάσταση όσο και παρουσία χαλκού, η ATP7B βρίσκεται στα όψιμα ενδοσώματα [16, 25]. Η ερμηνεία που δίνεται από το M. Harada και τους συνεργάτες [50, 51] είναι ότι η ATP7B μεταφέρει το χαλκό από το κυτταρόπλασμα στον αυλό των όψιμων ενδοσωμάτων απ' όπου ο χαλκός μπορεί να μεταφερθεί στα λυσοσώματα μέσω των οποίων εκκρίνεται στη χολή. Τα ενδοσώματα εμπλέκονται στην ταξινόμηση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών που φτάνουν στα λυσοσώματα από τη συσκευή Golgi. Οι διαλυτές λυσοσωμικές υδρολάσες περιέχουν 6-φωσφομαννόζη που καθορίζει τα λυσοσώματα ως προορισμό. Η 6-φωσφομαννόζη μεσολαβεί στη σύνδεση στους υποδοχείς 6-φωσφομαννόζης (MPR) στη συσκευή Golgi απ' όπου τα σύμπλοκα υδρολάσης-MPR μεταφέρονται στα ενδοσώματα. Στα όψιμα ενδοσώματα οι υποδοχείς MPR απελευθερώνουν το φορτίο τους και στη συνέχεια επιστρέφουν στη συσκευή Golgi και ο κύκλος επαναλαμβάνεται [52]. Συνεπώς, ο χαλκός που βρίσκεται στα όψιμα ενδοσώματα

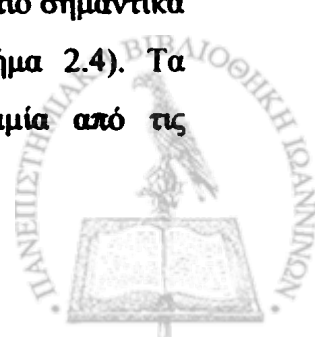


μπορεί να μεταφέρεται στη συσκευή Golgi μέσω των ανακυκλούμενων κυστιδίων MPR και να ενσωματώνεται στην απο-σερουλοπλασμίνη στη συσκευή Golgi. Οπότε ο χαλκός ενσωματωμένος στην απο-σερουλοπλασμίνη μεταφέρεται στον κολποειδικό χώρο μέσω της εκκριτικής οδού.

Η S. Lutsenko και οι συνεργάτες της [53] διαπίστωσαν ότι η ATP7B υπάρχει στα ηπατοκύτταρα σε δύο μορφές, μία 160-kDa και μία 140-kDa. Η πρωτεΐνη των 160-kDa είναι αυτή που έχει αναφερθεί ότι βρίσκεται στη συσκευή Golgi. Η πρωτεΐνη των 140-kDa βρέθηκε στα μιτοχόνδρια όπου πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά χαλκού στα οργανίδια αυτά. Πιθανολογείται ότι η πρωτεΐνη 140-kDa προέρχεται από πρωτεόλυση του N-τελικού τμήματος της πρωτεΐνης 160-kDa. Το εύρημα αυτό πιθανόν να μπορεί να συσχετισθεί και με το γεγονός ότι έχει διαπιστωθεί πρώιμη οξειδωτική γήρανση του ηπατικού μιτοχονδριακού DNA στην ασθένεια Wilson. Πιστεύεται ότι η συσσώρευση χαλκού στα ηπατικά μιτοχόνδρια δρα προοξειδωτικά προκαλώντας την πρώιμη γήρανση τους [54].

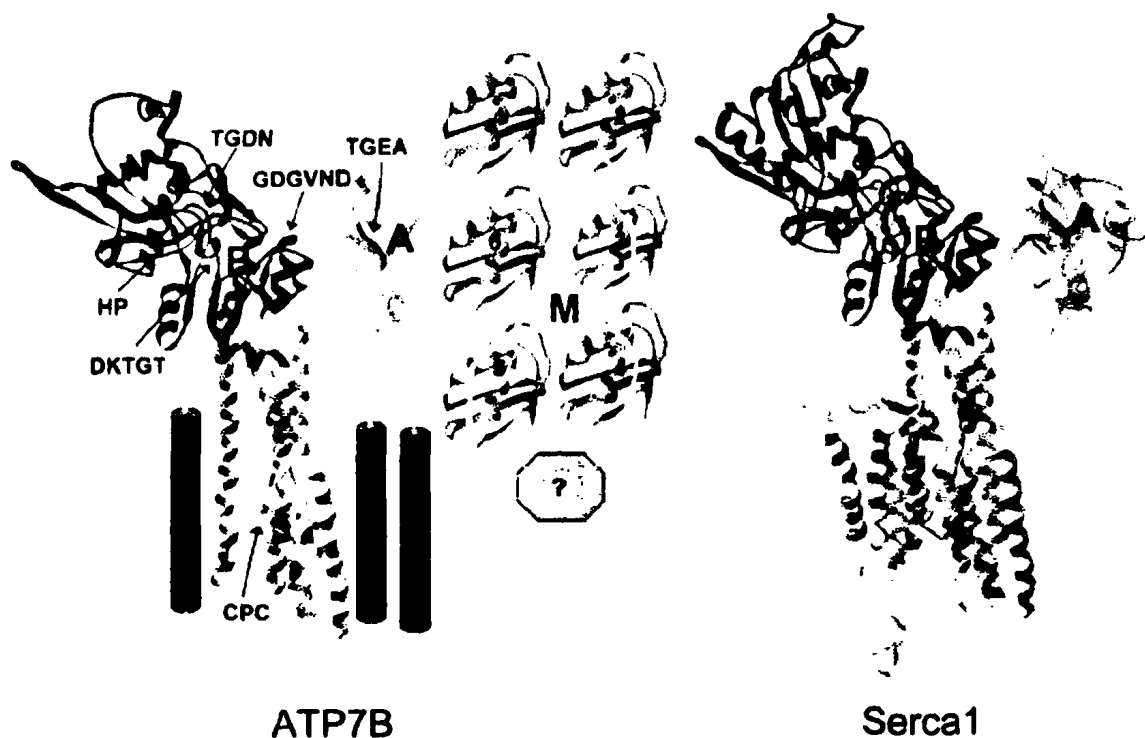
Από την άλλη, η έκφραση του γονιδίου ATP7B φαίνεται ότι παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ διαφορετικών ιστών. Έτσι, ενώ στο ήπαρ το mRNA του ATP7B κωδικοποιεί ολόκληρη την πρωτεΐνη, το mRNA που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα σε κύτταρα του εγκεφάλου δεν διαθέτει τα εξόνια 6, 7, 8 και 12 και οδηγεί στην έκφραση μικρότερης πρωτεΐνης. Μελέτη των προϊόντων της έκφρασης των δύο παραπάνω μορφών mRNA έδειξε ότι εντοπίζονται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. Συγκεκριμένα, η ηπατική πρωτεΐνη εντοπίζεται στη συσκευή Golgi ενώ η πρωτεΐνη του εγκεφάλου βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα [16].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το μοντέλο της ATP7B (σχήμα 2.4) που κατασκευάστηκε από τους N. Fatemi και B. Sarkar [55] με βάση την ομολογία της ATP7B προς άλλες P-τύπου ΑΤΡάσες και συγκεκριμένα την Ca-ΑΤΡάση SERCA1a της οποίας η δομή έχει λυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Για τον πυρήνα της ATP7B που περιλαμβάνει τις περιοχές μεταξύ των διαμεμβρανικών τμημάτων TM3 και TM7 (περιοχή φωσφατάσης - εκκίνησης (A), N-τελική περιοχή σύνδεσης μετάλλου (M), περιοχή σύνδεσης του ATP (N) και περιοχή φωσφορύλωσης (P)) ήταν δυνατό να κατασκευαστεί μοντέλο με επιτυχία. Τα πιο σημαντικά διατηρημένα αμινοξέα επισημαίνονται πάνω στο μόριο της ATP7B (σχήμα 2.4). Τα διαμεμβρανικά τμήματα TM1, TM2 και TM8 δεν αντιστοιχούν σε καμία από τις



16 2. Η ΑΤΡάση της ασθένειας Wilson (ATP7B): Δομή και λειτουργία

διαμεμβρανικές έλικες της SERCA1a και δεν κατασκευάστηκε μοντέλο γι' αυτά. Οι έξι περιοχές σύνδεσης χαλκού στη Ν-τελική περιοχή της ATP7B λαμβάνουν διαμόρφωση παρόμοια με της φερρεδοξίνης όπως και άλλες περιοχές σύνδεσης μετάλλου. Η περιοχή μεταξύ της 4^{ης} και της 5^{ης} περιοχής σύνδεσης του χαλκού μπορεί να αποτελεί περιοχή με ανεξάρτητη λειτουργία η οποία όμως δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμα. Η συνολική διαμόρφωση της Ν-τελικής περιοχής της ATP7B παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον και παραμένει προς το παρόν άγνωστη.



Σχήμα 2.4. Μοντέλο της ATP7B με βάση την ομολογία της προς της SERCA1a της οποίας η δομή είναι γνωστή [55].

Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο, οι τρεις κυτταροπλασματικές περιοχές των ΑΤΡασών Ρ-τύπου, Ρ, Ν και Α παίζουν διακριτούς ρόλους κατά τη μεταφορά των ιόντων. Το καταλυτικό κέντρο αποτελείται από τις περιοχές Ν και Ρ. Όταν έχει δεσμευθεί το ιόν, οι περιοχές Ν και Ρ σχηματίζουν μια διαμόρφωση που θυμίζει ανοικτή σιαγόνα οπότε απαιτείται το κλείσιμο των περιοχών Ν και Ρ ώστε να συμβεί η φωσφορυλίωση. Το κλείσιμο των περιοχών αυτών δεν εξαρτάται από την κατάληψη της θέσης σύνδεσης του ΑΤΡ. Επίσης η περιοχή Α, η οποία φαίνεται να εμπλέκεται στη μετάδοση των μεταβολών στη διαμόρφωση, δίσταται σε μεγάλο βαθμό από την κύρια δομή στη δεσμευμένη με το ιόν

μορφή. Αυτό σημαίνει ότι η δέσμευση του κατιόντος απουσία του δεσμευμένου ATP εξασθενεί την αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών περιοχών.

Όσον αφορά το ρόλο της N-τελικής περιοχής, σύμφωνα με τους N. Fatemi και B. Sarkar [55], τα μοτίβα σύνδεσης του χαλκού αποτελούν την αρχική θέση δέσμευσης του χαλκού πριν τη μεταφορά. Η δέσμευση του χαλκού στη N-τελική περιοχή εξασθενεί την αλληλεπίδραση της με την περιοχή N με αποτέλεσμα να διίστανται, όχι όμως πριν δοθεί ο χαλκός στη θέση υψηλής συγγένειας προς το χαλκό εντός του διαμεμβρανικού καναλιού. Στις ΑΤΡάσεις χαλκού έχει προβλεφθεί ότι η περιοχή μεταγωγής αποτελείται από τις διαμεμβρανικές έλικες TM6, TM7 και TM8. Πιθανολογείται ότι η θέση σύνδεσης του ιόντος χαλκού εντός του καναλιού είναι το μοτίβο CPC. Η διάσταση του N-τελικού άκρου από την περιοχή N αποκαθιστά τη συγγένεια της N περιοχής για το ATP. Η σύνδεση του ATP στην κατάσταση όπου το κατιόν είναι δεσμευμένο επάγει την αλληλεπίδραση των N και P περιοχών με την περιοχή A, το κενό μεταξύ των περιοχών κλείνει και το μοτίβο TGEA/S της περιοχής A πλησιάζει στο μοτίβο DKTG της περιοχής P όπου και λαμβάνει χώρα η φωσφορυλίωση (αποδέκτης της γ-φωσφορικής ομάδας είναι το Asp1027 του μοτίβου DKTG της περιοχής φωσφορυλίωσης). Οι μεταβολές αυτές στη διαμόρφωση μεταδίδονται στην περιοχή μεταγωγής, διαταράσσοντας τη θέση δέσμευσης του χαλκού και μεταβάλλοντας την ικανότητα πρόσβασης του στο κυτταρόπλασμα και στον αυλό. Η απελευθέρωση του κατιόντος εντός του αυλού μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση της περιοχής A επιτρέποντας στο νερό να πλησιάσει και να υδρολύσει το φωσφοένζυμο [55].

Πέρα από τη φυσιολογική της λειτουργία, η ATP7B φαίνεται να εμπλέκεται και σε μηχανισμούς αντίστασης στην αντικαρκινική δράση του cisplatin και των αναλόγων του. Διαπιστώθηκε ότι ανθρώπινα κύτταρα επιδερμικού καρκινώματος KB-3-1 τα οποία υπερεκφράζουν την ATP7B είναι περίπου 9 φορές πιο ανθεκτικά στο cisplatin [56]. Επιπλέον, διαπιστώθηκε αντίσταση στην αντικαρκινική δράση του carboplatin και του cisplatin σε κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος ωοθηκών τα οποία υπερέκφραζαν την ATP7B [57]. Ο μηχανισμός μέσω του οποίου η ATP7B προκαλεί την αντίσταση στην αντικαρκινική δράση των παραπάνω φαρμάκων είναι η ελάττωση στη συσσώρευσή τους στα κύτταρα. Δεδομένου ότι έχει διαπιστωθεί ότι η πρωτεΐνη φορέας CTR1 ρυθμίζει την πρόσληψη του cisplatin και των αναλόγων του από το κύτταρο [58-59] πιθανολογείται ότι



18 2. Η ATPάση της ασθένειας Wilson (ATP7B): Δομή και λειτουργία

τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούν τις πρωτεΐνες μεταφορείς και chaperon που έχουν ως προορισμό της ρύθμιση της ομοιοστασίας του χαλκού.

2.3. Μεταλλάξεις του γονιδίου της ATP7B

Πάνω από 200 μεταλλάξεις του γονιδίου της ATP7B έχουν περιγραφεί και περιλαμβάνονται σε βάση δεδομένων (<http://www.medgen.med.ualberta.ca/database>). Οι μεταλλάξεις αυτές περιλαμβάνουν μεταλλάξεις μίας βάσης, διαγραφής, μετατοπίσης πλαισίου, σφάλματα στο μάτισμα και μεταβολές στη μη κωδικοποιούμενη περιοχή της αντίθετης κατεύθυνσης του mRNA της ATP7B. Οι μεταλλάξεις χωρίς έννοια (missense mutations) απαντώνται πιο συχνά στην περιοχή σύνδεσης του ATP και το διαμεμβρανικό τμήμα, τονίζοντας τη σημασία αυτών των τμημάτων στην ATP-εξαρτώμενη μεταφορά του χαλκού από την ATP7B. Μελέτη μεταλλάξεων σημείου στο διαμεμβρανικό τμήμα οδήγησαν σε μείωση ή και απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης [44].

Η πιο κοινή μετάλλαξη είναι η His1069Gln (38% στη Βόρεια Αμερική) η οποία βρίσκεται στο κρίσιμο μοτίβο SEHPL [60]. Μελέτη της κοινής μετάλλαξης His1069Gln σε κύτταρα ινοβλαστών έδειξε ότι λόγω της μη σωστής αναδίπλωσης της, η πρωτεΐνη καταλήγει στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου όπου και εκφυλίζεται με αποτέλεσμα ο χρόνος ημιζωής της να ελαττώνεται 5 φορές. Στους 28 °C η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη διατηρεί τη σωστή θέση της στη συσκευή Golgi, δεδομένου ότι σε αυτή τη θερμοκρασία ελαττώνονται οι περιορισμοί ως προς την αναδίπλωση αλλά δεν ανακυκλώνεται όταν τα επίπεδα χαλκού αυξηθούν [61]. Ο εκφυλισμός της μετάλλαξης αυτής στα προτεασώματα του κυτταροπλάσματος επιβεβαιώνεται περαιτέρω και από την εργασία του M. Harada και των συνεργατών του [62]. Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι η His1069 παίζει κρίσιμο ρόλο στην εξαρτώμενη από το χαλκό μετακίνηση της πρωτεΐνης Wilson.

Από την άλλη, ο R. Tsivkovskii και των συνεργατών του, οι οποίοι μελέτησαν επίσης το ρόλο της His-1069 στην αναδίπλωση και τη λειτουργία της ATP7B, παρατήρησαν ότι μεταλλάξεις της His-1069 δεν επηρεάζουν την αναδίπλωση τόσο της περιοχής σύνδεσης του ATP όσο και όλη την πρωτεΐνη [63]. Επιπλέον, από τις δύο θέσεις φωσφορυλίωσης της ATP7B, την εξαρτώμενη από το χαλκό (αποδέκτης της γ-φωσφορικής ομάδας είναι μία σερίνη) [24, 36] και την εξαρτώμενη από το ATP (αποδέκτης της γ-φωσφορικής ομάδας είναι το Asp1027 του μοτίβου DKTG της περιοχής φωσφορυλίωσης), η πρώτη φαίνεται να

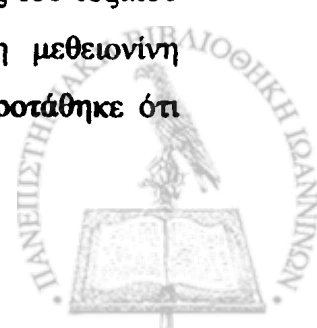


μην επηρεάζεται από τη μετάλλαξη της ιστιδίνης ενώ η δεύτερη ελαττώνεται σε σημαντικό βαθμό. Φαίνεται πιθανό ότι πριν τη μεταφορά του γ-φωσφορικού, η His-1069 κατευθύνει το ATP προς το καταλυτικό Asp1027 [63].

Παρόλο που δεν έχουν ταυτοποιηθεί παρόμοιες μεταλλάξεις στην αντίστοιχη περιοχή της πρωτεΐνης Menkes, τρεις μεταλλάξεις που προκαλούν την ασθένεια Wilson έχουν ταυτοποιηθεί στην περιοχή σύνδεσης του χαλκού (G85V, L429S και G591D) [64]. Η G591D βρίσκεται στην έκτη περιοχή σύνδεσης του χαλκού η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του χαλκού και τη μετακίνηση της ATP7B. Η έκφραση των τριών αυτών μεταλλάξεων δεν επηρέασε τη σωστή τοποθέτηση της ATP7B εντός του κυττάρου. Ωστόσο παρατηρήθηκε σημαντική εξασθένηση της αλληλεπίδρασης της N-τελικής περιοχής της ATP7B με την ATOX1 [34].

Μεταλλάξεις που καταργούν τη μετακίνηση της ATP7B είναι η G943S στην πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή, μετάλλαξη του μοτίβου CPC στο έκτο διαμεμβρανικό τμήμα και η M1356V στην όγδοη διαμεμβρανική περιοχή. Η διασπορά αυτή των μεταλλάξεων που καταργούν τη μετακίνηση της ATP7B δείχνει ότι δεν επηρεάζουν συγκεκριμένα σήματα που παίζουν διακριτούς ρόλους στην επαγόμενη από το χαλκό μετακίνηση. Μάλλον, η μετακίνηση της ATP7B εξαρτάται από τη μεταφορά του χαλκού καθώς αυτές οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την αναδίπλωση της πρωτεΐνης και την ικανότητά της να υφίσταται μεταβολές στη διαμόρφωση σε σύζευξη με την καταλυτική της δράση [24].

Ένα πειραμοτόζωο μοντέλο της ασθένειας Wilson είναι και ο μυς του τοξικού γάλακτος. Η μετάλλαξη του τοξικού γάλακτος είναι μια μετάλλαξη που κληρονομείται με τον αυτοσωματικό υπολειπόμενο χαρακτήρα στους μύες, ζώα μοντέλα της ασθένειας Wilson, και η οποία προκαλεί συσσώρευση του χαλκού στο ήπαρ που ξεκινά την τρίτη εβδομάδα ζωής και στους 6 μήνες η συγκέντρωση του χαλκού μπορεί να είναι 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του φυσιολογικού ενήλικα. Αυτή η σταδιακή συσσώρευση χαλκού στο ήπαρ είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται και στην ασθένεια Wilson. Επιπλέον, τα νεογέννητα έχουν έλλειψη χαλκού και το γάλα που παράγεται από τις μεταλλαγμένες μητέρες έχει χαμηλή συγκέντρωση χαλκού με αποτέλεσμα τα νεογέννητα να πεθαίνουν. Βρέθηκε ότι μια μετάλλαξη σημείου στο ομόλογο γονίδιο της ATP7B του μυός του τοξικού γάλακτος η οποία προβλέφθηκε ότι μετατρέπει μια υψηλά διατηρημένη μεθειονίνη (Met1386) σε βαλίνη στην όγδοη διαμεμβρανική περιοχή της ΑΤΡάσης. Προτάθηκε ότι



20 2. Η ΑΤΡάση της ασθένειας Wilson (ATP7B): Δομή και λειτουργία

αυτή η μετάλλαξη είναι υπεύθυνη για το φαινότυπο του τοξικού γάλακτος [65]. Η έκφραση αυτής της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης των μυών σε κύτταρα CHO (Chinese Hamster Ovary) έδειξε ότι βρίσκεται στη συσκευή Golgi σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις χαλκού ενώ σε αυξημένη συγκέντρωση χαλκού δεν μετακινείται αλλά παραμένει στη συσκευή Golgi [66]. Επιπλέον εμφανίζει κατά πολύ μειωμένη καταλυτική δραστηριότητα [67]. Στους φυσιολογικούς μύες και στους μύες του τοξικού γάλακτος που δεν παράγουν γάλα, η Atp7b βρίσκεται σε μια περιπυρηνική περιοχή των επιθηλιακών κυττάρων του αυλού. Η θέση αυτή δε μεταβάλλεται στους μύες του τοξικού γάλακτος που παράγουν γάλα. Αντιθέτως, στους φυσιολογικούς μύες που παράγουν γάλα, η Atp7b διασπείρεται σε κυτταροπλασματικά κοκκία. Η θέση αυτή δε μεταβάλλεται ανάλογα με το φορτίο χαλκού του φυσιολογικού μύος αλλά στο μυ του τοξικού γάλακτος η μεταλλαγμένη Atp7b βρίσκεται σε μια περιοχή μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος, θέση διαφορετική από αυτή του φυσιολογικού μύος. Θεωρήθηκε ότι η ATP7B έχει έναν επιπρόσθετο ρόλο, δηλαδή τη μεταφορά χαλκού στο γάλα στους αδένες του μαστού. Η γαλουχία αυξάνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα χαλκού με αποτέλεσμα τη νέα τοποθέτηση της ATP7B ώστε να αυξάνει τη μεταφορά του χαλκού εντός του γάλακτος. Η παραγωγή γάλακτος με χαμηλή συγκέντρωση χαλκού από το μυ του τοξικού γάλακτος οφείλεται πιθανόν στην έλλειψη λειτουργίας και μετακίνησης της μεταλλαγμένης Atp7b [68].

2.4. Δομή των αλληλουχιών σύνδεσης μετάλλου



Σχήμα 2.5. Τρισδιάστατη δομή της MerP όπως προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία NMR [70].

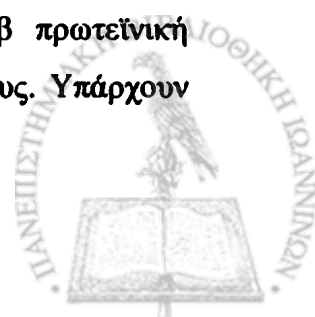
Οι αλληλουχίες σύνδεσης μετάλλου χρησιμοποιούνται με διάφορους τρόπους για τη μεταφορά βαρέων μετάλλων σε πρωτεΐνες στόχους. Είναι σχετικά μικρά πολυπεπτίδια (70-80) αμινοξέα, με υψηλή ομολογία (30-50% ταύτιση αλληλουχίας), τα οποία περιέχουν την αλληλουχία MXCXXC (όπου X είναι οποιοδήποτε αμινοξύ). Η πρότυπη αλληλουχία σύνδεσης μετάλλου είναι η MerP, η περιπλαστική πρωτεΐνη από το βακτηριακό σύστημα εξουδετέρωσης του υδραργύρου [69]. Ο προσδιορισμός της δομής της MerP [70-71] έδειξε ότι έχει διαμόρφωση βαββαβ, χαρακτηριστική των φερρεδοξινών.



Εκτός από τις πρωτεΐνες και τις περιοχές σύνδεσης μετάλλου, πολυπεπτίδια με αυτή τη διαμόρφωση είναι και οι πρωτεϊνικές περιοχές σύνδεσης RNA, σύνδεσης DNA, ακυλ-φωσφατάσες και η ρυθμιστική περιοχή της δεϋδρογονάσης της φωσφογλυκερόλης. Αυτές οι πρωτεΐνες δεν φαίνεται να έχουν κοινές λειτουργίες και τα ενεργά κέντρα τους διαφέρουν δραματικά. Όπως φαίνεται από τη δομή της MerP (σχήμα 2.5), οι δύο α-έλικες βρίσκονται πάνω από ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο τεσσάρων αλυσίδων ενώ ο βρόχος που συνδέονται τα μέταλλα βρίσκεται μεταξύ της πρώτης αλυσίδας του β-φύλλου και την πρώτη α-έλικα [70].

Όσον αφορά τα συστήματα μεταφοράς του χαλκού και συγκεκριμένα τις ΑΤΡάσες Ρ-τύπου, η παρουσία 1-6 αλληλουχιών σύνδεσης μετάλλου βρέθηκε λόγω της ομολογίας τους με τη MerP [72]. Στον άνθρωπο, ο χαλκός μεταφέρεται μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης από την πρωτεΐνη-φορέα CTR1 [73-74]. Η ATOX1 (HAH1) έπειτα μεταφέρει το χαλκό στις ΑΤΡάσες Menkes ή Wilson. Η δομή της HAH1 έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ [75]. Επίσης οι δομές της πρώτης (MNK1) και της τέταρτης (MNK4) [76] περιοχής σύνδεσης μετάλλου της ATP7A έχουν προσδιοριστεί με φασματοσκοπία NMR. Εκτός από την HAH1, ο άνθρωπος διαθέτει και μια δεύτερη πρωτεΐνη chaperone χαλκού, την CCS [77], της οποίας πρωτεΐνη-στόχος είναι η σουπεροξειδική δισμουτάση Cu, Zn (SOD1). Η δομή μιας περιοχής της CCS που προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ [78] δείχνει ότι η πρωτεΐνη έχει μια περιοχή σύνδεσης μετάλλου και μια άλλη περιοχή παρόμοια σε δομή με την πρωτεΐνη-στόχο της, SOD1. Στη μαγιά, μετά από πρόσληψη μέσω της CTR1, η Atx1, το ανάλογο της HAH1, μεταφέρει χαλκό στη Ccc [79], μία ΑΤΡάση που έχει δύο περιοχές σύνδεσης μετάλλου. Η δομή της Atx1 έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ [80] και σε διάλυμα με φασματοσκοπία NMR [81]. Η δομή της πρώτης αμινο-τελικής περιοχής σύνδεσης μετάλλου έχει επίσης προσδιοριστεί με φασματοσκοπία NMR [82]. Η μαγιά διαθέτει επίσης CCS [73] η οποία μεταφέρει το χαλκό στη σουπεροξειδική δισμουτάση και η κρυσταλλική δομή της έχει προσδιοριστεί [83]. Στα βακτήρια, η CopZ παραδίδει χαλκό σε δύο ΑΤΡάσες χαλκού, τις CopA και CopB [84]. Οι δομές της CopZ από τον *Enterococcus hirae* [85] και τον *Bacillus subtilis* [86] έχουν προσδιοριστεί σε διάλυμα με φασματοσκοπία NMR.

Όλες οι αλληλουχίες σύνδεσης μετάλλου έχουν την ίδια βαββαβ πρωτεϊνική διαμόρφωση όπως αναμένεται δεδομένου του υψηλού βαθμού ομολογίας τους. Υπάρχουν



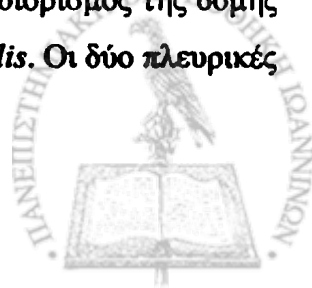
22 2. Η ATPάση της ασθένειας Wilson (ATP7B): Δομή και λειτουργία

σχετικά μικρές διαφορές στις δομές των βρόχων σύνδεσης του μετάλλου και σε μικρότερο βαθμό σε στοιχεία της δευτεροταγούς δομής. Οι διαφορές μεταξύ της ελεύθερης μετάλλου και της δεσμευμένης με μέταλλο μορφής των βρόχων σύνδεσης μετάλλου ποικίλλουν. Οι λεπτομέρειες των αλληλεπιδράσεων των μετάλλων με τα αμινοξέα των βρόχων σύνδεσης μετάλλου έχουν μεγάλο ενδιαφέρον και άμεση σχέση με τη βιολογική λειτουργία των πρωτεϊνών. Έχουν προσδιοριστεί οι δομές των αλληλουχιών σύνδεσης μετάλλου δεσμευμένα με διάφορα μέταλλα, όπως Hg(II), Ag(I) και Cu(I).

Οι δομικές και οι φασματοσκοπικές διαφορές μεταξύ της δεσμευμένης με μέταλλο και της ελεύθερης μετάλλου μορφής της πρότυπης αλληλουχίας σύνδεσης μετάλλου, MerP, περιορίζονται στο βρόχο σύνδεσης μετάλλου και τις γειτονικές περιοχές που περιλαμβάνουν την πρώτη έλικα, το καρβοξυ-τελικό άκρο του πρώτου β-φύλλου, το αμινο-τελικό άκρο του τρίτου β-φύλλου και τη στροφή μεταξύ της δεύτερης έλικας και του τέταρτου β-φύλλου [70]. Δεδομένα φασματοσκοπίας NMR ^{199}Hg δείχνουν ότι το μέταλλο εντάσσεται στις σουλφυδρυλομάδες των δύο κυστεϊνών με γραμμική διενταγμένη γεωμετρία. Η οξειδωμένη μορφή της MerP, όπου οι δύο κυστεϊνες στο βρόχο σύνδεσης μετάλλου σχηματίζουν δισουλφιδική γέφυρα, έχει επίσης λυθεί με NMR [87] και η δομή της είναι ταυτόσημη με τη δεσμευμένη με μέταλλο MerP.

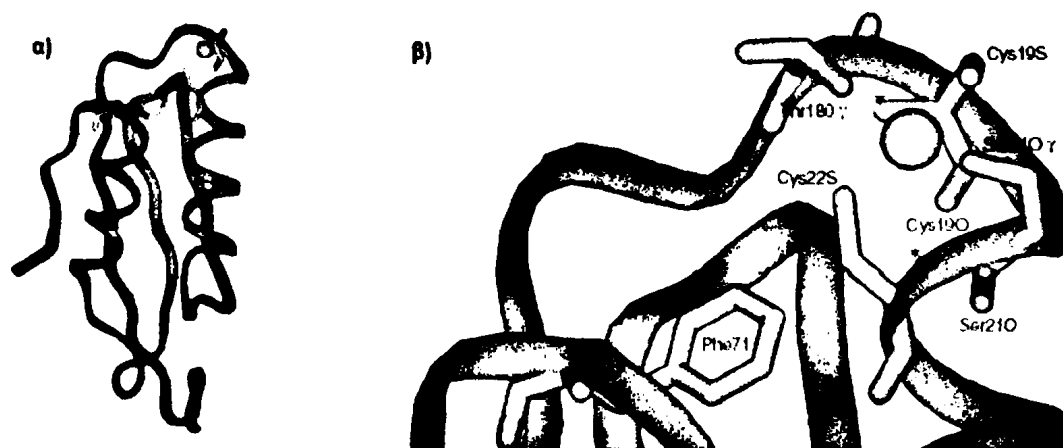
Μελέτες EXAFS της Cu(I)-Atx1 [88] δείχνουν την παρουσία ενός τρίτου απόμακρου υποκαταστάτη στο κέντρο σύνδεσης του μετάλλου εκτός των ατόμων θείου των δύο κυστεϊνών. Αρχικά προσδιορίστηκαν οι δομές της συνδεδεμένης με υδράργυρο και ελεύθερης μετάλλου Atx1 με κρυσταλλογραφία ακτίνων X [80] και πιο πρόσφατα η συνδεδεμένη με χαλκό και η ελεύθερη μετάλλου μορφή σε διάλυμα μέσω φασματοσκοπίας NMR [81]. Η δομή της Atx1 σε διάλυμα από το *Saccharomyces cerevisiae* δείχνει ότι οι πλευρικές αλυσίδες των δύο κυστεϊνών εντάσσονται στο άτομο Cu(I), παρόλο που η γωνία S-Cu-S ($120^\circ \pm 40^\circ$) δείχνει ότι ο Cu(I) μπορεί να έχει ένταξη >2 . Ωστόσο, μελέτες NMR ^{199}Hg της Atx1 έδειξαν χημικές μετατοπίσεις που αναλογούν σε γραμμική διθειολική ένωση.

Οι δομές των βακτηριακών μεταφορέων χαλκού, CopZ από τον *Enterococcus hirae* [89] και από τον *Bacillus subtilis* [86] έχουν προσδιοριστεί σε διάλυμα με φασματοσκοπία NMR. Τα δύο πολυπεπτίδια παρουσιάζουν 39% ομολογία και οι ελεύθερες μετάλλου μορφές έχουν την ίδια διαμόρφωση με τη MerP. Ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της δομής μόνο για τη δεσμευμένη με Cu(I) μορφή της πρωτεΐνης από τον *B. subtilis*. Οι δύο πλευρικές



αλυσίδες των κυστεϊνών έχουν τα άτομα θείου προσανατολισμένα προς το άτομο χαλκού. Οι δεσμοί Cys-Cu(I)-Cys σχηματίζουν γωνία $115^\circ \pm 26^\circ$, η οποία αντιστοιχεί σε τρι-ένταξη πιθανόν λόγω της συμμετοχής του DTT που είναι παρόν στο διάλυμα.

Μελέτες EXAFS των κυτταροπλασματικών περιοχών σύνδεσης χαλκού της ATP7A [90] και της ATP7B [27] έδειξαν ότι οι πλευρικές αλυσίδες των δύο κυστεϊνών είναι οι κύριοι υποκαταστάτες του Cu(I) σε όλες τις περιοχές σύνδεσης του μετάλλου. Μελέτες ^{199}Hg NMR της πρώτης περιοχής σύνδεσης μετάλλου της ATP7A [91], όπως και της MerP [70] έδειξαν ότι το μέταλλο αυτό συνδέεται στις δύο κυστεϊνικές πλευρικές αλυσίδες με δι-ενταγμένη γεωμετρία. Η δομή σε διάλυμα της MNK1 συνδεδεμένη με Cu(I) (Σχήμα 2.6) που προσδιορίστηκε πρόσφατα δείχνει επίσης απόκλιση 10° - 20° από τη γραμμική διθειολική ένταξη στον Cu(I) (180°) [91]. Η λύση της δομής της MNK4 συνδεδεμένη με Ag(I) αναφέρει και άλλους υποκαταστάτες στη θέση σύνδεσης του μετάλλου που πιθανώς θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην ένταξη.



Σχήμα 2.6. Τρισδιάστατη δομή της MNK1 (ATP7A) συνδεδεμένη με Cu(I). (α) Πλήρης δομή της MNK1 συνδεδεμένη με Cu(I). (β) Μεγέθυνση του βρόχου σύνδεσης μετάλλου όπου φαίνεται η πλευρική αλυσίδα O_γ των Thr18 και Ser21, το οξυγόνα του σκελετού των Cys19 και Ser21, τα άζωτα του σκελετού των Cys19 και Cys22 που επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Η Phe71 με το πράσινο χρώμα αποτελεί υψηλά διατηρημένο αμινοξύ σε όλες τις περιοχές σύνδεσης της πρωτεΐνης Menkes [70].

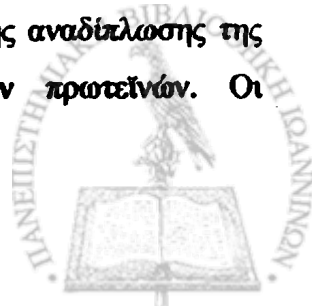
Στο σχήμα 2.6β φαίνεται μεγέθυνση του βρόχου σύνδεσης μετάλλου που δείχνει την πλευρική αλυσίδα O_γ της Thr18 και της Ser21, τα οξυγόνα του σκελετού των Cys19 και Ser21 και τα άζωτα του σκελετού των Cys19 και Cys22 που επισημαίνονται με έναν αστερίσκο (*). Τα O_γ της Thr18 και της Ser21 βρίσκονται σε απόσταση 2,5 Å από το ιόν του Cu(I), απόσταση που αντιστοιχεί σε δευτεροταγείς αλληλεπιδράσεις. Επίσης, τα άζωτα του

24 2. Η ATPάση της ασθένειας Wilson (ATP7B): Δομή και λειτουργία

σκελετού των Cys19 και Cys22 και τα οξυγόνα του σκελετού των Cys19 και Ser21 βρίσκονται επίσης σε απόσταση περίπου 2,5 Å από το μεταλλικό κέντρο. Οι Thr18 και Ser21 δεν παρατηρούνται στα $^1\text{H} / ^{15}\text{N}$ HSQC φάσματα των απο-MNK1 και MNK4, γεγονός που δείχνει ότι υφίστανται ανταλλαγή ή κινήσεις σε κλίμακα χρόνου τέτοια που οδηγεί σε διεύρυνση των κορυφών. Ωστόσο, όταν συνδέεται το μέταλλο στη MNK1 και στη MNK4, οι κορυφές αυτές εμφανίζονται. Παρόμοια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί για τα αντίστοιχα αμινοξέα της Atx1 και της CopZ.

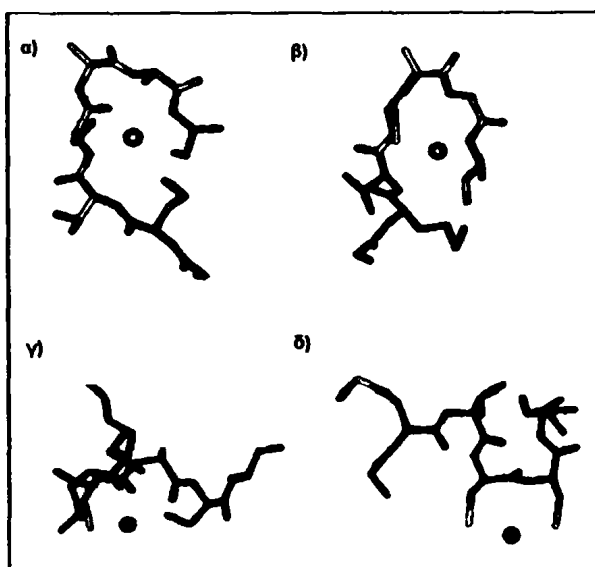
Αρωματικά αμινοξέα κοντά στο βρόχο σύνδεσης μετάλλου μπορεί να το εξαναγκάζουν σε συγκεκριμένο προσανατολισμό ώστε να συνδέονται τα μέταλλα. Για παράδειγμα, στην απο-μορφή της MerP, το αμινοξύ Phe38 που βρίσκεται στη στροφή μεταξύ των β-φύλλων 2 και 3 κατευθύνεται προς το βρόχο σύνδεσης μετάλλου. Ωστόσο, στη μορφή της MerP που συνδέεται με τον Hg(II), ο δακτύλιος της Phe38 απομακρύνεται από το βρόχο. Η κίνηση της Phe38 στην απο- και τη δεσμευμένη μορφή θα μπορούσε να είναι μια μέθοδος ρύθμισης ή διάκρισης των μετάλλων επειδή οι MNK1, MNK4, CopZ, Atx1 και Ccc2 έχουν μια λευκίνη σε αυτή τη θέση και οι δομές τους δείχνουν κοντινές επαφές με τη θέση δέσμευσης του μετάλλου. Τα έξι μοτίβα σύνδεσης μετάλλου των πρωτεϊνών Menkes και Wilson και της Ccc2 έχουν όλα μια υψηλά διατηρημένη φαινυλαλανίνη που βρίσκεται στο καρβοξυ-τελικό άκρο του κάθε μοτίβου που αντικρύζει το βρόχο σύνδεσης μετάλλου. Στις MerP και CopZ, το αμινοξύ αυτό είναι η τυροσίνη και στην Atx1 η λυσίνη. Όλες οι δομές των πρωτεϊνών αυτών αναφέρουν ότι αυτό το αμινοξύ είναι μερικός δότης ή συμμετέχει σε αλληλεπίδραση Van der Waals με συγκεκριμένα αμινοξέα του βρόχου σύνδεσης μετάλλου.

Για την κατανόηση πως αυτές οι αρωματικές αλυσίδες μπορούν να σταθεροποιήσουν το βρόχο σύνδεσης μετάλλου, κατασκευάστηκε μετάλλαξη της Phe σε Ala στη θέση 71 της MNK1 [91] και αντίστοιχα στην Tyr66 της MerP. Ενώ η φυσιολογική MNK1 και η Phe71Ala MNK1 μετακινούνται στην ίδια θέση στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, ωστόσο έχουν διαφορετικό χρόνο κατακράτησης σε στήλη μοριακής διήθησης δείχνοντας έτσι ότι έχουν διαφορετική ακτίνα Stokes. Οι Phe71Ala MNK1 και Tyr66Ala MerP εκλύονται ταχύτερα από στήλη μοριακής διήθησης σε σχέση με τη φυσιολογική MNK1 συνιστώντας ότι καταλαμβάνουν μεγαλύτερο όγκο. Για περαιτέρω χαρακτηρισμό της αναδίπλωσης της πρωτεΐνης, ελήφθησαν φάσματα NMR των δύο μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. Οι



περισσότερες κορυφές έλειπαν από αυτά τα φάσματα δείχνοντας ότι οι Phe71Ala MNK1 και Tyr66Ala MerP βρίσκονται σε μία μερικώς ξεδιπλωμένη κατάσταση η οποία είναι πιο προσιτή στο διαλύτη. Από τα πειράματα αυτά φάνηκε ότι αυτή η υψηλά διατηρημένη αρωματική πλευρική αλυσίδα που αντικρύζει το βρόχο σύνδεσης μετάλλου είναι σημαντική για τη σταθεροποίηση της δομής.

Οι τρισδιάστατες δομές των αμινοξέων 6-23 του βρόχου σύνδεσης μετάλλου της MerP και τριών διαφορετικών συνθετικών γραμμικών 18-πεπτιδίων με την ίδια σύνθεση αμινοξέων και σχεδόν ταυτόσημες αλληλουχίες συγκρίνονται στο σχήμα 2.7. Όχι μόνο η δομή του πεπτιδίου CAAC είναι παρόμοια με αυτή της ίδιας αλληλουχίας που βρίσκεται στη MerP, αλλά διατηρεί επίσης και την εκλεκτικότητα ως προς τη δέσμευση διαφόρων μετάλλων παρόλο που οι συγγένειες ως προς τα διάφορα μέταλλα είναι μια τάξη μεγέθους μικρότερη σε σύγκριση με την πρωτεΐνη [92]. Τα άλλα δύο πεπτίδια (CACA, CCAA) συντέθηκαν με ακριβώς την ίδια αλληλουχία εκτός από



μία αλλαγή στη θέση των δύο κυστεϊνών. Οι συγγένειες τους ως προς τη σύνδεση με μέταλλα δείχνουν ότι η εκλεκτικότητα

Σχήμα 2.7. Οι τρισδιάστατες δομές των συνδεδεμένων με υδράργυρο βρόχων σύνδεσης μετάλλων: (α) η πρωτεΐνη MerP, (β) το πεπτίδιο CAAC, (γ) το πεπτίδιο CACA, (δ) το πεπτίδιο CCAA [93].

μεταβάλλεται με αλλαγή της θέσης των κυστεϊνών και οι δομές των πεπτιδίων δεσμευμένων με μέταλλα σε διάλυμα δείχνουν ότι η γεωμετρία του μορίου παίζει σημαντικό ρόλο στη διάκριση των μετάλλων [93]. Η εκλεκτικότητα μεταξύ των διαφόρων μετάλλων είναι σημαντική όσο και η συγγένεια. Τα δεδομένα δείχνουν ότι το πεπτίδιο CCAA με γειτονικές κυστεΐνες δεσμεύει τον Hg(II) με υψηλή εκλεκτικότητα. Ίσως η μικρή απόσταση των γειτονικών κυστεϊνών επιβάλλει γραμμική διενταγμένη γεωμετρία. Ωστόσο, ο Ag(I) είναι γνωστό ότι εντάσσεται επίσης σε γραμμική διενταγμένη γεωμετρία, συνιστώντας ότι η ιονική ακτίνα του υδραργύρου προτιμάται έναντι αυτής του αργύρου. Αυτό διαφέρει δραματικά στην περίπτωση της MerP και των πεπτιδίων CAAC και CACA, τα οποία δεσμεύουν πολλά μέταλλα με παρόμοια συγγένεια.



26 2. Η ΑΤΡάση της ασθένειας Wilson (ATP7B): Δομή και λειτουργία

Υπάρχουν δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι MerF και MerT που εμπλέκονται στη μεταφορά του Hg(II) από το περίπλασμα στο κυτταρόπλασμα, όπου ανάγεται σε Hg(0) από τη ρεδοκτάση του υδραργύρου. Και τα δύο κέντρα δέσμευσης του υδραργύρου στη MerF και ένα από τα δύο κέντρα στη MerT έχουν γειτονικές κυστεΐνες [94-95]. Το πεπτίδιο που περιέχει γειτονικές κυστεΐνες, CCAA, δεσμεύει αποκλειστικά τον υδράργυρο, συνιστώντας ότι ένα μεγάλο μέρος της εξειδίκευσης στο σύστημα εξουδετέρωσης του υδραργύρου στα βακτήρια μπορεί να οφείλεται στις πρωτεΐνες μεταφοράς μετάλλων παρά στην περιπλασμική πρωτεΐνη MerP, η οποία μπορεί να δεσμεύσει πολλά διαφορετικά μέταλλα επειδή έχει την αλληλουχία CAAC στο βρόχο σύνδεσης μετάλλου της.

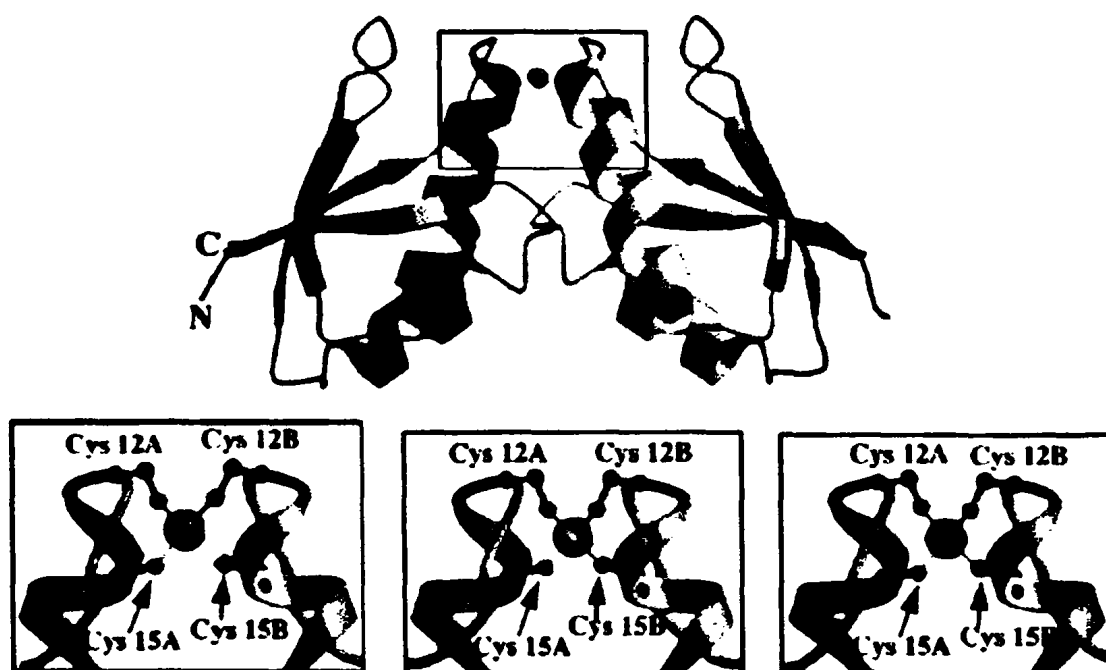
2.5. Μηχανισμός μεταφοράς του χαλκού από τις πρωτεΐνες chaperone στις πρωτεΐνες Menkes/Wilson

Ο μηχανισμός μεταφοράς χαλκού από την ATOX1 στις πρωτεΐνες Menkes και Wilson είναι άγνωστος αλλά έχει προταθεί ότι εμπλέκει τα μοτίβα MT/HCXXC (όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ), παρόντα τόσο στην πρωτεΐνη chaperone όσο και στις N-τελικές περιοχές των ΑΤΡασών στόχων. Η ATOX1 περιέχει ένα τέτοιο μοτίβο, ενώ για τις πρωτεΐνες Menkes και Wilson είναι γνωστό ότι περιέχουν έξι. Η ATOX1 δεσμεύει ένα ιόν χαλκού [75]. Όπως προκύπτει από φασματοσκοπικές μελέτες, ο Cu(I) στις πρωτεΐνες Menkes και Wilson είναι διενταγμένος στις Cys του μοτίβου MT/HCXXC ενώ για την Atx1, την chaperone χαλκού της μαγιάς, παρατηρήθηκε η ύπαρξη ενός επιπλέον υποκαταστάτη, πιθανόν μια εξωγενής θειολική ομάδα [88]. Με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα για την Atx1, έχει προταθεί ότι η μεταφορά του χαλκού πραγματοποιείται με πλησίασμα της πρωτεΐνης chaperone και της πρωτεΐνης-στόχου οπότε και οι θέσεις σύνδεσης μετάλλου MT/HCXXC βρίσκονται πολύ κοντά ώστε να σχηματιστούν δι-ενταγμένα και τρι-ενταγμένα ενδιάμεσα στα οποία το μεταλλοϊόν εντάσσεται ταυτόχρονα και στις δύο πρωτεΐνες [88].

Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής της ATOX1 (Hah1) παρουσία Cu(I) (CuHah1), Hg(II) (HgHah1) και Cd(II) (CdHah1) υπήρξε ιδιαίτερα διαφωτιστικός σχετικά με το μηχανισμό μεταφοράς του χαλκού από την ATOX1 στις πρωτεΐνες-στόχους (σχήμα 2.8) [75, 89]. Στην κρυσταλλογραφική ασύμμετρη κυψελίδα, δύο μόρια της Hah1 συνδέονται με ένα μεταλλοϊόν και ουσιαστικά η Hah1 είναι η πρώτη από τις πρωτεΐνες σύνδεσης μετάλλου της οποίας η δομή έχει χαρακτηριστεί και ένα μεταλλοϊόν εντάσσεται

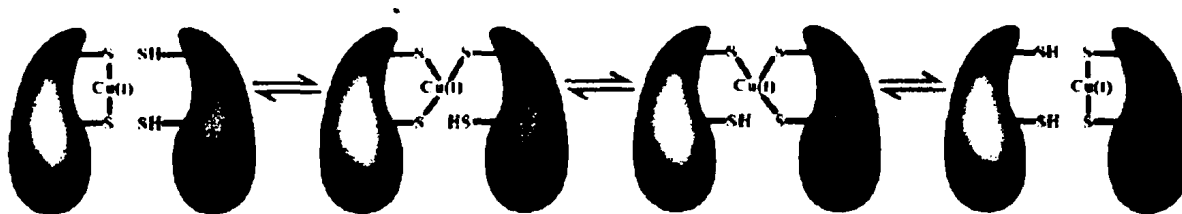


σε περισσότερα από ένα μόρια πρωτεΐνης (σχήμα 2.8). Στην CdHah1, το ιόν Cd(II) εντάσσεται τετραεδρικά από τέσσερις κυστεΐνες, Cys A12 και Cys A15 από το A μονομερές και Cys B12 και Cys B15 από το B μονομερές. Οι αποστάσεις Cd-S είναι 2,4 Å για τις Cys A12 και Cys B12 και 2,5 Å για τις Cys A15 και Cys B15. Στην HgHah1, το μεταλλικό κέντρο εμφανίζει παραμορφωμένη τετραεδρική γεωμετρία με αποστάσεις Hg-S 2,3 Å για την Cys A12, 2,5 Å για την Cys B12, 2,5 Å για την Cys A15 και 2,8 Å για την Cys B15. Οι τρεις πρώτες αποστάσεις συμφωνούν με τρι-ένταξη του Hg(II) ενώ η απόσταση Hg-S 2,8 Å για την Cys B15 είναι πολύ μεγάλη για ομοιοπολικό δεσμό και αντιστοιχεί σε δευτεροταγή αλληλεπίδραση. Δηλαδή, ο Hg(II) είναι τρι-ενταγμένος στην HgHah1. Στην CuHah1, τα άτομα θείου των κυστεϊνών παρατάσσονται σε παραμορφωμένη τετραεδρική γεωμετρία με αποστάσεις Cu-S 2,3 Å για τις Cys A12, Cys B12 και Cys B15 και 2,4 Å για την Cys A15. Η τέταρτη απόσταση Cu-S, 2,4 Å, δεν συμφωνεί με τις δεσμικές αποστάσεις γνωστές για σύμπλοκα του Cu(I) με υποκαταστάτες S, N ή O και συνεπώς θεωρείται δευτεροταγής αλληλεπίδραση. Σε όλες τις παραπάνω δομές τα δύο μόρια Hah1 συγκρατούνται μαζί περαιτέρω από το σχηματισμό δικτύου διαμοριακών δεσμών υδρογόνου [75].



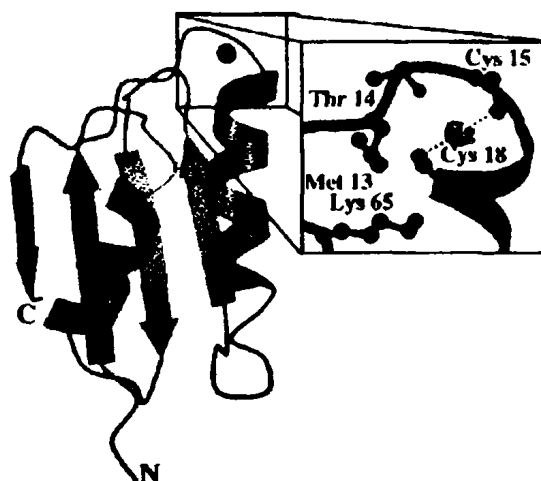
Σχήμα 2.8. Δομή της Hah1. Στις μεγεθύνσεις φαίνονται οι λεπτομέρειες της ένταξης των μεταλλοϊόντων Hg(II), Cu(II) και Cd(II) [89].





Σχήμα 2.9. Προτεινόμενος μηχανισμός της μεταφοράς του χαλκού από την Hah1 σε μια περιοχή σύνδεσης μετάλλου των πρωτεϊνών Menkes και Wilson. Η Hah1 είναι μπλε και η πρωτεΐνη-στόχος είναι μωβ [89].

Οι παραπάνω δομές της Hah1 προσφέρουν μια πρώτη μοριακή εικόνα για το πως μπορεί να επιτευχθεί η μεταφορά μεταλλοϊόντος μεταξύ περιοχών που περιέχουν το μοτίβο MT/HCXXC [75, 89] (σχήμα 2.9). Όπως φαίνεται, τα δύο μοτίβα MT/HCXXC μπορούν να συμπλησιάσουν ώστε είναι δυνατός ο μηχανισμός απευθείας μεταφοράς του μετάλλου. Έτσι, όταν η CuHah1 πλησιάζει το στόχο της, μια απο- περιοχή της πρωτεΐνης Menkes ή Wilson, μπορεί να υιοθετήσει μια δι-ενταγμένη γεωμετρία Cu(I), παρόμοια με αυτή που παρατηρήθηκε για την HgAtx1 (σχήμα 2.10). Καθώς πλησιάζουν, μια κυστεΐνη από την πρωτεΐνη-στόχο σχηματίζει έναν τρίτο δεσμό με το ιόν του Cu(I). Με βάση τη δομή, ο τρίτος υποκαταστάτης είναι



Σχήμα 2.10. Δομή της Atx1 δεσμευμένης με Hg(II). Η μεγέθυνση δείχνει λεπτομέρειες της θέσης σύνδεσης του μετάλλου [89].

πιθανότατα η N-τελική Cys του μοτίβου MT/HCXXC, η ανάλογη της Cys 12 της Hah1, η οποία βρίσκεται σε πιο εύκαμπτο βρόχο. Το πρώτο ενδιάμεσο που σχηματίζεται θα ομοιάζει με τη δομή της HgHah1. Έπειτα ο δεσμός του ιόντος χαλκού και της Cys 15 της Hah1 σπάει και σχηματίζεται δεσμός με την Cys 15 της πρωτεΐνης-στόχου. Αυτό το ενδιάμεσο αντιπροσωπεύεται από τη δομή της CuHah1. Τέλος, το ιόν του χαλκού καταλήγει να είναι ενταγμένο στις δύο κυστεΐνες της πρωτεΐνης-στόχου, όπως στη δομή της συμπλεγμένης με Ag(I) MNK4, οπότε και η πρωτεΐνη chaperone απομακρύνεται. Αυτά τα βήματα πιθανόν ακολουθούνται και κατά τη μεταφορά χαλκού μεταξύ διαφορετικών μοτίβων σύνδεσης μετάλλου εντός της ίδιας πρωτεΐνης. Ο παραπάνω μηχανισμός φαίνεται να συμφωνεί και με

πειράματα τα οποία έδειξαν ότι όταν η Hah1 αναμιγνύεται με Cd(II) δεν αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Wilson [31]. Είναι πιθανό ότι το διμερές CdHah1 είναι τόσο σταθερό που εμποδίζει την πρωτεΐνη Wilson να πλησιάσει και επομένως και τη μεταφορά του μεταλλοϊόντος. Αντιθέτως, τα ιόντα Cu(II) και Hg(II) δεν σχηματίζουν τέσσερις δεσμούς με τις θειολικές ομάδες και μπορεί να βρίσκονται σε ισορροπία επιτρέποντας το συμπλησίμα σε μια άλλη περιοχή.



Κεφάλαιο



**ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΑ
ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ
ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

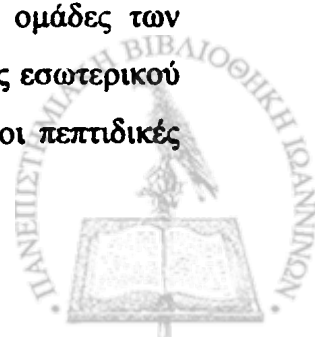


3. ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΑ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Μικρά πολυπεπτίδια που απαντώνται στη φύση ως τμήματα πρωτεϊνικών μεμβρανικών περιοχών αλλά και πεπτίδια που σχεδιάζονται εκ νέου μπορούν να μιμηθούν επαρκώς δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά μεμβρανικών πρωτεϊνών ενώ ταυτόχρονα έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να παρασκευασθούν σε ποσότητες των mg και να υποστούν βιοφυσικές αναλύσεις και είναι τόσο απλά που τα δομικά χαρακτηριστικά τους μπορούν να εξαχθούν με ακρίβεια [96]. Για παράδειγμα, η γραμισιδίνη A, ένα υδρόφοβο 15πεπτίδιο, το οποίο σχηματίζει κανάλια ιόντων εντός μεμβρανών, έχει χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για την κατανόηση της αναδίπλωσης μεμβρανικών πρωτεϊνών και τη δομή και λειτουργία των καναλιών ιόντων [97-98]. Παρόμοιες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με την αλαμεθικίνη (*Trichoderma Viride*) [99], την παρδαξίνη [100] και άλλα συνθετικά πεπτίδια [101]. Επιπλέον απόδειξη ότι συνθετικά πεπτίδια που αντιστοιχούν σε πραγματικές διαμεμβρανικές αλληλουχίες μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορούν να αναδιπλωθούν και/ή να συγκροτηθούν στις καταστάσεις δέσμευσης στη μεμβράνη, φαίνεται από μελέτες της διαμεμβρανικής περιοχής της γλυκοφορίνης A (μικρή πρωτεΐνη με άγνωστη λειτουργία που βρίσκεται στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων) [102], των πρωτεϊνών phospholamban (μικρή μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία ρυθμίζει τη δράση της Ca^{2+} -ATPάσης του σαρκοπλασματικού δικτύου) [103] και της minK (minimal potassium channel protein) [104], οι οποίες επάγουν κανάλια.

Η κρυστάλλωση μεμβρανικών πρωτεϊνών παρουσιάζει μεγάλη δυσκολία, ωστόσο υπάρχει ένας περιορισμένος αριθμός επιτυχιών όπως το φωτοσυνθετικό κέντρο [105], η βακτηριοροδοψίνη [106], η κυτοχρωμική οξειδάση [107] και άλλα από τα οποία φαίνεται η κυριαρχία της δομής α-έλικας στα διαμεμβρανικά τμήματα. Επίσης, η φασματοσκοπία NMR έχει δείξει ότι το διαμεμβρανικό τμήμα της γλυκοφορίνης A έχει δομή α-έλικας [102].

Η έλικα είναι η προτιμώμενη δομή στο μεμβρανικό περιβάλλον επειδή (α) είναι συμπαγής και γραμμική ελαχιστοποιώντας την τοπική διαταραχή του πακεταρίσματος των λιπιδίων, (β) υδροφοβικές πλευρικές αλυσίδες βρίσκονται στην περιφέρεια της δομής, όπου μπορούν να αλληλεπιδράσουν αποτελεσματικά με τις μεθυλ- και μεθυλενο- ομάδες των λιπιδίων και (γ) ηλεκτραρνητικά άτομα N και O "εξουδετερώνονται" μέσω ενός εσωτερικού δικτύου δεσμών υδρογόνου. Όπου υπάρχουν δομές β-φύλλου σε μεμβράνες, οι πεπτιδικές

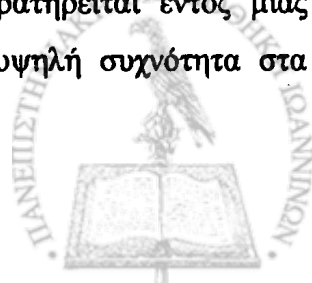


ομάδες NH και C=O ενσωματώνονται σε κυλινδρικά β-βαρέλια όπως φαίνεται και στην κρυσταλλική δομή της α-αιμολυσίνης [107].

Η σημασία του μοριακού περιβάλλοντος ως καθοριστικού παράγοντα στη διαμόρφωση γίνεται εμφανής αν θεωρήσουμε τις σχετικές τάσεις για σχηματισμό α-έλικας και β-φύλλου των αμινοξέων των σφαιρικών πρωτεϊνών σε σύγκριση με τις τάσεις αυτές εντός της μεμβράνης. Υδρόφοβα αμινοξέα (Ala, Leu, Val, Ile, Phe) φυσιολογικά κυριαρχούν σε διαμεμβρανικά τμήματα μεμβρανικών πρωτεϊνών, αλλά τα αμινοξέα Ser, Thr, Met, Tyr, Trp και Gly παρατηρούνται επίσης. Παρόλη την υψηλή προτίμηση των διαμεμβρανικών τμημάτων για δομή έλικας, αμινοξέα με β-αλυσίδες (Val, Ile, Thr) και Gly, τα οποία προβλέπεται από τους κανόνες Chou-Fasman να μην ευνοούν τις α-έλικες σε διαλυτές πρωτεΐνες, συχνά αποτελούν το 40-50% της αμινοξικής σύνθεσης διαμεμβρανικών τμημάτων. Έτσι, όταν οι κανόνες Chou-Fasman εφαρμόζονται σε διαμεμβρανικά τμήματα τα οποία είναι γνωστό από πειράματα ότι έχουν δομή α-έλικας, προβλέπονται ως β-φύλλα. Είναι φανερό ότι αμινοξέα όπως Val, Ile και Gly υποστηρίζουν τη δομή της α-έλικας εντός της μεμβράνης. Επιπλέον, όσο περισσότερο υδρόφοβα είναι τα αμινοξέα τόσο έχουν μεγαλύτερη τάση σχηματισμού για α-έλικα σε μη πολικό περιβάλλον [96].

Η σύνθεση πεπτιδίων μοντέλων εκ νέου (*de novo*) με στόχο τη βαθύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-λιπιδίων έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία. Το πλεονέκτημα του σχεδιασμού εκ νέου είναι ότι η δομή των μοντέλων μπορεί να ελεγχθεί με ευκολία, με αποτέλεσμα να υπάρχουν λιγότερες πιθανότητες στη δομή, απλούστερες ιδιότητες και μεγαλύτερη ευχέρεια στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Από μελέτες αυτού του είδους έχουν εξαχθεί χρήσιμα συμπεράσματα όπως ότι η ελικοειδής διαμόρφωση ενός πεπτιδίου μοντέλου στο περιβάλλον της μεμβράνης συσχετίζεται με την τμηματική υδροφοβικότητά του, με τη σειρά σχηματισμού έλικας μη φορτισμένων αμινοξέων σε μικύλλια SDS να έχει ως εξής: Ile > Leu ~ Val > Met > Phe > Ala > Gln > Tyr > Thr > Ser > Asn > Gly. Επιπλέον, φαίνεται να υπάρχει ένα “κατώφλι υδροφοβικότητας” για τη σταθεροποίηση ενός πεπτιδικού τμήματος εντός μιας μήτρας λιπιδίων [108].

Από την ανάλυση των διαλυτών πρωτεϊνών διαπιστώνεται ότι η προλίνη είναι το αμινοξύ με τη μικρότερη πιθανότητα να είναι παρόν σε μια α-έλικα. Επιπλέον, επειδή γενικά απαντάται σε υδροφιλικό περιβάλλον, δεν θα αναμενόταν να παρατηρείται εντός μιας μεμβράνης. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι η προλίνη παρατηρείται σε υψηλή συχνότητα στα



διαμεμβρανικά τμήματα με δομή α-έλικας πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών οι οποίες έχουν λειτουργία υπομονάδων υποδοχέων ή μεταφορέων. Μελέτες με πεπτίδια μοντέλα έδειξαν ότι σε περιβάλλον που προσομοιάζει τη μεμβράνη, η προλίνη προστατεύει την α-έλικα ενώ διακόπτει τη διαμόρφωση β-φύλλου [109]. Ενώ η κατανομή της προλίνης εντός των μεμβρανών φαίνεται να είναι τυχαία αναφορικά με τη θέση της εντός των διαμεμβρανικών τμημάτων, οι διαμεμβρανικές προλίνες φαίνεται να διατηρούνται μεταξύ ομόλογων πρωτεϊνών. Η επίδραση της προλίνης σε μια διαμεμβρανική έλικα έχει κατηγοριοποιηθεί από τους K. A. Williams και C. M. Deber σε δομική και δυναμική [110]. Ο δομικός ρόλος περιλαμβάνει κυρίως στατικές επιδράσεις όπως ο σχηματισμός ατελούς έλικας όπως και ηλεκτρονικές επιδράσεις που προέρχονται από αυξημένη τοπική πολικότητα. Ο δυναμικός ρόλος, ο οποίος σχετίζεται με τη συμμετοχή της προλίνης σε μεταβολή της διαμόρφωσης, περιλαμβάνει δύο κατηγορίες: Την ισομερίωση cis-trans των πεπτιδικών δεσμών X-Pro και τις αλληλομετατροπές μεταξύ όλων των trans διαμορφώσεων οι οποίες μεσολαβούνται από την προλίνη.



Κεφάλαιο

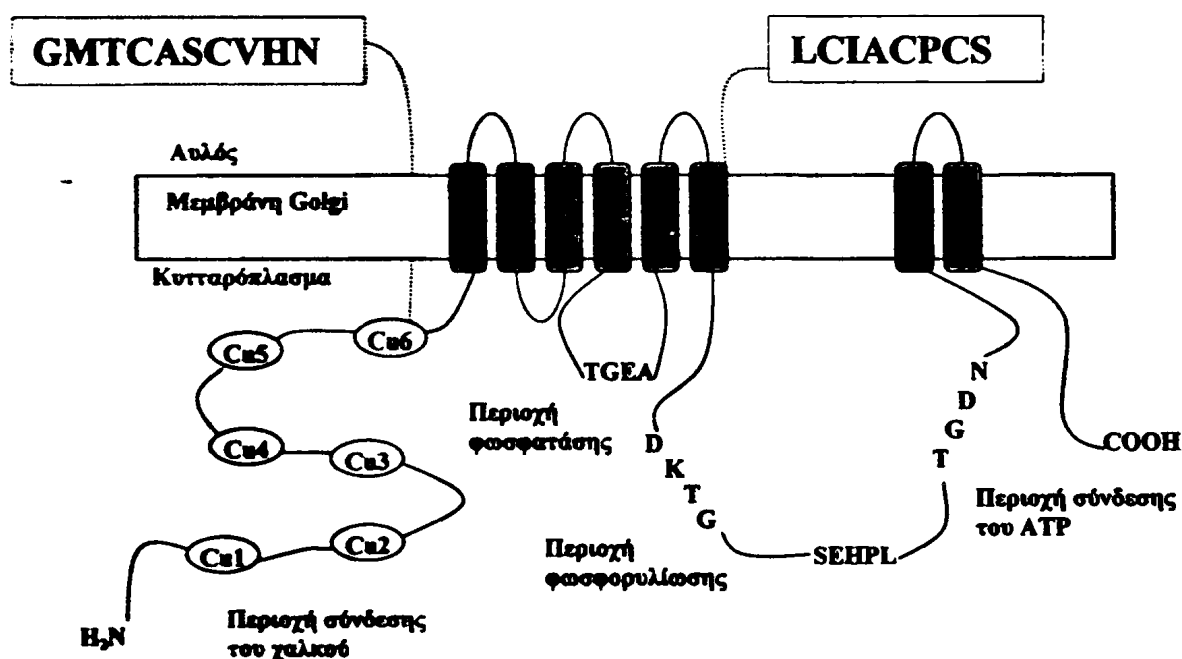
4

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ



4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Από τα παραπάνω δεικνύεται η σπουδαιότητα της ΑΤΡάσης της ασθένειας Wilson στη διατήρηση της ομοιοστασίας του χαλκού εντός του ηπατοκυττάρου και γενικά ολόκληρου του οργανισμού. Επίσης είναι φανερό ότι η δομή της ΑΤΡ7Β δεν έχει λυθεί ακόμα ούτε με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αλλά και ούτε με φασματοσκοπία NMR, συνεπώς πολλά ερωτήματα μένουν να απαντηθούν όσον αφορά τη συνολική δομή και τη λειτουργία της. Στο διαμεμβρανικό μοτίβο CPC, υψηλά διατηρημένο στις ΑΤΡάσες που μεταφέρουν μέταλλα μετάπτωσης, δεν φαίνεται να έχει αποδοθεί τεκμηριωμένα ακόμα κάποιος ρόλος σχετικά με το μηχανισμό μεταφοράς του χαλκού από την ΑΤΡ7Β.



Σχήμα 4.1. Προβλεπόμενη δομή της ΑΤΡ7Β, όπου εκσημαίνονται οι πεπτιδικές αλληλουχίες 2Κ8ρ και 2Κ10ρ.

Τα πεπτίδια, τμήματα διαμεμβρανικών περιοχών πρωτεϊνών, έχουν αποδειχτεί σημαντικά εργαλεία στη διερεύνηση των ιδιοτήτων των πρωτεϊνικών αυτών περιοχών *in vitro*. Έτσι λοιπόν, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του πεπτιδίου 2Κ8ρ (σχήμα 4.1 και 4.2) το οποίο αποτελεί τμήμα της έκτης διαμεμβρανικής περιοχής, η οποία περιέχει το κατά πολύ διατηρημένο, ανάμεσα στις ΑΤΡάσες τύπου Ρ, μοτίβο CPC. Με σκοπό τη διερεύνηση του ρόλου της κάθε μίας από τις 3 κυστείνες που περιέχονται στο πεπτίδιο 2Κ8ρ, συντέθηκαν



34 4. Σκοπός της διατριβής

πεπτιδικές αλληλουχίες στις οποίες μία κυστεΐνη κάθε φορά αντικαθίσταται από μια σερίνη (σχήμα 4.2).

$\text{CH}_3\text{CO-Lys}^1\text{-Gly}^2\text{-Met}^3\text{-Thr}^4\text{-Cys}^5\text{-Ala}^6\text{-Ser}^7\text{-Cys}^8\text{-Val}^9\text{-His}^{10}\text{-Asn}^{11}\text{-Lys}^{12}\text{-CONH}_2$	2K10p
$\text{CH}_3\text{CO-Lys}^1\text{-Leu}^2\text{-Cys}^3\text{-Ile}^4\text{-Ala}^5\text{-Cys}^6\text{-Pro}^7\text{-Cys}^8\text{-Ser}^9\text{-Lys}^{10}\text{-CONH}_2$	2K8p
$\text{CH}_3\text{CO-Lys}^1\text{-Leu}^2\text{-Ser}^3\text{-Ile}^4\text{-Ala}^5\text{-Cys}^6\text{-Pro}^7\text{-Cys}^8\text{-Ser}^9\text{-Lys}^{10}\text{-CONH}_2$	1s
$\text{CH}_3\text{CO-Lys}^1\text{-Leu}^2\text{-Cys}^3\text{-Ile}^4\text{-Ala}^5\text{-Ser}^6\text{-Pro}^7\text{-Cys}^8\text{-Ser}^9\text{-Lys}^{10}\text{-CONH}_2$	2s
$\text{CH}_3\text{CO-Lys}^1\text{-Leu}^2\text{-Cys}^3\text{-Ile}^4\text{-Ala}^5\text{-Cys}^6\text{-Pro}^7\text{-Ser}^8\text{-Ser}^9\text{-Lys}^{10}\text{-CONH}_2$	3s

Σχήμα 4.2. Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα για τη μελέτη της ATPάσης Wilson.

Η έκτη περιοχή σύνδεσης του χαλκού βρίσκεται πλησιέστερα της μεμβράνης και πιστεύεται ότι είναι η πιο σημαντική για τη λειτουργία της ATP7B ως μεταφορέα χαλκού. Γι' αυτό το λόγο έγινε σύνθεση του πεπτιδίου 2K10p (σχήμα 4.1 και 4.2) που είναι ένα τμήμα της έκτης περιοχής σύνδεσης του Cu(I) η οποία περιέχει το διατηρημένο μοτίβο σύνδεσης μετάλλων GMTCXXC. Σε όλες τις πεπτιδικές αλληλουχίες προστέθηκαν δύο λυσίνες και στα δύο άκρα ώστε να αυξηθεί η διαλυτότητα των πεπτιδίων σε υδατικά διαλύματα.

Η μελέτη με φασματοσκοπικές τεχνικές της αλληλεπίδρασης των παραπάνω πεπτιδίων με Cu(I) πιστεύουμε ότι μπορεί να μας διαφωτίσει σχετικά με λεπτομέρειες του μηχανισμού μεταφοράς του χαλκού από την ATPάση της ασθένειας Wilson.



Κεφάλαιο

5

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.1. Σύνθεση των πεπτιδίων

Όλα τα πεπτίδια συντέθηκαν με πεπτιδική σύνθεση στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας synthesizer Pioneer (Hospital for Sick Children, Τορόντο, Καναδάς) σύμφωνα με την Fmoc στρατηγική. Ως στερεό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη Fmoc-PAL-PEG-PS. Η αποπροστασία των Fmoc-αμινοξέων (NOVA) πραγματοποιήθηκε με διάλυμα 20% πιπεριδίνης σε DMF. Ως αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε το HBTU. Ο οξικός ανυδρίτης χρησιμοποιήθηκε για την ακετυλίωση του πεπτιδίου. Το κόψιμο από τη ρητίνη και η τελική αποπροστασία των πλευρικών αλυσίδων έγιναν σε ένα βήμα χρησιμοποιώντας το μίγμα TFA:H₂O:φαινόλη:TIPS 88:5:5:2. Το πεπτίδιο καταβυθίστηκε με παγωμένο αιθέρα και απομονώθηκε με φυγοκέντρηση. Ο καθαρισμός των πεπτιδίων έγινε με ανάστροφης φάσης HPLC σε χρωματογράφο Waters 600 με ανιχνευτή απορρόφησης Waters 481 χρησιμοποιώντας στήλη C4. Οι διαλύτες της χρωματογραφίας ήταν ακετονιτρίλιο και νερό βαθμού καθαρότητας HPLC, και οι δύο περιείχαν 0,1% TFA. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας γραμμική αύξηση κατά 2%/min νερού (0,1% TFA) και ακετονιτρίλιου (0,1% TFA) με αρχική αναλογία νερό: ακετονιτρίλιο 99:1 και τελική αναλογία 20:80. Στη συνέχεια ακολούθησε λυοφιλοποίηση των πεπτιδίων και αποθήκευσή τους στους 4 °C. Η καθαρότητα των πεπτιδίων επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία μάζας ESI-MS (τεχνική Time Of Flight).

5.2. Μέθοδοι προσδιορισμού

5.2.1. Μέθοδος BCA.

Το BCA (Bicinchoninic Acid, Pierce) είναι ένα ευαίσθητο, σταθερό, υψηλής εξειδίκευσης αντιδραστήριο για το ιόν Cu⁺¹. Η μέθοδος προσδιορισμού πρωτεϊνών BCA συνδυάζει τη γνωστή αντίδραση της διουρίας στην οποία το ιόν του Cu⁺² ανάγεται από την πρωτεΐνη σε ένα αλκαλικό μέσο για να δώσει Cu⁺¹ με τη μοναδική ικανότητα του BCA να σχηματίζει ένα ιώδες προϊόν από την αλληλεπίδραση δύο μορίων BCA με ένα ιόν Cu(I) [111-112]. Το ιώδες προϊόν της αντίδρασης είναι υδατοδιαλυτό και παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση στα 562 nm η οποία επιτρέπει το φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών σε υδατικά διαλύματα. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης



36 5. Πειραματικό μέρος

χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα καθαρής αλβουμίνης ορού από βοειδή (BSA). Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 25 mM (pH=8,00).

5.2.2. Μέθοδος Ellman.

Το αντιδραστήριο Ellman (DTNB=διθειο-1,4-νιτροβενζοϊκό οξύ) [113] σχηματίζει εύκολα ένα μικτό δισουλφίδιο με θειόλες, απελευθερώνοντας το χρωμοφόρο 5-μερκαπτο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (μέγιστο απορρόφησης 412 nm, $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Η συγκέντρωση υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το συντελεστή μοριακής απορρόφησης του κίτρινου προϊόντος. Χρησιμοποιήθηκε τελική συγκέντρωση DTNB 10^{-4} M , ενώ όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 100 mM.

5.2.3. Η μέθοδος του Cu(I).

Το BCA χρησιμοποιείται επίσης και σε αυτή τη μέθοδο, μόνο που εδώ χρησιμοποιείται το ασκορβικό οξύ για την αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I). Για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων και την κατασκευή πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα Cu(II) ατομικής απορρόφησης. Η απομάκρυνση των παρεμποδιζουσών ουσιών επιτυγχάνεται με καταβύθιση με διάλυμα 15% TCA. Η αναλογία Cu(I):BCA που χρησιμοποιείται είναι 1:2. Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 361,6 nm.

5.3. Μελέτη της σταθερότητας των πεπτιδίων ως προς την οξείδωση

Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων υδατικών διαλυμάτων των πεπτιδίων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Ellman. Η πρώτη μέτρηση πραγματοποιήθηκε τη μέρα της παρασκευής τους και ακολούθησαν επαναληπτικές μετρήσεις σε διάστημα δύο εβδομάδων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των πεπτιδίων ήταν της ίδιας τάξης (1-3 mM).

5.4. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD)

Παρασκευάστηκαν αρχικά διαλύματα του πεπτιδίου, του DTT και του Cu(II). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του πεπτιδίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BCA. Η συγκέντρωση του διαλύματος του Cu(II) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του Cu(I). Η μέθοδος



Ellman χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του αρχικού διαλύματος του DTT.

Όλα τα παραπάνω αρχικά διαλύματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (25 mM) pH=8,00. Για την εισαγωγή των πεπτιδίων σε μικύλλια, προστέθηκε SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) σε τελική συγκέντρωση 20 mM. Όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν με ανάμιξη υπολογισμένων ποσοτήτων από τα παραπάνω αρχικά διαλύματα, η οποία έγινε αμέσως πριν από την καταγραφή του φάσματος. Για κάθε δείγμα, μετρήθηκε επίσης το αντίστοιχο τυφλό που περιείχε όλες τις ουσίες εκτός από το πεπτίδιο. Τα φάσματα CD καταγράφηκαν σε ένα σπεκτροπολαρίμετρο Jasco J-720 (Hospital for Sick Children, Τορόντο, Καναδάς). Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα 0,1 cm για την περιοχή 190-250 nm ενώ για την περιοχή 250-400 nm χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα 2 cm. Το τυφλό αφαιρέθηκε από το φάσμα του δείγματος. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με το πρόγραμμα Microcal Origin 6.0.

5.5. Φασματοσκοπία ^1H NMR

Παρασκευάστηκαν διαλύματα του πεπτιδίου συγκέντρωσης 5 mM σε D_2O . Η κατάλληλη ποσότητα του πεπτιδίου ζυγίστηκε σε ηλεκτρονικό ζυγό ακρίβειας πέμπτου δεκαδικού ψηφίου. Στο διάλυμα του πεπτιδίου προστέθηκε ισοδύναμη ποσότητα διαλύματος Cu(II) . Η συγκέντρωση του διαλύματος Cu(II) είχε προσδιοριστεί μέσω τιτλοδοτήσεως με Titriplex. Επίσης, προστέθηκε DTT σε αναλογία 2:1 ως προς το πεπτίδιο ώστε να επιτευχθεί η αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I) καθώς και η αναγωγή των πεπτιδικών δισουλφιδικών δεσμών. Το pH ρυθμίστηκε στο 8,0 χρησιμοποιώντας διαλύματα NaOD και DCl. Η προετοιμασία του δείγματος έγινε υπό αναερόβιες συνθήκες και το σωληνάκι NMR κλείστηκε ερμητικά. Ελήφθησαν φάσματα 1D ^1H NMR και 2D TOCSY, NOESY και ROESY σε όργανο Bruker Avance 400 MHz (Κέντρο φασματοσκοπίας ^1H NMR, CERM, Φλωρεντία, Ιταλία).

5.6. Φασματοσκοπία μάζας (Electrospray Mass Spectrometry)

Τα φάσματα ESI-MS καταγράφηκαν σε τετραπολικό φασματογράφο Micromass Q-TOF (Hospital for Sick Children, Τορόντο, Καναδάς). Όλα τα φάσματα καταγράφηκαν στη λειτουργία TOF (time of flight), με θερμοκρασία πηγής 80°C και τάση $\Delta\text{CS} = 100 - 120\text{V}$ ώστε να επιτευχθούν ήπιες συνθήκες στις διεπιφάνειες.



5.7. Δημιουργία μοντέλου με βάση την ομολογία μεταξύ πρωτεϊνών

Κατασκευάστηκε μοντέλο των πεπτιδίων 2K10p και 2K8p βάση ομολογίας χρησιμοποιώντας το SWISS-model και το πρόγραμμα SWISS-PDB-viewer [114-116] για τη δημιουργία γραφικών αναπαραστάσεων των πεπτιδίων όπως έχει ήδη περιγραφεί από τους N. Fatemi και B. Sarkar [55].



Κεφάλαιο
6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1. Φασματοσκοπία ESI-MS

Ο χαρακτηρισμός και των πέντε πεπτιδίων έγινε με λήψη των φασμάτων ESI-MS. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 6.1 ενώ ενδεικτικά δίνεται στο σχήμα 6.1 το φάσμα του πεπτιδίου 1s. Δέκτης των πρωτονίων είναι η αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης η οποία βρίσκεται στο N- και στο C-τελικό άκρο και των πέντε πεπτιδίων (κορυφές $[M+1H^+]/1$ και $[M+2H^+]/2$). Για το 2K10p παρατηρείται επιπλέον η κορυφή $[M+3H^+]/3$, όπου αποδέκτης του τρίτου πρωτονίου είναι το ιμιδαζόλιο της πλευρικής αλυσίδας της His10.

Πίνακας 6.1.

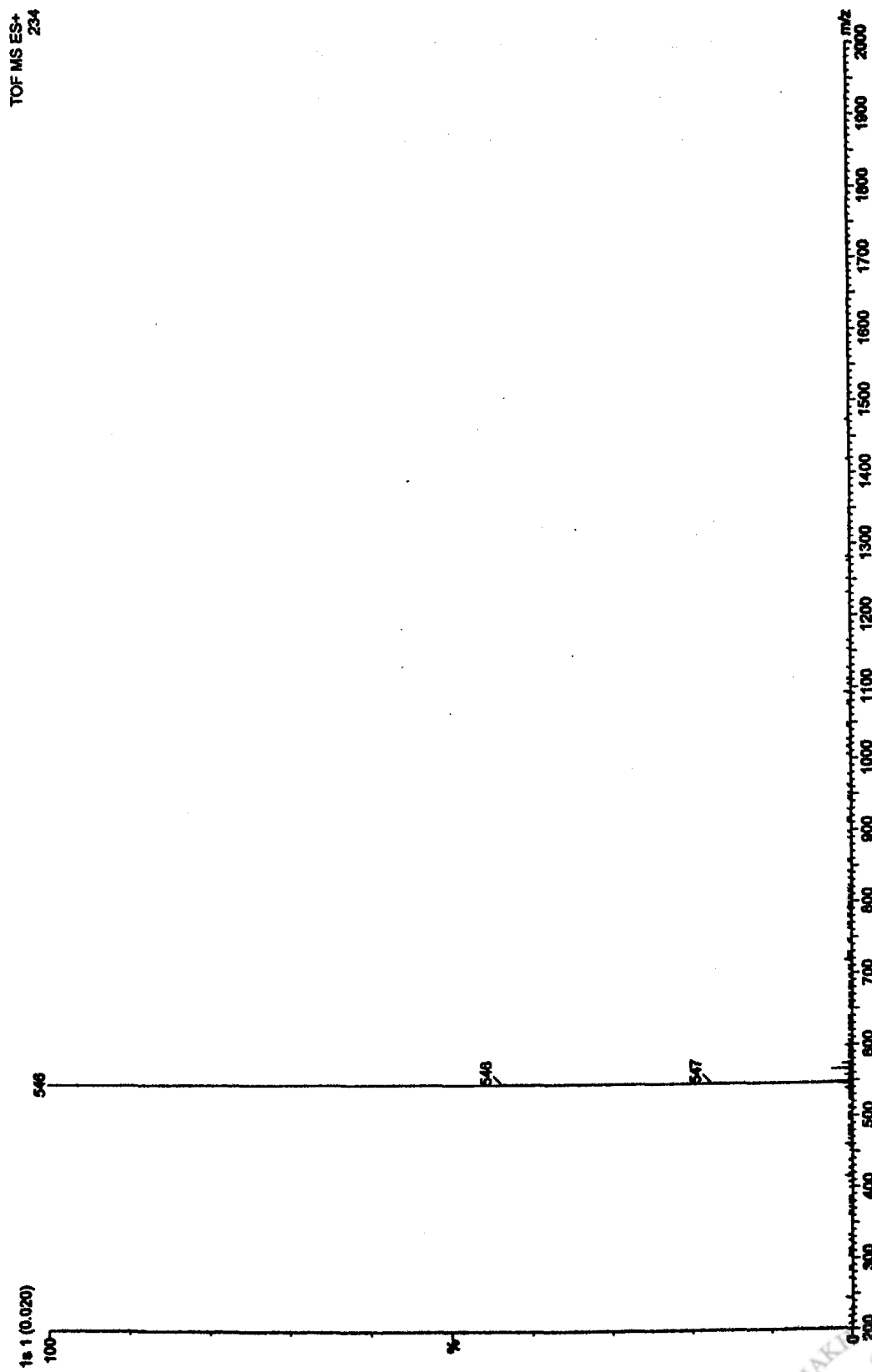
Τα χαρακτηριστικά των κορυφών που παρατηρούνται στα φάσματα ESI-MS των πέντε πεπτιδίων.

Πεπτίδιο	Σχετική ένταση	m/z	Φορτίο	Κορυφή ^a
2K10p	100,0	440,54	3	$[M+3H^+]/3$
	69,8	660,30	2	$[M+2H^+]/2$
2K8p	100,0	553,74	2	$[M+2H^+]/2$
	1,8	1106,49	1	$[M+1H^+]/1$
1s	100,0	545,80	2	$[M+2H^+]/2$
	0,85	1090,62	1	$[M+1H^+]/1$
2s	100,0	545,81	2	$[M+2H^+]/2$
3s	100,0	545,81	2	$[M+2H^+]/2$

^a Με το γράμμα Μ συμβολίζεται το μοριακό βάρος του πεπτιδίου.



40 δ. Αποτελέσματα

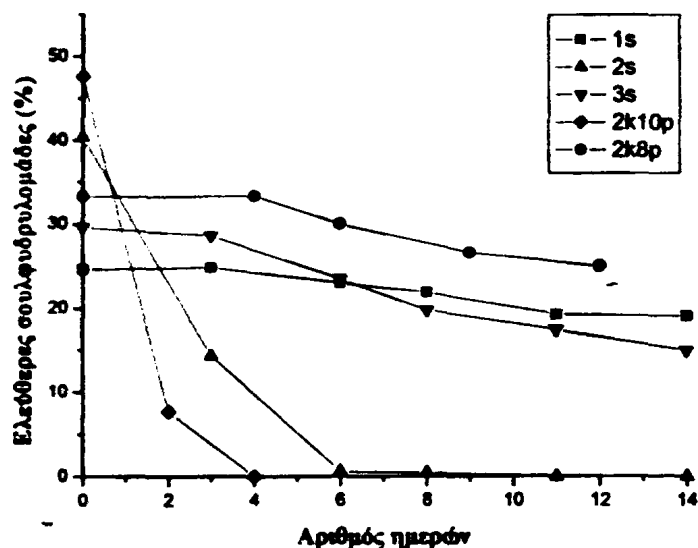


Σχήμα 6.1. Φάσμα ESI-MS του πεπτιδίου 1s.



6.2. Σταθερότητα των πεπτιδίων ως προς την οξείδωση

Μελετήθηκε επίσης η σταθερότητα σε υδατικό διάλυμα έναντι της οξείδωσης των σουλφυδρυλομάδων (-SH) και των πέντε πεπτιδίων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα



Σχήμα 6.2. Περιεχόμενο σε ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες (%) των υδατικών διαλυμάτων των 2K10p, 2K8p, 1s, 2s και 3s σε συνάρτηση με το χρόνο.

την οξείδωση παρουσιάζουν τα πεπτιδικά 1s (5,7% σε 14 ημέρες) και 2K8p (8,5% σε 14 ημέρες).

6.3. Κατασκευή μοντέλου από την ομολογία πρωτεϊνών

Η έκτη περιοχή σύνδεσης του χαλκού στην ΑΤΡάση της ασθένειας Wilson (WD6) λαμβάνει διαμόρφωση τύπου φερρεδοξίνης όπως προκύπτει από την ομολογία της με άλλες περιοχές σύνδεσης μετάλλου. Συνεπώς, δεδομένου ότι το πεπτιδικό 2K10p αποτελεί τμήμα της WD6, μπορεί να κατασκευαστεί γι' αυτό μοντέλο ομολογίας όπως φαίνεται στο σχήμα 6.3Α.

Στο σχήμα 6.3Β φαίνεται το έκτο διαμεμβρανικό τμήμα της ΑΤΡ7Β (TM6) για το οποίο ως μοντέλο έχει χρησιμοποιηθεί η τέταρτη διαμεμβρανική περιοχή της Ca-ΑΤΡάσης (M4). Η ευθυγράμμιση των δύο ομόλογων περιοχών έχει ως εξής:

```

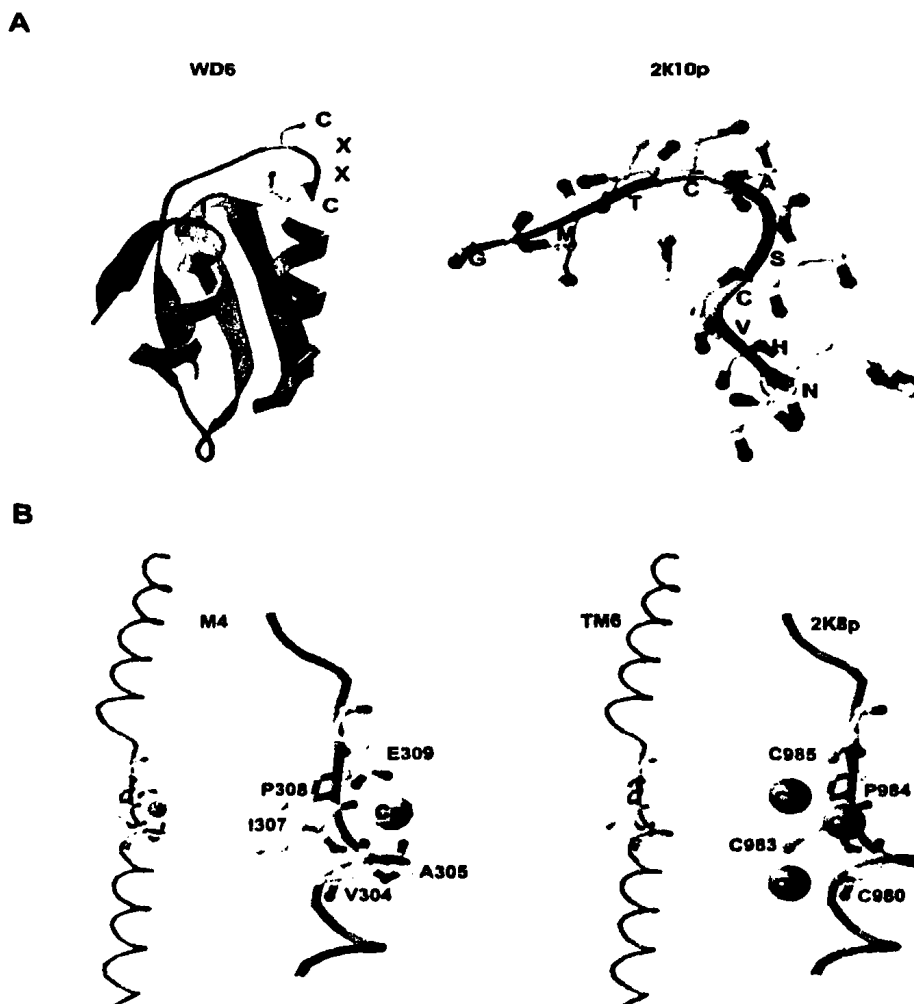
ATP7B: 933  XXXXXXXXXX V - I G F : D P S N V Q K Y F R F W I S I S O T XXXXXXXXXX 991
              V W   I G           F P   S       I   F           A P   L
SERCA: 266  XXXXXXXXXX I N I G - - - - - H P K D P V N G S W I XXXXXXXXXX 315
                                     M4

ATP7B: 992  XXXXXXXXXX G I L I K G K P L E M A K I K T V N F D E T Q T I T H N V P R V N V L L G D V 1048
              T   Q T   A           E           D E T Q T   T   V           V
SERCA: 316  XXXXXXXXXX I A I V R S L P S V E T L G C T S V I C S D E T Q T L T T M O N S V C I O N F I I D K V 372

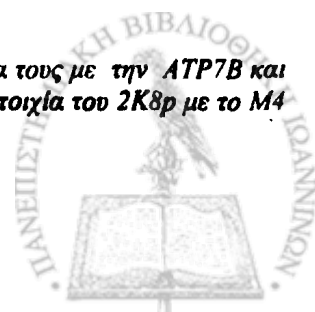
```



Τα αμινοξέα Val 304, Ile 307 και Glu 309 του M4, που συνεισφέρουν στην υψηλή συγγένεια ως προς το ιόν Ca^{2+} στη θέση II της SERCA1a [117], αντιστοιχούν στις Cys 980, 983 και 985 στο τμήμα του TM6 που σχηματίζει το μοτίβο CXXCPC. Η θέση II στο M4 σχηματίζεται σχεδόν απευθείας από τα καρβονυλικά οξυγόνα της κυρίας αλυσίδας των Val 304, Ala 305 και Ile 307 και τα άτομα οξυγόνου της πλευρικής αλυσίδας του Glu 309. Αυτή η γεωμετρία ένταξης καθίσταται δυνατή επειδή η ελικοειδής δομή του M4 ξετυλίγεται μεταξύ της Ile 307 και της Gly 310 και διακόπτεται από την Pro 308. Παρομοίως στο πεπτίδιο 2K8p, η θέση σύνδεσης του ιόντος Cu(I) δεν αναμένεται να υιοθετεί τη συνηθισμένη σε διαμεμβρανικά τμήματα δομή α-έλικας λόγω της ύπαρξης της ίδιας διατηρημένης Pro 984. Έχει βρεθεί ότι τα αμινοξέα Cys 980, 983 και 985 στο ξετυλιγμένο τμήμα του TM6 είναι απαραίτητα για τη μεταφορά του χαλκού και σύμφωνα με αυτό το μοντέλο θα μπορούσαν να ενταχθούν στο ιόν του Cu(I).



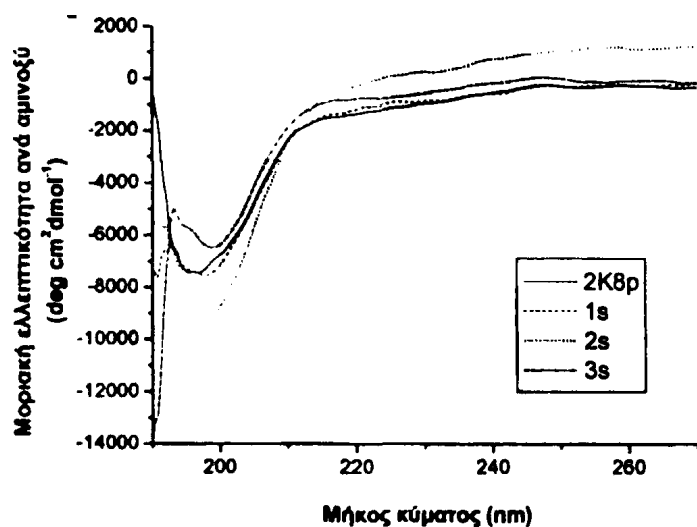
Σχήμα 6.3. Μοντέλο των πεπτιδίων 2K10p και 2K8p όπως προκύπτει από την ομολογία τους με την ATP7B και την SERCA1a αντίστοιχα. Α) Αντιστοιχία του 2K10p με την WD6 της ATP7B. Β) Αντιστοιχία του 2K8p με το M4 της SERCA1a.



6.4. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD)

Η αλληλεπίδραση του Cu(I) με τα πεπτίδια μπορεί να μελετηθεί με φασματοσκοπία CD με δύο διαφορετικούς τρόπους. Παρακολουθώντας τις μεταβολές της μοριακής ελλειπτικότητας ανά αμινοξύ ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) στην περιοχή 190-250 nm, μπορούν να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τη δευτεροταγή δομή του πεπτιδικού μορίου [118]. Επιπλέον, οι μεταπτώσεις LMCT που παρατηρούνται στην περιοχή 250-400 nm προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη φύση των ατόμων δοτών που εντάσσονται στον Cu(I) [119]

Στο σχήμα 6.4 φαίνονται τα φάσματα CD στην περιοχή του άπω-υπεριώδους για το πεπτίδιο 2K8p και τις τρεις μεταλλάξεις του. Παρατηρείται η παρουσία ενός ελαχίστου κοντά στα 198 nm και για τα τέσσερα πεπτίδια το οποίο είναι ενδεικτικό τυχαίας διαμόρφωσης [120-121]. Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.4, η αντικατάσταση της πρώτης κυστεΐνης από σερίνη



Σχήμα 6.4 Φάσματα άπω υπεριώδους των πεπτιδίων 2K8p, 1s, 2s και 3s.

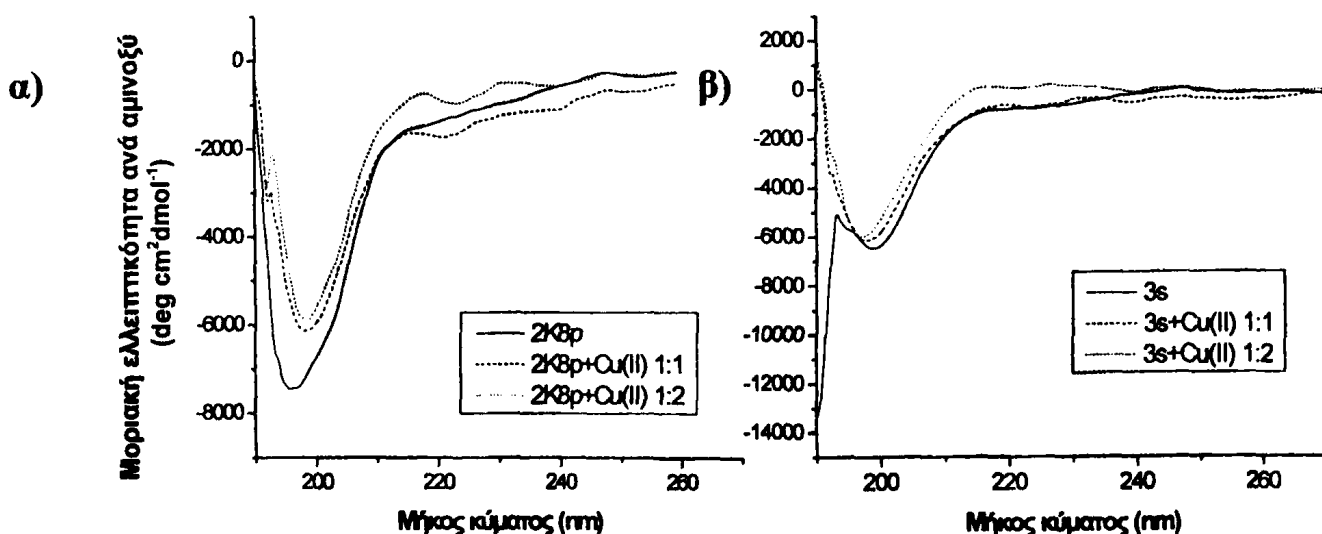
δεν επηρεάζει σημαντικά τη διαμόρφωση του 2K8p. Από την άλλη, υπάρχει μεγάλη μεταβολή όταν αντικαθίσταται η δεύτερη κυστεΐνη του 2K8p, η πρώτη του μοτίβου CPC, δίνοντας πιο αρνητικό σήμα στα 198 nm. Πιθανόν η δεύτερη κυστεΐνη του 2K8p να συμμετέχει στο σχηματισμό ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού ο οποίος δημιουργεί τάση και παρεμποδίζει το μόριο του πεπτιδίου να λάβει όλες τις πιθανές διαμορφώσεις. Είναι γνωστό ότι ο κύριος μηχανισμός του κυκλικού διχρωϊσμού είναι η αλληλεπίδραση του συμμετρικού χρωμοφόρου (αμιδικού δεσμού) με τα γειτονικά μονομερή (αμινοξέα) τα οποία είναι τοποθετημένα ασύμμετρα γύρω του στις περισσότερες διαμορφώσεις που μπορεί να πάρει το πολυμερές [122]. Η απουσία δισουλφιδικού δεσμού αυξάνει τον αριθμό των πιθανών διαμορφώσεων του πεπτιδικού μορίου με αποτέλεσμα μεγαλύτερη αρνητική μοριακή ελλειπτικότητα. Η μετάλλαξη της τρίτης κυστεΐνης συνοδεύεται από ελάττωση της αρνητικής μοριακής ελλειπτικότητας, η

δεν επηρεάζει σημαντικά τη διαμόρφωση του 2K8p. Από την άλλη, υπάρχει μεγάλη μεταβολή όταν αντικαθίσταται η δεύτερη κυστεΐνη του 2K8p, η πρώτη του μοτίβου CPC, δίνοντας πιο αρνητικό σήμα στα 198 nm. Πιθανόν η δεύτερη κυστεΐνη του 2K8p να συμμετέχει στο σχηματισμό ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού ο οποίος δημιουργεί τάση και παρεμποδίζει το μόριο του



οποία πιθανόν προέρχεται από το σχηματισμό ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης κυστεΐνης του πεπτιδίου 2K8p. Ο περιορισμός ως προς τη δυνατότητα λήψης οποιαδήποτε διαμόρφωσης είναι μεγαλύτερος για το πεπτίδιο 3s σε σχέση με τα πεπτίδια 2K8p και 1s. Αυτό συμβαίνει επειδή στο πεπτίδιο 3s ο δισουλφιδικός δεσμός περιορίζει τη διαμόρφωση 4 αμινοξέων (Cys-X-X-Cys), ενώ στα πεπτίδια 2K8p και 1s ο δισουλφιδικός δεσμός περιορίζει τη διαμόρφωση 3 αμινοξέων (Cys-Pro-Cys).

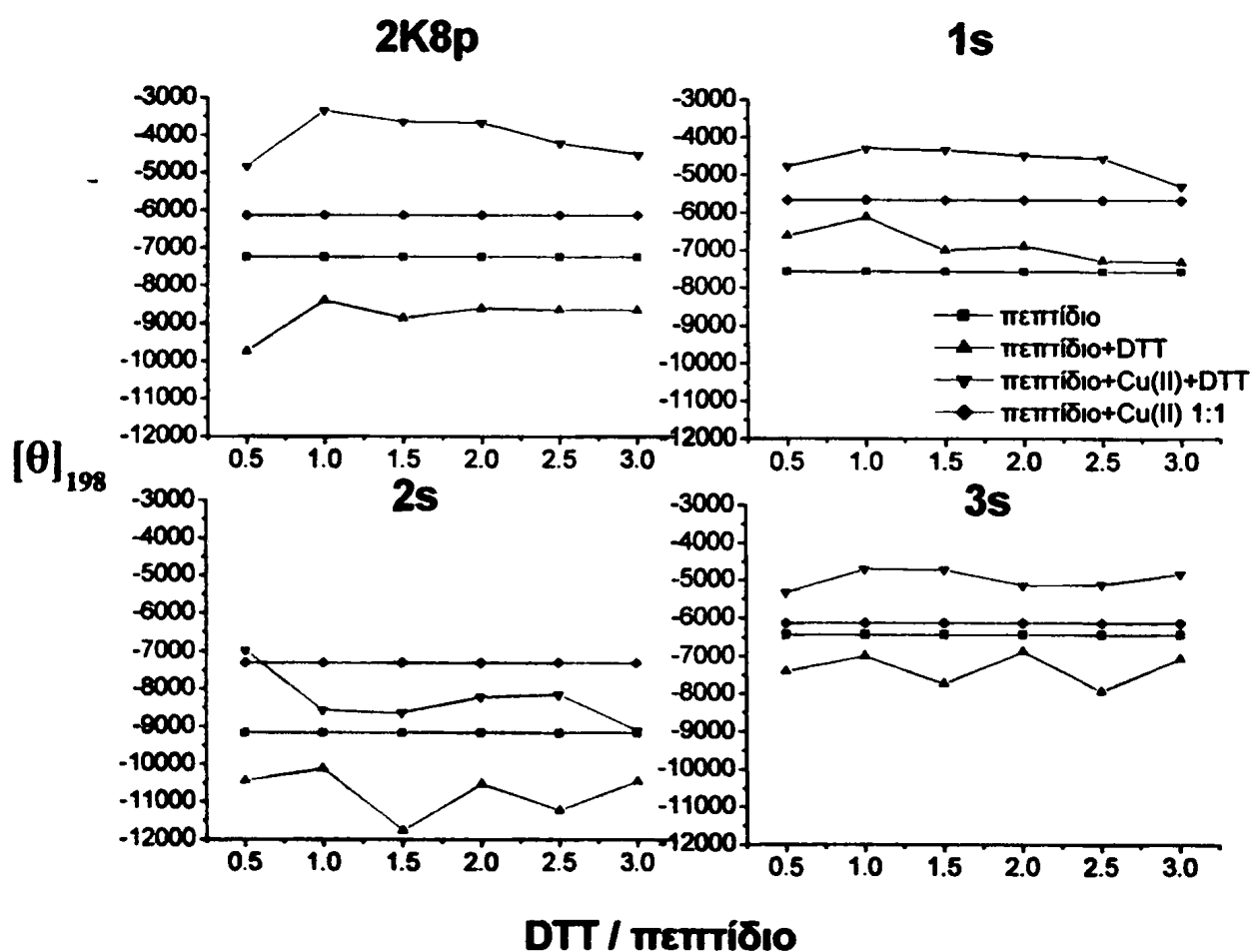
Λόγω του μεγέθους τους και της απουσίας συγκεκριμένης δευτεροταγούς δομής και αναδίπλωσης, τα πεπτίδια είναι πολύ πιο εκτεθειμένα στο διαλύτη και ευάλωτα στην οξείδωση σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες. Η προστασία των σουλφυδρυλομάδων καθίσταται απαραίτητη, όπως φαίνεται και από την παραπάνω μελέτη τις σταθερότητας των πεπτιδίων ως προς την οξείδωση. Γι' αυτό το λόγο, το DTT, το οποίο χρησιμοποιείται ευρύτατα στην απομόνωση, τον καθαρισμό και τη μελέτη των πρωτεϊνών για την προστασία των θειολικών ομάδων, χρησιμοποιήθηκε για την αναγωγή των πεπτιδικών δισουλφιδικών δεσμών και την παραγωγή *in situ* του Cu(I) από Cu(II). Η επίδραση του DTT στο σύστημα αξιολογείται μέσω της παρατήρησης των μεταβολών των φασμάτων CD καθώς προστίθεται σε αυξανόμενα ποσά, απουσία και παρουσία του Cu(II). Η αναλογία του πεπτιδίου προς τον Cu(II) που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1:1. Επιπλέον προσθήκη Cu(II) δεν έδωσε σημαντική μεταβολή στα φάσματα όλων των πεπτιδίων (σχήμα 6.5).



Σχήμα 6.5. Προσθήκη Cu(II) πέραν της αναλογίας πεπτίδιο:Cu(II) 1:1 δεν οδήγησε σε σημαντική μεταβολή των φασμάτων. Ενδεικτικά δίνονται τα φάσματα άνω υπερϊώδους των α) 2K8p και β) 3s.



Στο σχήμα 6.6, φαίνονται τα αποτελέσματα από την περιοχή του άπω υπεριώδους σε συνάρτηση με τη στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου. Οι μεταβολές στη διαμόρφωση που λαμβάνουν χώρα μελετούνται με παρακολούθηση της μοριακής ελλειπτικότητας στα 198 nm, το τοπικό ελάχιστο που παρατηρείται για όλα τα πεπτίδια. Οι τιμές της μοριακής ελλειπτικότητας που προσδιορίστηκαν για τα δείγματα του πεπτιδίου και του πεπτιδίου+Cu(II) 1:1 έχουν ενσωματωθεί στο σχήμα για λόγους σύγκρισης (δεν έχει προστεθεί DTT σε αυτά τα δείγματα). Η προσθήκη DTT έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους της μοριακής ελλειπτικότητας σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από το 1s.



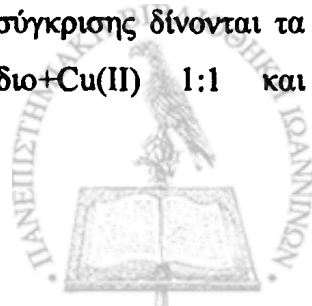
Σχήμα 6.6 Μεταβολές της μοριακής ελλειπτικότητας στα 198 nm (άξονας y) του 2K8p και των μεταλλάξεων 1s, 2s και 3s σε σχέση με την στοιχειομετρία DTT / πεπτίδιο (άξονας x), [πεπτίδιο ■, πεπτίδιο+DTT ▲, πεπτίδιο+Cu(II) 1:1 ♦, πεπτίδιο+Cu(II)+DTT ▼].



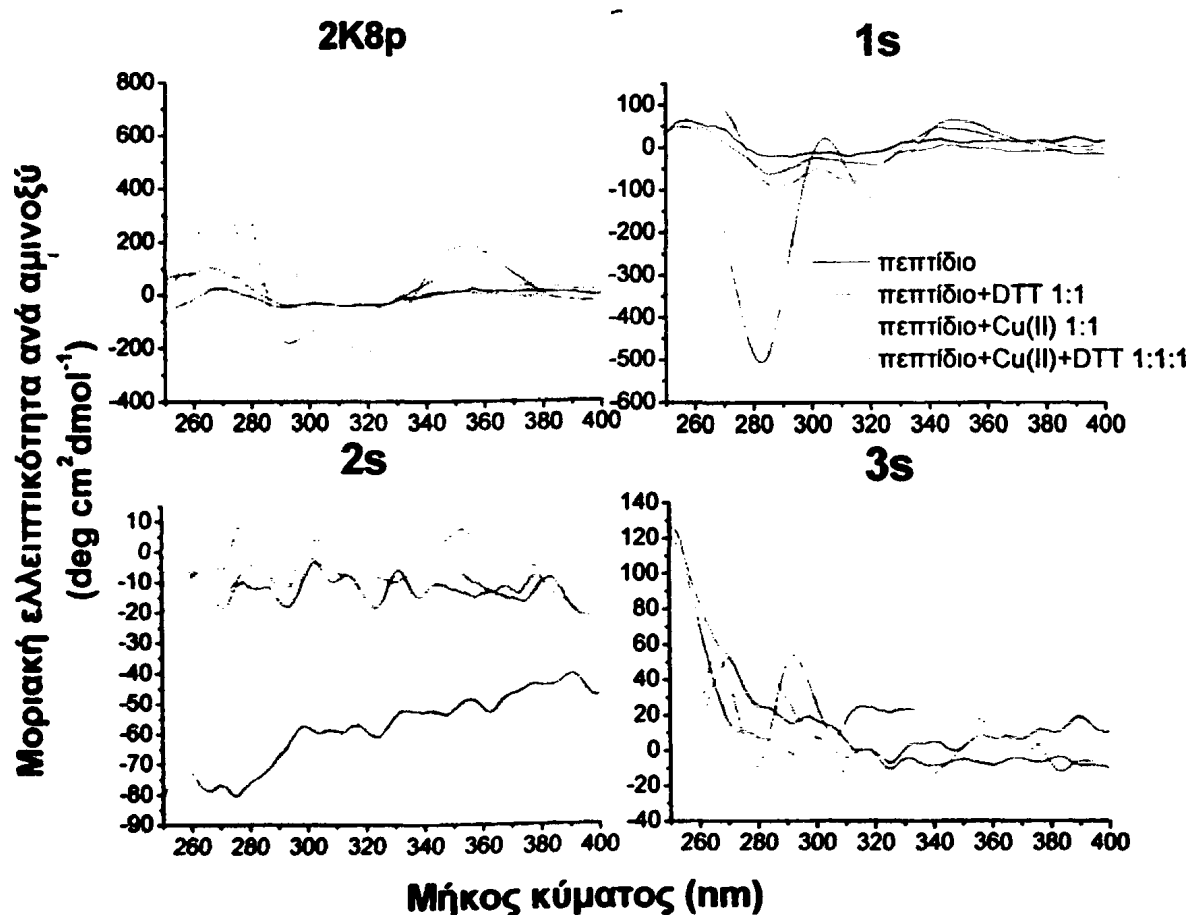
Η παρουσία του Cu(I) στο διάλυμα συνοδεύεται από σημαντικές μεταβολές διαφορετικές για κάθε πεπτίδιο. Η ελάττωση στο μέγεθος της μοριακής ελλειπτικότητας που παρατηρείται παρουσία του Cu(I) συγκριτικά με την ανηγμένη απ' το DTT μορφή του πεπτιδίου (πεπτίδιο+DTT) πιθανόν προέρχεται από την ένταξή του στις ελεύθερες σουλφυδρυλομάδες. Δηλαδή παρατηρούμε ότι η ένταξη του Cu(I) στις θειολικές ομάδες των κυστεϊνών έχει την ίδια επίδραση στη μοριακή ελλειπτικότητα με τον δισουλφιδικό δεσμό. Αυτό είναι αναμενόμενο αν θεωρήσει κανείς την κρυσταλλογραφική δομή της MerP η οποία είναι η ίδια είτε συνδέεται Cu(I) ή σχηματίζεται δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των κυστεϊνών του μοτίβου CXXC [87]. Η ένταξη του Cu(I) έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στη διαμόρφωση του πεπτιδίου 2K8p, είναι επίσης σημαντική στην περίπτωση του 1s ενώ η επίδραση είναι σημαντικά λιγότερη για τα πεπτίδια 3s και 2s. Αφού το μοτίβο CPC παραμένει ακέραιο μόνο στα 2K8p και 1s, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η επίδραση αυτή οφείλεται στην αλληλεπίδραση του CPC με τον Cu(I).

Επιπλέον πληροφορίες αναφορικά με τα σύμπλοκα πεπτιδίων-Cu(I) μπορούν να προκύψουν από τη λεπτομερή ανάλυση των μεταλλοθειονινών-Cu(I) των θηλαστικών [123]. Οι ταινίες στην περιοχή υψηλής ενέργειας (κάτω από 280 nm) προέρχονται κυρίως από ηλεκτρικά επιτρεπόμενες μεταπτώσεις CysS-Cu(I) LMCT, των οποίων η ένταση της ταινίας που δίνουν είναι ανάλογη του αριθμού των θειολικών υποκαταστατών που εντάσσονται στο μεταλλοϊόν. Από την άλλη, η ασυνήθιστα ισχυρές ταινίες στην περιοχή χαμηλής ενέργειας παρατηρούνται συχνά σε πολυπυρηνικά σύμπλοκα Cu(I) στα οποία οι αποστάσεις Cu...Cu είναι σχετικά μικρές με αποτέλεσμα η ενδομοριακή $d^{10}-d^{10}$ αλληλεπίδραση γειτονικών ιόντων Cu(I) να δίνει έναν αριθμό διεγερμένων καταστάσεων με κυρίως μεταλλικό χαρακτήρα. Οι ασθενείς αυτές ταινίες χαμηλής ενέργειας έχουν αποδοθεί στις τυπικά spin-απαγορευμένες μεταπτώσεις $3d \rightarrow 4s$ της μεταλλικής πλειάδας. Η παρατήρηση τέτοιων μεταπτώσεων δείχνει την παρουσία πολυέδρων Cu(I) σε αυτά τα σύμπλοκα. Το μέγεθος των μεταπτώσεων αυτών είναι ανάλογο με τον αριθμό των δεσμευμένων μεταλλοϊόντων. Όλα τα παραπάνω στοιχεία φαίνονται ξεκάθαρα στα φάσματα CD των μεταλλοθειονινών των θηλαστικών [123] και τη C- [124] και N-τελική [125] περιοχή του παράγοντα αναστολής της ανάπτυξης των νεύρων.

Μεταπτώσεις που προέρχονται από το μεταλλοϊόν μπορούν να παρατηρηθούν στα εγγύς-UV φάσματα CD των 2K8p και 1s (σχήμα 6.7). Για λόγους σύγκρισης δίνονται τα φάσματα CD για το πεπτίδιο, πεπτίδιο+DTT 1:1, πεπτίδιο+Cu(II) 1:1 και



πεπτιδίο+Cu(II)+DTT 1:1:1. Επιπλέον προσθήκη DTT δεν προκαλεί μεταβολή στα φάσματα CD. Στο φάσμα CD του 2K8p, παρουσία Cu(I), παρατηρούνται οι παρακάτω ταινίες στα (+)270 nm, (-)293 nm, (-)320 nm και (+)354 nm. Οι σχετικά ισχυρές ταινίες που παρατηρούνται πάνω από τα 280 nm οφείλονται στο σχηματισμό πλειάδας χαλκού στο σύστημα 2K8p-Cu(I). Η μετάλλαξη της C3 σε S στο 1s μεταβάλλει δραματικά το σχήμα του φάσματος CD, στο οποίο οι κορυφές συγκριτικά με το αντίστοιχο φάσμα του 2K8p φαίνονται να αντιστρέφονται. Διακρίνονται οι παρακάτω ταινίες στα (-)283 nm, (+)305 nm, (-)322 nm και (+)348 nm.



Σχήμα 6.7. Μεταβολές στα φάσματα CD του 2K8p και των μεταλλάξεων 1s, 2s και 3s στην περιοχή 250-400 nm που οφείλονται στην προσθήκη Cu(II) και DTT.

Πηγαίνοντας από το 2K8p στο 1s, τα χαρακτηριστικά του φάσματος στην περιοχή μεταφοράς φορτίου παρουσιάζουν ερυθρή μετατόπιση συνιστώντας ότι η φύση των θειολικών υποκαταστατών διαφέρει. Επιπλέον, τα πρόσημα των δύο πρώτων ταινιών έχουν αντιστραφεί δείχνοντας ότι η αλληλεπίδραση με τον Cu(I) διαφέρει δραματικά.



Προηγούμενες μελέτες στις μεταλλοθειονίνες [126-127] έχουν αποδόσει αυτή τη συμπεριφορά στην ένταξη στον Cu(I) κυρίως γεφυρωμένων θειολικών ομάδων λόγω της μεγαλύτερης πολικότητάς τους σε σύγκριση με τις τελικές θειολικές ομάδες. Τα δεδομένα αυτά συνιστούν τη συμμετοχή της C3 στην ένταξη του Cu(I), καθώς η παρουσία της οδηγεί σε διαφορετικό τύπο ένταξης σε σύγκριση με το μοτίβο CPC. Το πιο πιθανό είναι ότι το μοτίβο CPC ευνοεί τη δημιουργία πλειάδας ιόντων Cu(I) κυρίως μέσω της ένταξης γεφυρωμένων θειολικών ομάδων.

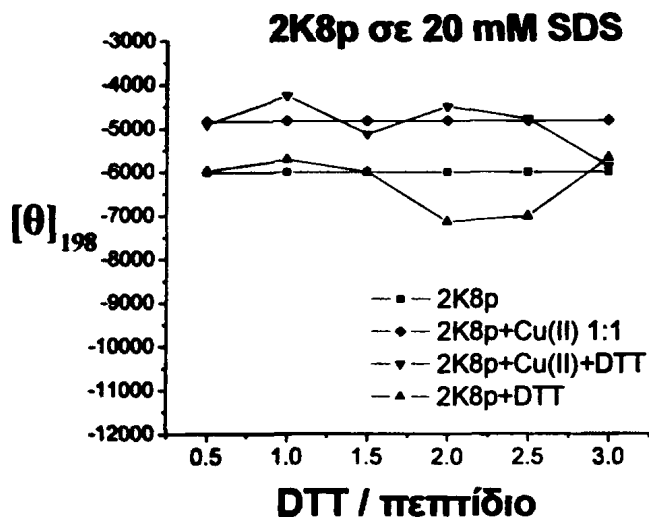
Η απουσία των μεταπτώσεων του μεταλλοϊόντος χαρακτηρίζει τα φάσματα CD του 2s. Δεν υπάρχει χαρακτηριστική ταινία που να δείχνει το σχηματισμό συμπλόκου παρόλο που υπάρχει μια μικρή αλλά μη συγκεκριμένη μεταβολή λόγω της παρουσίας Cu(I) στο διάλυμα. Το 3s εμφανίζει ταινίες στα (+)266 nm, (-)280 nm και (+)293 nm αλλά δεν υπάρχει καμία ταινία στην περιοχή χαμηλής ενέργειας. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι οι δύο πρώτες κυστεΐνες μπορεί να εντάσσονται στο Cu(I) και να σχηματίζουν σύμπλοκο με τρόπο λιγότερο ασύμμετρο σε σύγκριση με το 1s και ακόμα λιγότερο σε σύγκριση με το 2K8p. Η απουσία ταινιών στην περιοχή χαμηλής ενέργειας δείχνει ότι η τρίτη κυστεΐνη εκτός του ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ένταξη του Cu(I), πιθανόν να δρα γεφυρωτικά στο σχηματισμό πλειάδας CysS-Cu(I).

Η αλληλεπίδραση του Cu(II) με τις θειολικές ομάδες φαίνεται να είναι σημαντική, ιδιαίτερα στην περίπτωση του 2K8p, όπου και παρατηρούνται ταινίες σχετικά υψηλής έντασης (σχήμα 6.7). Αυτές μπορεί να οφείλονται σε αλληλεπίδραση του Cu(II) με τις ελεύθερες θειολικές ομάδες ή και σε πιθανή αναγωγή του Cu(II) σε Cu(I) από τις πεπτιδικές κυστεΐνες. Δυστυχώς είναι ελάχιστα τα διαθέσιμα δεδομένα για το σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ πεπτιδίων που περιέχουν L-cysteine και το ιόν Cu(II) λόγω των πειραματικών δυσκολιών στην παρασκευή των ενώσεων αυτών στην ανηγμένη τους μορφή και το γεγονός ότι μπορούν εύκολα να ανάγουν διάφορα μεταλλοϊόντα [128].

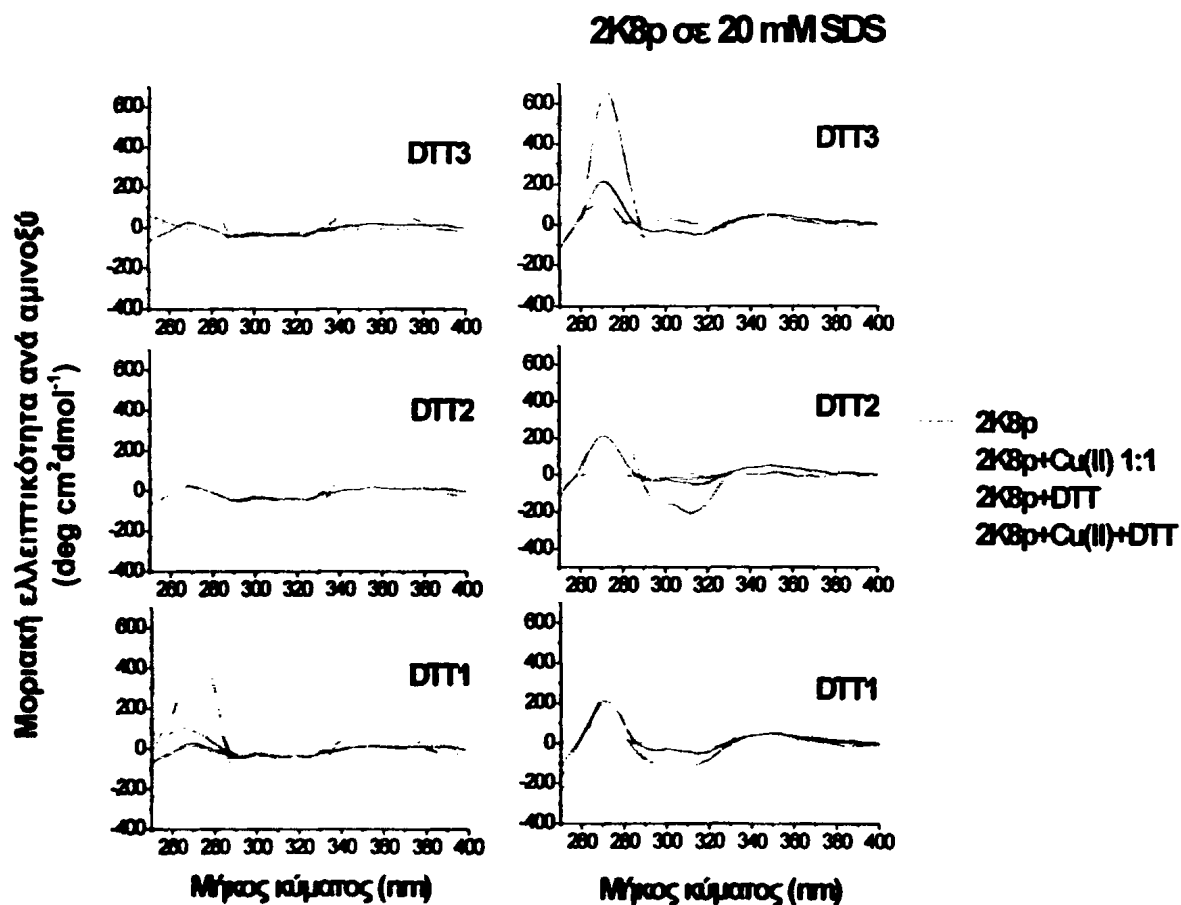
Έγινε προσπάθεια για μια πιο ρεαλιστική προσέγγιση στην αλληλεπίδραση του 2K8p με Cu(I) με την εισαγωγή του σε μικύλλια. Ως μοντέλο μεμβράνης χρησιμοποιήθηκε το SDS, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως μιμητικό του μεμβρανικού περιβάλλοντος σε μελέτες υδρόφοβων πρωτεϊνικών τμημάτων [129-131]. Η σύγκριση των μεταβολών που προκαλούνται από τον Cu(I) στη μοριακή ελλειπτικότητα του 2K8p παρουσία του SDS φαίνονται στο σχήμα 6.8α.



α)



β)



Σχήμα 6.8. α) Μεταβολές της μοριακής ελλειπτικότητας στα 198 nm (άξονας y) του 2K8p σε 20 mM SDS έναντι της στοιχειομετρίας DTT/πεπτιδίου (άξονας x), [2K8p ■, 2K8p+DTT ▲, 2K8p+Cu(II) 1:1 ◆, 2K8p+Cu(II)+DTT ▼], β) Διαφορές στα φάσματα CD του 2K8p στην περιοχή 250–400 nm, που προκαλούνται από την παρουσία 20 mM SDS και την προσθήκη Cu(II) και DTT. Σύγκριση των στοιχειομετριών DTT/πεπτιδίο 1:1 (DTT1), 2:1 (DTT2) και 3:1 (DTT3).



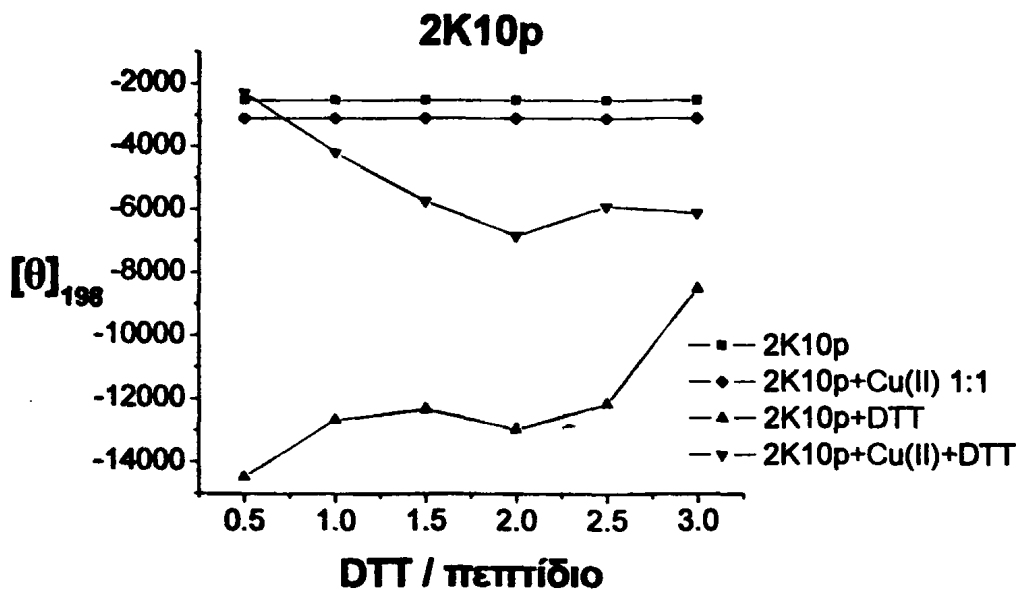
Οι διακυμάνσεις στη μοριακή ελλειπτικότητα είναι ενδεικτικές των μεταβολών στη διαμόρφωση του πεπτιδίου ανάλογα με την ασυμμετρία του περιβάλλοντος του. Το υδρόφοβο περιβάλλον των μικυλλίων SDS είναι γνωστό ότι επιβάλλει περιορισμούς στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών [132]. Οι περιορισμοί στη διαμόρφωση του 2K8p είναι εμφανείς από την ελάττωση στο μέγεθος της μοριακής ελλειπτικότητας στα 198 nm (σχήμα 6.8α) παρουσία των μικυλλίων. Η προσθήκη DTT και Cu(II) προκαλεί αμελητέες μεταβολές στη διαμόρφωση του 2K8p παρουσία των μικυλλίων SDS.

Η εισαγωγή του 2K8p στα μικύλλια SDS δίνει χαρακτηριστικές ταινίες μεταφοράς φορτίου λόγω της αλληλεπίδρασης του με τον Cu(I) (σχήμα 6.8β). Όταν το 2K8p εισαχθεί εντός των μικυλλίων SDS φαίνεται να μην αλληλεπιδρά με το ιόν του Cu(II) (δεν παρατηρείται ταινία μεταφοράς φορτίου). Επιπλέον, το μέγεθος της ταινίας CT στην περιοχή υψηλής ενέργειας φτάνει στο μέγιστο σε στοιχειομετρία DTT/πεπτίδιο 3:1, ενώ απουσία του SDS το μέγιστο έχει επιτευχθεί ήδη από στοιχειομετρία DTT/πεπτίδιο 1:1 (σχήμα 6.8β). Το μέγεθος και το μέγιστο της μοριακής ελλειπτικότητας είναι παρόμοια για το 2K8p (270 nm, $656 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) και το 2K8p σε 20 mM SDS (272 nm, $658 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$). Η μελέτη του 2K8p παρουσία των μικυλλίων δείχνει την παρουσία μιας σταθερής διαμόρφωσης η οποία επηρεάζεται ελάχιστα από μεταβολές του εξωτερικού περιβάλλοντος. Επιπλέον το 2K8p δείχνει να αλληλεπιδρά ειδικά με τον Cu(I) έναντι του Cu(II).

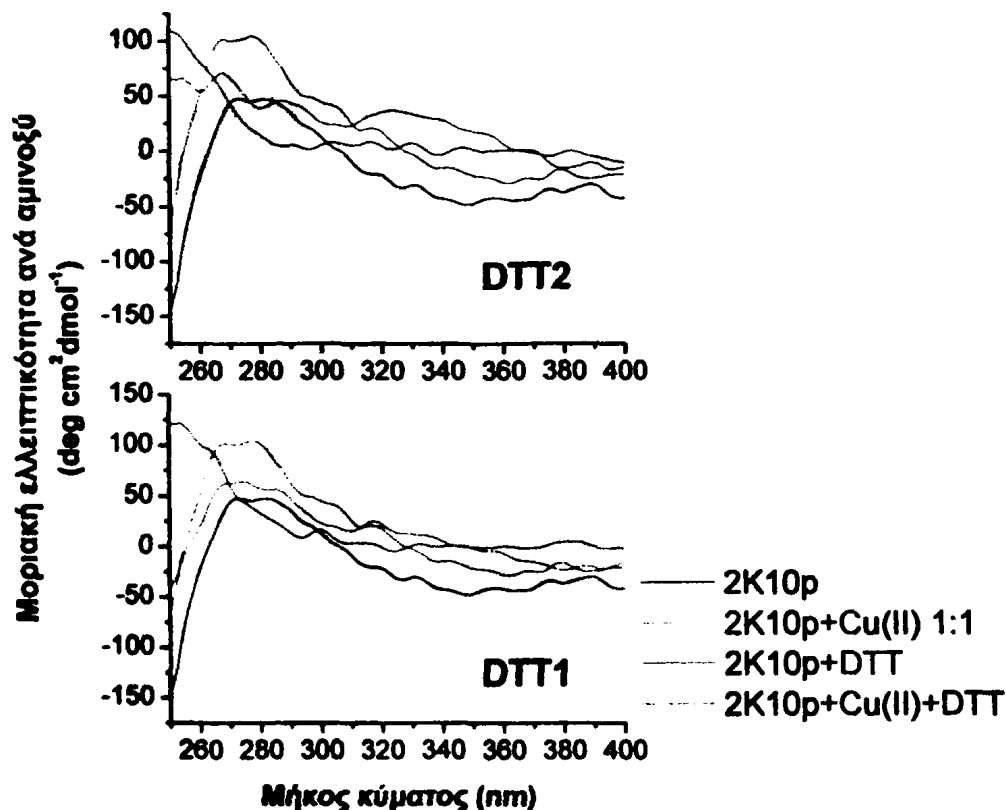
Το σχήμα 6.9α δείχνει τις μεταβολές της διαμόρφωσης που παρατηρούνται για το 2K10p κατά την προσθήκη DTT και Cu(II). Το μέγεθος της μοριακής ελλειπτικότητας του 2K10p στα 198 nm είναι πολύ λιγότερο σε σύγκριση με το 2K8p. Αυτό δείχνει μια πιο περιορισμένη διαμόρφωση για το 2K10p όπως ήδη έχει προβλεφθεί και από το μοντέλο ομολογίας. Η προσθήκη του DTT οδηγεί σε μεγάλη αύξηση της μοριακής ελλειπτικότητας πιθανόν λόγω της αναγωγής του ήδη σχηματισμένου δισουλφιδικού δεσμού. Ο πιθανός σχηματισμού συμπλόκου με ένταξη των ελεύθερων σουλφυδρυλομάδων (μοτίβο -Cys-X-X-Cys-) στον Cu(I) φαίνεται από την ελάττωση του μεγέθους της μοριακής ελλειπτικότητας (σχήμα 6.9α).



α)



β)



Σχήμα 6.9. α) Μεταβολές της μοριακής ελλειπτικότητας στα 198 nm (άξονας y) του 2K10p έναντι της στοιχειομετρίας DTT/πεπτιδίου (άξονας x), [2K10p ■, 2K10p+DTT ▲, 2K10p+Cu(II) 1:1 ♦, 2K10p+Cu(II)+DTT ▼, β) Μεταβολές των φασμάτων CD του 2K10p στην περιοχή 250-400 nm που προκαλούνται από την προσθήκη Cu(II) και DTT. Σύγκριση της στοιχειομετρίας DTT/πεπτιδίο 1:1 (DTT1) με τη 2:1 (DTT2).



Οι μεταβολές που προκαλούνται από τον Cu(I) στην περιοχή του εγγύς UV δεν είναι τόσο έντονες στην περίπτωση του 2K10p. Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.9β, παρουσία Cu(II) παρατηρείται μία ταινία CT μέτριας έντασης η οποία εμφανίζει δύο τοπικά μέγιστα ((+) 268 nm, 102,1 deg·cm²dmol⁻¹ και (+)277 nm, 105,4 deg·cm²dmol⁻¹). Η ταινία αυτή είναι πιο ισχυρή από αυτή που παρατηρείται παρουσία Cu(I) η οποία μετατοπίζεται ελαφρώς προς υψηλότερα μήκη κύματος σε στοιχειομετρία DTT/ πεπτίδιο 1:1 ((+)273 nm, 64,5 deg·cm²dmol⁻¹ και (+)285 nm, 56,8 deg·cm²dmol⁻¹) και διαχωρίζεται σε δύο κορυφές όταν η στοιχειομετρία DTT/πεπτίδιο γίνει 2:1 ((+)267 nm, 71,4 deg·cm²dmol⁻¹ και (+)287 nm, 46,3 deg·cm²dmol⁻¹). Ταυτόχρονα, εμφανίζεται νέα κορυφή με μέγιστο στα (+)324 nm, 37,4 deg·cm²dmol⁻¹. Τα φάσματα CD του 2K10p δεν θυμίζουν σε τίποτα αυτά που καταγράφηκαν για το 2K8p, γεγονός αναμενόμενο από τα μοντέλα ομολογίας των δύο πεπτιδίων. Είναι φανερό ότι η φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του Cu(I) και των δύο πεπτιδίων, και κατ' επέκταση των μοτίβων CXXC και CPC, διαφέρει ποιοτικά και ποσοτικά.

6.5. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (¹H NMR)

Η απόδοση των κορυφών του DTT έγινε όπως στην εργασία του H. Kozlowski και των συνεργάτων του [133]. Το φάσμα ¹H NMR της ανηγμένης μορφής του DTT (DTT_{red}) σε D₂O περιλαμβάνει ένα σήμα για το πρωτόνιο CH(OH) στα 3,6-3,7 ppm και δύο σήματα για τα μη ισοδύναμα πρωτόνια CH₂S στην περιοχή των 2,5-2,9 ppm. Στο φάσμα ¹H NMR της οξειδωμένης μορφής του DTT (DTT_{ox}), το σήμα για το πρωτόνιο CH(OH) βρίσκεται στα ~3,6 ppm ενώ τα δύο σήματα των πρωτονίων CH₂S μετατοπίζονται στα 2,8-3,0 ppm.

Η απόδοση των σημάτων των πεπτιδικών πρωτονίων έγινε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (οι συμβολισμοί των αμινοξέων και των πρωτονίων τους παρατίθενται στο Παράρτημα I) [134]. Η απόδοση των κορυφών των κυστεϊνών βασίστηκε στη διαδοχική αντικατάσταση της κάθε κυστεϊνης από μία σερίνη στην αρχική αλληλουχία του 2K8p η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της αντίστοιχης cross-peak στο φάσμα δύο διαστάσεων ¹H NMR των μεταλλαγμένων πεπτιδίων 1s, 2s και 3s. Δεν παρατηρήθηκαν NOE cross-peaks για κανένα από τα δείγματα που μετρήθηκαν. Τα φάσματα δύο διαστάσεων 2D ROESY δεν προσέφεραν παραπάνω πληροφορίες από το πείραμα TOCSY. Το φάσμα 2D TOCSY του 2K8p, στο οποίο επισημαίνεται η απόδοση των κορυφών τόσο του 2K8p όσο και



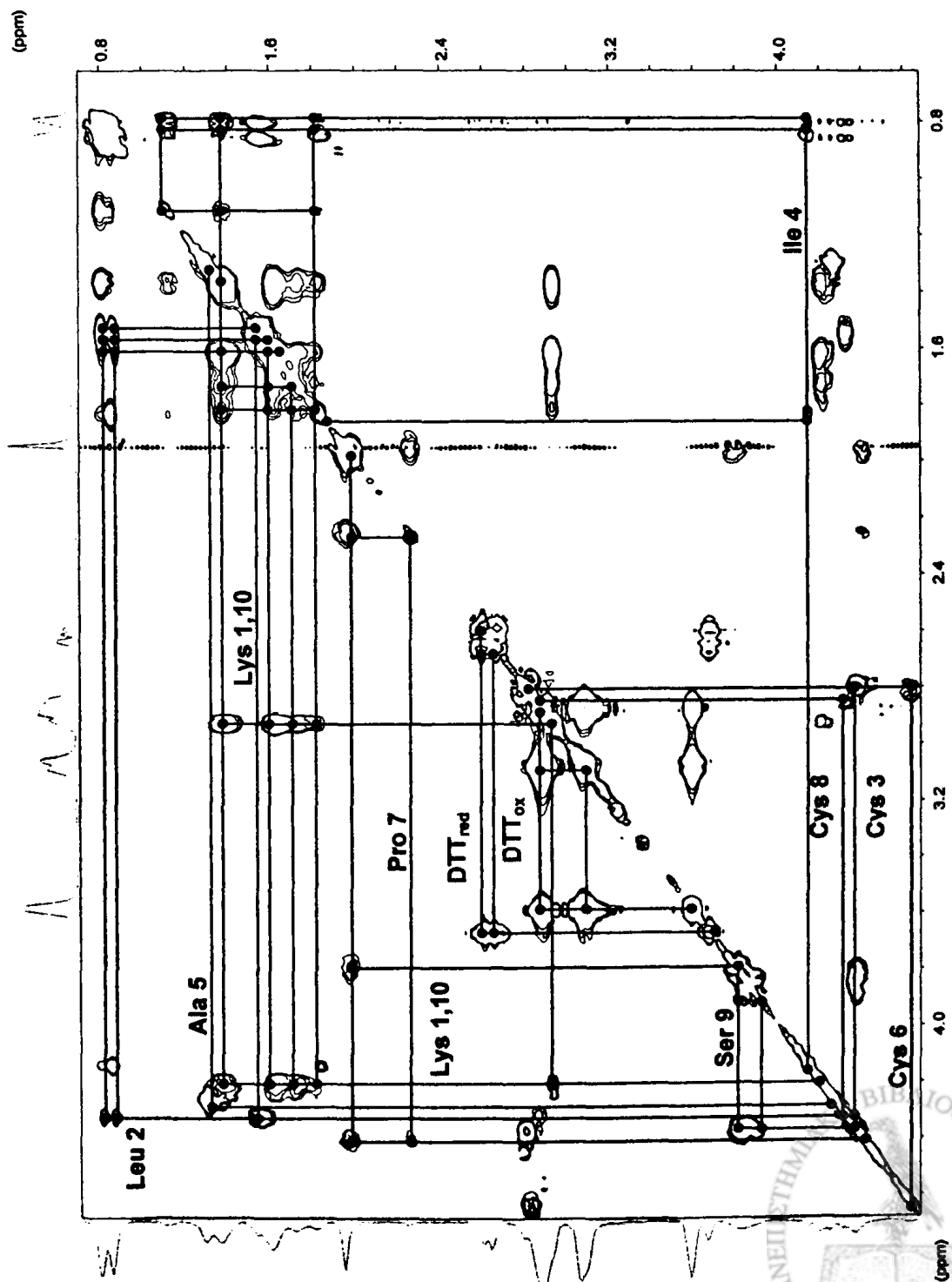
της ανηγμένης και της οξειδωμένης μορφής του DTT, φαίνεται στο σχήμα 6.10 (τα φάσματα ^1H NMR δύο διαστάσεων παρατίθενται στο Παράρτημα ΙΙ).

Η αλληλεπίδραση του Cu(I) με πεπτίδια που περιέχουν κυστεΐνες έχει ως αποτέλεσμα σημαντική διεύρυνση των κορυφών. Το φαινόμενο αυτό γίνεται πιο εμφανές από τη σύγκριση των φασμάτων 1D. Η μεγαλύτερη επίδραση στο εύρος των κορυφών από τον Cu(I) παρατηρείται για το 2K8p ενώ οι κορυφές στο φάσμα του πεπτιδίου 2s επηρεάζονται ελάχιστα (σχήμα 6.11). Το γεγονός ότι όλα τα σήματα των πεπτιδικών πρωτονίων υφίστανται διεύρυνση συνιστά ότι ολόκληρο το μόριο συμμετέχει στη διαδικασία αποδιέγερσης. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται και κατά την αλληλεπίδραση του Cu(I) με το DTT [133] καθώς και στη μελέτη των μεταλλικών πλειάδων στο N-τελικό άκρο του ανασταλτικού παράγοντα της ανάπτυξης των νεύρων [125]. Επιπλέον, η προσθήκη Cu(I) στην *aro-CorZ*, την πρωτεΐνη chaperone χαλκού του *Enterococcus hirae*, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των περισσότερων σημάτων NMR πλησίον της θέσης σύνδεσης του μετάλλου. Ο αυξημένος χρόνος συσχέτισης περιστροφής της Cu(I)-CorZ σε σύγκριση με την *aro-CorZ* και η επακόλουθη ελαττωμένη συνολική κινητικότητα αποδόθηκαν στη συσσωμάτωση της Cu(I)-CorZ [85]. Το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο όταν σχηματίζονται μικρά ολιγομερή.

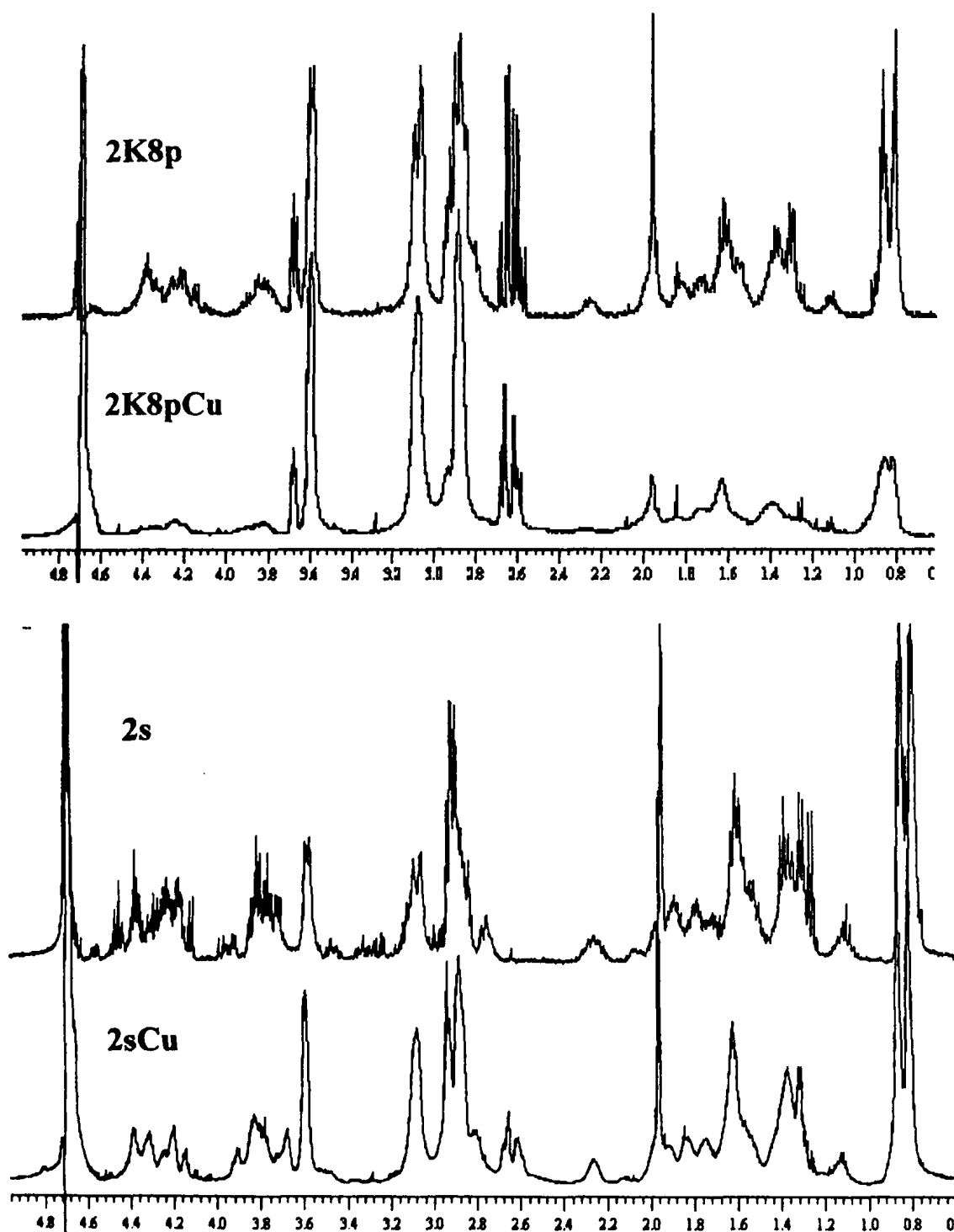
Το πείραμα 2D TOCSY μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες σχετικά με τις διαφορές στην αλληλεπίδραση των πέντε πεπτιδίων με τον Cu(I) . Στον πίνακα 6.2, φαίνονται οι διαφορές των χημικών μετατοπίσεων ^1H NMR των 2K8p, 1s, 2s και 3s όταν υπάρχει Cu(I) στο διάλυμα. Στην περίπτωση του 2K8p, ο μεγάλος αριθμός συνδυασμών για το σχηματισμό ολιγομερών έχει ως αποτέλεσμα τη διεύρυνση των σημάτων των κυστεϊνών η οποία οδηγεί στην εξαφάνιση των αντιστοίχων cross-peak. Προτείνεται λοιπόν ότι όλες οι κυστεΐνες συμμετέχουν στην ένταξη του Cu(I) . Το σήμα του DTT_{red} δεν επηρεάζεται, επομένως το DTT δεν συμμετέχει στην ένταξη του Cu(I) . Επιπλέον, η κορυφή της προλίνης (P7) H_δ έχει επίσης εξαφανιστεί, πιθανότατα λόγω διεύρυνσης ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται μετατόπιση περίπου 0,05 ppm για τα πρωτόνια L2 H_β και P7 H_γ . Τα δεδομένα αυτά συνιστούν την ένταξη του Cu(I) στα γειτονικά αμινοξέα των L2 και P7, δηλαδή τις κυστεΐνες C3, C6 και C8.

Το φάσμα που επηρεάζεται λιγότερο από την παρουσία του Cu(I) είναι αυτό του 2s. Η διεύρυνση των κορυφών είναι αμελητέα, όμως παρατηρείται σημαντική μετατόπιση των κυστεϊνικών πρωτονίων (0,1 ppm για τα πρωτόνια H_α των C3 και C8 και ~ 0,05 ppm για τα πρωτόνια H_β των C3 και C8), η οποία προέρχεται από την αλληλεπίδραση των





Σχήμα 6.10. Φάσμα 2D
TOCSY του πεπτιδίου
2K8p.



Σχήμα 6.11. Σύγκριση των φασμάτων $1D^1H$ NMR των 2K8p και 2s απουσία και παρουσία Cu(I).

σουλφυδρυλομάδων με τον Cu(I). Ο σχηματισμός μακροχηλικού συμπλόκου με ταυτόχρονη ένταξη των κυστεϊνών C3 και C8 δεν ευνοείται θερμοδυναμικά. Γι' αυτό το λόγο, οι C3 και C8 δεν μπορούν να δράσουν ως γεφυροποιοί υποκαταστάτες στο σχηματισμό ολιγομερών. Ο τύπος ένταξης σε αυτή την περίπτωση φαίνεται να είναι απλούστερος. Πιθανότατα, κάθε κυστεΐνη να αλληλεπιδρά ανεξάρτητα με ένα ιόν Cu(I). Λαμβάνοντας υπόψη ότι μόνο για το 2s παρατηρείται ξεχωριστό σήμα για την ελεύθερη και τη συμπλεγμένη μορφή του DTT_{red}, μπορεί να προταθεί ότι το DTT_{red} συμμετέχει επίσης στην ένταξη ως μονοδοντικός υποκαταστάτης σχηματίζοντας μικτό σύμπλοκο με το πεπτίδιο. Αυτός ο απλός τρόπος ένταξης μπορεί να ερμηνεύσει την παρουσία ξεχωριστών σημάτων αντί διευρυσμένων κορυφών που παρατηρούνται στα φάσματα των υπόλοιπων πεπτιδίων.

Πίνακας 6.2.

Οι χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR των 2K8p, 1s, 2s και 3s οι οποίες διαφέρουν σημαντικά παρουσία Cu(I) σε pH=8,00 και T=298 °K^a.

	2K8p		1s		2s		3s	
Πρωτόνια	-	Cu(I)	-	Cu(I)	-	Cu(I)	-	Cu(I)
C3 H _α	4,37	^β	-	-	<u>4,22</u>	<u>4,37</u>	4,34	^β
C3 H _β	2,80 ^γ	^β	-	-	<u>2,75^γ</u>	<u>2,80^γ</u>	2,79 ^γ	^β
C6 H _α	4,64	^β	4,66	^β	-	-	4,59	^β
C6 H _β	2,80 ^γ	^β	2,84 ^γ	^β	-	-	2,81 ^γ	^β
C8 H _α	4,32	^β	4,35	^β	<u>4,22</u>	<u>4,32</u>	-	-
C8 H _β	2,86 ^γ	^β	2,88 ^γ	^β	2,84 ^γ	2,81 ^γ	-	-
L2 H _{β2}	<u>1,57</u>	<u>1,62</u>	1,61	1,60	1,59	1,58	1,57	1,56
I4 H _α	4,14	4,14	4,16	4,15	4,12	4,15	<u>4,15</u>	<u>3,96</u>
I4 H _{γ12}	1,12	1,12	1,13	1,12	1,13	1,13	<u>1,11</u>	<u>1,18</u>
I4 H _{γ13}	1,37	1,40	1,40	1,39	1,35	1,38	<u>1,36</u>	<u>1,46</u>
P7 H _α	4,40	^β	4,41	4,41	4,36	4,39	4,39	4,40
P7 H _β	2,25	2,28	<u>2,13</u>	<u>2,25</u>	2,24	2,25	2,27	^β
P7 H _γ	<u>1,96</u>	<u>2,02</u>	1,96	2,00	<u>1,96</u>	<u>1,91</u>	<u>1,97</u>	<u>1,90</u>
P7 H _δ	3,79	^β	<u>3,80</u>	<u>3,73</u>	3,73	3,74	<u>3,88</u>	<u>3,72</u>
DTT _{red} H ₁	2,59	2,60	2,62	^β	2,59	2,61, 2,61	2,60	^β
DTT _{red} H ₂	2,66	2,66	2,67	^β	2,66	2,66, 2,66	2,66	^β
DTT _{red} H ₃	3,66	3,68	3,69	^β	<u>3,66</u>	3,68, <u>3,88</u>	3,67	^β

^a Ως αναφορά των χημικών μετατοπίσεων έχει χρησιμοποιηθεί το σήμα HOD στα 4,75 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις που διαφέρουν κατά 0,05 είναι υπογραμμισμένες ενώ εκείνες για τις οποίες Δδ>0,05 ppm είναι διπλά υπογραμμισμένες.

^β Δεν ήταν δυνατή η παρατήρηση της cross-peak στο φάσμα 2D TOCSY.

^γ Θεωρείται ότι υπάρχει εκφυλισμός.



Πίνακας 6.3.

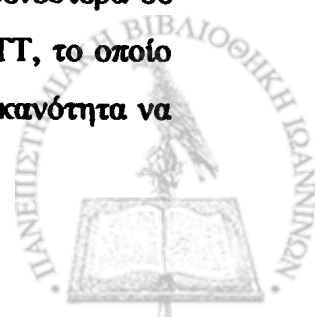
Οι χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του 2K10p, απουσία και παρουσία Cu(I) σε pH=8,00 και $T=298^\circ\text{K}^a$.

Πρωτόνια	-	Cu(I)	Πρωτόνια	-	Cu(I)
K1,12 H _a	4,20	4,20	H10 H _a	4,56	4,55
K1,12 H _{β2}	1,70	1,69	H10 H _{β2}	2,97	2,97
K1,12 H _{β3}	1,80	1,80	H10 H _{β3}	3,05	3,06
K1,12 H _γ	1,40	1,39	H10 H ₂	7,63	7,64
K1,12 H _δ	1,62	1,62	H10 H ₅	6,90	6,91
K1,12 H _ε	2,93	2,93			
G2 H _a	3,64	3,64			
M3 H _a	4,51	4,520			
M3 H _{β2}	1,97	1,97	N11 H _a	4,62	4,62
M3 H _{β3}	2,46	2,46	N11 H _{β2}	2,69	2,69
M3 H _γ	2,54	2,54	N11 H _{β3}	2,78	2,77
M3 H _ε	2,08	2,06			
T4 H _a	4,32	4,33			
T4 H _β	4,17	4,16			
C5,8 H _a	4,39	4,42			
C5,8 H _β	2,85	2,85			
A6 H _a	4,28	4,28			
A6 H _β	1,38	1,36			
S7 H _a	4,35	4,36			
S7 H _{β2}	3,81	3,81			
S7 H _{β3}	3,85	3,85			
V9 H _a	4,00	4,01	DTT _{red} H ₁	2.60	^β
V9 H _β	1,99	1,98	DTT _{red} H ₂	2.66	^β
V9 H _γ	0,78	0,79	DTT _{red} H ₃	3.68	^β

^a Ως αναφορά των χημικών μετατοπίσεων έχει χρησιμοποιηθεί το σήμα HOD στα 4,75 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις που διαφέρουν κατά 0,05 είναι υπογραμμισμένες ενώ εκείνες για τις οποίες $\Delta\delta > 0,05$ ppm είναι διπλά υπογραμμισμένες.

^β Δεν ήταν δυνατή η παρατήρηση της cross-peak στο φάσμα 2D TOCSY.

Στην περίπτωση του 1s (μετατόπιση 0,07-0,12 ppm για τα πρωτόνια P7 H_δ, H_β) και του 3s (μετατόπιση ~ 0,09 ppm για τα πρωτόνια I4 H_a και H_γ και 0,07-0,16 ppm για τα πρωτόνια P7 H_δ και H_γ), η εξαφάνιση των cross-peak των κυστεϊνών αποδίδεται στη διεύρυνση του σήματος λόγω του σχηματισμού ολιγομερών. Το σήμα των πρωτονίων CH₂ του DTT_{red} παρουσία Cu(I), έχει επίσης εξαφανιστεί και για τα δύο πεπτίδια συνιστώντας την πιθανή συμμετοχή του στην ένταξη. Τα 1s και 3s δεσμεύουν τον Cu(I) ασθενέστερα σε σχέση με το 2K8p, καθιστώντας δυνατή και τη συμμετοχή στην ένταξη του DTT, το οποίο φαίνεται να είναι καλό χηλικό αντιδραστήριο για τον Cu(I). Το DTT έχει την ικανότητα να



σχηματίζει σύμπλοκα με τον Cu(I) ανεξάρτητα ή να συμμετέχει στο σχηματισμό μικτών συμπλόκων.

Για το 2K10p, το οποίο αποτελεί τμήμα του WD6 και είναι γνωστό ότι αντιδρά με τον Cu(I), η αλληλεπίδραση φαίνεται κυρίως από τη διεύρυνση των σημάτων που παρατηρούνται στο φάσμα 1D ^1H NMR. Ο σχηματισμός ολιγομερών μπορεί να αποτελεί αιτία της διεύρυνσης με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν σημαντικές μετατοπίσεις των σημάτων του πεπτιδίου. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του 2K10p φαίνονται στον πίνακα 6.3.

Το DTT φαίνεται να συμμετέχει επίσης στην ένταξη αφού το σήμα CH_2 της ανηγμένης του μορφής δεν παρατηρείται. Πιθανότατα, το 2K10p να μην σχηματίζει τόσο σταθερό σύμπλοκο όσο το 2K8p με τον Cu(I), γεγονός που πιθανόν ερμηνεύεται από την αντιστρεπτή σύνδεση του Cu(I) στην WD6 ανάλογα με το φορτίο του Cu(I) στο ηπατοκύτταρο καθώς και ο Cu(I) πρέπει να μεταφερθεί από την άλλη πλευρά της μεμβράνης εντός της συσκευής Golgi αντί να μείνει σταθερά συνδεδεμένος στην WD6.

Πίνακας 6.4.

Σύγκριση των φασμάτων ^1H NMR σε διαφορετικές αναλογίες $[\text{Cu(I)}]:[\text{3s}]$ στους 298°K^a .

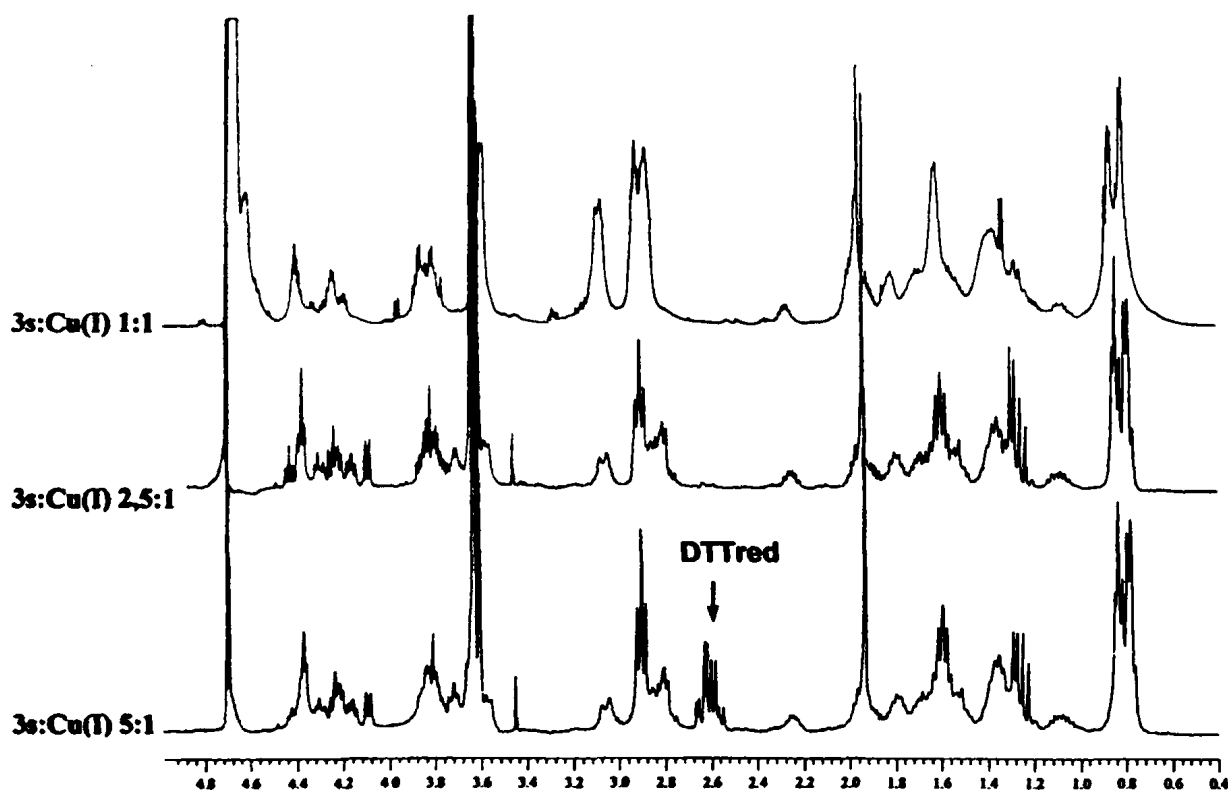
	[3s]	[Cu(I)]:[3s] 1:1	[Cu(I)]:[3s] 1:2.5	[Cu(I)]:[3s] 1:5
C3 H_α	4,34	β	<u>4,44</u>	<u>4,44</u>
C3 H_β	2,79	β	2,80	2,80
C6 H_α	4,59	β	<u>4,70</u>	<u>4,70</u>
C6 H_β	2,81	β	2,80	2,79
P7 H_α	4,39	4,40	4,38	4,36
P7 H_β	2,27	<u>2,13</u>	2,25	2,25
P7 H_γ	1,97	<u>1,90</u>	1,94	1,94
P7 H_δ	3,88	<u>3,72</u>	<u>3,70</u>	<u>3,70</u>
DTT _{red} H_1	2,59	β	β	2,57
DTT _{red} H_2	2,66	β	β	2,62
DTT _{red} H_3	3,66	β	β	3,66

^a Ως κορυφή αναφοράς των χημικών μετατοπίσεων χρησιμοποιήθηκε το σήμα HOD στα 4,75 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις που διαφέρουν έχουν υπογραμμιστεί και αυτές για τις οποίες $\Delta\delta > 0,05$ ppm είναι διπλά υπογραμμισμένες.

^b Δεν παρατηρείται cross-peak στο φάσμα 2D TOCSY.

Για να αποκλείσουμε την πιθανότητα η διεύρυνση των κορυφών παρουσία Cu(I) να οφείλεται σε άλλα αίτια όπως ο παραμαγνητισμός, έγιναν επιπλέον πειράματα. Εκτεταμένες μελέτες της αλληλεπίδρασης του Cu(I) με αμινοθειώλες [135-136] έχουν βρει ότι υπάρχει

ισχυρή τάση σχηματισμού πολυπυρηνικών συμπλόκων στοιχειομετρίας $(\text{CuL})_n$ και $(\text{Cu}_2\text{L}_3)_n$ σε συγκεντρώσεις Cu(I) πάνω από 10^{-4} M. Η αναλογία των δύο μορφών και ο βαθμός πολυμερισμού εξαρτάται από την αναλογία $[\text{Cu(I)}]:[\text{L}]$, την απόλυτη συγκέντρωση Cu(I) και τη δομή του L. Τα μονοπυρηνικά σωματίδια κυριαρχούν, ωστόσο, καθώς αυξάνεται η $[\text{L}]$ και ελαττώνεται η $[\text{Cu(I)}]$. Αποφασίσαμε να μετατοπίσουμε την ισορροπία σχηματισμού πολυπυρηνικών σωματιδίων τροποποιώντας την αναλογία $[\text{Cu(I)}]:[\text{L}]$. Το πεπτίδιο 3s χρησιμοποιήθηκε γι' αυτό το σκοπό στις αναλογίες 1:5 και 1:2.5 (Πίνακας 6.4).

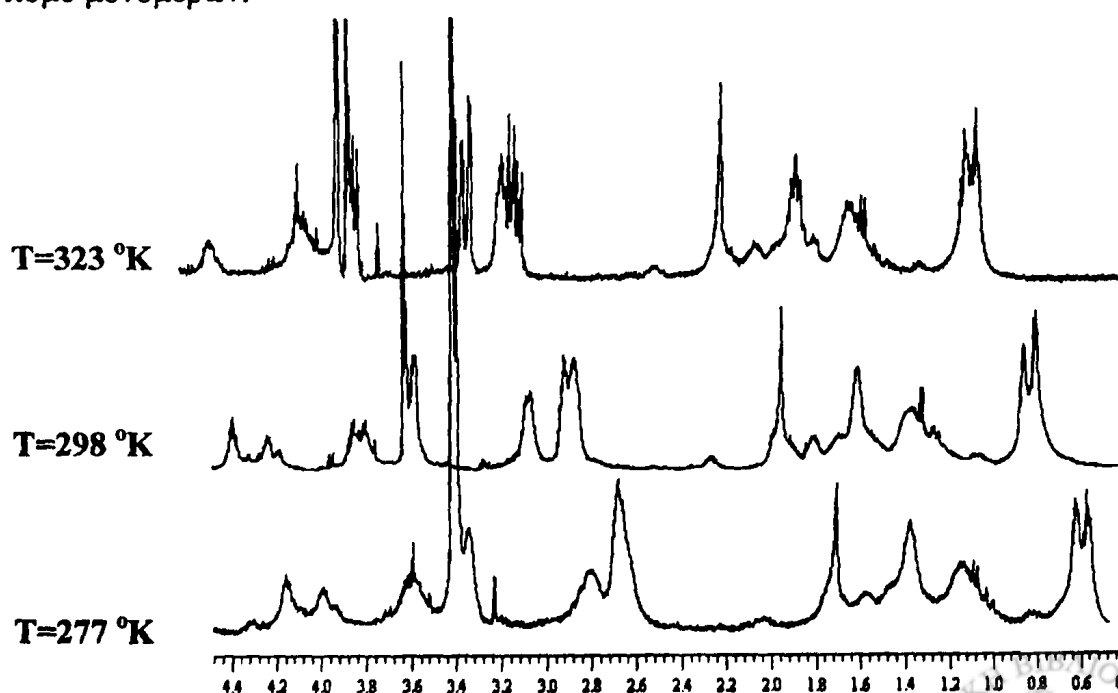


Σχήμα 6.12. Φάσματα 1D ^1H NMR του συστήματος 3s-Cu(I) για τις στοιχειομετρίες 1:1, 2.5:1 και 3:1 (στοιχειομετρία DTT/πεπτίδιου 2:1, pH=8,0).

Η επιλογή του 3s γι' αυτό το πείραμα βασίστηκε στη σημαντική διεύρυνση των σημάτων που παρουσιάζει σε συνδυασμό με την εξαφάνιση των σημάτων του DTT_{red} . Στην αναλογία 1:5, οι κορυφές γίνονται πιο οξείες (σχήμα 6.12) και οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις είναι πιο εύκολα διακριτές (Πίνακας 6.4). Στο φάσμα 2D TOCSY, φαίνονται οι cross-peak των κυστεϊνών με μετατόπιση $\sim 0,1$ ppm για τα πρωτόνια H_α των κυστεϊνών. Επιπλέον, φαίνονται τα cross-peak των πρωτονίων H_β της προλίνης τα οποία χαρακτηρίζονται από μετατόπιση $> 0,1$ ppm. Δεν παρατηρείται σημαντική μετατόπιση των πρωτονίων της

ανηγμένης μορφής του DTT, συνιστώντας ότι το DTT δεν συμπλέκεται με τον Cu(I). Η αύξηση της αναλογίας [Cu(I)]:[L] σε 1:2.5 δεν οδηγεί σε περαιτέρω μετατόπιση των πρωτονίων των κυστεϊνών και της προλίνης ενώ οι cross-peak του DTT_{red} έχουν εξαφανιστεί (σχήμα 6.12) συνιστώντας ότι η αύξηση του διαθέσιμου Cu(I) στο διάλυμα έχει ως αποτέλεσμα τη συμπλοκοποίηση του επίσης από μόρια DTT. Επιπλέον, ελέγχθηκε η στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 1:1 αντί για 2:1 που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα και βρέθηκε ότι δεν προκαλεί καμία διαφοροποίηση στο φάσμα.

Η θερμοκρασία είναι άλλη μία παράμετρος η οποία καθορίζει τις σταθερές χημικής ισορροπίας. Η ελάττωση της θερμοκρασίας στους 277 °K έχει ως αποτέλεσμα την αναμενόμενη αύξηση της διεύρυνσης των κορυφών στο φάσμα 1D (σχήμα 6.13) και την ελάττωση των όγκων των cross-peak στο φάσμα 2D η οποία συνοδεύεται από μετατόπιση όλων των κορυφών προς υψηλότερα πεδία κατά 0,2 ppm. Από την άλλη, η αύξηση της θερμοκρασίας στους 323 °K έχει ως αποτέλεσμα την όξυνση όλων των κορυφών (σχήμα 6.13) και την αύξηση των όγκων των cross-peak και ταυτόχρονη μετατόπιση τους προς χαμηλότερα πεδία κατά 0,2 ppm. Από τα πειράματα μεταβλητής θερμοκρασίας μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες μετατοπίζουν την ισορροπία προς το σχηματισμό πολυπυρηνικών σωματιδίων ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες ευνοούν το σχηματισμό μονομερών.



Σχήμα 6.13. Φάσματα 1D ^1H NMR του συστήματος 3s-Cu(I) 1:1 (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, pH=8,0) σε διάφορες θερμοκρασίες.

Κεφάλαιο

7

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η δυσκολία στη μελέτη ολόκληρης της ATP7B, λόγω του υψηλού μοριακού βάρους της και της πενιχρής διαλυτότητας της σε υδατικά διαλύματα, κατέστησε απαραίτητη τη μελέτη του μοτίβου CPC ως τμήμα ενός πεπτιδίου μοντέλου. Η μελέτη αυτή του μοτίβου CPC, τμήματος της Wilson TM6, αποκάλυψε τη σημαντική αλληλεπίδρασή του με τον Cu(I), στηρίζοντας την άποψη ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά του χαλκού. Αυτή η αλληλεπίδραση φαίνεται τόσο από τις μεταβολές στη διαμόρφωση που προκαλούνται από το σχηματισμό συμπλόκου με τον Cu(I) καθώς και από την παρουσία ισχυρών ταινιών CT στα φάσματα CD. Τα εξαρτώμενα από το μέταλλο χαρακτηριστικά στα φάσματα CD και η διεύρυνση των σημάτων στα φάσματα NMR συνιστούν την παρουσία ολιγομερών. Η εξαφάνιση όλων των cross-peak των κυστεϊνών συνιστά ότι και οι τρεις κυστεΐνες εντάσσονται στον Cu(I). Ενδιαφέρον αποτελεί ότι η αλληλεπίδραση με τον Cu(I) διατηρείται σε μεγάλο βαθμό κατά την εισαγωγή του πεπτιδίου 2K8p σε μικύλλια SDS, καθώς με αυτό τον τρόπο γίνεται μίμηση του μεμβρανικού περιβάλλοντος όπου η διαμόρφωση του είναι πιο περιορισμένη και λιγότερο εκτεθειμένη στο διαλύτη.

Η διαδοχική αντικατάσταση των κυστεϊνών από σερίνες εντός της αλληλουχίας του πεπτιδίου 2K8p αποτέλεσε χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση του ρόλου της κάθε κυστεΐνης στη δέσμευση του Cu(I). Τα φάσματα CD και NMR του πεπτιδίου 1s δείχνουν παρόμοιες μεταβολές στη διαμόρφωση κατά την ένταξη του Cu(I). Η παρουσία στοιχείων χαρακτηριστικών του μεταλλοϊόντος στα φάσματα CD καθώς και η εξαφάνιση των σημάτων των C6 και C8 στα φάσματα 2D NMR αποτελούν ενδείξεις της ένταξης του Cu(I). Έτσι, παρόλο που ο σχηματισμός πλειάδας Cu(I) είναι επίσης εμφανής στο 1s, η φύση των πολυπυρηνικών σωματιδίων διαφέρει σε σχέση με το 2K8p, όπως φαίνεται από τις ταινίες CT στην εγγύς-υπεριώδη περιοχή των φασμάτων CD. Το σήμα των ταινιών CT αντιστρέφεται προσομοιάζοντας το σήμα της εναντιομερούς μορφής σε σύγκριση με τις ταινίες CT του 2K8p ενώ ταυτόχρονα μετατοπίζεται προς μεγαλύτερα μήκη κύματος συνιστώντας ότι το είδος της ένταξης του Cu(I) στις κυστεϊνικές θειολικές ομάδες αυτού του πεπτιδίου διαφέρει συγκριτικά με το πεπτίδιο 2K8p.

Ο σημαντικός ρόλος της C6 στη δέσμευση του Cu(I) από το πεπτίδιο 2K8p επισημαίνεται στα φάσματα του 2s. Η μετατόπιση στα σήματα NMR των κυστεϊνικών πρωτονίων δείχνει ότι εντάσσονται στον Cu(I). Η απουσία διεύρυνσης των σημάτων δείχνει



ότι ο ολιγομερισμός πραγματοποιείται σε μικρότερη έκταση. Η αλληλεπίδραση του Cu(I) με το 2s δεν δίνει αξιόλογο σήμα στο CD στην περιοχή του εγγύς-UV δείχνοντας έτσι ότι η ένταξη εδώ διαφέρει σε σχέση με τα 2K8p και 1s. Επιπλέον, η παρουσία δύο ξεχωριστών σημάτων για την ελεύθερη και τη συμπλεγμένη μορφή του DTT συνιστά τη συμμετοχή του στην ένταξη στον Cu(I) πιθανόν μέσω της δημιουργίας μικτών συμπλόκων με το 2s. Αφού οι C3 και C8 χωρίζονται από τέσσερα αμινοξέα, η ταυτόχρονη ένταξή του δεν ευνοείται θερμοδυναμικά, οπότε προτείνεται ότι ο Cu(I) αλληλεπιδρά ξεχωριστά με την κάθε κυστεΐνη. Σε αυτή την περίπτωση, η σφαίρα ένταξης του Cu(I) συμπληρώνεται με τη συμμετοχή του DTT ταυτόχρονα με το 2s για το σχηματισμό των μικτών συμπλόκων.

Η αντικατάσταση της C8 από σερίνη στο πεπτίδιο 3s έχει σημαντική επίδραση στη φύση των σωματιδίων που σχηματίζονται, παρόλο που δεν παρατηρούνται αξιόλογες μεταβολές στη διαμόρφωση ή ταινίες CT κατά τη σύμπλεξη του Cu(I) συγκριτικά με τα 2K8p και 1s. Η αλληλεπίδραση του 3s με τον Cu(I) έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση των cross-peak των κυστεϊνών στα φάσματα 2D NMR η οποία οφείλεται πιθανόν στο σχηματισμό πολυπυρηνικών σωματιδίων.

Το 2K10p, τμήμα της WD6, χρησιμοποιήθηκε κυρίως ως πρότυπο για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων πεπτιδίου-Cu(I) αφού ο τύπος ένταξης του μοτίβου CXXC είναι γνωστός. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στα φάσματα του 2K10p δεν είναι τόσο εντυπωσιακές όπως στην περίπτωση των 2K8p και 1s. Προφανώς η θέση των κυστεϊνών εντός μιας συγκεκριμένης πεπτιδικής αλληλουχίας καθορίζει και τον τρόπο ένταξης. Η αλληλεπίδραση του Cu(I) με το 2K10p έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές μεταβολές στη διαμόρφωση, όπως φαίνεται και από τις ταινίες CT στα φάσματα CD και τη διεύρυνση των σημάτων στα φάσματα NMR. Οι cross-peak των κυστεϊνών δεν εξαφανίστηκαν, συνεπώς ο σχηματισμός των πολυπυρηνικών σωματιδίων πραγματοποιείται σε μικρότερο ποσοστό σε σύγκριση με τα άλλα πεπτίδια. Παρόλο που τα 2K10p και 3s περιέχουν εντός της αλληλουχίας τους το ίδιο μοτίβο CXXC, η τοποθέτηση των κυστεϊνών στο χώρο είναι πολύ διαφορετική όπως μπορεί κάποιος να δει από τα 3D μοντέλα ομολογίας των πεπτιδίων αυτών. Η διαφορά αυτή στη διαμόρφωση αντανακλάται και στα δεδομένα, όπως φαίνεται από το γεγονός ότι ο σχηματισμός πολυπυρηνικών σωματιδίων δεν είναι ο ίδιος. Η P7 στο 3s είναι πιθανότατα σημαντική για την τελική διαμόρφωση του μορίου και ίσως να ενισχύει την ικανότητα των κυστεϊνικών θειολικών ομάδων να δρουν ως γέφυρες.



Πρόσφατα η Banci και οι συνεργάτες της [137] διερεύνησαν την επίδραση του DTT στην ένταξη του Cu(I) στο μοτίβο MXCXXC που βρίσκεται στην CopZ, μια πρωτεΐνη chaperone χαλκού του *Bacillus subtilis*, χρησιμοποιώντας τεχνικές απορρόφησης ακτίνων X και NMR. Τα αποτελέσματά τους συνιστούν ότι ο Cu(I) έχει αριθμό ένταξης τρία σε όλες τις περιπτώσεις όπου ο τρίτος υποκαταστάτης θείου μπορεί να προέρχεται είτε από ένα εξωγενές μόριο όπως το DTT ή από ένα δεύτερο μόριο πρωτεΐνης σχηματίζοντας ομοδιμερές σύμπλοκο. Επιπλέον, οι εξωγενείς θειόλες όπως το DTT ή η GSH μπορούν να αποκλείσουν τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις ενώ ο σχηματισμός του ομοδιμερούς φαίνεται να ευνοείται παρουσία καρβοξυλικών αλάτων και όταν ο χαλκός ανάγεται από το ασκορβικό οξύ ή παρέχεται ως σύμπλοκο του Cu(I) με το ακετονιτρίλιο. Στη δική μας μελέτη, το DTT φαίνεται να εμπλέκεται στην ένταξη του Cu(I) σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από το 2K8p. Οι τρεις κυστεΐνες που βρίσκονται στην αλληλουχία του 2K8p επαρκούν για να κορεστεί η σφαίρα ένταξης του Cu(I) αλλά παρ' αυτά δεν μπορούν να παρεμποδίσουν τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει μια καλή βάση για το σχηματισμό ενός παραγώγου δότη-αποδέκτη κατά τη διαμοριακή μεταφορά του χαλκού. Επιπλέον, όπως προκύπτει από το πείραμα στο οποίο διαφοροποιήθηκε η αναλογία πεπτιδίου:Cu(I), καθώς ελαττώνεται ο διαθέσιμος προς συμπλοκοποίηση Cu(I) ελαττώνονται οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις καθώς και η συμμετοχή του DTT στο σχηματισμό μικτών συμπλόκων. Είναι ευνόητο λοιπόν ότι η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης χαλκού θα ευνοεί την ταυτόχρονη σύνδεση του χαλκού σε περισσότερες θέσεις σύνδεσης μετάλλου και σε επόμενο βήμα τη μεταφορά του εντός της συσκευής Golgi ή την απομάκρυνσή του από το κύτταρο ώστε να επιτευχθεί η ομοιοστασία του χαλκού εντός του κυττάρου.

Η σημαντική μετατόπιση που παρατηρήθηκε για τα πρωτόνια της προλίνης καθώς και η σημαντική διεύρυνση των σημάτων τους πρέπει να διερευνηθεί. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν σημαντικές μετατοπίσεις για αλειφατικά αμινοξέα όπως η λευκίνη και η ισολευκίνη. Τα γεγονότα που διαδραματίζονται κατά την ένταξη του Cu(I) και οδηγούν σε διαφορετικές καταστάσεις διαμόρφωσης μπορούν να ερμηνεύσουν τις παραπάνω μετατοπίσεις. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, η προλίνη μπορεί να έχει είτε δομικό ή δυναμικό ρόλο εντός μιας πεπτιδικής αλληλουχίας [110]. Η προλίνη είναι το μόνο αμινοξύ για το οποίο ο cis πεπτιδικός δεσμός είναι ενεργειακά προσιτός, μετατρέποντας τα σχήματα δεσμών υδρογόνου, οδηγώντας έτσι σε διαφορετικές διαμορφώσεις. Οι cis X-Pro πεπτιδικοί δεσμοί έχουν βρεθεί



σε πλήθος πρωτεϊνών [138] και πεπτιδίων [139]. Έχει προταθεί ότι η προλίνη μπορεί να είναι σημαντική όταν βρίσκεται σε μεμβρανικές πρωτεΐνες. Οι Brandl και Deber [140] πρότειναν ότι η *cis-trans* ισομερίωση που μεσολαβείται από υποκαταστάτη των ενδομεμβρανικών δεσμών X-Pro μπορεί να ρυθμίζει το άνοιγμα και το κλείσιμο καναλιών.

Η σημασία της P7 στην συμπλοκοποίηση του Cu(I) έχει φανεί από τα φάσματα NMR στα οποία παρουσιάζεται σημαντική μετατόπιση των πρωτονίων της προλίνης. Αυτά τα δεδομένα συνιστούν ένα δυναμικό ρόλο για την προλίνη, καθορίζοντας ένα στερεοχημικά συγκεκριμένο τύπο ένταξης του Cu(I) στο μοτίβο CPC. Το 2K8p παρουσιάζει μοναδική συμπεριφορά κατά τη συμπλοκοποίηση του από το Cu(I). Η συμπεριφορά αυτή προσομοιάζεται κατά κάποιο τρόπο από το 1s, το οποίο υφίσταται και αυτό παρόμοιες μεταβολές στη διαμόρφωση με το 2K8p. Η εικόνα είναι πολύ διαφορετική όταν δεν είναι παρούσες η C6 ή η C8 του μοτίβου CPC. Αυτές οι παρατηρήσεις παρέχουν κάποιες προκαταρκτικές ενδείξεις σχετικά με τη σημασία του μοτίβου CPC στη δέσμευση του Cu(I).

Το μοτίβο Cys-X-Cys βρίσκεται στις μεταλλοθειονίνες όπου είναι γνωστό ότι συμμετέχει στο σχηματισμό πολυπυρηνικής πλειάδας χαλκού [141]. Διακριτές πλειάδες μετάλλου-θειολικών ομάδων που σχηματίζονται από τη συμμετοχή πολλών μοτίβων CXC παρατηρούνται στη Ν-τελική περιοχή του παράγοντα αναστολής της ανάπτυξης των νεύρων [125]. Η Cox17, μια πρωτεΐνη chaperone χαλκού απαραίτητη για την παράδοση των ιόντων χαλκού στα μιτοχόνδρια, υπάρχει με τη μορφή ολιγομερών σωματιδίων που σχηματίζονται από την ένταξη του Cu(I) από τις κυστεϊνικές θειολικές ομάδες ενός μοτίβου Cys-Cys-X-Cys [142]. Συνεπώς το CXC είναι ένα μοτίβο σύνδεσης μετάλλων σε γειτνίαση με άλλες θέσεις σύνδεσης μετάλλων που μπορούν εύκολα να σχηματίσουν πολυπυρηνικές πλειάδες. Στην περίπτωση της CCS, της πρωτεΐνης chaperone χαλκού της σουπεροξειδικής δισμουτάσης, έχει προταθεί ο σχηματισμός διπυρηνικής πλειάδας χαλκού γεφυρωμένης από τις δύο κυστεΐνες του μοτίβου MT/HCXXC της περιοχής I και τις δύο κυστεΐνες του μοτίβου CXC της περιοχής III [89]. Έχει προταθεί ότι το μοτίβο CXC της περιοχής III παραδίδει Cu(I) στο μοτίβο CXXC της περιοχής I. Η συνεργασία στη δέσμευση του Cu(I) μεταξύ δύο διαφορετικών θέσεων δέσμευσης του χαλκού της ίδιας πρωτεΐνης μπορεί να αποτελεί τη βάση για τη μεταφορά του Cu(I).

Τα αποτελέσματά μας συνιστούν συγκεκριμένη γεωμετρία ένταξης του Cu(I) από το μοτίβο CPC. Αυτή η αλληλεπίδραση του Cu(I) διατηρείται και παρουσία μυκλλίων SDS ενώ



εξαφανίζεται όταν μία από τις δύο κυστεΐνες του μοτίβου CPC μεταλλαχθεί. Συνεπώς, το μοτίβο CPC της ΑΤΡάσης Wilson θα μπορούσε πιθανότατα να δράσει ως ενδιάμεσο μεταξύ του έκτου μοτίβου σύνδεσης μετάλλου του Ν-τελικού τμήματος και ενός πιθανού αποδέκτη του Cu(I) εντός της συσκευής Golgi. Μια τέτοια υπόθεση όμως απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις δότη-δέκτη μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνών chaperone χαλκού. Αυτό θα μπορούσε να είναι ένα βήμα-κλειδί για τη διαλεύκανση του μηχανισμού μεταφοράς του Cu(I) ειδικότερα διαμέσου της μεμβράνης.



Κεφάλαιο

8

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αποδεικνύεται με τη μελέτη μέσω φασματοσκοπίας CD και ^1H NMR της αλληλεπίδρασης του Cu(I) με το πεπτίδιο μοντέλο της έκτης διαμεμβρανικής περιοχής της ATP7B που περιέχει το μοτίβο CPC, 2K8p, η ύπαρξη ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ Cu(I) και του μοτίβου CPC, συνιστώντας έναν πιθανόν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό μεταφοράς του χαλκού.

Η χρησιμοποίηση τριών μεταλλαγμένων αλληλουχιών του 2K8p, με αντικατάσταση διαδοχικά μιας κυστεΐνης από μία σερίνη και σχηματισμό αντίστοιχα των 1s, 2s και 3s καταδεικνύει τη σημασία κάθε κυστεΐνης στο σχηματισμό των συμπλόκων με τον Cu(I) . Η παρουσία ακέραιου του μοτίβου CPC στα 2K8p και 1s έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές μεταβολές στη διαμόρφωσή τους και την παρουσία ισχυρών ταινιών CT στα φάσματα CD. Η παρουσία επιπλέον της C3 στο 2K8p οδηγεί στο σχηματισμό διαφορετικών σωματιδίων σε σχέση με το 1s, όπως φαίνεται και από την αντιστροφή των σημάτων στην περιοχή CT των φασμάτων CD, με τις κυστεΐνες του CPC στο 1s να δρουν σε μεγαλύτερο βαθμό ως γεφυρωμένοι υποκαταστάτες συγκριτικά με το 2K8p. Επιπλέον, η κυστεΐνη C3 αποκλείει τη συμμετοχή του DTT στην σφαίρα ένταξης του Cu(I) ενώ στο σχηματισμό συμπλόκων του 1s με τον Cu(I) συμμετέχουν εξωγενείς θειολικές ομάδες προερχόμενες από το DTT. Η κυστεΐνη C6 του μοτίβου CPC αποδεικνύεται πολύ σημαντική για την αλληλεπίδραση με τον Cu(I) και η απουσία της στην αλληλουχία του 2s οδηγεί σε ασθενή αλληλεπίδραση του με τον Cu(I) , η οποία δεν ανταγωνίζεται επαρκώς το DTT για την ένταξη στον Cu(I) . Η απουσία της C8 στο 3s έχει ως αποτέλεσμα μικρότερες μεταβολές στη διαμόρφωση και μεγαλύτερη συμμετρικότητα στην αλληλεπίδραση με τον Cu(I) ενώ η συμμετοχή του DTT στον σχηματισμό πολυπυρηνικών σωματιδίων αποδεικνύεται επίσης σημαντική.

Η ύπαρξη της υψηλά διατηρημένης, μεταξύ των ΑΤΡασών P-τύπου, προλίνης στο μοτίβο CPC πιθανόν να διαδραματίζει δυναμικό ρόλο στη μεταφορά του χαλκού μέσω της μεμβράνης. Αυτό γίνεται εμφανές από τις σημαντικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της προλίνης που παρατηρούνται για όλα τα πεπτίδια κατά την αλληλεπίδρασή τους με τον Cu(I) σε άλλοτε άλλο βαθμό.

Η αναλογία πεπτιδίου: Cu(I) 1:1 οδηγεί στον σχηματισμό πολυπυρηνικών σωματιδίων για όλα τα πεπτίδια εκτός από το 2s. Καθώς ελαττώνεται ο διαθέσιμος προς συμπλοκοποίηση Cu(I) , ελαττώνονται οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις καθώς και η συμμετοχή του DTT στο



σχηματισμό μικτών συμπλόκων. Αυτή φαίνεται να είναι βασική αρχή για τη διατήρηση της ομοιοστασίας του χαλκού εντός του κυττάρου, δεδομένου ότι η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης χαλκού θα οδηγεί στην ένταξη του ταυτόχρονα σε περισσότερες από μία θέσι σύνδεσης μετάλλου και σε επόμενο βήμα τη μεταφορά του είτε εντός των διαφόρων οργανιδίων ή εκτός του κυττάρου.

Η αλληλεπίδραση του Cu(I) με το 2K10p, τμήμα της WD6 που περιέχει το διατηρημένο μοτίβο GMTCCXC, χαρακτηρίζεται επίσης από το σχηματισμό πολυπυρηνικών σωματιδίων με συμμετοχή του DTT. Η συμμετοχή εξωγενούς θειολικής ομάδας κατά το σχηματισμό συμπλόκου του μοτίβου CXXC με τον Cu(I) δεν καταργεί αυτά που ήδη γνωρίζαμε για την ένταξη του Cu(I) στα μοτίβα σύνδεσης μετάλλων αλλά επιβεβαιώνει τη δυνατότητα που παρουσιάζουν τα μοτίβα αυτά να συνεργάζονται με παρόμοια μοτίβα σύνδεσης μετάλλου ώστε να επιτυγχάνεται η μεταφορά του χαλκού είτε από τις πρωτεΐνες *chaperone* στις ΑΤΡάσες χαλκού ή από τη μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη.

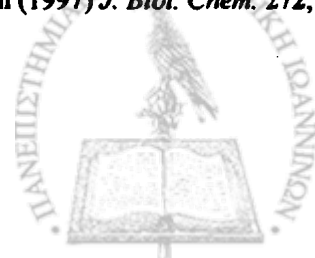


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

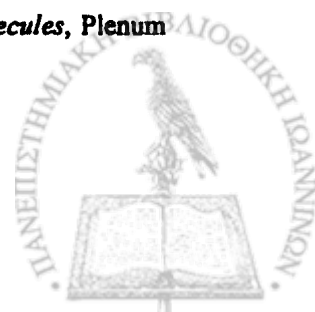
1. S. A. K. Wilson (1912) *Brain* 34, 295-504.
2. G. T. Strickland, D. Frommer, M. L. Leu, R. Pollard, S. Sherlock, J. N. Cumings (1973) *Quart. J. Med.* 42, 619-638.
3. M. Didonato, B. Sarkar (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1360, 3-16.
4. M. Liu, E. J. Cohen, G. J. Brewer, P. R. Laibson (2002) *Am. J. Ophthalmol.* 133, 832-834.
5. M. Frydman, B. Bonne-Tamir, L. A. Farrer, P. M. Conneally, A. Magazanik, S. Ashbel, Z. Goldwirth (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1819-1821.
6. A. M. Bowcock, L. A. Farrer, J. M. Herbert, M. Agger, I. Sternlieb, I. H. Scheinberg, C. H. Buys, H. Scheffer, M. Frydman, T. Chajek-Saul, B. Bonne-Tamir, L. L. Cavalli-Sforza (1988) *Am. J. Hum. Genet.* 43, 664-674.
7. P. C. Bull, G. R. Thomas, J. M. Rommens, J. R. Forbes, D. W. Cox (1993) *Nat. Genet.* 5, 327-337.
8. K. Petrukhin, S. G. Fischer, M. Pirastu, R. E. Tanzi, I. Chernov, M. Devoto, L. M. Brzustowicz, E. Cayanis, E. Vitale, J. J. Russo, D. Matseoane, B. Boukhgalter, W. Wasco, A. L. Fifus, J. Loudianos, A. Cao, I. Sternlieb, O. Evgrafov, E. Parano, L. Pavone, D. Ott, J. Warburton, G. K. Penchaszadeh, I. H. Scheinberg, T. C. Gilliam (1993) *Nat. Genet.* 5, 338-343.
9. R. E. Tanzi, K. Petrukhin, I. Chernov, J. L. Pellequer, W. Wasco, B. Ross, D. M. Romano, E. Parano, L. Pavone, L. M. Brzustowicz, M. Devoto, J. Peppercorn, A. I. Bush, I. Sternlieb, M. Pirastu, J. F. Gusella, O. Evgrafov, G. K. Penchaszadeh, B. Honig, I. S. Edelman, M. B. Soares, I. H. Scheinberg, T. C. Gilliam (1993) *Nat. Genet.* 5, 344-350.
10. P. L. Pedersen, E. Carafoli (1987) *Trends Biochem. Sci.* 12, 146-150.
11. S. Lutsenko, J. H. Kaplan (1995) *Biochemistry* 34, 15607-15613.
12. M. Solioz, C. Vulpe (1996) *Trends Biochem. Sci.* 21, 237-241.
13. S. Lutsenko, K. Petrukhin, M. J. Cooper, C. T. Gilliam, J. H. Kaplan (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 18939-18944.
14. M. DiDonato, S. Narindrasorasak, J. P. Forbes, D. W. Cox, B. Sarkar (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 33279-33282.
15. I. H. Hung, M. Suzuki, Y. Yamaguchi, D. S. Yuans, R. D. Klausner, J. D. Gitlin (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 21461-21466.
16. X. L. Yang, N. Miura, Y. Kwarada, K. Terada, K. Petrukhin, T. C. Gilliam, T. Sugiyama (1997) *Biochem. J.* 326, 897-902.
17. M. Shaefer, R. G. Hopkins, M. A. Failla, J. D. Gitlin (1999) *Am. J. Physiol.* 276, G639-G646.
18. H. Roelofsen, H. Wolters, M. J. A. V. Luyn, N. Miura, F. Kuipers, R. J. Vonk (2000) *Gastroenterol.* 119, 782-793.
19. K. Nagamo, K. Nakamura, K.-I. Urakami, K. Umeyama, H. Uchiyama, K. Koinai, S. Hattori, T. Yamamoto, I. Matsuda, F. Endo (1998) *Hepatology* 27, 799-807.
20. M. J. Petris, J. F. B. Mercer, J. G. Culvenor, P. Lockhart, P. A. Gleeson, J. Camakaris (1996) *EMBO J.* 15, 6084-6095.
21. K. Terada, M. L. Schilsky, N. Miura, T. Sugiyama (1998) *The Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 30, 1063-1067.
22. K. Terada, T. Nakako, X. L. Yang, M. Iida, N. Aiba, Y. Minamiya, M. Nakai, T. Sakaki, N. Miura, T. Sugiyama (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 1815-1820.
23. B. Sarkar (2000) *J. Inorg. Biochem.* 79, 187-191.
24. S. Lutsenko, M. J. Petris (2002) *J. Membrane Biol.* 191, 1-12.
25. S. La Fontaine, S. D. Firth, J. Camakaris, A. Englezou, M. B. Theophilos, M. J. Petris, M. Howie, P. J. Lockhart, M. Greenough, H. Brooks, R. R. Reddel, J. F. B. Mercer (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 31375-31380.
26. J. R. Forbes, H. Hsu, D. W. Cox (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 12408-12413.
27. M. DiDonato, H.-F. Hsu, S. Narindrasorasak, L. Que, B. Sarkar (2000) *Biochemistry* 39, 1890-1896.
28. C. Vulpe, B. Levinson, S. Whitney, S. Dackman, J. Gitschier (1993) *Nat. Genet.* 3, 7-13.
29. P. C. Bull, D. W. Cox (1994) *Trends Genet.* 10, 246-252.
30. L. W. J. Klomp, S.-J. Lin, D. S. Yuan, R. D. Klausner, V. C. Culotta (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 9221-9226.
31. D. Larin, C. Mekios, K. Das, B. Ross, A.-S. Yang, T. C. Gilliam (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 28497-28504.
32. J. M. Walker, R. Tsivkovskii, S. Lutsenko (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 27953-27959.
33. I. Hamza, M. Schaefer, L. W. J. Klomp, J. D. Gitlin (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13363-13368.
34. Z. Hou, S. Narindrasorasak, B. Bhushan, B. Sarkar (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 40858-40863.
35. R. Tsivkovskii, B. C. MacArthur, S. Lutsenko (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 2234-2242.
36. R. Tsivkovskii, J. F. Eisie, J. H. Kaplan, S. Lutsenko (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 976-983.
37. S. M. Vanderwerf, M. J. Cooper, I. V. Stetsenko, S. Lutsenko (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 36289-36294.



38. Z. Hou, S. Narindrasorasak, B. Bhusan, B. Sarkar, B. Mitra (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 40858-40863.
39. C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura, H. Ogawa (2000) *Nature* **405**, 647-655.
40. W. J. Rice, H. S. Young, D. W. Martin, J. R. Sachs, D. L. Stokes (2001) *Biophys. J.* **80**, 2187-2197.
41. G. A. Scarborough (2000) *J. Exp. Biol.* **203**, 147-154.
42. K. J. Sweadner, C. Donnet (2001) *Biochem. J.* **356**, 685-704.
43. M. Mense, L. A. Dunbar, R. Blostein, M. J. Caplan (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1749-1756.
44. K. D. Bissig, H. Wunderli-Ye, P. W. Duda, M. Solioz (2001) *Biochem. J.* **357**, 217-223.
45. J. R. Forbes, D. W. Cox (1998) *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 1663-1674.
46. I. Voskoboinik, J. Mar, D. Strausak, J. Camakaris (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 28620-28627.
47. T. Yoshimizu, H. Omote, T. Wakabayashi, Y. Samborgi, M. Futai (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1258-1260.
48. J. R. Forbes, D. W. Cox (2000) *Hum. Mol. Genet.* **9**, 1927-1935.
49. M. Harada, S. Sakisaka, K. Terada, R. Kimura, T. Kawaguchi, H. Koga, E. Taniguchi, K. Sasatomi, N. Miura, T. Suganuma, H. Fujita, K. Funita, K. Tanikawa, T. Sugiyama, M. Sata (2000) *Gastroenterol.* **118**, 921-928.
50. M. Harada, S. Sakisaka, T. Kawaguchi, R. Kimura, E. Taniguchi, H. Koga, S. Hanada, S. Bala, K. Furuta, R. Kumashiro, T. Sugiyama, M. Sata (2000) *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* **275**, 871-876.
51. M. Harada, H. Kumemura, S. Sakisaka, S. Shishido, E. Taniguchi, T. Kawaguchi, S. Hanada, H. Koga, R. Kumashiro, T. Ueno, T. Suganuma, K. Furuta, M. Namba, T. Sugiyama, M. Sata (2003) *Int. J. Mol. Med.* **11**, 293-298.
52. P. Keller, K. Simon (1997) *J. Cell. Sci.* **110**, 3001-3009.
53. S. Lutsenko, M. J. Cooper (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6004-6009.
54. A. Marisour, I. Gaou, B. Fromenty, A. Berson, P. Letteron, C. Degott, S. Erlinger, D. Pessayre (1997) *Gastroenterol.* **113**, 599-605.
55. N. Fatemi, B. Sarkar (2002) *Inorg. Chim. Acta* **339**, 179-187.
56. M. Komatsu, T. Sumizawa, M. Mutoh, Z.-S. Chen, K. Terada, T. Furukawa, X.-L. Yang, H. Gao, N. Miura, T. Sugiyama, S. Akiyama (2000) *Cancer Res.* **60**, 1312-1316.
57. K. Katano, R. Safaei, G. Samimi, A. Holzer, M. Rochdi, S. B. Howell (2003) *Mol. Pharmacol.* **64**, 466-473.
58. S. Ishida, J. Lee, D. J. Thiele, J. Herskowitz (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14298-14302.
59. X. Lin, T. Okuda, A. Holzer, S. B. Howell (2002) *Mol. Pharmacol.* **62**, 1154-1159.
60. J. F. B. Mercer (2001) *Trends Mol. Med.* **7**, 64-69.
61. A. S. Payne, E. J. Kelly, J. D. Gitlin (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10854-10859.
62. M. Harada, S. Sakisaka, K. Terada, R. Kimura, T. Kawaguchi, H. Koga, M. Kim, E. Taniguchi, S. Hanada, T. Suganuma, K. Furuta, T. Sugiyama, M. Sata (2001) *Gastroenterol.* **120**, 967-974.
63. R. Tsvikovskii, R. G. Efremov, S. Lutsenko (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 13302-13308.
64. G. Loudianos, V. Dessi, M. Lovicu, A. Angius, A. Nurchi, G. C. Sturniolo, M. Marcellini, L. Zancan, P. Bragetti, N. Akar, et al. (1998) *Hum. Mutat.* **98**, 640-642.
65. M. B. Theophilos, D. W. Cox, J. F. B. Mercer (1996) *Hum. Mol. Genetics* **5**, 1619-1624.
66. S. La Fontaine, M. B. Theophilos, S. D. Firth, R. Gould, R. G. Parton, J. F. B. Mercer (2001) *Hum. Mol. Genetics* **10**, 361-370.
67. I. Voskoboinik, M. Greenough, S. La Fontaine, J. F. B. Mercer, J. Camakaris (2001) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **281**, 966-970.
68. A. A. Michalczyk, J. Reiger, K. J. Allen, J. F. B. Mercer, M. L. Ackland (2000) *Biochem. J.* **352**, 565-571.
69. L. Sahlman, B. H. Jonsson (1997) *Eur. J. Biochem.* **205**, 375-381.
70. R. A. Steele, S. J. Opella (1997) *Biochemistry* **36**, 6885-6895.
71. A. G. Muszin, S. E. Brenner, T. Hubbard, C. Chothia (1995) *J. Mol. Biol.* **247**, 536-540.
72. S. Silver, G. Necifora, L. Che, T. K. Misra (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 237-241.
73. A. Dancis, D. S. Yuan, D. Haile, C. Askwith, D. Eide, C. Moehle, J. Kaplan, R. D. Klausner (1994) *Cell* **76**, 393-402.
74. J. Lee, M. M. Pena, Y. Nose, D. J. Thiele (2001) *J. Biol. Chem.* **4**, 4380-4387.
75. A. K. Wernimont, D. L. Huffman, A. L. Lamb, T. V. O' Halloran, A. C. Rosenweig (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 766-771.
76. J. Gitschier, B. Moffat, D. Reilly, W. J. Wood, W. J. Fairbrother (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**, 47-54.
77. V. C. Culotta, L. W. J. Klomp, J. Strain, R. L. B. Casareno, B. Krems, J. D. Gitten (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 23469-23472.



78. A. L. Lamb, A. K. Wernimont, R. A. Pufahl, T. V. O' Halloran, A. C. Rosenweig (2000) *Biochemistry* 39, 1589-1595.
79. S. Lin, R. Pufahl, A. Dancis, T. V. O' Halloran, V. C. Culotta (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 9215-9220.
80. A. C. Rosenweig, D. L. Huffman, M. Y. Hou, A. K. Wernimont, R. A. Pufahl, T. V. O' Halloran (1999) *Structure* 7, 605-617.
81. F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, D. L. Huffman, T. V. O' Halloran (2001) *Biochemistry* 40, 1528-1539.
82. L. Banci, I. Bertini, S. Gofi-Baffoni, D. L. Huffman, T. V. O' Halloran (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 8415-8426.
83. A. L. Lamb, A. K. Wernimont, R. A. Pufahl, T. V. O' Halloran, A. C. Rosenweig (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6, 724-729.
84. J. S. Cha, D. A. Cooksey (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8915-8919.
85. R. Wimmer, T. Herrmann, M. Solioz, K. Wuthrich (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 22597-22603.
86. L. Banci, I. Bertini, R. Del Conte, J. Markey, F. J. Ruiz-Duenas (2001) *Biochemistry* 40, 15660-15668.
87. H. Qian, L. Sahlmann, P. O. Eriksson, C. Hambræus, U. Edlund, I. Sethson (1998) *Biochemistry* 37, 9316-9322.
88. R. A. Pufahl, C. P. Singer, K. L. Peariso, S.-J. Lin, P. J. Schmidt, C. J. Fahrni, V. C. Culotta, J. E. Pinner-Hahn, T. V. O' Halloran (1997) *Science* 278, 853-856.
89. A. C. Rosenweig (2001) *Acc. Chem. Res.* 34, 119-128.
90. M. Ralle, M. J. Cooper, S. Lutsenko, N. J. Blackburn (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 13525-13526.
91. S. J. Opella, T. M. De Silva, G. Veglia (2002) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 217-223.
92. G. Veglia, F. Porcelli, T. De Silva, A. Prantner, S. J. Opella (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, 2389-2390.
93. T. De Silva, G. Veglia, F. Porcelli, A. Prantner, S. J. Opella (2002) *Biopolymers*, 64, 189-197.
94. J. Wilson, C. Leang, A. Morby, J. Hobman, N. Brown (2000) *FEBS Lett.* 472, 78-82.
95. A. O. Summers (1986) *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 607-634.
96. C. M. Deber, L.-P. Liu, C. Wang (1999) *J. Peptide Res.* 54, 200-205.
97. B. A. Wallace (1996) *Adv. Exp. Med. Biol.* 198, 607-614.
98. S. V. Sychev, S. V. Sukhanov, L. I. Bersukov, V. T. Ivanov (1996) *J. Peptide Sci.* 2, 141-156.
99. S. You, S. Peng, I. Lien, J. Breed, M. S. Sansom, G. A. Woolley (1996) *Biochemistry* 35, 6225-6232.
100. I. Ben-Efraim, Y. Shai (1997) *Biophys. J.* 72, 85-96.
101. C. M. Deber, S. C. Li (1995) *Biopolymers* 37, 295-318.
102. K. R. Mackenzie, J. H. Prestegard, D. M. Engelman (1997) *Science* 276, 131-133.
103. I. T. Arkin, P. D. Adams, A. T. Brunger, S. O. Smith, D. M. Engelman (1997) *Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 157-179.
104. E. A. Mercer, G. W. Abbott, S. P. Brazier, B. Ramesh, P. I. Harris, S. K. Srail (1997) *Biochem. J.* 325, 475-479.
105. J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel (1985) *Nature* 318, 618-624.
106. E. Pebay-Peyroula, G. Rummel, J. P. Rosenbusch, E. M. Landau (1997) *Science* 277, 1676-1681.
107. L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Boyley, J. E. Gouaux (1996) *Science* 274, 1859-1866.
108. L.-P. Liu, C. M. Deber (1998) *Biopolymers* 47, 41-62.
109. S.-C. Li, N. K. Goto, K. A. Williams, C. M. Deber (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6676-6681.
110. K. A. Williams, C. M. Deber (1991) *Biochemistry* 30, 8919-8923.
111. P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner (1985) *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
112. K. Wiechelman, R. Braun, J. Fitzpatrick (1988) *Anal. Biochem.* 175, 231-237.
113. G. L. Ellman (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
114. M. J. Petris, I. Voskoboinik, M. Cater, K. Smith, B. E. Kim, R. M. Llanos, D. Strausak, J. Camakaris, J. F. B. Mercer (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 46736 - 46742.
115. N. Guex, M. C. Peitsch (1997) *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
116. M. C. Peitsch (1995) *BioTechnology* 13, 658-660.
117. C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura, H. Ogawa (2000) *Nature* 405, 647-655.
118. P. T. Wingfield, R. H. Pain (1996) *Current Protocols in Protein Science*, J. E. Coligan, B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher, P. T. Wingfield (eds) John Wiley & Sons Inc New York, pp 7.6.1-7.6.23.
119. D. L. Pountney, I. Shauwecker, J. Zarn, M. Vasak (1994) *Biochemistry* 33, 9699-9705.
120. G. D. Fasman (ed) (1996) *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press New York.
121. G. Hotzwarth, P. Doty (1965) *J. Am. Chem. Soc.* 87, 218-228.
122. W. C. Johnson (1985) *Methods Biochem. Anal.* 31, 61-163.



71 Βιβλιογραφία

123. D. L. Pountney, I. Shauwecker, J. Zarn, M. Vasak (1994) *Biochemistry* **33**, 9699-9705.
124. D. W. Hasler, P. Faller, M. Vasak (1998) *Biochemistry* **37**, 14966-14973.
125. Faller P, Vasak M (1997) *Biochemistry* **36**, 13341-13348.
126. M. Vasak, J. H. R. Kagi (1983) *Met. Ions Biol. Syst.* **15**, 213-273.
127. H. Willner, M. Vasak, J. H. R. Kagi (1987) *Biochemistry* **26**, 6287-6292.
128. I. Sovago (1990) *Biocoordination Chemistry*, K. Burger (ed), Ellis Horwood Chichester UK, pp 135-184.
129. A. R. Khan, K. A. Williams, J. M. Boggs, C. M. Deber (1995) *Biochemistry* **34**, 12388-12397.
130. M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie, D. J. Craik (1998) *Biochemistry* **37**, 11064-11077.
131. M. Koppitz, B. Matha, H. Kessler (1999) *J. Peptide Sci.* **5**, 507-518.
132. S. C. Li, C. M. Deber (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 22975-22978.
133. A. Kretzel, W. Lesniak, M. Jezowska-Bojczuk, P. Mlynarz, J. Brasun, H. Kozlowski, W. Bal (2001) *J. Inorg. Biochem.* **84**, 77-88.
134. K. Wuthrich (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A.
135. G. A. Bagiyani, I. K. Koroleva, N. V. Soroka (1978) *Russ. J. Inorg. Chem.* **23**, 1337-1341.
136. G. A. Bagiyani, I. K. Koroleva, N. V. Soroka (1978) *Russ. J. Inorg. Chem.* **23**, 232-236.
137. L. Banci, I. Bertini, R. Del Conte, S. Mangani, W. Meyer-Kalucke (2003) *Biochemistry* **42**, 2467-2474.
138. J. Kordel, S. Forsen, T. Drakenberg, W. J. Chazin (1990) *Biochemistry* **29**, 4400-4409.
139. D. A. Torchia (1972) *Biochemistry* **11**, 1462-1468.
140. C. J. Brandl, C. M. Deber (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 917-921.
141. I. Bertini, H. J. Hartmann, T. Klein, G. Liu, C. Luchinat, U. Weser (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 1008-1018.
142. D. N. Heaton, G. N. George, G. Garrison, D. R. Winge (2001) *Biochemistry* **40**, 743-751.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με το στόχο τη διερεύνηση του μηχανισμού μεταφοράς του Cu (I) από την ATPάση της ασθένειας Wilson (ATP7B), στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου 2K10p ($\text{CH}_3\text{CO-Lys-Gly-Met-Thr-Cys-Ala-Ser-Cys-Val-His-Asn-Lys-CONH}_2$), τμήματος της έκτης δεσμευτικής περιοχής των μετάλλων (WD6) και του 2K8p ($\text{CH}_3\text{CO-Lys-Leu-Cys-Ile-Ala-Cys-Pro-Cys-Ser-Lys-CONH}_2$) που προέρχεται από την έκτη διαμεμβρανική περιοχή (TM6) της ATPάσης της ασθένειας Wilson μέσω φασματοσκοπίας CD, NMR και κατασκευή μοριακών μοντέλων ομολογίας. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του Cu (I) με τις μεταλλαγμένες αλληλουχίες του 2K8p, 1s ($\text{CH}_3\text{CO-Lys-Leu-Ser-Ile-Ala-Cys-Pro-Cys-Ser-Lys-CONH}_2$), 2s ($\text{CH}_3\text{CO-Lys-Leu-Cys-Ile-Ala-Ser-Pro-Cys-Ser-Lys-CONH}_2$) και 3s ($\text{CH}_3\text{CO-Lys-Leu-Cys-Ile-Ala-Cys-Pro-Ser-Ser-Lys-CONH}_2$), που περιέχουν δύο κυστεΐνες σε διάφορες θέσεις, μελετήθηκε με τις ίδιες μεθόδους, προκειμένου να γίνει κατανοητός ο ρόλος κάθε κυστεΐνης στη δέσμευση του χαλκού. Οι μελέτες μας δείχνουν ότι τρεις θειολικές ομάδες των κυστεϊνών που υπάρχουν στην αλληλουχία του πεπτιδίου 2K8p δρουν κυρίως ως γεφυροποιόι υποκαταστάτες στη δέσμευση του Cu (I), και η διθειοθρεϊτόλη έχει σημαντική συμμετοχή στη δέσμευση του Cu (I) από το 2K10p και τις μεταλλαγμένες αλληλουχίες του 2K8p. Διαπιστώθηκε σχηματισμός ολιγομερών σωματιδίων για όλα τα πεπτίδια εκτός από 2s. Πραγματοποιήθηκε μετατόπιση της ισορροπίας μεταξύ των διάφορων ολιγομερών σωματιδίων με μείωση της αναλογίας Cu(I):πεπτιδίου. Οι σημαντικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της προλίνης κατά την αλληλεπίδραση με το Cu (I) έχουν παρατηρηθεί για όλα τα πεπτίδια που περιέχουν προλίνη υπονοώντας έναν πιθανό ρόλο της προλίνης στη δέσμευση του Cu (I). Αυτά τα συμπεράσματα συζητούνται εκτενώς όσον αφορά τη μοριακή βάση της μετακίνησης του χαλκού και των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων.



ABSTRACT

With the aim to investigate the mechanism of Cu(I) transport by Wilson ATPase (ATP7B), we have studied the interaction of the peptides 2K10p ($\text{CH}_3\text{CO-Lys-Gly-Met-Thr-Cys-Ala-Ser-Cys-Val-His-Asn-Lys-CONH}_2$), and 2K8p ($\text{CH}_3\text{CO-Lys-Leu-Cys-Ile-Ala-Cys-Pro-Cys-Ser-Lys-CONH}_2$), part of the sixth metal binding domain (WD6) and the sixth transmembrane segment (TM6) of Wilson ATPase respectively, by means of CD, NMR spectroscopy and homology modeling. In addition, the interaction of Cu(I) with the 2K8p mutants 1s ($\text{CH}_3\text{CO-Lys-Leu-Ser-Ile-Ala-Cys-Pro-Cys-Ser-Lys-CONH}_2$), 2s ($\text{CH}_3\text{CO-Lys-Leu-Cys-Ile-Ala-Ser-Pro-Cys-Ser-Lys-CONH}_2$) and 3s ($\text{CH}_3\text{CO-Lys-Leu-Cys-Ile-Ala-Cys-Pro-Ser-Ser-Lys-CONH}_2$), containing two cysteines in various positions, have been studied with the same methods, in order to understand the role of each cysteine in copper binding. Our studies show that the three cysteine thiolates present in the 2K8p peptide sequence act mainly as bridging ligands for Cu(I) binding, and dithiothreitol acts as an important ligand in Cu(I) ligation by 2K10p and the 2K8p mutants. Formation of oligomeric species has been evidenced for all peptides except 2s. Shift of the equilibrium between the various oligomeric species has been accomplished by reducing the Cu(I):peptide ratio. Significant shifts of proline protons upon interaction with Cu(I) have been observed for all proline containing peptides implying a possible role of proline in facilitating Cu(I) binding. These findings have been further discussed with respect to the molecular basis of copper trafficking and intermolecular interactions.



ΜΕΡΟΣ Β'

**ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΜΕ
ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ Ru(II) ΜΕ ΔΙΠΥΡΙΔΥΛΙΚΟΥΣ
ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΟΥΣ ΜΕ ΠΕΠΤΙΔΙΑ**



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA

1.1. Εισαγωγικά	74
1.2. Η διαμόρφωση του σακχάρου	75
1.3. Διαμορφώσεις γύρω από το γλυκοζιτικό δεσμό	76
1.4. Οι γωνίες στρέψης του σκελετού	77
1.5. Η δομή της διπλής έλικας	78

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2° ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ DNA

82

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3° ΕΙΔΗ ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.1. Εισαγωγικά	85
3.2. Τα είδη της αντιστρεπτής αλληλεπίδρασης	85
3.2.1. Εξωτερικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις	87
3.2.1.1. Αλληλεπιδράσεις τύπου εξουδετέρωσης (αντισταθμιστικές)	87
3.2.1.2. Μη ειδικό εξωτερικό stacking	88
3.2.2. Δέσμευση στις αύλακες του DNA	88
3.2.3. Παρεμβολή μεταξύ των βάσεων του DNA	93
3.2.3.1. Το κλασικό μοντέλο	93
3.2.3.2. Δέσμευση με ειδικότητα ως προς την αλληλουχία	95
3.2.3.3. Η αρχή του αποκλεισμού του γειτονικού μορίου	96
3.2.3.4. Παραδείγματα μορίων που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA	96

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4° ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

4.1. Γενικά	99
4.2. Τα είδη των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο DNA	101



4.3. Αλληλεπιδράσεις από τη μείζονα αύλακα – η α-έλικα ως στοιχείο αναγνώρισης	102
4.4. Πρωτεΐνες δακτύλων ψευδαργύρου και άλλες αναγνωριστικές δομές	104
4.5. Αναγνώριση από την ελάσσονα αύλακα	105
4.6. Η διαμόρφωση του DNA και η αναγνώριση του από τα φάρμακα και τις πρωτεΐνες	106

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΑΡΑΣΕΙΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΤΟ DNA

5.1. Γενικά	108
5.2. Σύμπλοκα του Ru(II)	109
5.2.1. Ιδιότητες των συμπλόκων Ru(II)	109
5.2.2. Σύμπλοκα του Ru(II) με απλούς αρωματικούς υποκαταστάτες	110
5.2.2.1. Τρις-χηλικά σύμπλοκα του Ru(II) με 2,2'-διπυριδύλιο (bpy), 1,10-φαινανθρολίνη (phen) και παράγωγά τους	110
5.2.2.2. Σύμπλοκα με τον υποκαταστάτη dppz και τα παράγωγά του	119
5.2.2.3. Σύμπλοκα με τον υποκαταστάτη phi	126
5.2.2.4. Σύμπλοκα με τον υποκαταστάτη eilatin	129
5.2.3. Σύμπλοκα του Ru(II) με ασύμμετρους υποκαταστάτες	130
5.2.3.1. Σύμπλοκα με παράγωγα του υποκαταστάτη picen	130
5.2.3.2. Σύμπλοκα του Ru(II) με παράγωγα κινόξαλης	132
5.2.3.3. Σύμπλοκα του Ru(II) με διάφορους άλλους ασύμμετρους υποκαταστάτες	132
5.2.4. Διμεταλλικά σύμπλοκα του Ru(II)	134
5.2.4.1. Διμεταλλικά σύμπλοκα του Ru(II) με γεφυροποιούς υποκαταστάτες	135
5.2.4.2. Διμεταλλικά σύμπλοκα του Ru(II) με συνδετική αλυσίδα (linker)	137
5.3. Σύμπλοκα άλλων μετάλλων μετάπτωσης με το DNA	138

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο ΧΡΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

140



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

7.1. Επιλογή των συμπλόκων του Ru(II)	148
7.2. Η επιλογή των πεπτιδίων	149
7.3. Η επιλογή των νουκλεϊνικών οξέων	150

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8.1. Αντιδραστήρια	152
8.2. Σύνθεση των συμπλόκων του Ru(II)	152
8.2.1. Σύνθεση του υποκαταστάτη 4'-μεθυλ-2,2'-διτυριδυλο-4-καρβοξυλικό οξύ (m-OH)	152
8.2.1.1. Σύνθεση της 4'-μεθυλ-2,2'-διτυριδυλο-4-καρβοξαλδεϋδης (m-H)	152
8.2.1.2. Σύνθεση του 4'-μεθυλ-2,2'-διτυριδυλο-4-καρβοξυλικού οξέος (m-OH)	153
8.2.2. Σύνθεση των Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (py) ₂] A (όπου A = O,O'-διβενζύουλ-τρυγικό οξύ)	153
8.2.2.1. Σύνθεση του cis-[Ru(bpy) ₂ Cl ₂]	153
8.2.2.2. Σύνθεση του rac-[Ru(bpy) ₂ (py) ₂]Cl ₂	154
8.2.2.3. Διαχωρισμός των εναντιομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (py) ₂]Cl ₂	154
8.2.3. Σύνθεση των πεπτιδικών παραγώγων των συμπλόκων του Ru(II)	154
8.2.3.1. Σύνθεση του Λ- ή Δ-[Ru(bpy) ₂ (m-OH)](PF ₆) ₂	155
8.2.3.2. Σύνθεση του Λ- ή Δ-[Ru(bpy) ₂ (m-OSu)](PF ₆) ₂	155
8.2.3.3. Σύνθεση του Λ- ή Δ-[Ru(bpy) ₂ (m-peptide)]Cl ₂	156
8.3. Φασματοσκοπικές τεχνικές	157
8.3.1. Φασματοσκοπία NMR	157
8.3.2. Φασματοσκοπία μάζας (Electrospray Mass Spectrometry)	157
8.3.3. Φασματοσκοπία CD	158
8.3.4. Κατασκευή μοριακών μοντέλων	158

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

9.1. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων	159
9.1.1. Χαρακτηρισμός των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (m-GHK)]Cl ₂	160



9.1.1.1 Φασματοσκοπία μάζας (ESI-MS)	160
9.1.1.2. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	161
9.1.1.3. Φασματοσκοπία ^1H NMR	162
9.1.2. Χαρακτηρισμός των διαστερομερών Λ - και Δ -[Ru(bpy) $_2$ (m-7p)]Cl $_2$	164
9.1.2.1. Φασματοσκοπία CD	164
9.1.2.2. Φασματοσκοπία ^1H NMR	165
9.2. Χαρακτηρισμός των ολιγονουκλεοτιδίων με φασματοσκοπία ^1H NMR	167
9.2.1. Χαρακτηρισμός του d(CGCGAATTCGCG) $_2$	167
9.2.1.1. Απόδοση των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων	167
9.2.1.2. Απόδοση των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων	177
9.2.2. Χαρακτηρισμός του d(GCGCTTAAGCGC) $_2$	178
9.2.2.1. Απόδοση των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων	178
9.2.2.2. Απόδοση των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων	180
9.2.3. Χαρακτηρισμός του d(CGCGATCGCG) $_2$	180
9.2.3.1. Απόδοση των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων	180
9.2.3.2. Απόδοση των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων	182
9.3. Αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων με ολιγονουκλεοτίδια	183
9.3.1. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ - και Δ -[Ru(bpy) $_2$ (m-GHK)]Cl $_2$ με τη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου d(CGCGAATTCGCG) $_2$	183
9.3.2. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ - και Δ -[Ru(bpy) $_2$ (m-GHK)]Cl $_2$ με τη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου d(CGCGATCGCG) $_2$	196
9.3.3. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ - και Δ -[Ru(bpy) $_2$ (m-7p)]Cl $_2$ με ολιγονουκλεοτίδια	217
9.3.3.1. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ - και Δ -[Ru(bpy) $_2$ (m-7p)]Cl $_2$ με τη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου d(CGCGAATTCGCG) $_2$	217
9.3.3.2. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ - και Δ -[Ru(bpy) $_2$ (m-7p)]Cl $_2$ με τη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου d(GCGCTTAAGCGC) $_2$	222
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10° ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	231
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	233



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

243

ABSTRACT

245

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

247

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

248



Κεφάλαιο

1

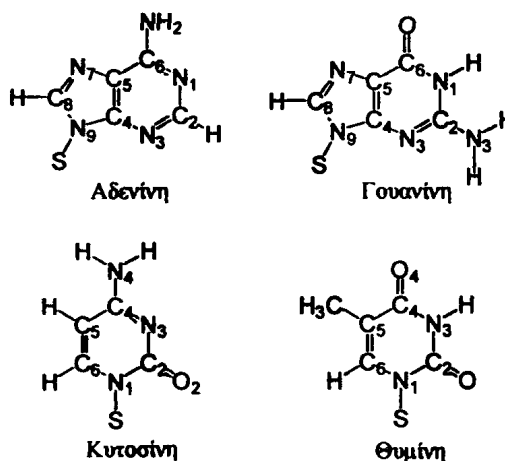
Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA



1. Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ DNA

1.1. Εισαγωγικά

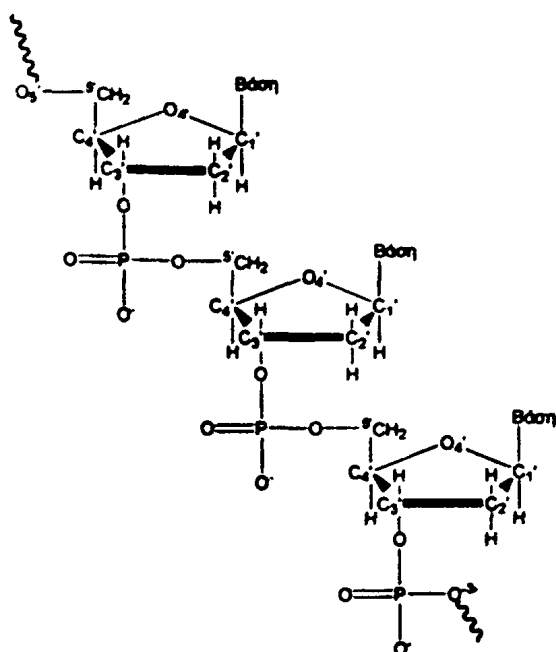
Το DNA είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από δομικές μονάδες δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Κάθε δεοξυριβονουκλεοτίδιο αποτελείται από μία βάση, μία δεοξυριβόζη και μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες [1,2]. Η αζωτούχα βάση είναι παράγωγο πυριμιδίνης ή πουρίνης. Οι πουρίνες του DNA είναι η αδενίνη (A) και η γουανίνη (G) και οι πυριμιδίνες, η θυμίνη (T) και η κυτοσίνη (C) και φαίνονται στο σχήμα 1.1. Η αρίθμηση των ατόμων στα νουκλεϊνικά οξέα, όπως αυτή χρησιμοποιείται διεθνώς, φαίνεται στα σχήματα 1.1 και 1.2.



Σχήμα 1.1. Οι τέσσερις βάσεις του DNA (όπου S είναι η δεοξυριβόζη).

Στο δεοξυριβονουκλεοτίδιο, το άτομο άνθρακα C-1' της δεοξυριβόζης δεσμεύεται στο

N-1 μιας πυριμιδίνης ή στο N-9 μιας πουρίνης. Στα φυσικά νουκλεϊνικά οξέα, η διαμόρφωση αυτού του N-γλυκοζιτικού δεσμού είναι πάντα β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου και από την ίδια πλευρά του επιπέδου που βρίσκεται και το 5'-OH της δεοξυριβόζης. Ένας νουκλεοζίτης αποτελείται από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης δεσμευμένης σε ένα σάκχαρο. Για να σχηματιστεί το νουκλεϊνικό οξύ, κάθε νουκλεοζίτης συνδέεται με τον άλλο μέσω φωσφορικών ομάδων που συνδέονται στις θέσεις 3' και 5' των σακχάρων (σχήμα 2). Έτσι, η επαναλαμβανόμενη μονάδα στο νουκλεϊνικό οξύ είναι το 3',5'-νουκλεοτίδιο.



Σχήμα 1.2. Δομή ενός τμήματος μιας αλυσίδας του DNA.

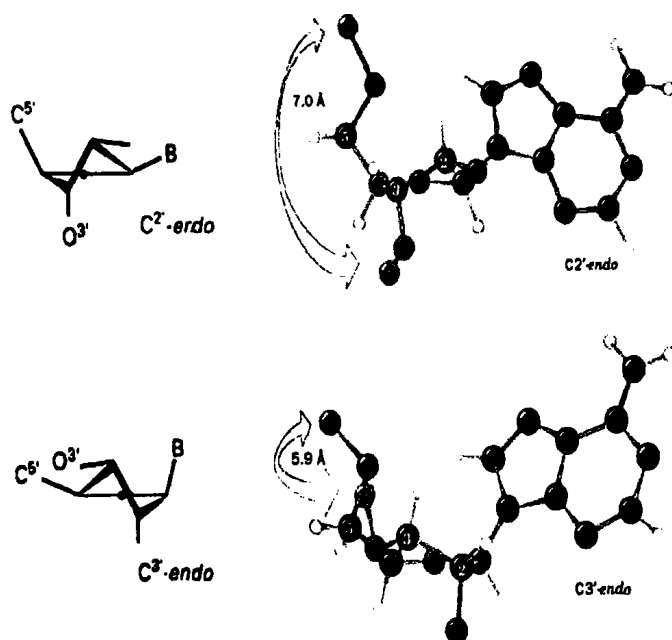
Για την αναφορά σε αλληλουχίες νουκλεϊνικών οξέων και ολιγονουκλεοτιδίων χρησιμοποιούνται στην καθημερινή πράξη οι εξής συντομεύσεις των τεσσάρων νουκλεοτιδίων: A, T, C και G. Οι δύο τάξεις των βάσεων συμβολίζονται είτε ως Y ή py

(πυριμιδίνη) και R ή ru (πουρίνη). Οι φωσφορικές ομάδες συμβολίζονται συνήθως ως p. Οι δημοσιεύσεις που σχετίζονται με τη δομή του DNA, πριν από την αλληλουχία τοποθετούν ένα d για να δώσουν έμφαση όταν το ολιγονουκλεοτίδιο περιέχει δεοξυριβόζη αντί για ριβόζη.

1.2. Η διαμόρφωση του σακχάρου

Ο πενταμελής δακτύλιος της δεοξυριβόζης στο DNA δεν είναι επίπεδος από τη φύση του. Η ακριβής διαμόρφωση του δακτυλίου της δεοξυριβόζης μπορεί να προσδιοριστεί πλήρως βάσει των πέντε εσωτερικών ενδοκυκλικών γωνιών στρέψης. Έχει βρεθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και φασματοσκοπία NMR ένας μεγάλος αριθμός διαμορφωμερών. Όταν ένα άτομο του δακτυλίου είναι εκτός του επιπέδου των υπόλοιπων τεσσάρων, το διαμορφωμερές έχει τη μορφή “φακέλου”. Συνήθως, δύο άτομα αποκλίνουν

από το επίπεδο των υπόλοιπων τριών, με αυτά τα δύο να βρίσκονται είτε στη μία ή την άλλη πλευρά του επιπέδου. Είναι σύνηθες το ένα από τα δύο άτομα να αποκλίνει περισσότερο από το άλλο. Αν η μεγαλύτερη απόκλιση είναι από την ίδια πλευρά με τη βάση και το δεσμό C4'-C5', τότε το άτομο ορίζεται ως *endo*. Αν είναι από την αντίθετη πλευρά, τότε λέγεται *exo*. Τα πιο συνηθισμένα διαμορφωμερή στις κρυσταλλικές δομές είναι κοντά στους τύπους C2' *endo* και C3' *endo* (σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3. Τα διαμορφωμερή C2' *endo* και C3' *endo* της δεοξυριβόζης.

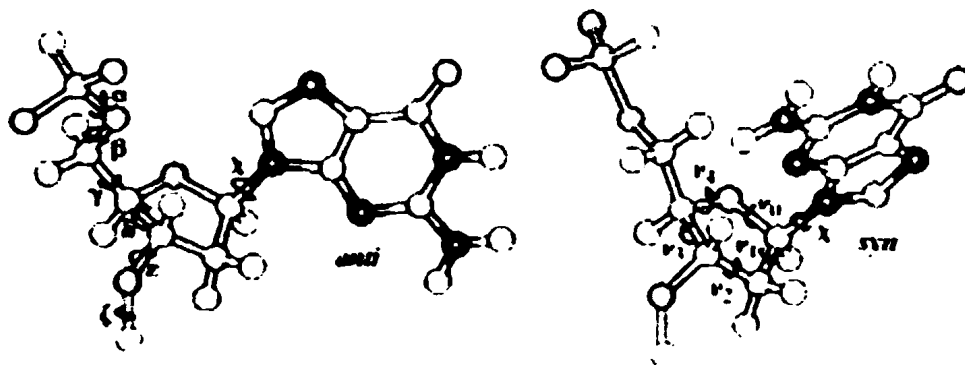
Μεταξύ των διαμορφωμερών υπάρχει η δυνατότητα αλληλομετατροπής και συγκεκριμένα όσον αφορά την αλληλομετατροπή μεταξύ των C2' *endo* και C3' *endo* μορφών, η ενέργεια που απαιτείται είναι 8-21 kJ/mol [2]. Η αναλογία των πληθυσμών των διαμορφωμερών εξαρτάται από το είδος της βάσης με την οποία συνδέονται. Οι πουρίνες προτιμούν το C2' *endo* διαμορφωμερές ενώ οι πυριμιδίνες ευνοούν το C3' *endo* διαμορφωμερές.



Έχουν βρεθεί συσχετισμοί, από κρυσταλλογραφικές μελέτες και μελέτες NMR, μεταξύ των διαμορφωμερών του σακχάρου και διαφόρων μεταβλητών της διαμόρφωσης του σκελετού του DNA, τόσο σε νουκλεοτίδια και νουκλεοζίτες όσο και σε δομές ολιγονουκλεοτιδίων [3,4]. Η διαμόρφωση του σακχάρου είναι καθοριστικός παράγοντας της διαμόρφωσης ενός ολιγο- ή πολυνουκλεοτιδίου, δεδομένου ότι μεταβολές στη διαμόρφωση του σακχάρου αλλάζουν τον προσανατολισμό των υποκαταστάσεων στις θέσεις C1', C3' και C4', οδηγώντας σε σημαντικές μεταβολές της διαμόρφωσης του σκελετού και επομένως της συνολικής δομής.

1.3. Διαμορφώσεις γύρω από τον γλυκοζιτικό δεσμό

Ο γλυκοζιτικός δεσμός συνδέει μια δεοξυριβόζη και μία βάση και είναι ο δεσμός C1'-N9 για τις πουρίνες και ο C1'-N1 για τις πυριμιδίνες. Η γωνία στρέψης χ γύρω από αυτό τον απλό δεσμό μπορεί να πάρει ένα μεγάλο εύρος τιμών. Όμως από τη θεωρία και σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα, έχουν προβλεφθεί δύο κυρίως περιοχές χαμηλής ενέργειας για τη γωνία του γλυκοζιτικού δεσμού [2]. Η διαμόρφωση *anti* έχει την N1, C1 πρόσωση των πουρινών και την C2, N3 πρόσωση των πυριμιδινών απομακρυσμένη από τον δακτύλιο του σακχάρου (σχήμα 1.4) έτσι ώστε τα υδρογόνα που συνδέονται με τον άνθρακα C8 των πουρινών και τον C6 των πυριμιδινών να βρίσκονται πάνω από τον δακτύλιο του σακχάρου. Έτσι, οι δεσμοί υδρογόνου Watson-Crick των βάσεων κατευθύνονται μακριά από το δακτύλιο του σακχάρου. Οι προσανατολισμοί αυτοί αντιστρέφονται στη διαμόρφωση *syn*, όπου οι δεσμοί υδρογόνου στρέφονται προς το σάκχαρο και ειδικότερα το άτομο O5' (σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4. Οι διαμορφώσεις *anti* και *syn* του γλυκοζιτικού δεσμού για το νουκλεοτίδιο της αδενίνης.

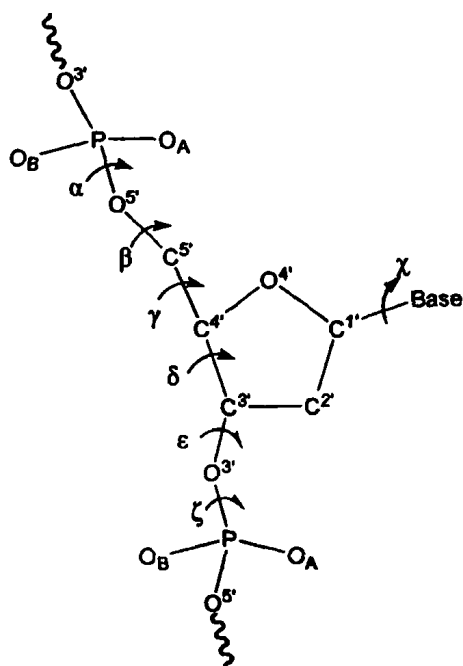


Από την ανάλυση κρυσταλλικών δομών νουκλεοζιτών πουρίνης σε *syn* διαμόρφωση, έχει βρεθεί η ύπαρξη δεσμού υδρογόνου μεταξύ του ατόμου O5' και του N3 της βάσης, ο οποίος σταθεροποιεί τη διαμόρφωση αυτή. Διαφορετικά, οι πουρίνες θα προτιμούσαν τη διαμόρφωση *anti* σε σύγκριση με τη *syn*, λόγω των λιγότερων στερικών αλληλεπιδράσεων. Οι κυριότερες εξαιρέσεις σε αυτό τον κανόνα είναι τα νουκλεοτίδια της γουανίνης, τα οποία έχουν μικρή προτίμηση για τη *syn* διαμόρφωση λόγω των ευνοϊκών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της εξωκυκλικής αμινομάδας N2 της γουανίνης και τη 5'-φωσφορική ομάδα. Για τα νουκλεοτίδια πυριμιδίνης, η διαμόρφωση *anti* προτιμάται έναντι της *syn* λόγω των μη ευνοϊκών επαφών ανάμεσα στο άτομο O2 της βάσης και την 5'-φωσφορική ομάδα.

Στερικά οι προτιμώμενες γωνίες του γλυκοζιτικού δεσμού είναι $-120^\circ < \chi < 180^\circ$ για την *anti* και $0^\circ < \chi < 90^\circ$ για τη *syn* διαμόρφωση. Τιμές του χ στην περιοχή των -90° συχνά περιγράφονται ως 'υψηλή *anti*' διαμόρφωση.

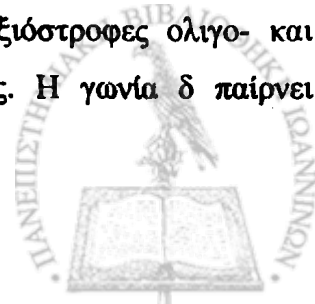
1.4. Οι γωνίες στρέψης του σκελετού

Ο φωσφοδιεστερικός σκελετός ενός ολιγονουκλεοτιδίου έχει έξι μεταβλητές γωνίες στρέψης (σχήμα 1.5), οι οποίες ονομάζονται α-ζ. Οι τιμές που λαμβάνουν (κι επομένως και οι κινήσεις τους μέσα σε διάλυμα) παρουσιάζουν υψηλή συσχέτιση. Λόγω στερικών επιδράσεων οι γωνίες του σκελετού περιορίζονται σε συγκεκριμένο εύρος τιμών και δεν είναι ελεύθερες να λάβουν οποιαδήποτε τιμή μεταξύ 0° και 360° . Για την περιγραφή των γωνιών αυτών χρησιμοποιούνται οι όροι *gauche*⁺ (*g*⁺) για γωνία $\sim 60^\circ$, *gauche*⁻ (*g*⁻) για γωνία περίπου -60° και *trans* (*t*) για γωνία $\sim 180^\circ$. Οι γωνίες α και γ μπορούν να βρεθούν στις διαμορφώσεις *g*⁺, *g*⁻ και *t*. Η γωνία β βρίσκεται σχεδόν πάντα στην *trans* διαμόρφωση. Για τη γωνία γ έχουν βρεθεί και οι τρεις μορφές σε κρυσταλλικές δομές νουκλεοζιτών, αλλά η διαμόρφωση *g*⁺ κυριαρχεί σε δεξιόστροφες ολιγο- και πολυνουκλεοτιδικές διπλές έλικες. Η γωνία δ παίρνει



Σχήμα 1.5. Οι γωνίες στρέψης (α-ζ) του σκελετού ενός νουκλεοτιδίου. Κάθε δεσμός με δυνατότητα περιστροφής επισημαίνεται με ένα βέλος.

μορφές σε κρυσταλλικές δομές νουκλεοζιτών, αλλά η διαμόρφωση *g*⁺ κυριαρχεί σε δεξιόστροφες ολιγο- και πολυνουκλεοτιδικές διπλές έλικες. Η γωνία δ παίρνει



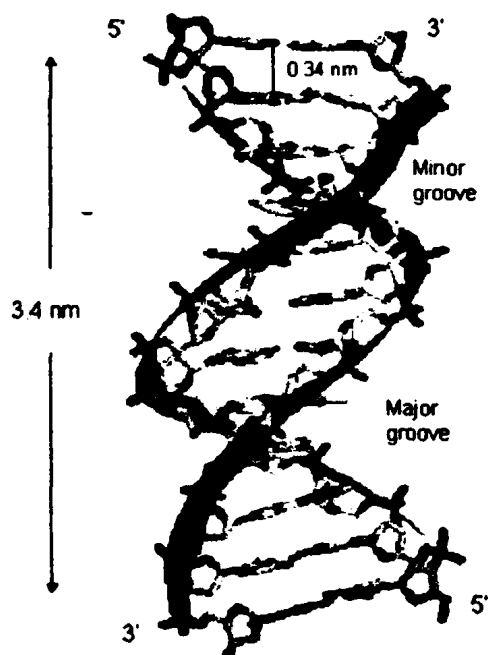
τιμές ανάλογα με τη διαμόρφωση του σακχάρου, οι οποίες είναι $\sim 75^\circ$ για την C3' *endo* και $\sim 150^\circ$ για την C2' *endo* διαμόρφωση.

1.5. Η δομή της διπλής έλικας

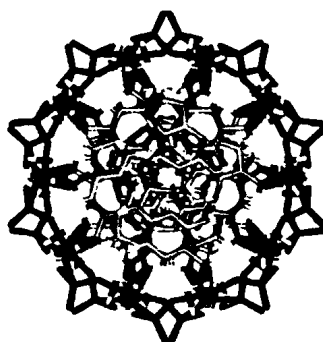
Το 1953, οι J. Watson και F. Crick, μετά από μελέτη περίθλασης ακτίνων X ινών DNA, κατέληξαν στο εξής δομικό μοντέλο [1]:

(α) Δύο ελικοειδείς πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες αντίθετης κατεύθυνσης περιστρέφονται γύρω από έναν κοινό άξονα σχηματίζοντας τη δομή της διπλής έλικας (σχήμα 1.6α).

α)



β)



Σχήμα 1.6. (α) Σκελετικό μοντέλο της διπλής έλικας του B-DNA, (β) Διάγραμμα εγκάρσια τομής της διπλής έλικας του B-DNA. Οι βάσεις βρίσκονται στο εσωτερικό (πράσινο και μπλε χρώμα), ενώ ο σκελετός σακχάρων-φωσφορικών βρίσκεται στο εξωτερικό (κόκκινο και μωβ χρώμα).

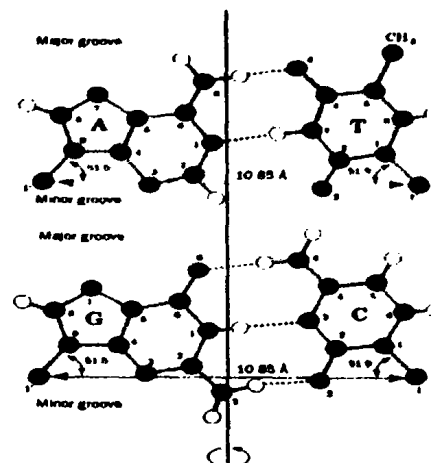
(β) Οι βάσεις βρίσκονται στο εσωτερικό της έλικας ενώ οι φωσφορικές ομάδες και τα σάκχαρα βρίσκονται στο εξωτερικό της έλικας (σχήμα 1.6β). Το επίπεδο των βάσεων είναι κάθετο προς τον άξονα της έλικας. Το επίπεδο των σακχάρων είναι σχεδόν κάθετο σε αυτό των βάσεων.

(γ) Η διάμετρος της έλικας είναι 20 Å. Διαδοχικές βάσεις απέχουν η μία από την άλλη 3,4 Å και η μεταξύ τους γωνία στροφής είναι 36° . Επομένως, η ελικοειδής δομή επαναλαμβάνεται κάθε δέκα κατάλοιπα σε κάθε αλυσίδα, δηλαδή σε διαστήματα 34 Å.



(δ) Οι δύο αλυσίδες συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ ζευγών βάσεων. Η αδενίνη συνδέεται πάντα με τη θυμίνη ενώ η γουανίνη με την κυτοσίνη.

Η πιο ουσιαστική πλευρά της διπλής έλικας του DNA είναι η εξειδίκευση των ζευγών βάσεων. Οι Watson και Crick συμπέραναν ότι η αδενίνη πρέπει να “ζευγαρώνει” με τη θυμίνη και η γουανίνη με την κυτοσίνη, εξ’ αιτίας στερικών παραγόντων και της ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Οι στερικοί περιορισμοί επιβάλλονται από την ελικοειδή φύση του σκελετού των σακχάρων-φωσφορικών της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας. Οι δεσμοί υδρογόνου τύπου Watson-Crick φαίνονται στο σχήμα 1.7.



Σχήμα 1.7. Το ζευγάρισμα των βάσεων AT και GC με δεσμούς υδρογόνου Watson-Crick.

Στο B-DNA, η κλασική δομή που έχει περιγραφεί από τους Watson και Crick, η επαναλαμβανόμενη ομάδα της έλικας είναι το νουκλεοτίδιο και όλα τα νουκλεοτίδια στη δομή έχουν την ίδια διαμόρφωση. Η διαμόρφωση του σακχάρου του σκελετού έχει C2' endo διαμόρφωση και υψηλούς *anti* γλυκοζιτικούς δεσμούς. Βασική συνέπεια του ζευγαρώματος των βάσεων κατά Watson-Crick είναι ότι τα σάκχαρα ενός συγκεκριμένου ζεύγους βάσεων βρίσκονται στην ίδια πλευρά. Έτσι, όταν οι διαδοχικές βάσεις τοποθετούνται παράλληλα η μία στην άλλη κατά μήκος της έλικας, τα κενά μεταξύ των σακχάρων σχηματίζουν κοιλότητες στην επιφάνεια, οι οποίες περιέχονται παράλληλα με τις φωσφοδιεστερικές αλυσίδες. Οι κοιλότητες αυτές ονομάζονται αύλακες. Η ασυμμετρία στα ζεύγη

Σχήμα 1.8. Σύγκριση της δομής της διπλής έλικας του A-DNA, του B-DNA και του Z-DNA.

των βάσεων έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο τύπων αύλακας, των οποίων οι διαστάσεις (και ειδικότερα το βάθος) σχετίζονται με τις αποστάσεις των ζευγών βάσεων από τον άξονα της έλικας και τον προσανατολισμό τους σε σχέση με τον άξονα της έλικας. Η

ευρεία μείζονα αύλακα (σχήμα 1.8 και πίνακας 1.1) έχει σχεδόν το ίδιο βάθος με τη στενότερη ελάσσονα αύλακα, στην οποία τα υδροφοβικά άτομα οξυγόνου των σακχάρων σχηματίζουν τα τοιχώματά της. Γενικά, η μείζονα αύλακα είναι πλουσιότερη σε υποκαταστάσεις των βάσεων όπως τα O6 και N6 των πουρινών και τα N4 και O4 των πυριμιδινών. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις στερικές διαφορές μεταξύ των δύο αυλακών έχει σημαντικές συνέπειες για την αλληλεπίδραση με άλλα μόρια.

Πίνακας 1.1. Οι διαστάσεις των αυλάκων στις διπλές έλικες του DNA.

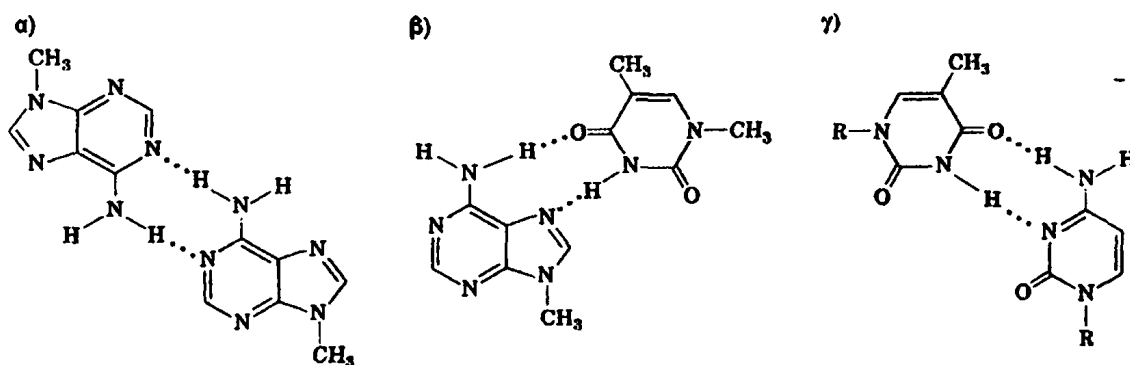
Τύπος έλικας	Μείζονα αύλακα		Ελάσσονα αύλακα	
	Εύρος (Å)	Βάθος (Å)	Εύρος (Å)	Βάθος (Å)
A	2,2	13,0	11,1	2,6
B	11,6	8,5	6,0	8,2
C	10,5	7,6	4,8	7,9
D	9,6	6,2	0,8	7,4
Z	8,8	3,7	2,0	13,8

Η διπλή έλικα του A-DNA παρατηρείται σε ίνες τυχαίας αλληλουχίας DNA κάτω από συνθήκες χαμηλής υγρασίας και σε αλκοολούχα διαλύματα. Η διαμόρφωση του σακχάρου σε κάθε νουκλεοτίδιο είναι C3' *endo*, η οποία φέρνει τις διαδοχικές φωσφορικές ομάδες πιο κοντά (5,9 Å σε σύγκριση με 7 Å στο B-DNA) και μεταβάλλει τη γωνία του γλυκοζιτικού δεσμού από υψηλή *anti* σε *anti*. Η έλικα είναι ευρύτερη από τη B και επαναλαμβάνεται κάθε 11 ζεύγη βάσεων. Συγκριτικά με τη B μορφή, το κέντρο της έλικας είναι κοίλος κύλινδρος και η μείζονα αύλακα είναι πιο στενή και η ελάσσονα αύλακα πιο ευρεία και πολύ ρηχή. Η C μορφή του DNA παρατηρείται όταν μία ίνα DNA βρεθεί σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας και είναι υπερσπειρωμένη σε σύγκριση με το B-DNA, με 9,3 κατάλοιπα ανά στροφή. Η εμφάνιση της έλικας και οι διαστάσεις των αυλάκων μοιάζουν περισσότερο με αυτά του B-DNA παρά με την A μορφή. Η D μορφή δεν λαμβάνεται από μια τυχαία αλληλουχία φυσικού DNA και έχει παρατηρηθεί σε κρυσταλλικές ίνες των πολυνουκλεοτιδίων poly(dA-dT)poly(dA-dT) και poly(dI-dT)poly(dI-dT), όπου I είναι η ινοσίνη (είναι μια σπάνια 8-οξο-πουρίνη). Αυτή η δομή δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως ακόμα. Η Z μορφή του είναι μια αριστερόστροφη έλικα. Παρατηρείται στην αλληλουχία (dC-dG)poly(dC-dG) και πιστεύεται ότι σχηματίζεται σε



διαλύματα με υψηλή συγκέντρωση αλάτων ($>2,5$ M NaCl). Ο πολυμορφισμός στη δομή του DNA που παρατηρείται στις πολυμερικές ίνες συνιστά την παρουσία ευκαμψίας στη δομή του DNA. Αυτή είναι αποτέλεσμα του μεγάλου αριθμού πιθανών διαμορφώσεων που μπορούν να λάβουν το σάκχαρο και ο σκελετός σε συνδυασμό με την ευκαμψία του ζεύγους των βάσεων που οδηγούν στο σχηματισμό διαφορετικών ελίκων με ίση ενέργεια.

Όταν μιλάμε για ζευγάρι των βάσεων συνήθως αναφερόμαστε σε δεσμούς υδρογόνου τύπου Watson-Crick. Παρόλο που 16 διαφορετικοί συνδυασμοί των βάσεων είναι επίσης δυνατοί, ελάχιστοι έχουν παρατηρηθεί. Τα ζεύγη Hoogsteen (σχήμα 1.9) έχουν βρεθεί σε διάφορες κρυσταλλικές δομές συμπλόκων αδεΐνης:θυμίνης και αδεΐνης:ουρακίλης [2]. Στους δεσμούς υδρογόνου αυτού του τύπου συμμετέχουν τα άτομα N6 και N7 της αδεΐνης σε σύγκριση με τα άτομα N1 και N6 στους δεσμούς τύπου Watson-Crick. Επομένως, οι δεσμοί υδρογόνου τύπου Hoogsteen με τη θυμίνη είναι με διαφορετικό άκρο της αδεΐνης, αυτό το οποίο βλέπει προς τη μείζονα αύλακα. Έτσι, στο ζεύγος Hoogsteen, η αδεΐνη πρέπει να βρίσκεται σε διαμόρφωση *syn* ώστε να είναι δυνατή η παρουσία του ζεύγους αυτού σε μια αντιπαράλληλη διπλή έλικα. Αταίριαστα ζεύγη βάσεων παρατηρούνται στο DNA κατά την αντιγραφή του. Ωστόσο, το κύτταρο διαθέτει ενζυμικούς μηχανισμούς για την επιδιόρθωση του DNA. Η παρουσία των αταίριαστων ζευγών βάσεων αποσταθεροποιεί τη διπλή έλικα του DNA.



Σχήμα 1.9. Δεσμοί υδρογόνου τύπου Hoogsteen.

Κεφάλαιο

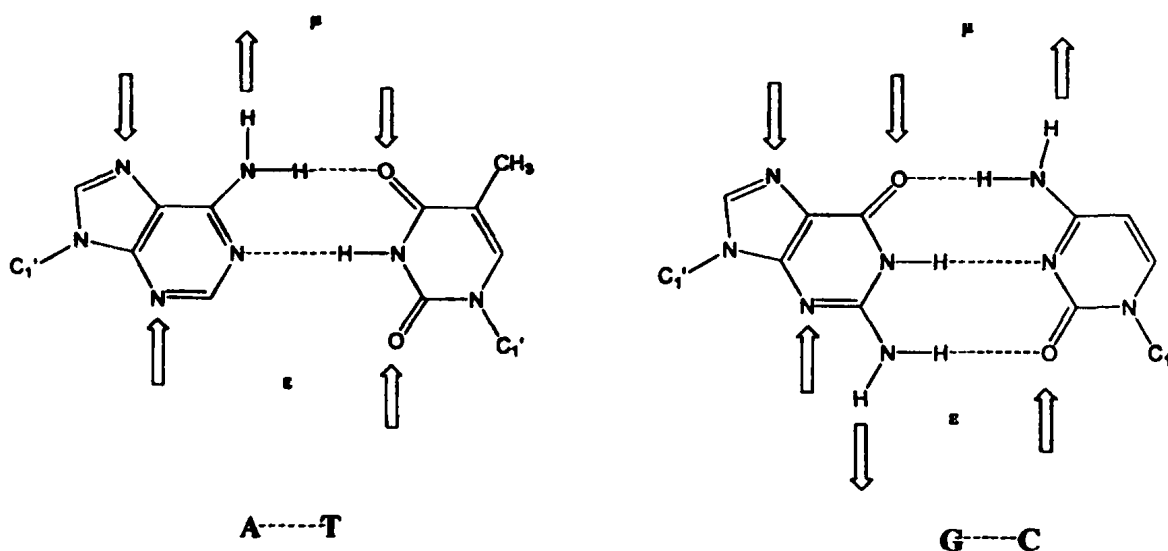
4

ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ DNA



2. ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΟΥ DNA

Η αναγνώριση ενός μορίου DNA είτε αυτή πραγματοποιείται από μικρά μόρια ή πρωτεΐνες, μπορεί να είναι γενική και να αφορά οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο ή αλληλουχία. Από την άλλη, μπορεί να είναι πολύ ειδική, αναγνωρίζοντας μόνο μια καθορισμένη αλληλουχία. Αυτό μπορεί να γίνει πολύ αποτελεσματικά από το ίδιο το DNA. Μια απλή αλυσίδα ενός ολιγονουκλεοτιδίου μπορεί να αναγνωρίσει μια άλλη αλυσίδα, μια διπλή έλικα (σχηματίζοντας τριπλή έλικα) ή ακόμα και τρεις άλλες αλυσίδες (σχηματίζοντας τετραπλή έλικα), με αυξημένη σε κάθε περίπτωση ειδικότητα όσον αφορά την αλληλουχία [2]. Η αναγνώριση DNA-DNA στηρίζεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων. Αυτός είναι ο τρόπος με τον οποίο η άμεση ανάγνωση των πληροφοριών της αλληλουχίας του DNA μπορεί να επιτευχθεί από μικρά μόρια και πρωτεΐνες αλλά και από το ίδιο το DNA. Για να πραγματοποιηθεί η άμεση ανάγνωση, το εισερχόμενο μόριο πρέπει να έχει πρόσβαση στα ζεύγη των βάσεων μέσω μιας αύλακας του DNA. Ο προσανατολισμός αυτής της εισερχόμενης ομάδας είναι σημαντικός αφού ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου, κι επομένως και η άμεση ανάγνωση, είναι αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένη κατεύθυνση.



Σχήμα 2.1. Οι πιθανές θέσεις σχηματισμού δεσμών υδρογόνου στα ζεύγη A-T και G-C. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση των δεσμών υδρογόνου ενώ τα μ και ϵ δηλώνουν τη μείζονα και την ελάσσονα αύλακα, αντίστοιχα.

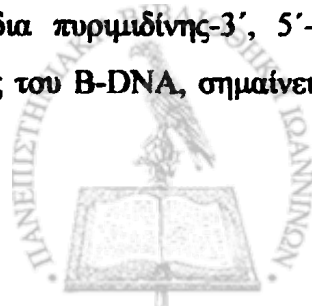
Στα άκρα των βάσεων υπάρχουν ομάδες με δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (σχήμα 2.1) οι οποίες δεν συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων. Αυτή η διάταξη των δεσμών υδρογόνου εξαρτάται από την αλληλουχία. Έτσι, στη



83 2. Αρχές της αναγνώρισης συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA

μείζονα αύλακα, ένα ζεύγος βάσεων C·G τύπου Watson-Crick έχει μια διάταξη (δότης, αποδέκτης, αποδέκτης) η οποία διαφέρει από το αντίστροφο ζεύγος G·C (βλέπε σχήμα 2.1). Τα ζεύγη A·T και T·A έχουν ίδια διάταξη δεκτών / δοτών στη μείζονα αύλακα, αλλά η παρουσία της μεθυλομάδας της θυμίνης εισάγει μια ασυμμετρία στην αύλακα που καθιστά αποτελεσματική τη διάκριση μεταξύ αυτών των δύο αλληλουχιών. Το σχήμα δεσμών υδρογόνου στις ελάσσονες αύλακες του κάθε ζεύγους είναι συμμετρικό, κι επομένως η διάκριση σε αυτή τη βάση μόνο δεν είναι δυνατή. Η στενότητα της ελάσσονος αύλακας στις αλληλουχίες B-τύπου DNA καθιστά απίθανο τον ταυτόχρονο σχηματισμό και των τριών δεσμών υδρογόνου στις διαθέσιμες θέσεις ενός ζεύγους C·G ή G·C, κυρίως για στερικούς λόγους. Πιο γενικά, η πρόσβαση των βάσεων, σε οποιαδήποτε αύλακα, είναι απαραίτητη για την άμεση ανάγνωση μέσω δεσμών υδρογόνου. Αυτή προσβασιμότητα εξαρτάται από το εύρος της αύλακας, το οποίο στη συνέχεια εξαρτάται άμεσα από την αλληλουχία μέσω τόσο στατικών όσο και δυναμικών παραγόντων. Έχει διαπιστωθεί από τις κρυσταλλικές δομές των ολιγονουκλεοτιδίων ότι οι ελάσσονες αύλακες αλληλουχιών πλούσιες σε AT τείνουν να είναι στενότερες από το μέσο όρο. Το εύρος τους εξαρτάται τόσο από το μήκος όσο και από τη φύση της αλληλουχίας AT. Άλλα στοιχεία εξαρτώμενα από την αλληλουχία των ζευγών βάσεων, τα οποία μπορεί να είναι εντοπιζόμενα (όπως το propeller και το helical twist) ή σε μεγάλο μήκος αλληλουχίας (με τυπικό παράδειγμα την κάμψη των περιοχών A), θα επηρεάσουν τις γεωμετρικές σχέσεις μεταξύ των δοτών και των αποδεκτών δεσμού υδρογόνου σε διαδοχικές βάσεις.

Η έμμεση ανάγνωση της αλληλουχίας, εξ' ορισμού περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση με στοιχεία της δομής του DNA διαφορετική από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τις βάσεις και συνεπώς είναι λιγότερο κατευθυνόμενη. Οι ίδιες οι βάσεις παρέχουν διάφορους μηχανισμούς για μια τέτοια ανάγνωση. Υπάρχουν επίσης σημαντικές διαφορές στον ηλεκτρονικό χαρακτήρα μεταξύ των ζευγών A·T και G·C, με το τελευταίο να είναι πιο πλούσιο σε ηλεκτρονικό φορτίο. Έτσι, επίπεδα μόρια με έλλειμμα ηλεκτρονίων που μπορούν να ευθυγραμμιστούν με ζεύγη βάσεων (όπως τα παρεμβαλλόμενα μόρια φαρμάκων ή η πλευρική αλυσίδα της τρυπτοφάνης), τείνουν να δεσμεύονται κατά προτίμηση σε ζεύγη G·C. Τέτοιες προτιμήσεις εντοπίζονται από τη φύση τους σε συγκεκριμένα ζεύγη βάσεων. Ωστόσο, η μικρότερη τάση ευθυγραμμισμού με τα δινουκλεοτίδια πυριμιδίνης-3', 5'-πυρίνης σε σχέση με τα δινουκλεοτίδια πυριμίνης-3', 5'-πυριμιδίνης του B-DNA, σημαίνει



ότι οι αλληλουχίες δινουκλεοτιδίων CpG, TrG, CpA, και TrA (του τύπου πυριμιδίνης-3', 5'-πουρίνης) ξεχωρίζουν πιο εύκολα, με αποτέλεσμα επίπεδα μόρια να παρεμβάλλονται σε αυτά κατά προτίμηση. Η μεθυλομάδα της θυμίνης μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάγνωση της αλληλουχίας, σχηματίζοντας σταθερές επαφές Van der Waals με υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες όπως αυτές της λευκίνης, της ισολευκίνης και της αλανίνης. Η έμμεση ανάγνωση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί μέσω της παρουσίας μιας συγκεκριμένης ομάδας, υποκατάστασης ή πλευρικής αλυσίδας η οποία θα οδηγούσε στην παρουσία στερικών παρεμποδίσεων και συνεπώς αποσταθεροποίηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου DNA-υποκαταστάτη. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ογκώδης μεθυλομάδα της θυμίνης, η οποία επιτρέπει την πρόσβαση σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις [2].

Η έμμεση ανάγνωση της εξαρτώμενης από την αλληλουχία δομής μπορεί να στηρίζεται στην ύπαρξη διαφορών στο σκελετό και στις διαμορφώσεις των φωσφορικών όπως είναι οι γεωμετρίες των φωσφορικών τύπου B_{II}, οι οποίες μπορούν να δράσουν ως σήματα αναγνώρισης. Ίσως πιο σημαντικές να είναι οι διαφορές στις αποστάσεις μεταξύ των φωσφορικών οι οποίες προέρχονται από διαφορές στη διαμόρφωση του σκελετού και οι οποίες μπορούν να αναγνωριστούν μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις βασικές πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων.

Τα ηλεκτρονιακά χαρακτηριστικά ενός συγκεκριμένου ζεύγους βάσεων παράγουν ένα ηλεκτρικό πεδίο και δυναμικό πλησίον του. Αυτά τα ηλεκτρονιακά στοιχεία διαφέρουν στους διάφορους τύπους δομής του DNA, αλλά και στις διαφορετικές αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων. Ειδικής σημασίας είναι το εύρημα ότι για το DNA B-τύπου, παρατηρείται ελάχιστο του ηλεκτροστατικού δυναμικού στη μείζονα αύλακα των ολιγο(dG)(dC) αλληλουχιών, την ελάσσονα αύλακα των ολιγο(dA)(dT) και την αλληλουχία 5'-AATT του δωδεκαμερούς των Dickerson-Drew (CGCGAATTCGCG). Όλα αυτά έχουν περισσότερο αρνητικά δυναμικά από αυτά γύρω από τις φωσφορικές ομάδες, εξηγώντας γιατί οι κατιονικοί υποκαταστάτες και οι βασικές πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών συγκεντρώνονται στις αύλακες παρά γύρω από τις φωσφορικές ομάδες. Αυτός ο ηλεκτροστατικός παράγοντας είναι σημαντικός στο να κατευθύνει έναν εισερχόμενο υποκαταστάτη σε μια συγκεκριμένη περιοχή της αλληλουχίας.



Κεφάλαιο



ΕΙΔΗ ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ
ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ



3. ΕΙΔΗ ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

3.1. Εισαγωγικά

Τα νουκλεϊνικά οξέα αλληλεπιδρούν αντιστρεπτά με ένα ευρύ φάσμα χημικών σωματιδίων που περιλαμβάνει το νερό, μεταλλοϊόντα και τα σύμπλοκά τους, μικρά οργανικά μόρια και πρωτεΐνες. Μία από τις πιο σημαντικές γραμμές στην ανάπτυξη φαρμάκων και της σημερινής χημειοθεραπείας κατά κάποιων καρκίνων, ιώσεων και παρασιτώσεων περιλαμβάνει φάρμακα που αλληλεπιδρούν αντιστρεπτά με νουκλεϊνικά οξέα. Φυσικά αντιβιοτικά όπως η αδριαμυκίνη και συνθετικά φάρμακα όπως η αμσακρίνη, τα οποία αλληλεπιδρούν με το DNA, χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική θεραπεία πολλών νεοπλαστικών παθήσεων. Το κίνητρο για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων των νουκλεϊνικών οξέων προήλθε από το ενδιαφέρον για τη διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης των προϋπάρχοντων φαρμάκων και από την επιθυμία ανάπτυξης μιας νέας γενιάς ανώτερων φαρμάκων. Τα συνθετικά ολιγοπεπτίδια και ολιγονουκλεοτίδια προσφέρουν συναρπαστικές δυνατότητες σαν φάρμακα που αναγνωρίζουν νουκλεϊνικά οξέα και ως πιθανές “νουκλεάσες” με υψηλή ειδικότητα ως προς την αλληλουχία [5].

3.2. Τα είδη της αντιστρεπτής αλληλεπίδρασης

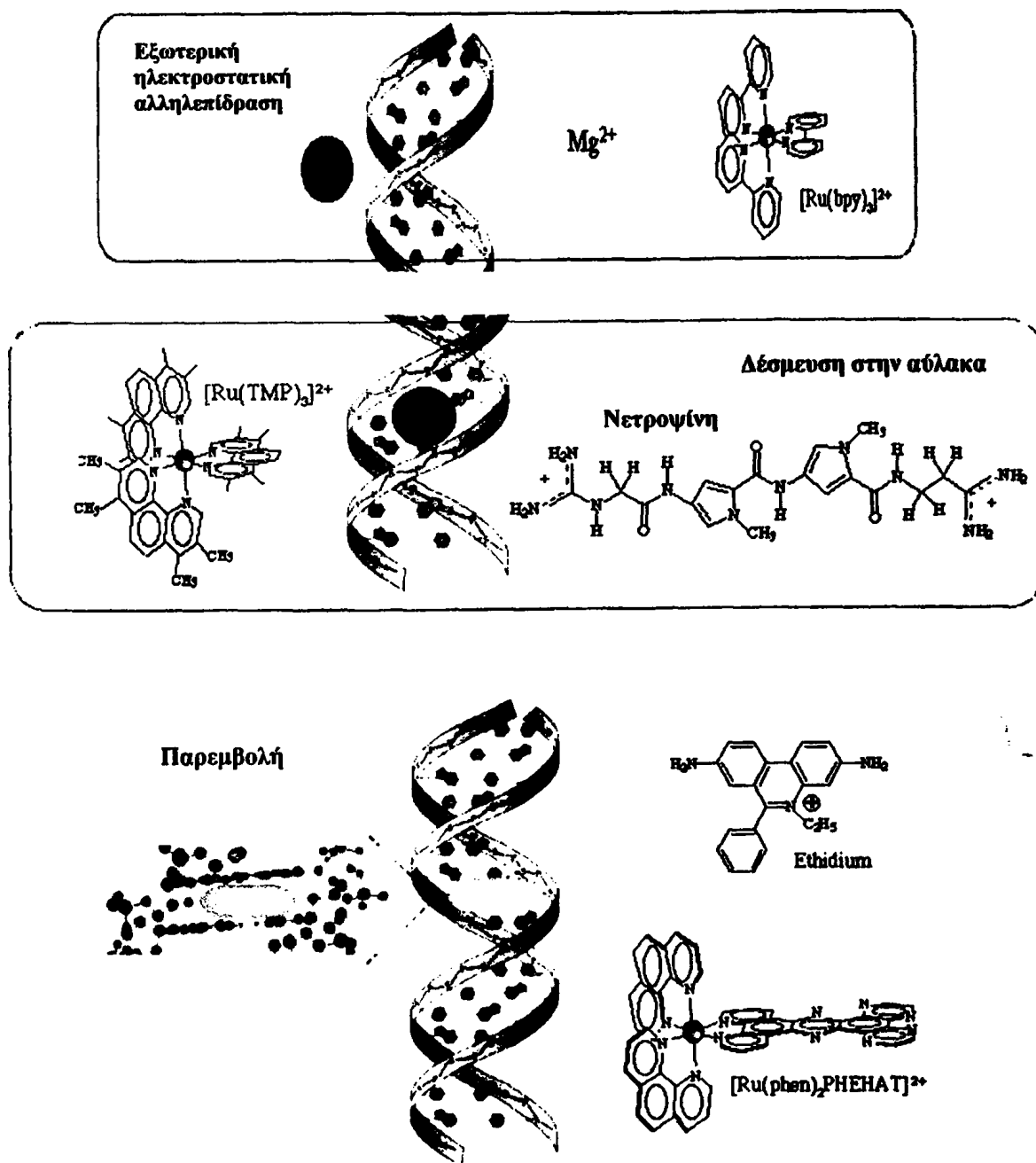
Μόρια και ιόντα αλληλεπιδρούν με τη διπλή έλικα νουκλεϊνικών οξέων με τρεις κυρίως τρόπους οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους:

- Δέσμευση κατά μήκος της εξωτερικής επιφάνειας της έλικας μέσω αλληλεπιδράσεων οι οποίες είναι γενικά μη ειδικές και είναι κυρίως ηλεκτροστατικές,
- Δέσμευση στην αύλακα, η οποία περιλαμβάνει απευθείας αλληλεπιδράσεις του δεσμευμένου μορίου με τα άκρα των ζευγών βάσεων οποιασδήποτε από τις αύλακες (μείζονα ή ελάσσονα) των νουκλεϊνικών οξέων,
- Παρεμβολή μεταξύ των βάσεων από μικρά μόρια επίπεδα ή σχεδόν επίπεδα (σχήμα 3.1).

Οι πρώτοι δύο τρόποι δέσμευσης δεν απαιτούν μεταβολή στη διαμόρφωση του νουκλεϊνικού οξέος αλλά μπορεί να προκαλέσουν μεταπτώσεις μεταξύ διαφορετικών δομών κατά τον σχηματισμό του συμπλόκου. Η παρεμβολή μεταξύ των βάσεων απαιτεί μεταβολή στις γωνίες της αλυσίδας σακχάρου-φωσφορικών λόγω του διαχωρισμού γειτονικών ζευγών



βάσεων κατά μία απόσταση (περίπου 3,4 Å) αρκετή ώστε να επιτρέψει την εισαγωγή του παρεμβαλλόμενου μορίου. Αυτή μπορεί να συνοδεύεται κι από άλλες μεταβολές στις παραμέτρους της έλικας όπως κάμψη, αποσυσπείρωση της έλικας κτλ. Παραδείγματα των τύπων των μορίων και των ιόντων που συνδέονται σε νουκλεϊνικά οξέα με τους τρεις διαφορετικούς τρόπους περιγράφονται παρακάτω λεπτομερώς.



Σχήμα 3.1. Οι τρεις κύριοι τρόποι αντιστρεπτής αλληλεπίδρασης ενός μορίου με τη διπλή έλικα ενός νουκλεϊνικού οξέος.

3.2.1. Εξωτερικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

3.2.1.1. Αλληλεπιδράσεις τύπου εξουδετέρωσης (αντισταθμιστικές).

Τα νουκλεϊνικά οξέα είναι πολυηλεκτρολύτες με υψηλό φορτίο, οι φωσφορικές ομάδες των οποίων, επηρεάζουν ισχυρά τη δομή και τις αλληλεπιδράσεις τους. Ο Manning και οι συνεργάτες του [6] έχουν δείξει ότι απλά ιόντα, όπως αυτά των αλκάλων, δεσμεύονται σε νουκλεϊνικά οξέα κυρίως ως συνάρτηση της πυκνότητας φορτίου του πολυμερούς. Σε B-DNA, για παράδειγμα, αν το μόριο παρασταθεί ως μια γραμμή από φορτία τα οποία απέχουν ίσες αποστάσεις μεταξύ τους, τότε υπάρχει ένα ανιονικό φορτίο ανά απόσταση 7 Å (δύο φορτία ανά ζεύγος βάσεων και περίπου δέκα ζεύγη βάσεων ανά στροφή της διπλής έλικας). Αν η απόσταση των φορτίων γίνει μικρότερη των 7 Å, το μόριο γίνεται ασταθές.

Οι διαμορφώσεις του πολυμερούς με φορτία που απέχουν μικρότερα διαστήματα πρέπει να αντισταθμίζονται από ιόντα του διαλύματος ώστε να επιτύχουν την σταθεροποίηση. Η αλληλεπίδραση των ιόντων με τον πολυηλεκτρολύτη δημιουργεί ένα όρο μη ευνοϊκής εντροπίας στην συνολική ενέργεια διαμόρφωσης του πολυμερούς. Αυτός ο μη ευνοϊκός όρος εξουδετερώνεται με το παραπάνω από τις πολυάριθμες ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις στο αναδιπλωμένο πολυμερές (όπως είναι η διπλή έλικα του DNA). Τα αντισταθμιστικά ιόντα εξουδετερώνουν μέχρι να ελαττωθεί η πυκνότητα φορτίου στο σταθερό επίπεδο του ενός φορτίου ανά 7 Å. Επιπλέον αντισταθμιστικά ιόντα αλληλεπιδρούν με τα εναπομείνοντα φορτία του πολυανιόντος μέσω αλληλεπιδράσεων Debye-Hückel. Μια σημαντική πρόβλεψη της θεωρίας της εξουδετέρωσης, η οποία έχει λάβει σημαντική στήριξη από το πείραμα, είναι ότι τα αντισταθμιστικά ιόντα ανά φωσφορικό φορτίο παραμένουν σχετικά σταθερά για μια συγκεκριμένη διαμόρφωση καθώς η ιονική ισχύς του διαλύματος μεταβάλλεται σε μεγάλο εύρος.

Για τη B-μορφή διπλής έλικας DNA, η θεωρία της εξουδετέρωσης προβλέπει κατά μέσο όρο 0,76 μονοσθενή ιόντα (όπως Na^+) ανά φωσφορική ομάδα και σύνολο 0,88 ανά φωσφορική ομάδα όταν ληφθούν υπ' όψιν και οι αλληλεπιδράσεις τύπου Debye-Hückel. Τα δεσμευμένα αντισταθμιστικά ιόντα ελαττώνουν το αποτελεσματικό φορτίο των νουκλεϊνικών οξέων και επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες και τις αλληλεπιδράσεις του πολυμερούς σε διάλυμα. Σε σταθερή θερμοκρασία, η ευνοϊκή εντροπική επίδραση της απελευθέρωσης των αντισταθμιστικών ιόντων μπορεί να οδηγήσει σε μετουσίωση αλλά και σε αύξηση της δέσμευσης κατιονικών υποκαταστατών καθώς ελαττώνεται η ιονική ισχύς του διαλύματος.

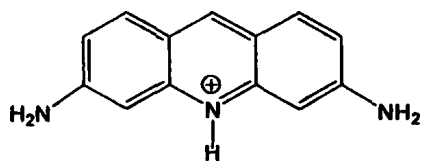


Συνεπώς, τόσο η T_m των νουκλεϊνικών οξέων όσο και η παρατηρούμενη σταθερά ισορροπίας για τη δέσμευση κατιονικών υποκαταστατών εξαρτάται σημαντικά από την ιονική ισχύ.

Οποιοδήποτε κατιόν μπορεί να δεσμευτεί στο DNA μέσω αλληλεπίδρασης εξουδετέρωσης. Αφού η εξουδετέρωση δημιουργεί μη ειδικό, ευκίνητο σύμπλοκο κατά μήκος της εξωτερικής επιφάνειας της διπλής έλικας, η κινητική της δέσμευσης και της αποδέσμευσης ενός τέτοιου συμπλόκου είναι ταχεία. Κινητικές μελέτες δείχνουν ότι κατιονικά σύμπλοκα, τα οποία στην ισορροπία δεσμεύονται στο DNA στις αύλακες ή μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις μέσω πολύ ειδικών αλληλεπιδράσεων, αρχικά δεσμεύονται στην έλικα μέσω αλληλεπιδράσεων εξουδετέρωσης. Η οδός δέσμευσης μπορεί να περιλαμβάνει αρχικά αλληλεπιδράσεις τύπου Debye-Hückel οι οποίες ακολουθούνται από εξουδετέρωση και ταχεία διάχυση κατά μήκος του σκελετού της έλικας στην ειδική θέση δέσμευσης. Αυτή η διαδικασία είναι κατά κάποιο τρόπο ανάλογη προς την “ολίσθηση” των πρωτεϊνικών μορίων κατά μήκος της έλικας του DNA καθώς αναζητούν την πιο ευνοϊκή προς σύνδεση θέση.

3.2.1.2. Μη ειδικό εξωτερικό *stacking*.

Επίπεδα αρωματικά μόρια μπορούν να διαταχθούν το ένα παράλληλα με το άλλο (*stack*) σχηματίζοντας διμερή είτε μεγαλύτερα συσσωματώματα. Όταν οι ενώσεις είναι



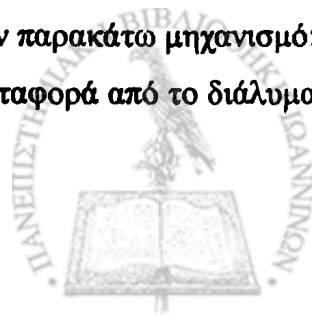
Σχήμα 3.2. Προφλαβίνη.

φορτισμένες, όπως η προφλαβίνη (σχήμα 3.2), απωθούνται ηλεκτροστατικά μεταξύ τους. Αν, ωστόσο, τα κατιόντα τοποθετηθούν παράλληλα κατά μήκος της ανιονικής σακχαρο-φωσφορικής αλυσίδας του DNA, η άπωση ελαττώνεται και ο τύπος δεσμού οδηγεί στο μη ειδικό

εξωτερικό *stacking* των επίπεδων κατιόντων κατά μήκος της διπλής έλικας. Ένα τέτοιο *stacking* έχει πολλές αλληλεπιδράσεις φορτίου και απελευθερώνει ένα μεγάλο κλάσμα αντισταθμιστικών ιόντων. Εξαρτάται λοιπόν σημαντικά από την ιονική ισχύ και είναι γενικά ασθενές σε ιονική ισχύ ίση ή μεγαλύτερη του 0,1 M.

3.2.2. Δέσμευση στις αύλακες του DNA.

Η δέσμευση ενός μορίου στις αύλακες του DNA ακολουθεί τον παρακάτω μηχανισμό: Πρώτα, η ένωση που συνδέεται στις αύλακες υφίσταται υδρόφοβη μεταφορά από το διάλυμα



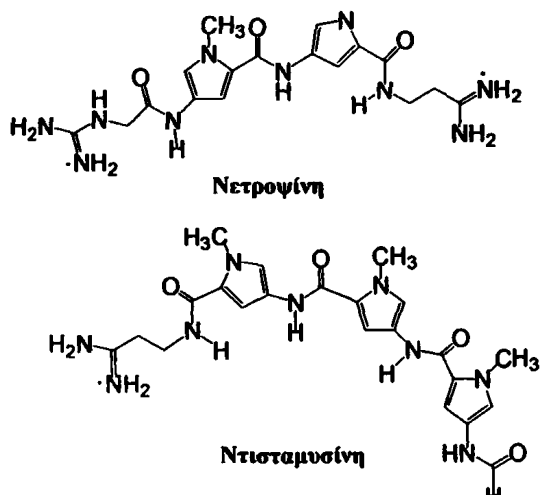
στην αύλακα. Αν η ένωση είναι θετικά φορτισμένη, το γεγονός αυτό ακολουθείται από την απελευθέρωση αντισταθμιστικών ιόντων που περιβάλλουν το DNA. Όταν εισέλθει στην αύλακα το μόριο, τότε μπορούν να πραγματοποιηθούν ειδικές μοριακές αλληλεπιδράσεις όπως van der Waals και δεσμοί υδρογόνου [7]. Η μείζων και η ελάσσων αύλακες διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά το ηλεκτροστατικό δυναμικό, τα χαρακτηριστικά των δεσμών υδρογόνου, τις στερικές επιδράσεις και την εφυδάτωση. Πολλές πρωτεΐνες παρουσιάζουν ειδικότητα ως προς τη δέσμευση μέσω αλληλεπιδράσεων στη μείζονα αύλακα ενώ μικρά μόρια γενικά προτιμούν την ελάσσονα αύλακα του DNA.

Τυπικά, τα μόρια που συνδέονται στην ελάσσονα αύλακα έχουν διάφορους απλούς αρωματικούς δακτυλίους όπως πυρρολικούς, φουρανικούς ή βενζολικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με δεσμούς με ελευθερία περιστροφής. Έτσι, οι ενώσεις αυτές με την κατάλληλη στρέψη μπορούν να ταιριάξουν στην καμπύλη της έλικας στην ελάσσονα αύλακα αντικαθιστώντας το νερό της αύλακας. Η ελάσσων αύλακα του DNA γενικά δεν έχει τόσο μεγάλο εύρος στις πλούσιες σε A·T σε σχέση με τις πλούσιες σε G·C περιοχές και μπορεί να δεχτεί αρωματικά μόρια καλύτερα στις A·T παρά στις G·C αλληλουχίες. Με την κατάλληλη στρέψη των αρωματικών δακτυλίων, το μόριο μπορεί να ταιριάξει στην ελάσσονα αύλακα και να σχηματίσει δεσμούς Van der Waals με τις αλυσίδες της έλικας που σχηματίζουν τα τοιχώματα της αύλακας. Επιπλέον ειδικότητα στη δέσμευση προκύπτει από επαφές μεταξύ του δεσμευμένου μορίου και των άκρων των ζευγών βάσεων στο “πάτωμα” (floor) της αύλακας.

Δεσμοί υδρογόνου μπορούν να σχηματιστούν μεταξύ των ζευγών A·T και του δεσμευμένου μορίου στο C-2 καρβονυλικό οξυγόνο της T ή το N-3 άζωτο της A (αποδέκτες δεσμών υδρογόνου). Παρόλο που παρόμοιες ομάδες υπάρχουν και στα ζεύγη G·C, η αμινομάδα της G αποτελεί στερικό εμπόδιο για το σχηματισμό δεσμού υδρογόνου στο N-3 της G και στο C-2 καρβονύλιο της C (βλέπε σχήμα 2.1). Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της αμινομάδας της G και του καρβονυλικού οξυγόνου της C στα ζεύγη G·C βρίσκεται στην ελάσσονα αύλακα (βλέπε σχήμα 2.1) και παρεμποδίζει στερικά την είσοδο των μορίων στην αύλακα αυτή των πλούσιων σε G·C περιοχών. Έτσι, οι αρωματικοί δακτύλιοι πολλών μορίων σχηματίζουν στενές επαφές με τα πρωτόνια A-H₂ της ελάσσονος αύλακας του DNA. Ο Pullman και οι συνεργάτες του [8] έδειξαν ότι το αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό είναι υψηλότερο στην ελάσσονα αύλακα πλουσίων σε A·T περιοχών σε σχέση με τις πλούσιες σε



G·C περιοχές του DNA και αυτό προσφέρει μια επιπλέον δυνατότητα στα κατιόντα που συνδέονται ειδικά σε περιοχές A·T. Υπάρχει η δυνατότητα να αυξηθεί η ειδικότητα σύνδεσης στις περιοχές G·C σχεδιάζοντας μόρια που μπορούν να αποδεχτούν δεσμούς υδρογόνου από την ομάδα G-NH₂.



Σχήμα 3.3. Οι δομές της νετροψίνης και της ντισταμυσίνης.

Μια δυνατότητα που υπάρχει με τα μόρια που συνδέονται στις αύλακες του DNA, η οποία δεν υπάρχει με τα μόρια που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων, είναι ότι μπορούν να επεκταθούν σε πολλά ζεύγη βάσεων κατά μήκος της αύλακας και μπορούν να αναγνωρίζουν με πολύ υψηλή ειδικότητα συγκεκριμένη αλληλουχία των νουκλεϊνικών οξέων. Η νετροψίνη και η ντισταμυσίνη (σχήμα 3.3) αποτελούν δύο τυπικά παραδείγματα μορίων τα οποία δεσμεύονται στην ελάσσονα αύλακα του DNA.

Ο Dickerson και οι συνεργάτες του [9] παρουσίασαν την κρυσταλλική δομή της νετροψίνης συνδεδεμένη με τη διπλή έλικα d(CGCGAATTCGCG)₂ (σχήμα 3.4), η οποία παρέχει σημαντικές μοριακές λεπτομέρειες σχετικά με το σχηματισμό συμπλόκου στην ελάσσονα αύλακα. Η νετροψίνη συνδέεται στην κεντρική αλληλουχία AATT της διπλής έλικας και αντικαθιστά τη σφαίρα εφυδάτωσης που υπήρχε σε αυτή την περιοχή στο ελεύθερο oligομερές (σχήμα 3.4). Οι τρεις αμιδικές ομάδες NH κατευθύνονται προς το εσωτερικό σχηματίζοντας επιμηκυσμένους δεσμούς υδρογόνου με το N-3 της A και το O-2 της T. Το μόριο συγκρατείται στο κέντρο της αύλακας με δεσμούς Van der Waals με άτομα του DNA που σχηματίζουν τα τοιχώματα της αύλακας. Οι δεσμοί αυτοί συγκρατούν τους πυρρολικούς δακτυλίους σχεδόν παράλληλους προς τα τοιχώματα της αύλακας ενώ λόγω της ελικοειδούς διαμόρφωσης της αύλακας, οι δύο πυρρολικοί δακτύλιοι στρέφονται κατά 33°, ο ένας ως προς τον άλλο.



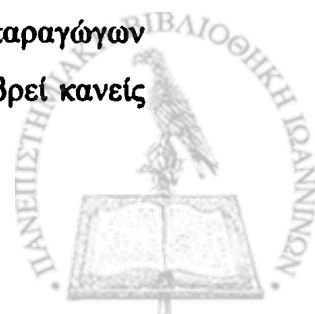
Σχήμα 3.4. Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της νετροψίνης με το oligονουκλεοτίδιο (C-G-C-G-A-A-T-T-Br-C-G-C-G)₂ [10].



Τα δύο κατιονικά άκρα της νετροψίνης επικεντρώνονται επίσης στην ελάσσονα αύλακα και δημιουργούν δεσμούς με τα N-3 των εξωτερικών A της κεντρικής αλληλουχίας AATT. Στερικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πυρρολικών -CH και των βάσεων του DNA αποτρέπουν τη νετροψίνη να εισέλθει περισσότερο στην αύλακα. Ως συνέπεια, τα μήκη κάποιων δεσμών υδρογόνου μεταξύ της νετροψίνης και των ζευγών A-T είναι σχετικά μεγάλα (3,3-3,8 Å) σε σύγκριση με τις κανονικές τιμές (<3 Å). Η δέσμευση της νετροψίνης προκαλεί μια μικρή διεύρυνση της ελάσσονος αύλακας στην περιοχή AATT και μια μικρή κάμψη του άξονα της έλικας πέρα από τη θέση σύνδεσης.

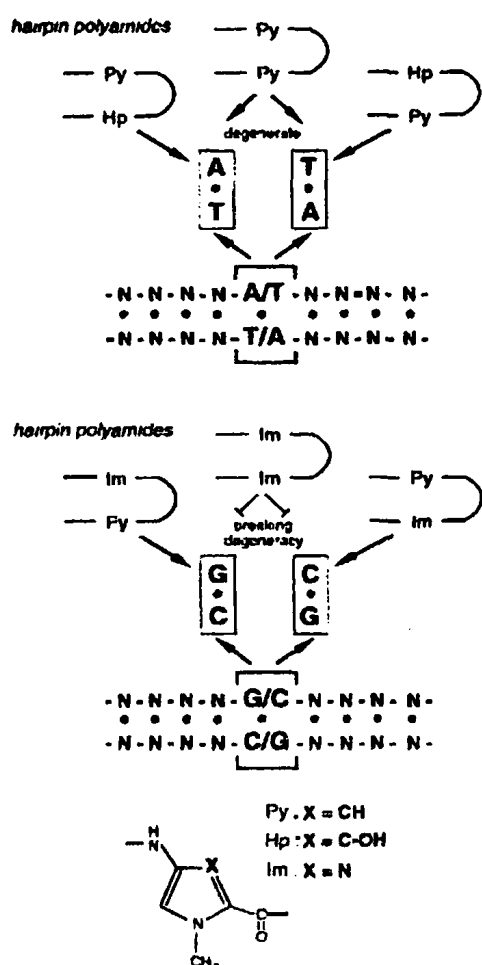
Η ντισταμυσίνη έχει δομή και ειδικότητα ως προς τη σύνδεση παρόμοια με τη νετροψίνη (σχήμα 3.3) και το σύμπλοκο της με το DNA έχει πολλά χαρακτηριστικά παρόμοια με το σύμπλοκο της νετροψίνης. Οι Rich και Wang έλυσαν την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου του ολιγομερούς $d(CGCA_3T_3GCG)_2$ με τη ντισταμυσίνη [11]. Η ντισταμυσίνη έχει μηνοειδές σχήμα το οποίο ταιριάζει με την καμπυλότητα της ελάσσονος αύλακας η οποία είναι και η θέση σύνδεσης του φαρμάκου. Στην κρυσταλλική δομή, το μόριο έχει υποστεί στρέψη με τρόπο συμπληρωματικό ως προς τη φυσική ελικοειδή στροφή της ελάσσονος αύλακας. Πέντε ομάδες NH βρίσκονται στο εσωτερικό του μηνοειδούς σχήματος της ντισταμυσίνης και μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου με το N-3 της A και το O-2 της T. Τουλάχιστον 3 επιμηκυσμένοι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται (προς το N-3 και το O-2) στην κρυσταλλική δομή. Η τοποθέτηση των ομάδων NH στη ντισταμυσίνη δεν ταιριάζει απόλυτα με την ελικοειδή τοποθέτηση των ομάδων αποδεκτών υδρογόνου στα ζεύγη A-T του DNA και συνεπώς δεν είναι εφικτό όλες οι ομάδες NH να βρίσκονται στη βέλτιστη θέση σχηματισμού δεσμού υδρογόνου. Η ακριβής φύση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ DNA και ντισταμυσίνης θα εξαρτάται αναμφίβολα από την τοπική αλληλουχία και τη γεωμετρία της έλικας. Το μόριο της ντισταμυσίνης έχει τρεις πυρρολικούς δακτυλίους συγκριτικά με τους δύο του μορίου της νετροψίνης και καλύπτει 5 ζεύγη A-T στο σύμπλοκο συγκριτικά με τα 4 στην περίπτωση της νετροψίνης.

Μετά την πρωτοποριακή ανακάλυψη της νετροψίνης και της ντισταμυσίνης, δύο φαρμάκων με εκλεκτικότητα ως προς A-T αλληλουχίες, έγιναν πολλές προσπάθειες για τη σύνθεση αναλόγων τους που να παρουσιάζουν παρόμοια ή/ και μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ως προς A-T αλλά και G-C αλληλουχίες. Η παρουσίαση των πολυάριθμων αυτών παραγώγων ξεφεύγει του σκοπού αυτής της διατριβής, για τα οποία λεπτομέρειες μπορεί να βρεί κανείς



στην αναφορά [12]. Ενδεικτικά θα αναφερθούν οι λεξιτροψίνες και τα πολυαμίδια τύπου φουρκέτας τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Οι Lowy και Dickerson [12] επινόησαν μια νέα σειρά αντιδραστηρίων ειδικών ως



Σχήμα 3.5. Σχηματικό μοντέλο αναγνώρισης των ζευγών βάσεων από τα πολυαμίδια τύπου φουρκέτας (hairpin polyamides) τα οποία περιέχουν μοτίβα ιμιδαζολίου (Im), πυρρολίου (Py) και υδροξυπυρρολίου (Hp).

προς τη σύνδεση σε συγκεκριμένη αλληλουχία, τις λεξιτροψίνες, τα οποία είναι σχεδιασμένα ώστε να αναγνωρίζουν τόσο ζεύγη A-T όσο και ζεύγη G-C. Πρόσεξαν ότι οι πυρρολικές CH ομάδες της νετροψίνης κατευθύνονται προς την ελάσσονα αύλακα και είναι σε στενή επαφή με ζεύγη A-T. Στις λεξιτροψίνες, ένας ή περισσότεροι πυρρολικοί δακτύλιοι αντικαθίστανται από ετεροκυκλικούς δακτυλίους που μπορούν να δεχτούν δεσμούς υδρογόνου όπως το ιμιδαζόλιο. Η ανταλλαγή ενός πυρρολικού CH με ένα ιμιδαζολικό-N εξαφανίζει τη στερική παρεμπόδιση της ομάδας G-NH₂ η οποία παρεμποδίζει τη δέσμευση της νετροψίνης σε περιοχές G-C. Ένας συγκεκριμένος δεσμός υδρογόνου μπορεί να σχηματιστεί μεταξύ της G-NH₂ και του ιμιδαζολικού αζώτου, ο οποίος μπορεί να αυξήσει τις αλληλεπιδράσεις με ζεύγη G-C με κατάλληλα υποκατεστημένες λεξιτροψίνες. Πειράματα NMR και footprinting έχουν επιβεβαιώσει την αυξημένη ειδικότητα ως προς την αναγνώριση ζευγών G-C από συνθετικές λεξιτροψίνες.

Ο σχεδιασμός με βάση τη λογική υποκαταστατών που να μπορούν να συνδεθούν ισχυρά και ειδικά σε οποιαδήποτε επιθυμητή αλληλουχία διπλής έλικας DNA πρόσφατα έγινε πραγματικότητα. Πολυαμίδια τύπου φουρκέτας, τα οποία αποτελούνται από δύο μόρια λεξιτροψίνης ομοιοπολικά συνδεδεμένα μέσω του συνδετικού μορίου γ-αμινοβουτυρικού προσφέρουν πολλές δυνατότητες για ειδικότητα με υψηλή συγγένεια ως προς μεγάλο εύρος αλληλουχιών DNA. Η ειδικότητα τους περιορίζεται αυστηρά σε μια αλληλουχία 7 βάσεων στην ελάσσονα αύλακα του DNA [12]. Η τοποθέτηση ενός ιμιδαζολίου (Im) αντιπαράλληλα

με ένα πυρρόλιο (Py) αναγνωρίζει ένα ζεύγος βάσεων G·C, ενώ ένας συνδυασμός Py/Im αναγνωρίζει ένα ζεύγος C·G (σχήμα 3.5). Η διάκριση μεταξύ T·A και A·T αρχικά ήταν ένα εμπόδιο γιατί ένα ζεύγος (Py/Py) παρουσιάζει εκφυλισμό. Όμως το πρόβλημα λύθηκε με την αντικατάσταση του πυρρολίου από το ογκωδέστερο 3-υδροξυπυρρόλιο, η παρουσία του οποίου επιτρέπει τη διάκριση A·T από T·A ζεύγη με υψηλή ειδικότητα, η οποία προέρχεται κυρίως από την αποσταθεροποίηση αλληλεπιδράσεων με ανεπιθύμητες αλληλουχίες [12]. Κατάλληλα επιλεγμένοι συνδυασμοί των τριών αρωματικών αμινοξέων πυρρολίου (Py), ιμιδαζολίου (Im) και υδροξυπυρρολίου (Hr) επιτρέπει την ακριβή αναγνώριση των ζευγών βάσεων A·T (Py/Hr), T·A (Hr/Py), G·C (Im/Py) και C·G (Py/Im) κι επομένως τη σύνδεση σε συγκεκριμένες αλληλουχίες (σχήμα 3.5).

3.2.3. Παρεμβολή μεταξύ των βάσεων του DNA.

3.2.3.1. Το κλασικό μοντέλο.

Στις αρχές του 1960, ο Lerman πραγματοποίησε διάφορες φυσικές μελέτες πάνω στην αλληλεπίδραση του DNA με επίπεδα αρωματικά κατιόντα και συμπέρανε ότι τα επίπεδα αρωματικά μόρια μπορούσαν να συνδεθούν στο DNA μέσω μιας διαδικασίας την οποία ονόμασε παρεμβολή [5]. Αυτός ο τύπος δέσμησης έχει βρεθεί σήμερα για έναν μεγάλο αριθμό πολυκυκλικών αρωματικών κατιόντων. Παράλληλα, το κλασικό μοντέλο παρεμβολής έχει αναλυθεί σε μοριακή λεπτομέρεια. Όπως το κλασικό B-DNA αποτελεί σήμερα μόνο μία από τις πολλές πιθανές διαμορφώσεις της διπλής έλικας των νουκλεϊνικών οξέων, το μοντέλο της κλασικής παρεμβολής αποτελεί μία μόνο όψη των τρόπων με τους οποίους οι αρωματικές ενώσεις μπορούν να πάρουν θέση μεταξύ των ζευγών βάσεων.

Ως αποτέλεσμα της περιστροφής γύρω από δεσμούς του σκελετού του DNA, η παρεμβολή προκαλεί διαχωρισμό των ζευγών βάσεων επιμηκύνοντας ταυτόχρονα τη διπλή έλικα και ελαττώνοντας την ελίκωση στη θέση παρεμβολής (απέλιξη, ξετύλιγμα). Στο κλασικό μοντέλο, η έλικα επιμηκύνεται κατά 3,4 Å, όσο δηλαδή το πάχος των τυπικών αρωματικών δακτυλίων. Στην πράξη, η παρατηρούμενη αύξηση του μήκους είναι γενικά λιγότερη από 3,4 Å λόγω επιδράσεων όπως η κάμψη της έλικας στη θέση παρεμβολής. Το μέγεθος της απέλιξης του DNA εξαρτάται από τη δομή της παρεμβαλλόμενης ένωσης και την αλληλουχία του DNA με τέτοιο τρόπο ώστε δεν είναι απόλυτα κατανοητό.

Το μέγεθος της απέλιξης του DNA λόγω παρεμβολής μπορεί να μετρηθεί με κλειστό κυκλικό υπερσπειρωμένο DNA και η γωνία απέλιξης που υπολογίζεται από τέτοια πειράματα



είναι ο μέσος όρος όλων των θέσεων παρεμβολής στο DNA τυχαίας αλληλουχίας. Ωστόσο, οι πραγματικές γωνίες απέλιξης στην κάθε θέση σύνδεσης στις τοπικές αλληλουχίες μπορεί να ποικίλλουν. Αντιπροσωπευτικά πειράματα αποτελούν η εκτίμηση των μεταβολών κατά τη μέτρηση του ιξώδους του DNA ή του συντελεστή καθίζησης ή της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας κλειστού κυκλικού DNA που προκαλείται από την επιμήκυνση και την απέλιξη της έλικας [13].

Κατά την παρεμβολή παρατηρείται επιπλέον ηλεκτρονιακή αλληλεπίδραση του παρεμβαλλόμενου μορίου με την έλικα [13]. Τα επίπεδα αρωματικά συστήματα των παρεμβαλλόμενων ενώσεων παραλληλίζονται (stack) με τα ζεύγη βάσεων του DNA με αποτέλεσμα η παρεμβαλλόμενη επιφάνεια να καθηλώνεται ισχυρά μεταξύ των αρωματικών, ετεροκυκλικών ζευγών βάσεων και να σταθεροποιείται ηλεκτρονικά εντός της έλικας μέσω αλληλεπιδράσεων συσώρευσης π-π (stacking) και αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου. Η ηλεκτρονιακή αυτή αλληλεπίδραση μεταξύ παρεμβαλλόμενου μορίου και των βάσεων του DNA μπορεί να διαπιστωθεί από διάφορα πειράματα. Μία δοκιμασία για παρεμβολή παρέχεται από μεθόδους γραμμικού διχρωισμού (LD) από τις οποίες διαπιστώνονται παρόμοιες τιμές διχρωισμού των παρεμβαλλόμενων μορίων με τις βάσεις του DNA. Ο διχρωισμός των μορίων που συνδέονται στις αύλακες του DNA είναι πολύ συχνά αντίθετος από αυτόν των ζευγών βάσεων αφού τα μόρια αυτά είναι δεσμευμένα κατά μήκος των άκρων των ζευγών βάσεων του DNA παρά παράλληλα μεταξύ των βάσεων όπως στην περίπτωση των παρεμβαλλόμενων μορίων. Επίσης, ο υποχρωμισμός και η μετατόπιση της μετάπτωσης του παρεμβαλλόμενου χρωμοφόρου είναι συνήθης. Ενίσχυση ή εξαφάνιση της ικανότητας εκπομπής μπορεί να παρατηρηθεί σε μόρια που παρουσιάζουν χημειοφωταύγεια. Επίσης, μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία των χημικών μετατοπίσεων ^1H NMR του παρεμβαλλόμενου μορίου, οι οποίες οφείλονται σε πεδία προερχόμενα από τους δακτυλίους καθώς αυτοί τοποθετούνται παράλληλα μεταξύ τους.

Η παρεμβολή ενός μορίου επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ευκαμψία του και τον προσανατολισμό του [13]. Παρατηρείται σημαντική αλληλεπικάλυψη μεταξύ των ζευγών βάσεων και του παρεμβαλλόμενου μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το παρεμβαλλόμενο μόριο να συγκρατείται σταθερά και να υιοθετεί προσανατολισμό με τον επίπεδο δακτύλιο κάθετα προς τον άξονα της έλικας.



3.2.3.2. Δέσμευση με ειδικότητα ως προς την αλληλουχία.

Υπάρχουν δέκα πιθανοί συνδυασμοί δινουκλεοτιδίων οι οποίοι σχηματίζουν διαφορετικές, δεξιόστροφες, αντιπαράλληλες θέσεις παρεμβολής για απλά παρεμβαλλόμενα μόρια. Οι δέκα συνδυασμοί είναι ($5' \rightarrow 3'$): A-T-A-T, A-A-T-T, T-A-T-A, A-C-G-T, C-A-T-G, G-C-G-C, G-G-C-C, C-G-C-G, G-A-T-C και A-G-C-T. Για παρεμβαλλόμενα μόρια με υποκαταστάσεις που δημιουργούν επαφές πέρα από τη θέση παρεμβολής ή δημιουργούν παραμόρφωση των γειτονικών αλληλουχιών από τη θέση σύνδεσης, ο αριθμός των πιθανοτήτων είναι ακόμα μεγαλύτερος. Οι περισσότερες απλές παρεμβαλλόμενες ενώσεις είτε δεν παρουσιάζουν προτίμηση κατά τη δέσμευση ή μικρή προτίμηση για το ζεύγος G-C και αυτό έρχεται σε αντίθεση με την προτίμηση ως προς το A-T πολλών ενώσεων που δεσμεύονται εξωτερικά. Έχει προταθεί ότι η γενική προτίμηση για G-C οφείλεται στη μεγαλύτερη διπολική ροπή του ζεύγους G-C σε σχέση με το A-T με αποτέλεσμα τα ζεύγη G-C να προκαλούν πόλωση των δακτυλίων των παρεμβαλλόμενων μορίων. Έχουν συντεθεί παρεμβαλλόμενα μόρια με προτίμηση ως προς το A-T και σε αυτή την περίπτωση η ειδικότητα ως προς τη σύνδεση δεν εξαρτάται μόνο από τις διπολικές αλληλεπιδράσεις αλλά επίσης και από τις αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου, το μέγεθος, την εφυδάτωση και το ηλεκτροστατικό δυναμικό των αυλάκων που αλληλεπιδρούν με τις υποκαταστάσεις του παρεμβαλλόμενου μορίου.

Συγκρίνοντας τα μόρια που συνδέονται στις αύλακες με τα παρεμβαλλόμενα μόρια, είναι φανερό ότι τα μόρια που συνδέονται στις αύλακες παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη ειδικότητα ως προς τη σύνδεση από τα παρεμβαλλόμενα μόρια. Οι κοιλότητες παρεμβολής που δημιουργούνται στα ζεύγη βάσεων A-T ή G-C είναι παρόμοιες όσον αφορά τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με επίπεδα αρωματικά συστήματα. Οι συνεισφορές από ηλεκτροστατικές, υδρόφοβες και van der Waals αλληλεπιδράσεις στη δέσμευση είναι παρόμοιες και για τις δύο θέσεις σύνδεσης. Από την άλλη, τα μόρια που συνδέονται στις αύλακες μπορούν να δημιουργήσουν επαφές με περισσότερα ζεύγη βάσεων καθώς τοποθετούνται κατά μήκος της αύλακας και αυτό τους δίνει μεγαλύτερη δυναμικότητα όσον αφορά την αναγνώριση.

Ο Helene και οι συνεργάτες του [14] ενίσχυσαν σημαντικά την ειδικότητα των παρεμβαλλόμενων μορίων συνδέοντας σε αυτά ολιγονουκλετίδια συγκεκριμένης αλληλουχίας. Αυτά τα παράγωγα μπορούν να εντοπίσουν τις συμπληρωματικές τους περιοχές



σε νουκλεϊνικά οξέα με υψηλή ακρίβεια. Το παρεμβαλλόμενο τμήμα παρέχει αυξημένη ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης καθώς και πιθανόν επιπρόσθετη ειδικότητα κατά το σχηματισμό του συμπλόκου.

3.2.3.3. Η αρχή αποκλεισμού του γειτονικού μορίου.

Ενώ μπορούν να κατασκευαστούν μοντέλα της διπλής έλικας του DNA που παρουσιάζουν λογικές γωνίες του σκελετού με παρεμβολή μορίων σε όλες τις πιθανές θέσεις μεταξύ των ζευγών βάσεων, μελέτες σε διάλυμα δείχνουν ότι ακόμα και τα πιο απλά παρεμβαλλόμενα μόρια εμφανίζουν κορεσμό στο μέγιστο του ενός παρεμβαλλόμενου μορίου ανά δύο ζεύγη βάσεων. Αυτή η εμπειρική παρατήρηση οδήγησε στην αρχή του αποκλεισμού του γειτονικού μορίου η οποία αναφέρει ότι τα παρεμβαλλόμενα μόρια μπορούν να συνδέονται σε διαδοχικά ζεύγη βάσεων του DNA, το μέγιστο ένα ανά κάθε δεύτερη θέση σύνδεσης.

Διάφορες θεωρίες αναπτύχθηκαν για να ερμηνεύσουν τη μοριακή βάση του αποκλεισμού του γειτονικού μορίου κατά τη δέσμευση. Μία πρόταση είναι ότι η δέσμευση του παρεμβαλλόμενου μορίου επάγει μεταβολές στη διαμόρφωση γειτονικών θέσεων του DNA και η νέα διαμόρφωση καθιστά αδύνατη την παρεμβολή ενός δεύτερου παρεμβαλλόμενου μορίου στη γειτονική θέση. Μια εναλλακτική πρόταση, από τους Friedman και Manning [15], είναι ότι αφού τα παρεμβαλλόμενα μόρια δεσμεύονται στο DNA και εξουδετερώνουν κάποιο από το φορτίο του, η ευνοϊκή απελευθέρωση αντισταθμιστικών ιόντων ελαττώνεται καθώς τα παρεμβαλλόμενα μόρια δεσμεύονται στην έλικα και η παρατηρούμενη σταθερά ισορροπίας ελαττώνεται επίσης. Αφού η τοπική απελευθέρωση ιόντων λόγω της παρεμβολής θα είναι μεγαλύτερη από την απελευθέρωση ιόντων σε απόσταση κατά μήκος του μορίου του DNA, η τοπική απελευθέρωση των αντισταθμιστικών ιόντων θα μπορούσε επίσης να οδηγήσει σε χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια δέσμευσης σε γειτονικές θέσεις. Πιθανόν τόσο η διαμόρφωση όσο και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις συνεισφέρουν στον παρατηρούμενο αποκλεισμό του γειτονικού μορίου.

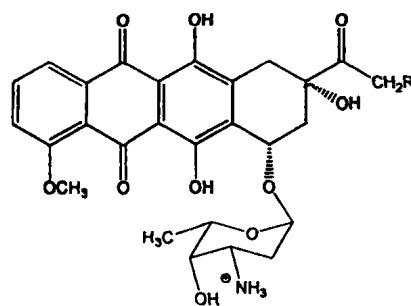
3.2.3.4. Παραδείγματα μορίων που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA.

Σημαντική κατηγορία μορίων που παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις του DNA αποτελούν τα παράγωγα της ανθρακυκλίνης. Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι



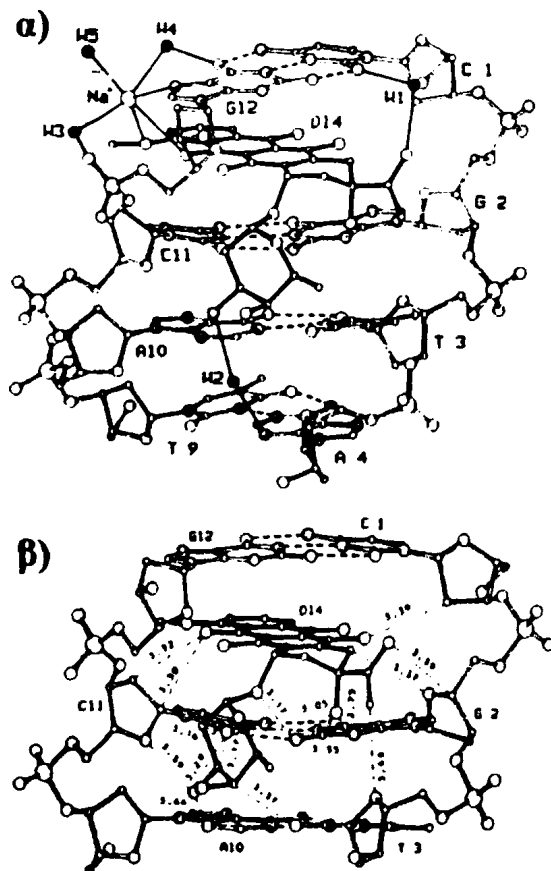
η νταουνομυσίνη και η αδριαμυσίνη (σχήμα 3.6). Η πρώτη κρυσταλλική δομή του συμπλόκου μεταξύ ολιγονουκλεοτιδίου και παρεμβαλλόμενου μορίου λήφθηκε από τους Wang, Rich και τους συνεργάτες τους [16] για το σύμπλοκο του αντιβιοτικού νταουνομυσίνη και το ολιγομερές d(CGTACG).

Σε αντίθεση με τα παρεμβαλλόμενα μόρια που μελετήθηκαν στο επίπεδο του δινουκλεοτιδίου, η νταουνομυσίνη δεσμεύεται στη διπλή έλικα με τον επιμήκη άξονά της σχεδόν κάθετο ως προς τον επιμήκη άξονα των γειτονικών ζευγών βάσεων από τη θέση παρεμβολής. Το αμινο-σάκχαρο της νταουνομυσίνης, το οποίο είναι συνδεδεμένο με τον δακτύλιο A του αρωματικού



Σχήμα 3.6. Η δομή των παρεμβαλλόμενων μορίων ανθρακυκλίνης, νταουνομυσίνη ($R=H$) και αδριαμυσίνη ($R=OH$).

βρίσκεται στην ελάσσονα αύλακα ενώ ο δακτύλιος D, ο οποίος φέρει μια μεθοξυ ομάδα, εισέρχεται στη μείζονα αύλακα. Ο πυρήνας της νταουνομυσίνης, οι δακτύλιοι B και C, βρίσκονται μεταξύ των ζευγών βάσεων. Το εξαμερές έχει δύο μόρια νταουνομυσίνης τα οποία παρεμβάλλονται στις δύο θέσεις C'G στα άκρα της διπλής έλικας. Αυτές οι θέσεις παρεμβολής φαίνονται στο σχήμα 3.7. Τα κεντρικά ζεύγη A'T διατηρούν γενικά γεωμετρία τύπου β στο σύμπλοκο αλλά με μικρές παραμορφώσεις του σκελετού. Όπως αναμενόταν, η θέση παρεμβολής G'C έχει ανοίξει κατά 3,4 Å για να δημιουργήσει τον κατάλληλο χώρο για παρεμβολή (σχήμα 3.7). Ο κατιονικός υποκαταστάτης του αμινοσακχάρου και ο δακτύλιος A πληρούν την ελάσσονα αύλακα και αντικαθιστούν τα μόρια νερού και τα ιόντα της.



Σχήμα 3.7. (α) Διάγραμμα της νταουνομυσίνης (D14) παρεμβαλλόμενο στο d(CGTACG) όπου φαίνονται οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Φαίνονται οι τέσσερις βάσεις του εξαμερούς. Οι δεσμοί υδρογόνου των βάσεων αναπαρίστανται με διακεκομμένες γραμμές. (β) Διάγραμμα που δείχνει τις στενές επαφές van der Waals contacts ($<3,5 \text{ Å}$) μεταξύ της νταουνομυσίνης και του DNA [16].

Η υδροξυλομάδα του δακτυλίου A είναι δότηςδεσμού υδρογόνου στο N-3 της G και δέκτης δεσμού υδρογόνου από την ομάδα NH_2 της ίδιας G. Αυτό δίνει αυξημένη ελεύθερη ενέργεια και τόσο ειδικότητα ως προς το ζεύγος βάσεων όσο και τον προσανατολισμό του παρεμβαλλόμενου φαρμάκου. Οι διαμορφώσεις του δακτυλίου A και του αμινο-σακχάρου της νταουνομυσίνης μεταβάλλονται σε σχέση με το μη δεσμευμένο μόριο και αυτές οι μεταβολές διευκολύνουν το ταίριασμα του μορίου στη δεξιόστροφη ελάσσονα αύλακα.

Η διαμόρφωση της διπλής έλικας μεταβάλλεται επίσης σημαντικά σε σχέση με την ελικοειδή δομή του B-DNA ώστε να δεχτεί το αντιβιοτικό. Εκτός από τον αυξημένο διαχωρισμό των ζευγών βάσεων στη θέση παρεμβολής, τα ζεύγη βάσεων G·C μετατοπίζονται επίσης πλευρικά προς τη μείζονα αύλακα με αποτέλεσμα να αλλάζει θέση ο άξονας της έλικας. Δεν υπάρχει απέλιξη στη θέση παρεμβολής, δηλαδή παραμένει η συνηθισμένη ελικοειδής στρέψη των 36° , αλλά τα ζεύγη βάσεων των γειτονικών θέσεων απελίσσονται κατά 8° . Το γεγονός ότι η απέλιξη παρατηρείται στα γειτονικά ζεύγη βάσεων είναι μη αναμενόμενο. Οι επαγόμενες μεταβολές στη διαμόρφωση σε τόσο μεγάλη απόσταση παρέχουν άλλο ένα παράδειγμα της ευκαμψίας του DNA και φαίνονται οι σημαντικές διαφοροποιήσεις που μπορούν να προκύψουν στη διαμόρφωση μιας διπλής έλικας ώστε να δημιουργήσει χώρο για ένα μεγάλο παρεμβαλλόμενο μόριο το οποίο έχει υποκαταστάσεις που μπορούν να δεσμευτούν στην αύλακα. Ο τρόπος με τον οποίο απελίσσεται το DNA στα σύμπλοκα παρεμβολής εξαρτάται από τη δομή του δεσμευόμενου φαρμάκου και επίσης πιθανόν από τις τοπικές αλληλουχίες του DNA.



Κεφάλαιο



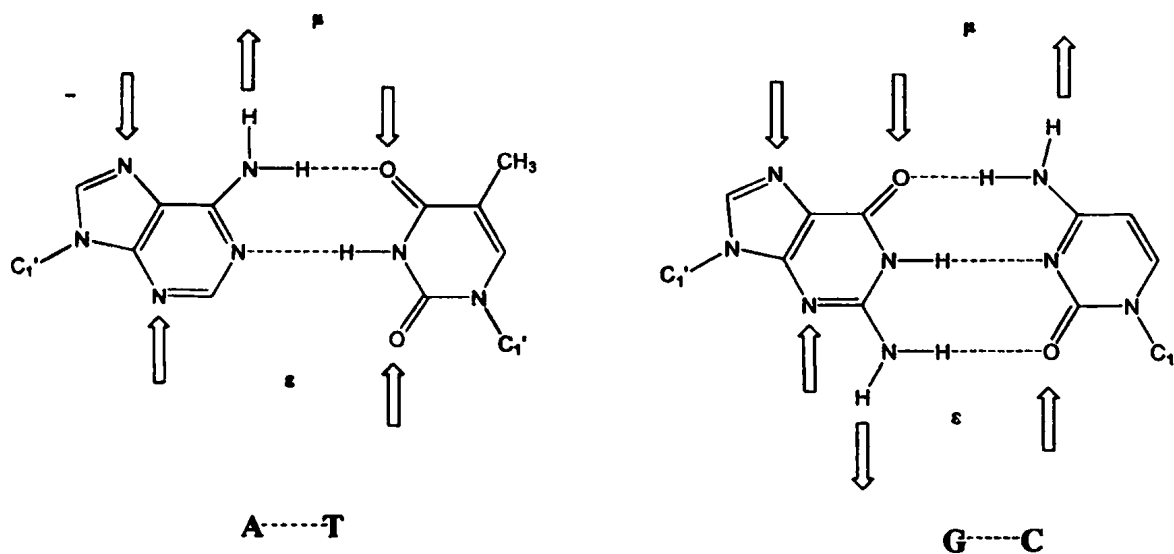
ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ



4. ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

4.1. Γενικά

Η αναγνώριση ενός μορίου DNA είτε αυτή πραγματοποιείται από μικρά μόρια ή πρωτεΐνες, μπορεί να είναι γενική και να αφορά οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο ή αλληλουχία. Από την άλλη, μπορεί να είναι πολύ ειδική, αναγνωρίζοντας μόνο μια καθορισμένη αλληλουχία. Αυτό μπορεί να γίνει πολύ αποτελεσματικά από το ίδιο το DNA. Η αναγνώριση DNA-DNA στηρίζεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων. Για να πραγματοποιηθεί η άμεση ανάγνωση, το εισερχόμενο μόριο πρέπει να έχει πρόσβαση στα ζεύγη των βάσεων μέσω μιας αύλακας του DNA. Ο προσανατολισμός αυτής της εισερχόμενης ομάδας είναι σημαντικός αφού ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου, κι επομένως και η άμεση ανάγνωση, είναι αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένη κατεύθυνση [2].



Σχήμα 4.1. Οι πιθανές θέσεις σχηματισμού δεσμών υδρογόνου στα ζεύγη A-T και G-C. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση των δεσμών υδρογόνου ενώ τα μ και ε δηλώνουν τη μείζονα και την ελάσσονα αύλακα, αντίστοιχα.

Στα άκρα των βάσεων υπάρχουν ομάδες με δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (σχήμα 4.1) οι οποίες δεν συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων. Αυτή η διάταξη των δεσμών υδρογόνου εξαρτάται από την αλληλουχία. Έτσι, στη μείζονα αύλακα, ένα ζεύγος βάσεων C-G τύπου Watson-Crick έχει μια διάταξη (δότης, αποδέκτης, αποδέκτης) η οποία διαφέρει από το αντίστροφο ζεύγος G-C (βλέπε σχήμα 4.1). Τα ζεύγη A-T και T-A έχουν ίδια διάταξη δεκτών / δοτών στη μείζονα αύλακα, αλλά η παρουσία της μεθυλομάδας της θυμίνης εισάγει μια ασυμμετρία στην αύλακα που καθιστά αποτελεσματική τη διάκριση μεταξύ αυτών των δύο αλληλουχιών. Το σχήμα δεσμών

υδρογόνου στις ελάσσονες αύλακες του κάθε ζεύγους είναι συμμετρικό, κι επομένως η διάκριση σε αυτή τη βάση μόνο δεν είναι δυνατή. Η στενότητα της ελάσσονος αύλακας στις αλληλουχίες Β-τύπου DNA καθιστά απίθανο τον ταυτόχρονο σχηματισμό και των τριών δεσμών υδρογόνου στις διαθέσιμες θέσεις ενός ζεύγους C·G ή G·C, κυρίως για στερικούς λόγους. Πιο γενικά, η πρόσβαση των βάσεων, σε οποιαδήποτε αύλακα, είναι απαραίτητη για την άμεση ανάγνωση μέσω δεσμών υδρογόνου. Αυτή προσβασιμότητα εξαρτάται από το εύρος της αύλακας, το οποίο στη συνέχεια εξαρτάται άμεσα από την αλληλουχία μέσω τόσο στατικών όσο και δυναμικών παραγόντων. Έχει διαπιστωθεί από τις κρυσταλλικές δομές των ολιγονουκλεοτιδίων ότι οι ελάσσονες αύλακες αλληλουχιών πλούσιες σε AT τείνουν να είναι στενότερες από το μέσο όρο. Άλλα στοιχεία εξαρτώμενα από την αλληλουχία των ζευγών βάσεων, τα οποία μπορεί να είναι εντοπισμένα (όπως το propeller και το helical twist) ή σε μεγάλο μήκος αλληλουχίας (με τυπικό παράδειγμα την κάμψη των περιοχών A), θα επηρεάσουν τις γεωμετρικές σχέσεις μεταξύ των δοτών και των αποδεκτών δεσμού υδρογόνου σε διαδοχικές βάσεις.

Η έμμεση ανάγνωση της αλληλουχίας, εξ' ορισμού περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση με στοιχεία της δομής του DNA διαφορετική από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τις βάσεις και συνεπώς είναι λιγότερο κατευθυνόμενη. Υπάρχουν επίσης σημαντικές διαφορές στον ηλεκτρονικό χαρακτήρα μεταξύ των ζευγών A·T και G·C, με το τελευταίο να είναι πιο πλούσιο σε ηλεκτρονικό φορτίο. Έτσι, επίπεδα μόρια με έλλειμμα ηλεκτρονίων που μπορούν να ευθυγραμμιστούν με ζεύγη βάσεων (όπως τα παρεμβαλλόμενα μόρια φαρμάκων ή η πλευρική αλυσίδα της τρυπτοφάνης), τείνουν να δεσμεύονται κατά προτίμηση σε ζεύγη G·C. Η μεθυλομάδα της θυμίνης μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάγνωση της αλληλουχίας, σχηματίζοντας σταθερές επαφές Van der Waals με υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες όπως αυτές της λευκίνης, της ισολευκίνης και της αλανίνης. Η έμμεση ανάγνωση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί μέσω της παρουσίας μιας συγκεκριμένης ομάδας, υποκατάστασης ή πλευρικής αλυσίδας η οποία θα οδηγούσε στην παρουσία στερικών παρεμποδίσεων και συνεπώς αποσταθεροποίηση του σχηματιζόμενου συμπλόκου DNA-υποκαταστάτη. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ογκώδης μεθυλομάδα της θυμίνης, η οποία επιτρέπει την πρόσβαση σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις. Επιπλέον, η έμμεση ανάγνωση της εξαρτώμενης από την αλληλουχία δομής μπορεί να στηρίζεται στην ύπαρξη διαφορών στο



σκελετό και στις διαμορφώσεις των φωσφορικών όπως είναι οι γεωμετρίες των φωσφορικών τύπου B_{II}, οι οποίες μπορούν να δράσουν ως σήματα αναγνώρισης [2].

Τα ηλεκτρονιακά χαρακτηριστικά ενός συγκεκριμένου ζεύγους βάσεων παράγουν ένα ηλεκτρικό πεδίο και δυναμικό πλησίον του. Αυτά τα ηλεκτρονιακά στοιχεία διαφέρουν στους διάφορους τύπους δομής του DNA, αλλά και στις διαφορετικές αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων. Ειδικής σημασίας είναι το εύρημα ότι για το DNA B-τύπου, παρατηρείται ελάχιστο του ηλεκτροστατικού δυναμικού στη μείζονα αύλακα των ολιγο(dG)(dC) αλληλουχιών, την ελάσσονα αύλακα των ολιγο(dA)(dT) και την αλληλουχία 5'-AATT του δωδεκαμερούς των Dickerson-Drew (CGCGAATTCGCG). Όλα αυτά έχουν περισσότερο αρνητικά δυναμικά από αυτά γύρω από τις φωσφορικές ομάδες, εξηγώντας γιατί οι κατιονικοί υποκαταστάτες και οι βασικές πλευρικές αλυσίδες των πρωτεϊνών συγκεντρώνονται στις αύλακες παρά γύρω από τις φωσφορικές ομάδες. Αυτός ο ηλεκτροστατικός παράγοντας είναι σημαντικός στο να κατευθύνει έναν εισερχόμενο υποκαταστάτη σε μια συγκεκριμένη περιοχή της αλληλουχίας.

4.2. Τα είδη των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο DNA

Οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο DNA μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες:

- (1) ρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι οποίες δεσμεύονται με υψηλή ειδικότητα σε αλληλουχίες DNA για να ελέγξουν την έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου ή δεσμεύονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες "σήματα" όπως η 5'-TATA ώστε γενικά να ξεκινήσουν τη μεταγραφή,
- (2) πρωτεΐνες που κόβουν το DNA (νουκλεάσες) – μερικές, όπως οι DNAάση I, έχουν σχετικά μικρή ειδικότητα ως προς την αλληλουχία (παρόλο που μπορεί να έχουν κάποια εκλεκτικότητα ως προς τη δομή του DNA), ενώ άλλες, όπως τα περιοριστικά ένζυμα, έχουν πολύ υψηλή ειδικότητα για συγκεκριμένες αλληλουχίες,
- (3) πρωτεΐνες επιδιόρθωσης οι οποίες ανταποκρίνονται σε διάφορους τύπους βλάβης του DNA αναγνωρίζοντας και διορθώνοντας τη βλάβη και / ή συνδέοντας τα τμήματα του κατεστραμμένου DNA,
- (4) πρωτεΐνες οι οποίες επιλύουν τοπολογικά προβλήματα του DNA ξετυλίγοντας το DNA πριν από την αντιγραφή,
- (5) δομικές πρωτεΐνες που διατηρούν την ακεραιότητα του αναδιπλωμένου ή πακεταρισμένου DNA, όπως είναι οι ιστόνες στη χρωματίνη,

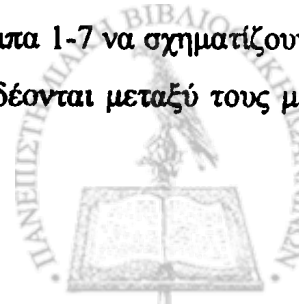


(6) λειτουργικές πρωτεΐνες, τυπικό παράδειγμα των οποίων είναι οι πολυμεράσες, οι οποίες χρησιμοποιούν το DNA ως μήτρα για περαιτέρω σύνθεση νουκλεϊνικών οξέων: δεν απαιτείται η ειδικότητα ως προς την αλληλουχία για την αναγνώριση του DNA, αλλά η δυνατότητα αναγνώρισης ενός συγκεκριμένου τύπου δομής διπλής έλικας [2].

Όπως έχει βρεθεί από μελέτες περιοριστικών ενδονουκλεασών, ενζύμων που αναγνωρίζουν και κόβουν με υψηλή ειδικότητα συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που συνδέονται ειδικά σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA ξεκινά με το σχηματισμό μη ειδικού συμπλόκου [17]. Η μη-ειδική δέσμευση στο DNA αποτελεί το πρώτο στάδιο πριν από τη διάχυση των πρωτεϊνών κατά μήκος του DNA. Η διάχυση κατά μήκος του DNA είναι η μετατόπιση του μορίου της πρωτεΐνης κατά μήκος του μορίου του DNA, κατά την οποία, η πρωτεΐνη δεν βρίσκεται ουσιαστικά σε ελεύθερη κατάσταση. Περιλαμβάνει την ολίσθηση της πρωτεΐνης (δηλαδή μια κίνηση παράλληλη προς το DNA, κατά την οποία η πρωτεΐνη δεν απομακρύνεται από την 'περιοχή' του DNA), αναπηδήσεις (δηλαδή η κίνηση της έλικας λόγω της πορείας της μέσω των αυλάκων του DNA), καθώς και τη μεταφορά από ένα τμήμα σε ένα άλλο (η οποία απαιτεί την παρουσία δύο θέσεων δέσμευσης πάνω στην πρωτεΐνη). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς διαχέονται γραμμικά κατά μήκος του DNA πρέπει συνεχώς να ελέγχουν τη μείζονα αύλακα και πιθανόν και την ελάσσονα αύλακα για στοιχεία αναγνώρισης στα άκρα των βάσεων. Όταν έρθουν σε επαφή με μερικά δομικά στοιχεία του σκελετού του DNA και των βάσεων, χαρακτηριστικά της αλληλουχίας αναγνώρισης, ξεκινά η μετατροπή του μη ειδικού συμπλόκου σε ειδικό σύμπλοκο. Ο σχηματισμός του ειδικού συμπλόκου απαιτεί μεταβολές στη διαμόρφωση τόσο της πρωτεΐνης όσο και του DNA, καθώς και την αποβολή μορίων ύδατος από την επιφάνεια επαφής ώστε να επιτραπούν πιο στενές επαφές [17].

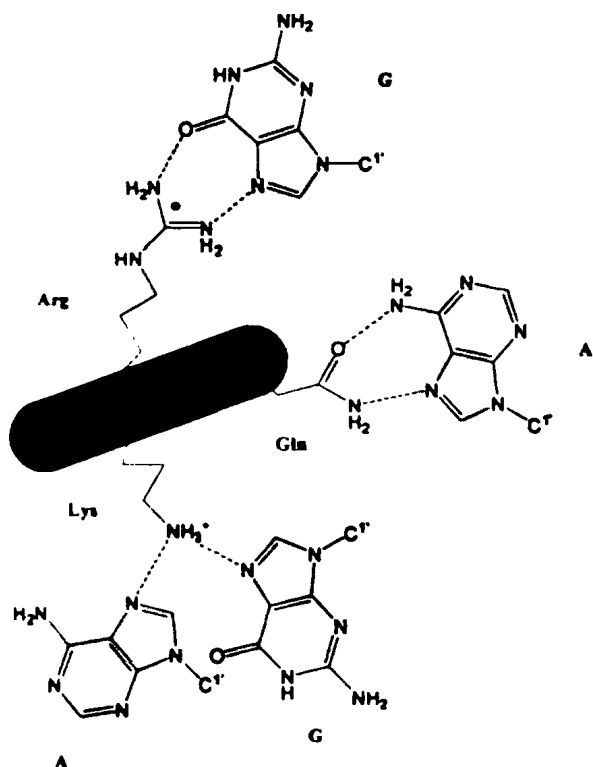
4.3. Αλληλεπιδράσεις από τη μείζονα αύλακα – η α-έλικα ως στοιχείο αναγνώρισης

Η α-έλικα μιας πρωτεΐνης μπορεί άνετα να εισέλθει εντός της μείζονος αύλακας σε σχέση με την ελάσσονα αύλακα μιας διπλής έλικας B-DNA και μπορεί να δράσει απευθείας ως στοιχείο αναγνώρισης. Αυτό το στοιχείο παρατηρήθηκε αρχικά στη βακτηριακή κατασταλτική πρωτεΐνη *cro* σαν τμήμα του μοτίβου έλικα-στροφή-έλικα (helix-turn-helix, HTH). Το HTH αποτελείται συνολικά από 20 αμινοξέα, με τα κατάλοιπα 1-7 να σχηματίζουν την πρώτη έλικα και τα κατάλοιπα 12-20 τη δεύτερη, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με



μια μικρή στροφή έτσι ώστε οι δύο έλικες να κλίνουν 120° η μία προς την άλλη. Η δεύτερη έλικα είναι το στοιχείο αναγνώρισης, το οποίο σχηματίζει τις ειδικές επαφές με το DNA και βρίσκεται στη μείζονα αύλακα. Υπάρχουν χαρακτηριστικά υδροφοβικά κατάλοιπα στις θέσεις 4, 8, 10, 16 και 18 της έλικας αναγνώρισης, τα οποία βοηθούν στο σχηματισμό του υδροφοβικού πυρήνα της πρωτεΐνης [18-20].

Η πλειονότητα των πρωτεϊνών HTH παρουσιάζουν απευθείας αλληλεπιδράσεις



Σχήμα 4.1. Σχηματική αναπαράσταση των διαφόρων τρόπων της άμεσης ανάγνωσης της αδενίνης και γουανίνης από τις πλευρικές αλυσίδες της αργινίνης, της γλουταμίνης και της λυσίνης.

μεταξύ της έλικας αναγνώρισης και της μείζονος αύλακας της αλληλουχίας του DNA, στη διαμόρφωση Β-τύπου. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων και των άκρων των ζευγών των βάσεων. Ο σκελετός της πρωτεΐνης σχηματίζει μερικές φορές επαφές με τις βάσεις ή τις φωσφορικές ομάδες, αλλά αυτές δεν θεωρούνται υπεύθυνες για την ειδικότητα ως προς τη δέσμευση. Η πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνει δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ατόμων O6 και / ή N7 της γουανίνης με τα φορτισμένα άκρα των μακρών εύκαμπτων πλευρικών αλυσίδων των βασικών αμινοξέων αργινίνη ή λυσίνη, των αμιδικών αμινοξέων γλουταμίνη και

ασπαραγίνη ή την υδροξυλομάδα μιας σερίνης (σχήμα 4.1). Η αδενίνη αναγνωρίζεται μέσω των ατόμων της N6 και / ή N7, αν και αυτή η αναγνώριση πραγματοποιείται λιγότερο συχνά σε σχέση με τη γουανίνη. Η αναγνώριση των πυριδιμινών είναι ακόμα λιγότερο συχνή. Ωστόσο, δεν υπάρχει απλή αντιστοιχία αμινοξέος : βάσεως 1:1, αφού η αναγνώριση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω πολλών τρόπων εκτός από το μονοδοντικό και διδοντικό τρόπο. Για παράδειγμα, είναι συνηθισμένη η εύρεση πλευρικών αλυσίδων οι οποίες γεφυρώνουν γειτονικές βάσεις που μπορεί να βρίσκονται στην ίδια αλυσίδα ή ακόμα και σε αντίθετες αλυσίδες. Μερικές φορές ένα ή περισσότερα μόρια νερού μπορεί να συμμετέχουν σε μια

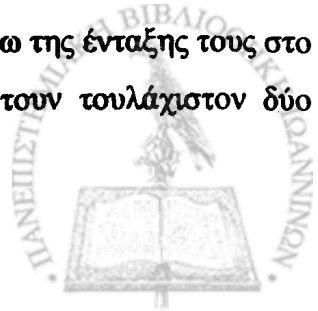


τέτοια γέφυρα δεσμών υδρογόνου ή το ίδιο να αποτελεί τη γέφυρα μεταξύ μιας βάσεως και μιας πλευρικής αλυσίδας.

Δεν έχει καταστεί δυνατός ο ορισμός ενός συγκεκριμένου σχήματος προτίμησης μεταξύ μιας βάσεως και ενός αμινοξέος. Η έλλειψη ενός συγκεκριμένου σχήματος αναγνώρισης μέσω δεσμών υδρογόνου, φαίνεται εν μέρει και στις διαφορές στη δομή του DNA στα διάφορα σύμπλοκα. Άλλοι παράγοντες μπορεί να παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση συγκεκριμένων αλληλουχιών όπως για παράδειγμα η ικανότητα της μεθυλομάδας της θυμίνης να σχηματίζει δεσμούς van der Waals με υδροφοβικές πλευρικές αλυσίδες. Επίσης σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι πολυάριθμες μη ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης και σκελετού του DNA καθώς και άλλες αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν το σύμπλοκο πρωτεΐνης-DNA ως σύνολο, όπως η ευκαμψία των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων εξασφαλίζουν τη βέλτιστη αλληλεπίδραση με όλα τα στοιχεία του DNA. Το σύνολο των αλληλεπιδράσεων επιτρέπει στην έλικα αναγνώρισης μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης να προσανατολίζεται με μοναδικό τρόπο εντός της μείζονος αύλακος. Τέτοιες γενικές υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μπορούν επίσης να παίζουν έναν πιο ενεργό ρόλο στην αναγνώριση, μέσω της έμμεσης ανάγνωσης της δομής και της ευκαμψίας του DNA μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας. Ο σημαντικός ρόλος που μπορεί να διαδραματίσει η έμμεση ανάγνωση φαίνεται εξαιρετικά στη δομή του συμπλόκου του καταστολέα γονιδίων *trp* και του γονιδίου στόχου του, το οποίο έχει μεγάλο αριθμό επαφών μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων και των φωσφορικών ομάδων του DNA, αλλά δεν διαθέτει καμία σημαντική αλληλεπίδραση άμεσης ανάγνωσης μεταξύ των βάσεων και των αμινοξέων. Τελικά, η αθροιστική επίδραση των μη ειδικών επαφών έχει ως αποτέλεσμα την αποτελεσματική ανάγνωση συγκεκριμένων δομικών λεπτομερειών στην αλληλουχία του DNA (Σχήμα 4.1).

4.4. Πρωτεΐνες δακτύλων ψευδαργύρου και άλλες αναγνωριστικές δομές

Η μεγαλύτερη ομάδα των πρωτεϊνών που περιέχουν ψευδάργυρο και συνδέονται στο DNA είναι οι πρωτεΐνες δακτύλου ψευδαργύρου οι οποίες περιέχουν μονάδες κυστεϊνών και ιστιδινών που εντάσσονται σε ένα ιόν ψευδαργύρου. Κάθε μονάδα αποτελείται από ένα αντιπαράλληλο β-φύλλο και μια α-έλικα, οι οποίες συγκρατούνται μέσω της ένταξης τους στο ιόν του ψευδαργύρου. Οι πρωτεΐνες δακτύλου ψευδαργύρου διαθέτουν τουλάχιστον δύο



τέτοιες μονάδες, από τις οποίες η κάθε μία αναγνωρίζει μια θέση 3 ζευγών βάσεων στη μείζονα αύλακα της διπλής έλικας B-DNA. Ο δάκτυλος ψευδαργύρου σχηματίζει άμεσες επαφές σε αλυσίδα πλούσια σε γουανίνη, με σχήματα αλληλεπιδράσεων της πλευρικής αλυσίδας της α-έλικας που περιλαμβάνουν αναγνώριση της αργινίνης από τη γουανίνη παρόμοια με τις πρωτεΐνες HTH.

Κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες των ευκαρυωτικών κυττάρων περιέχουν το βασικό στοιχείο αναγνώρισης και διμερισμού 'φερμουάρ λευκίνης', το οποίο αποτελείται από μια πολύ επιμήκη, συνεχή, σχεδόν ευθεία έλικα με επαναλαμβανόμενα κατάλοιπα λευκίνης. Δύο τέτοιες έλικες αλληλεπιδρούν ώστε να σχηματίσουν ένα παράλληλο έλασμα. Υπάρχει μεγάλος αριθμός αλληλεπιδράσεων μεταξύ του σκελετού του DNA και τις βασικές πλευρικές αλυσίδες, καθώς και ειδικών αλληλεπιδράσεων. Ο προσανατολισμός της α-έλικας εντός της μείζονος αύλακας είναι κρίσιμος ώστε να πραγματοποιηθούν αυτές οι επαφές, με την έλικα να είναι περίπου παράλληλη με τον φωσφοδιεστερικό σκελετό.

Ο ενεργοποιητής μεταγραφής E2 του ιού του παπλώματος χρησιμοποιεί ένα ασυνήθιστο μοτίβο σύνδεσης στο DNA, μέσω ενός διμερούς αντιπαράλληλου β-βαρελιού το οποίο φέρει ένα ζεύγος α-ελίκων εντός της μείζονος αύλακας. Οι επαφές πρωτεΐνης-DNA περιλαμβάνουν απευθείας επαφές των πλευρικών αλυσίδων με τις βάσεις καθώς και μη ειδικές επαφές. Ένα ξεχωριστό στοιχείο της δομής είναι η κάμψη του DNA γύρω από το β-βαρέλι, με ακτίνα καμπυλότητας τα 45 Å. Η κάμψη αυτή οφείλεται σε ένα μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων με τις φωσφορικές ομάδες του DNA, οι οποίες τοποθετούν την αναγνωριστική έλικα εντός της μείζονος αύλακας. Η αναγνώριση χωρίς τη μεσολάβηση α-έλικας έχει επίσης βρεθεί σε κάποιους βακτηριακούς καταστολείς όπου αντι-παράλληλες β-ταινίες που σχηματίζουν διπλή έλικα είναι τα αναγνωριστικά στοιχεία της μείζονος αύλακας. Οι πλευρικές αλυσίδες των ταινιών αλληλεπιδρούν απευθείας με τις φωσφορικές ομάδες και τις βάσεις του DNA, παρόμοια με τα υπόλοιπα σύμπλοκα καταστολέων-DNA που αναφέρθηκαν παραπάνω.

4.5. Αναγνώριση από την ελάσσονα αύλακα

Οι ειδικές ως προς την αλληλουχία πρωτεΐνες γενικά χρησιμοποιούν τη μείζονα αύλακα περισσότερο από την ελάσσονα αύλακα. Αυτό δεν οφείλεται αποκλειστικά στη μεγαλύτερη δυνατότητά της για μεταφορά πληροφοριών. Η ικανότητα μιας α-έλικας να

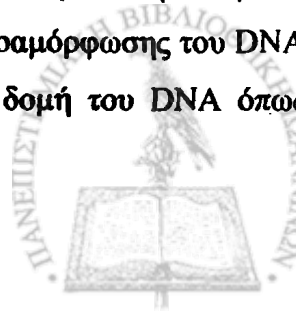


ταιριάζει στη μείζονα αύλακα, αποτελεί επίσης ένα σημαντικό παράγοντα. Αυτό οδήγησε στο παρελθόν να θεωρείται η ελάσσονα αύλακα μικρής σημασίας. Ωστόσο, υπάρχουν σήμερα πολλά παραδείγματα όπου η αλληλεπίδραση των πλευρικών αλυσίδων στην ελάσσονα αύλακα αποτελεί σημαντικό συστατικό της σταθεροποίησης του συμπλόκου πρωτεΐνης-DNA. Μια πλευρική αλυσίδα αργινίνης του ενζύμου 434 γεφυρώνει τις βάσεις του DNA και τις φωσφορικές ομάδες μέσω μορίων νερού. Οι δύο δομές ομοιοπεριοχών του ενζύμου έχουν εκτεταμένες N-αλυσίδες που βρίσκονται στην ελάσσονα αύλακα του DNA, σχηματίζοντας πολλές επαφές με τις βάσεις AT και το σκελετό του DNA. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζουν οι πλευρικές αλυσίδες της αργινίνης σε αυτά τα σύμπλοκα με το O2 των θυμινών είναι ανάλογοι με τον τρόπο αλληλεπίδρασης των φαρμάκων που συνδέονται στην ελάσσονα αύλακα. Αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου, μαζί με την έμμεση ανάγνωση των διαστάσεων της αύλακας μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals, αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα στην προτίμηση των ομοιοπεριοχών για θέσεις AT στο DNA, σε αναλογία με τις προτιμήσεις των φαρμάκων.

Άλλο παράδειγμα είναι η πρωτεΐνη TFIID που είναι παράγοντας-κλειδί για την έναρξη της μεταγραφής στα ευκαρυωτικά κύτταρα [2]. Συνδέεται στην αλληλουχία 'κουτί TATA' στην ελάσσονα αύλακα της ίδιας της θέσης TATA, καθώς και στη μείζονα αύλακα της 3' πλευράς αυτής της θέσεως. Υπάρχει ισχυρή προτίμηση για το TATA συγκριτικά με άλλες αλληλουχίες που περιέχουν AT, σε αντίθεση με τις ασθενείς προτιμήσεις που παρουσιάζουν τα φάρμακα που συνδέονται στην ελάσσονα αύλακα.

4.6. Η διαμόρφωση του DNA και η αναγνώριση του από τα φάρμακα και τις πρωτεΐνες

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X και άλλες τεχνικές έχουν δείξει ότι οι δομές του DNA απουσία συνδεδεμένου φαρμάκου ή πρωτεΐνης έχουν σημαντικό βαθμό ευκαμψίας όσον αφορά τον σκελετό, τη διαμόρφωση του σακχάρου, το βήμα των βάσεων και τα στοιχεία των βάσεων. Τα φάρμακα που δεσμεύονται στις αύλακες δεν χρειάζεται να παραμορφώσουν σημαντικά το DNA από τη B-μορφή κι έτσι οι δομές των κρυστάλλων τους και σε διάλυμα είναι όπως και στην ελεύθερη κατάσταση. Η κατάσταση με τις πρωτεΐνες είναι κάπως διαφορετική, κυρίως επειδή η ενέργεια δέσμευσης για την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-DNA είναι αρκετή για να υπερπηδηθούν οι φραγμοί της παραμόρφωσης του DNA κι έτσι μπορούν να επιτευχθούν μεταβολές μεγάλης κλίμακας στη δομή του DNA όπως



κάμψη, έτσι ώστε να βελτιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις. Κάποιες φορές αυτές οι παραμορφώσεις δυσκολεύουν τη διάκριση μεταξύ των A- και B-μορφών του DNA ιδιαίτερα για μεταβολές όπως το εύρος της αύλακας, το helical twist, και η κλίση των ζευγών βάσεων σε σχέση με τον άξονα της έλικας.



Κεφάλαιο



**ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΕΣ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ
ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΜΕ
ΤΟ DNA**



5. ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕΤΑΠΤΩΣΗΣ ΜΕ ΤΟ DNA

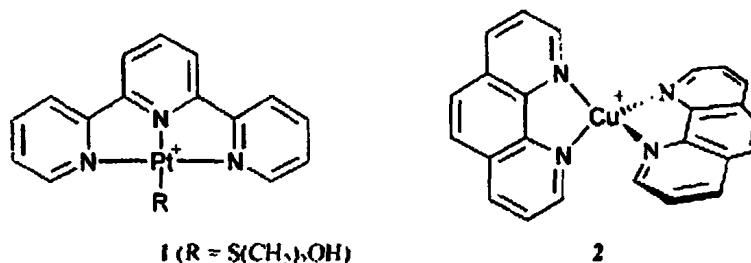
5.1. Γενικά

Τα μέταλλα μετάπτωσης είναι ιδιαίτερα ελκυστικά για την έρευνα των αλληλεπιδράσεων μικρών μορίων με το DNA. Αυτό συμβαίνει γιατί όχι μόνο διαθέτουν καθορισμένες γεωμετρίες ένταξης αλλά συχνά παρουσιάζουν τέτοιες ηλεκτροχημικές ή φωτοφυσικές ιδιότητες οι οποίες ενισχύουν τη λειτουργικότητα του δεσμευόμενου μορίου. Συγκεκριμένα, η χημεία υποκατάστασης των κινητικά αδρανών συμπλόκων που βασίζονται σε επίπεδα τετραγωνικά d^8 και οκταεδρικά μεταλλοϊόντα d^6 είναι καλά μελετημένη και αναπτυγμένη. Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιούνται πολύ συχνά ως το κεντρικό πλαίσιο για την κατασκευή αντιδραστηρίων βασισμένων σε μέταλλα που να δεσμεύονται στο DNA. Τα σύμπλοκα που συντίθενται κατ' αυτό τον τρόπο έχουν βρει πληθώρα εφαρμογών από αντιδραστήρια foot-printing (αποτύπωσης) ως ανιχνευτικά μόρια για διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του DNA κ.λ.π. [21]. Είναι πρακτικά αδύνατο να παρουσιάσει κανείς όλες τις εργασίες που έχουν γίνει γύρω από αυτού του τύπου τις ενώσεις. Παρακάτω ακολουθεί μια σύνοψη των τυπικών δομών που έχουν χρησιμοποιηθεί στην έρευνα της αλληλεπίδρασης με το DNA καθώς και τα αξιοσημείωτα αποτελέσματα που έχουν προκύψει.

Τα πρώτα πειράματα που περιγράφουν την αλληλεπίδραση με το DNA οκταεδρικών συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης με κορεσμένη σφαίρα ένταξης χρησιμοποίησαν σύμπλοκα τα οποία ήταν πλήρως χαρακτηρισμένα. Περίπου 30 χρόνια πριν, ο Lippard και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι τα μονοκατιονικά επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα του $Pt(II)$ με τον υποκαταστάτη $2,2':6',2''$ τερπυριδύλιο (try), όπως το 1 του σχήματος 5.1, μπορούν να δεσμευτούν στη διπλή έλικα του DNA μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις. Αργότερα βρέθηκε ότι η σταθερά δέσμευσης αυτής της αλληλεπίδρασης είναι περίπου $10^5 M^{-1}$ [22]. Περίπου την ίδια χρονική περίοδο, ο Sigman και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι το σύμπλοκο $[Cu(phen)_2]^+$ (2, σχήμα 5.1) δεσμεύεται με τρόπο αντιστρεπτό στην ελάσσονα αύλακα και λειτουργεί σαν συνθετική νουκλεάση του DNA [23]. Στις αρχές της δεκαετίας του '80 είχαν ήδη ξεκινήσει οι μελέτες αλληλεπίδρασης οκταεδρικών συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης με το DNA. Οι πρώτες αυτές μελέτες επικεντρώθηκαν στη δέσμευση συμπλόκων των Zn, Co και Ru στο DNA [24-34]. Μία από αυτές τις πρωτοποριακές εργασίες περιγράφει τη σημαντική διαφορά στην σταθερά δέσμευσης του DNA από τα εναντιομερή



του συμπλόκου $[\text{Zn}(\text{phen})_3]^{2+}$ [26]. Όμως το μεγαλύτερο ενδιαφέρον των ερευνητών συγκέντρωσε το κατιόν του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ του οποίου η αλληλεπίδραση με το DNA μελετήθηκε με πληθώρα μεθόδων καταλήγοντας συχνά σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την αλληλεπίδραση του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ καθώς και άλλων συμπλόκων του Ru(II) με το DNA παρατίθενται στην ενότητα 5.2.2.



Σχήμα 5.1. Δομή του συμπλόκου του Pt(II) με τον υποκαταστάτη try (1) και του συμπλόκου $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ (2).

5.2. Σύμπλοκα του Ru(II)

5.2.1. Ιδιότητες των συμπλόκων Ru(II).

Τα σύμπλοκα του Ru(II) παρουσιάζουν τα εξής χαρακτηριστικά: (α) είναι κινητικά αδρανή λόγω της διαμόρφωσης d^6 χαμηλού σπιν, (β) παρουσιάζουν έντονη ταινία μεταφοράς φορτίου (MLCT) στο ορατό [26] και (γ) είναι από τα λίγα σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης που παρουσιάζουν ισχυρή χημειοφωταύγεια σε διάλυμα σε θερμοκρασία δωματίου και υπάρχει η δυνατότητα της φωτοευαισθητοποίησης τους ώστε να συμμετάσχουν σε διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ενέργειας [35].

Η χημεία της διεγερμένης κατάστασης των τρις-χηλικών συμπλόκων του Ru(II) με τους υποκαταστάτες 2,2'-διπυριδύλιο (σχήμα 5.2α) και 1,10-φαινανθρολίνη (σχήμα 5.2β) έχει τραβήξει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια. Τα πολυπυριδυλικά σύμπλοκα του Ru(II) χρησιμοποιούνται εκτεταμένα σε διαδικασίες μεταφοράς ενέργειας και ηλεκτρονίων [36].

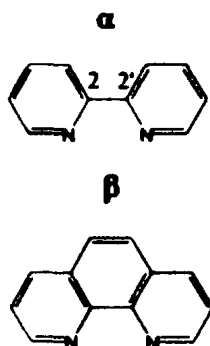
Μεγάλο όμως ενδιαφέρον παρουσιάζει η αλληλεπίδραση των συμπλόκων του Ru(II) με τα νουκλεϊνικά οξέα. Κατ' αρχάς, η δέσμευση πολυπυριδυλικών συμπλόκων του Ru(II) στο DNA συνοδεύεται από ενίσχυση της χημειοφωταύγειας και μείωση της απορρόφησης της έντονης ταινίας μεταφοράς φορτίου (MLCT) του συμπλόκου [27]. Από την άλλη, είναι γνωστό ότι η φωτοδιέγερση συμπλόκων του Ru(II) που είναι δεσμευμένα στο DNA μπορεί να προκαλέσει κόψιμο της αλυσίδας του. Τα σύμπλοκα του Ru(II) δρουν συνήθως με το

μηχανισμό της φωτοοξειδωσης είτε μέσω απευθείας μεταφοράς ηλεκτρονίου από μία βάση του DNA στο σύμπλοκο ή μέσω ενεργοποίησης του μοριακού οξυγόνου και σχηματισμού απλού (singlet) οξυγόνου ($^1\text{O}_2$), το οποίο αντιδρά στη συνέχεια με τη βάση, μηχανισμός που έχει συχνά χρησιμοποιηθεί σε φωτοθεραπείες καρκινικών όγκων [37]. Με τον πρώτο μηχανισμό έχει προταθεί ότι δρουν σύμπλοκα του Ru(II) με του υποκαταστάτες tap (1,4,5,8-τετρααζαφαινανθρένιο) και hat (1,4,5,8,9,12-εξααζατριφαινουλένιο) όπως τα $[\text{Ru}(\text{hat})_3]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{tap})_3]^{2+}$ και $[\text{Ru}(\text{tap})_2(\text{hat})]^{2+}$ [38]. Με το δεύτερο μηχανισμό δρουν τα τρις-χηλικά σύμπλοκα του Ru(II) με bry (2,2'-διπυριδύλιο) και phen (1,10-φαινανθρολίνη) [37, 38]. Συγκεκριμένα, το τρις-χηλικό σύμπλοκο του Ru(II) με bry μπορεί να διεγερθεί και παρουσία υπερθειικού οξέος ή άλλου δότη οξυγόνου και να προκαλέσει απευθείας οξείδωση των βάσεων. Επίσης, απευθείας οξείδωση των βάσεων μπορεί να προκληθεί και από τα σύμπλοκα $\text{trans}-[\text{Ru}(\text{O}_2)(4\text{-OMe-py})_4]^+$ (py=πυριδίνη) και $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppz})\text{O}]$ (tpy=2,2':6',2''-τερπυριδίνη, dppz=διπυριδο[3,2-α:2',3'-c]φαιναζίνη). Συνήθως η οξείδωση πραγματοποιείται σε μια γουανίνη, η οποία έχει και το χαμηλότερο δυναμικό οξείδωσης από όλες τις βάσεις [37].

5.2.2. Σύμπλοκα του Ru(II) με απλούς αρωματικούς υποκαταστάτες.

5.2.2.1. Τρις-χηλικά σύμπλοκα του Ru(II) με 2,2'-διπυριδύλιο (bry), 1,10-φαινανθρολίνη (phen) και παράγωγά τους.

Από πολύ νωρίς, το πρόδρομο σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bry})_3]^{2+}$ συγκέντρωσε το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω της ενδιαφέρουσας φωτοχημείας του. Ήδη από τις



Σχήμα 5.2.
Οι αρωματικοί
υποκαταστάτες:
α) 2,2'-διπυριδύλιο, β)
1,10-φαινανθρολίνη.

πρώτες μελέτες αλληλεπίδρασής του με το DNA διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζει σημαντική εναντιοεκλεκτικότητα και χαρακτηρίστηκε ως χειρικό αντιδραστήριο μετατόπισης (chiral shift agent) [34, 39-40]. Ο τρόπος δέσμευσης του στο DNA αποτέλεσε αντικείμενο συζητήσεων και διαφωνίας μεταξύ των ερευνητών. Αρχικά, ο Yamagishi πρότεινε ότι το Δ-εναντιομερές δεσμεύεται στο DNA μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις κάτι που δεν ισχύει όμως για το Λ-εναντιομερές [34, 40]. Από την άλλη, σύμφωνα με φωτοφυσικές μελέτες από τη Barton και τους συνεργάτες της [28], η δέσμευση του $[\text{Ru}(\text{bry})_3]^{2+}$ στο DNA μέσω

ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ή παρεμβολής είναι αμελητέα. Σύμφωνα με όσα αναφέρουν η Barton και οι συνεργάτες της [28], ο υποκαταστάτης bry δεν αναμένεται να



είναι επίπεδος λόγω των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υδρογόνων 6 και 6' ενώ συγκρινόμενος με τον υποκαταστάτη phen (σχήμα 5.2β) διαθέτει μικρότερο αρωματικό σύστημα. Επιπλέον, η απουσία διπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων άνθρακα 6 και 6' δεν του επιτρέπει να εισχωρήσει στην έλικα του DNA συγκριτικά με τον υποκαταστάτη phen. Επίσης, τα υδρογόνα 4 και 4' εμποδίζουν τον υποκαταστάτη να πλησιάσει τις βάσεις με αποτέλεσμα να ελαττώνεται περαιτέρω η διαθέσιμη επιφάνεια για παρεμβολή ανάμεσα στις βάσεις. Όλοι αυτοί οι παράγοντες παρεμποδίζουν την παρεμβολή του bry ανάμεσα στις βάσεις. Επίσης, έκπληξη αποτελεί η διαπίστωση ότι και η σταθερά δέσμευσης του ιόντος $[\text{Ru}(\text{bry})_3]^{2+}$ είναι μικρότερη από την αντίστοιχη για τα ιόντα $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ και $[\text{Ru}(\text{DIP})_3]^{2+}$ (DIP= 4,7-διφαινυλ-1,10-φαινανθρολίνη) γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στη μικρότερη υδροφοβικότητα του bry και τη μεγαλύτερη διαλυτότητά του σε υδατικά διαλύματα. Αν και ο υποκαταστάτης bry δεν παρουσιάζει τη δυνατότητα παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις του DNA, εντούτοις εμφανίζει την τάση να παραλληλίζεται με τις βάσεις [41].

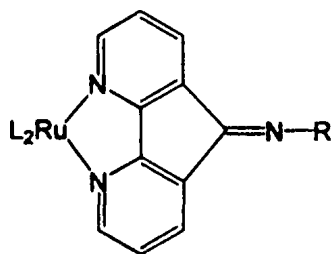
Μελέτες τρις-χηλικών συμπλόκων του bry έδειξαν ότι τα σύμπλοκα αυτά βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική υδρόφιλη στιβάδα του DNA αλληλεπιδρώντας ηλεκτροστατικά με τον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό σκελετό [42-44]. Στην εργασία των S. Mahadevan και M. Paliandavar [44] τονίζεται ο ρόλος της ιονικής ισχύος στη δέσμευση των συμπλόκων αυτών στο DNA. Στην εργασία της Barton και των συνεργατών της, η ιονική ισχύς του διαλύματος ήταν 50 mM NaCl. Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM, παρατηρήθηκε ασθενή δέσμευση του $[\text{Ru}(\text{bry})_3]^{2+}$ [42]. Επιπλέον, σε ιονική ισχύ <5 mM, η σταθερά δέσμευσης του $[\text{Ru}(\text{bry})_3]^{2+}$ στο DNA βρέθηκε $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ [22] και από άλλους ερευνητές $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ σε 1 mM NaCl και $1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ σε 10 mM NaCl [45]. Η ιονική ισχύς φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στη δέσμευση και άλλων συμπλόκων του Ru(II) στο DNA. Έτσι, η Barton και οι συνεργάτες της [46] παρατήρησαν ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl, το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ δεν δεσμεύεται στο DNA. Συνεπώς, φαίνεται ότι η ιονική ισχύς ελαττώνει το ποσοστό δέσμευσης. Η έλξη μεταξύ των θετικά φορτισμένων συμπλόκων του Ru(II) και του πολυανιονικού DNA είναι γνωστό ότι ελαττώνεται σε υψηλή ιονική ισχύ [47]. Η επίδραση της ιονικής ισχύος στη δέσμευση επεκτείνεται και σε σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής όπως το $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ για το οποίο διαπιστώθηκε ελάττωση της σταθεράς δέσμευσης όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl [48]. Η ερμηνεία της επίδρασης αυτής της ιονικής ισχύος



στηρίχτηκε στη θεωρία του πολυηλεκτρολύτη [49] σύμφωνα με την οποία σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων δεν ευνοείται η απελευθέρωση των αντισταθμιστικών ιόντων που προέρχονται από τη θέση που καταλαμβάνει το σύμπλοκο.

Η παρουσία υποκαταστάσεων στον υποκαταστάτη bry σε σύμπλοκα του τύπου $[\text{Ru}(\text{bry})_2\text{L}]^{2+}$, όπου $\text{L} = 4\text{-καρβοξυ-4'-μεθυλ-2,2'-διτυριδίνη}$ ή $4,4'\text{-δικαρβοξυλ-2,2'-διτυριδίνη}$, φαίνεται να αλλάζει τον τρόπο δέσμευσης στο DNA σε σύγκριση με το πρόδρομο σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bry})_3]^{2+}$. Ο R. Caspar και οι συνεργάτες του μελέτησαν με φασματοσκοπία NMR την αλληλεπίδραση των Λ - και Δ -εναντιομερών των παραπάνω συμπλόκων με το DNA [50] και πρότειναν την πιθανή συμμετοχή της καρβοξυλομάδας στη δέσμευση των συμπλόκων αυτών στο DNA. Προσδιορισμός της σταθεράς δέσμευσής τους στο DNA έδειξε ότι δεσμεύονται ισχυρότερα από το πρόδρομο σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bry})_3]^{2+}$ ενισχύοντας την άποψη της πιθανής συμμετοχής των καρβοξυλομάδων στη δέσμευση στο DNA. Το Λ -εναντιομερές παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης από το Δ , γεγονός που έχει ξανά παρατηρηθεί στην περίπτωση του $[\text{Ru}(\text{bryMe}_2)_2(\text{phen})]^{2+}$ [51]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι το Λ -εναντιομερές με το δικαρβοξυλικό υποκαταστάτη δεν κόβει το πλασμιδιακό DNA ενώ το αντίστοιχο Δ -εναντιομερές το κόβει τόσο παρουσία όσο και απουσία φωτός.

Η επίδραση των υποκαταστάσεων στους αρωματικούς δακτυλίους του bry φαίνεται περαιτέρω και από την εργασία του G. Yang και των συνεργάτων του, οι οποίοι μελέτησαν την αλληλεπίδραση με CT-DNA συμπλόκων του Ru(II) με πολυτυριδυλικούς υποκαταστάτες του τύπου $[\text{RuL}_2\text{L}']^{2+}$, όπου $\text{L} = \text{bpy}$ ή phen και $\text{L}' = \text{βάσεις του Schiff ή φαινυλδραζόνες προερχόμενες από τη 4,5-διαζαφλουορεν-9-όνη}$ (σχήμα 5.3) [52]. Με χρήση διάφορων φασματοσκοπικών τεχνικών (φασματοσκοπία απορρόφησης, κυκλικού διχρωϊσμού και μετρήσεις ιξώδους) συμπεράναν ότι το σύμπλοκο (1) έχει



- (1) $\text{L} = \text{bpy}$, $\text{R} = \text{—C}_6\text{H}_4\text{—NH}_2$
 (2) $\text{L} = \text{phen}$, $\text{R} = \text{—C}_6\text{H}_4\text{—NH}_2$
 (3) $\text{L} = \text{bpy}$, $\text{R} = \text{—NH—C}_6\text{H}_5$
 (4) $\text{L} = \text{phen}$, $\text{R} = \text{—NH—C}_6\text{H}_5$

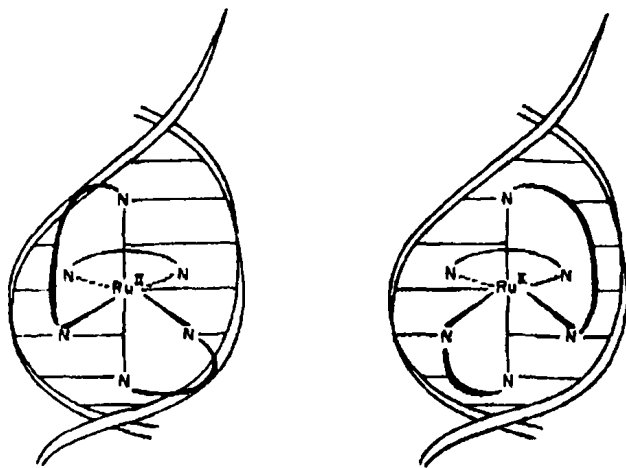
Σχήμα 5.3. Δομές των συμπλόκων που μελετήθηκαν στην [52].

μόνο ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το DNA, το (2) αλληλεπιδρά χωρίς παρεμβολή ενώ τα (3) και (4) παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις.

Οι αλληλεπιδράσεις των εναντιομερών Λ - και Δ - του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ με το DNA είναι από αυτές που έχουν συζητηθεί περισσότερο. Η Barton και οι συνεργάτες της



μέσα από μια σειρά εργασιών [26-29, 33, 53-55] υποστήριξαν ότι η αλληλεπίδραση του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ με το DNA πραγματοποιείται μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις. Αρχικά



Σχήμα 5.4. Σχήμα της δέσμευσης των εναντιομερών του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ στο B-DNA, στο οποίο φαίνεται η στερεοεκλεκτικότητα. Μη ευνοϊκές στερικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους μη παρεμβαλλόμενους υποκαταστάτες και τον φωσφορικό σκελετό φαίνονται για το Λ-εναντιομερές (αριστερά). Αντιθέτως, το Δ-εναντιομερές (δεξιά) ταιριάζει απόλυτα στη δεξιόστροφη αύλακα [26].

η Barton και οι συνεργάτες της από φωτοφυσικές μελέτες πρότειναν ότι κατά την αλληλεπίδραση του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ με τη B-μορφή του DNA, ο ένας αρωματικός υποκαταστάτης phen παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων [26]. Η σταθερά δέσμευσης του συμπλόκου αυτού με το DNA είναι χαμηλή, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί με μερική εισχώρηση του phen μεταξύ των βάσεων λόγω των στερικών παρεμποδίσεων που δημιουργούνται από την παρουσία των άλλων δύο υποκαταστατών. Επιπλέον, κατά την αλληλεπίδραση αυτή υπάρχει σημαντικού βαθμού εναντιοεκλεκτικότητα η οποία πηγάζει από τη διαφορετική συμμετρία

των δύο εναντιομερών, με το Δ-εναντιομερές να ταιριάζει στη δεξιόστροφη έλικα και να παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης σε σύγκριση με το Λ-εναντιομερές το οποίο δεν μπορεί να παρεμβληθεί μεταξύ των βάσεων λόγω σημαντικών στερικών παρεμποδίσεων [26, 28]. Επίσης, η ίδια ερευνητική ομάδα προτείνει δύο διαφορετικούς τρόπους δέσμευσης του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ στη δεξιόστροφη έλικα του DNA, με το Δ-εναντιομερές να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων στη μείζονα αύλακα κατά προτίμηση πλούσιων σε G·C αλληλουχιών και το Λ-εναντιομερές να δεσμεύεται επιφανειακά μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [29]. Συγκεκριμένα, η συμμετρία του Δ-εναντιομερούς επιτρέπει τον παραλληλισμό του ενός φαινανθρολινικού υποκαταστάτη με τις βάσεις καθώς οι άλλοι δύο ταιριάζουν με τη συμμετρία της δεξιόστροφης αύλακας. Αντιθέτως, για το Λ-εναντιομερές, η συμμετρία των δύο φαινανθρολινικών υποκαταστατών δεν ταιριάζει με την συμμετρία της δεξιόστροφης έλικας με αποτέλεσμα τη δέσμευση του στην αύλακα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (σχήμα 5.4) [29]. Μελέτες NMR της αλληλεπίδρασης των παραπάνω εναντιομερών με ολιγονουκλεοτίδια από τους J. P. Rehmann και J. K. Barton στηρίζουν τις



παραπάνω υποθέσεις και επιπλέον προκύπτει ότι το Λ-εναντιομερές δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα [31].

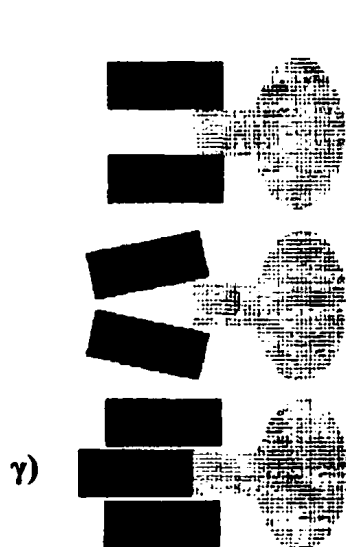
Από την άλλη, πειράματα γραμμικού και κυκλικού διχρωϊσμού επιβεβαιώνουν την ύπαρξη διαφορετικού τρόπου αλληλεπίδρασης για τα δύο εναντιομερή αλλά αμφισβητούν την ύπαρξη παρεμβολής [56]. Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι τα δύο εναντιομερή είναι μόρια που συνδέονται στις αύλακες με διαφορετική γεωμετρία το καθένα, με τον άξονα συμμετρίας C_3 του Λ-εναντιομερούς να σχηματίζει γωνία 50° και του Δ-εναντιομερούς 70° με τον άξονα της έλικας. Επίσης, πρότειναν ότι στην περίπτωση του Λ-εναντιομερούς, ο ένας χηλικός υποκαταστάτης εισέρχεται εντός της αύλακας και παραλληλίζεται με τις βάσεις ενώ οι άλλοι δύο αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες των δύο αλυσίδων. Αντίθετα, στην περίπτωση του Δ-εναντιομερούς, οι δύο χηλικοί υποκαταστάτες κατευθύνονται προς το εσωτερικό της αύλακας [56].

Η παρεμβολή ως τρόπος δέσμευσης του $[Ru(phen)_3]^{2+}$ στο DNA αμφισβητήθηκε περαιτέρω και από την M. Eriksson και τους συνεργάτες της [57], οι οποίοι μελέτησαν με φασματοσκοπία NMR την αλληλεπίδραση των εναντιομερών Λ- και Δ- του παραπάνω συμπλόκου με το $d(CGCGATCGCG)_2$. Τα αποτελέσματά τους αποκλείουν την ύπαρξη παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις και δείχνουν ότι και τα δύο εναντιομερή δεσμεύονται στην ελάσσονα αύλακα της κεντρικής αλληλουχίας AT. Εντούτοις, το Δ-εναντιομερές παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης προς την αλληλουχία AT συγκριτικά με το Λ-εναντιομερές επειδή στην περίπτωση του Δ-εναντιομερούς, οι δύο υποκαταστάτες φαινανθρολίνης εισέρχονται στην ελάσσονα αύλακα ενώ στην περίπτωση του Λ-εναντιομερούς εισέρχεται μόνο ο ένας [58]. Επιπλέον, πειράματα μέτρησης ιξώδους του DNA έδειξαν ότι κανένα από τα δύο εναντιομερή δεν συνδέεται στο DNA μέσω του κλασικού τρόπου παρεμβολής και επιβεβαίωσαν την προτίμηση του Λ-εναντιομερούς για αλληλουχίες πλούσιες σε AT και του Δ-εναντιομερούς για GC αλληλουχίες [59-61].

Η πιο πρόσφατη βιβλιογραφία απορρίπτει οριστικά την αλληλεπίδραση του $[Ru(phen)_3]^{2+}$ μέσω παρεμβολής μεταξύ των βάσεων [41, 62-63]. Η ανάπτυξη μιας νέας τεχνικής (Scanning Force Microscopy) με την οποία μπορεί να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι επιμήκυνσης ενός μορίου DNA, η οποία προκαλείται από την αλληλεπίδραση με άλλο μόριο και η εφαρμογή της στο σύστημα $[Ru(phen)_3]^{2+}$ -DNA απέκλεισε την ύπαρξη της παρεμβολής [62]. Ωστόσο, η προσπάθεια για ερμηνεία των πειραματικών ευρημάτων οδήγησε στη



συζήτηση για οριακές περιπτώσεις παρεμβολής. Οι P. Lincoln και B. Norden [41] πρότειναν την ύπαρξη δύο εναλλακτικών τρόπων με τους οποίους θα μπορούσε ο υποκαταστάτης φαινανθρολίνης να αλληλεπιδρά με τις βάσεις του DNA πέρα από τον κλασικό τρόπο

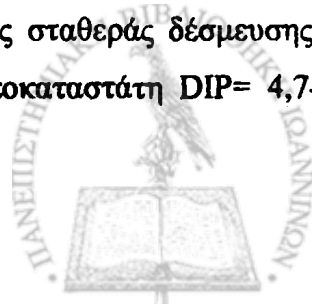


Σχήμα 5.5. Ορισμοί: α) της κλασικής παρεμβολής (intercalation), β) semi-intercalation και γ) quasi-intercalation.

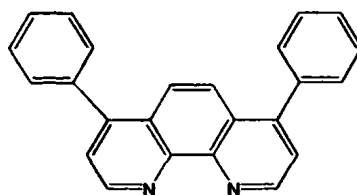
παρεμβολής (σχήμα 5.5). Σύμφωνα με τον πρώτο τρόπο, το άκρο του Β-δακτυλίου της φαινανθρολίνης καθώς δεσμεύεται δημιουργεί ένα άνοιγμα μεταξύ των ζευγών βάσεων (σχήμα 5.5β-semi-intercalation) και αυτός ο τρόπος δέσμευσης θα μπορούσε να ερμηνεύσει την επίδραση που έχει το Δ-εναντιομερές στον προσανατολισμό, τις ηλεκτροφορητικές ιδιότητες και το ιξώδες μικρών τμημάτων DNA. Σύμφωνα με έναν εναλλακτικό μηχανισμό, το άκρο του Β-δακτυλίου της φαινανθρολίνης ωθεί ένα ζεύγος βάσεων προς τη μείζονα αύλακα και έτσι επιτυγχάνει μερική αλληλεπικάλυψη με τα

γειτονικά ζεύγη βάσεων (σχήμα 5.5γ-quasi intercalation). Με τον τελευταίο αυτό μηχανισμό ερμηνεύεται η ευθυγράμμιση στο ίδιο επίπεδο του υποκαταστάτη φαινανθρολίνης με τις βάσεις. Στο πνεύμα αυτό κινείται και η νεότερη εργασία του D. Z. M. Coggan και των συνεργατών η οποία αναφέρει ότι ο τρόπος δέσμευσης των εναντιομερών του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους [63]. Βάσει των μελετών μοριακών μοντέλων που πραγματοποίησαν πρότειναν τρεις δυνατούς τρόπους δέσμευσης: (i) ο ένας χηλικός υποκαταστάτης φαινανθρολίνης βρίσκεται σχεδόν παράλληλος προς τις βάσεις εντός τις μείζονος αύλακος (με μερική εισχώρηση), (ii) ο ένας χηλικός υποκαταστάτης είναι τοποθετημένος κατά μήκος της αύλακος και (iii) οι δύο χηλικοί υποκαταστάτες βρίσκονται στην ελάσσονα αύλακα. Για το Λ-εναντιομερές, ο πρώτος τρόπος δέσμευσης ευνοείται σε όλες τις αναλογίες συμπλόκου-DNA. Για το Δ-εναντιομερές, σε χαμηλές αναλογίες, προτιμάται η δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα σύμφωνα με τον τρίτο τρόπο ενώ σε υψηλές αναλογίες πιο ευνοϊκός είναι ο δεύτερος τρόπος και παρατηρείται επίσης εν μέρει και η μερική εισχώρηση στη μείζονα αύλακα.

Θεωρήθηκε ότι αυξάνοντας την επιφάνεια του υποκαταστάτη ο οποίος παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων μπορεί να οδηγήσει σε αντίστοιχη αύξηση της σταθεράς δέσμευσης. Βάσει αυτής της λογικής, παρασκευάστηκαν σύμπλοκα με τον υποκαταστάτη DIP= 4,7-



διφαινυλ-1,10-φαινανθρολίνη (σχήμα 5.6) και εξετάστηκε η αλληλεπίδραση τους με το DNA. Όντως, το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{DIP})_3]^{2+}$ παρουσιάζει μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης από το $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ [39]. Αν και ο υποκαταστάτης DIP δεν αναμένεται να είναι εντελώς επίπεδος, γεγονός που δεν ευνοεί την παρεμβολή, πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι όντως αλληλεπιδρά μέσω παρεμβολής. Συγκεκριμένα, πειράματα καταστολής της χημειοφωταύγειας του Λ - $[\text{Ru}(\text{DIP})_3]^{2+}$ έδειξαν ότι συνδέεται στη B-μορφή του DNA κυρίως μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ενώ το Δ -εναντιομερές αλληλεπιδρά μέσω παρεμβολής του ενός



Σχήμα 5.6. Ο υποκαταστάτης DIP.

υποκαταστάτη DIP και διάσχιση του συνοδού φαινυλίου από τη μείζονα αύλακα προς την ελάσσονα αύλακα [64]. Βέβαια δεν κατέστη σαφές αν η επιπλέον σταθεροποίηση του συμπλόκου με DIP έναντι του phen προέρχεται από την αυξημένη επιφάνεια για παρεμβολή ή από την αυξημένη υδροφοβικότητα. Από την άλλη, μελέτες κυκλικού και γραμμικού διχρωϊσμού έδειξαν ότι και τα δύο εναντιομερή αλληλεπιδρούν με το DNA με τον ίδιο τρόπο χωρίς παρεμβολή [65]. Μια πιθανή ερμηνεία γι' αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα είναι η μικρή διαλυτότητα και γενικά η υδροφοβικότητα των συμπλόκων αυτών. Στις αρχικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν χλωριούχα και υπερχλωρικά άλατα τα οποία απαιτούσαν μίγματα ρυθμιστικών διαλυμάτων DMSO/ύδατος 1:9 για να διαλυθούν. Στις μετέπειτα μελέτες, χρησιμοποιήθηκε το περισσότερο υδατοδιαλυτό οξεικό άλας και οι μετρήσεις έγιναν σε αμιγώς υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα. Προτάθηκε ότι η παρουσία του DMSO θα μπορούσε να μεταβάλλει τη διαμόρφωση του B-DNA επάγοντας με αυτό τον τρόπο διαφορετική συμπεριφορά απέναντι στα δύο εναντιομερή [65].

Η κύρια επίδραση ενός βοηθητικού υποκαταστάτη, σύμφωνα με τον A. M. Pyle και τους συνεργάτες του [39], είναι η μεταβολή της εναντιοεκλεκτικότητας. Για παράδειγμα, η σύγκριση των $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ και $[\text{Ru}(\text{DIP})_3]^{2+}$ έδειξε ότι η αύξηση του όγκου των βοηθητικών υποκαταστατών αυξάνει την εναντιοεκλεκτικότητα για παρεμβολή του Δ -εναντιομερούς σε μια δεξιόστροφη έλικα DNA [28]. Γενικά, η παρουσία ενός υποκαταστάτη που μπορεί να παρεμβληθεί προσθέτει στην σταθερότητα του συμπλόκου αλλά η παρουσία ενός δεύτερου υποκαταστάτη, ο οποίος αναγκαστικά θα πάρει θέση κάθετη σε σχέση με την αύλακα, δεν προσθέτει στη σταθερότητα του συμπλόκου. Έτσι, το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{DIP})_2\text{phen}]^{2+}$ έχει παρόμοια σταθερά δέσμευσης με το $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{DIP}]^{2+}$. Οι στεरिकές αλληλεπιδράσεις μπορεί



να παίζουν σημαντικό ρόλο στο πόσο βαθιά ο παρεμβαλλόμενος υποκαταστάτης μπορεί να εισέλθει στην έλικα. Επιπλέον, η αυξημένη υδροφοβικότητα των συμπλόκων μπορεί να οδηγήσει σε αυτο-συσσωμάτωση μέσα στο διάλυμα ελαττώνοντας έτσι τη σταθερά δέσμευσης. Συγκρίνοντας το $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{phen}]^{2+}$ με το $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ή το $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{DIP})]^{2+}$ με το $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{DIP})]^{2+}$, διαπιστώνει κανείς ότι η σταθερά δέσμευσης αυξάνεται με την υδροφοβικότητα των βοηθητικών υποκαταστατών [39].

Η παρουσία υποκαταστάσεων στους αρωματικούς δακτυλίους μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα ενός συμπλόκου με τέτοιο τρόπο ώστε να αναγνωρίζει DNA τύπου A αντί για B. Όπως φαίνεται από την εργασία των H.-Y. Mei και J. K. Barton [66], το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{TMP})_3]^{2+}$, όπου TMP= 3,4,7,8-τετραμεθυλφαινανθρολίνη, δεσμεύεται εκλεκτικά σε α-έλικες, παρουσιάζει εναντιοεκλεκτικότητα κατά τη δέσμευση και μετά από ακτινοβολήση κόβει εκλεκτικά το A-DNA. Σύμφωνα με του συγγραφείς, λαμβάνοντας υπόψη ότι το σύμπλοκο $\Lambda\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ δεσμεύεται κατά προτίμηση στην επιφάνεια του B-DNA και ότι η ελάχιστονα αύλακα του A-DNA είναι ρηχή ενώ η μείζονα αύλακα στενή, βαθιά και δυσπρόσιτη, το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{TMP})_3]^{2+}$ σχεδιάστηκε κατ' αυτό τον τρόπο ώστε να αλληλεπιδρά με την ελάχιστονα αύλακα του A-DNA και να μην μπορεί να αλληλεπιδράσει με B-DNA ούτε μέσω παρεμβολής λόγω του μεγέθους του υποκαταστάτη αλλά ούτε και μέσω δέσμευσης στις αύλακες. Έτσι, πράγματι το σύμπλοκο $\Lambda\text{-}[\text{Ru}(\text{TMP})_3]^{2+}$ δεσμεύεται κατά προτίμηση στο A-DNA συγκριτικά με το B-DNA ενώ μετά από ακτινοβολήση διαπιστώθηκε ότι κόβει επίσης κατά προτίμηση το DNA A-τύπου και μάλιστα σε διπλάσιο ποσοστό συγκριτικά με το Δ -εναντιομερές [66].

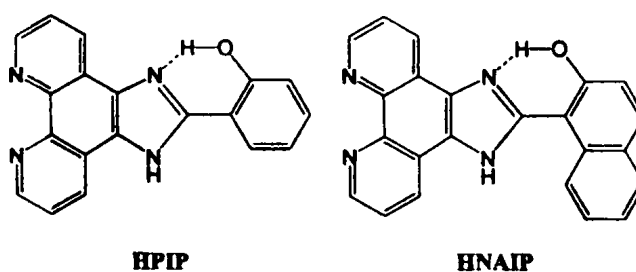
Ο σχεδιασμός και η μελέτη της αλληλεπιδράσεως με το DNA μιας σειράς συμπλόκων του Ru(II) με παράγωγα του υποκαταστάτη IP επιβεβαιώνει ότι μικρές μεταβολές στις υποκαταστάσεις μπορεί να επηρεάσουν δραματικά τον τρόπο δέσμευσης. Ο B. Jing και οι συνεργάτες του μελέτησαν με φωτοφυσικές τεχνικές (φασματοσκοπία ηλεκτρονικής απορρόφησης, χημειοφωταύγεια, μέτρηση χρόνων ημιζωής της διεγερμένης κατάστασης και φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού) την αλληλεπίδραση με CT-DNA των συμπλόκων του τύπου $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$, όπου L= IP και παράγωγα του IP με α-ναφθυλ και 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-φαινυλ στη θέση 2 [67]. Διαπίστωσαν ότι τα σύμπλοκα αυτά δεσμεύονται στο DNA μέσω παρεμβολής και τη μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης παρουσιάζει το τελευταίο παράγωγο, γεγονός που αποδίδεται στον πιθανό σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του

συμπλόκου και DNA. Επίσης, η μελέτη της αλληλεπίδρασης με CT-DNA των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{PBIP})]^{2+}$, $\text{PBIP} = 2-(4\text{-βρωμοφαινυλ})\text{ιμιδαζο}[4,5\text{-}f]1,10\text{-φαινανθρολίνη}$ και $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{OBIP})]^{2+}$, $\text{OBIP} = 2-(2\text{-βρωμοφαινυλ})\text{ιμιδαζο}[4,5\text{-}f]1,10\text{-φαινανθρολίνη}$ δείχνει πως η διαφορετική θέση του βρωμίου στον παρεμβαλλόμενο υποκαταστάτη έχει ως αποτέλεσμα διαφορετικές σταθερές δέσμησης και συμπεριφορά κατά τη δέσμηση στο DNA [68]. Παρόμοια μελέτη συμπλόκων του Ru(II) με άλλα παράγωγα του IP, τα $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$, όπου $\text{L} = \text{CNOIP}$ ($2-(2\text{-χλωρο-5-νιτροφαινυλ})\text{ιμιδαζο}[4,5\text{-}f][1,10]\text{φαινανθρολίνη}$), ή HPIP ($2-(2\text{-υδροξυφαινυλ})\text{ιμιδαζο}[4,5\text{-}f][1,10]\text{φαινανθρολίνη}$, DPPZ , TAPTP ($4,5,9,18\text{-τετρααζαφαινανθρενο-}[9,10\text{-}b]\text{τριφαινύλιο}$) παρουσίασαν διαφορές στην συμπεριφορά κατά τη δέσμηση στο DNA, τη χημειοφωταύγεια αλλά και κατά το κόψιμο του πλασμιδίου pBR 322 μετά από ακτινοβολήση [69].

Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HPIP})]^{2+}$ έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής [67-71]. Ο J.-G. Liu και οι συνεργάτες του [70] αναφέρουν ότι δεν παρατηρήθηκε εναντιοεκλεκτικότητα κατά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου αυτού με το DNA. Από την άλλη, οι N. Χατζηλιάδης, A. Γαρούφης και οι συνεργάτες τους [71] μελέτησαν με φασματοσκοπία NMR την αλληλεπίδραση των Λ - και Δ -εναντιομερών του παραπάνω συμπλόκου με το εξανουκλεοτίδιο $d(\text{GTCGAC})_2$ και βρήκαν ότι το Δ -εναντιομερές παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις A_5C_6 ενώ το Λ -εναντιομερές δεσμεύεται ασθενώς στο DNA χωρίς παρεμβολή.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των σταθερών δέσμησης των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HPIP})]^{2+}$

και $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HNAIP})]^{2+}$ ($\text{HNAIP} = 2-(2\text{-υδροξυ-1-ναφθυλ})\text{ιμιδαζο}[4,5\text{-}f][1,10]\text{φαινανθρολίνη}$), όπου τόσο ο HPIP όσο και ο HNAIP είναι δύο υποκαταστάτες που παρουσιάζουν ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου (σχήμα 5.7). Όπως προκύπτει

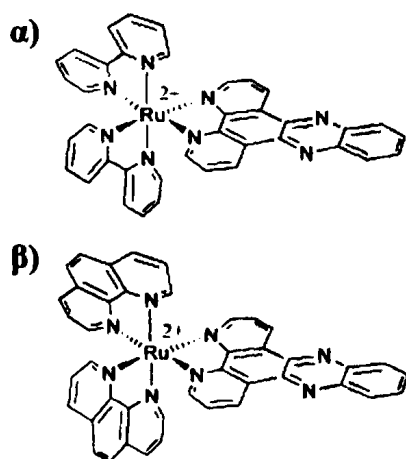


Σχήμα 5.7. Η δομή των HPIP και HNAIP .

από την εργασία του J.-G. Liu και των συνεργατών του [72], το σύμπλοκο με τον υποκαταστάτη HPIP αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής με σταθερά δέσμησης μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από το αντίστοιχο σύμπλοκο με τον υποκαταστάτη HNAIP , ο οποίος αλληλεπιδρά μέσω μερικής παρεμβολής. Πιθανολογείται ότι ο μεγάλος ναφθυλικός

δακτύλιος του HNAIP δεν βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο οδηγώντας έτσι σε μερική παρεμβολή. Επίσης, θεωρητικές μελέτες των συμπλόκων $[Ru(bpy)_2(L)]^{2+}$, όπου $L = IP, PIP$ ή $HPIP$ έδειξαν ότι η παρουσία του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου στο μόριο του $HPIP$ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση στην επίπεδη επιφάνεια του υποκαταστάτη και μπορεί να ερμηνεύσει την υψηλή σταθερά δέσμευσης που παρατηρείται στα σύμπλοκα του [73]. Από την άλλη, από τη σύγκριση της αλληλεπίδρασης με το DNA των συμπλόκων του τύπου $[Ru(phen)_2(p-L)]^{2+}$, όπου $L = MOIP$ (2-(4-μεθοξυφαινυλ)ιμιδαζο[4,5-f][1,10]φαινανθρολίνη), $HPIP$, $NPIP$ (2-(4-νιτροφαινυλ)ιμιδαζο[4,5-f][1,10]φαινανθρολίνη) προκύπτει ότι όλα τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής με διαφορετικές σταθερές δέσμευσης οι οποίες επηρεάζονται σημαντικά από τις ηλεκτρονιακές επιδράσεις των υποκαταστάσεων στο φαινυλικό δακτύλιο του PIP [74]. Συγκεκριμένα, η σειρά των σταθερών δέσμευσης βρίσκεται σε συμφωνία με την ικανότητα έλξης ηλεκτρονίων της ομάδας υποκατάστασης: $-OR < -OH < -NO_2$. Επιπλέον, η επίδραση της ομάδας $-NO_2$ στη σταθερά δέσμευσης έχει μελετηθεί στο σύμπλοκο $[Ru(5-NO_2-phen)_3]^{2+}$, όπου 5- NO_2 -phen = 5-νιτροφαινανθρολίνη, και διαπιστώθηκε ότι παρόλο που υπάρχει η δυνατότητα σχηματισμού υδρογόνου, η δέσμευση στο DNA είναι μικρή και συγκρίσιμη με αυτή του συμπλόκου $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ και επομένως είναι κυρίως ηλεκτροστατική [61].

5.2.2.2. Σύμπλοκα με τον υποκαταστάτη $dpprz$ και παράγωγά του.



Σχήμα 5.8. Δομή των συμπλόκων:
α) $[Ru(bpy)_2(dpprz)]^{2+}$, β) $[Ru(phen)_2(dpprz)]^{2+}$.

Το 1990 αναφέρθηκε ότι το σύμπλοκο $[Ru(bpy)_2(dpprz)]^{2+}$ ($dpprz =$ διπυριδο[3,2- α :2',3'- c]φαιναζίνη) (σχήμα 5.8) παρουσίαζε εντυπωσιακές φωτοφυσικές ιδιότητες. Ηλεκτροχημικές και φωτοφυσικές μετρήσεις στη θεμελιώδη και τη διεγερμένη κατάσταση έδειξαν ότι η μεταφορά φορτίου κατευθυνόταν από το μεταλλικό κέντρο προς τη φαιναζίνη του υποκαταστάτη $dpprz$ και ότι η κύρια οδός απενεργοποίησης χωρίς ακτινοβολή της διεγερμένης κατάστασης ήταν η πρωτονίωση των ατόμων αζώτου της φαιναζίνης. Έτσι, η διεγερμένη κατάσταση του παραπάνω συμπλόκου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το

μικροπεριβάλλον. Συνεπώς, ενώ το σύμπλοκο αυτό εμφανίζει ισχυρή χημειοφωταύγεια από

τη μεταφορά φορτίου από το μέταλλο στον υποκαταστάτη (MLCT) σε υδρόφοβους διαλύτες όπως το ακετονιτρίλιο ή το διχλωρομεθάνιο, σε υδατικά διαλύματα η κατάσταση MLCT εξαφανίζεται. Οι ιδιότητες αυτές συνιστούν αυτό που ονομάστηκε ως “μοριακός διακόπτης”: Η προσθήκη DNA σε υδατικά διαλύματα του συμπλόκου αυτού έχει ως αποτέλεσμα ισχυρή χημειοφωταύγεια, επειδή τα άζωτα του δακτυλίου του υποκαταστάτη dppz προστατεύονται από το διαλύτη λόγω της παρεμβολής του ανάμεσα στις βάσεις του DNA [75].

Μελέτες γραμμικού διχρωϊσμού [76-77], ιξωδομετρίας [78], απέλιξης του DNA [75] και resonance Raman [79] στα σύμπλοκα $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ και $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ έδειξαν ότι αδιαμφισβήτητα πρόκειται για παρεμβαλλόμενα μόρια με υψηλή σταθερά δέσμευσης ($K_b = 10^8 \text{ M}^{-1}$) και αντίθετα με πολλά κλασικά παρεμβαλλόμενα μόρια, η διαδικασία αναγνώρισης κατευθύνεται από την εντροπία. Η αυξημένη επιφάνεια του υποκαταστάτη dppz συγκριτικά με τον phen έχει ως αποτέλεσμα η σταθερά δέσμευσης να αυξάνεται κατά περίπου τρεις τάξεις μεγέθους και η δέσμευση στις αύλακες να καθίσταται πλέον αμελητέα. Η αύξηση στη χημειοφωταύγεια για το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ όταν δεσμεύεται στο DNA είναι 10^4 [75]. Επιπλέον, παρόλο που τα Λ- και Δ- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά ως προς τη σταθερά δέσμευσης [76], οι γεωμετρίες παρεμβολής, τα κβάντα χημειοφωταύγειας και οι χρόνοι ημιζωής παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Ωστόσο, παρόλο το μεγάλο αριθμό των αναφερόμενων μελετών, δεν υπάρχει συμφωνία ως προς ένα πιο λεπτομερές μοντέλο του μηχανισμού δέσμευσης αυτών των παρεμβαλλόμενων μορίων στο DNA [21].

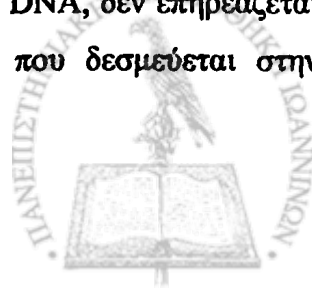
Οι φωτοφυσικές μελέτες δείχνουν ότι όταν δεσμεύονται στο DNA, οι χρόνοι ημιζωής των Λ- και Δ- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ παρουσιάζουν διεκθετική εξασθένιση, η οποία οφείλεται στην παρουσία δύο σωματιδίων που εκπέμπουν, από τα οποία το ένα έχει σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής από το άλλο [76]. Μια ερμηνεία των δεδομένων αυτών από την Barton και τους συνεργάτες της είναι ότι τα σύμπλοκα αυτά παρουσιάζουν δύο τρόπους δέσμευσης [80-83]. Κατά τον ένα τρόπο, ο υποκαταστάτης dppz παρεμβάλλεται με την πλαϊνή του πλευρά, αφήνοντας ένα από τα άζωτα του δακτυλίου προσιτό στο διαλύτη. Σύμφωνα με τον άλλο τρόπο, και τα δύο άζωτα του φαιναζινικού δακτυλίου παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις και είναι απρόσιτα στο διαλύτη, με αποτέλεσμα η διεγερμένη κατάσταση να έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής. Από την άλλη, μια εναλλακτική πρόταση



είναι ότι η διεκθετική εξασθένιση σχετίζεται με την αναλογία συμπλόκου:DNA και την αλληλεπίδραση των συμπλόκων που δεσμεύονται σε κοντινές θέσεις (dye distribution effect), με αποτέλεσμα τα σχετικά απομονωμένα σύμπλοκα που δεσμεύονται στο DNA να είναι πιο προσιτά στο διαλύτη οπότε και έχουν μικρότερο χρόνο ημιζωής σε σύγκριση με τα στενά πακεταρισμένα σύμπλοκα [76].

Ενώ υπήρχε συμφωνία ως προς το γεγονός ότι ο υποκαταστάτης $dppz$ αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις, τα αποτελέσματα υπήρξαν αντικρουόμενα όσον αφορά την αύλακα από την οποία αλληλεπιδρούν τα παρεμβαλλόμενα σύμπλοκα του $Ru(II)$ με τη διπλή έλικα. Στα πρώτα πειράματα NMR που έγιναν, παρατηρήθηκαν διαμοριακά NOE με τα πρωτόνια της μείζονος αύλακος, τα οποία δείχνουν την αλληλεπίδραση του συμπλόκου στη μείζονα αύλακα [84]. Το 1997, ο Tuite και οι συνεργάτες του [85] μέσα από μελέτες γραμμικού διχρωϊσμού πρότειναν ότι η παρεμβολή λαμβάνει χώρα από την ελάσσονα αύλακα. Ανέφεραν ότι κατά τη δέσμευση τόσο του Δ - όσο και του Λ - $[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$ σε T-4 DNA, η χημειοφωταύγεια του $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ δεν ελαττώνεται παρόλο που το T-4 DNA είναι γλυκοζυλιωμένο 100% στην κυτοσίνη στη θέση 5-CH₂-OH στη μείζονα αύλακα, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο ένα σημαντικό στερικό εμπόδιο για τη δέσμευση στην αύλακα αυτή. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στους χρόνους ημιζωής για το T-4 DNA και το DNA από θύμο βοειδούς (calf thymus – CT). Το συμπέρασμα λοιπόν είναι ότι η στερική παρεμπόδιση στη μείζονα αύλακα δεν εμπόδισε τη δέσμευση του συμπλόκου $[Ru(bpy)_2(dppz)]^{2+}$ στο DNA, το οποίο τελικά δεσμεύτηκε με παρεμβολή μέσω της ελάσσονος αύλακος [85].

Για την περαιτέρω διερεύνηση αυτού του θέματος, ο Holmlin και οι συνεργάτες του [86] πραγματοποίησαν πειράματα ανταγωνισμού με τη ντισταμυσίνη, μόριο που δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα και το σύμπλοκο Δ - α - $[Rh((R,R)\text{-}Me_2trien)phi]^{3+}$ ($(R,R)\text{-}Me_2trien = 2R,9R\text{-}διαμινω\text{-}4,7\text{-}διαζαδεκάνιο$), το οποίο παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA από τη μείζονα αύλακα όπως έχει προκύψει τόσο από τη δομή σε διάλυμα [87] αλλά και από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου του με το DNA [88]. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι το Δ - α - $[Rh((R,R)\text{-}Me_2trien)phi]^{3+}$ εκτόπιζε το Δ - $[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$ από την έλικα του DNA. Αντιθέτως, τα πειράματα ανταγωνισμού με τη ντισταμυσίνη έδειξαν ότι η χημειοφωταύγεια του συμπλόκου, όταν αυτό δεσμεύεται σε διάφορες αλληλουχίες του DNA, δεν επηρεάζεται από την παρουσία περίσσειας από το μόριο της ντισταμυσίνης που δεσμεύεται στην



ελάσσονα αύλακα. Επομένως, όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα η έλικα του DNA δεσμεύει ταυτόχρονα το Δ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ και τη ντισταμυσίνη. Επιπλέον, κατά την αλληλεπίδραση του Δ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ με μίγμα 1:1 poly d(AT) και poly d(GC), το 85% του συμπλόκου δεσμεύτηκε στις περιοχές AT τόσο του T-4 DNA όσο και του CT-DNA. Φαίνεται λοιπόν ότι η προτίμηση του Δ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ να παρεμβάλλεται σε περιοχές AT στη μείζονα αύλακα δεν θα μπορούσε να παρεμποδιστεί από τη γλυκοζυλίωση των κυτοσινών στη μείζονα αύλακα.

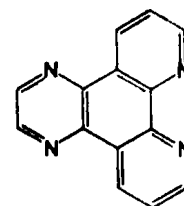
Η μελέτη με NMR της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων Λ - και Δ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ με το εξαμερές d(GTCGAC)₂ συμπλήρωσαν τις μελέτες της χημειοφωταύγειας και επιβεβαίωσαν την παρεμβολή από τη μείζονα αύλακα καθώς και τη συσχέτιση της διεκθετικής εξασθένισης της χημειοφωταύγειας με την ύπαρξη δύο πληθυσμών από διαφορετικές γεωμετρίες παρεμβολής [89]. Επίσης, επιβεβαιώθηκε η εναντιοεκλεκτικότητα της αλληλεπίδρασης του παραπάνω συμπλόκου με το DNA, η οποία πηγάζει από τη διαφορετική συμμετρία των δύο εναντιομερών και έχει ως αποτέλεσμα διαφορετικές γεωμετρίες κατά την παρεμβολή.

Πρόσφατα μελετήθηκαν οι φωτοφυσικές ιδιότητες των Λ - και Δ -[Ru(phen)₂(dppz)]²⁺ κατά την αλληλεπίδρασή τους με το poly[d(A-T)₂] παρουσία του μορίου DAPI (4',6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλιο), ένα φάρμακο το οποίο είναι γνωστό ότι δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα [90]. Διαπιστώθηκε ότι οι φασματοσκοπικές ιδιότητες του [Ru(phen)₂dppz]²⁺-poly[d(A-T)₂] είναι ανεξάρτητες από το αν είναι δεσμευμένο ή όχι το DAPI στην ελάσσονα αύλακα, γεγονός που σημαίνει ότι το σύμπλοκο δεσμεύεται στη μείζονα αύλακα. Από την άλλη, η παρουσία τρίτης αλυσίδας από τη μείζονα αύλακα φαίνεται να οδηγεί τη δέσμευση αυτών των συμπλόκων στην ελάσσονα αύλακα [91]. Καταλήγοντας λοιπόν, φαίνεται ότι τα σύμπλοκα αυτά έχουν τη δυνατότητα της παρεμβολής και από την ελάσσονα αλλά και από τη μείζονα αύλακα όταν δεν υπάρχει κάποιου είδους παρεμπόδιση για αυτή την αλληλεπίδραση τους.

Αν απομακρυνθεί ο τελικός αρωματικός δακτύλιος στον υποκαταστάτη dppz, σχηματίζεται ένα κοντινό ανάλογο του dppz, το δυτυριδο[2,2-d:2',3'-f]κινόξαλίνη (dprq) (σχήμα 5.9). Το [Ru(phen)₂dprq]²⁺ επίσης παρεμβάλλεται στο DNA, αλλά μελέτες NMR παρόμοιες με αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω για το [Ru(phen)₂dppz]²⁺ έδειξαν ότι το [Ru(phen)₂dprq]²⁺ δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα [92-94]. Η σταθερά δέσμευσης του



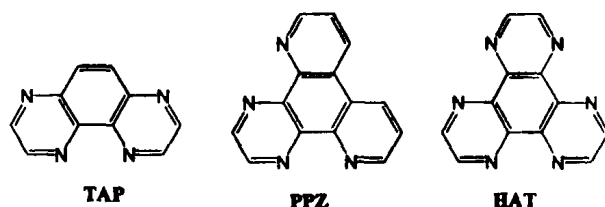
συμπλόκου στο DNA δεν έχει προσδιοριστεί, ούτε επίσης αν το ένα ισομερές προτιμάται έναντι του άλλου. Βέβαια, μελέτες NMR της αλληλεπίδρασης του $[\text{Ru}(\text{dmphen})_2\text{dprq}]^{2+}$, όπου $\text{dmphen} = 2,9\text{-διμεθυλ-}1,10\text{-φαινανθρολίνη}$, με το εξανουκλεοτίδιο $\text{d}(\text{GTCGAC})_2$ έδειξαν ότι παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων G_4A_5 και T_2C_3 της συμπληρωματικής αλυσίδας από την ελάσσονα αύλακα με το Δ -εναντιομερές να εισέρχεται βαθύτερα ανάμεσα στις βάσεις και το Λ -ισομερές να αλληλεπιδρά με μερική παρεμβολή [95].



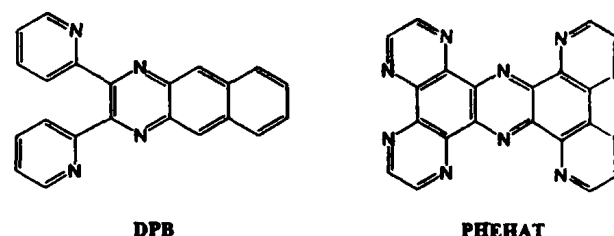
Σχήμα 5.9. Ο υποκαταστάτης dprq .

Από την άλλη, με την προσθήκη μιας κινόνης στο σύστημα των αρωματικών δακτυλίων του dppz , σχηματίζεται ο υποκαταστάτης $\text{qdppz} = \text{ναφθο}[2,3\text{-}\alpha]\text{διπυριδο}[3,2\text{-}h:2',2'\text{-}f]\text{φαιναζίνη-}5,18\text{-διόνη}$, του οποίου το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{qdppz})]^{2+}$ δεν παρουσιάζει χημειοφωταύγεια ούτε σε υδατικό διάλυμα αλλά ούτε παρουσία του DNA παρόλο που δεσμεύεται με παρεμβολή [96]. Η συμπεριφορά αυτού του συμπλόκου οφείλεται στην καταστολή μεταφοράς του ηλεκτρονίου στη διεγερμένη κατάσταση MLCT από την κινόνη.

Άλλα ανάλογα σύμπλοκα με αυτά του Ru(II) με τον υποκαταστάτη dppz , είναι με το 1,4,5,8-тетраазаφαινανθρένιο (tap), 1,4,5,8,9,12-εξααζατριφαινυλένιο (hat) και 1,10-φαινανθρολινο[5,6- b]1,4,5,8,9,12-εξααζατριφαινυλένιο (phehat) (σχήμα 5.10).



Τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν επίσης με το DNA και όπως και τα σύμπλοκα με το dppz παρουσιάζουν μεταβολή των φωτοφυσικών τους ιδιοτήτων κατά τη



δέσμευσή τους στη διπλή έλικα [97]. Έχει βρεθεί ότι διμεταλλικά σύμπλοκα τα οποία

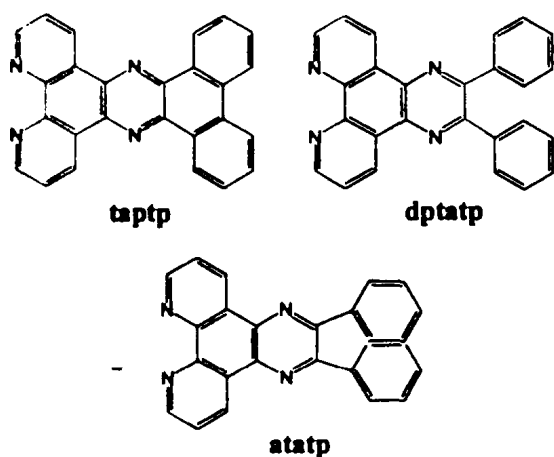
Σχήμα 5.10. Παρεμβαλλόμενοι υποκαταστάτες ανάλογοι του dppz .

γεφυρώνονται από τον υποκαταστάτη 2,3-δισ(2-πυριδυλ)-βενζο[g]κινόξαλίνη (dpb) δεσμεύονται στο DNA μέσω παρεμβολής [98].

Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{phehat}]^{2+}$ βρέθηκε επίσης να έχει ιδιότητες μοριακού διακόπτη φωτός, παρόλο που εμφανίζει πιο ασθενή χημειοφωταύγεια όταν δεσμεύεται σε CT-DNA σε σύγκριση με το $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ [99]. Το $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{hat}]^{2+}$, σε αντίθεση με τα $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ και $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{phehat}]^{2+}$, εμφανίζει χημειοφωταύγεια σε υδατικό διάλυμα,

αλλά αυτή η χημειοφωταύγεια ελάχιστα ενισχύεται παρουσία του DNA [100]. Κάποια από αυτά τα παράγωγα, στην πραγματικότητα, παρουσιάζουν μειωμένη χημειοφωταύγεια όταν δεσμεύονται σε πλούσιο σε GC DNA ως αποτέλεσμα της συμμετοχής του στη μεταφορά ηλεκτρονίων.

Ο L. N. Ji και οι συνεργάτες τους μελέτησαν την επίδραση της επίπεδης διαμόρφωσης ενός αρωματικού συστήματος στη δέσμευση του στο DNA, χρησιμοποιώντας τους



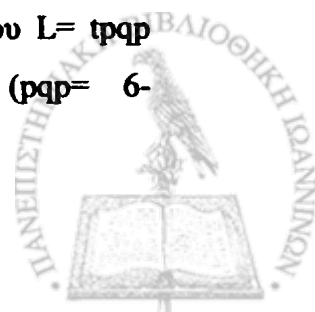
Σχήμα 5.11. Οι υποκαταστάτες taptr, dptatp και atatp.

πολυπυριδυλικούς υποκαταστάτες taptr (4,5,9,18-τετρααζαφαινανθρενο[9,10-*b*] τριφαινύλιο και dptatp (2,3-διφαινυλο-1,4,8,9-τετρααζατριφαινύλιο) (σχήμα 5.11) [101]. Η μόνη διαφορά μεταξύ των taptr και dptatp είναι ότι το πρώτο είναι ένα πλήρως επίπεδο π-σύστημα ενώ το δεύτερο παρεμποδίζεται κατά κάποιο τρόπο στερικά από την επίπεδη διαμόρφωση (σχήμα 5.11). Οι σταθερές δέσμευσης των συμπλόκων

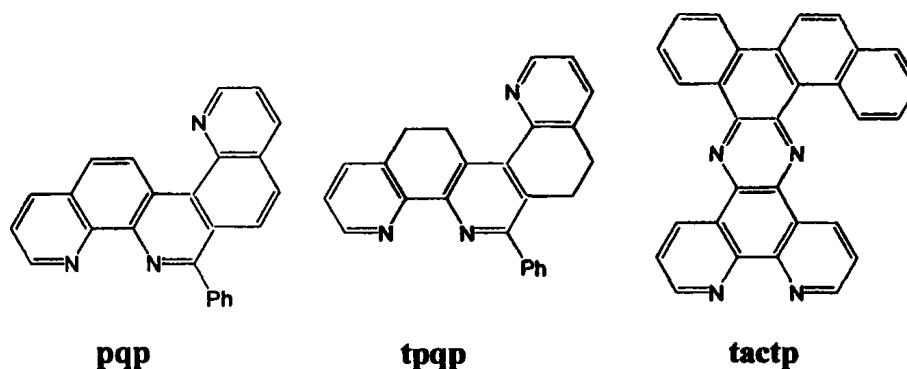
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{taptr})]^{2+}$ και $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dptatp})]^{2+}$ με

CT-DNA βρέθηκαν $1,7 \times 10^5$ και $3,8 \times 10^4$ αντίστοιχα, γεγονός που δείχνει ότι ο πλήρως επίπεδος υποκαταστάτης dptatp οδηγεί σε πιο ισχυρή δέσμευση. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η αντικατάσταση των βοηθητικών υποκαταστατών bpy από phen οδήγησε σε ελάττωση των σταθερών δέσμευσης, λόγω του σχηματισμού ογκωδέστερου συμπλόκου με τον υποκαταστάτη phen [102]. Επίσης, βρέθηκε ότι το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{taptr})]^{2+}$ παρουσιάζει ασήμαντη χημειοφωταύγεια στο νερό και σημαντική χημειοφωταύγεια παρουσία του DNA, συνιστώντας μια πιθανή χρήση του ως ανιχνευτής του DNA [102]. Η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε σύμπλοκα με τον υποκαταστάτη atatp (ακεναφθενο[1,2-*b*]-1,4,8,9-τετρααζατριφαινύλιο) (σχήμα 5.11) του τύπου $[\text{Ru}(\text{L})_2(\text{atatp})]^{2+}$, όπου L = bpy, phen, dmp (2,9-διμεθυλο-1,10-φαινανθρολίνη) [103]. Από τη μελέτη αυτή φάνηκε πόσο σημαντική είναι η συνεισφορά των βοηθητικών υποκαταστατών στον τρόπο δέσμευσης του συμπλόκου στο DNA. Έτσι λοιπόν, τα σύμπλοκα με bpy και phen δεσμεύονται μέσω παρεμβολής του υποκαταστάτη atatp, κάτι που όμως δεν συμβαίνει όταν L = dmp.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα σύμπλοκα του τύπου $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$, όπου L = tqqr (tqqr = 7,8,13,14-τετραϋδρο-6-φαινυλκίνο[8,7-*k*][1,8]φαινανθρολίνη) ή pqr (pqr = 6-



φαινυλκίνο[8,7-*k*][1,8]φαινανθρολίνη) ή tactp (tactp= 4,5,9,18-τετρααζαχρυσενο[9,10-*b*]-τριφαινύλιο), ανάλογα του υποκαταστάτη dppz (σχήμα 5.12). Ενώ, το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pqp})]^{2+}$ δεν παρουσιάζει χημειοφωταύγεια, το $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tpqp})]^{2+}$ παρουσιάζει χημειοφωταύγεια παρουσία και απουσία του DNA και δεσμεύεται κατά προτίμηση σε αλληλουχίες CC με κακό ταίριασμα των βάσεων. Από την άλλη το $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tactp})]^{2+}$ δεσμεύεται επίσης σε αλληλουχίες CC με κακό ταίριασμα των βάσεων και επιπλέον παρουσιάζει αύξηση της χημειοφωταύγειας κατά τη δέσμευση του στο DNA [104].



Σχήμα 5.12. Οι δομές των υποκαταστατών pqp, tpqp και tactp.

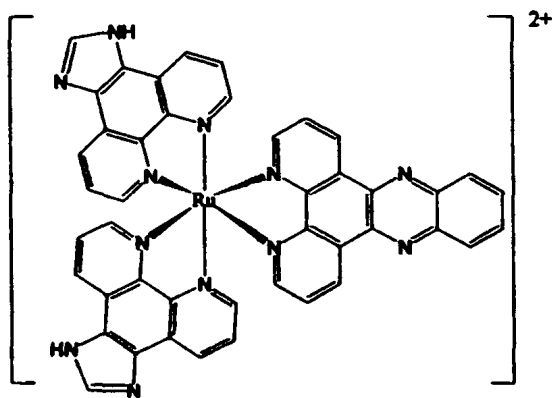
Η επίδραση της παρουσίας υποκαταστάσεων στους δακτυλίους των βοηθητικών υποκαταστατών στον τρόπο δέσμευσης του συμπλόκου στο DNA γίνεται φανερή από τα αποτελέσματα της εργασίας του J.-G. Liu και των συνεργατών του. Αυτοί μελέτησαν την αλληλεπίδραση των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{dmp})_2(\text{dppz})]^{2+}$, όπου dmp= 2,9-διμεθυλ-1,10-φαινανθρολίνη και $[\text{Ru}(\text{dmb})_2(\text{dppz})]^{2+}$, όπου dmb= 4,4'-διμεθυλ-2,2'-διπυριδύλιο με το CT-DNA [105]. Διαπίστωσαν ότι το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{dmp})_2(\text{dppz})]^{2+}$ παρουσιάζει σημαντική μείωση της σταθεράς δέσμευσης σε σύγκριση με το αρχικό σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η υποκατάσταση στις θέσεις 2- και 9- των βοηθητικών υποκαταστατών phen, όπως προκύπτει από την κρυσταλλική δομή, προκαλούν στερικούς περιορισμούς στον πυρήνα του Ru(II) καθώς το σύμπλοκο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Οι μεθυλομάδες πιθανότατα πλησιάζουν στις βάσεις και οι στερικές παρεμποδίσεις που δημιουργούνται εμποδίζουν το σύμπλοκο να παρεμβληθεί αποτελεσματικά. Από την άλλη, η παρουσία υποκαταστάσεων στον υποκαταστάτη bpy στις θέσεις 4 και 4' δεν επηρέασε σημαντικά τη σταθερά δέσμευσης αλλά προκάλεσε αύξηση στη



διαφορά των ταχυτήτων δέσμευσης των εναντιομερών Λ -και Δ -, με το Λ - να δεσμεύεται ταχύτερα από το Δ .

Ο A. Greguric και οι συνεργάτες του μελέτησαν με NMR την αλληλεπίδραση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{dmp})_2(\text{dppz})]^{2+}$ με το εξανουκλεοτίδιο $\text{d}(\text{GTCGAC})_2$ και βρήκαν ότι παρεμβάλλεται από την ελάσσονα αύλακα [106]. Από την άλλη, οι Dupureur και Barton [86] μελέτησαν με NMR την αλληλεπίδραση του $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ με το ίδιο ολιγονουκλεοτίδιο και βρήκαν ότι δεσμεύεται με παρεμβολή στη μείζονα αύλακα του DNA. Από την ερμηνεία του A. Greguric και των συνεργατών του, προκύπτει ότι η διαφορετική αυτή συμπεριφορά των δύο συμπλόκων κατά την αλληλεπίδρασή τους με το DNA δεν οφείλεται σε απευθείας αλληλεπίδραση των μεθυλομάδων με το DNA αλλά η δέσμευση ενός συμπλόκου σε μία αύλακα του DNA κατευθύνεται από το σχήμα του συμπλόκου, το οποίο όπως φαίνεται και από την κρυσταλλική δομή [105] παρουσία των μεθυλομάδων μεταβάλλεται σημαντικά. Πιο συγκεκριμένα, οι δύο υποκαταστάτες dmp παρουσιάζουν κάμψη λόγω στερικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεθυλομάδων και των ατόμων αζώτου των γειτονικών υποκαταστατών, με αποτέλεσμα ο υποκαταστάτης dppz να εισέρχεται τόσο βαθιά ανάμεσα από τις βάσεις ώστε να φτάνει ως την αντίθετη αύλακα.

Η επίδραση των τροποποιήσεων των βοηθητικών υποκαταστατών στον τρόπο δέσμευσης στο DNA καταδεικνύεται περισσότερο από την εργασία του J.-G. Liu και των συνεργατών του. Στην εργασία αυτή, μελέτησαν την αλληλεπίδραση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{IP})_2(\text{dppz})]^{2+}$ (σχήμα 5.13), όπου $\text{IP} = \mu\text{ιδαζολυλ-[4,5-}f\text{]-1,10-φαινανθρολίνη}$, με το DNA [107]. Διαπιστώθηκε σημαντική αύξηση της σταθεράς δέσμευσης σε σύγκριση με το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$, γεγονός που αποδόθηκε στη μεγαλύτερη υδροφοβικότητα του υποκαταστάτη IP σε σχέση με τον υποκαταστάτη bpy .



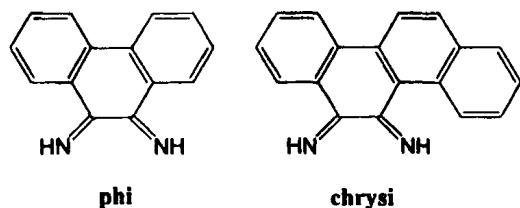
Σχήμα 5.13. Η δομή του $[\text{Ru}(\text{IP})_2(\text{dppz})]^{2+}$.

5.2.2.3. Σύμπλοκα με τον υποκαταστάτη phi .

Ο υποκαταστάτης 9,10-φαινανθρεκινόνη διίμίνη (phi) (σχήμα 5.14) παρέχει διαφορετικές δυνατότητες και περιορισμούς. Όταν εντάσσεται σε ένα αδρανές μέταλλο



μετάπτωσης, ο υποκαταστάτης *phi* προβάλλει μακριά από το μεταλλικό κέντρο επειδή χρησιμοποιεί τις ιμίνες για να ενταχθεί χηλικά. Έτσι, όπως και ο *dprrz*, ο *phi* αποτελεί επίσης ένα παρεμβαλλόμενο αρωματικό σύστημα που απομακρύνεται από το μεταλλικό κέντρο,



Σχήμα 5.14. Οι υποκαταστάτες *phi* και *chrysi*.

όμως η γεωμετρία του *phi* είναι τέτοια ώστε να παρέχει εκτεταμένη αρωματική δομή που διασχίζει τις βάσεις. Στην πραγματικότητα, ο *phi* σχεδιάστηκε αρχικά σε μια προσπάθεια να ταιριάξει η θέση των αρωματικών δακτυλίων του με αυτή των ζευγών βάσεων [108]. Οι μη παρεμβαλλόμενοι βοηθητικοί υποκαταστάτες (L), σε σύμπλοκα του τύπου $[\text{RuL}_2(\text{phi})]^{2+}$ (όπου L=διδοντικός υποκαταστάτης), έρχονται σε τέτοια θέση έναντι των ζευγών βάσεων ώστε να μπορούν να πραγματοποιηθούν ειδικές μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομάδων των βοηθητικών υποκαταστατών και την αύλακα του DNA.

Η κρυσταλλική δομή του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phi})]^{2+}$ [109] δείχνει εκτεταμένη αρωματική επιφάνεια προερχόμενη από τον υποκαταστάτη *phi*. Παρατηρείται η ύπαρξη σημαντικού back-bonding μεταξύ του *phi* και του μεταλλικού κέντρου, σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τους πολυπυριδυλικούς υποκαταστάτες. Τα άτομα αζώτου έλκονται πολύ κοντά στο μεταλλικό κέντρο. Λόγω της σημαντικής ηλεκτρονιακής αλληλεπίδρασης του υποκαταστάτη *phi* με το μεταλλικό κέντρο, οι υπόλοιποι υποκαταστάτες τραβιούνται προς τα πίσω δηλ. ελαττώνεται η γωνία μεταξύ των υποκαταστατών *bpy*, με αποτέλεσμα ο *phi* να εκτείνεται μακριά από το κέντρο του μετάλλου. Η ασυνήθιστα μεγάλη δυνατότητα του υποκαταστάτη *phi* να δρα ως π-αποδέκτης είχε προβλεφθεί και από κβαντομηχανικούς υπολογισμούς [110].

Η αυξημένη αυτή ικανότητα π-αποδέκτη του υποκαταστάτη *phi* σε σύγκριση με τους πολυπυριδυλικούς υποκαταστάτες είναι φανερή και από την ταινία μεταφοράς φορτίου των συμπλόκων με το Ru(II). Οι ταινίες MLCT μετατοπίζονται σε χαμηλότερες ενέργειες για τα σύμπλοκα του Ru(II) με τον *phi*. Αυτό που εκπλήσσει στα σύμπλοκα αυτά είναι ότι οι καταστάσεις μεταφοράς φορτίου έχουν χαρακτήρα απεντοπισμού συγκριτικά με την εντοπισμένη μεταφορά φορτίου που παρατηρείται συνήθως. Πιστεύεται ότι μετάπτωση MLCT στα σύμπλοκα του Ru(II) με πολυπυριδυλικούς υποκαταστάτες είναι εντοπισμένη στον κάθε υποκαταστάτη και δεν θεωρείται απεντοπισμένη σε όλο το σύστημα των

υποκαταστατών. Συγκεκριμένα, φασματοσκοπικές μελέτες Raman συντονισμού της διεγερμένης κατάστασης [111-113] έδειξαν ότι το $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ εμφανίζει φάσμα που αντιστοιχεί στο $[\text{Ru}(\text{III})(\text{bpy})_2(\text{bpy})]^{2+}$. Ως αποτέλεσμα αυτού του εντοπισμένου χαρακτήρα, οι μεταπτώσεις MLCT των πολυπυριδυλικών συμπλόκων του Ru(II) δεν μετατοπίζονται προς υψηλότερα μήκη κύματος με αύξηση των πολυπυριδυλικών υποκαταστατών στη σφαίρα ένταξης. Γενικά, μικρές διαφορές παρατηρούνται στα ηλεκτρονικά φάσματα σε μια σειρά μονο-, δι- και τρις(δυπυριδυλο)- υποκατεστημένα σύμπλοκα του Ru(II) όπου οι άλλοι υποκαταστάτες έχουν άτομα αζώτου ως δότες. Αντίθετα, στην περίπτωση σταδιακής αύξησης της υποκατάστασης από υποκαταστάτες rhi , παρατηρείται σημαντική μετατόπιση της ταινίας MLCT προς υψηλότερα μήκη κύματος, ενδεικτική του χαρακτήρα απεντοπισμού στα σύμπλοκα αυτά. Επιπλέον, σε αντίθεση με τα πολυπυριδυλικά σύμπλοκα του Ru(II), στα σύμπλοκα με τον rhi ο χρόνος ημιζωής της διεγερμένης κατάστασης είναι πολύ μικρός με αποτέλεσμα να μην παρατηρείται χημειοφωταύγεια [114]. Παρόλη την απουσία χημειοφωταύγειας, τα σύμπλοκα του Ru(II) με τον rhi έχουν τη δυνατότητα εφαρμογών. Τα σύμπλοκα αυτά δεσμεύονται στο DNA και πιθανότατα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στην ηλεκτρονική μικροσκοπία και η scanning tunneling μικροσκοπία. Η μετάπτωση MLCT του $[\text{Ru}(\text{rhi})_2(\text{bpy})]^{2+}$ είναι από τις πιο έντονες που παρατηρούνται για ένα σύμπλοκο Ru(II) με συντελεστή μοριακής απορρόφησης $73500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ στα 572 nm, το σύμπλοκο αυτό έχει έντονο μπλε χρώμα ορατό σε επίπεδα μM . Η ταινία MLCT του $[\text{Ru}(\text{rhi})_3]^{2+}$ στα 660 nm αποτελεί τη χαμηλότερη μετάπτωση που παρατηρείται για μονοπυρηνικό σύμπλοκο του Ru(II). Συνεπώς, τα σύμπλοκα αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για βιολογικές χρώσεις [109].

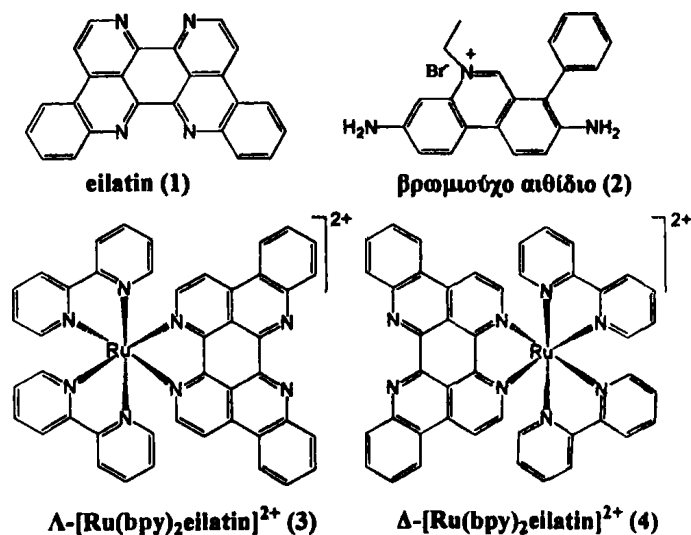
Τα σύμπλοκα του rhi διαφέρουν επίσης από τα σύμπλοκα του drpz όσον αφορά τη φωτοχημεία τους κι επομένως τις δυνατότητες χρήσης τους. Τα σύμπλοκα του rhi τόσο του Rh(III) όσο και του Ru(II) δεν εμφανίζουν εκπομπή προκαλούμενη από το φως [39]. Τα σύμπλοκα του rhi με το Ru(II) είναι φωτοσταθερά και δεν προκαλούν κόψιμο του DNA σε αντίθεση με τα σύμπλοκα του rhi με Rh(III) τα οποία παρουσιάζουν πλούσια φωτοχημεία. Επίσης, τα σύμπλοκα του Ru(II) με τον υποκαταστάτη chrysi , ένα ανάλογο του υποκαταστάτη rhi (σχήμα 5.14), δεν εμφανίζουν χημειοφωταύγεια. Κυρίως, λοιπόν, έχουν μελετηθεί σύμπλοκα του chrysi με Rh(III).



Έχει αναφερθεί ότι τα σύμπλοκα που περιέχουν τον υποκαταστάτη *phi* παρεμβάλλονται κυρίως από τη μείζονα αύλακα. Αυτό που έχει επικρατήσει είναι ότι τα Δ-εναντιομερή προτιμούν την αλληλουχία GC/CG και αυτό έχει επιβεβαιωθεί τόσο από μελέτες ^1H NMR αλλά και από τον προσδιορισμό της δομής με NMR ενός συμπλόκου του Rh(III) δεσμευμένο σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο [87] καθώς και με τον προσδιορισμό της δομής αυτής και με ακτίνες X [88]. Τα αποτελέσματα για τα Λ-εναντιομερή ποικίλλουν και περιλαμβάνουν παρεμβολή στη θέση TG [115], στη θέση TA [116] και TX (όπου X=οποιαδήποτε βάση από τις A, C, G, T) [117] καθώς και παρεμβολή ανεξαρτήτου αλληλουχίας ανάλογα με τους βοηθητικούς υποκαταστάτες [115].

5.2.2.4. Σύμπλοκα με τον υποκαταστάτη *eilatin*.

Το *eilatin* είναι ένα σχεδόν επίπεδο, επτακυκλικό αλκαλοειδές το οποίο απομονώθηκε από ένα θαλάσσιο ζώο του είδους *Eudistoma* και είναι γνωστό για την κυτταροτοξική δράση καθώς και για τη δράση του κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [118]. Τα σύμπλοκα του Ru(II) με τον *eilatin*, Λ- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{eilatin})]^{2+}$ και Δ- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{eilatin})]^{2+}$ (σχήμα 5.15) βρέθηκε ότι αναστέλλουν την αντιγραφή του ιού HIV σε κυτταρικές καλλιέργειες [118]. Η σύγκρισή τους με παρόμοια σύμπλοκα με διπυριδυλικούς υποκαταστάτες αποκαλύπτει ότι ο υποκαταστάτης *eilatin* είναι απαραίτητος και για τη δέσμευση στα νουκλεϊνικά οξέα αλλά και για την αντιϊκή δράση [119]. Επιπλέον, από την εργασία του N.



Σχήμα 5.15. Το *eilatin* (1), το βρωμιούχο αιθίδιο (2) και τα εναντιομερή Λ και Δ σύμπλοκα του Ru(II) με το *eilatin* (3 και 4 αντίστοιχα).

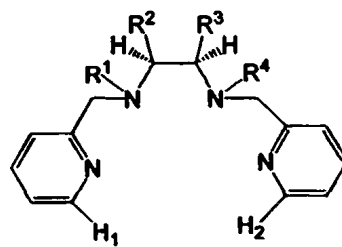
W. Luedtke και των συνεργατών του [118] κατά την οποία συγκρίνεται η αλληλεπίδραση με DNA και RNA των παραπάνω συμπλόκων με το *eilatin* και το βρωμιούχο αιθίδιο (σχήμα 5.15), προκύπτει ότι η ειδικότητα του *eilatin* για δέσμευση στα νουκλεϊνικά οξέα μεταβάλλεται όταν αυτό ενσωματώνεται σε ένα μεταλλικό σύμπλοκο. Συγκεκριμένα, το *eilatin* δεσμεύεται πιο ισχυρά σε όλες τις διπλές έλικες DNA και RNA συγκριτικά με τα

σύμπλοκα Λ^- και Δ^- -[Ru(bpy)₂(eilatin)]²⁺. Από την άλλη, τα σύμπλοκα Λ^- και Δ^- -[Ru(bpy)₂(eilatin)]²⁺ δεσμεύονται πιο ισχυρά σε poly d(AT) – poly d(AT) συγκριτικά με το poly d(A) – poly d(T) ενώ για το eilatin ισχύει το αντίστροφο. Όσον αφορά την εναντιοεκλεκτικότητα κατά τη δέσμευση των Λ^- και Δ^- -[Ru(bpy)₂(eilatin)]²⁺ στο DNA, υπάρχει σαφής προτίμηση για το Λ^- -εναντιομερές από όλες τις διπλές έλικες DNA που μελετήθηκαν [119].

5.2.3. Σύμπλοκα του Ru(II) με ασύμμετρους υποκαταστάτες.

5.2.3.1. Σύμπλοκα με παράγωγα του υποκαταστάτη *picen*.

Η ικανότητα χειρικών συμπλόκων μετάλλων με υποκαταστάτες που φέρουν τελικές α-πυριδυλικές ομάδες να αναγνωρίζουν το DNA, έστρεψε την προσοχή των ερευνητών προς τον τετραδοντικό υποκαταστάτη *picen* (1,6-δι(2-πυριδυλ)-2,5-διαζαεξάνιο) (σχήμα 5.16, R¹, R², R³, R⁴=H) [120]. Με τη χρήση διαφορετικών υποκαταστάσεων στα κεντρικά άτομα αζώτου ή στους άνθρακες μπορεί κανείς να μελετήσει πως μεταβάλλεται η συμπεριφορά του υποκαταστάτη ως προς την ένταξη αλλά και την αλληλεπίδραση με το DNA. Σύμφωνα με την J. R. Aldrich-Wright και τους συνεργάτες της, τα σύμπλοκα του τύπου

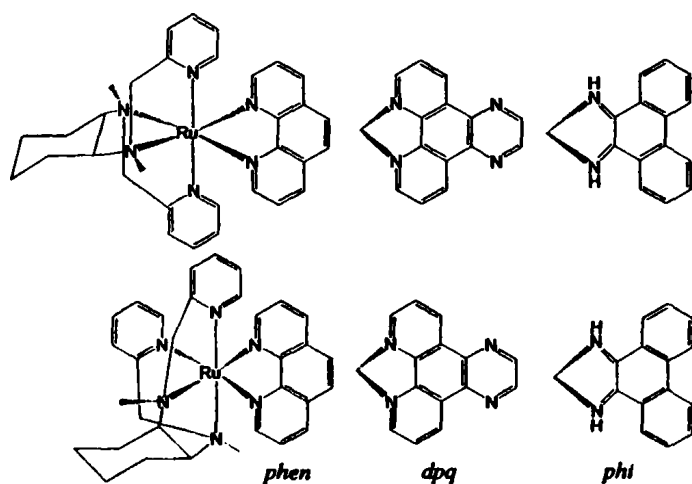


Σχήμα 5.16. Ο υποκαταστάτης *picen* (R¹, R², R³, R⁴=H).

[Ru(picen*)(διδοντικός υποκαταστάτης)]²⁺ (όπου *picen**=παράγωγα του *picen*) παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα τρις-χηλικά σύμπλοκα του τύπου [Ru(διϊμίνη)₂(διδοντικός υποκαταστάτης)]²⁺ (όπου διϊμίνη=π.χ. bpy, phen κ.τ.λ.) σχετικά με την αναγνώριση του DNA [120]. Έτσι, υποστηρίζεται ότι υπάρχει μεγαλύτερη ευχέρεια στο σχεδιασμό και συνεπώς καλύτερος έλεγχος της χειρικότητας αλλά και εύκολη εισαγωγή ογκωδών υποκαταστάσεων και δευτερευόντων θέσεων δέσμευσης. Επιπλέον, (1) δεδομένου ότι περιέχουν μόνο έναν παρεμβalλόμενο διδοντικό υποκαταστάτη, δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ως προς ποιο τμήμα του μορίου παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις, (2) η εγγενής χειρικότητά τους, η οποία καθορίζεται από τον σχεδιασμό του τετραδοντικού υποκαταστάτη (*vide supra*) παρέχει οπτικώς καθαρά σύμπλοκα τα οποία δεν υφίστανται ρακεμοποίηση ως προς το μεταλλικό κέντρο και συνεπώς δεν χρειάζεται ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού εναντιομερών, (3) ο τετραδοντικός υποκαταστάτης είναι μη αρωματικός, με αποτέλεσμα τα σήματα NMR των πρωτονίων του να εμφανίζουν σημαντική διασπορά η

οποία διευκολύνει τις μελέτες αλληλεπίδρασης με ολιγονουκλετίδια και (4) η ύπαρξη των διαστερομερών *cis*-α και *cis*-β δίνει την ευκαιρία μελέτης της επίδρασης του σχήματος του μορίου στην αλληλεπίδραση με τα νουκλεϊνικά οξέα. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν η μελέτη συμπλόκων του Ru(II) με τον υποκαταστάτη R^*,R^* -picchxnMe₂, παράγωγο του picen, παραδείγματα των οποίων περιγράφονται παρακάτω.

Στα σύμπλοκα με τύπο $[Ru(R^*,R^*\text{-picchxnMe}_2)(\text{διδοντικός υποκαταστάτης})]^{2+}$, ο τετραδοντικός υποκαταστάτης $R^*,R^*\text{-picchxnMe}_2$ [(1*R**,2*R**)-N,N'-διμεθυλ-N,N'-δισ(2-πικολουλ)-1,2-διαμινοκυκλοεξάνιο] καθορίζει τη χειρικότητα του κατιόντος και το σχήμα του ενώ ο διδοντικός υποκαταστάτης είναι ο εξεταζόμενος για παρεμβολή υποκαταστάτης [120]. Ένας τετραδοντικός υποκαταστάτης αυτού του τύπου σχηματίζει δύο στερεοϊσομερή κατά την ένταξή του στο κέντρο του Ru(II), τα οποία ονομάζονται *cis*-α και *cis*-β (σχήμα 5.17). Το συμμετρικό *cis*-α έχει άξονα συμμετρίας C₂ ενώ το ασύμμετρο *cis*-β έχει συμμετρία C₁. Σε αντίθεση με τα σύμπλοκα $[Ru(\text{διδοντικός υποκαταστάτης})_3]^{2+}$, στα μικτά σύμπλοκα αυτού του τύπου αποφεύγεται η παρατήρηση του μέσου όρου που προκύπτει από την ύπαρξη τριών δυνατών τρόπων δέσμησης. Από τη μελέτη NMR του συμπλόκου $\Delta\text{-cis-}\alpha\text{-}[Ru(RR\text{-picchxnMe}_2)(\text{phen})]^{2+}$ με τις αυτοσυμπληρούμενες διπλές έλικες $[d(\text{CGCGATCGCG})_2]$ και $[d(\text{ATATCGATAT})_2]$ προέκυψε ότι το παραπάνω σύμπλοκο δεσμεύεται εκλεκτικά στις αλληλουχίες AT και ο κύριος δεσμευόμενος υποκαταστάτης είναι το phen. Η δέσμευση πραγματοποιείται χωρίς παρεμβολή στην ελάσσονα αύλακα [121]. Αυτή η μελέτη αποτελεί ένα παράδειγμα στο πως μπορεί να διασαφηνιστεί ο τρόπος δέσμησης ενός υποκαταστάτη, όπως το πολυσυζητημένο phen.



Σχήμα 5.17. Δομή των (Α) $\Delta\text{-cis-}\alpha$ και (Β) $\Delta\text{-cis-}\beta\text{-}[Ru(R,R\text{-picchxnMe}_2)(L)]^{2+}$, όπου $L=\text{phen}$, dpq ή phi .

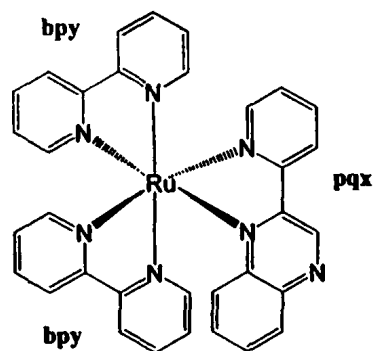
Η Ε. Μ. Proudfoot και οι συνεργάτες της μελέτησαν με φασματοσκοπία NMR την αλληλεπίδραση των κατιόντων $\Delta\text{-cis-}\alpha$ - και $\Delta\text{-cis-}\beta\text{-}[Ru(RR\text{-picchxnMe}_2)(L)]^{2+}$, όπου $L=\text{phen}$, dpq ή phi , με τις διπλές έλικες των ολιγονουκλεοτιδίων $[d(\text{CGCGATCGCG})_2]$ και $[d(\text{ATATCGATAT})_2]$ (σχήμα 5.17)

[122]. Τα α- και β-ισομερή

παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά όταν $L = \text{rhen}$, με το $\alpha\text{-rhen}$ να δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα κατά προτίμηση σε AT, TA και GA αλληλουχίες ενώ το $\beta\text{-rhen}$ δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με καμία από τις αύλακες αλλά αλληλεπιδρά κυρίως με τα άκρα του DNA. Το $\alpha\text{-drq}$ σύμπλοκο παρεμβάλλεται στην ελάσσονα αύλακα κυρίως στην GA αλληλουχία. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα $\alpha\text{-}$ και $\beta\text{-rhi}$ δεν εμφανίζουν διαφορές, παρεμβάλλονται από τη μείζονα αύλακα κατά προτίμηση σε AT/TA αλληλουχίες. Η έλλειψη διάκρισης ανάμεσα στα $\alpha\text{-}$ και $\beta\text{-}$ ισομερή αποδίδεται στο γεγονός ότι ο υποκαταστάτης rhi είναι μεγάλος συγκριτικά με τους rhen και drq και συνεπώς κρατάει σε απόσταση τον ογκώδη υποκαταστάτη RR-picchxnMe_2 ο οποίος πιθανότατα να παίζει πιο καθοριστικό ρόλο λόγω στερικών κυρίως επιδράσεων στην περίπτωση των rhen και drq .

5.2.3.2. Σύμπλοκα του Ru(II) με παράγωγα της κινολίνης.

Από τα παράγωγα της κινολίνης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο υποκαταστάτης $\text{pqx} = 2\text{-(2'-πυριδυλ)κινολίνη}$, ο οποίος προσομοιάζει στον υποκαταστάτη bpy ενώ ταυτόχρονα η ασύμμετρη φύση του άρει τη μαγνητική ισοδυναμία των δύο υποκαταστατών bpy σε σύμπλοκα του τύπου $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pqx})]^{2+}$ (σχήμα 5.18) επιτρέποντας κατ' αυτό τον τρόπο την πιο διεξοδική μελέτη μέσω φασματοσκοπίας NMR της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων αυτών με το DNA. Μελέτες φασματοσκοπίας NMR της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων $\Lambda\text{-}$ και $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pqx})]^{2+}$ με το ολιγονουκλεοτίδιο $\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ [123] έδειξαν ότι και τα δύο σύμπλοκα δεσμεύονται στη μείζονα αύλακα του DNA. Επιπλέον, παρόλο που και τα δύο εναντιομερή δεσμεύονται στην ίδια θέση της αλληλουχίας, T_8C_9 , φαίνεται να υιοθετούν διαφορετικούς προσανατολισμούς με τους υποκαταστάτες pqx και bpy να κατευθύνονται προς το εσωτερικό της αύλακας στην περίπτωση του $\Delta\text{-εναντιομερούς}$ ενώ το $\Lambda\text{-εναντιομερές}$ δεσμεύεται στην αύλακα μέσω του υποκαταστάτη bpy με τον pqx να κατευθύνονται εκτός της αύλακας του DNA.



Σχήμα 5.18. Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pqx})]^{2+}$.

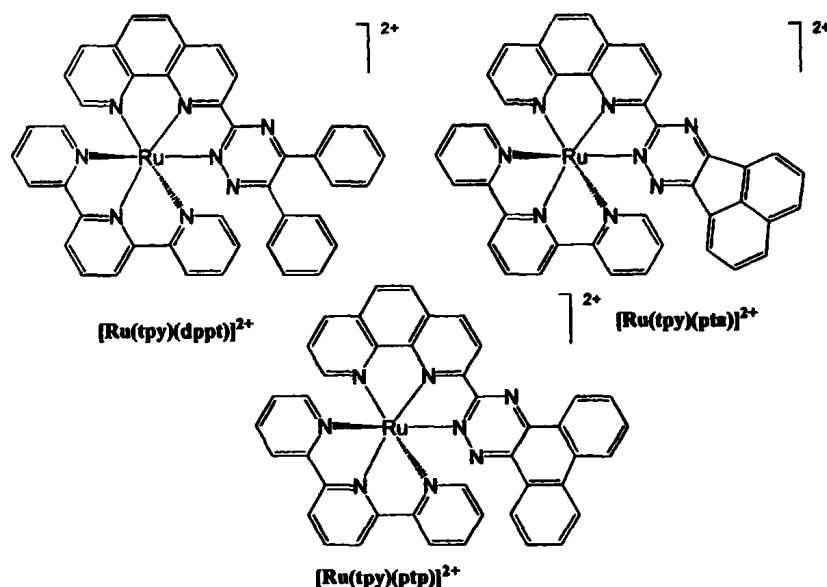
5.2.3.3. Σύμπλοκα του Ru(II) με διάφορους άλλους ασύμμετρους υποκαταστάτες.



Η διερεύνηση της επίδρασης του σχήματος του συμπλόκου και της επιτεδότητας των υποκαταστατών οδήγησε στη μελέτη της αλληλεπίδρασης με το DNA συμπλόκων με τριδοντικούς αρωματικούς υποκαταστάτες. Ο H. Chao και οι συνεργάτες του [124] μελέτησαν τη σειρά των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppt})]^{2+}$, ($\text{tpy}=2,2':6',2''\text{-τερπυριδίνη}$, $\text{dppt}=3\text{-}(1,10\text{-φαινανθρολιν-2-υλ})\text{-5,6-διφαινυλ-as-τριαζίνη}$),

$[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{pta})]^{2+}$ ($\text{pta}=3\text{-}(1,10\text{-φαινανθρολιν-2-υλ})\text{-as-τριαζινο}[5,6\text{-f}]\text{ακεναφθυλένιο}$)

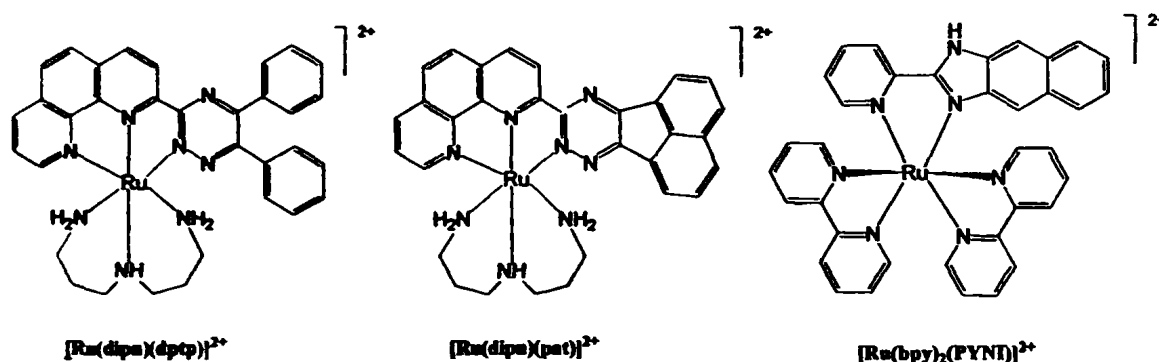
και $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{ptp})]^{2+}$ ($\text{ptp}=3\text{-}(1,10\text{-φαινανθρολιν-2-υλ})\text{-as-τριαζινο}[5,6\text{-f}]\text{-φαινανθρένιο}$) (σχήμα 5.19) με φασματοσκοπικές τεχνικές και μετρήσεις ιξώδους. Από τα αποτελέσματά τους προκύπτει ότι το πρώτο σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το DNA μέσω μερικής παρεμβολής ενώ τα άλλα δύο αλληλεπιδρούν μέσω κλασικής παρεμβολής. Επίσης, η σειρά των σταθερών δέσμευσης αυξάνεται με την αύξηση της επιτεδότητας του παρεμβαλλόμενου υποκαταστάτη και είναι η εξής: $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{dppt})]^{2+} < [\text{Ru}(\text{tpy})(\text{pta})]^{2+} < [\text{Ru}(\text{tpy})(\text{ptp})]^{2+}$.



Σχήμα 5.19. Σύμπλοκα του Ru(II) με τους ασύμμετρους υποκαταστάτες dppt , pta και ptp [124].

Δύο άλλοι νέοι ασύμμετροι υποκαταστάτες συγκρίνονται στην εργασία του X. L. Hong και των συνεργατών του [125] στα σύμπλοκα $[\text{Ru}(\text{dipn})(\text{dptp})]^{2+}$ ($\text{dipn}=\text{N-(3-αμινοπροπυλ)προπανο-1,3-διαμίνη}$, $\text{dptp}=2\text{-(5,6-διαφαινυλ-1,2,4-τριαζιν-3-υλ)-1,10-φαινανθρολίνη}$) και $[\text{Ru}(\text{dipn})(\text{pat})]^{2+}$ ($\text{pat}=9\text{-(1,10-φαινανθρολιν-2-υλ)ακεναφθο}[1,2\text{-e}][1,2,4]\text{τριαζίνη}$) (σχήμα 5.20). Το πρώτο σύμπλοκο παρεμβάλλεται μερικώς ανάμεσα στις βάσεις σε αντίθεση με το δεύτερο που παρεμβάλλεται κανονικά ανάμεσα στις βάσεις και

εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης στο DNA. Υπολογιστικές μελέτες δείχνουν ότι ο υποκαταστάτης *rac* παρουσιάζει μεγαλύτερη επιπεδότητα από τον *dpir* με αποτέλεσμα να μπορεί να παρεμβάλλεται χωρίς στερικές παρεμποδίσεις. Τέλος, ο ασύμμετρος υποκαταστάτης *PYNI* (*PYNI*=2-(2'-πυριδυλ)ναφθοιμιδαζόλιο) στο σύμπλοκο $[Ru(bpy)_2(PYNI)]^{2+}$ (σχήμα 5.20) παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA ενώ ακτινοβόληση του συμπλόκου αυτού οδηγεί σε κόψιμο του πλασμιδίου pBR 322 [126].



Σχήμα 5.20. Σύμπλοκα του $Ru(II)$ με τους υποκαταστάτες *dipr* και *PYNI* [125-126].

5.2.4. Διμεταλλικά σύμπλοκα του $Ru(II)$.

Οι αλληλεπιδράσεις των μονομερών χαρακτηρίζονται από ασθενή δέσμευση ($K_b \approx 10^4$ - $10^6 M^{-1}$ ανάλογα με τον παρεμβαλλόμενο υποκαταστάτη) και αντικαθίστανται εύκολα από το DNA σε ιονική ισχύ πολύ μικρότερη από τις συνθήκες *in vivo*. Επίσης, τα μονομερή σύμπλοκα μετάλλων είναι μικρά σε μέγεθος και δεσμεύονται κατά μήκος 1-2 ζεύγη βάσεων. Αυτά αποτελούν σημαντικά μειονεκτήματα, δεδομένου ότι η αναγνώριση 8-10 ζευγών βάσεων είναι απαραίτητη για να προσεγγίσουν την ειδικότητα που εμφανίζει μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο DNA. Επομένως, η ανάγκη για σύνθεση συμπλόκων, τα οποία δεσμεύονται πιο ισχυρά και με μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στο DNA οδήγησε στη σύνθεση διπυρηνικών συμπλόκων. Πέρα από την ισχυρότερη δέσμευση στο DNA, στα διπυρηνικά σύμπλοκα υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός στερεοϊσομερών και επομένως περισσότερες δυνατότητες στο σχεδιασμό πιο εκλεκτικών συμπλόκων που δεσμεύονται στο DNA. Μέχρι σήμερα, έχει συντεθεί περιορισμένος αριθμός διπυρηνικών συμπλόκων του $Ru(II)$ [127-147]. Αυτά μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, (i) αυτά που τα δύο μεταλλικά κέντρα συνδέονται μέσω ενός γεφυρωμένου υποκαταστάτη και (ii) αυτά στα οποία η σύνδεση των μεταλλικών κέντρων γίνεται μέσω συνδετικού μορίου (linker).



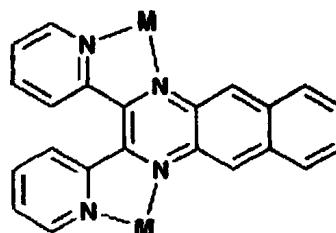
5.2.4.1. Διμεταλλικά σύμπλοκα του Ru(II) με γεφυροποιούς υποκαταστάτες.

Το 1993, ο Carlson και οι συνεργάτες του [127] ανέφεραν τη σύνθεση των διμεταλλικών συμπλόκων

$[\{Ru(NH_3)_4\}_2(dpb)]^{4+}$ ($dpb=2,3$ -δισ(2-πυριδυλ)βενζο[g]κινόξαλίνη) και

$[\{Ru(bpy)_2\}_2(dpb)]^{4+}$ (σχήμα 5.21), τα οποία περιέχουν έναν υποκαταστάτη που

έχει τη δυνατότητα παρεμβολής και είναι τοποθετημένος κάθετα στον άξονα που



$M = [Ru(NH_3)_4]^{2+}$

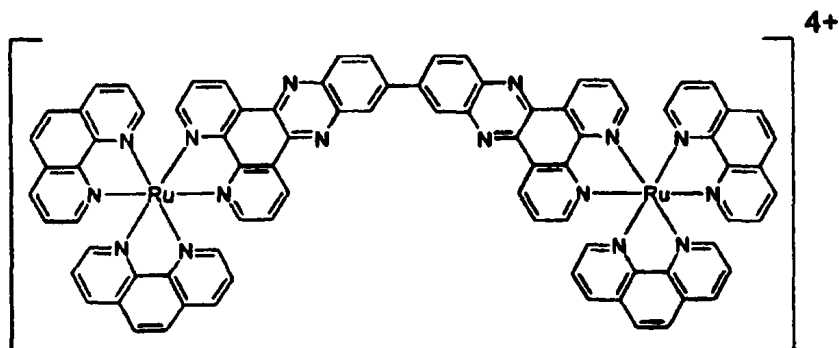
$M = [Ru(bpy)_2]^{2+}$

Σχήμα 5.21. Δομή των συμπλόκων $[\{Ru(NH_3)_4\}_2(dpb)]^{4+}$ και $[\{Ru(bpy)_2\}_2(dpb)]^{4+}$.

ενώνει τα δύο μεταλλικά κέντρα. Βρέθηκε ότι το $[\{Ru(NH_3)_4\}_2(dpb)]^{4+}$ δεσμεύεται στο CT-DNA με σταθερά δέσμευσης παρόμοια με το σύμπλοκο $[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$, παρόλο που η θέση δέσμευσης είναι πολύ μεγαλύτερη. Αντιθέτως, το $[\{Ru(bpy)_2\}_2(dpb)]^{4+}$ δεσμεύεται στο DNA ασθενώς έως και καθόλου, γεγονός που ερμηνεύτηκε με βάση τις στεरिकές αλληλεπιδράσεις των βοηθητικών υποκαταστατών. Ενώ οι υποκαταστάτες αμμωνίας είναι επαρκώς μικροί ώστε να ταιριάζουν στην αύλακα κατά την παρεμβολή του γεφυρωμένου υποκαταστάτη, οι υποκαταστάτες bpy είναι αρκετά μεγάλοι ώστε να παρεμποδίζουν σημαντικά την αλληλεπίδραση του βενζο[g]-κινόξαλινικού τμήματος.

Οι Lincoln και Norden αναφέρουν ένα νέο διμερές σύμπλοκο, το οποίο βασίζεται σε μονάδες dppz που συνδέονται ομοιοπολικά (σχήμα 5.22) [133, 142]. Απομονώθηκαν τόσο η ΔΔ όσο και η ΛΛ μορφή. Μελέτες ανταγωνισμού και οπτικής φασματοσκοπίας έδειξαν ότι ενώ το σύστημα αυτό

δεσμεύεται ισχυρά στο DNA ($K_b \approx 10^{12} M^{-1}$), η αλληλεπίδραση δεν γίνεται μέσω παρεμβολής ενώ η γεωμετρία των συμπλόκων ΛΛ και ΔΔ όταν $L=bpy$ είναι παρόμοια. Ωστόσο, τα ΔΔ και ΛΛ ισομερή, όταν

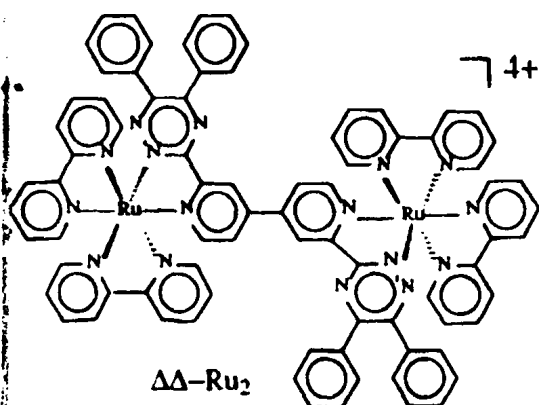


Σχήμα 5.22. Δομή του συμπλόκου $[\mu-(1,1'-bidppz)(phen)_2Ru_2]^{4+}$.

$L=phen$ παρουσιάζουν εντελώς διαφορετική συμπεριφορά. Αρχικά, για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων θεωρήθηκε ότι ο υποκαταστάτης $bi(dppz)$ δεσμεύεται στο DNA μέσω της

κοίλης επιφάνειας του και ότι για το $[\mu-(11,11'\text{-bidppz})(\text{bpy})_4\text{Ru}_2]^{4+}$ ($11,11'\text{-bidppz} = 11,11'\text{-δισ(δυτυριδο[3,2-a:2',3'-c]φαιναζινυλ)}$) και το $\Lambda\Lambda\text{-}[\mu-(11,11'\text{-bidppz})(\text{phen})_4\text{Ru}_2]^{4+}$, μία μονάδα $[\text{RuL}_2]^{2+}$ είναι τοποθετημένη σε κάθε αύλακα. Αντίθετα, για το $\Delta\Delta\text{-}[\mu-(11,11'\text{-bidppz})(\text{phen})_4\text{Ru}_2]^{4+}$ προτάθηκε ότι οι μεταλλικές μονάδες βρίσκονται στην ίδια αύλακα [133]. Αργότερα, όμως, παρατηρήθηκε ότι το $\Delta\Delta\text{-}[\mu-(11,11'\text{-bidppz})(\text{phen})_4\text{Ru}_2]^{4+}$ μεταβάλλει μέσω αργής κινητικής τον τρόπο δέσμευσης του στο DNA από δέσμευση στην αύλακα σε παρεμβολή, η οποία πραγματοποιείται μέσω διάσχισης μίας από τις μονάδες $[\text{Ru}(\text{phen})_2]^{2+}$ μέσω της διπλής έλικας του DNA. Έτσι, με αυτό τον τρόπο, ένας από τους γεφυρωμένους υποκαταστάτες dppz παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA αφήνοντας ένα μεταλλικό κέντρο σε κάθε αύλακα [142]. Νεότερη μελέτη των παραπάνω συμπλόκων κατέληξε στο ότι τόσο το $\Lambda\Lambda$, το $\Delta\Delta$ και το Δ, Λ (*meso*) στην τελική μορφή τους παρεμβάλλονται στο DNA [130]. Συγκεκριμένα, ο γεφυρωμένος υποκαταστάτης bidppz παρεμβάλλεται με διαμόρφωση *anti*. Χρησιμοποιώντας τη μορφή *meso*, βρέθηκε ότι η Λ μονάδα προτιμά να εισέρχεται βαθιά στην ελάσσονα αύλακα ενώ η Δ μονάδα τοποθετείται στη μείζονα αύλακα ελάχιστα απομακρυσμένη από το κέντρο της έλικας.

Τα δυτυρηνικά σύμπλοκα στα οποία τα μεταλλικά κέντρα συνδέονται μέσω ενός γεφυροποιού υποκαταστάτη, όπως τα $\{[\text{Ru}(\text{phen})_2]_2(\mu\text{-HAT})\}^{4+}$ [136, 138] και $\{[\text{Ru}(\text{Me}_2\text{-bpy})_2]_2(\mu\text{-bpm})\}^{4+}$ [140-141] ($\text{Me}_2\text{bpy} = 4,4'\text{-διμεθυλ-2,2'\text{-δυτυριδίνη}}$, $\text{bpm} = 2,2'\text{-δυτυριμιδίνη}$), έχει βρεθεί ότι δεσμεύονται ασθενώς στην αύλακα κατά μήκος της έλικας του DNA, με μια προτίμηση για μετουσιωμένα ή αποσχηματισμένα τμήματα.



Σχήμα 5.23. Δομή του συμπλόκου $[\{[\text{Ru}(\text{bpy})_2]_2(\mu\text{-bdptb})\}]^{4+}$.

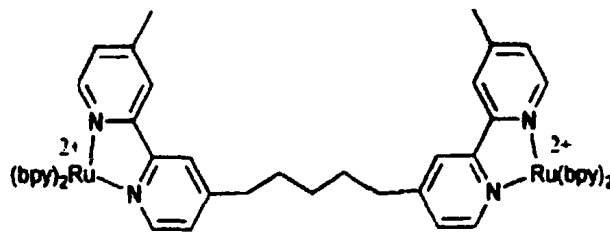
Ένας νέος γεφυροποιός υποκαταστάτης που χρησιμοποιήθηκε για να γεφυρώσει δύο μονάδες $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]^{2+}$ είναι ο $\text{bdptb} = 2,2'\text{-δισ(5,6-δωφαινυλ-1,2,4-τριαζιν-3-υλ)-4,4'\text{-δυτυριδίνη}}$ [143] (σχήμα 5.23). Μελέτες της αλληλεπίδρασης των $\Lambda\Lambda$ - και $\Delta\Delta$ - εναντιομερών του διμερούς αυτού έδειξαν ότι το $\Lambda\Lambda$ -εναντιομερές δεσμεύεται πιο ισχυρά σε CT-DNA [147] πιθανότατα μέσω δέσμευσης στις αύλακες του DNA.



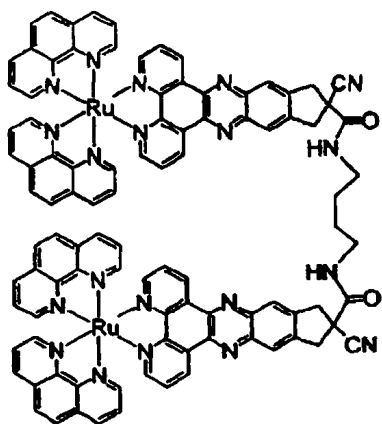
5.2.4.2. Διμεταλλικά σύμπλοκα του Ru(II) με συνδετική αλυσίδα (linker).

Το 1996, ο Kelly και οι συνεργάτες του περιέγραψαν τη σύνθεση συνδεδεμένων μονάδων $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (σχήμα 5.24) [134].

Ενώ το μονομερές δεσμεύεται στο DNA ασθενώς σε χαμηλή ιονική ισχύ, το διμεταλλικό σύμπλοκο εμφανίζει αύξηση της σταθεράς δέσμευσης κατά δύο τάξεις μεγέθους και είναι λιγότερο ευαίσθητο στην επίδραση της ιονικής ισχύος. Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι η αλληλεπίδραση είναι κυρίως ηλεκτροστατικής φύσης και ότι υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι δέσμευσης [131, 134, 137].

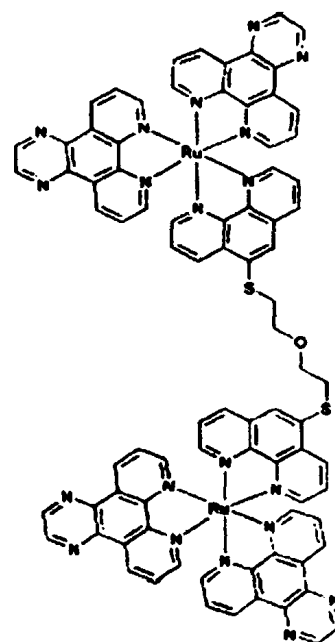


Σχήμα 5.24. Το διπορηνικό σύμπλοκο $[(\text{bpy})_2\text{Ru}(\text{Me}_2\text{bpy})-(\text{CH}_2)_5-(\text{bpyMe})\text{Ru}(\text{bpy})_2]^{4+}$ [134].



Σχήμα 5.25. Δομή του $[\mu\text{-C}_4(\text{cr}^4\text{ppz})_2(\text{phen})_4\text{Ru}_2]^{4+}$, όπου $\text{C}_4(\text{cr}^4\text{ppz})_2 = \text{N,N}'\text{-dis}(12\text{-κυανο-12,13-διϋδρο-11H-8-κυκλοπεντα[b]διπυριδο[3,2-h:2'3'-j]) φαιναζινο-12-καρβονυλ)-1,4-διαμινοβουτάνιο}$.

Το φαινόμενο της διασχίσεως του DNA, το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε άλλα συστήματα όπως σε φυσικά αντιβιοτικά, παρατηρήθηκε στην περίπτωση ενός παρόμοιου διμεταλλικού συμπλόκου, το οποίο αναφέρεται από το Norden και τους συνεργάτες του [145]. Συντέθηκαν τα τρία ισομερή διμεταλλικού συμπλόκου το οποίο αποτελείται από δύο μονάδες $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός εύκαμπτου συνδετικού μορίου (σχήμα 5.25). Μελέτες γραμμικού



$[(\text{Ru}(\text{dpa})_2)_2(5\text{-phen-SOS-phen-5})]^{4+}$

Σχήμα 5.26. Δομή του συμπλόκου $[(\text{Ru}(\text{dpa})_2)_2(5\text{-phen-SOS-phen-5})]^{4+}$.

αντίθετη αύλακα. Η σταθερά δέσμευσης του συμπλόκου αυτού εκτιμάται ότι είναι τέσσερις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$. Η κινητική της δέσμευσης διαφέρει για τα τρία ισομερή. Έτσι, το ΛΛ-ισομερές διΐσταται περίπου μια τάξη μεγέθους ταχύτερα από τη ΔΔ μορφή και παρουσιάζει μεγαλύτερη εξάρτηση από την ιονική ισχύ [145]. Προτάθηκε ότι αυτό οφείλεται στη μικρότερη μεταβολή της διαμόρφωσης του DNA κατά την αποδιάσχιση του ΛΛ σε σχέση με το ΔΔ. Επιπλέον παρατηρήσεις έδειξαν επίσης ότι η παρεμβολή και των τριών μορφών είναι ταχύτερη με $[\text{poly}(\text{dA-dT})]_2$ από $[\text{poly}(\text{dC-dG})]_2$. Αυτό συμφωνεί με το μηχανισμό διασχίσεως, δεδομένου ότι τα ζεύγη GC είναι πιο σταθερά από τα ζεύγη AT [146]. Τα συμμετρικά διτυρηνικά σύμπλοκα του τύπου $[\{\text{Ru}(\text{dpq})_2\}_2-(\text{phen-x-SOS-x-phen})]^{4+}$ (SOS = 2-μερκαπτοαιθυλαιθέρας, $x = 3, 4$ ή 5) (σχήμα 5.26) δεσμεύονται ισχυρά στο DNA μέσω παρεμβολής [144]. Η μεταβολή στη θέση σύνδεσης του υποκαταστάτη phen (3, 4 ή 5) οδηγεί σε σύμπλοκα όπου η απόσταση μεταξύ των μεταλλικών κέντρων διαφέρει. Αυτό έχει μεγάλη επίδραση στο μέγεθος της θέσης δέσμευσης του διτυρηνικού συμπλόκου το οποίο ποικίλλει από 5,9 έως 17,1 ζεύγη βάσεων [144].

5.3. Σύμπλοκα άλλων μετάλλων μετάπτωσης με το DNA

Έχουν γίνει αξιόλογες εργασίες με θέμα την αντιστρεπτή αλληλεπίδραση συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης με το DNA. Επειδή το θέμα της διατριβής αυτής επικεντρώνεται σε σύμπλοκα του Ru(II), η λεπτομερής αναφορά των αλληλεπιδράσεων με το DNA συμπλόκων άλλων μετάλλων μετάπτωσης ξεφεύγει από το σκοπό αυτής της εισαγωγής. Περισσότερες πληροφορίες μπορεί κανείς να αντλήσει από τις ανασκοπήσεις των K. Erkkila, D. T. Odom και J. K. Barton [21] και των C. Metcalfe και J. A. Thomas [37]. Πολλοί από τους υποκαταστάτες που ήδη συζητήθηκαν μελετήθηκαν και στα σύμπλοκα τους με άλλα μέταλλα μετάπτωσης. Έτσι, ενδεικτικά αναφέρουμε ότι υπάρχουν μελέτες της αλληλεπίδρασης με το DNA συμπλόκων του υποκαταστάτη phen με Cu(II) [150], Zn(II) [26], Pt(II) [149], Co(III) [150], Ir(III) [151] καθώς και πολλές εργασίες όπου ο υποκαταστάτης phen χρησιμοποιείται ως βοηθητικός υποκαταστάτης. Επίσης, μεγάλος αριθμός εργασιών υπάρχει με σύμπλοκα του υποκαταστάτη phi με Ni(II) [152] και Rh(III) [108-109, 116, 153-171]. Επίσης έχουν αναφερθεί σύμπλοκα του Ni(II) με dppz [152], dpq [152] και πεπτίδια [172], Co(III) με πορφυρίνη [173], την πεπλεομυσίνη [174], τους υποκαταστάτες IP, PIP [175] και CNOIP



139 5. Αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης με το DNA

[176] και την αιθυλενοδιαμίνη [93], Zn(II) με μακροκυκλικούς τετρααμίνες συνεδεμένες με αρωματικούς υποκαταστάτες [177], με ένα σύμπλεγμα αιθιδίου-πεπτιδίου [178], Cu(II) με salen [179] και ελλειπτισίνη [180] και Rh(III) με chrysi [181-184], παρεμβαλλόμενα μόρια πολυαμίνης [185], διϋμίνες [186], phen με συνδεδεμένα πεπτίδια [187-188], PIP [189], rhzi (βενζο[a]φαιναζινο-5,6-κινονο διϋμίνη) [190].



Κεφάλαιο



ΧΡΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ



6. ΧΡΗΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΝΟΥΚΛΕΪΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Όπως ήδη έχει αναφερθεί παραπάνω, οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο DNA περιέχουν περιοχές αναγνώρισης στις οποίες μικρά τμήματα είναι τοποθετημένα έτσι ώστε να δεσμεύονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Η κατάλληλη τοποθέτηση μιας α-έλικας ή ενός β-φύλλου του πολυπεπτιδίου στην αύλακα του DNA έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των ειδικών επαφών μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων και των βάσεων του DNA. Το υπόλοιπο μόριο της πρωτεΐνης, που αποτελεί και το μεγαλύτερο μέρος, συνήθως περιέχει στοιχεία με ρόλο (α) την τοποθέτηση των στοιχείων αναγνώρισης με συγκεκριμένο προσανατολισμό ως προς την αύλακα, (β) να συμπληρώσουν τις ειδικές αλληλεπιδράσεις του στοιχείου αναγνώρισης αυξάνοντας τη σταθερά δέσμευσης στο DNA μέσω μη ειδικών επαφών, (γ) να δημιουργήσουν άλλες ενδομοριακές ή διαμοριακές επαφές (όπως ο διμερισμός) ώστε να διατηρηθεί η αναδίπλωση.

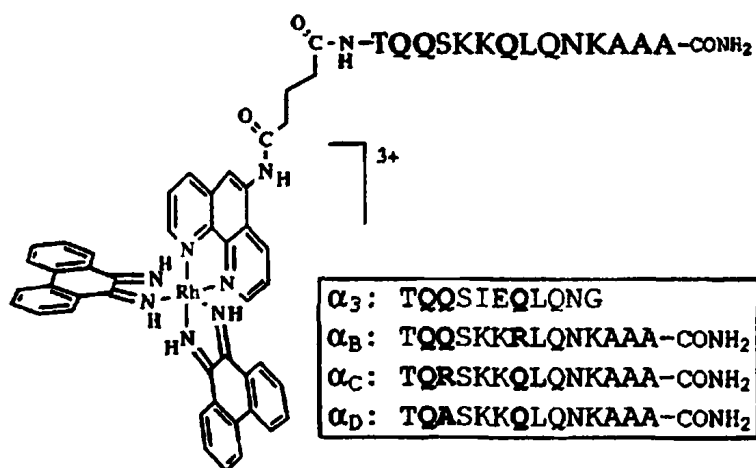
Παρόλο που τα στοιχεία αυτά αναγνώρισης συνεισφέρουν σημαντικά στην εκλεκτικότητα ως προς τη δέσμευση σε συγκεκριμένη αλληλουχία, δεν έχουν τη δυνατότητα να δεσμευτούν από μόνα τους ισχυρά στο DNA, ακόμα κι αν έχουν τη σωστή αναδίπλωση. Μελέτες με πεπτιδικές αλληλουχίες που προέρχονται από πρωτεϊνικές περιοχές αναγνώρισης στηρίχτηκαν στο διμερισμό για να αυξήσουν τη σταθερά δέσμευσης [191-193]. Τόσο η δέσμευση όσο και η ειδικότητα αυξάνονται στις φυσικές πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο DNA μέσω του σχηματισμού διμερών, τετραμερών ή και συνδεδεμένων ολιγομερών. Για παράδειγμα, μια εργασία στην πρωτεΐνη Hin έδειξε ότι ένα πεπτίδιο 31 αμινοξέων, το οποίο περιείχε μια περιοχή έλικα-στροφή-έλικα, δεν ήταν αρκετό για την επίτευξη δέσμευσης στο DNA με ειδικότητα ως προς την αλληλουχία [194-195]. Αντίθετα, ήταν απαραίτητο ένα μεγαλύτερο τμήμα αποτελούμενο από 52 αμινοξέα για την ειδική αλληλεπίδραση με την θέση αναγνώρισης στο DNA. Ως μονομερή λοιπόν, οι α-έλικες ή οι πεπτιδικές περιοχές δεν έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται ισχυρά στο DNA στις περιπτώσεις που μελετήθηκαν μέχρι σήμερα.

Εντυπωσιακά είναι τα αποτελέσματα σχετικά με τμήματα πρωτεϊνών, τα οποία μπορούν να μιμηθούν την συμπεριφορά ολόκληρου του μορίου της πρωτεΐνης. Έχει βρεθεί ότι πολλές από τις δομικές πρωτεΐνες του DNA, όπως οι ιστόνες, δεσμεύονται κατά



προτίμηση σε αλληλουχίες πλούσιες σε AT όπως τα μόρια που δεσμεύονται στην ελάσσονα αύλακα του DNA (π.χ. ντισταμυσίνη). Ο M. Suzuki πρότεινε ότι στις ιστόνες H1 και H2B από σπέρμα αχινού υπάρχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες SPXY οι οποίες δεσμεύονται στο DNA όπως τα αντιβιοτικά νετροψίνη και η ντισταμυσίνη [196]. Μελέτες footprinting έδειξαν ότι τα πεπτίδια (SPRK)₆ και SPRKSPRK δεσμεύονται εκλεκτικά στην ελάσσονα αύλακα περιοχών του DNA πλούσιων σε A/T [197]. Επίσης, το πεπτίδιο TPKRPRGRPKK από την περιοχή δέσμευσης στο DNA της χρωμοσωμικής πρωτεΐνης HMG-I/Y βρέθηκε να έχει τα ίδια χαρακτηριστικά δέσμευσης στο DNA με την ίδια την πρωτεΐνη [198]. Μελέτες ανταγωνισμού και footprinting έδειξαν ότι το πεπτίδιο αυτό δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα περιοχών του DNA πλούσιων σε AT [198-199]. Όμως, η μελέτη με NMR της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων SPRKSPRK και TPKRPRGRPKK με το d(CGCAAAAAGGC):d(GCCTTTTGTGCG) έδειξαν ότι το πρώτο δεν σχηματίζει ειδικό σύμπλοκο με το DNA [200]. Ωστόσο, το δεύτερο σχηματίζει ειδικά σύμπλοκα με τις θέσεις AT, και συγκεκριμένα όπως προκύπτει από τα NOE, το τμήμα RGR του πεπτιδίου εντοπίζεται εντός της ελάσσονος αύλακος με τις πλευρικές αλυσίδες της αργινίνης να καθορίζουν την εκλεκτικότητα ως προς τις αλληλουχίες AT.

Ο N. Y. Sardesai και η J. K. Barton [201] συνδύασαν μια α-έλικα αναγνώρισης με ένα σύμπλοκο που παρεμβάλλεται στο DNA στη θέση του πρωτεϊνικού σκελετού ώστε να κατευθυνθούν οι επαφές του στοιχείου αναγνώρισης και να υπάρξει ισχυρή δέσμευση στη



Σχήμα 6.1. Δομή των συμπλόκων τύπου $[Rh(phi)(phen)(phen-peptide)]^{3+}$ της εργασίας [201].

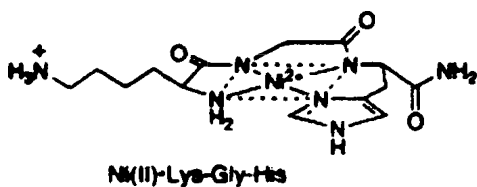
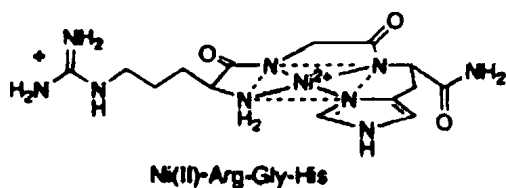
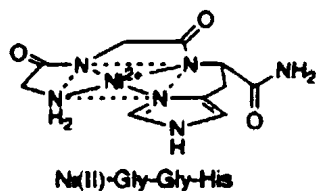
μείζονα αύλακα του DNA.

Επέλεξαν να χρησιμοποιήσουν το σύμπλοκο $[Rh(phi)_2(phen)]^{3+}$ και να το συζεύξουν με αναγνωριστικά πεπτίδια, επειδή το σύμπλοκο αυτό εμφανίζει υψηλή σταθερά δέσμευσης και δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς τη δέσμευση στο DNA [108, 159, 169].

Μελέτες NMR και μελέτες χημικής δραστηρότητας της δέσμευσης στο DNA των συμπλόκων του phi με

Rh(III) έδειξαν ότι παρεμβάλλονται από τη μείζονα αύλακα [108, 156, 162], ένα χαρακτηριστικό το οποίο τα καθιστά κατάλληλα για τη σύζευξή τους με αναγνωριστικά πεπτιδία. Από την άλλη, η ικανότητα των παρεμβαλλόμενων συμπλόκων του Rh(III) να κόβουν το DNA μετά από ακτινοβολήση παρέχει έναν εύκολο τρόπο ελέγχου των θέσεων στις οποίες δεσμεύονται. Οι πεπτιδικές αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν από την αναγνωριστική α-έλικα μιας πρωτεΐνης του φάγου 434 και συνδέθηκαν μέσω ενός συνδετικού μορίου στον υποκαταστάτη phen (σχήμα 6.1). Πειράματα footprinting έδειξαν ότι τα σύμπλοκα όντως δεσμεύονταν κατά προτίμηση στη θέση 5'-ACAA-3' όπως και η πρωτεΐνη. Από την άλλη, μελέτες κοψίματος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα σύμπλοκα έδειξαν παρόμοια εκλεκτικότητα με την πρωτεΐνη ως προς την αλληλουχία αλλά η ισχυρότερη δέσμευση για τα σύμπλοκα, σε αντίθεση με την πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκε με την αλληλουχία 5'-ACGA-3'.

Σε μια άλλη εργασία της ίδιας ερευνητικής ομάδας, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σύμπλοκο με πεπτίδιο 13 αμινοξέων, το οποίο προέρχεται από την έλικα α_3 μιας πρωτεΐνης



Σχήμα 6.2. Σύμπλοκα του Ni(II) με πεπτιδία του τύπου $NH_2-Xaa-Xaa-His-CONH_2$.

γλουταμικού για την αναγνώριση της παραπάνω αλληλουχίας οφείλεται είτε στην έμμεση συμμετοχή του στην αναδίπλωση του πεπτιδίου σε μια μοναδική διαμόρφωση υπό τις κατάλληλες συνθήκες ή στην άμεση συμμετοχή του γλουταμικού στην αλληλεπίδραση με τις

του φάγου P₂₂, η οποία δεσμεύεται στο DNA [188]. Μελέτες κοψίματος του DNA μετά από ακτινοβολήση βρήκαν ότι η παρουσία του γλουταμικού οξέος στη θέση 10 είναι απαραίτητη για την εξειδικευμένη αναγνώριση της αλληλουχίας 5'-CCA-3'. Μεθυλίωση της πλευρικής αλυσίδας του γλουταμικού ή μετατροπή του σε γλουταμίνη εξαφανίζει την εκλεκτικότητα για την αλληλουχία 5'-CCA-3' ενώ οι υποκαταστάσεις σε άλλα αμινοξέα δεν την επηρεάζουν. Πιθανολογείται ότι η

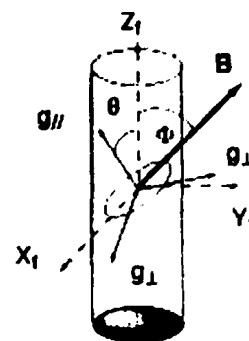
απαίτηση αυτή της ύπαρξης του



βάσεις του DNA. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής συνηγορούν υπέρ και των δύο ρόλων [187].

Μια άλλη προσέγγιση στη χρήση των πεπτιδίων σε σύμπλοκα μετάπτωσης για την αναγνώριση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA, είναι στα σύμπλοκά τους με το Ni(II). Τα μεταλλοπεπτίδια αυτού του τύπου είναι μοναδικά, σε σύγκριση με άλλες ενώσεις που δεσμεύονται στο DNA, στο γεγονός της παρουσίας του πεπτιδίου με τέτοιο τρόπο ώστε οι χαρακτηριστικές ομάδες που χρησιμοποιούν και οι πρωτεΐνες για να αναγνωρίζουν το DNA να είναι τοποθετημένες στην περιφέρεια ενός καλά καθορισμένου μεταλλικού συμπλόκου.

Ο Q. Liang και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν τα σύμπλοκα του Ni(II) με πεπτίδια του τύπου $\text{NH}_2\text{-Xaa-Xaa-His-CONH}_2$ (συγκεκριμένα τα Gly-Gly-His, Lys-Gly-His και Arg-Gly-His) (σχήμα 6.2) και εξέτασαν την ικανότητα των συμπλόκων αυτών να



Σχήμα 6.3. Συστήματα συντεταγμένων: B =Στατικό μαγνητικό πεδίο, (X_f, Y_f, Z_f) =οι άξονες του DNA, $(g_{||}, g_{\perp})$ =οι άξονες του διανύσματος g . Φ =η γωνία ανάμεσα στο B και στο Z_f , θ =η γωνία ανάμεσα στο $g_{||}$ και στο Z_f .

κόβουν το DNA σε συγκεκριμένη αλληλουχία παρουσία οξόνης, ενός αντιδραστηρίου ενεργοποιητή του οξυγόνου [202]. Διαπιστώθηκε ότι τα παραπάνω σύμπλοκα παρουσιάζουν την ικανότητα να κόβουν το DNA σε περιοχές πλούσιες σε AT, αν και αποφεύγουν τις ομοπολυμερείς θέσεις AT. Η αντίδραση αυτή αναστέλλεται από το φάρμακο ντισταμυσίνη, οπότε η αντίδραση αυτή προφανώς πραγματοποιείται από την ελάσσονα αύλακα. Επιπλέον, η αντικατάσταση της L-His από D-His αλλά και η χρήση ουδέτερων συμπλόκων που περιείχαν το αμινοξύ Asn έδειξαν ότι η εκλεκτικότητα μπορεί να μεταβληθεί μέσω μικρών μεταβολών στη δομή των πεπτιδίων. Έτσι, για παράδειγμα, το σύμπλοκο Ni(II)-Gly-D-Asn-His έδειξε εκλεκτικότητα για τις θέσεις 5'-CCT-3'. Η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε επίσης με ηλεκτρονικό παραμαγνητικό συντονισμό (EPR) την αλληλεπίδραση με το DNA συμπλόκων του τύπου Cu(II)-Xaa-Gly-His (όπου Xaa είναι Gly, Arg ή Lys) και έδειξαν ότι οι άξονες $g_{||}$ και τα μέσα ισημερινά επίπεδα αυτών των μεταλλοπεπτιδίων έχουν κλίση περίπου 50° και 40° (σχήμα 6.3, όπου $\theta=50^\circ$ και $\Phi=40^\circ$), αντίστοιχα, σε σχέση με τον άξονα του DNA, δείχνοντας έτσι ότι υπάρχει στερεοεκλεκτικός προσανατολισμός στην ελάσσονα αύλακα [203].

Οι παραπάνω μελέτες, σε συνδυασμό με τη διερεύνηση των υποκαταστάσεων της Gly στο σύμπλοκο Ni(II)-Gly-Gly-His, με αμινοξέα που παρατηρούνται συνήθως σε αλληλουχίες

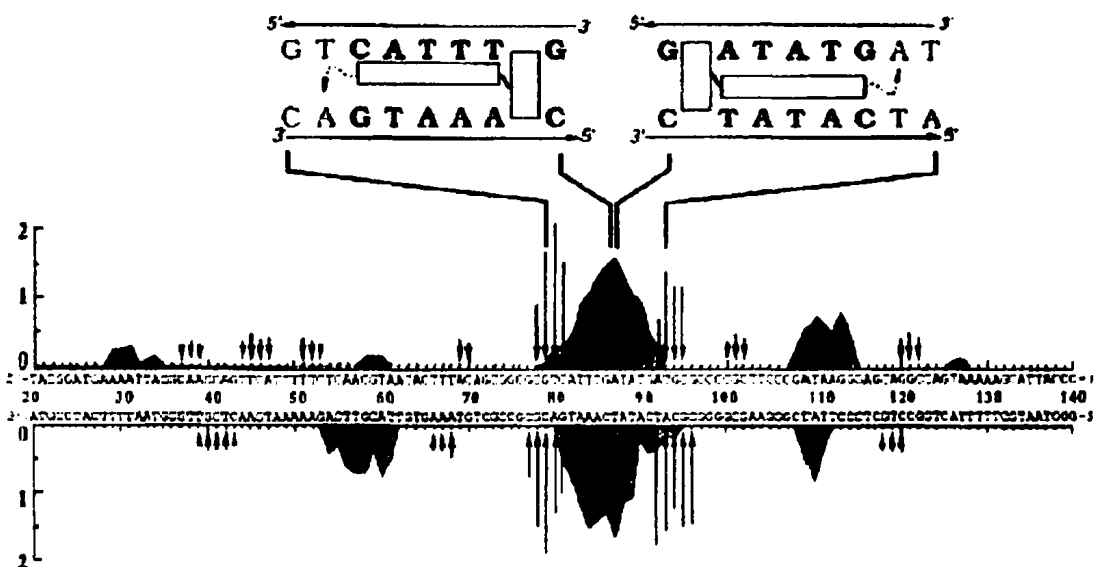
πρωτεϊνών που δεσμεύονται στην ελάσσονα αύλακα [204], οδήγησαν στην κατασκευή ενός πιθανού μοντέλου δέσμευσης στην ελάσσονα αύλακα του DNA. Έτσι, το αμινο-τελικό άζωτο και ο ιστιδινικός ιμιδαζολικός δακτύλιος που βρίσκονται στο άκρο της επίπεδης τετραγωνικής δομής του συμπλόκου είναι αυτά που εισέρχονται στην ελάσσονα αύλακα. Ο τρόπος αυτός δέσμευσης επιτρέπει τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ του πυρρολικού N-H, των πρωτονίων N-H της τελικής αμινομάδας και πιθανούς αποδέκτες στο πάτωμα της ελάσσονος αύλακος περιοχών πλούσιων σε AT (π.χ. το O2 της θυμίνης και το N3 της αδενίνης). Αυτό φαίνεται επίσης από το γεγονός ότι τα μεταλλοπεπτίδια του τύπου Ni(II)-Gly-Gly-His με μεθυλωμένη την His δεν αλληλεπιδρούν με το DNA [174]. Επιπλέον, μελέτες NMR έδειξαν ότι τα σύμπλοκα Ni(II)-L-Arg-Gly-His and Ni(II)-D-Arg-Gly-His δεσμεύονται στην ελάσσονα αύλακα της κεντρικής αλληλουχίας AATT του ολιγονουκλεοτιδίου d(CGCGAATTCGCG)₂ και από τις μελέτες μοριακής δυναμικής βάσει των πειραματικών δεδομένων προέκυψε ότι το ιμιδαζολικό N-H της ιστιδίνης, η τελική αμινομάδα και η πλευρική αλυσίδα της αργινίνης καθορίζουν την αναγνώριση μέσω της ελάσσονος αύλακας δρώντας ως δότες δεσμού υδρογόνου στο O2 της θυμίνης και το N3 της αδενίνης [172].

Ο Chikira και οι συνεργάτες του [205] χρησιμοποίησαν EPR για να μελετήσουν τον προσανατολισμό του συμπλόκου Cu(II)-Gly-His-Lys κατά τη δέσμευση του στο DNA. Παρατήρησαν ότι το επίπεδο τετραγωνικό σύμπλοκο (που σχηματίζεται από την τριδοντική ένταξη του πεπτιδίου) δεσμεύεται παράλληλα προς τον άξονα των ινών του DNA όπως και σε μια δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα. Βάσει αυτής της υπόθεσης συμπέραναν ότι το τριδοντικό σύμπλοκο εντάσσεται σε ένα οξυγόνο του φωσφοδιεστερικού σκελετού και αποκτά επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία. Τελικά, βρήκαν ότι ο προσανατολισμός του συμπλόκου που δεσμεύεται στο DNA εξαρτάται κυρίως από το γλυκυλ-ιστιδινο τμήμα του τριπεπτιδίου. Η συνεισφορά της λυσίνης στον καθορισμό του προσανατολισμού είναι ελάχιστη.

Ο Bailly και οι συνεργάτες του [206] δημιούργησαν μια εκλεκτική νουκλεάση στην οποία συνδυάζονται η ικανότητα χηλικής ένταξης στον χαλκό του πεπτιδίου GHK με την ικανότητα δέσμευσης στην ελάσσονα αύλακα της νετροψίνης (Net) και την ικανότητα παρεμβολής ενός παραγώγου της ακριδίνης (GA). Διαπιστώθηκε ότι ενώ το υβρίδιο νετροψίνης-ακριδίνης (NetGA) είχε σταθερά δέσμευσης $9,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, το νέο αυτό παράγωγο



υβρίδιο (NetGA-GHK) είχε σταθερά δέσμευσης 20 φορές μεγαλύτερη αποκαλύπτοντας τη συνεισφορά του τριπεπτιδίου στη δέσμευση στο DNA. Επιπλέον, βρέθηκε ότι παρουσία χαλκού, υπεροξειδίου του υδρογόνου και ασκορβικού οξέος επιτυγχάνεται εκλεκτική ως προς την αλληλουχία διάσπαση του DNA. Μελέτες footprinting με DNAάση I [206] έδειξαν ότι το υβρίδιο δεσμεύεται σε δύο διαδοχικές θέσεις, στην πρώτη η νετροψίνη δεσμεύεται στην αλληλουχία AATT και η ακριδίνη παρεμβάλλεται στην 5' πλευρά του κεντρικού ζεύγους GC ενώ στη δεύτερη η νετροψίνη δεσμεύεται στην αλληλουχία TATA και η ακριδίνη παρεμβάλλεται στην 3' πλευρά του κεντρικού ζεύγους GC (σχήμα 6.4). Αυτό έχει σαν συνέπεια το κόψιμο του DNA να γίνεται στα δύο άκρα της αλληλουχίας που δεσμεύεται το υβρίδιο (σχήμα 6.4).



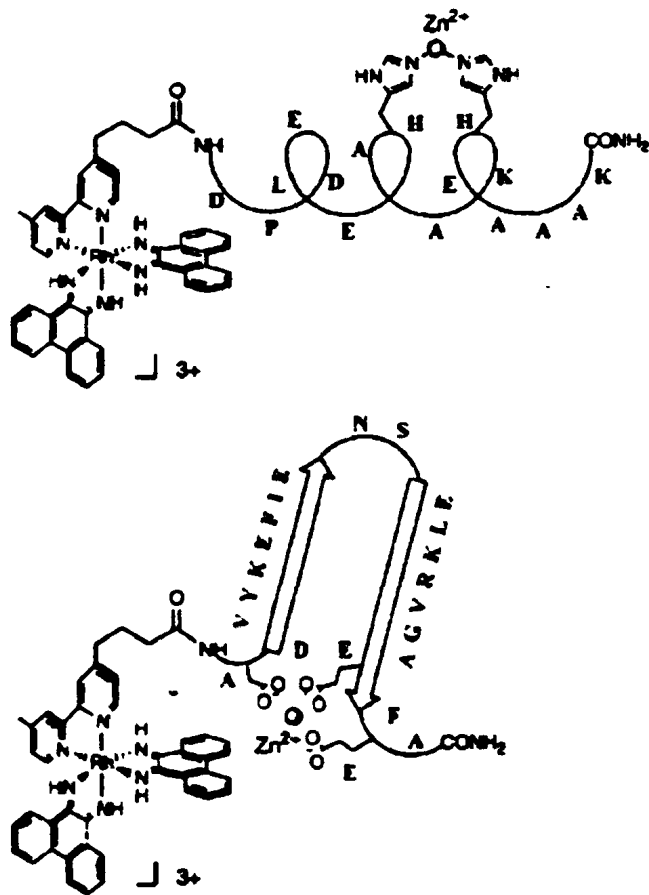
Σχήμα 6.4. Χαρτογράφηση της δέσμευσης και του κοψίματος από το υβρίδιο GHK-NetGA του τμήματος DNA 160-bp tyr T. Οι σκιασμένες επιφάνειες αναπαριστούν την έκταση της προστασίας από τη DNAάση I λόγω της δέσμευσης του GHK- NetGA. Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις κοψίματος από το ενεργοποιημένο φάσμακο. Σχηματική αναπαράσταση των δύο προτεινόμενων τύπων δέσμευσης του GHK-NetGA στο DNA [206].

Από την άλλη, σύμπλοκα μετάλλων που παρεμβάλλονται στο DNA με πεπτίδια συνδεδεμένα σε υποκαταστάτη έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις cross-linking με το DNA. Το σύμπλοκο που χρησιμοποιήθηκε ήταν του τύπου $[Ru(phen)(bpy')(dppz)]^{2+}$ ($bpy' = 4-(\beta\text{-ουτυρικό οξύ})-4'-\text{μεθυλ}-2,2'-\text{διτυριδίνη}$), όπου το bpy' είναι αυτό που φέρει το πεπτίδιο και η εκκίνηση της αντίδρασης cross-linking γίνεται με οξείδωση του DNA κατά την ακτινοβόληση παρουσία οξειδωτικού [207]. Η σύσταση του πεπτιδίου έχει άμεση επίδραση

τόσο στη σταθερά δέσμευσης αλλά και στην απόδοση της αντίδρασης cross-linking. Η μεγαλύτερη απόδοση παρατηρήθηκε με πεπτίδια τα οποία περιείχαν θετικά φορτισμένα αμινοξέα, όπως λυσίνη ή αργινίνη. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η σύνδεση του πεπτιδίου στο σύμπλοκο του $Ru(II)$ δεν ήταν απαραίτητη για να γίνει η αντίδραση cross-linking αλλά το πεπτίδιο από μόνο του έχει δράση και μάλιστα μεγαλύτερη απ' ό,τι όταν είναι συνδεδεμένο στο μεταλλικό σύμπλοκο [207].

Στην προσπάθεια δημιουργίας συνθετικών νουκλεασών, χρησιμοποιήθηκαν πεπτίδια

τα οποία συνδέθηκαν σε ένα παρεμβαλλόμενο σύμπλοκο $Rh(III)$ και τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν μεταλλοϊόντα. Το παρεμβαλλόμενο σύμπλοκο $[Rh(phi)_2(bpy')]^{2+}$ ($bpy' = 4$ -(βουτυρικό οξύ)-4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη) παρέχει την ισχυρή δέσμευση στο DNA ενώ το πεπτίδιο συνεισφέρει στη δραστηριότητα. Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα πεπτίδιο σε διαμόρφωση α-έλικας σχεδιασμένο εκ νέου, το οποίο φέρει δύο His ώστε να μπορεί να δεσμεύει μεταλλοϊόντα (P_1) και ένα δεύτερο πεπτίδιο σε διαμόρφωση τύπου φουρκέτας, μοντέλο του ενεργού κέντρου της περιοριστικής



Σχήμα 6.5. Δομές των συμπλόκων $[Rh(phi)_2bpy'-P_1]^{3+}$ (άνω) και $[Rh(phi)_2bpy'-Bam]^{3+}$ (κάτω).

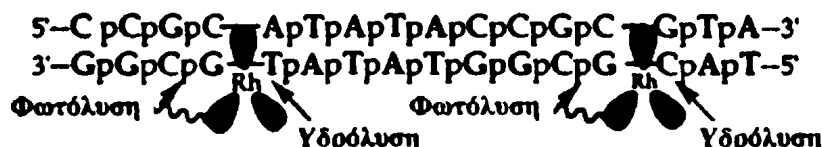
ενδονουκλεάσης *BamHI* (Bam) (σχήμα 6.5). Η δέσμευση Zn^{2+} στο πεπτίδιο

οδήγησαν στον σχηματισμό μιας αποτελεσματικής συνθετικής νουκλεάσης του DNA με ικανότητα να κόβει τόσο

πλασμιδιακό όσο και γραμμικό DNA [208-209].

Το πεπτίδιο P_1 παρουσιάζει

και από μόνο του δράση η



Σχήμα 6.6. Σχέση μεταξύ της παρεμβολής του συμπλόκου του $Rh(III)$ με το P_1 και της υδρόλυσης του DNA.

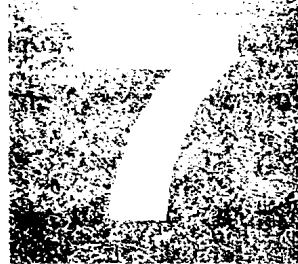


οποία όμως ενισχύεται σημαντικά όταν συνδέεται στο μεταλλικό σύμπλοκο. Το πεπτίδιο αυτό δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς την αλληλουχία κι έτσι η θέση δέσμευσης καθορίζεται κυρίως από το παρεμβαλλόμενο σύμπλοκο το οποίο παρεμβάλλεται στο κέντρο δύο θέσεων 5'-Pu-Py-Pu-Py-3' ενώ το κόψιμο του DNA πραγματοποιείται μετά από ακτινοβολήση και φωτοοξειδωση στη γειτονική πυριμιδίνη στην 5' κατεύθυνση από τη θέση παρεμβολής (σχήμα 6.6). Το πεπτίδιο P₁ ουσιαστικά μεταφέρει το δισθενές μεταλλοϊόν (Cu(II) ή Zn(II)) στον 3'-φωσφοδιεστερικό δεσμό ο οποίος και υφίσταται υδρολυτική διάσπαση (σχήμα 6.6). Από την άλλη, το πεπτίδιο Bam στο σύμπλοκο του με το Rh(III), βρέθηκε ότι κόβει υπερσπειρωμένο πλασμιδιακό DNA αλλά δεν εμφανίζει δραστικότητα έναντι του γραμμικού DNA κι έτσι δεν ήταν δυνατή η απομόνωση και ανάλυση των προϊόντων της φωτοδιασπάσεως.

Σε συνέχεια της παραπάνω εργασίας [209], η ίδια ερευνητική ομάδα συνέδεσε το πεπτίδιο P₁ σε ένα σύμπλοκο το οποίο είναι γνωστό ότι δεσμεύεται σε αταίριαστα ζεύγη βάσεων, το [Rh(phen)(bpy''-P₁)(chrysi)]³⁺ (bpy''= 4-(βαλερικό οξύ)-4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδίνη). Το σύμπλοκο αυτό όντως δεσμεύεται σε αταίριαστο ζεύγος βάσεων CC αλλά η υδρολυτική διάσπαση παρουσία ιόντων Zn(II) δεν ήταν επιτυχής. Επίσης, η σύνδεση του P₁ στο αιθίδιο, γνωστό οργανικό μόριο που παρεμβάλλεται στο DNA από την ελάσσονα αύλακα, οδήγησε στον σχηματισμό μη ενεργής νουκλεάσης. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι φανερό ότι δεν είναι κατάλληλα όλα τα παρεμβαλλόμενα σύμπλοκα μετάλλων για να επιτευχθεί ο κατάλληλος προσανατολισμός του πεπτιδίου και να γίνει η διάσπαση του DNA. Πιθανότατα, κάποιο ρόλο παίζουν και οι βοηθητικοί υποκαταστάτες αλλά και τα συνδετικά μόρια.



Κεφάλαιο



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ



7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της διατριβής είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός συμπλόκων του Ru(II) με διπυριδυλικούς υποκαταστάτες, σε έναν από τους οποίους συνδέεται ένα πεπτίδιο και η μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με τη διπλή έλικα νουκλεϊνικών οξέων με τη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών (^1H NMR και CD) και τελικό σκοπό την ανάπτυξη αντιδραστηρίων τα οποία μπορούν να αναγνωρίζουν εκλεκτικά συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA.

7.1. Επίλογή των συμπλόκων του Ru(II)

Σύμφωνα με όσα ήδη έχουν περιγραφεί παραπάνω, το Ru(II) είναι ένα ιόν με ηλεκτρονιακή διαμόρφωση d^6 , με δυνατότητα σχηματισμού οκταεδρικών συμπλόκων με κορεσμένη σφαίρα ένταξης και τα οποία είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με τρόπο αντιστρεπτό με το DNA. Τα σύμπλοκα του διπυριδυλίου με το Ru(II), όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, δεν παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις αλλά μπορούν να δεσμευτούν στο DNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Έτσι, υπάρχει μεγαλύτερη δυνατότητα για τη δημιουργία ειδικών επαφών μεταξύ των υποκαταστάσεων στους αρωματικούς δακτυλίου του διπυριδυλίου και των βάσεων του DNA. Συνεπώς, ο διπυριδυλικός υποκαταστάτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά του πεπτιδίου στην πιθανή θέση αναγνώρισης όπου οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων μπορούν ενδεχομένως να τοποθετηθούν στην κατάλληλη θέση αλληλεπίδρασης με το DNA. Από την άλλη, το διπυριδύλιο ως βοηθητικός υποκαταστάτης στα σύμπλοκα του τύπου $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}]^{2+}$, όπως αυτά που χρησιμοποιούνται σ' αυτή τη διατριβή, έχει τις λιγότερες δυνατές στεरिकές αλληλεπιδράσεις συγκριτικά με πιο εκτεταμένους αρωματικούς υποκαταστάτες. Επιπλέον, ένα τρις χηλικό σύμπλοκο του Ru(II) προσφέρει ένα πλαίσιο το οποίο μπορεί να δεσμευτεί στο DNA μέσω μη ειδικών επαφών όπως και ο πρωτεϊνικός σκελετός σταθεροποιώντας το σύμπλοκο με το DNA και δίνοντας κατ' αυτό τον τρόπο τη δυνατότητα σχηματισμού των ειδικών επαφών από τις ομάδες των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων.

Επιπλέον, η ύπαρξη χειρικού κέντρου στα σύμπλοκα αυτά προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης της αλληλεπίδρασης διαφορετικών εναντιομερών, διαπιστώνοντας με αυτό τον τρόπο την επίδραση μικρών μεταβολών στη δομή στον τρόπο δέσμευσης των συμπλόκων στο DNA. Επίσης, τα σύμπλοκα αυτά λόγω της χημειοφωταύγειας που εμφανίζουν, εφόσον έχουν την



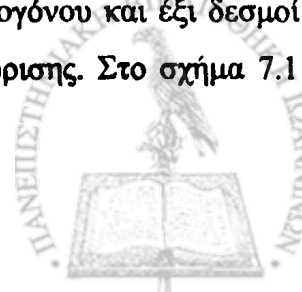
ικανότητα να αναγνωρίζουν εκλεκτικά συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτικά μόρια. Από την άλλη, η ικανότητα φωτοδιάσπασης του DNA, η οποία έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, επεκτείνει τις εφαρμογές τους και ως συνθετικών νουκλεασών.

7.2. Η επιλογή των πεπτιδίων

Δύο είναι οι πεπτιδικές αλληλουχίες που εξετάστηκαν σε αυτή τη διατριβή. Η πρώτη αλληλουχία είναι η Gly-His-Lys (GHK), ο γνωστός παράγοντας ανάπτυξης. Το πεπτίδιο αυτό έχει μελετηθεί εκτεταμένα για την ικανότητα του να εντάσσεται χηλικά σε μεταλλοϊόντα [210-212] και φέρει αμινοξέα τα οποία διαθέτουν πλευρικές αλυσίδες που μπορούν να δώσουν ειδικές επαφές με τις βάσεις του DNA. Από την άλλη, είναι ένα υδατοδιαλυτό πεπτίδιο, το οποίο μπορεί να αυξήσει τη διαλυτότητα του υδρόφοβου τρις χηλικού συμπλόκου του Ru(II) βοηθώντας το να φτάσει στον πυρήνα του κυττάρου σε μια πιθανή του χρήση σαν φαρμάκου. Η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου GHK και η δυνατότητά του να δεσμεύεται ειδικά στο DNA έχει δοκιμαστεί ήδη και από άλλους ερευνητές [205-206, 213].

Το δεύτερο πεπτίδιο προέρχεται από την περιοριστική ενδονουκλεάση *MunI*. Μια προσεκτική παρατήρηση ενός μεγάλου αριθμού περιοριστικών ενδονουκλεασών έδειξε ότι πολλές από αυτές χρησιμοποιούν ένα βρόγχο (loop) μέσω του οποίου δημιουργούν τις ειδικές επαφές με τις βάσεις κι επομένως αναγνωρίζουν συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA. Ο βρόχος αυτός πλησιάζει την αλληλουχία-στόχο από μία αύλακα του DNA, τη μείζονα ή την ελάσσονα συνήθως ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μια ενδονουκλεάση μπορεί να χρησιμοποιεί δύο βρόχους, έναν από τη μείζονα και έναν από την ελάσσονα αύλακα.

Η *MunI* είναι περιοριστική ενδονουκλεάση τύπου II, η οποία προέρχεται από το *Mycoplasma unidentifed*, το οποίο αναγνωρίζει την παλίνδρομη εξανουκλεοτιδική αλληλουχία C/AATTG και κόβει στο σημείο που επισημαίνεται από την κάθετο (/) [214]. Η κεντρική αλληλουχία αλλά και το σημείο κοπής είναι το ίδιο με τη γνωστή περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* (G/AATTC). Η *MunI* δημιουργεί άμεσες επαφές με τις βάσεις αποκλειστικά από τη μείζονα αύλακα. Όλα τα αμινοξέα που εμπλέκονται στις ειδικές ως προς την αλληλουχία αλληλεπιδράσεις βρίσκονται εντός της αλληλουχίας Arg¹¹⁵-Gly¹¹⁶-Asn¹¹⁷-Ala¹¹⁸-His¹¹⁹-Glu¹²⁰-Arg¹²¹ [214]. Συνολικά, υπάρχουν 16 δεσμοί υδρογόνου και έξι δεσμοί van der Waals μεταξύ του διμερούς της *MunI* και της θέσης αναγνώρισης. Στο σχήμα 7.1



βλέπουμε πως η *MunI* χρησιμοποιεί ένα βρόχο που φέρει την παραπάνω αλληλουχία για να αναγνωρίσει τη θέση-στόχο.



Σχήμα 7.1. Η αναγνώριση της αλληλουχίας CAATTG από το διμερές της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *MunI*.

7.3. Η επιλογή των νουκλεϊνικών οξέων

Για τη μελέτη της ικανότητας των συμπλόκων τύπου $[Ru(bpy)_2(L)]^{2+}$, όπου $L = 4$ -μεθυλ-4'-πεπτίδιο-2,2'-διτυριδύλιο (πεπτίδιο = GHK ή 7p = Arg-Gly-Asn-Ala-His-Glu-Arg) για αλληλεπίδραση με το DNA και αναγνώρισης συγκεκριμένης αλληλουχίας χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες ολιγονουκλεοτιδίων. Τα ολιγονουκλεοτίδια, λόγω του μικρού μεγέθους τους συγκριτικά με το DNA, προσφέρουν τη δυνατότητα χρησιμοποίησης



μιας γνωστής καλά χαρακτηρισμένης αλληλουχίας, η οποία μπορεί να μελετηθεί σε διάλυμα με φασματοσκοπία NMR αλλά και άλλες φασματοσκοπικές μεθόδους.

Μελετήθηκε, λοιπόν, η αλληλεπίδραση του συμπλόκου που φέρει το πεπτίδιο GHK με την αυτοσυμπληρούμενη παλίνδρομη αλληλουχία 5'-CGCGAATTCGCG-3', γνωστή και ως δωδεκαμερές των Drew-Dickerson, η οποία έχει χαρακτηριστεί με κρυσταλλογραφικές αλλά και φασματοσκοπικές τεχνικές [215-216]. Για τη διαπίστωση της ύπαρξης εκλεκτικού τρόπου δέσμευσης έγινε σύγκριση της αλληλεπίδρασης και με μία δεύτερη αλληλουχία, την 5'-CGCGATCGCG-3', η οποία διαφέρει από την πρώτη μόνο ως προς την κεντρική αλληλουχία.

Μελετήθηκε επίσης, η αλληλεπίδραση του συμπλόκου του Ru(II) που φέρει το 7p με την αλληλουχία 5'-GCGCTTAAGCGC-3' και την 5'-CGCGATCGCG-3'. Η μελέτη των παραπάνω έγινε με φασματοσκοπία NMR και κυκλικού διχρωϊσμού.



Κεφάλαιο 8

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8.1. Αντιδραστήρια

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια και οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός τους. Τα δεοξυνουκλεοτίδια d(5'-CGCGAATTCGCG-3'), d(5'-GCGCTTAAGCGC-3') και d(5'-CGCGATCGCG-3') αγοράστηκαν από την εταιρεία OSWEL DNA (Πανεπιστήμιο του Southampton, U.K.) και καθαρίστηκαν με στήλη χρωματογραφίας Sephadex G-25, 120 x 2,5 cm, χρησιμοποιώντας απιονισμένο νερό ως διαλύτη έκλουσης και στη συνέχεια λυοφιλοποιήθηκαν μέχρι ξηρού. Τα σύμπλοκα cis-[Ru(bpy)₂Cl₂] [217], Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(py)₂]A (όπου A = O,O'-διβενζόυλ-τρυγικό οξύ) [70, 218] και ο υποκαταστάτης 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδύλο-4-καρβοξυλικό οξύ (m-OH) συντέθηκαν βάσει της βιβλιογραφίας [219].

8.2. Σύνθεση των συμπλόκων του Ru(II)

8.2.1. Σύνθεση του υποκαταστάτη 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδύλο-4-καρβοξυλικό οξύ (m-OH).

Ως αρχική ένωση χρησιμοποιήθηκε το 4,4'-διμεθυλο-2,2'-διπυριδύλιο, το οποίο με σταδιακή οξείδωση της μίας μεθυλομάδας μετατράπηκε αρχικά σε αλδεΐδη και έπειτα σε μονοκαρβοξυλικό οξύ. Οι δύο αυτές αντιδράσεις περιγράφονται παρακάτω ξεχωριστά.

8.2.1.1. Σύνθεση της 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδύλο-4-καρβοξυαλδεΐδης (m-H).

Εναιώρημα αποτελούμενο από 4,4'-διμεθυλ-2,2'-διπυριδύλιο (5,27 g, 28,6 mmol) και SeO₂ (3,48 g, 31,4 mmol) σε 1,4-διοξάνη (155 ml) θερμαίνεται σε συσκευή reflux υπό ανάδευση για 24 ώρες. Το διάλυμα διηθείται θερμό οπότε και απομακρύνεται ένα μαύρο-πράσινο στερεό. Το διήθημα αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διηθείται ξανά για την απομάκρυνση ενός ανοικτού καφέ στερεού. Το διήθημα εξατμίζεται μέχρι ξηρού και το υπόλειμμα διαλύεται μερικώς σε οξικό αιθυλεστέρα (500 ml) και στη συνέχεια διηθείται για την απομάκρυνση του εναπομείναντος αδιάλυτου στερεού. Το διήθημα εκχυλίζεται με διάλυμα Na₂CO₃ 1,0 M (2 × 100 ml) για την απομάκρυνση των καρβοξυλικών οξέων και με διάλυμα Na₂S₂O₅ 0,3 M (3 × 100 ml) για να σχηματιστούν ενώσεις προσθήκης με την αλδεΐδη. Ενώνονται τα υδατικά εκχυλίσματα και το pH ρυθμίζεται στο 10 με την προσθήκη Na₂CO₃ ώστε να απελευθερωθεί η αλδεΐδη και στη



συνέχεια εκχυλίζονται με CH_2Cl_2 (4×100 ml). Ο διαλύτης εξατμίζεται μέχρι ξηρού και παραλαμβάνεται η αλδεΐδη με τη μορφή λευκού στερεού. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$: C: 72,78%, H: 5,13%, N: 14,06% (θεωρητικά: C: 72,71%, H: 5,08%, N: 14,13%). Απόδοση: $37,7\% \pm 7,6\%$ (μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων).

8.2.1.2. Σύνθεση του 4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδύλο-4-καρβοξυλικού οξέος (*m*-OH).

Ένα διάλυμα AgNO_3 (1,99 g, 11,7 mmol) σε νερό (20 ml) προστίθεται σε ένα εναιώρημα της *m*-H (2,21 g, 11,1 mmol) σε 95% αιθανόλη (95 ml). Το κίτρινο εναιώρημα αναδεύεται ισχυρά καθώς προστίθεται σε αυτό στάγδην σε χρονικό διάστημα 20 λεπτών διάλυμα NaOH 1,0 M (50 ml) ώστε να σχηματιστεί Ag_2O . Το μαύρο μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται ισχυρά για 15 ώρες. Απομακρύνεται η αιθανόλη με εξάτμιση και το υπόλειμμα διηθείται με ηθμό Gooch ώστε να απομακρυνθεί το Ag_2O και ο μεταλλικός άργυρος. Το στερεό εκπλένεται με διάλυμα NaOH 1,3 M (2×20 ml) και νερό (20 ml). Τα διηθήματα ενώνονται και εκχυλίζονται με CH_2Cl_2 (2×50 ml) για να απομακρυνθεί η μη αντιδρώσα αλδεΐδη και το pH ρυθμίζεται στο 3,5 με μίγμα 1:1 (v/v) HCl 4N/οξικό οξύ, οπότε και σχηματίζεται λευκό ίζημα. Το μίγμα φυλάσσεται κατά τη διάρκεια της νύχτας στους -10° και στη συνέχεια συλλέγεται το λευκό στερεό, το οποίο ξηραίνεται υπό κενό. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$: C: 67,34%, H: 4,80%, N: 12,99% (C: 67,28%, H: 4,71%, N: 13,08%). Απόδοση: $83,8\% \pm 9,1\%$ (μέσος όρος δύο επαναλήψεων).

8.2.2. Σύνθεση των Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(py)₂] A (όπου A = O, O'-διβενζοϋλ-τρυγικό οξύ).

Η σύνθεση αυτή περιλαμβάνει τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο, ξεκινώντας από το $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ και 2,2'-διπυριδύλιο (bpy) συντίθεται το *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂]. Στη συνέχεια τα δύο ιόντα Cl^- στη σφαίρα ένταξης του Ru(II) αντικαθίστανται από πυριδίνη (py) και λαμβάνουμε το ρακεμικό μίγμα *rac*-[Ru(bpy)₂(py)₂]Cl₂. Ο διαχωρισμός των δύο εναντιομερών Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(py)₂]Cl₂ πραγματοποιείται με κρυστάλλωση μέσω αργής εξάτμισης παρουσία του χειρικού αντιδραστηρίου O-O'-διβενζοϋλ-L(ή D)-τρυγικό οξύ.

8.2.2.1. Σύνθεση του *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂].

Διάλυμα $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (1,6 g, 6,1 mmol), bpy (1,9 g, 12,2 mmol) και LiCl (1,7 g, 40 mmol) σε DMF (10 ml) θερμαίνεται σε συσκευή reflux στους 140° υπό ατμόσφαιρα N_2 για 8-

9 ώρες. Το διάλυμα ψύχεται και στη συνέχεια προστίθεται ακετόνη (50 ml) και αφήνεται στους -20° για όλη τη νύχτα. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό με ηθμό Gooch, έκπλυση με διαιθυλαιθέρα (3×10 ml) και ξήρανση υπό κενό για 1-2 ώρες στους 50° . Το $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ παραλαμβάνεται ως μαύρο-καφέ στερεό. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{Ru}$: C: 49,53%, H: 3,40%, N: 11,51% (θεωρητικά: C: 49,60%, H: 3,33%, N: 11,57%). Απόδοση: $85,0\% \pm 4,6\%$ (μέσος όρος οκτώ επαναλήψεων).

8.2.2.2. Σύνθεση του $\text{rac-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2]\text{Cl}_2$.

Διάλυμα που περιέχει $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]$ (2,0 g, 4,1 mmol), py (23 ml, 284 mmol) και H_2O (46 ml) θερμαίνεται σε συσκευή reflux στους 120° για 4 ώρες. Το διάλυμα εξατμίζεται μέχρι ξηρού. Το υπόλειμμα διαλύεται σε μικρή ποσότητα μεθανόλης (5 ml) και προστίθεται TEOF (200 ml) και υπό συνεχή ανάδευση και με τη βοήθεια υπερήχων σχηματίζεται πορτοκαλί στερεό. Το στερεό παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό με ηθμό Gooch και ξήρανση στους 50° για 1-2 ώρες. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{Ru}$: C: 56,00%, H: 4,12%, N: 13,01% (θεωρητικά: C: 56,08%, H: 4,08%, N: 13,08%). Απόδοση: $52,0\% \pm 19,0\%$ (μέσος όρος οκτώ επαναλήψεων).

8.2.2.3. Διαχωρισμός των εναντιομερών Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2]\text{Cl}_2$.

Το χειρικό αντιδραστήριο (3,12 g, 8,29 mmol) προστίθεται υπό συνεχή ανάδευση σε διάλυμα NaOH (0,7 g, 17,5 mmol) σε νερό (30 ml). Μετά τη διάλυση του χειρικού αντιδραστηρίου, ρυθμίζεται το pH στο 8-9. Ακολουθεί η προσθήκη του $\text{rac-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2]\text{Cl}_2$ (1,95 g, 3 mmol) υπό συνεχή ανάδευση. Η αργή εξάτμιση του διαλύματος αυτού οδηγεί στον σχηματισμό πορτοκαλί-κόκκινων κρυστάλλων του Λ - ή του Δ -εναντιομερούς ανάλογα με το ποιο χειρικό αντιδραστήριο έχει χρησιμοποιηθεί. Οι κρύσταλλοι διηθούνται υπό κενό σε ηθμό Gooch και εκπλένονται ταχέως με παγωμένο νερό (3×10 ml), ακετόνη (3×20 ml) και διαιθυλαιθέρα (2×10 ml). Λαμβάνονται κρύσταλλοι κόκκινου χρώματος, οι οποίοι ξηραίνονται υπό κενό. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_8\text{Ru}$: C: 62,04%, H: 4,20%, N: 9,00 (θεωρητικά: C: 62,13%, H: 4,13%, N: 9,06%). Απόδοση: $32,0\% \pm 6,5\%$ (μέσος όρος επτά επαναλήψεων).

8.2.3. Σύνθεση των πεπτιδικών παραγώγων των συμπλόκων του Ru(II).



Στο σύμπλοκο Λ ή Δ -[Ru(bpy)₂(py)₂]A, οι δύο πυριδίνες αντικαθίστανται από τον χηλικό μονοκαρβοξυλικό υποκαταστάτη m-OH σε ένα στάδιο. Σε επόμενο στάδιο η καρβοξυλομάδα μετατρέπεται στον αντίστοιχο ηλεκτρουλοεστέρα (m-OSu). Το σύμπλοκο που σχηματίζεται, Λ - ή Δ -[Ru(bpy)₂(m-OSu)](PF₆)₂ χρησιμοποιείται για την αντίδραση με το πεπτίδιο, το οποίο έχει συντεθεί με πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση (SPPS) και βρίσκεται συνδεδεμένο στο στερεό υπόστρωμα. Ακολουθεί η αναλυτική περιγραφή των σταδίων αυτών.

8.2.3.1. Σύνθεση του Λ - ή Δ -[Ru(bpy)₂(m-OH)](PF₆)₂.

Κρύσταλλοι του Λ - ή Δ -[Ru(bpy)₂(py)₂]A (0,38 g) και m-OH (0,105 g) προστίθενται σε διάλυμα αιθανόλης 70 % (v/v) σε νερό (10 ml) και το μίγμα θερμαίνεται σε συσκευή reflux για όλη τη νύχτα. Το μίγμα της αντίδρασης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και συμπυκνώνεται με εξάτμιση υπό κενό μέχρι όγκου περίπου 3 ml. Το μίγμα της αντίδρασης παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας. Στη συνέχεια διηθείται και το ίζημα εκπλένεται με νερό (2 × 20 ml). Το διήθημα οξυνίζεται μέχρι pH = 1 με προσθήκη υπό ισχυρή ανάδευση στάγδην υδατικού διαλύματος 60% HPF₆. Το πορτοκαλί ίζημα συλλέγεται με διήθηση με ηθμο Gooch, εκπλένεται με νερό (2 × 5 ml), διαιθυλαιθέρα (2 × 5 ml) και θερμαίνεται στο πυριατήριο στους 110 °C για όλη τη νύχτα για να παραχθεί καθαρό Λ - ή Δ -[Ru(bpy)₂(m-OH)](PF₆)₂ χρώματος κόκκινου. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το C₃₂H₂₆N₆O₂P₂F₁₂Ru: C: 40,20%, H: 2,94%, N: 9,32 (θεωρητικά: C: 40,49%, H: 2,86%, N: 9,16%). Απόδοση: 83,1% ± 5,9% (μέσος όρος επτά επαναλήψεων).

8.2.3.2. Σύνθεση του Λ - ή Δ -[Ru(bpy)₂(m-OSu)](PF₆)₂.

Στερεό DCC (0,675 g, 3,27 mmol) προστίθεται υπό ανάδευση σε διάλυμα του [Ru(bpy)₂(m-OH)](PF₆)₂ (2,0 g, 2,18 mmol) και HOSu (0,263 g, 2,29 mmol) στην ελάχιστη δυνατή ποσότητα CH₃CN. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια διηθείται υπό κενό με ηθμό Gooch και στο διήθημα προστίθεται υπό ισχυρή ανάδευση 2-προπανόλη (200 ml) οπότε και σχηματίζεται πορτοκαλί στερεό. Το μίγμα τοποθετείται στους -10° για 1 ώρα και στη συνέχεια διηθείται. Το ίζημα εκπλένεται με αιθέρα (3 × 30 ml) και ξηραίνεται. Μια μικρή ποσότητα του [Ru(bpy)₂(m-OH)](PF₆)₂ μπορεί να ανακτηθεί αν το διήθημα εξατμιστεί μέχρι ξηρού, το υπόλειμμα διαλυθεί στη συνέχεια σε CH₃CN (2,0 ml) και στο διάλυμα που σχηματίζεται προστεθεί 2-

προπανόλη (150 ml) οπότε και θα σχηματιστεί πορτοκαλί στερεό. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το $C_{32}H_{29}N_7O_4P_2F_{12}Ru$: C: 42,50%, H: 2,84%, N: 9,62% (θεωρητικά: C: 42,61%, H: 2,88%, N: 9,66%). Απόδοση: $50,4\% \pm 14,1\%$ (μέσος όρος επτά επαναλήψεων).

8.2.3.3. Σύνθεση του Λ - ή Δ -[Ru(bpy)₂(m-peptide)]Cl₂.

Για τη σύζευξη του πεπτιδίου με την 4-καρβοξυλομάδα χρησιμοποιήθηκε πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση. Ακολουθήθηκε η στρατηγική Fmoc όπου ως στερεό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η ρητίνη 2-χλωροτριτυλ-H-Linker. Ως μέσο αποπροστασίας των αμινομάδων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα πιπεριδίνης 20% (v/v) σε DMF. Ως αντιδραστήριο σύζευξης χρησιμοποιήθηκε το DCC και το HOBt ως βοηθητικό πυρηνόφιλο. Το κόσμιμο από τη ρητίνη και η τελική αποπροστασία των ομάδων των πλευρικών αλυσίδων πραγματοποιήθηκαν σε ένα βήμα με ανάμιξη της ρητίνης με διάλυμα TFA 90% (v/v) σε DMF, το οποίο περιείχε ανισόλη 1-2% (v/v) για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών. Το τελικό προϊόν Λ - ή Δ -[Ru(bpy)₂m-peptide]²⁺ απομονώθηκε ως τριφθοροξικό άλας το οποίο δεν διαλύεται σε νερό. Η αντικατάσταση του τριφθοροξικού ανιόντος από ανιόν χλωρίου με ανάμιξη διαλύματος του συμπλόκου σε ακετόνη με κορεσμένο διάλυμα LiCl επίσης σε ακετόνη. Το πορτοκαλί στερεό που καταβυθίζεται με αυτό τον τρόπο είναι το χλωριούχο άλας το οποίο είναι υδατοδιαλυτό. Το τελικό σύμπλοκο καθαρίζεται με HPLC ανάστροφης φάσης με χρωματογράφο DIONEX και στήλη Waters C18. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι ακετονιτρίλιο και νερό καθαρότητας HPLC και περιέχουν 0,1% (v/v) TFA. Η αρχική αναλογία των διαλυτών είναι H₂O:CH₃CN 90:10, η οποία ελαττώνεται σταδιακά (gradient) μέσα σε 40 λεπτά σε H₂O:CH₃CN 20:80.

Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το Δ -[Ru(bpy)₂{(m-GHK).2HCl}]Cl₂, C₄₅H₅₁Cl₄N₁₃O₄Ru: C: 50,09%, H: 4,73%, N: 16,92% (θεωρητικά: C: 50,01%, H: 4,76%, N: 16,85%). Για το Λ -[Ru(bpy)₂{(m-GHK).2HCl}]Cl₂, C₄₅H₅₁Cl₂F₁₂N₁₃O₄P₂Ru: C: 49,93%, H: 4,82%, N: 16,75%. Για το Δ -[Ru(bpy)₂{(m-7p).2HCl}]Cl₂, C₆₄H₈₁Cl₄N₂₃O₁₁Ru: C: 48,22%, H: 5,25%, N: 20,16% (θεωρητικά: C: 48,30%, H: 5,13%, N: 20,24%) και για το Λ -[Ru(bpy)₂{(m-7p).2HCl}]Cl₂: C: 48,38%, H: 5,18%, N: 20,28%. Απόδοση για το [Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂: $39,7\% \pm 18,8\%$ (μέσος όρος τριών επαναλήψεων). Απόδοση για το [Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂: $18,1\% \pm 1,3\%$ (μέσος όρος δύο επαναλήψεων).



8.3. Φασματοσκοπικές τεχνικές

8.3.1. Φασματοσκοπία NMR.

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν τα εξής όργανα: Varian Unity-500 MHz (Κέντρο φασματοσκοπίας NMR του Πανεπιστημίου του Τορόντο, Τορόντο, Καναδάς) και Bruker Avance 600 και 800 MHz (Κέντρο φασματοσκοπίας NMR, CERM, Φλωρεντία, Ιταλία). Τα φάσματα ^1H -NMR μίας διάστασης καταγράφηκαν στους 298 K. Όλα τα φάσματα δύο διαστάσεων καταγράφηκαν με τετραπολική ανίχνευση και στις δύο διαστάσεις χρησιμοποιώντας τη μέθοδο TPPI. Τα φάσματα ^1H NOESY καταγράφηκαν σε χρόνους μίξης 80-400 ms και τα ^1H TOCSY στα 60-120 ms. Τα φάσματα ^1H DQF COSY συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο TPPI, με φασματικό εύρος 3125 Hz και σύνολο 2048×256 σημείων. Ως αναφορά χρησιμοποιήθηκε το σήμα του HOD στα 4,75 ppm.

Η ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου εκτιμάται αρχικά με τη ζύγιση και στη συνέχεια η συγκέντρωση του δείγματος προσδιορίζεται βάσει της απορρόφησής του στα 260 nm [221] σύμφωνα με τη σχέση: $C_{\text{oligo}} = A_{260} / E_{\text{oligo}} \cdot I$, όπου C_{oligo} είναι η συγκέντρωση του ολιγονουκλεοτιδίου σε $\mu\text{g/ml}$, A_{260} είναι η απορρόφηση στα 260 nm, E_{oligo} είναι ο ειδικός συντελεστής μοριακής απορρόφησης σε $(\mu\text{g/ml})^{-1}\text{cm}^{-1}$ (για διπλής έλικας DNA, 1 OD αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$ όταν χρησιμοποιείται κυψελίδα του 1 cm) και I είναι το μήκος διαδρομής της κυψελίδας σε cm. Σε όλα τα πειράματα NMR χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM (pH=7,00). Τα δείγματα λυοφιλοποιούνται μέχρι ξηρού και στη συνέχεια διαλύονται σε D_2O (99,96%) και λυοφιλοποιούνται ξανά μέχρι ξηρού. Ακολούθως, επαναδιαλύονται σε 0,5 ml D_2O (99,996) και μεταφέρονται σε σωληνάκια NMR 5mm. Τα δείγματα σε διαλύτη 90% H_2O και 10% D_2O παρασκευάζονται με διάλυση του δείγματος σε 0,45 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα των φωσφορικών και προσθήκη 0,05 ml D_2O . Η τελική συγκέντρωση του ολιγονουκλεοτιδίου είναι ~1-2 mM. Η κατάλληλη ποσότητα του συμπλόκου του Ru(II) ζυγίζεται σε ζυγό υψηλής ακρίβειας – πέντε δεκαδικών ψηφίων – και προστίθεται στο ήδη παρασκευασμένο διάλυμα του ολιγονουκλεοτιδίου.

8.3.2. Φασματοσκοπία μάζας (Electrospray Mass Spectrometry).

Τα φάσματα ESI-MS καταγράφηκαν σε τετραπολικό φασματογράφο Micromass Q-TOF (Κέντρο φασματοσκοπίας μάζας, Hospital for Sick Children, Τορόντο, Καναδάς). Όλα τα



φάσματα καταγράφηκαν στη λειτουργία TOF (time of flight), με θερμοκρασία πηγής 80 °C και τάση $\Delta CS = 100 - 120V$ ώστε να επιτευχθούν ήπιες συνθήκες στις διεπιφάνειες.

8.3.3. Φασματοσκοπία CD.

Τα φάσματα CD καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Jasco J-720 (Hospital for Sick Children, Τορόντο, Καναδάς). Για την περιοχή των 190-250 nm χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα διαδρομής 0,1 cm ενώ για την περιοχή των 250-540 nm χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα διαδρομής 2 cm. Τυφλό δείγμα (μόνο το ρυθμιστικό διάλυμα) καταγράφηκε και αφαιρέθηκε από τα φάσματα όλων των δειγμάτων. Για την επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microcal Origin 6.0.

8.3.4. Κατασκευή μοριακών μοντέλων.

Τα μοριακά μοντέλα τριών διαστάσεων κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα HyperChem v.6.0. Το μοντέλο της διπλής έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου $[d(CGCGAATTCGCG)_2]$ κατασκευάστηκε ως μια τυπική δομή DNA B-τύπου με διαμόρφωση του σακχάρου C2' *endo* χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων του προγράμματος. Το σύμπλοκο του Ru(II) κατασκευάστηκε μέσω δύο βημάτων. Πρώτα κατασκευάστηκε η σφαίρα ένταξης του Ru(II) χρησιμοποιώντας δεδομένα από κρυσταλλικές δομές παρόμοιων συμπλόκων [221]. Σε δεύτερη φάση, συνδέθηκε το πεπτίδιο στη θέση 4' του υποκαταστάτη *m*. Στη συνέχεια, το σύμπλοκο τοποθετήθηκε κοντά στη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου λαμβάνοντας υπόψη τα διαμοριακά NOE που παρατηρήθηκαν ως περιορισμούς αναφορικά με την απόσταση. Οι κορυφές διασταύρωσης (NOE cross peaks) ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: ασθενείς (5 Å), μέτριες (4 Å) και ισχυρές (3 Å) ανάλογα με το ολοκλήρωμά τους συγκριτικά με το αντίστοιχο της cross-peak C H5/C H6. Στη συνέχεια, βρέθηκε η διαμόρφωση με την ελάχιστη ενέργεια χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο AMBER. Από διάφορους συνδυασμούς των διαμοριακών NOE προέκυψαν διάφορα μοντέλα από τα οποία επιλέχτηκε αυτό που βρισκόταν σε καλύτερη συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα. Τα τελικά σχήματα των δομών έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος RasMol v. 2.6.



Κεφάλαιο

9

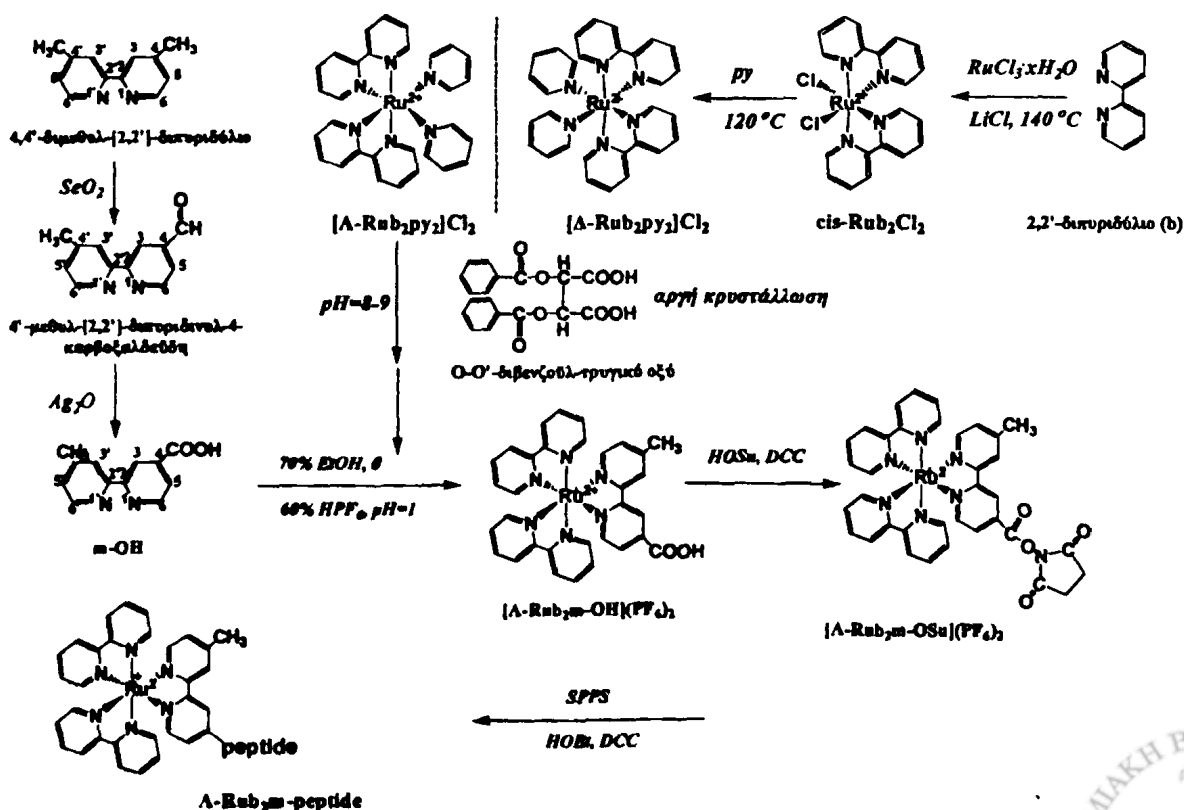
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ



9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

9.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

Η συνθετική πορεία των συμπλόκων Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-peptide)]Cl₂ (όπου peptide= Gly-His-Lys-CONH₂ ή Arg-Gly-Asn-Ala-His-Glu-Arg-CONH₂) συνοψίζεται στο σχήμα 9.1. Η σύνθεση των συμπλόκων cis-Ru(bpy)₂Cl₂, Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(py)₂]A (όπου A=O-O'-διβενζοϋλ-τρυνγικό οξύ) πραγματοποιήθηκε βάσει της βιβλιογραφίας [70, 217-218]. Τα σύμπλοκα Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(py)₂]²⁺ μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση τρις χηλικών συμπλόκων με περαιτέρω αντικατάσταση των δύο πυριδινών από χηλικό υποκαταστάτη χωρίς να αλλάξει η απόλυτη διαμόρφωση του συμπλόκου [222]. Συνεπώς, η προσθήκη του χηλικού υποκαταστάτη m-OH δε μεταβάλλει την απόλυτη διαμόρφωση του συμπλόκου. Η συνθετική πορεία του υποκαταστάτη m-OH καθώς και το στάδιο προσθήκης του στο σύμπλοκο [Ru(bpy)₂py₂]²⁺ και της μετατροπής της καρβοξυλομάδας στον ηλεκτρυλο-εστέρα της βασίστηκαν στην εργασία του Peek και των συνεργατών του [219] με μικρές τροποποιήσεις. Το τελικό προϊόν προέκυψε από την προσθήκη του συμπλόκου [Ru(bpy)₂(m-OSu)]²⁺ στο πεπτίδιο το οποίο είχε συντεθεί με πεπτιδική σύνθεση σε στερεά φάση (SPPS).

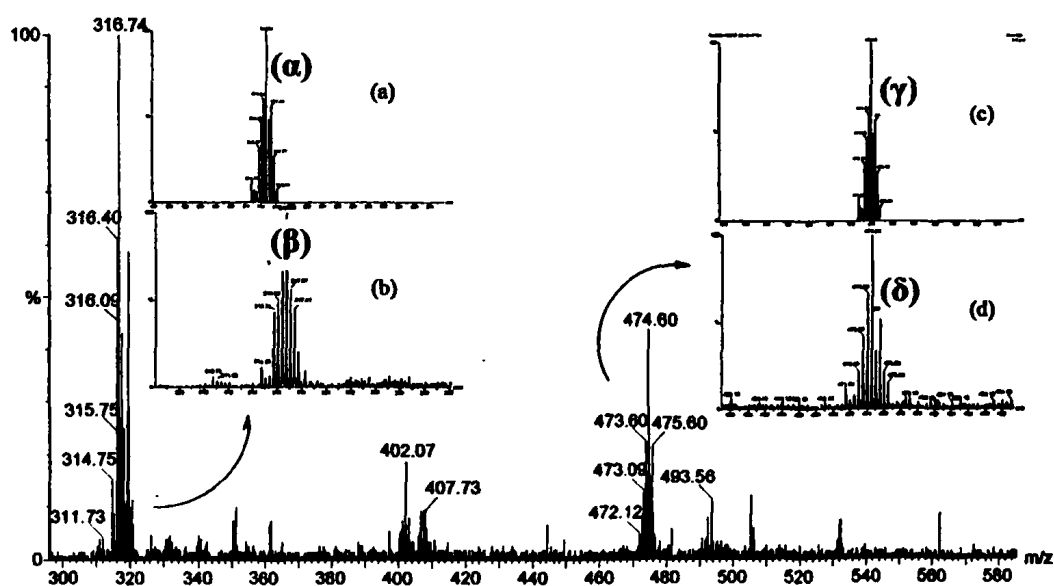
Σχήμα 9.1. Πορεία σύνθεσης των συμπλόκων Λ και Δ -[Ru(bpy)₂(m-peptide)]Cl₂.

Όλα τα ενδιαμέσα προϊόντα της παραπάνω συνθετικής πορείας χαρακτηρίστηκαν με στοιχειακή ανάλυση, φασματοσκοπία ^1H NMR μίας διάστασης και φασματοσκοπία υπερύθρου και ορατού. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που προέκυψαν από τις παραπάνω μετρήσεις βρέθηκαν σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία και δίνονται στο Παράρτημα ΙΙΙ. Για το χαρακτηρισμό των τελικών προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν κυρίως φασματοσκοπία ^1H NMR 1D και 2D, φασματοσκοπία ορατού, κυκλικού διχρωϊσμού και μάζας (ESI-MS). Ο χαρακτηρισμός των τελικών προϊόντων έχει ιδιαίτερη σημασία για τη μετέπειτα σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα από την αλληλεπίδρασή τους με ολιγονουκλεοτίδια. Θα ήταν λοιπόν σκόπιμο αυτά να περιγραφούν σε ξεχωριστή ενότητα.

9.1.1. Χαρακτηρισμός των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂

9.1.1.1 Φασματοσκοπία μάζας (ESI-MS).

Τα φάσματα μάζας των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-bpy-GHK)]Cl₂ σε υδατικό διάλυμα ελήφθησαν με τη μέθοδο time-of-flight (TOF) ώστε να ανιχνευτούν όλα τα ιόντα ταυτόχρονα [223]. Και τα δύο φάσματα είναι γενικά παρόμοια και εμφανίζουν κυρίως δύο κορυφές υψηλής έντασης στα 474,58 και 316,74 m/z (σχήμα 9.2), οι οποίες προέρχονται από το ίδιο ιόν, το $[\text{RuC}_{46}\text{H}_{49}\text{N}_{13}\text{O}_4]^{+2}$ (με μοριακό βάρος 948,30). Η πολλαπλότητα της κάθε

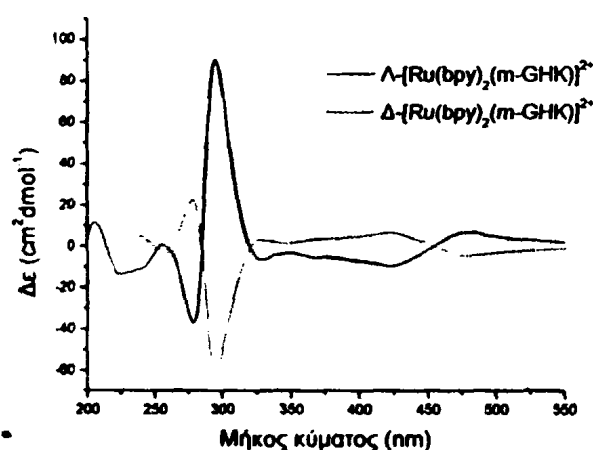


Σχήμα 9.2. Φάσμα ESI-MS του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-Gly-His-Lys-CONH}_2)]^{2+}$. Βλέπουμε επίσης σε μεγέθυνση τις κορυφές στα 316,74 (α και β) και στα 474,60 (γ και δ).

κορυφής, όπως αυτή φαίνεται και στις μεγεθύνσεις του σχήματος 9.2, οφείλεται στην παρουσία των διαφόρων ισοτόπων του ρουθηνίου τα οποία βάσει της φυσικής αφθονίας τους δίνουν χαρακτηριστικό φάσμα μάζας. Η επιβεβαίωση της παρουσίας του ρουθηνίου από το ισοτοπικό pattern έγινε με χρήση της βάσης δεδομένων του προγράμματος επεξεργασίας φασμάτων μάζας MassLynx 3.3. Η κορυφή υψηλής έντασης στα 474,58 m/z προέρχεται από το κατιόν $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-Gly-His-LysNH}_2)]^{+2}$, στο οποίο τόσο το ιμιδαζόλιο της ιστιδίνης όσο και η αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης είναι αποπρωτονιωμένα. Η κύρια κορυφή του φάσματος στα 316,74 m/z προέρχεται από το κατιόν $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-Gly-His-LysNH}_2 + \text{H}^+)]^{+3}$, όπου πιθανότατα η ε-αμινομάδα της λυσίνης ($\text{pK}_a = 10,4$) είναι πρωτονιωμένη και όχι το ιμιδαζόλιο της ιστιδίνης ($\text{pK}_a = 6,2$) [224].

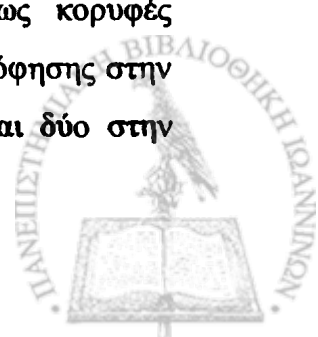
9.1.1.2. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού.

Τα φάσματα CD των διαστερομερών Λ και Δ (σχήμα 9.3) δεν έχουν ακριβώς τη σχέση ειδώλου-κατόπτρου όπως και φυσικά είναι αναμενόμενο λόγω της παρουσίας των επιπλέον



Σχήμα 9.3. Φάσματα CD των Λ - και Δ -(διακεκομμένη γραμμή) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}$ στην περιοχή 200-550 nm.

χειρικών κέντρων στο συνδεδεμένο πεπτιδίο. Η απόλυτη διαμόρφωση των συμπλόκων επιβεβαιώθηκε με σύγκριση των φασμάτων CD με φάσματα παρόμοιων συμπλόκων γνωστής διαμόρφωσης [70, 222, 225]. Τα φάσματα των δύο διαστερομερών παρουσιάζουν μέγιστα στα λ_{max} (nm) με $\Delta\epsilon$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 479 nm (+6,7), 422 nm (-9,6), 295 nm (+90,1), 278 nm (-36,9), 226 nm (-13,5), 205 nm (+11,7), 195 nm (-14,8) για το Λ -ισομερές και στα 479 nm (-4,6), 421,5 nm (+6,4), 295 nm (-60,8), 278 nm (+22,6), 225 nm (+5,2), 204 nm (-18,6), 190 nm (-11,5) για το Δ -ισομερές. Βάσει του φάσματος απορρόφησης του $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ [35-36], η κορυφή υψηλότερης ενέργειας στην περιοχή 190-240 nm προέρχεται από μεταπτώσεις $\pi-\pi^*$ του διπυριδυλίου όπως και η ισχυρή ταινία που παρατηρείται κοντά στα 300 nm (σημείο Cotton 285 nm). Ταινίες MLCT παρατηρούνται ως κορυφές χαμηλότερης ενέργειας στην περιοχή 190-250 nm και ως ταινία ισχυρής απορρόφησης στην περιοχή του ορατού. Οι d-d μεταπτώσεις, δύο στην περιοχή 200-250 nm και δύο στην



περιοχή 300-350 nm συνεισφέρουν στην τελική σύνθετη μορφή του φάσματος. Το συνδεδεμένο πεπτίδιο GHK είναι πολύ μικρό και δεν υιοθετεί δομή α-έλικας ή β-φύλλου. Τα πεπτίδια με τυχαία διαμόρφωση δίνουν ισχυρή κορυφή στο φάσμα CD στα περίπου 200 nm προερχόμενη από τη μετάπτωση $\pi-\pi^*$ του πεπτιδικού δεσμού [226]. Συνεπώς, η προερχόμενη από το GHK ταινία εμφανίζεται στην ήδη συνωστισμένη περιοχή του άπω υπεριώδους του φάσματος CD των δύο ισομερών συμπλόκων.

9.1.1.3. Φασματοσκοπία ^1H NMR.

Η απόδοση των σημάτων ^1H NMR των διαστερεομερών Λ- και Δ- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(m\text{-GHK})]\text{Cl}_2$ βασίστηκε σε ομοπυρηνικά πειράματα 2D COSY και TOCSY. Οι χημικές μετατοπίσεις των δύο ισομερών φαίνονται στον πίνακα 9.1. Στα φάσματα και των δύο ισομερών, τα πρωτόνια των δύο διπυριδυλικών υποκαταστατών παρουσιάζουν τις ίδιες χημικές μετατοπίσεις, γεγονός που σημαίνει ότι είναι μαγνητικά ισοδύναμα. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι ο τρίτος μη συμμετρικός υποκαταστάτης *m*-GHK έχει αμελητέα επίδραση στα σήματα των πρωτονίων των διπυριδυλίων με αποτέλεσμα οι διαφορές στο μαγνητικό τους περιβάλλον να μην είναι ανιχνεύσιμες. Παρόμοια συμπεριφορά έχει επίσης παρατηρηθεί και για τα σύμπλοκα $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HPIP})]^{2+}$ [71] και $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{pqx})]^{2+}$ [227], όπου HPIP είναι η 2-(2-υδροξυφαινυλ)ιμιδαζο[4,5-*f*][1,10] φαινανθρολίνη και pqx είναι η 2-(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνη, οι οποίοι είναι μη συμμετρικοί χηλικοί υποκαταστάτες. Από την άλλη, ο υποκαταστάτης *m* παρουσιάζει διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις για τον κάθε πυριδυλικό δακτύλιο με σημαντικές διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων πρωτονίων. Ο πυριδυλικός δακτύλιος που είναι υποκατεστημένος από τη μεθυλομάδα στη θέση 4 παρουσιάζει παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις με τους πυριδυλικούς δακτυλίους των άλλων δύο διπυριδυλικών υποκαταστατών με τα πρωτόνια των γειτονικών θέσεων 3 και 5 να μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία κατά -0,06 και -0,04 ppm αντίστοιχα (πίνακας 9.1). Αντιθέτως, τα πρωτόνια H3' και H5' του άλλου πυριδυλικού δακτυλίου του *m* μετατοπίζονται προς χαμηλότερα πεδία κατά +0,29 ppm (H3') και +0,78 ppm (H5'), γεγονός που δείχνει ότι η υποκατάσταση στη θέση 4 από την ομάδα CO-GHK προκαλεί αποπροστασία των πρωτονίων αυτών ελαττώνοντας την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του πυριδυλικού δακτυλίου [228].

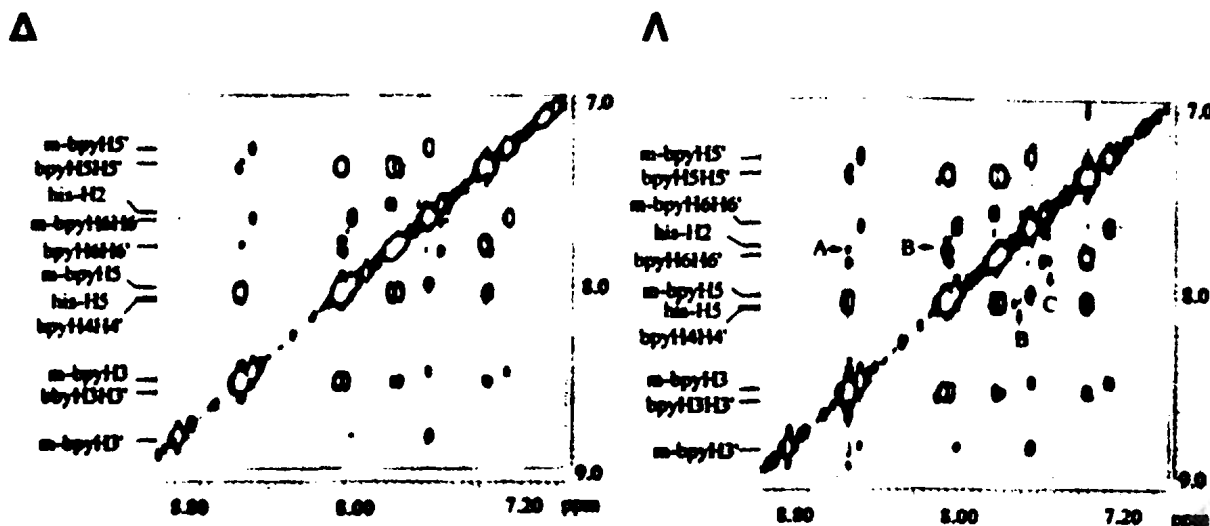


Πίνακας 9.1

Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR των διαστερεομερών Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}$ στους 298 Κ σε D_2O , $\text{pD}=7,0$ ($0,1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$).

Πρωτόνια	Δ -ισομερές	Λ -ισομερές	GHK*
H3 bpy	8,54	8,53	
H3' bpy	8,54	8,53	
H4 bpy	8,05	8,05	
H4' bpy	8,05	8,05	
H5 bpy	7,37	7,38	
H5' bpy	7,37	7,38	
H6 bpy	7,80	7,80	
H6' bpy	7,80	7,80	
H6 m	7,65	7,65	
H6' m	7,65	7,65	
H5 m	8,01	8,01	
H5' m	7,27	7,27	
4-CH ₃ m	2,54	2,54	
H3 m	8,48	8,47	
H3' m	8,83	8,83	
H _a Gly	4,17	4,17	3,84
H _a His	4,67	4,68	-
H _{β} His	3,15	3,17	3,21
H ₅ His	7,57	7,57	7,17
H ₂ His	7,83	7,68	8,18
H _a Lys	4,26	4,26	-
H _{β} Lys	1,80	1,79	1,92
H _{γ} Lys	1,35	1,34	1,40
H _{δ} Lys	1,67	1,670	1,76
H _{ϵ} Lys	2,97	2,97	3,00

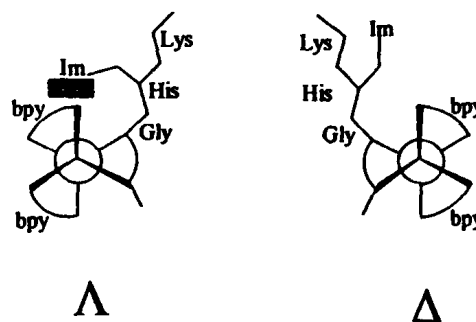
*Το πεπτίδιο GHK δεν προστατεύεται στα άκρα.



Σχήμα 9.4. Περιοχή των αρωματικών πρωτονίων των φασμάτων NOESY του Δ (πάνω) και του Λ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}$ (κάτω). A=H₂ His - H3,3' bpy, B=H₂ His - H4,4' bpy και C=H₂ His - H6,6' bpy.



Οι χημικές μετατοπίσεις των πεπτιδικών πρωτονίων είναι παρόμοιες για τα δύο διαστερομερή Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂, παρουσιάζοντας μικροδιαφορές της τάξεως του $\pm 0,01$ ppm, πλην του ιμιδαζολικού πρωτονίου H₂ της ιστιδίνης του Λ -ισομερούς, το οποίο μετατοπίζεται προς υψηλότερα πεδία κατά $-0,16$ ppm σε σύγκριση με το αντίστοιχο του Δ -ισομερούς. Το φαινόμενο αυτό πιθανότατα οφείλεται στη διαφορετική διαμόρφωση του πεπτιδίου στα δύο ισομερή με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο της ιστιδίνης να πλησιάζει στους πυριδυλικούς δακτυλίους στην περίπτωση του Λ -ισομερούς (σχήμα 9.4). Βάσει της μεθόδου που έχει προταθεί από τον Cheney [229], μέσω μιας ποιοτικής προσέγγισης, η παρατηρούμενη μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία κατά $-0,16$ ppm αντιστοιχεί σε περίπου 4-5 Å μεταξύ του επιπέδου ενός από τους πυριδυλικούς δακτυλίους και τα H₂ πρωτόνια του ιμιδαζολίου. Τα φάσματα NOESY και των δύο ισομερών είναι περίπου ίδια με την παρουσία διπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πυριδυλικών πρωτονίων του ίδιου ή του γειτονικού διπυριδυλικού υποκαταστάτη που εντάσσεται στο μεταλλοϊόν. Επιπλέον, στο φάσμα του Λ -ισομερούς παρατηρούνται τρία νέα cross-peak (σχήμα 9.4), τα οποία αποδίδονται στην αλληλεπίδραση των H3 ή H3' (A), H4 ή H4' (B) και H6 ή H6' (C) πρωτονίων του bpy με τα αρωματικά πρωτόνια H₂ του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης και είναι ενδεικτικά του διαφορετικού προσανατολισμού των δύο διαστερομερών. Μια τέτοια γεωμετρία έχει ως αποτέλεσμα ο ιμιδαζολικός δακτύλιος στην περίπτωση του Λ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ να πλησιάζει στον υποκαταστάτη bpy και πιθανότατα να αλληλεπιδρά μέσω π -stacking, γεγονός που δεν παρατηρείται στην περίπτωση του Δ -ισομερούς (σχήμα 9.5).



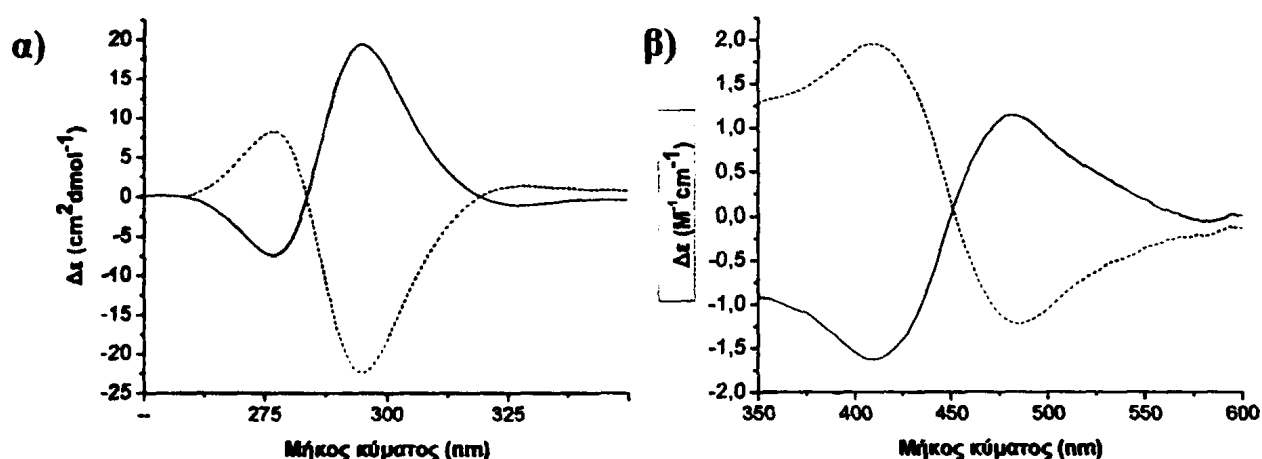
Σχήμα 9.5. Προτεινόμενες διαμορφώσεις για τα ισομερή Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺.

9.1.2. Χαρακτηρισμός των διαστερομερών Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂.

9.1.2.1. Φασματοσκοπία CD.

Τα φάσματα CD των δύο ισομερών στις περιοχές 250-350 nm και 350-600 nm φαίνονται στο σχήμα 9.6. Όπως και στην περίπτωση του πεπτιδίου GHK, έτσι κι εδώ η παρουσία χειρικών κέντρων στο μόριο του πεπτιδίου έχει ως αποτέλεσμα τα δύο σύμπλοκα να είναι διαστερομερή και όχι εναντιομερή και τα φάσματα τους δεν έχουν ακριβώς τη

σχέση ειδώλου-αντικειμένου. Έτσι, στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους, μεταπτώσεις $\pi-\pi^*$ του διυριδυλίου και d-d του μετάλλου οδηγούν στην παρουσία των εξής μεγίστων και ελαχίστων: λ (ε) 277 nm ($-7,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 295 nm ($+19,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) για το Λ -ισομερές και 277 nm ($+8,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 297 nm ($-22,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) για το Δ -ισομερές. Στην περιοχή του ορατού, μεταπτώσεις MLCT δίνουν τα παρακάτω ελάχιστα και μέγιστα: 407 nm ($-1,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) και 482 nm ($+1,1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) για το Λ -ισομερές και 408 nm ($+1,9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) και 484 nm ($-1,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) για το Δ -ισομερές.



Σχήμα 9.6. Φάσματα CD των ισομερών Δ - (διακεκομμένη γραμμή) και Λ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺ στις περιοχές 150-350 nm (α) και 350-600 nm (β).

9.1.2.2. Φασματοσκοπία ¹H NMR

Η απόδοση των σημάτων των πρωτονίων των Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺ βασίστηκε στα φάσματα ¹H NMR δύο διαστάσεων TOCSY και ROESY. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των δύο συμπλόκων δίνονται στον πίνακα 9.2. Παρατηρούμε ότι τα πρωτόνια των δύο διυριδυλικών υποκαταστατών παρουσιάζουν τις ίδιες χημικές μετατοπίσεις. Συνεπώς, οι δύο διυριδυλικοί υποκαταστάτες είναι μαγνητικά ισοδύναμοι και η επίδραση του τρίτου μη συμμετρικού υποκαταστάτη m-7p στα σήματα των δύο διυριδυλίων είναι αμελητέα όπως και στην περίπτωση του GHK. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των δύο ισομερών παρουσιάζουν μικρές διαφορές. Επιπλέον, δεν υπάρχουν ενδείξεις για το αν η ιστιδίνη, που βρίσκεται στην πέμπτη θέση της αλληλουχίας πλησιάζει τους διυριδυλικούς υποκαταστάτες όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση του Λ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺, όπου η ιστιδίνη



βρίσκεται στη δεύτερη θέση της αλληλουχίας και συνεπώς πιο κοντά στους αρωματικούς δακτυλίους του διτυριδυλίου.

Πίνακας 9.2

Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR των διαστερομερών Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$ στους 298 K σε 90% H_2O , 10% D_2O , $\text{pH}=7,0$ (0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$).

Πρωτόνια	Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$	Λ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$
4- CH_3 m	2,45	2,45
H3 m	8,39	8,39
H3' m	8,75	8,74
H5 m	7,21	7,19
H5' m	7,90	7,90
H6 m	7,55	7,55
H6' m	7,58	7,59
H3,3' bpy	8,45	8,45
H4,4' bpy	7,30	7,30
H5,5' bpy	7,97	7,97
H6,6' bpy	7,70	7,69
H _α Arg ^{1,7}	4,20	4,20
H _{β2} Arg ^{1,7}	1,70	1,67
H _{β3} Arg ^{1,7}	1,79	1,79
H _γ Arg ^{1,7}	1,57	1,59
H _δ Arg ^{1,7}	3,12	3,10
NH Arg ^{1,7}	8,26	8,27
H _α Gly ²	-	3,52
NH Gly ²	-	8,12
H _α Asn ³	4,51	4,51
H _{β2} Asn ³	2,62	2,59
H _{β3} Asn ³	2,62	2,63
NH Asn ³	8,12	8,09
H _α Ala ⁴	4,09	4,14
H _β Ala ⁴	1,21	1,24
NH Ala ⁴	8,23	8,25
H _α His ⁵	4,52	4,51
H _{β2} His ⁵	3,04	3,04
H _{β3} His ⁵	3,12	3,11
H ₂ His ⁵	8,00	7,94
H ₅ His ⁵	7,48	7,46
H _α Glu ⁶	4,17	4,17
H _{β2} Glu ⁶	1,86	1,86
H _{β3} Glu ⁶	1,96	1,96
H _γ Glu ⁶	2,13	2,12
NH Glu ⁶	8,22	8,19

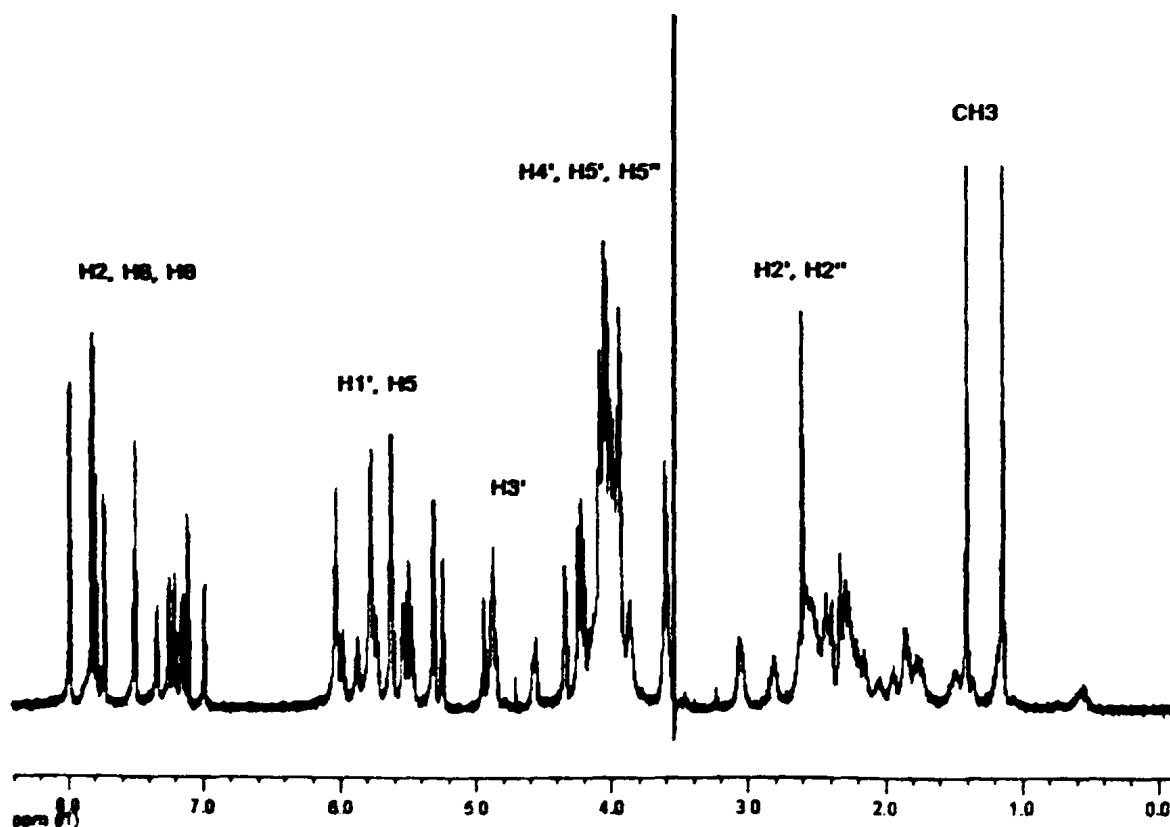


9.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ^1H NMR

9.2.1. Χαρακτηρισμός του $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$

9.2.1.1. Απόδοση των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων.

Η συμμετρία της αυτοσυμπληρούμενης αυτής αλληλουχίας διευκολύνει την ερμηνεία του φάσματος ^1H NMR, δεδομένου ότι ο συνολικός αριθμός των σημάτων μειώνεται στο μισό. Από την άλλη, το γεγονός ότι περιέχει την αλληλουχία που αναγνωρίζει και κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI* καθώς και ότι συνιστά έλικα με πλήρη στροφή είχε ως αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλά διαθέσιμα κρυσταλλογραφικά δεδομένα [230] και μελέτες της δομής με φασματοσκοπία NMR [231]. Παρακάτω θα περιγραφεί η διαδικασία απόδοσης των σημάτων, η οποία έχει καθιερωθεί για φάσματα ^1H NMR ολιγονουκλεοτιδίων και η οποία εφαρμόστηκε με παρόμοιο τρόπο για όλα τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

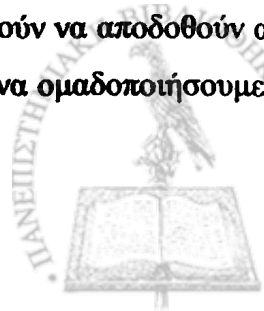


Σχήμα 9.7. Φάσμα ^1H NMR μίας διάστασης του $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ σε D_2O , στο οποίο φαίνονται οι διάφορες κατηγορίες των μη ανταλλάξιμων πρωτονίων.

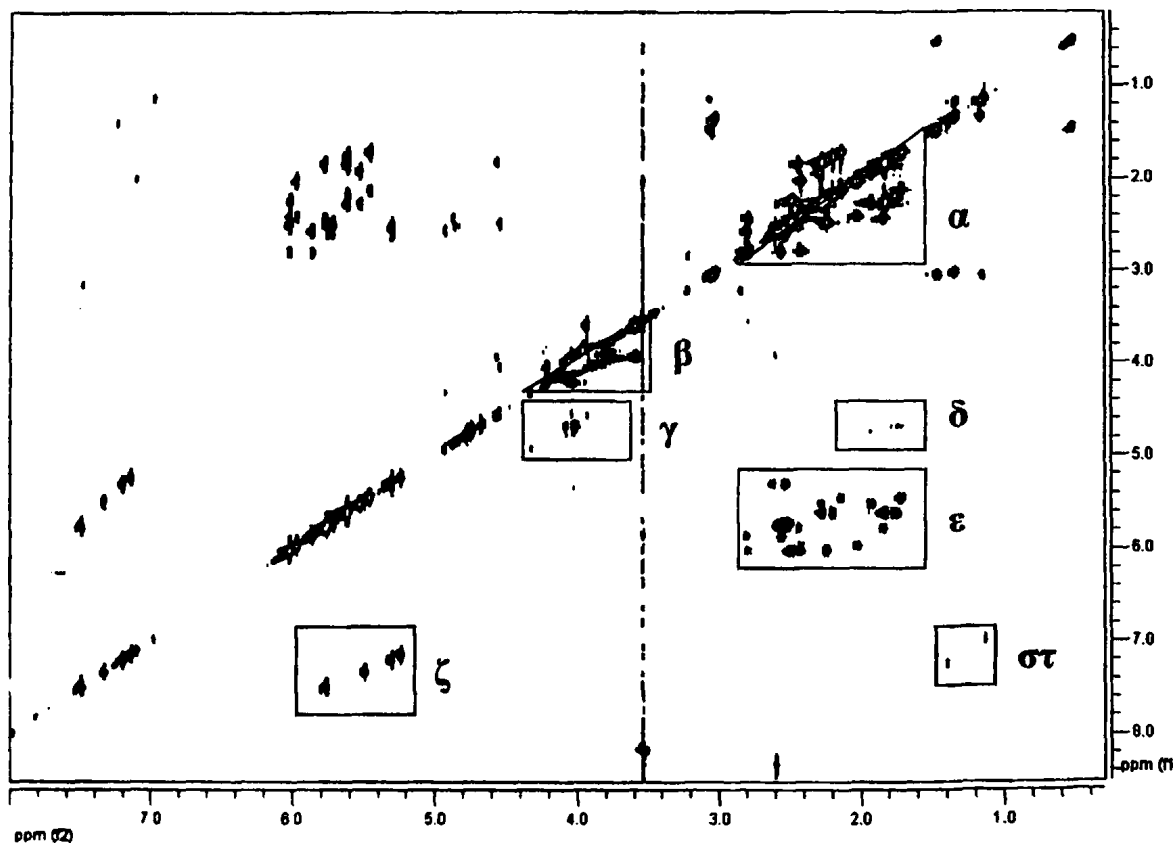


Η απόδοση των σημάτων των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων βασίζεται κυρίως στη φασματοσκοπία ^1H NMR δύο διαστάσεων και συγκεκριμένα σε πειράματα 2D DQF COSY και 2D NOESY. Το πείραμα COSY μας δίνει πληροφορίες για τη σύζευξη πρωτονίων που αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών ενώ το πείραμα NOESY αφορά πρωτόνια τα οποία συζεύγγονται μέσω χώρου. Το πείραμα DQF COSY, επιπλέον, σε σύγκριση με το απλό COSY, μας παρέχει το πλεονέκτημα της μεγαλύτερης ευκρίνειας cross-peak που βρίσκονται κοντά στη διαγώνιο και μπορεί να καλύπτονται από τις ουρές που σχηματίζονται από κορυφές υψηλής εντάσεων σημάτων όπως για παράδειγμα από το σήμα του HDO στα 4,65 ppm [234].

Στο σχήμα 9.7 βλέπουμε το φάσμα μίας διάστασης του $d(\text{C}_1\text{G}_2\text{C}_3\text{G}_4\text{A}_5\text{A}_6\text{T}_7\text{T}_8\text{C}_9\text{G}_{10}\text{C}_{11}\text{G}_{12})$ σε D_2O όπου και επισημαίνονται οι διάφοροι τύποι των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων [231]. Το φάσμα DQF COSY φαίνεται στο σχήμα 9.8. Η διάκριση των διαφορετικών περιοχών του φάσματος στις οποίες αντιστοιχούν διαφορετικοί τύποι πρωτονίων γίνεται άμεσα εμφανής με την παρατήρηση της ομαδοποίησης των κορυφών. Έτσι, η σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων του σακχάρου φαίνεται πολύ καθαρά στο φάσμα COSY (περιοχές α, β, γ και δ) όπου τα πρωτόνια του σακχάρου που ανήκουν στο ίδιο νουκλεοτίδιο σχηματίζουν τη δική τους υποομάδα. Κάθε πρωτόνιο $\text{H1}'$ συζεύγγεται με το $\text{H2}'$ και το $\text{H2}''$ (περιοχή ε) και η διάκρισή τους μπορεί να γίνει με σύγκριση των φασμάτων COSY και NOESY βάσει των διαφορών στη σύζευξη μεταξύ των H2 πρωτονίων με τα $\text{H1}'$ και $\text{H3}'$ πρωτόνια (βλέπε παρακάτω). Παρομοίως, κάθε $\text{H3}'$ πρωτόνιο συζεύγγεται με το αντίστοιχο $\text{H4}'$ (περιοχή γ), το οποίο με τη σειρά του συζεύγγεται με τα πρωτόνια $\text{H5}'$ (περιοχή β). Τα περισσότερα από τα $\text{H5}'$ και $\text{H5}''$ πρωτόνια δύσκολα διακρίνονται και αλληλεπικαλύπτονται με τις κορυφές των $\text{H4}'$ πρωτονίων. Τα ασθενή cross-peak που συνδέουν την περιοχή των 7 ppm με την περιοχή των 1 ppm (περιοχή στ) προέρχονται από τη σύζευξη μέσω τεσσάρων δεσμών μεταξύ της μεθυλομάδας και των H6 πρωτονίων των δύο θυμινών της αλληλουχίας. Η ομάδα ζ συνίσταται από τα αρωματικά πρωτόνια των πυριμιδινών. Στο DNA, τα μόνα αρωματικά πρωτόνια που συζεύγγονται είναι τα H5 και H6 της κυτοσίνης. Συνεπώς, τα τέσσερα ισχυρά cross-peak στην αρωματική περιοχή (ζ) προέρχονται από τη σύζευξη των H5 και H6 πρωτονίων των τεσσάρων κυτοσινών της αλληλουχίας. Συνεπώς, οι τέσσερις κυτοσίνες και οι δύο θυμίνες μπορούν να αποδοθούν από το φάσμα COSY. Ουσιαστικά λοιπόν, το φάσμα COSY μας επιτρέπει να ομαδοποιήσουμε τα

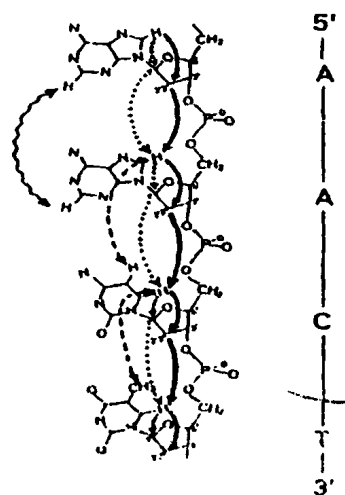


πρωτόνια ανάλογα με τη βάση ή το σάκχαρο στο οποίο ανήκουν μη παρέχοντας όμως πληροφορίες για τη θέση της βάσης αυτής ή του σακχάρου στην αλληλουχία.



Σχήμα 9.8. Φάσμα ^1H DQF COSY της διπλής έλικας $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ ($\text{pD}=7.0$, 25°C , 800 MHz). Οι περιοχές α-ζ αντιστοιχούν στις συζεύξεις των εξής πρωτονίων: α. $\text{H}2'-\text{H}2''$, β. $\text{H}4'-\text{H}5'$, $\text{H}4'-\text{H}5''$, $\text{H}5'-\text{H}5''$, γ. $\text{H}3'-\text{H}4'$, δ. $\text{H}2'-\text{H}3'$, $\text{H}2''-\text{H}3''$, ε. $\text{H}1'-\text{H}2'$, $\text{H}1'-\text{H}2''$, στ. $\text{H}5-\text{H}6$ και ζ. $5-\text{CH}_3-\text{H}6$ της T.

Τα περισσότερα από τα πρωτόνια που εμφανίζουν σύζευξη μέσω δεσμών είναι σε ικανή απόσταση ώστε να παρουσιάζουν και NOE cross-peak. Ωστόσο, πολλά είναι τα πρωτόνια τα οποία πλησιάζουν αρκετά χωρίς να παρουσιάζουν σύζευξη μέσω δεσμών όπως φαίνεται από την πληθώρα των cross-peak στο φάσμα NOESY συγκριτικά με το φάσμα COSY. Δεδομένου ότι η δεξιόστροφη διπλή έλικα του DNA σε υδατικό διάλυμα μπορεί να θεωρηθεί με ασφάλεια ως DNA B-τύπου, πολλοί συγγραφείς πρότειναν διαδικασίες για την απόδοση των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων σύμφωνα με τη

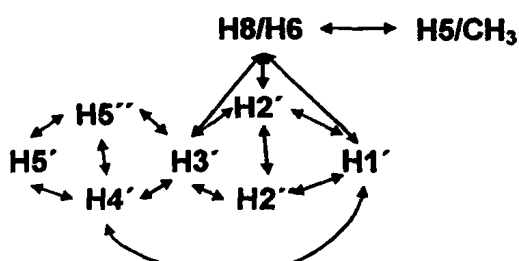


Σχήμα 9.9. Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων που μπορούν να δώσουν NOE στο β-DNA.

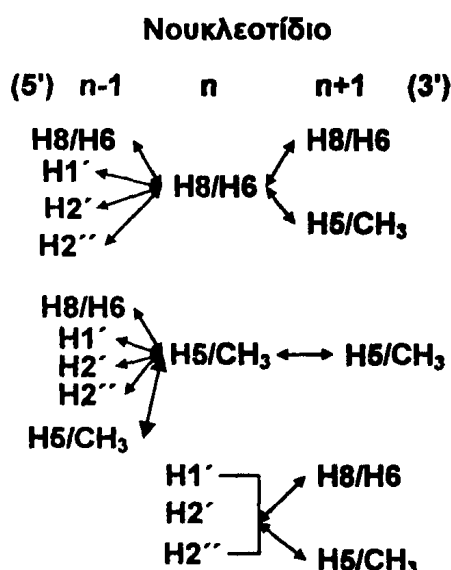
δεδομένη αλληλουχία χρησιμοποιώντας το φάσμα NOESY [2, 4-12]. Εκτός από μικρές διαφορές, όλες οι προτεινόμενες στρατηγικές βασίζονται στην απόδοση των σημάτων βάσει της αλληλουχίας όπως αυτή φαίνεται στο σχήμα 9.9. Ενώ μπορεί να φανεί από το σχήμα αυτό ότι η απόδοση των σημάτων θα μπορούσε να βασιστεί μόνο στο φάσμα NOESY, εντούτοις η απόδοση των κορυφών θα ήταν πιο ασφαλής σε συνδυασμό με το COSY ώστε να ταυτοποιηθούν σε πρώτη φάση τα συστήματα spin και έπειτα να ακολουθήσει η ταυτοποίηση της αλληλουχίας. Η βασισμένη στα NOE απόδοση των πρωτονίων μπορεί επίσης να συνοψιστεί διαγραμματικά στο σχήμα 9.10, το οποίο σύμφωνα με τον Clore και τους συνεργάτες του, δεν απαιτεί την αρχική υπόθεση της δεξιόστροφης έλικας [242].

Βάσει των σχημάτων 9.9 και 9.10, λοιπόν, σε οποιαδήποτε δεξιόστροφη έλικα, τα πρωτόνια H8 της πουρίνης ή τα H6 της πυριμιδίνης θα βρίσκονται κοντά στα H1' του δικού

1. Ενδονουκλεοτιδικές αποστάσεις



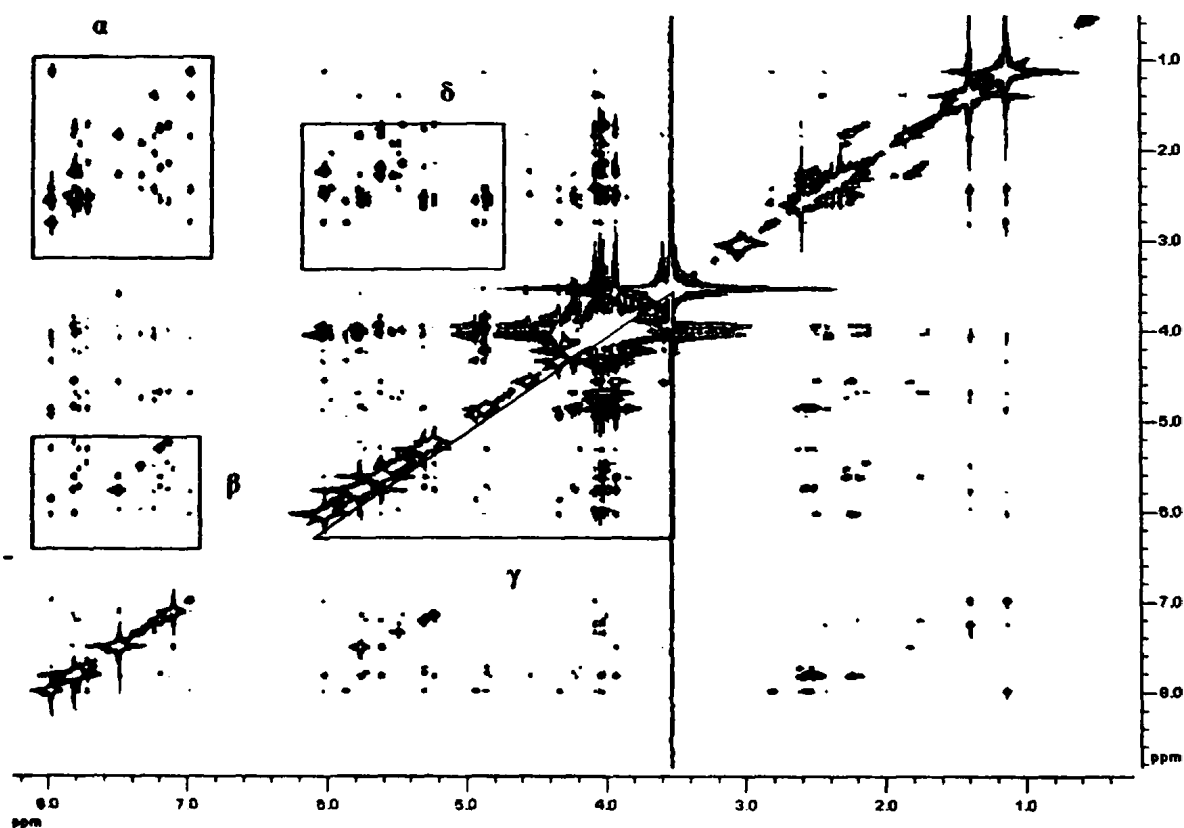
2. Διανουκλεοτιδικές αποστάσεις



Σχήμα 9.10. Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων $\leq 0,5$ nm σε β -DNA, απαραίτητων για την απόδοση των πρωτονίων σύμφωνα με την αλληλουχία και βάσει των NOE.

της σακχάρου και τα H1' του (n-1) σακχάρου (σύμφωνα με την αρίθμηση από το 5' προς το 3' άκρο της κάθε αλυσίδας). Αφού κάθε βάση θα έχει είτε H6 ή H8 πρωτόνιο, αυτή είναι μια αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού των γειτονικών νουκλεοτιδίων. Επιπλέον, το H6/H8 πρωτόνιο είναι επίσης κοντά με το H2'' πρωτόνιο της γειτονικής (n-1) δεοξυριβόζης (βλέπε σχήμα 9.9 και 9.10) το οποίο συζεύγνυται με το (n-1) H1'. Έτσι, η άμεση μέθοδος που χρησιμοποιεί το NOE (n) H6/H8 με το (n-1) H2'' παρέχει επιβεβαίωση για την απόδοση των σημάτων που γίνεται μέσω του NOE με τα (n-1) H1' πρωτόνια και τη σύζευξη μέσω δεσμών μεταξύ των H1' και H2'' πρωτονίων. Αν το πρωτόνιο H1' βρίσκεται σε μια συνωστισμένη περιοχή του φάσματος, το NOE με το H2'' αποτελεί μια εναλλακτική οδό σύνδεσης των ομάδων πρωτονίων και τη συνέχιση του προσδιορισμού της αλληλουχίας. Σε πολλές

αλληλουχίες παρατηρούνται και επιπλέον NOE τα οποία απλά επιβεβαιώνουν την απόδοση των σημάτων που έχει ήδη γίνει μέσω της θέσης H1'. Ωστόσο, επειδή εξαρτώνται από την αλληλουχία δεν μπορούν να συμπεριληφθούν σε μια γενική μέθοδο πλήρους χαρακτηρισμού.



Σχήμα 9.11. Φάσμα NOESY ($\tau_m=400$ ms) του $d(CGCGAATTCGCG)_2$.

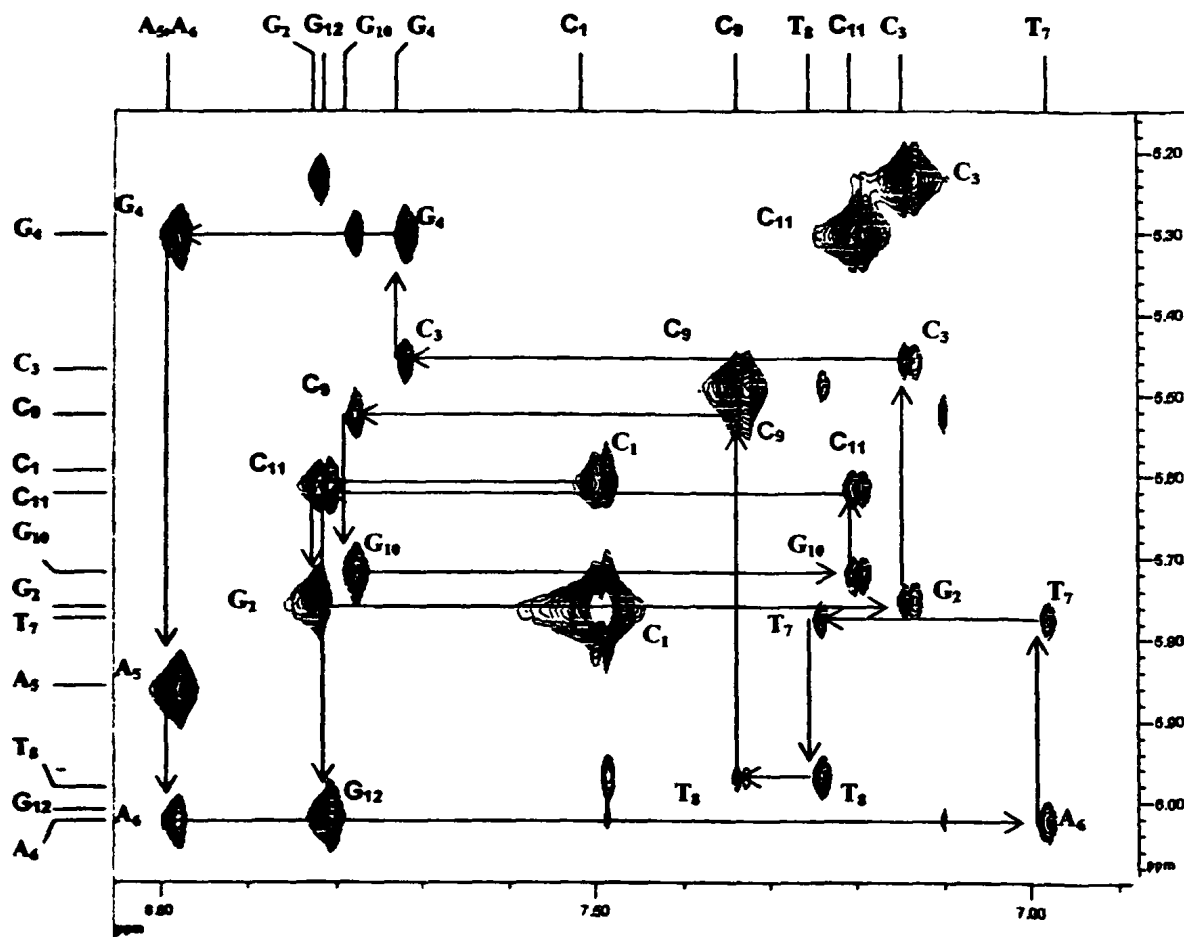
Επίσης, παρατηρούνται και άμεσα NOE μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων γειτονικών βάσεων. Στην περίπτωση των πυριμιδινών, NOE μπορεί να παρατηρηθεί μεταξύ του H5 της βάσης και του H6 ή H8 της (n-1) βάσης (στην περίπτωση της θυμίνης, αυτό το NOE αφορά την C5 μεθυλομάδα). Επιπλέον NOE παρατηρούνται μεταξύ του (n) H1' πρωτονίου και του (n+1) H5 πρωτονίου μιας πυριμιδίνης. Όπως προκύπτει από τα μοριακά μοντέλα, όταν μία πυριμιδίνη ακολουθείται από μία πουρίνη, θα πρέπει να παρατηρηθεί NOE από το H6 της πυριμιδίνης προς το H8 της πουρίνης. Η απόσταση μεταξύ των H8 πρωτονίων γειτονικών πουρινών είναι πολύ μεγάλη για να δώσει NOE και επιπλέον ένα τέτοιο cross-peak θα εμφανιζόταν κοντά στη διαγώνιο όπου συχνά εμφανίζονται ψευδείς κορυφές. Αν υπάρχουν διαδοχικές αδενίνες στην αλληλουχία σε οποιαδήποτε αλυσίδα, τότε παρατηρείται NOE μεταξύ των H2 πρωτονίων αν και αυτά δεν συνδέονται με άλλα πρωτόνια του σκελετού. Στο σχήμα 9.11, φαίνεται στο φάσμα NOESY του $d(CGCGAATTCGCG)_2$, όπου με α-δ



επισημαίνονται οι περιοχές των cross-peak που χρησιμοποιήθηκαν για την απόδοση των πρωτονίων.

Στο φάσμα NOESY του σχήματος 9.11 (περιοχή α), οι κορυφές των δύο μεθυλομάδων των θυμινών στα 1,24 και 1,51 ppm αποτελούν ένα πολύ καλό σημείο για την έναρξη απόδοσης της αλληλουχίας. Το H6 της θυμίνης στην οποία ανήκει μια συγκεκριμένη μεθυλομάδα προσδιορίζεται μέσω της ασθενούς σύζευξης της μέσω τεσσάρων δεσμών με αυτή τη μεθυλομάδα (περιοχή στ, σχήμα 9.8). Έτσι, τα αρωματικά πρωτόνια στα 7,09 και 7,35 ppm είναι τα H6 πρωτόνια των δύο θυμινών, από τα οποία το H6 στα 7,09 ppm αντιστοιχεί στη μεθυλομάδα στα 1,24 ppm. Η απόδοση των πρωτονίων H6 και της μεθυλομάδας που συνδέονται μέσω δεσμών βασίζεται στο γεγονός ότι η μεθυλομάδα της T₈ δίνει NOE cross-peak με τα H6 πρωτόνια και των δύο θυμινών ενώ η μεθυλομάδα της T₇ δίνει cross-peak με τα δικά της H6 και με τα αρωματικά πρωτόνια στα 8,09 ppm (περιοχή α, σχήμα 9.9). Οι μόνες γειτονικές βάσεις στις δύο θυμίνες είναι η A₆ και η C₉. Όμως, το γεγονός ότι η κορυφή στα 8,09 ppm δεν δίνει cross-peak με άλλο πρωτόνιο στο φάσμα COSY σημαίνει ότι ανήκει στην A₆. Επίσης, το γεγονός ότι το αρωματικό πρωτόνιο της T₇ βρίσκεται κοντά τόσο στη μεθυλομάδα της T₇ όσο και στη μεθυλομάδα της T₈ αποδεικνύει ότι η έλικα είναι δεξιόστροφη [231]. Έχοντας αναγνωρίσει τα πρωτόνια H6 και τις μεθυλομάδες των T₇ και T₈, κανείς μπορεί να προχωρήσει κατά μήκος της έλικας προς οποιαδήποτε από τις δύο κατευθύνσεις χρησιμοποιώντας τα NOE των αρωματικών προς τα H1' πρωτόνια (σχήμα 9.12). Το μόνο NOE που δεν παρατηρείται σε αυτή την περιοχή είναι από το H8 της G₂ προς το H1' της C₁. Αυτό πιθανόν να οφείλεται είτε στ' ότι η τελική δεοξυριβόζη υιοθετεί διαφορετική διαμόρφωση σε σχέση με τα υπόλοιπα σάκχαρα που βρίσκονται στο εσωτερικό της έλικας ή να είναι αποτέλεσμα της κίνησης του μορίου [231]. Όπως μπορεί κανείς να διαπιστώσει από το φάσμα μίας διάστασης στην περιοχή 12-14 ppm (βλέπε ενότητα 9.2.1.2), υπάρχει ταχεία ανταλλαγή των ίμινο πρωτονίων των δύο τελευταίων ζευγών που συνιστά άνοιγμα των δύο αλυσίδων στα άκρα [243]. Παρόλο που η απόδοση της κορυφής αυτής έγινε εξ' αποκλεισμού, το H1' πρωτόνιο μπορεί να αποδοθεί επίσης και από την περιοχή των H2'-H2'' όπως και τα υπόλοιπα. Από την περιοχή των cross-peak των αρωματικών προς τα H2'-H2'' και τις μεθυλομάδες του φάσματος NOESY (περιοχή α, σχήμα 9.8) και σε συνδυασμό με την περιοχή των cross-peak των H1' προς τα H2-H2'' (περιοχή δ, σχήμα 9.9) μπορεί να γίνει η επιβεβαίωση της απόδοσης των πρωτονίων H1' των C₁, G₂ και C₃.

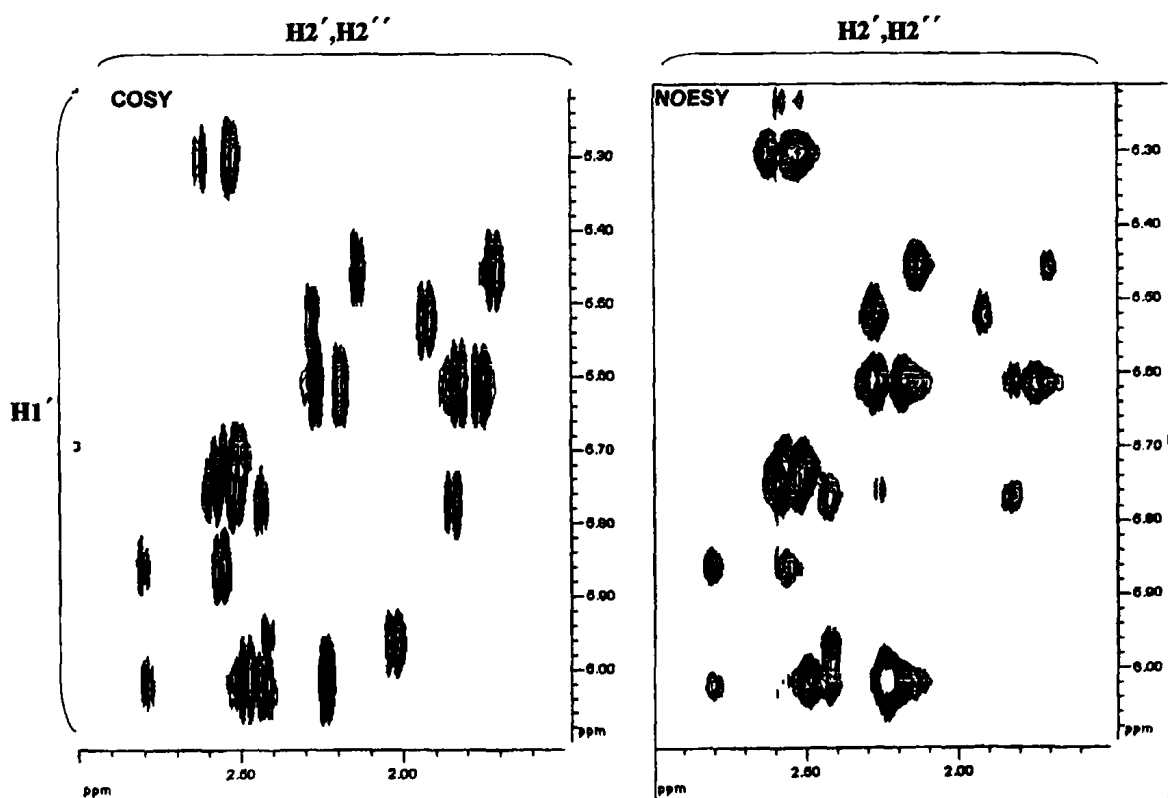




Σχήμα 7.12. Περιοχή του φάσματος NOESY όπου φαίνονται τα cross-peak μεταξύ της περιοχής των H8-H6 και της περιοχής H1'-H5. Φαίνεται η σύνδεση των νουκλεοτιδίων από το C₁ στο G₁₂ μέσω των NOE. Η προέλευση των H1' δίνεται στον αριστερό άξονα και των αρωματικών πρωτονίων στον άνω άξονα.

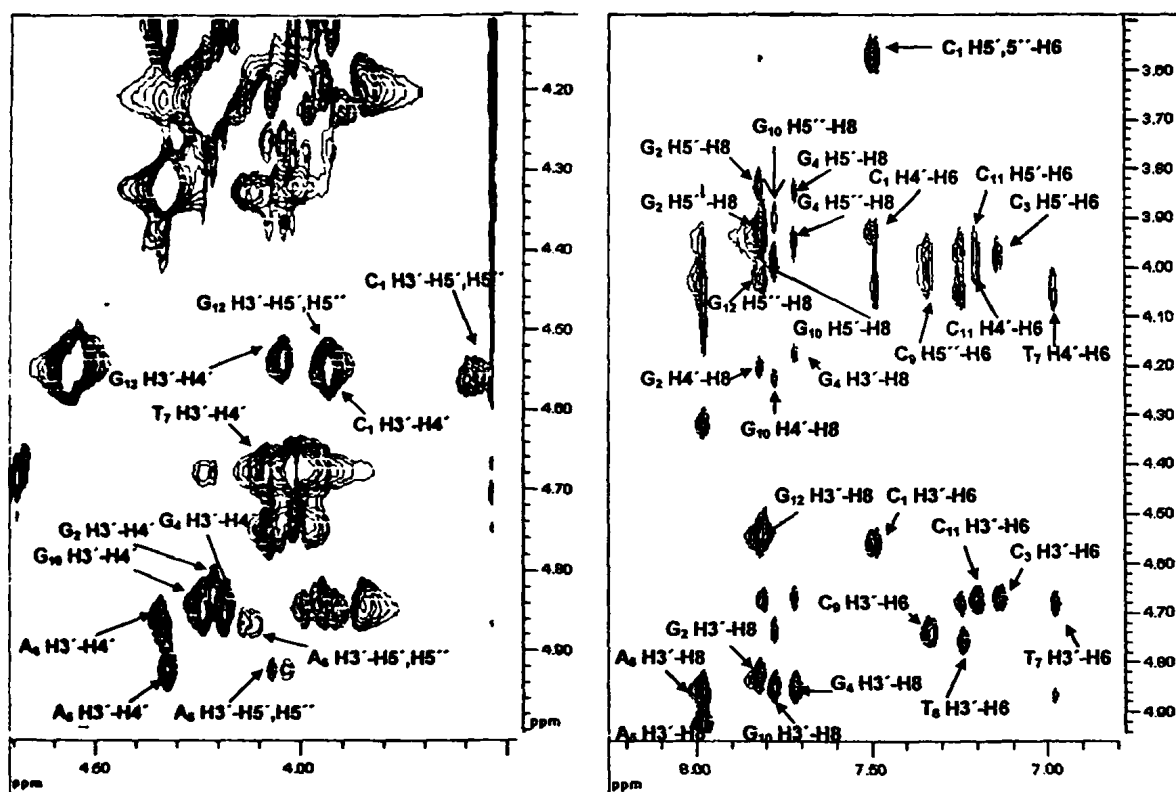
Αφού αποδοθούν οι κορυφές των πρωτονίων των βάσεων και των H1', το φάσμα COSY επαρκεί για την απόδοση όλων των εναπομείναντων πρωτονίων του σακχάρου. Στο σχήμα 9.13 φαίνονται οι περιοχές των cross-peak των H1' προς τα H2'-H2'' των φασμάτων COSY και NOESY. Τόσο τα H2' όσο και τα H2'' συζεύγνυνται ισχυρά με το H1'. Ωστόσο, οποιοδήποτε H2'' βρίσκεται πιο κοντά στο H1' απ' ό,τι το H2' κι έτσι δίνει πολύ πιο ισχυρό NOE cross-peak διευκολύνοντας το διαχωρισμό των H2' από τα H2''. Όπως και στην περίπτωση των αρωματικών πρωτονίων, το φάσμα NOESY παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τα πρωτόνια των σακχάρων. Για παράδειγμα, το NOE από το H1' προς το H3' μπορεί να παρατηρηθεί επιβεβαιώνοντας με αυτό τον τρόπο τη σύνδεση που ανευρίσκεται από το H1' στο H2' και από το H2' στο H3' στο φάσμα COSY. Παρομοίως, με προσεκτική μελέτη των περιοχών των H3', H4', H5' και H5'' πρωτονίων στα φάσματα COSY και NOESY μπορεί

κάνει να αποδώσει τις κορυφές των $H3'$ και $H4'$ πρωτονίων. Στην περιοχή γ του φάσματος NOESY υπάρχουν τα cross-peak μεταξύ των πρωτονίων $H3'$ και $H4'$ καθώς και μεταξύ των $H3'$ και $H4'$ με τα $H5'$ και $H5''$. Συνεπώς είναι φανερό ότι πρόκειται για μια συνωστισμένη περιοχή του φάσματος. Τα $H3'$ και $H4'$ μπορούν να αποδοθούν με σχετική ευκολία ιδιαίτερα αν χρησιμοποιηθεί και για επιβεβαίωση η περιοχή των αρωματικών με τα $H3'$ και $H4'$. Η απόδοση των $H5'$ και $H5''$ αποτελεί δύσκολη διαδικασία για τα περισσότερα ολιγονουκλεοτίδια. Στο συγκεκριμένο ολιγονουκλεοτίδιο, κατέστη δυνατή η απόδοση όλων των πρωτονίων της δεοξυριβόζης, ακόμα και των $H5'$ και $H5''$. Στο σχήμα 9.14 φαίνεται μία μεγέθυνση της περιοχής γ καθώς και της περιοχής των αρωματικών- $H3'$, $H4'$ και $H5'$, $H5''$, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την πλήρη απόδοση όλων των πρωτονίων της δεοξυριβόζης. Στον πίνακα 9.3 φαίνονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων όπως αυτές προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω.



Σχήμα 9.13. Περιοχές των cross-peak μεταξύ των πρωτονίων $H1'$ και $H2'-H2''$ στα φάσματα DQF-COSY (αριστερά) και NOESY (δεξιά).





Σχήμα 9.14. Περιοχή του φάσματος NOESY των πρωτονίων $H3'$ με τα $H4'$, $H5'$ και $H5''$ (αριστερά) και η περιοχή των αρωματικών με τα $H4'$, $H5'$ και $H5''$ (δεξιά).

Πίνακας 9.3. Οι χημικές μετατοπίσεις των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων του $d(CGCGAATTCGCG)$.

	CH ₃	H8/H6	H2/H5	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5', H5''
C ₁		7,60	5,88	5,72	1,94	2,39	4,68	4,04	3,68, 3,71
G ₂		7,93		5,88	2,62	2,68	4,95	4,32	3,96, 4,07
C ₃		7,25	5,35	5,56	1,83	2,26	4,79	4,11	4,11, 4,15
G ₄		7,83		5,42	2,63	2,75	4,97	4,30	3,97, 4,06
A ₅		8,09	7,21*	6,13	2,68	2,90	5,04	4,44	4,15, 4,18
A ₆		8,09	7,60*	5,97	2,49	2,90	4,99	4,45	4,23, 4,25
T ₇	1,24	7,09		5,88	1,94	2,53	4,80	4,18	4,16
T ₈	1,51	7,35		6,12	2,14	2,53	4,88	4,19	4,09
C ₉		7,44	5,60	5,64	2,04	2,43	4,85	4,13	4,09, 4,17
G ₁₀		7,89		5,83	2,62	2,68	4,97	4,35	4,03, 4,11
C ₁₁		7,31	5,42	5,72	1,87	2,31	4,80	4,14	4,09, 4,18
G ₁₂		7,92		6,13	2,62	2,36	4,66	4,15	4,03

* Η απόδοση των H2 πρωτονίων των αδενινών στηρίχτηκε στη μέθοδο απόδοσης των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων, η οποία περιγράφεται παρακάτω.



Από την παρατήρηση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του d(CGCGAATTCGCG) (Πίνακας 9.3) μπορούν να προκύψουν ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Κατ' αρχάς, φαίνεται ότι οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων H2' και H2'' βρίσκονται σε συγκεκριμένη περιοχή ανάλογα με το σε ποια βάση συνδέονται, με τα πρωτόνια της δεοξυριβόζης της κυτοσίνης να βρίσκονται σε χαμηλότερα πεδία ακολουθούμενα από τη θυμίνη, τη γουανοσίνη και την αδερίνη. Επίσης, τα πρωτόνια H2', με μόνη εξαίρεση αυτά των τελικών νουκλεοτιδίων, βρίσκονται σε χαμηλότερα πεδία από τα H2''. Τα σήματα των H8 πρωτονίων των πουρινών επίσης βρίσκονται πολύ κοντά ανάλογα με τη βάση στην οποία ανήκουν, με τα H8 των δυο αδενοσινών να έχουν την ίδια χημική μετατόπιση και τα H8 των τεσσάρων κυτοσινών να βρίσκονται σε χαμηλότερα πεδία αλλά με επίσης παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις.

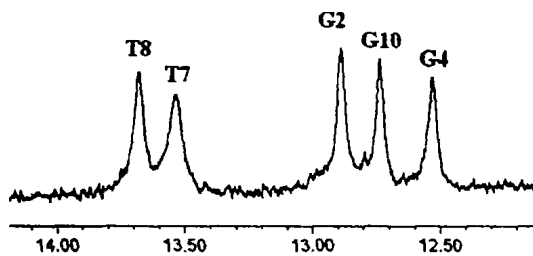
Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι στην πρώτη απόδοση των σημάτων ^1H NMR του δωδεκανουκλεοτιδίου d(CGCGAATTCGCG)₂ που έγινε από τον D. R. Hare και τους συνεργάτες του [231], προσδιορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των H1', H2', H3' και H4' του σακχάρου. Οι χημικές μετατοπίσεις που δίνονται στον πίνακα 9.1 βρίσκονται σε συμφωνία (διαφορές $\leq 0,03$ ppm) με τις αντίστοιχες που αναφέρονται στην παραπάνω εργασία. Η απόδοση των H5' και H5'' πρωτονίων του σακχάρου, μη εφικτή από τον D. R. Hare και τους συνεργάτες του [231], έγινε δυνατή για πρώτη φορά από τον Glaser και τους συνεργάτες του [243] με χρήση πειράματος TOCSY με παρατεταμένο χρόνο μίξης (500 ms). Ακολούθησε η πλήρης και πιο ακριβής απόδοση των πρωτονίων του σακχάρου μέσω ενός ετεροπυρηνικού πειράματος NMR τριών διαστάσεων ^{31}P - ^1H TOCSY-NOESY του οποίου η ακρίβεια είναι αδιαμφισβήτητη συγκριτικά με το πείραμα TOCSY παρατεταμένου χρόνου μίξης στο οποίο παρατηρούνται συνήθως θέρμανση του δείγματος και συσσώρευση τυχαίων σφαλμάτων φάσης [244]. Η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων του πίνακα 9.3 με τις αντίστοιχες της τελευταίας αυτής εργασίας έδειξε συμφωνία για τα πρωτόνια H3', H4' και τα περισσότερα H5'/H5'' (με διαφορές $\leq 0,03$ ppm). Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν για τα H5'/H5'' των νουκλεοτιδίων C₁, T₇, C₉ και C₁₁ όπου και στην περίπτωση των κυτοσινών παρατηρήθηκαν δύο κορυφές συγκριτικά με τη μία που προσδιορίστηκε από το 3D πείραμα. Χωρίς να τίθεται καμία αμφισβήτηση για την ακρίβεια ενός πειράματος 3D, οι διαφορές αυτές θα μπορούσαν να προέρχονται και από τον καλύτερο διαχωρισμό (resolution) των κορυφών που παρέχει το όργανο συχνότητας 800 MHz που χρησιμοποιήθηκε για τα



πειράματα αυτής της διατριβής συγκριτικά με το όργανο συχνότητας 500 MHz που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα 3D.

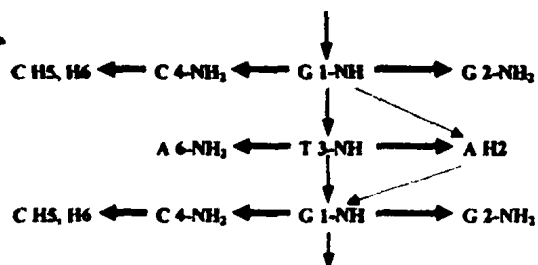
9.2.1.2. Απόδοση των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων.

Για να γίνει δυνατή η παρατήρηση των σημάτων των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων, έγινε λήψη φάσματος ^1H NMR σε 90% H_2O , 10 % D_2O . Έτσι, στην περιοχή 12-14 ppm, όπως φαίνεται από το φάσμα μίας διάστασης (σχήμα 9.15), βλέπουμε πέντε κορυφές που αντιστοιχούν στις ιμινο-ομάδες που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου για το σχηματισμό των ζευγών βάσεων και ανήκουν στη G και την T. Η παρουσία των πέντε αυτών σημάτων είναι ενδεικτική του σχηματισμού σταθερής διπλής έλικας στην οποία όλες οι βάσεις σχηματίζουν ζεύγη εκτός από τις ακριανές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα των δύο αλυσίδων στα άκρα της διπλής έλικας. Ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου απ' όλα ζεύγη (και τα 6) για το συγκεκριμένο ολιγονουκλεοτίδιο έχει παρατηρηθεί στους -5°C ενώ στη θερμοκρασία του πειράματος αυτού παρατηρήθηκε η παρουσία των 5 σημάτων που βλέπουμε στο σχήμα 9.15 [245].



Σχήμα 9.15. Περιοχή των ιμινο-πρωτονίων του φάσματος 1D ^1H NMR του $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ στους 298 K, $\text{pH}=7,0$.

Έχει προταθεί [241, 246-249] ένα σχήμα απόδοσης των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων του β -DNA με βάση τις αποστάσεις $<4,3 \text{ \AA}$ (σχήμα 9.16). Η μέθοδος βασίζεται



Σχήμα 9.16. Μέθοδος απόδοσης των ευκίνητων πρωτονίων των βάσεων και των H2 της A σε τρία γειτονικά ζεύγη βάσεων GC, AT και GC σε β -DNA. Το πάχος του βέλους είναι ενδεικτικό της απόστασης μεταξύ των πρωτονίων.

στα NOE που παρατηρούνται μεταξύ των ιμινο πρωτονίων των γειτονικών ζευγών βάσεων. Για το ζεύγος AT υπάρχουν επιπλέον αποστάσεις με τα H2 πρωτόνια της αδενίνης. Επειδή εντός των ζευγών βάσεων υπάρχουν πολυάριθμες αποστάσεις μικρότερες συγκριτικά με τις αποστάσεις γειτονικών ζευγών βάσεων, θα υπάρχει σημαντική διάχυση σπιν εντός των ζευγών βάσεων. Τα NOE που προκύπτουν

μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ταυτοποιηθούν τα είδη των βάσεων και μπορούν να αποτελέσουν μία εναλλακτική οδό απόδοσης των σημάτων των ιμινο πρωτονίων σε



περίπτωση που αυτά δεν διακρίνονται. Μια εναλλακτική οδό απόδοσης της αμινομάδας της κυτοσίνης αποτελούν τα cross-peak μεταξύ της αμινομάδας και των H6 και H5 πρωτονίων. Εξάλλου, τα δύο πρωτόνια της αμινομάδας - με εξαίρεση την κυτοσίνη που βρίσκεται στα άκρα της αλληλουχίας - παρουσιάζουν διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις επειδή το ένα από τα δύο συμμετέχει στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου, με αποτέλεσμα να δίνουν μεταξύ τους ισχυρό cross-peak. Οι χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων του $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ φαίνονται στον πίνακα 9.4.

Πίνακας 9.4

Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ στους 298 K, $\text{pH}=7,0$ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$).

	NH (G/T)	NH ₂	NH ₂ *
G ₂ -C ₁₁	13,02	6,55	8,37
C ₃ -G ₁₀	12,88	6,42	8,41
G ₄ -C ₉	12,68	6,80	8,40
A ₅ -T ₈	13,78	-	-
A ₆ -T ₇	13,65	-	-

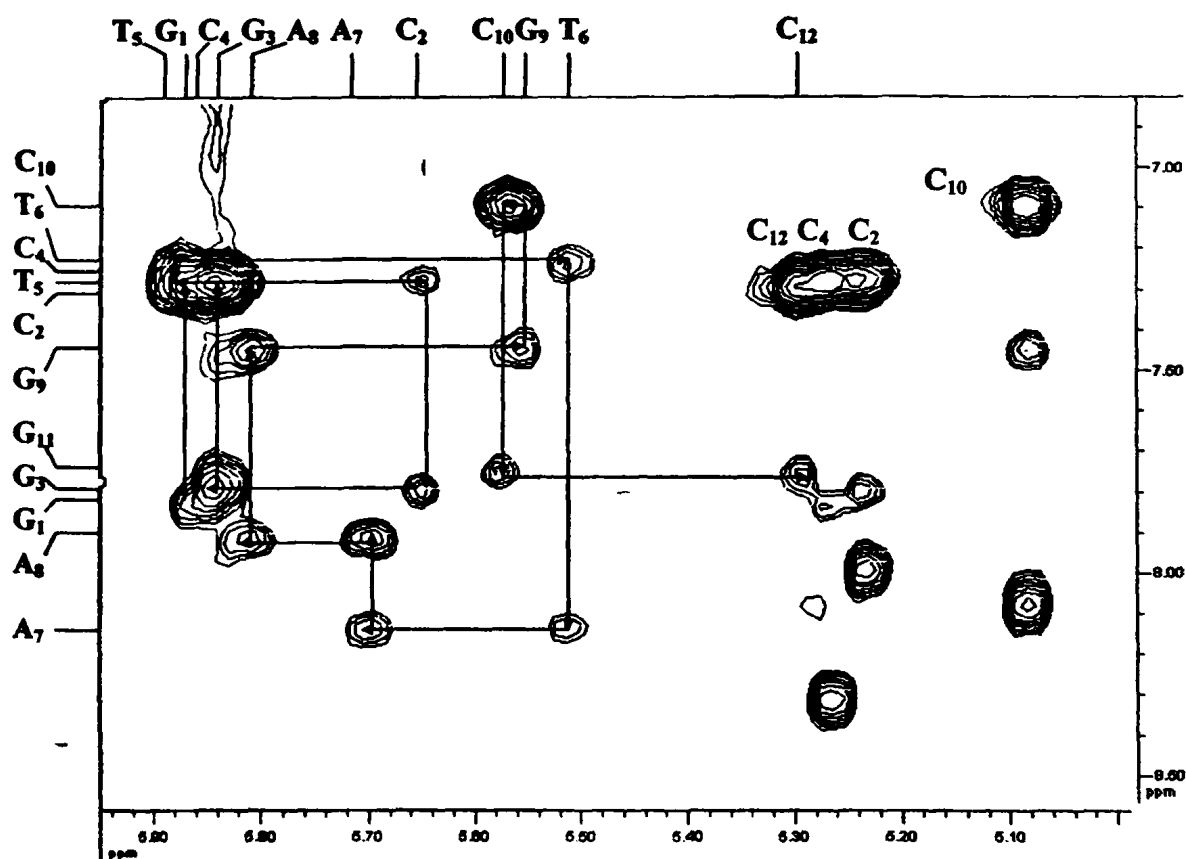
*Αμινομάδα που συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου.

9.2.2. Χαρακτηρισμός του $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$

9.2.2.1. Απόδοση των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων.

Το ολιγονουκλεοτίδιο $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$ είναι επίσης μία αυτοσυμπληρούμενη αλληλουχία, παρόμοια με την αλληλουχία των Dickerson-Drew, και στην πραγματικότητα είναι η αντίστροφη της αν διαβαστεί από το 3' άκρο. Χρησιμοποιήθηκε κυρίως στην αλληλεπίδραση με τα διαστερομερή Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$, όπου το επταπεπτίδιο 7p αποτελεί τμήμα της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *MunI*. Το $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$ περιέχει την αλληλουχία AATT, η οποία και αναγνωρίζεται από τη *MunI*.

Όπως είναι αναμενόμενο, η σύνδεση των σημάτων μέσω των NOE σύμφωνα με την αλληλουχία θα διαφέρει συγκριτικά με το ολιγομερές των Dickerson-Drew. Στο σχήμα 9.17 βλέπουμε την περιοχή του φάσματος NOESY των αρωματικών με τα H1' πρωτόνια. Η απόδοση των υπολοίπων πρωτονίων έγινε βάση της μεθόδου που περιγράφηκε στην ενότητα 9.2.1 και οι χημικές μετατοπίσεις φαίνονται στον πίνακα 9.5. Σε αντίθεση με το $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$, στις περιοχές των H4', H5' και H5'' υπάρχει σημαντική αλληλεπικάλυψη η οποία καθιστά αδύνατη την απόδοση των πρωτονίων αυτών με βεβαιότητα.



Σχήμα 9.17. Περιοχή του φάσματος NOESY όπου φαίνονται τα cross-peak μεταξύ της περιοχής των H8-H6 και της περιοχής H1'-H5. Φαίνεται η σύνδεση των νουκλεοτιδίων από το G₁ στο C₁₂ μέσω των NOE. Η προέλευση των H1' δίνεται στον αριστερό άξονα και των αρωματικών πρωτονίων στον άνω άξονα.

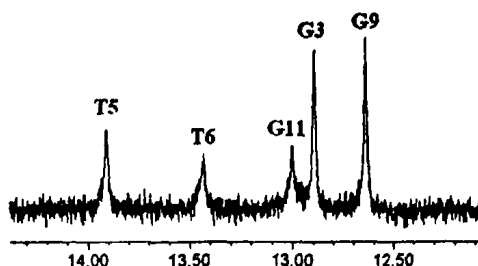
Πίνακας 9.5

Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$ στους 298 K, pH=7,0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$).

	CH ₃	H2/H5	H8/H6	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5',H5''
G1	-	-	7,84	5,87	2,50	2,67	4,75	3,97	3,62
C2	-	5,27	7,30	5,66	1,99	2,35	4,76	4,05	-
G3	-	-	7,80	5,84	2,58	2,64	4,90	-	-
C4	-	5,24	7,29	5,84	1,98	2,42	4,67	-	-
T5	1,51	-	7,30	5,89	1,99	2,42	4,73	-	-
T6	1,61	-	7,25	5,52	1,91	2,25	4,76	-	-
A7	-	7,30	8,15	5,70	2,62	2,75	4,93	4,28	4,09
A8	-	7,30	7,93	5,81	2,47	2,68	4,81	-	-
G9	-	-	7,46	5,56	2,32	2,47	4,81	4,23	-
C10	-	5,09	7,11	5,58	1,79	2,23	4,70	4,02	-
G11	-	-	7,76	5,84	2,49	2,62	4,86	-	-
C12	-	5,30	7,31	6,08	2,10	2,09	4,40	4,39	3,94



9.2.2.2. Απόδοση των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων.



Σχήμα 9.18. Η περιοχή των ιμινο-πρωτονίων του φάσματος 1D ^1H NMR του $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$, 298 K, $\text{pH}=7,0$.

Η απόδοση των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων του $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$ έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί. Στο σχήμα 9.18 βλέπουμε την περιοχή 12-14 ppm των ιμινο-πρωτονίων. Η παρουσία πέντε σημάτων είναι ενδεικτική του σχηματισμού σταθερής διπλής έλικας στην οποία δεν συμμετέχουν τα ακραία νουκλεοτίδια. Από την άλλη, παρατηρούμε τη μεγάλη διεύρυνση του σήματος για το προτελευταίο ζεύγος, δηλαδή του C_2G_{11} , ενδεικτική της

συμμετοχής του στο άνοιγμα στα άκρα των αλυσίδων της διπλής έλικας. Στον πίνακα 9.6 δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων του $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$.

Πίνακας 9.6

Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$ στους 298 K, $\text{pH}=7,0$ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$).

	NH (G/T)	NH ₂	NH ₂ *
G ₁ -C ₁₂	-	6,54	-
C ₂ -G ₁₁	13,00	6,38	8,33
G ₃ -C ₁₀	12,89	6,16	8,09
C ₄ -G ₉	12,64	6,44	8,00
T ₅ -A ₈	13,91	6,78	8,15
T ₆ -A ₇	13,43	6,78	8,15

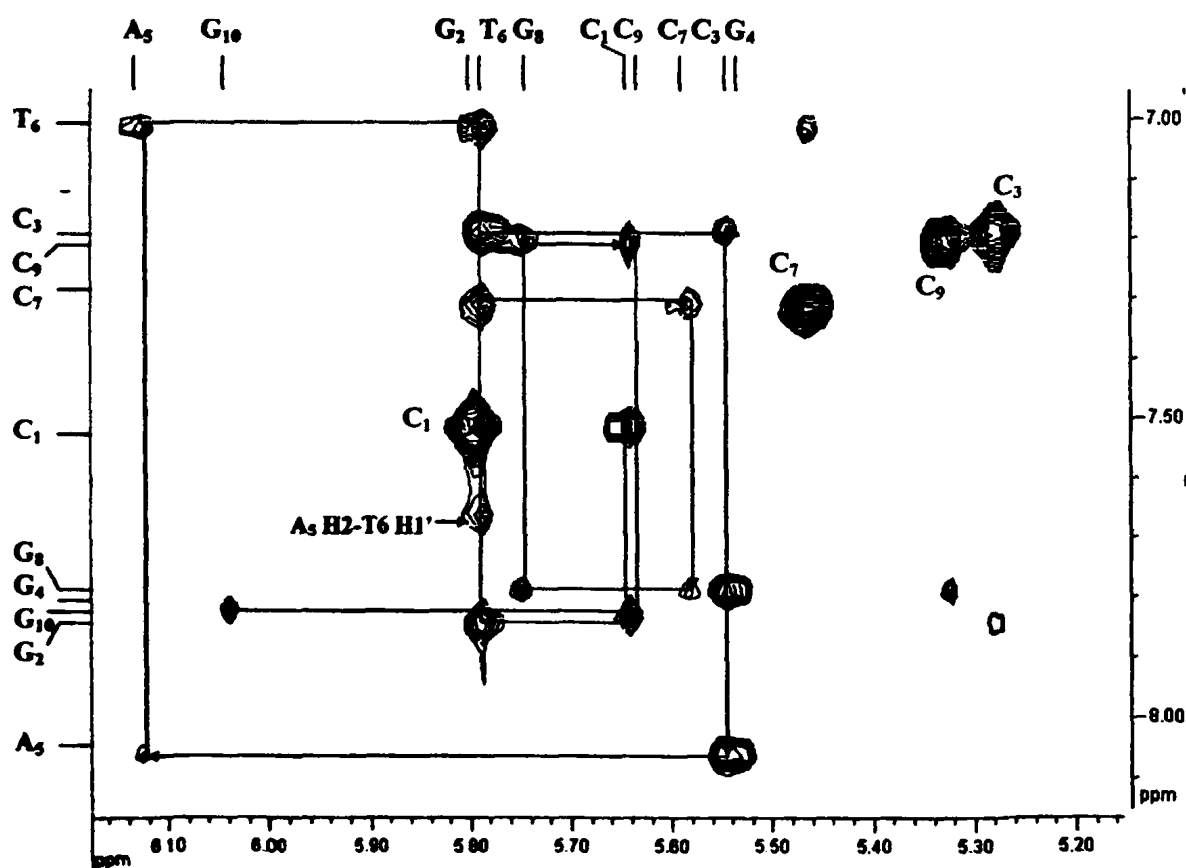
* Αμινομάδα που συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου.

9.2.3. Χαρακτηρισμός του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$

9.2.3.1. Απόδοση των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων.

Η απόδοση των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ βασίστηκε στη μέθοδο, η οποία έχει ήδη περιγραφεί στην ενότητα 9.2.1. Στο σχήμα 9.19 φαίνεται η περιοχή του φάσματος NOESY των αρωματικών και των H1' πρωτονίων και η σύνδεση των σημάτων μέσω των NOE βάσει της αλληλουχίας. Στην περιοχή αυτή παρατηρούμε επίσης την ύπαρξη cross-peak από τα H2 της A₅ προς τα A₅ H1', T₆ H1' και τα C₇ H1' (σχήμα 9.19). Η παρουσία αυτών των NOE cross-peak μεταξύ νουκλεοτιδίων της

ίδιας αλυσίδας αλλά και μεταξύ νουκλεοτιδίων δύο διαφορετικών αλυσίδων είναι ενδεικτική της παρουσίας propeller twisting στην περιοχή $A_5T_6C_7$ (και τη συμμετρική της $G_4A_5T_6$) [250] το οποίο έχει ως αποτέλεσμα η ελάσσονα αύλακα να είναι στενότερη [1]. Στον πίνακα 9.7 βλέπουμε τις χημικές μετατοπίσεις των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων. Παρατηρούμε ότι ήταν εφικτή η απόδοση όλων των H_4' πρωτονίων της δεοξυριβόζης αλλά η απόδοση κάποιων από τα H_5' και H_5'' κατέστη δυσχερής λόγω των αλληλεπικαλύψεων των κορυφών στη συνωστισμένη αυτή περιοχή του φάσματος NOESY.



Σχήμα 9.19. Περιοχή του φάσματος NOESY όπου φαίνονται τα cross-peak μεταξύ της περιοχής των H_8-H_6 και της περιοχής $H_1'-H_5$. Φαίνεται η σύνδεση των νουκλεοτιδίων από το C_1 στο G_{10} μέσω των NOE. Η προέλευση των H_1' δίνεται στον αριστερό άξονα και των αρωματικών πρωτονίων στον άνω άξονα.



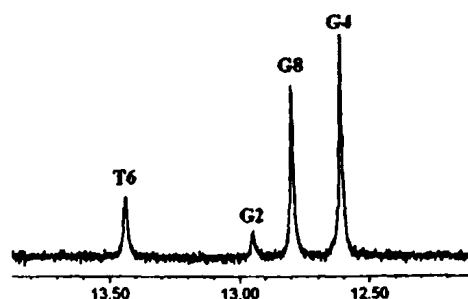
Πίνακας 9.7

Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ στους 298 K, $\text{pH}=7,0$ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$).

	CH_3	H2/H5	H6/H8	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5',H5''
C ₁	-	5,80	7,52	5,65	1,86	2,30	4,60	3,97	3,62
G ₂	-	-	7,85	5,79	2,56	2,63	4,90	4,25	3,92, 4,01
C ₃	-	5,28	7,20	5,55	1,84	2,26	4,74	4,06	-
G ₄	-	-	7,80	5,55	2,62	2,72	4,92	4,26	3,93, 4,15
A ₅	-	7,67	8,07	6,14	2,51	2,84	4,90	4,37	4,05, 4,18
T ₆	1,23	-	7,02	5,80	1,92	2,35	4,73	4,07	4,03
C ₇	-	5,47	7,32	5,59	1,93	2,30	4,74	4,02	3,94
G ₈	-	-	7,80	5,75	2,52	2,59	4,88	4,25	4,01, 4,08
C ₉	-	5,33	7,21	5,65	1,79	2,22	4,73	4,05	3,89
G ₁₀	-	-	7,83	6,04	2,51	2,28	4,58	4,07	3,97

9.2.3.2. Απόδοση των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων.

Στο φάσμα ^1H NMR μίας διάστασης στην περιοχή των ιμινο πρωτονίων (σχήμα 9.20) βλέπουμε 4 κορυφές ενδεικτικές του σχηματισμού σταθερής διπλής έλικας στην οποία δεν συμμετέχουν τα ακραία νουκλεοτίδια. Η απόδοση των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων στηρίχθηκε στη μέθοδο που περιγράφηκε στην ενότητα 9.2.2. Παρατηρούμε σημαντική διεύρυνση της κορυφής που αντιστοιχεί στο προτελευταίο ζεύγος G_2C_9 ενδεικτική του ανοίγματος των δύο αλυσίδων στα άκρα της διπλής έλικας. Οι χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ φαίνονται στον πίνακα 9.8.



Σχήμα 9.20. Περιοχή των ιμινο-πρωτονίων του φάσματος $1\text{D } ^1\text{H}$ NMR του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ στους 298 K, $\text{pH}=7,0$.

Πίνακας 9.8

Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ στους 298 K, $\text{pH}=7,0$ ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3(\text{PO}_4)_2$).

	NH (G/T)	NH ₂	NH ₂ *
C ₁ -G ₁₀	-	6,76	-
G ₂ -C ₉	12,95	6,48	8,35
C ₃ -G ₈	12,80	6,29	8,25
G ₄ -C ₇	12,61	6,63	8,29
A ₅ -T ₆	13,44	6,63	8,29

* Αμινομάδα που συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου.



9.3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

9.3.1. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ με τη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου d(CGCGAATTCGCG)₂

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των διαστερομερών συμπλόκων με τη διπλή έλικα του DNA βασίστηκε σε πειράματα ¹H NMR δύο διαστάσεων DQF COSY και NOESY. Στους πίνακες 9.9 και 9.10 φαίνονται οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των συμπλόκων και του ολιγονουκλεοτιδίου.

Πίνακας 9.9

Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR των συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ παρουσία του d(CGCGAATTCGCG)₂ σε αναλογία 1:1, pH=7,00 (0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄), στους 298 K σε D₂O.

Πρωτόνια	Δ Δ(δ)	Λ Δ(δ)	Πρωτόνια	Δ Δ(δ)	Λ Δ(δ)
H3 bpy	-0,20	-0,06	H3 m	-0,07	-0,05
H3' bpy	-0,10	-0,06	H3' m	-0,09	-0,05
H4 bpy	-0,17	-0,04	H _α Gly	-0,00	-0,01
H4' bpy	-0,08	-0,04	H _α His	-0,04	-0,03
H5 bpy	-0,04	-0,04	H _β His	-0,02	-0,02
H5' bpy	-0,04	-0,04	H _γ His	-0,04	-0,03
H6 bpy	-0,09	-0,05	H _δ His	-0,04	+0,12
H6' bpy	-0,09	-0,05	H _α Lys	-0,02	-0,01
H6 m	-0,06	-0,04	H _β Lys	+0,01	+0,03
H6' m	-0,06	-0,04	H _γ Lys	+0,02	+0,04
H5 m	-0,08	-0,06	H _δ Lys	+0,01	-0,01
H5' m	-0,05	-0,03	H _ε Lys	-0,09	-0,07
4-CH ₃ m	-0,06	-0,04			



Πίνακας 9.10

Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ παρουσία των συμπλόκων Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(m\text{-GHK})]\text{Cl}_2$ σε αναλογία 1:1, $pD=7,00$ (0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), στους 298 K σε D_2O^* .

	H8/H6		H2/H5		H1'		H2''		H2'	
	Λ	Δ	Λ	Δ	Λ	Δ	Λ	Δ	Λ	Δ
C ₁	-0,01	+0,01	-0,02	<u>-0,03</u>	-0,02	-0,01	-0,01	-0,02	-	-
G ₂	+0,02	+0,02	-	-	-0,02	<u>-0,03</u>	0,00	0,00	0,00	0,00
C ₃	0,00	-0,01	<u>-0,06</u>	<u>-0,07</u>	+0,02	<u>+0,03</u>	+0,01	+0,01	0,00	+0,01
G ₄	0,00	0,00	-	-	-0,01	-0,01	-	-	0,00	-
A ₅	0,00	0,00	<u>+0,05</u>	-0,02	<u>-0,05</u>	<u>-0,06</u>	<u>-0,11</u>	<u>+0,05</u>	0,00	0,00
A ₆	0,00	0,00	-0,01	0,00	-0,02	<u>-0,03</u>	<u>-0,11</u>	<u>+0,05</u>	+0,01	+0,02
T ₇	+0,02	0,00	-	-	-0,02	<u>-0,03</u>	-0,01	-0,01	-	-
T ₈	<u>+0,05</u>	-0,02	-	-	<u>-0,04</u>	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	<u>+0,03</u>
C ₉	+0,01	0,00	+0,01	+0,01	0,00	-0,02	-	+0,01	-0,01	-0,01
G ₁₀	+0,00	-0,01	-	-	+0,02	+0,01	+0,02	0,00	0,00	0,00
C ₁₁	-0,01	0,00	-0,01	-0,01	-0,02	-0,01	-0,01	<u>-0,03</u>	-0,01	-0,02
G ₁₂	+0,01	0,00	-	-	<u>-0,05</u>	<u>-0,06</u>	-0,01	0,00	-0,01	-0,01

* Έχουν υπογραμμιστεί οι μετατοπίσεις $>0,02$ ppm.

Τα φάσματα ^1H NMR των συμπλόκων Λ και Δ σε αναλογία 1:1 με το ολιγονουκλεοτίδιο παρουσιάζουν μία κορυφή για τα αντιδρώντα και τα προϊόντα, γεγονός που σημαίνει ότι οι δεσμευμένες μορφές, το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο και το σύμπλοκο βρίσκονται σε ταχεία ανταλλαγή (στην κλίμακα χρόνου του NMR σε θερμοκρασία δωματίου). Η μείωση της θερμοκρασίας στους 238 K έχει ως αποτέλεσμα μικρή διεύρυνση των σημάτων ενδεικτική της μετατροπής της ταχείας ανταλλαγής σε κατάσταση ενδιάμεσης κινητικής. Η περαιτέρω μείωση της θερμοκρασίας δεν οδηγεί σε διαχωρισμό των σημάτων. Υπό αυτές τις συνθήκες, από τα δεδομένα του NMR μπορούμε να παρατηρήσουμε το μέσο όρο των πιθανών δεσμευμένων μορφών. Συνεπώς, οι κορυφές του φάσματος ^1H NMR δεν προέρχονται απαραίτητα από ένα σωματίδιο αλλά μπορεί να είναι ο μέσος όρος διαφορετικών δεσμευμένων μορφών αποτέλεσμα της μη ειδικής δέσμευσης των διαστερεομερών συμπλόκων στο ολιγονουκλεοτίδιο. Ωστόσο, η επίτευξη κατάστασης αργής κινητικής είναι

σχετικά σπάνια ακόμα και για ενώσεις που δεσμεύονται με υψηλή ειδικότητα όπως η ντισταμυσίνη [251]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η προσέγγιση μπορεί να είναι μόνο ποιοτική. Η πλειοψηφία των πολυπυριδυλικών συμπλόκων του Ru(II) δεσμεύονται στο DNA μέσω ταχείας ή ενδιάμεσης κινητικής και η πρόβλεψη των διαμορφώσεων δίνεται χρησιμοποιώντας πρόσθετες μεθόδους όπως μοριακής μηχανικής (MM) και μοριακής δυναμικής (MD) σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα NOE, τα οποία χρησιμοποιούνται ως περιορισμοί στις αποστάσεις [71, 89, 94, 106, 121-122, 141, 252].

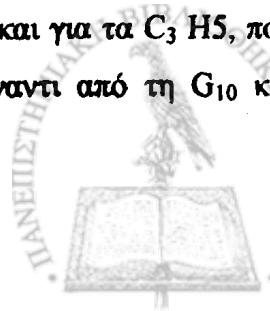
Τα σήματα των διπυριδυλικών πρωτονίων μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία και για τα δύο διαστερεομερή, σε μεγαλύτερο βαθμό στην περίπτωση του Δ-ισομερούς. Ιδιαίτερα τα πρωτόνια που βρίσκονται στην άκρη του ενός πυριδυλικού δακτυλίου H3' και H4', μετατοπίζονται κατά -0,19 και -0,17 ppm αντίστοιχα. Τα μεγέθη αυτών των μετατοπίσεων, οι οποίες συνοδεύονται και από μικρότερες αλλά σημαντικές μετατοπίσεις και όλων των υπολοίπων διπυριδυλικών πρωτονίων, δείχνουν ότι ο διπυριδυλικός υποκαταστάτης δεσμεύεται στο ολιγονουκλεοτίδιο χωρίς να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις. Η παρεμβολή ανάμεσα στις βάσεις προκαλεί μεγάλες μετατοπίσεις των σημάτων των πρωτονίων του υποκαταστάτη προς υψηλότερα πεδία (0,3-1,0 ppm) και σημαντική διεύρυνση των σημάτων λόγω της ύπαρξης ενδιάμεσης κινητικής [89]. Η παρατηρούμενη προστασία των πρωτονίων H3' και H4' του *hry* από τις βάσεις του DNA βρίσκεται κοντά στο κατώτερο όριο για τη δέσμευση μέσω παρεμβολής, γεγονός που σημαίνει ότι τα πρωτόνια αυτά δεν απέχουν πολύ από τα επίπεδα που διέρχονται από τις βάσεις [252]. Σύμφωνα με τον Pullman και τους συνεργάτες του, η επαγόμενη προστασία ενός πενταμελούς ή εξαμελούς αρωματικού δακτυλίου από τις βάσεις του DNA, είναι συνάρτηση της απόστασής [252-253]. Η παρατηρούμενη μετατόπιση ~0,2 ppm προς υψηλότερα πεδία αντιστοιχεί σε κάθετη απόσταση μεταξύ των επιπέδων των βάσεων και των H3'/H4' πρωτονίων των αρωματικών δακτυλίων του *hry* περίπου 5 Å, η οποία δεν αρκεί για να ισχυριστούμε παρεμβολή μεταξύ των βάσεων. Οι μικρές αυτές μεταβολές που παρατηρούνται στις χημικές μετατοπίσεις των συμπλόκων μπορούν να προέλθουν από άλλους τρόπους δέσμευσης όπως η δέσμευση στις αύλακες. Γενικά, τα μόρια που δεσμεύονται στις αύλακες του DNA αλληλεπιδρούν με τα άκρα των βάσεων, με αποτέλεσμα μηδενική ή μηδαμινή προστασία των πρωτονίων του μορίου [254]. Σύμπλοκα με υποκαταστάτες παρόμοιους με το *hry*, όπως στην περίπτωση του $[{\text{Ru}}(\text{Me}_2\text{hry})_2]^{2+}(\mu\text{-bpm})^{4+}$ ($\mu\text{-bpm}$ = 2,2'-διπυριμιδίνη), δεσμεύονται στην ελάχισσυνα



αύλακα του DNA και προκαλούν πολύ μικρές μεταβολές στα σήματα των πρωτονίων του υποκαταστάτη ($<0,1$ ppm) [141]. Επίσης, παρατηρήθηκαν μικρές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πυριδυλικών και αλειφατικών πρωτονίων του συμπλόκου Δ -cis- α -[Ru(RR- picchxnMe_2)(phen)] $^{2+}$ ($<0,2$ ppm), το οποίο δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα των ολιγονουκλεοτιδίων [d(CGCGATCGCG) $_2$] και [d(ATATCGATAT) $_2$] [122]. Η αλληλεπίδραση DNA-συμπλόκου μετάλλου αυτού του τύπου είναι γνωστή επίσης για το σύμπλοκο [Ru(bpy) $_3$] $^{2+}$, το οποίο δεσμεύεται στο DNA χωρίς να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις [28]. Για το Λ -[Ru(bpy) $_2$ (m-GHK)]Cl $_2$, οι μεταβολές που παρατηρούνται για τα πρωτόνια του *bpy* κυμαίνονται από $-0,06$ ως $-0,03$ ppm, συνιστώντας ασθενή αλληλεπίδραση με το ολιγονουκλεοτίδιο ή πιθανότατα μη ειδική δέσμευση. Η παρατήρηση παρόμοιων μεγεθών μετατόπισης είτε προς χαμηλότερα ή προς υψηλότερα πεδία για όλα τα πρωτόνια του Λ -ισομερούς μπορεί να ερμηνευτεί βάσει του μη ειδικού τρόπου δέσμευσής του.

Τα αρωματικά πρωτόνια του υποκαταστάτη *m* παρουσιάζουν μικρές μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία ($<0,1$ ppm) και για τα δύο ισομερή. Επιπλέον, τα πρωτόνια του πεπτιδίου μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία εκτός από τα πρωτόνια H $_a$, H $_b$ και H $_r$ της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης που μετατοπίζονται προς χαμηλότερα πεδία. Τα H $_b$, τα οποία βρίσκονται κοντά στην τελική αμινομάδα, μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία και για τα δύο ισομερή, πιθανότατα λόγω αλληλεπίδρασης της αμινομάδας είτε με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA ή με το π -αρωματικό σύστημα των υποκαταστατών *bpy*. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης του τριπεπτιδίου Lys-Tyr-Lys με το τετρανουκλεοτίδιο d(5'-GCGC-3') $_2$, όπου η θετικά φορτισμένη αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με το φωσφοδιεστερικό σκελετό του DNA [255]. Επιπλέον, κατά τη δέσμευση του πεπτιδίου Lys-Tyr-Lys στο DNA παρατηρούνται επίσης ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των λυσινών και του σκελετού του DNA [256].

Η επίδραση της δέσμευσης του Δ -ισομερούς στα σήματα των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου περιορίζεται κυρίως στα πρωτόνια που βρίσκονται στη μείζονα αύλακα, δηλαδή τα H2' και H2'' του σακχάρου, τα οποία και παρουσιάζουν μεγαλύτερες μετατοπίσεις συγκριτικά με τα πρωτόνια H1' που βρίσκονται στην ελάσσονα αύλακα H1'. Οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις παρατηρούνται για τα A $_5$ H2'' και A $_6$ H2'' και για τα C $_3$ H5, που επίσης βρίσκονται στη μείζονα αύλακα. Η βάση C $_3$ βρίσκεται απέναντι από τη G $_{10}$ και



πιθανότατα τα H5 να επηρεάζονται λόγω της δέσμευσης του συμπλόκου κοντά στην αλληλουχία T₈C₉. Έτσι, το τμήμα του ολιγονουκλεοτιδίου που επηρεάζεται περισσότερο είναι η περιοχή από A₅ ως G₁₀ στη μείζονα αύλακα.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η δέσμευση της πεπτιδικής αλληλουχίας στο τμήμα του DNA, τα φάσματα καταγράφηκαν σε 90% H₂O/10% D₂O, ώστε να παρατηρηθούν τα ανταλλάξιμα με το διαλύτη αμινο και ιμινο πρωτόνια. Στον πίνακα 9.11 δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων, η απόδοση των οποίων βασίστηκε στη φασματοσκοπία NOESY και τη βιβλιογραφία [257-259].

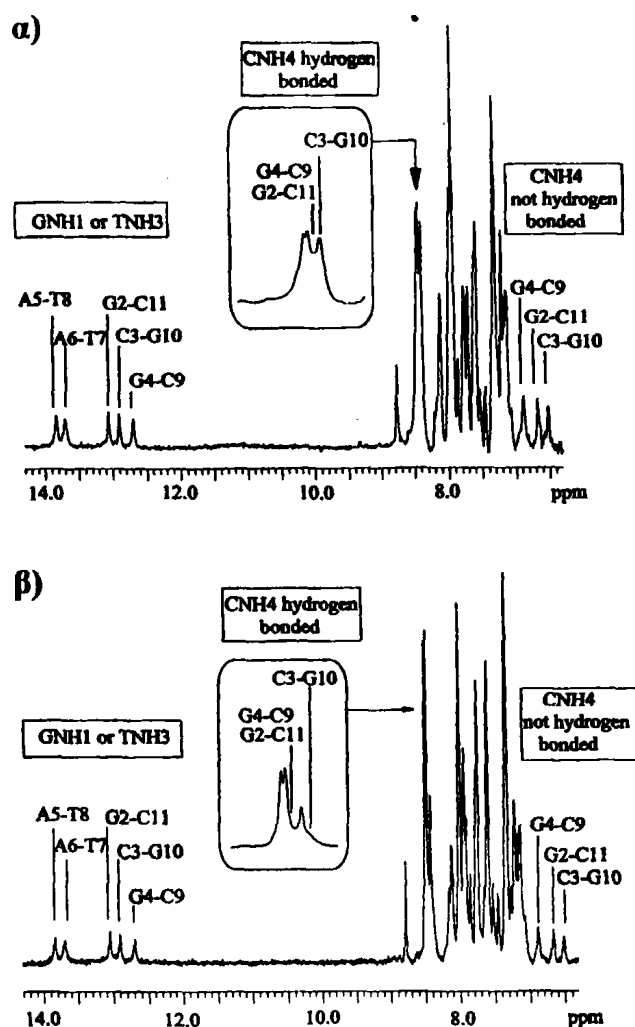
Πίνακας 9.11

Χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων του ελεύθερου d(CGCGAATTCGCG)₂, των συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ και η μεταβολή τους όταν DNA και σύμπλοκο βρίσκονται σε αναλογία 1:1, σε 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH = 7,00), 90% H₂O/ 10%D₂O, στους 298 K.

	NH (G/T)	NH ₂ ^a	NH ₂ ^b	Πεπτιδικά NH	Lys-CONH ₂
A ₅ -T ₈	13,78				
Δ-ισομερές (Δδ)	+0,05				
Λ-ισομερές (Δδ)	+0,03				
A ₆ -T ₇	13,65				
Δ-ισομερές (Δδ)	+0,04				
Λ-ισομερές (Δδ)	+0,01				
G ₂ -C ₁₁	13,02	6,55	8,37		
Δ-ισομερές (Δδ)	+0,02	+0,11	+0,02		
Λ-ισομερές (Δδ)	0,00	+0,10	+0,02		
G ₁₀ -C ₃	12,88	6,42	8,41		
Δ-ισομερές (Δδ)	+0,01	+0,07	+0,03		
Λ-ισομερές (Δδ)	0,00	+0,09	+0,02		
G ₄ -C ₉	12,68	6,80	8,40		
Δ-ισομερές (Δδ)	+0,01	+0,08	+0,03		
Λ-ισομερές (Δδ)	-0,02	+0,08	+0,02		
Gly-NH				8,19	0,00
Δ-ισομερές (δ/Δδ)				8,16	-0,01
Λ-ισομερές (δ/Δδ)					
Lys-NH				8,10	+0,02
Δ-ισομερές (δ/Δδ)				8,21	+0,04
Λ-ισομερές (δ/Δδ)					
His-NH				8,24	-0,13
Δ-ισομερές (δ/Δδ)				8,25	-0,13
Λ-ισομερές (δ/Δδ)					
Lys-CONH ₂					
Δ-ισομερές (δ/Δδ)					7,16 +0,04
Λ-ισομερές (δ/Δδ)					7,17 -0,01

^a Ομάδα NH₂ που δεν συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου. ^b Ομάδα που συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου.





Σχήμα 9.21. Τμήματα των φασμάτων ^1H NMR των ισομερών, όπου φαίνεται η επίδραση των (α) Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(m\text{-GHK})]\text{Cl}_2$ και (β) Λ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(m\text{-GHK})]\text{Cl}_2$ στους δεσμούς υδρογόνου των G 1-NH, T 3-NH και C 4-NH στα ζεύγη των βάσεων CG και AT της διπλής έλικας του DNA.

Το πρωτόνιο H8 (γειτονικό ως προς το N7) της γουανίνης ή της αδενίνης του ολιγονουκλεοτιδίου ουσιαστικά δεν μετατοπίζονται παρουσία των διαστερεομερών και συνεπώς αποκλείεται η πιθανότητα συμμετοχής του αζώτου αυτού σε δεσμό υδρογόνου με το συνδεδεμένο πεπτίδιο των συμπλόκων. Το O6 της γουανίνης αποτελεί επίσης μία θέση πιθανού σχηματισμού δεσμού υδρογόνου. Αλλά μια τέτοια αλληλεπίδραση θα επηρέαζε το σήμα G O6...HN-4 C (δηλαδή το πρωτόνιο της εξωκυκλικής 4-αμινομάδας της κυτοσίνης που συμμετέχει στο δεσμό υδρογόνου με το O6 της γουανίνης), γεγονός που δεν συμβαίνει ($\Delta\delta = 0,02$ ως $0,03$ ppm και για τα δύο ισομερή). Τα υπόλοιπα πρωτόνια που δεν συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου των εξωκυκλικών αμινομάδων των C₃, C₉ και C₁₁, (C 4-NH) μετατοπίζονται περίπου 0,1 ppm λόγω των αλληλεπιδράσεων με τα δύο ισομερή (Σχήμα 9.21). Αυτή η

μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία είναι σημαντική αλλά όχι αρκετά υψηλή ώστε να συμπεράνουμε ότι τα πρωτόνια αυτά συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου. Θα μπορούσαν βέβαια να συμμετέχουν σε διακλαδούμενους δεσμούς υδρογόνου και μεγαλύτερους του κανονικού ή αλληλεπιδράσεων Van der Waals μεταξύ του πεπτιδικού τμήματος των συμπλόκων και το C 4-NH των C₃, C₉ και C₁₁ [2]. Παρόμοια περίπτωση αποτελεί η αλληλεπίδραση της ίδιας αλληλουχίας DNA με το φάρμακο ντισταμυσίνη A, όπου παρατηρήθηκαν μικρές μετατοπίσεις προς χαμηλότερα πεδία και για τα δύο πρωτόνια του δακτυλίου της αδενίνης και τα NH των πυρρολικών ομάδων του φαρμάκου [2] βάσει των

οποίων προτάθηκε η αλληλεπίδραση με την αύλακα. Το πρωτόνιο που συμμετέχει στο δεσμό υδρογόνου του ζεύγους AT (A 6-NH...O4 T) δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τη δέσμευση, δεδομένου ότι τα σήματα των γειτονικών πρωτονίων της μεθυλομάδας της θυμίνης δεν μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία, αποκλείοντας συνεπώς την πιθανότητα αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου στη θέση αυτή. Η μετατόπιση του πρωτονίου A₅ H₂ προς χαμηλότερα πεδία κατά περίπου 0,05 ppm πιθανόν να οφείλεται σε αλληλεπίδραση του πεπτιδίου με τη θέση A₅ N³. Από τα ανταλλάξιμα με το διαλύτη πρωτόνια του πεπτιδίου, μόνο το NH της His μετατοπίζεται προς υψηλότερα πεδία κατά περίπου -0,13 ppm και για τα δύο διαστερομερή, συνιστώντας ότι η θέση αυτή ή το γειτονικό καρβονύλιο (>C=O) συμμετέχει στη δέσμευση του συμπλόκου στο DNA.

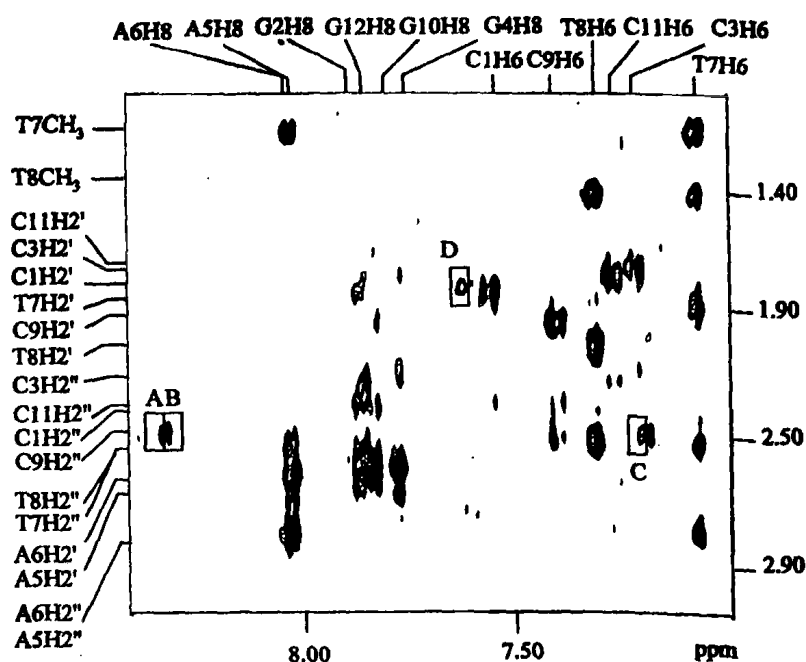
Πίνακας 9.12

Τα NOE cross-peaks που παρατηρούνται μεταξύ των πρωτονίων των διαστερομερών Δ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ και του d(CGCGAATTCGCG)₂ σε αναλογία συμπλόκου / διπλής έλικας 1:1, σε 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH = 7,00), 90% H₂O/ 10%D₂O, στους 298 K*.

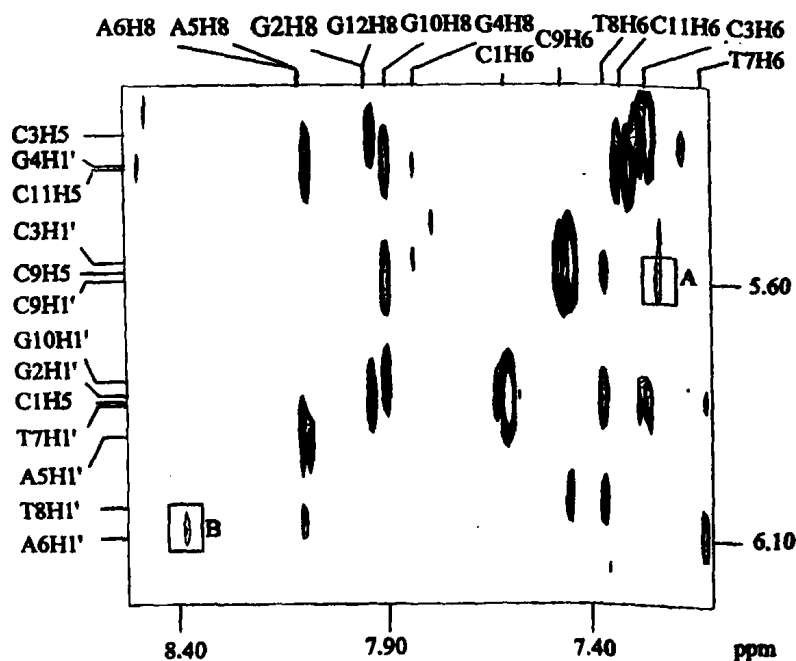
Δ-[Ru(bpy) ₂ (m-GHK)]Cl ₂	Δ-[Ru(bpy) ₂ (m-GHK)]Cl ₂
H3 m → C ₉ H2'' (w)	H3' m → A ₆ H1' (m)
H3' m → C ₉ H2'' (s)	H5' m → C ₉ H1' (w)
H5' m → C ₉ H2'' (s)	Gly NH → T ₈ H1' (w)
H3' bpy → C ₉ H2'' (s)	
H6, H6' bpy → C ₁ H2' (m)	
His H _α → A ₅ H1' (w)	
Lys NH → A ₅ A ₆ H2'' (m)	
His NH → T ₇ T ₈ H2'' (m)	
→ Me T ₈ (m)	

* Τα cross-peak χαρακτηρίζονται ποιοτικά ως ασθενής (w), μέτριας (m) και ισχυρής (s) έντασης βάσει της σύγκρισής τους με το ολοκλήρωμα του cross-peak C H5 → C H6.





Σχήμα 9.22. Τμήμα του φάσματος ^1H NOESY ($\tau_m = 400$ ms) του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2 - [\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})_2]$ σε αναλογία 1:1 στους 298 K όπου φαίνονται οι αποδόσεις των αρωματικών πρωτονίων των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου (F2) και των πρωτονίων του σακχάρου της μείζονος αλυσίδας $\text{H2}'$ και $\text{H2}''$ για τις βάσεις: αδενίνη, θυμίνη και κυτοσίνη (F1). Τα cross-peaks που επισημαίνονται αντιστοιχούν στα παρακάτω: (A) $m\text{-H3}'\text{-C}_9\text{H2}''$, (B) $\text{bry H3-C}_9\text{H2}''$, (C) $m\text{H5}'\text{-C}_9\text{H2}''$, (D) $\text{bry H6,H6}'\text{-C}_1\text{H2}'$.



Σχήμα 9.23. Τμήμα του φάσματος ^1H NOESY ($\tau_m = 400$ ms) του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2 - [\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})_2]$ σε αναλογία 1:1 στους 298 K όπου φαίνονται οι αποδόσεις των αρωματικών πρωτονίων των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου (F2) και των πρωτονίων του σακχάρου της ελάσσονος αλυσίδας $\text{H1}'$ (F1). Τα cross-peaks που επισημαίνονται αντιστοιχούν στα παρακάτω: (A) $m\text{H5}'\text{-C}_9\text{H1}'$, (B) $m\text{H3}'\text{-A6H1}'$.

Στον πίνακα 9.12 δίνονται τα NOESY cross-peak που παρατηρούνται μεταξύ των ισομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ και το d(CGCGAATTCGCG)₂. Η ένταση μερικών NOE cross-peak που προέρχονται από τον σχηματισμό διπλής έλικας (B μορφή) ελαττώνεται γεγονός που δείχνει ότι η διαμόρφωση της έλικας επηρεάζεται σε μικρό βαθμό [260]. Η παρατήρηση αυτή μας επιτρέπει να θεωρήσουμε σταθερή τη B δομή του DNA στα μοντέλα δέσμευσης. Τα διαμοριακά NOE που παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαστερομερών συμπλόκων και του δωδεκανουκλεοτιδίου φαίνονται στα σχήματα 9.22 και 9.23.

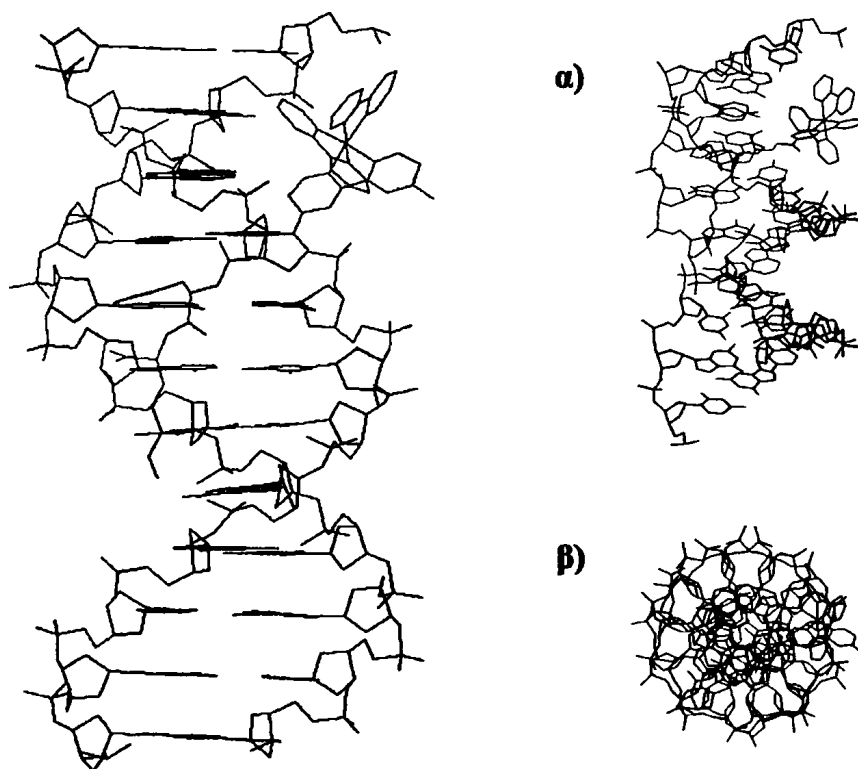
Στην περίπτωση του Δ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂, παρατηρήθηκαν αποστάσεις μικρότερες από 5 Å μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων των υποκαταστατών *m* και *bpy* και των πρωτονίων H2'' των βάσεων C₉ και T₈ που βρίσκονται στη μείζονα αύλακα της έλικας. Τα ανταλλάξιμα με το διαλύτη πρωτόνια NH του πεπτιδικού σκελετού, που συνδέεται στην 4^η θέση του υποκαταστάτη *m*, εμφανίζει cross-peaks με πρωτόνια που βρίσκονται στη μείζονα αύλακα όπως τα H2'' της T₇ και της T₈ και τη μεθυλομάδα της θυμίνης T₈. Επίσης, παρατηρήθηκαν διαμοριακά NOE ασθενούς έντασης μεταξύ της αλειφατικής πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης και του ολιγονουκλεοτιδίου ενδεικτικά της τοποθέτησης του πεπτιδίου κατά μήκος της μείζονος αύλακας της έλικας.

Από την άλλη, τα διαμοριακά NOE μεταξύ του Λ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ και του ολιγονουκλεοτιδίου είναι πολύ λιγότερα σε σύγκριση με το Δ-ισομερές και συνεπώς η δέσμευσή του στο DNA είναι ασθενέστερη ή μη ειδική. Μερικά από αυτά παρατηρούνται μεταξύ των πρωτονίων H5' και H3' του υποκαταστάτη *m* και των C₉ H1' καθώς και μεταξύ του πεπτιδικού NH της Gly και του H1' της βάσης T₈, τα οποία βρίσκονται στην ελάσσονα αύλακα της έλικας. Σε αντίθεση με το Δ-ισομερές, δεν παρατηρήθηκαν cross-peak μεταξύ των άλλων δύο υποκαταστατών *bpy* του συμπλόκου και του ολιγονουκλεοτιδίου, γεγονός που δείχνει ότι μόνο το τμήμα *m*-GHK του συμπλόκου βρίσκεται κοντά στο d(CGCGAATTCGCG)₂.

Η κατασκευή μοντέλων 3D του τρόπου δέσμευσης των διαστερομερών στη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί ποσοτικά λόγω της ταχείας κινητικής του συστήματος σύμπλοκο του Ru(II) / d(CGCGAATTCGCG)₂, η οποία δεν επιτρέπει να ληφθούν ταυτόχρονα όλα τα NOE ως περιορισμοί ως προς την απόσταση. Για την κατασκευή απλών μοντέλων τα οποία βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα της φασματοσκοπίας NMR (σχήματα 9.24 και 9.25) πρέπει να γίνουν οι παρακάτω παραδοχές: (i) ότι δεν υπάρχει



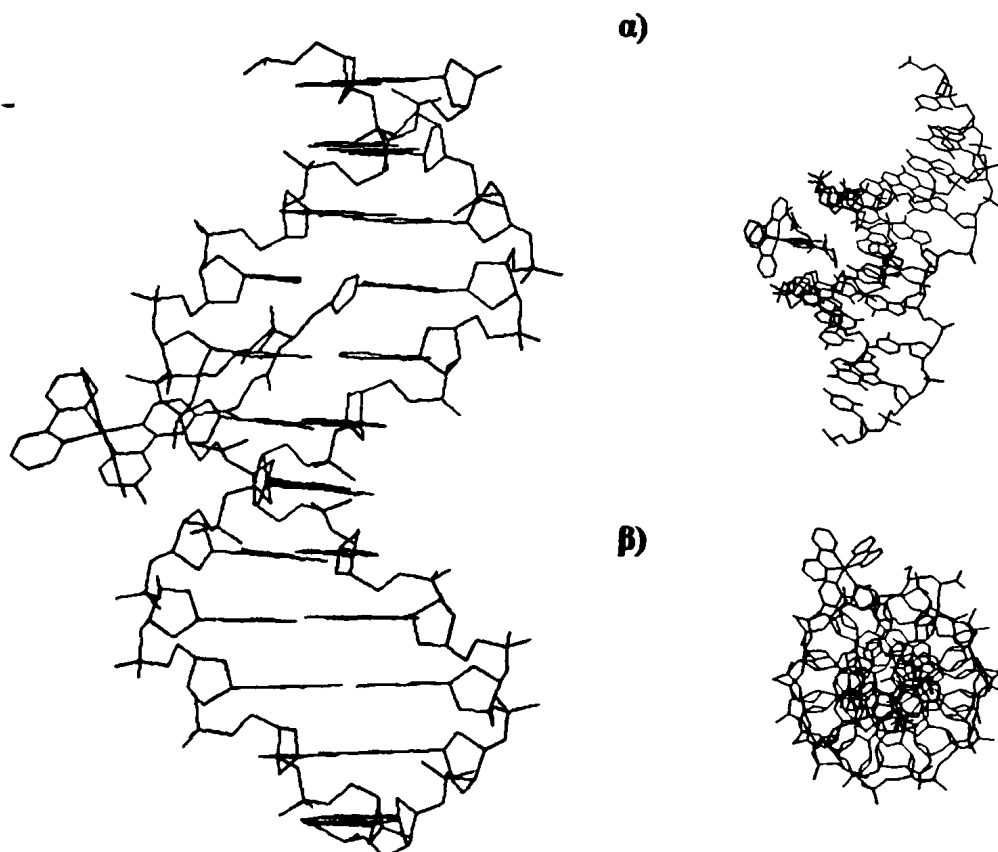
σημαντική παραμόρφωση της διπλής έλικας του DNA (σύμφωνα με τα NOE που συνδέουν τις βάσεις του ολιγονουκλεοτιδίου σύμφωνα με την αλληλουχία), (ii) ότι η γεωμετρία και η σφαίρα ένταξης του Ru(II) παραμένει σταθερή και (iii) η χρήση επιλεκτικά των NOE ώστε να υπάρχει συμφωνία γεωμετρική. Τα σύμπλοκα τοποθετήθηκαν σε αποστάσεις ανάλογα με τα διαμοριακά NOE σε πολλούς διαφορετικούς συνδυασμούς και ακολούθησε ελαχιστοποίηση με διατήρηση σταθερής της σφαίρας ένταξης του Ru(II) (γωνίες και μήκη δεσμών) και της δομής του DNA. Οι δομές που συμφωνούν καλύτερα με τα δεδομένα της φασματοσκοπίας NMR παρουσιάζονται στα σχήματα 9.24 και 9.25.



Σχήμα 9.24. Μοριακό μοντέλο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ και του d(CGCGAATTCGCG)₂. Σε μεγέθυνση βλέπουμε (α) την όψη κατά μήκος της μείζονας άξονα στην οποία φαίνεται ο προσανατολισμός του συμπλόκου με τον πεπτιδικό σκελετό να βρίσκεται εντός της αέλακος, (β) όψη από την κορυφή κατά μήκος του άξονα z που δείχνει τον προσανατολισμό του συμπλόκου και τη θέση δέσμευσης του πεπτιδίου στο ολιγονουκλεοτίδιο.

Από το μοριακό μοντέλο του συμπλόκου Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺ / d(CGCGAATTCGCG)₂ παρατηρούμε ότι οι δύο διτυριδυλικοί υποκαταστάτες του συμπλόκου βρίσκονται κοντά στις βάσεις του DNA, γεγονός που επιβεβαιώνεται κι από την παρατηρούμενη μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία κατά ~0,2 ppm των πρωτονίων H3' και

H4'. Επίσης, η θέση του συμπλόκου συμφωνεί και με τις μικρές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων του υποκαταστάτη *m*, ο οποίος κατευθύνεται εκτός της αύλακος αλλά και με τις παρατηρούμενες μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία των πρωτονίων A₅A₆ H2', A₅A₆ H2'' και C₃ H5 (απέναντι από τη G₁₀), λόγω της εντόπισης του συμπλόκου κοντά στο τμήμα αυτό του ολιγονουκλεοτιδίου. Στο μοντέλο του Λ-ισομερούς (σχήμα 9.25), οι διπυριδυλικοί υποκαταστάτες απέχουν από τις βάσεις του DNA και η τελική θετικά φορτισμένη αμινομάδα της λυσίνης πλησιάζει προς τις φωσφορικές ομάδες του DNA, όπως είχαμε ήδη υποθέσει βάσει των χημικών μετατοπίσεων. Το μοντέλο που προέκυψε για τον τρόπο αλληλεπίδρασης του Λ-[Ru(bpy)₂(*m*-GHK)]²⁺ με το DNA, καταδεικνύει τη δέσμευση του στην ελάσσονα αύλακα της έλικας.



Σχήμα 9.25. Μοριακό μοντέλο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του Λ-[Ru(bpy)₂(*m*-GHK)]Cl₂ και του d(CGCGAATTCGCG)₂. Σε μεγέθυνση βλέπουμε (α) την όψη κατά μήκος της ελάσσονος αύλακας στην οποία φαίνεται ο προσανατολισμός του συμπλόκου εντός της ελάσσονος αύλακας, (β) όψη από την κορυφή κατά μήκος του άξονα *z* που δείχνει τον προσανατολισμό του συμπλόκου και του υποκαταστάτη *m* προς την έλικα.

Είναι ήδη γνωστό ότι τα τρεις χηλικά σύμπλοκα του ρουθηνίου με υποκαταστάτες 2,2'-διυριδυλίου ή 1,10-φαινανθρολίνης δεσμεύονται στις αύλακες του DNA. Για παράδειγμα, το $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ [57] δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα ενώ το $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phen})]^{2+}$ παρουσιάζει ένα παρόμοιο τρόπο δέσμευσης [41]. Ωστόσο, όταν στο σύμπλοκο του Ru(II) υπάρχει υποκαταστάτης με ικανότητα παρεμβολής (π.χ. dppz) σε συνδυασμό με δύο υποκαταστάτες bpy ή phen , το σύμπλοκο δεσμεύεται στο DNA μέσω παρεμβολής αυτού του υποκαταστάτη ανάμεσα στις βάσεις οδηγώντας τους δύο άλλους υποκαταστάτες στην ελάσσονα αύλακα (π.χ. $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ [94], $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{Me}_2\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ [106], $[\{\text{Ru}(\text{Me}_2\text{bpy})_2\}(\mu\text{-bpy})]^{4+}$ [141]). Μερικές φορές, ο υποκαταστάτης που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις είναι αυτός που οδηγεί το μόριο στη δέσμευση από τη μείζονα αύλακα όπως στην περίπτωση του $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$ όπου ο υποκαταστάτης dppz οδηγεί τα μόρια της φαινανθρολίνης εντός της μείζονος αύλακας [89]. Συνεπώς, δημιουργείται ένα ερώτημα σχετικά με το ποιοι είναι οι παράγοντες που καθορίζουν από ποια αύλακα, μείζονα ή ελάσσονα, πλησιάζει την έλικα του DNA ένα οκταεδρικό σύμπλοκο. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που καθορίζουν τον τρόπο αλληλεπίδρασης οκταεδρικών τρις χηλικών συμπλόκων μετάπτωσης με το DNA είτε αυτά αλληλεπιδρούν μέσω παρεμβολής ή μέσω δέσμευσης στις αύλακες. Οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι η υδροφοβικότητα των υποκαταστατών, το σχήμα του μορίου, πώς τοποθετούνται οι υποκαταστάτες σε σχέση με τη διπλή έλικα του DNA αλλά και πώς μπορούν να ταιριάζουν στην επιφάνεια του DNA [39]. Όπως ήδη έχει αναφερθεί (ενότητα 5.2.2.1) για την περίπτωση της αλληλεπίδρασης με το DNA του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$, το Δ -εναντιομερές ταιριάζει καλύτερα στη συμμετρία της δεξιόστροφης έλικας ενώ για το Λ -εναντιομερές δημιουργούνται στερικές αλληλεπιδράσεις των μη παρεμβαλλόμενων υποκαταστατών με το φωσφορικό σκελετό, με αποτέλεσμα να υπάρχει εναντιοεκλεκτικότητα για τη δέσμευση στο DNA υπέρ του Δ -εναντιομερούς [27]. Από την άλλη, έχει διαπιστωθεί ότι γενικότερα η ύπαρξη υποκαταστατών αυξημένου μεγέθους οδηγεί σε αύξηση της εναντιοεκλεκτικότητας υπέρ της παρεμβολής του Δ -εναντιομερούς συγκριτικά με το Λ κατά την αλληλεπίδραση με το DNA [39].

Στην περίπτωση του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2$, το συνδεδεμένο πεπτιδίο φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στον τρόπο δέσμευσης των δύο εναντιομερών. Η αλληλεπίδραση του συνδεδεμένου πεπτιδίου με το δωδεκανουκλεοτίδιο έχει ήδη τεκμηριωθεί από τα δεδομένα NMR με παρουσία σημαντικών μετατοπίσεων τόσο για τα πρωτόνια του πεπτιδίου όσο και τα

πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου και την παρουσία σημαντικού αριθμού στενών επαφών NOE, ιδιαίτερα στην περίπτωση του Δ-ισομερούς. Θα μπορούσαμε συνεπώς να ισχυριστούμε ότι το πεπτίδιο καθορίζει τον προσανατολισμό των δύο ισομερών στις αύλακες. Στην περίπτωση του Δ-ισομερούς, το σύμπλοκο εισέρχεται εντός της μείζονος αύλακας με τους υποκαταστάτες *m* και *bpy* εξασφαλίζοντας τη μέγιστη δυνατόν αλληλεπίδραση τόσο μέσω της αλληλεπίδρασης του *bpy* με τις βάσεις αλλά και μέσω του πεπτιδίου του *m*. Για το Λ-ισομερές, ο διαφορετικός προσανατολισμός του πεπτιδίου (σχήμα 9.25) σε σύγκριση με το Δ-ισομερές πιθανότατα δεν ευνοεί τη δέσμευσή του στη μείζονα αύλακα, με αποτέλεσμα το Λ-ισομερές να εισέρχεται εντός της ελάσσονος αύλακας με τον υποκαταστάτη *m*, επιτυγχάνοντας με αυτό τον τρόπο τη μέγιστη δυνατή αλληλεπίδραση με το DNA μέσω του συνδεδεμένου πεπτιδίου αλλά ταυτόχρονα ελαττώνοντας τις στεरिकές αλληλεπιδράσεις δεδομένου ότι οι λιγότερο ογκώδεις υποκαταστάτες *bpy* κατευθύνονται εκτός της αύλακας. Βέβαια, ακόμα και σε αυτή την περίπτωση, η αλληλεπίδραση του πεπτιδικού τμήματος περιορίζεται στον σκελετό του DNA.

Έχοντας αυτά υπόψη, η δέσμευση του Δ-[Ru(*bpy*)₂(*m*-GHK)]Cl₂ στη μείζονα αύλακα συμφωνεί με (i) τις σχετικές διαστάσεις του συμπλόκου και τη μείζονα αύλακα του ολιγονουκλεοτιδίου (οι διαστάσεις κατ' εκτίμηση του συμπλόκου είναι περίπου 22 Å στο μήκος και 11 Å στο πλάτος, ενώ το μέγεθος της μείζονος αύλακας είναι 11,6 Å × 8,5 Å και της ελάσσονος αύλακας 6,0 Å × 8,2 Å, με *x* βάθος [2]), (ii) τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στον πεπτιδικό σκελετό και τα πρωτόνια της εξωκυκλικής αμινομάδας της κυτοσίνης που δεν συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου, ο οποίος ερμηνεύεται με την προσέγγιση των συμπλόκων από τη μείζονα αύλακα και (iii) το γεγονός ότι η μείζονα αύλακα είναι πλούσια σε αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες και γι' αυτό το λόγο προτιμά τη δέσμευση θετικά φορτισμένων κατιονικών συμπλόκων καθώς και την ομάδα NH₃⁺ της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης. Συνεπώς, το πεπτίδιο φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στον τρόπο δέσμευσης των συμπλόκων στο ολιγονουκλεοτίδιο. Στην περίπτωση του Λ-ισομερούς, τα NOE cross-peak ασθενούς έντασης που παρατηρήθηκαν μεταξύ του πεπτιδικού NH της γλυκίνης NH με τα H1' της T₈ και τα H3'/H5' του *m* με τα A₆ και C₉ H1', δείχνουν ότι μόνο ο υποκαταστάτης *m* αλληλεπιδρά με το ολιγονουκλεοτίδιο από την ελάσσονα αύλακα.



9.3.2. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ με τη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου d(CGCGATCGCG)₂

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ με το δεκανουκλεοτίδιο d(CGCGATCGCG)₂ πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας ¹H NMR δύο διαστάσεων και πιο συγκεκριμένα μέσω των πειραμάτων TOCSY, DQF COSY και NOESY. Οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των διαστερομερών συμπλόκων και του DNA παρατίθενται στους πίνακες 9.13, 9.14 και 9.15. Η απουσία σημαντικών μεταβολών στις χημικές μετατοπίσεις του ολιγονουκλεοτιδίου στην περίπτωση του Δ-ισομερούς όταν αυτό βρίσκεται σε αναλογία 1:1 με το DNA, οδήγησε στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του με το DNA στις αναλογίες 2:1 και 5:1 οπότε και προέκυψαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Στην περίπτωση του Λ-ισομερούς, η περαιτέρω αύξηση της αναλογίας Λ:DNA>1,0 δεν οδήγησε σε σημαντική μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων τόσο για το σύμπλοκο όσο και για το DNA.

Τα φάσματα ¹H NMR των συμπλόκων Λ και Δ παρουσία του δεκανουκλεοτιδίου παρουσιάζουν μία κορυφή για τα αντιδρώντα και τα προϊόντα, γεγονός που σημαίνει ότι οι δεσμευμένες μορφές, το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο και το σύμπλοκο βρίσκονται σε ταχεία ανταλλαγή (στην κλίμακα χρόνου του NMR σε θερμοκρασία δωματίου). Συνεπώς, υπό αυτές τις συνθήκες, από τα δεδομένα του NMR μπορούμε να παρατηρήσουμε το μέσο όρο των πιθανών δεσμευμένων μορφών και να κάνουμε εκτιμήσεις ως προς τον τρόπο δέσμευσης περισσότερο ποιοτικές παρά ποσοτικές. Σε όλα τα φάσματα NOESY, όλων των δειγμάτων που μετρήθηκαν, διαπιστώνεται ότι η ένταση των cross-peak αυξάνεται σύμφωνα με την ακόλουθη σειρά $\alpha_{H2'-H8/H6} \geq \alpha_{H1'-H8/H6} > \alpha_{H3'-H8/H6}$ όσον αφορά τα NOE μεταξύ των βάσεων και των σακχάρων και $\alpha_{H2''-H1'} > \alpha_{H2'-H1'} > \alpha_{H1'-H4'}$ όσον αφορά τα NOE μεταξύ των πρωτονίων του σακχάρου. Η σειρά αυτή είναι ενδεικτική της διαμόρφωσης του γλυκοζιτικού δεσμού *anti* και διαμόρφωσης του σακχάρου στην περιοχή C1'-*exo* ως C2'-*endo*, χαρακτηριστικά του B-DNA [242]. Η παρουσία ισχυρών NOE cross-peak στα φάσματα NOESY, για όλα τα δείγματα, είναι χαρακτηριστική της διαμόρφωσης C2'-*endo* του σακχάρου [261]. Τα φάσματα NOESY χαρακτηρίζονται επίσης από την παρουσία των cross-peak A₅ H₂ - T₆ H1', A₅ H₂ - C₇ H1' και A₅ H₂ - C₇ H₅ ενδεικτικών της παρουσίας propeller twisting στην περιοχή A₅T₆C₇ (και τη συμμετρική της G₄A₅T₆) [250]. Το propeller



twisting δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση του δεκανουκλεοτιδίου με τα Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺.

Πίνακας 9.13

Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR των συμπλόκων Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ παρουσία του d(CGCGATCGCG)₂, pH=7,00 (0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄), στους 298 K σε 90% H₂O/10% D₂O*.

Πρωτόνια	Δ	Δ + DNA 1:1	Δ + DNA 2:1	Δ + DNA 5:1	Λ	Λ + DNA 1:1
H3 bpy	8,44	<u>8,29 (-0,15)</u>	<u>8,30 (-0,14)</u>	<u>8,37 (-0,07)</u>	8,45	<u>8,40 (-0,04)</u>
H3' bpy	8,44	<u>8,35 (-0,09)</u>	<u>8,35 (-0,09)</u>	<u>8,37 (-0,07)</u>	8,45	<u>8,40 (-0,04)</u>
H4 bpy	7,29	<u>7,24 (-0,05)</u>	<u>7,22 (-0,07)</u>	7,26 (-0,03)	7,30	7,28 (-0,01)
H4' bpy	7,29	<u>7,25 (-0,04)</u>	<u>7,23 (-0,06)</u>	7,26 (-0,03)	7,30	7,28 (-0,01)
H5 bpy	7,97	<u>7,87 (-0,10)</u>	<u>7,86 (-0,11)</u>	<u>7,92 (-0,05)</u>	7,97	7,94 (-0,03)
H5' bpy	7,97	<u>7,91 (-0,06)</u>	<u>7,89 (-0,08)</u>	<u>7,92 (-0,05)</u>	7,97	7,94 (-0,03)
H6 bpy	7,70	<u>7,63 (-0,07)</u>	<u>7,61 (-0,09)</u>	<u>7,66 (-0,04)</u>	7,71	<u>7,66 (-0,04)</u>
H6' bpy	7,70	<u>7,65 (-0,05)</u>	<u>7,64 (-0,06)</u>	<u>7,66 (-0,04)</u>	7,71	<u>7,66 (-0,04)</u>
4-CH ₃ m	2,46	<u>2,42 (-0,04)</u>	<u>2,40 (-0,06)</u>	<u>2,42 (-0,04)</u>	2,46	2,43 (-0,03)
H3 m	8,38	<u>8,33 (-0,05)</u>	<u>8,31 (-0,07)</u>	<u>8,34 (-0,04)</u>	8,39	<u>8,34 (-0,04)</u>
H3' m	8,74	<u>8,69 (-0,05)</u>	<u>8,68 (-0,06)</u>	<u>8,70 (-0,04)</u>	8,74	<u>8,70 (-0,04)</u>
H5 m	7,18	7,16 (-0,02)	<u>7,14 (-0,04)</u>	7,16 (-0,02)	7,18	7,17 (-0,01)
H5' m	7,90	<u>7,86 (-0,04)</u>	<u>7,84 (-0,06)</u>	<u>7,86 (-0,04)</u>	7,91	<u>7,86 (-0,04)</u>
H6,6' m	7,55	<u>7,51 (-0,04)</u>	<u>7,50 (-0,05)</u>	7,52 (-0,03)	7,56	7,53 (-0,02)
H _{a1} Gly	3,51	3,54 (-0,03)	3,51 (0,00)	3,53 (-0,02)	3,50	3,54 (-0,03)
H _{a2} Gly	3,68	<u>3,72 (-0,04)</u>	3,70 (+0,02)	3,70 (-0,02)	3,68	<u>3,72 (+0,04)</u>
NH Gly	7,10	<u>7,06 (0,04)</u>	<u>7,05 (-0,05)</u>	<u>7,06 (-0,04)</u>	7,10	<u>7,06 (-0,04)</u>
H _a His	4,63	4,63 (0,00)	4,62 (-0,01)	<u>4,59 (-0,04)</u>	4,60	4,60 (-0,03)
H _b His	3,08	3,11 (-0,03)	3,11 (-0,03)	3,07 (-0,01)	3,08	3,09 (+0,01)
H ₂ His	7,74	7,74 (0,00)	<u>7,70 (-0,04)</u>	7,73 (0,01)	7,74	7,73 (-0,01)
H ₃ His	7,49	7,46 (-0,03)	<u>7,44 (-0,05)</u>	7,46 (-0,03)	7,49	<u>7,45 (-0,04)</u>
H _a Lys	4,19	4,19 (0,00)	<u>4,23 (+0,04)</u>	4,19 (0,00)	4,18	4,18 (-0,01)
H _{b2} Lys	1,67	1,67 (0,00)	1,65 (-0,02)	1,67 (0,00)	1,65	1,66 (-0,01)
H _{b3} Lys	1,74	1,73 (-0,01)	1,72 (-0,02)	1,73 (-0,01)	1,74	1,74 (0,00)
H _γ Lys	1,33	1,33 (0,00)	1,33 (0,00)	1,33 (0,00)	1,31	1,31 (-0,02)
H _δ Lys	1,60	1,60 (0,00)	1,60 (0,00)	1,60 (0,00)	1,58	1,58 (-0,02)
H _ε Lys	2,92	2,91 (-0,01)	2,90 (-0,02)	2,91 (-0,01)	2,90	2,90 (-0,02)
NH Lys	8,49	8,49 (0,00)	8,50 (-0,01)	8,49 (0,00)	-	-

*Υπογραμμίζονται οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις $\geq 0,04$ ppm. Το αρνητικό $\Delta\delta$ υποδηλώνει μετατόπιση της κορυφής προς υψηλότερα πεδία ενώ το θετικό πρόσθιο υποδηλώνει μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία.



Πίνακας 9.14

Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ παρουσία των συμπλόκων Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(m\text{-GHK})]\text{Cl}_2$ σε αναλογία 1:1, $pD=7,00$ (0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), στους 298 K σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O .

Πρωτόνια	DNA	+Δ 1:1	+Δ 1:2	+Δ 1:5	+Λ 1:1	Πρωτόνια	DNA	+Δ 1:1	+Δ 1:2	+Δ 1:5	+Λ 1:1
$\text{C}_1 \text{H1}'$	5,65	5,65	5,64	<u>5,62</u>	<u>5,62</u>	$\text{T}_6 \text{H1}'$	5,80	5,80	5,79	5,78	5,79
$\text{C}_1 \text{H2}'$	1,86	1,86	1,85	<u>1,81</u>	1,84	$\text{T}_6 \text{H2}'$	1,92	1,93	1,93	1,94	1,92
$\text{C}_1 \text{H2}''$	2,30	2,31	2,30	2,28	2,30	$\text{T}_6 \text{H2}''$	2,35	2,34	2,33	<u>2,31</u>	2,34
$\text{C}_1 \text{H5}$	5,80	5,81	5,79	<u>5,77</u>	5,79	$\text{T}_6 \text{H6}$	7,02	7,03	7,03	7,04	7,03
$\text{C}_1 \text{H6}$	7,52	7,53	7,52	7,51	7,52	$\text{T}_6 \text{CH}_3$	1,23	1,24	1,25	<u>1,27</u>	1,24
$\text{G}_2 \text{H1}'$	5,79	5,79	5,78	<u>5,76</u>	5,78	$\text{C}_7 \text{H1}'$	5,59	5,58	5,57	<u>5,54</u>	5,58
$\text{G}_2 \text{H2}'$	2,56	2,58	2,56	2,54	2,57	$\text{C}_7 \text{H2}'$	1,93	1,93	1,93	1,93	1,93
$\text{G}_2 \text{H2}''$	2,63	2,62	2,61	<u>2,60</u>	2,62	$\text{C}_7 \text{H2}''$	2,30	2,29	2,28	<u>2,26</u>	2,28
$\text{G}_2 \text{H8}$	7,85	7,85	7,85	7,84	7,84	$\text{C}_7 \text{H5}$	5,47	5,48	5,48	5,48	5,47
$\text{C}_3 \text{H1}'$	5,55	5,55	5,55	5,54	5,55	$\text{C}_7 \text{H6}$	7,32	7,33	7,33	7,32	7,32
$\text{C}_3 \text{H2}'$	1,84	1,84	1,82	<u>1,78</u>	1,83	$\text{G}_8 \text{H1}'$	5,75	5,75	5,74	5,73	5,75
$\text{C}_3 \text{H2}''$	2,26	2,25	2,25	<u>2,21</u>	2,26	$\text{G}_8 \text{H2}'$	2,52	2,53	2,52	2,52	2,52
$\text{C}_3 \text{H5}$	5,28	5,29	5,28	5,28	5,28	$\text{G}_8 \text{H2}''$	2,59	2,59	2,59	2,58	2,59
$\text{C}_3 \text{H6}$	7,20	7,20	7,19	7,18	7,20	$\text{G}_8 \text{H8}$	7,80	7,80	7,80	7,79	7,80
$\text{G}_4 \text{H1}'$	5,55	5,53	<u>5,52</u>	<u>5,47</u>	<u>5,52</u>	$\text{C}_9 \text{H1}'$	5,65	5,64	5,64	<u>5,61</u>	5,64
$\text{G}_4 \text{H2}'$	2,62	2,62	2,61	<u>2,59</u>	2,61	$\text{C}_9 \text{H2}'$	1,79	1,79	1,78	<u>1,75</u>	1,78
$\text{G}_4 \text{H2}''$	2,72	2,71	<u>2,69</u>	<u>2,66</u>	2,71	$\text{C}_9 \text{H2}''$	2,22	2,21	2,20	<u>2,16</u>	2,20
$\text{G}_4 \text{H8}$	7,80	7,79	7,80	7,78	7,80	$\text{C}_9 \text{H5}$	5,33	5,34	5,33	5,32	5,33
$\text{A}_5 \text{H1}'$	6,14	6,12	6,12	<u>6,08</u>	6,12	$\text{C}_9 \text{H6}$	7,21	7,22	7,21	7,19	7,21
$\text{A}_5 \text{H2}'$	2,51	2,52	2,52	2,52	2,51	$\text{G}_{10} \text{H1}'$	6,04	6,03	<u>6,00</u>	<u>5,94</u>	<u>6,01</u>
$\text{A}_5 \text{H2}''$	2,84	2,83	2,82	<u>2,79</u>	2,83	$\text{G}_{10} \text{H2}'$	2,51	2,51	2,51	2,50	2,50
$\text{A}_5 \text{H2}$	7,67	7,66	<u>7,64</u>	<u>7,59</u>	7,66	$\text{G}_{10} \text{H2}''$	2,28	2,26	2,26	<u>2,23</u>	<u>2,25</u>
$\text{A}_5 \text{H8}$	8,07	8,07	8,07	8,07	8,07	$\text{G}_{10} \text{H8}$	7,83	7,83	7,82	<u>7,80</u>	7,82

* Έχουν υπογραμμιστεί οι μετατοπίσεις $>0,02$ ppm.



Πίνακας 9.15

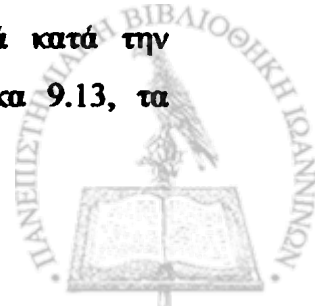
Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων του ελεύθερου $d(\text{CGCGATCGCG})_2$, των συμπλόκων Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(m\text{-GHK})]\text{Cl}_2$ και η μεταβολή τους όταν DNA και σύμπλοκο βρίσκονται σε αναλογία 1:1, σε 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH = 7,00), 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%\text{D}_2\text{O}$, στους 298 K^a.

Πρωτόνια ^b	DNA	+ Λ 1:1 ($\delta/\Delta\delta$)	+ Δ 2:1 ($\delta/\Delta\delta$)	+ Δ 5:1 ($\delta/\Delta\delta$)	+ Λ 1:1 ($\delta/\Delta\delta$)
$\text{C}_1 \text{NH}_{2\text{nb}}$	6,76	6,75 (-0,01)	6,74 (-0,02)	<u>6,72 (-0,04)</u>	<u>6,72 (-0,04)</u>
$\text{G}_2 \text{NH}$	12,95	12,94 (-0,01)	<u>12,92 (-0,03)</u>	<u>12,86 (-0,09)</u>	12,93 (-0,02)
$\text{G}_2\text{-C}_9 \text{NH}_{2\text{b}}$	8,35	8,35 (0,00)	-8,33 (-0,02)	<u>8,29 (-0,06)</u>	8,34 (-0,01)
$\text{G}_2\text{-C}_9 \text{NH}_{2\text{nb}}$	6,48	6,49 (+0,01)	6,48 (0,00)	6,47 (-0,01)	6,48 (0,00)
$\text{C}_3\text{-G}_8 \text{NH}_{2\text{b}}$	8,25	8,24 (-0,01)	8,24 (-0,01)	<u>8,21 (-0,04)</u>	8,24 (-0,01)
$\text{C}_3\text{-G}_8 \text{NH}_{2\text{nb}}$	6,29	6,30 (+0,01)	6,30 (+0,01)	6,31 (-0,02)	6,30 (+0,01)
$\text{G}_4 \text{NH}$	12,61	12,60 (-0,01)	12,59 (-0,02)	<u>12,55 (-0,06)</u>	12,60 (-0,01)
$\text{G}_4\text{-C}_7 \text{NH}_{2\text{b}}$	8,29	8,29 (0,00)	8,27 (-0,02)	<u>8,24 (-0,05)</u>	8,28 (-0,01)
$\text{G}_4\text{-C}_7 \text{NH}_{2\text{nb}}$	6,63	6,64 (+0,01)	6,64 (+0,01)	6,63 (0,00)	6,63 (0,00)
$\text{A}_5 \text{NH}_{2\text{b}}$	8,29	8,29 (0,00)	8,27 (-0,02)	<u>8,24 (-0,05)</u>	8,28 (-0,01)
$\text{A}_5 \text{NH}_{2\text{nb}}$	6,63	6,64 (+0,01)	6,64 (+0,01)	6,63 (0,00)	6,63 (0,00)
$\text{T}_6 \text{NH}$	13,44	<u>13,40 (-0,04)</u>	<u>13,37 (-0,07)</u>	<u>13,28 (-0,15)</u>	<u>13,40 (-0,04)</u>
$\text{G}_8 \text{NH}$	12,80	12,80 (0,00)	12,78 (-0,02)	<u>12,75 (-0,05)</u>	12,79 (-0,01)
$\text{G}_{10} \text{NH}_{2\text{nb}}$	6,76	6,75 (-0,01)	6,74 (-0,02)	<u>6,72 (-0,04)</u>	<u>6,72 (-0,04)</u>

^a Έχουν υπογραμμιστεί οι μετατοπίσεις $>0,02$ ppm. Το αρνητικό $\Delta\delta$ υποδηλώνει μετατόπιση της κορυφής προς υψηλότερα πεδία ενώ το θετικό πρόσθετο υποδηλώνει μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία.

^b $\text{NH}_{2\text{nb}}$ = ομάδα NH_2 που δεν συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου και $\text{NH}_{2\text{b}}$ = ομάδα που συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου.

Όπως μπορεί κανείς να παρατηρήσει από τους παραπάνω πίνακες, η προσθήκη του Δ -ισομερούς σε αναλογία 1:1 ως προς το δεκαυνουκλεοτίδιο έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές μετατοπίσεις για τα πρωτόνια του συμπλόκου ενώ τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου επηρεάζονται ελάχιστα. Η μικρή πραγματικά επίδραση του συμπλόκου στο περιβάλλον των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου οφείλεται στο γεγονός ότι τα πρωτόνια αυτά βρίσκονται ήδη σε ένα περιβάλλον υψηλής ηλεκτρονιακής πυκνότητας λόγω του φαινομένου συσσώρευσης των νουκλεϊνικών βάσεων το οποίο δεν αλλάζει σημαντικά κατά την προσέγγιση του συμπλόκου. Συγκεκριμένα, όπως προκύπτει από τον πίνακα 9.13, τα



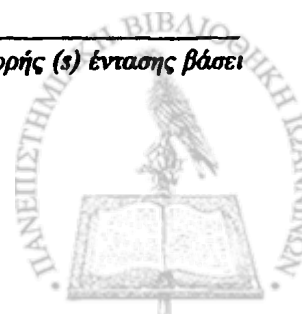
αρωματικά πρωτόνια των διπυριδυλικών υποκαταστατών μετατοπίζονται σημαντικά προς υψηλότερα πεδία με τα πρωτόνια H3 και H3' των υποκαταστατών *bpy* να παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες μετατοπίσεις, -0,15 ppm και -0,09 ppm, αντιστοίχως. Οι μετατοπίσεις αυτές των αρωματικών πρωτονίων των διπυριδυλικών υποκαταστατών προς υψηλότερα πεδία καθώς και η παρουσία ενός ασθενούς NOE μεταξύ του πρωτονίου H6' του *bpy* και του G₈ H8 (πίνακας 9.16) δείχνει την παρουσία του Δ-ισομερούς κοντά στη διπλή έλικα του DNA. Συνεπώς, τα δεδομένα αυτά είναι ενδεικτικά της παρουσίας του Δ-ισομερούς σε τέτοια απόσταση από τις βάσεις του DNA ώστε να υφίστανται την επίδραση των ρευμάτων δακτυλίου αλλά η απουσία σημαντικών διαμοριακών NOE δεν μας επιτρέπει να μιλήσουμε για δέσμευση του συμπλόκου στις αύλακες. Επιπλέον, η απουσία σημαντικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του Δ-ισομερούς με το δεκανουκλεοτίδιο στην αναλογία 1:1 επιβεβαιώνεται και από την απουσία σημαντικών μετατοπίσεων για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου πέρα από τα ιμινο πρωτόνια της T₆. Η εικόνα μεταβάλλεται δραματικά όταν η αναλογία Δ-ισομερούς- d(CGCGATCGCG)₂ αυξάνεται σε 2:1 και ακόμα περισσότερο όταν η αναλογία μεταβληθεί σε 5:1. Τα διαμοριακά NOE που παρατηρούνται μεταξύ των Λ- και Δ-[Ru(*bpy*)₂(*m*-GHK)]²⁺ και του d(CGCGATCGCG)₂ δίνονται στον πίνακα 9.16 ενώ στο σχήμα 9.26 βλέπουμε τα NOE για την αναλογία 2:1 στην περίπτωση του Δ-ισομερούς.

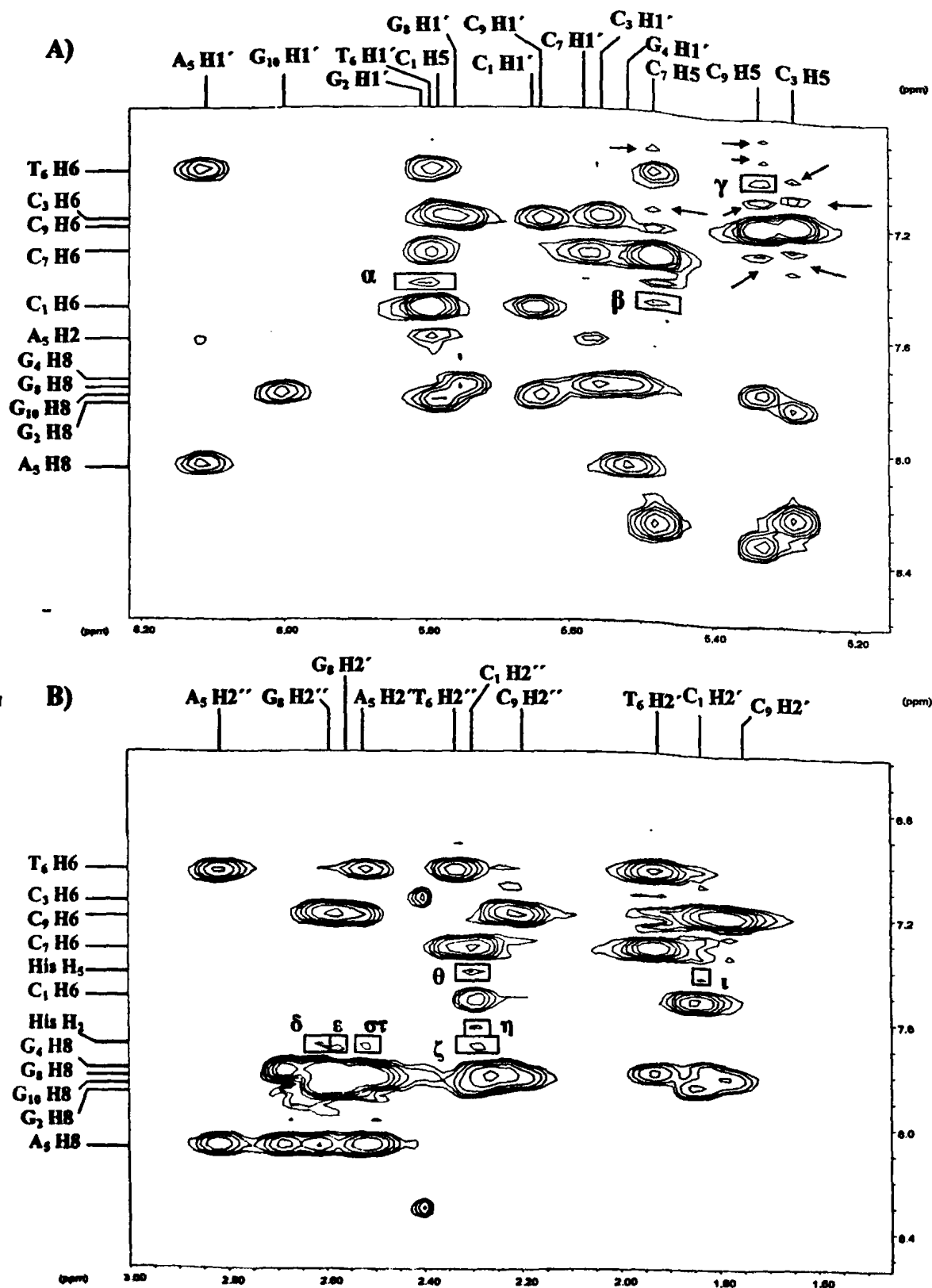
Πίνακας 9.16

Τα NOE cross-peaks που παρατηρούνται μεταξύ των πρωτονίων των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(*bpy*)₂(*m*-GHK)]Cl₂ και του d(CGCGATCGCG)₂ σε 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH = 7,00), 90% H₂O/ 10%D₂O, στους 298 K^ο.

Λ		Δ	
1:1	2:1	5:1	1:1
H6' <i>bpy</i> – G ₈ H8 (w)	H6,6' <i>m</i> – C ₇ H5 (w)	Gly NH – C ₃ H2'' (m)	H3' <i>m</i> – A ₅ H2 (w)
	His H ₅ – C ₁ H5 (w)		
	Gly NH – C ₉ H5 (w)		
	H6' <i>bpy</i> – C ₁ H2'' (w)		
	His H ₂ – G ₂ H2'' (w)		
	His H ₅ – C ₁ H2' (w)		
	His H ₂ – G ₈ H2' (w)		
	Lys H _γ – T ₆ H6 (m)		
	His H ₅ – C ₁ H2'' (w)		
	His H ₂ – G ₈ H2'' (w)		
	His H ₂ – C ₇ H2'' (w)		

Τα cross-peak χαρακτηρίζονται ποιοτικά ως ασθενής (w), μέτριας (m) και ισχυρής (s) έντασης βάσει της σύγκρισής τους με το ολοκλήρωμα του cross-peak C H5→C H6.





Σχήμα 9.26. Τμήματα του φάσματος ^1H NOESY ($\tau_m = 250$ ms) του συστήματος $\Delta-[Ru(bpy)_3(m-GHK)]Cl_2 - [d(CGCGATCGCG)]$ σε αναλογία 2:1 στους 298 K των περιοχών H6,H8- H1' (A) και H6,H8-H2,H2'' (B). Τα crosspeak που επισημαίνονται αντιστοιχούν στα παρακάτω: (α) His $H_5-C_1 H5$, (β) m H6,6'-C₇ H5, (γ) Gly NH-C₇ H5, (δ) His $H_7-G_2 H2''$, (ε) His $H_7-G_4 H2''$, (στ) His $H_7-G_8 H2'$, (ζ) His $H_7-C_7 H2''$, (η) H6' bpy-C₁ H2'', (θ) His $H_5-C_1 H2'$, (ι) His $H_5-C_1 H2'$. Με βέλη επισημαίνονται τα νέα cross-peak που πιθανότατα οφείλονται στην ύπαρξη διαμορφωμένων.

Το φάσμα ^1H NMR σε αναλογία 2:1, χαρακτηρίζεται από μικρή αύξηση στις χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων των διπυριδυλικών υποκαταστατών του Δ-ισομερούς αλλά και από την παρουσία σημαντικών μετατοπίσεων για τα πρωτόνια G_4 $\text{H1}'$ και $\text{H2}''$, A_5 H2 , G_{10} $\text{H1}'$, T_6 NH και G_2 NH του δεκανουκλεοτιδίου. Επιπλέον, στην αναλογία 2:1 παρατηρείται σημαντικός αριθμός διαμοριακών NOE (πίνακας 9.16), η πλειοψηφία των οποίων περιλαμβάνει τα πρωτόνια $\text{H2}'$ και $\text{H2}''$ του σακχάρου που εντοπίζονται στη μείζονα αύλακα. Όταν η αναλογία Δ-ισομερούς- $\text{d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ αυξάνεται σε 5:1 συμβαίνει κάτι πραγματικά αξιοσημείωτο. Οι μετατοπίσεις των πρωτονίων του Δ-ισομερούς μειώνονται και χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χημική μετατόπιση του πρωτονίου H3 του *hrg*, η οποία από -0,15 ppm σε αναλογία 1:1 ελαττώνεται σχεδόν στη μισή τιμή, στα -0,07 ppm σε αναλογία 5:1. Από την άλλη, τα πρωτόνια του δεκανουκλεοτιδίου εμφανίζουν σημαντικές μετατοπίσεις. Πιο συγκεκριμένα, σημαντικές μετατοπίσεις παρατηρούνται για τα πρωτόνια του σακχάρου όλων των νουκλεοτιδίων πλην του G_4 αλλά και για τα ανταλλάξιμα με το διαλύτη πρωτόνια για τα οποία και οι μετατοπίσεις είναι οι σημαντικότερες και περιλαμβάνουν όλα τα ιμινο πρωτόνια από τα οποία η μεγαλύτερη μετατόπιση παρατηρείται για τα T_6 NH και είναι -0,15 ppm.

Οι μετατοπίσεις των ιμινο πρωτονίων είναι χαρακτηριστικές κατά την αλληλεπίδραση του Δ-ισομερούς με το δεκανουκλεοτίδιο σε όλες τις αναλογίες που μελετήθηκαν και είναι ιδιαίτερα αυξημένες στην αναλογία 5:1. Η μετατόπιση των ιμινο πρωτονίων, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία είναι ένα γεγονός που χαρακτηρίζει τις αλληλεπιδράσεις πληθώρας χημικών ενώσεων με το DNA. Η μελέτη με φασματοσκοπία ^1H NMR της αλληλεπίδρασης περισσότερων από 70 φαρμάκων με το DNA, από τη J. Feigon και τους συνεργάτες της [262], ανέδειξε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της μετατόπισης των ιμινο-πρωτονίων και του τρόπου αλληλεπίδρασής τους με τη διπλή έλικα του DNA. Έτσι, η παρουσία μετατοπίσεων προς υψηλότερα πεδία χαρακτηρίζει τις ενώσεις που παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις ενώ η μετατόπιση των σημάτων των ιμινο πρωτονίων προς χαμηλότερα πεδία παρουσιάζεται κατά τη δέσμευση μιας ένωσης σε μία από τις δύο αύλακες [262]. Κατά τη μη ειδική εξωτερική δέσμευση μιας ένωσης στο DNA δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στα σήματα των ιμινο πρωτονίων [262]. Από τη βιβλιογραφία προκύπτουν ενδιαφέροντα αποτελέσματα σχετικά με την αλληλεπίδραση συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης με το DNA. Έτσι, μετατοπίσεις των ιμινο πρωτονίων προς υψηλότερα πεδία έχουν παρατηρηθεί κατά την



αλληλεπίδραση με το DNA των Λ - και Δ -[Ru(dmphe)₂dprq]²⁺ (όπου dmphe= 2,9-διμεθυλ-1,10-φαινανθρολίνη και dprq= διυριδο[3,2-f:2',3'-h]κινόξαλίνη) [95], Δ -[Ru(Me₂phen)₂dppz]²⁺ (Me₂phen = 2,9-διμεθυλ-1,10-φαινανθρολίνη, dppz= διυριδο-[3,2-α:2',3'-c]φαιναζίνη) [106] και Δ -[Ru(phen)₂dprq]²⁺ [94], τα οποία αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής. Από την άλλη, στην περίπτωση των $\Lambda\Lambda$ -[Ru(Me₂bpy)₂]₂(μ-bpm)]⁴⁺ (όπου Me₂bpy= 4,4'-διμεθυλ-2,2'-διυριδύλιο και bpm= 2,2'-διυριμιδίνη) [139], Pt(en)₂²⁺ [263] και [(en)Pt(μ-dprzm)₂Pt(en)]⁴⁺ (en= αιθυλενοδιαμίνη, dprzm= 4,4'-διυραζολυλμεθάνιο) [264] που δεσμεύονται στην ελάσσονα αύλακα του DNA, δεν παρατηρήθηκε μετατόπιση στα σήματα των ιμινο πρωτονίων ενώ στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης του Δ -Co(en)₃³⁺ με το d(TCGGGATCCCGA)₂, το NH της T₇ μετατοπίζεται προς υψηλότερα πεδία και τα NH των γουανινών προς χαμηλότερα πεδία [93]. Συνεπώς, η μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία θα έλεγε κανείς ότι αποτελεί κοινό εύρημα των ενώσεων που παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις του DNA αλλά στην περίπτωση των ενώσεων που δεσμεύονται στις αύλακες δεν θα μπορούσε κανείς να γενικεύσει όσον αφορά τη συμπεριφορά των σημάτων των ιμινο πρωτονίων. Στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης των Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)₂]²⁺ με το d(CGCGAATTCGCG)₂, τα οποία δεσμεύονται στις αύλακες του DNA, παρατηρήθηκαν επίσης μετατοπίσεις των ιμινο πρωτονίων προς χαμηλότερα πεδία. Όταν τα Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)₂]²⁺ αλληλεπιδρούν με το d(CGCGATTCGCG)₂, όπως φαίνεται και από τον πίνακα 9.15, τα σήματα των ιμινο πρωτονίων μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία.

Η μετατόπιση αυτή των ιμινο πρωτονίων προς υψηλότερα πεδία δεν θα μπορούσε να οφείλεται σε παρεμβολή. Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν απουσιάζουν τα τυπικά χαρακτηριστικά της παρεμβολής. Κατ' αρχάς, οι μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων των διυριδυλικών υποκαταστατών είναι σημαντικά μικρότερες από αυτές που παρατηρούνται όταν ένας αρωματικός υποκαταστάτης παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις και οι οποίες συνήθως ξεπερνούν τα 0,5 ppm [156]. Από την άλλη, δεν επηρεάζονται τα διανουκλεοτιδικά NOE cross-peaks nH1' $\Rightarrow$ (n+1)H6/H8, γεγονός που σημαίνει ότι δεν υπάρχει απομάκρυνση των βάσεων η οποία θα παρατηρούταν σε περίπτωση παρεμβολής. Επίσης, η κινητική των συστημάτων που μελετήθηκαν υπήρξε ταχεία στην κλίμακα χρόνου του NMR και όχι ενδιάμεση ή αργή όπως στις περισσότερες περιπτώσεις παρεμβολής [122, 265]. Συνεπώς, η παρατηρούμενη μετατόπιση των ιμινο-πρωτονίων προς χαμηλότερα πεδία



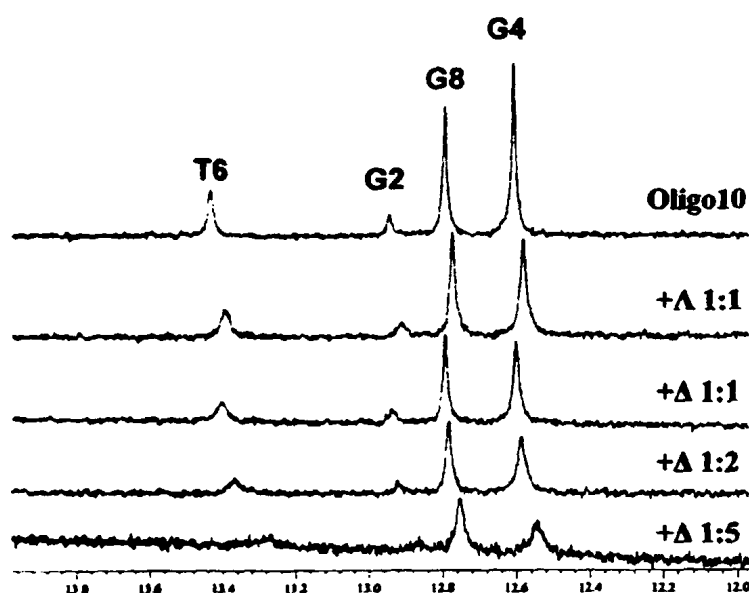
ιδιαίτερα στην περίπτωση του συστήματος Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)₂]²⁺ - d(CGCGATCGCG)₂ σε αναλογία > 1:1 δεν μπορεί να αποδοθεί σε αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής.

Πέρα από τη μετατόπιση των ιμινο πρωτονίων κατά την αλληλεπίδραση του DNA με κάποιο μόριο, μεγάλη σημασία φαίνεται να έχει και η κινητική ανταλλαγής τους με τον διαλύτη. Είναι γνωστό ότι τα ιμινο πρωτόνια των βάσεων όταν συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου προστατεύονται από την ανταλλαγή με το διαλύτη [266]. Για να πραγματοποιηθεί η ανταλλαγή με το διαλύτη θα πρέπει να διακοπεί ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ των βάσεων. Έχει βρεθεί ότι για τα ζεύγη των βάσεων στα άκρα μιας αλληλουχίας υπάρχει ταχεία ανταλλαγή μεταξύ της κατάστασης των ζευγαρωμένων βάσεων και των ανοιγμένων αλυσίδων, η σταθερά της οποίας εξαρτάται από την ύπαρξη βάσης η οποία μπορεί να δράσει ως καταλύτης και να επιταχύνει τη διαδικασία ανταλλαγής [267]. Από την άλλη, στα ζεύγη των βάσεων που βρίσκονται στο εσωτερικό της αλληλουχίας, η ανταλλαγή πραγματοποιείται κάθε φορά που ανοίγουν οι δύο αλυσίδες του DNA και συνεπώς η ταχύτητα ανταλλαγής αποτελεί και ένα μέτρο του ρυθμού ανοίγματος των δύο αλυσίδων [267]. Για τα ζεύγη βάσεων του εσωτερικού της αλληλουχίας, η ταχύτητα ανταλλαγής είναι ανεξάρτητη της ύπαρξης βάσης που μπορεί να δράσει ως καταλύτης [267]. Στο σχήμα 9.27 φαίνεται η περιοχή των ιμινο-πρωτονίων του φάσματος μίας διάστασης του ολιγονουκλεοτιδίου d(CGCGATCGCG)₂ και πως αυτή μεταβάλλεται παρουσία του Δ και του Λ ισομερούς. Ο προσδιορισμός των χημικών μετατοπίσεων των ιμινο-πρωτονίων υπήρξε δυνατός παρά την εκτεταμένη διεύρυνση των σημάτων από τα ισχυρά cross-peak που παρατηρούνται στο φάσμα NOESY λόγω της χημικής ανταλλαγής τους με το νερό. Στον πίνακα 9.17 δίνονται οι χρόνοι ανταλλαγής των ιμινο πρωτονίων όπως αυτοί υπολογίστηκαν από το εύρος των σημάτων (στο μισό του ύψους της κορυφής μετά από προσομοίωση της από τη λορεντζιανή συνάρτηση του προγράμματος Origin 7.0) σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\tau_{ex} = \frac{1}{\pi\Delta}$$

Όπου τ_{ex} =ο χρόνος ανταλλαγής ενός ζεύγους βάσεων και Δ = η διαφορά στο εύρος της κορυφής του αντίστοιχου ιμινο-πρωτονίου του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου και παρουσία του Δ ή του Λ -ισομερούς [266]. Από τους χρόνους ανταλλαγής μπορούμε να αξιολογήσουμε ποσοτικά την έκταση του φαινομένου. Έτσι, είναι φανερό η διεύρυνση των σημάτων





Σχήμα 9.27. Περιοχή 12,0-14,0 ppm του φάσματος 1D του $d(CGCGATCGCG)_2$ (Oligo10) όπου φαίνονται οι κορυφές των ιμινο-πρωτονίων και πως αυτές μεταβάλλονται παρουσία των Λ - και Δ - $[Ru(bpy)_2(m-GHK)]^{2+}$.

παρουσία του Λ και του Δ -ισομερούς σε αναλογία 1:1, με το Δ -ισομερές να εμφανίζει λίγο μεγαλύτερους χρόνους ανταλλαγής συγκριτικά με το Λ -ισομερές. Μεγαλύτερη διεύρυνση και περαιτέρω ελάττωση των χρόνων ανταλλαγής παρατηρείται στην αναλογία 2:1 του Δ -ισομερούς. Τους μικρότερους χρόνους ανταλλαγής εμφανίζουν τα ιμινο πρωτόνια των βάσεων T_6 και G_2 . Η βάση G_2 ανήκει στο προτελευταίο νουκλεοτίδιο κι επομένως

ακολουθεί το άνοιγμα των αλυσίδων που ήδη υπάρχει στα άκρα. Τα ζεύγη AT έχει βρεθεί γενικότερα ότι ανοίγουν πιο εύκολα συγκριτικά με τα ζεύγη GC [266, 268]. Σε αναλογία 5:1 του Δ -ισομερούς, οι κορυφές των T_6 NH και G_2 NH έχουν σχεδόν εξαφανιστεί ενώ σημαντική διεύρυνση έχουν υποστεί επιπλέον οι κορυφές των G_4 NH και G_8 NH που βρίσκονται προς το εσωτερικό της έλικας. Επιπλέον, η μειωμένη συμμετοχή των ιμινο-πρωτονίων στο δεσμό υδρογόνου του ζεύγους δικαιολογεί επιπλέον και τη μετατόπιση των σημάτων προς υψηλότερα πεδία. Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι παρουσία των Λ και Δ -ισομερών επηρεάζεται σημαντικά η διαμόρφωση της διπλής έλικας.

Το άνοιγμα των αλυσίδων του DNA επιβεβαιώνεται περαιτέρω και από τη μεταβολή στην ένταση των cross-peak στο φάσμα δύο διαστάσεων NOESY, όπως αναμένεται. Οι μεγαλύτερες μεταβολές αφορούν τα ανταλλάξιμα με το διαλύτη πρωτόνια. Αναλυτικά τα cross-peak των οποίων η ένταση επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση με τα Λ - και Δ - $[Ru(bpy)_2(m-GHK)]^{2+}$ δίνεται στον πίνακα 9.18 ενώ στο σχήμα 9.28 βλέπουμε πως μεταβάλλεται η περιοχή των NH-NH₂ του φάσματος NOESY. Παρατηρούμε τη μείωση σε ένταση αλλά και την εξαφάνιση cross-peak μεταξύ πρωτονίων των δύο αλυσίδων όπως π.χ. τα cross-peak G_2 NH-C₉ NH_{2b} και G_4 NH- T_6 NH των οποίων η εξαφάνιση υποδηλώνει την αύξηση στην απόσταση των δύο αλυσίδων. Είναι φανερό η σταδιακή αύξηση του αριθμού



των cross-peak που επηρεάζονται καθώς αυξάνεται η αναλογία του Δ-ισομερούς προς το δεκανουκλεοτίδιο.

Πίνακας 9.17

Χρόνοι ανταλλαγής των μινο-πρωτονίων του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ παρουσία των Δ- και Δ- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}$ σε 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH = 7,00), 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%\text{D}_2\text{O}$, στους 298 K.

	G ₄	G ₈	G ₂	T ₆
+Δ 1:1	75,6 msec	146,7 msec	43,1 msec	71,7 msec
+Δ 1:1	68,8 msec	165,0 msec	62,1 msec	49,8 msec
+Δ 1:2	39,7 msec	108,0 msec	^a	32,0 msec
+Δ 1:5	18,5 msec	34,1 msec	^a	^a

^a Δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός λόγω εκτεταμένης διεύρυνσης του σήματος.

Το άνοιγμα των αλυσίδων του DNA σε πολλές περιπτώσεις συνοδεύεται και από απώλεια της συμμετρίας C₂ και την παρουσία διαμορφωμερών. Και στην περίπτωση του συστήματος $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}$ - $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ υπάρχουν ενδείξεις για την παρουσία διαμορφωμερών του DNA. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από την παρουσία cross-peak (τέτοια cross-peak επισημαίνονται στο σχήμα 9.29Γ) λόγω χημικής ανταλλαγής μεταξύ πρωτονίων του νουκλεϊνικού οξέος, η συμμετρία των οποίων μεταβάλλεται κατά τον σχηματισμό συμπλόκου. Έτσι, ενδεικτικά αναφέρεται ότι τα μη ισοδύναμα πρωτόνια H6 της T₆ δίνουν ένα cross-peak (σχήμα 9.29Γ), όπως και τα μη ισοδύναμα πρωτόνια H6 των C₃ και C₉ (σχήμα 9.29Γ) και τα πρωτόνια H8 των γουανινών (σχήμα 9.29Γ). Κάθε ζεύγος σημάτων μπορεί να προσδιοριστεί με ευκολία αφού το cross-peak της ανταλλαγής βρίσκεται δίπλα στη διαγώνιο. Η παρουσία, λοιπόν, αυτών των cross-peak ανταλλαγής είναι ενδεικτική της ύπαρξης ισορροπίας μεταξύ δύο καταστάσεων όπου το $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}$ δεσμεύεται με δύο διαφορετικούς προσανατολισμούς στη μείζονα αύλακα του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ [89]. Επιπλέον, όπως μπορεί να δει κανείς από την περιοχή του φάσματος NOESY H6,H8-H1' στην περίπτωση της αναλογίας 2:1 (σχήμα 9.26Α) παρατηρούνται νέα cross-peak τα οποία δεν μπορούν να αποδοθούν στα ήδη γνωστά πρωτόνια και πιθανότατα οφείλονται στην



ύπαρξη διαμορφωμένων. Χαρακτηριστικά βλέπουμε την παρουσία νέων cross-peak συμμετρικά πάνω και κάτω από τα ισχυρά cross-peak H6-H5 των κυτοσινών C₃, C₇ και C₉.

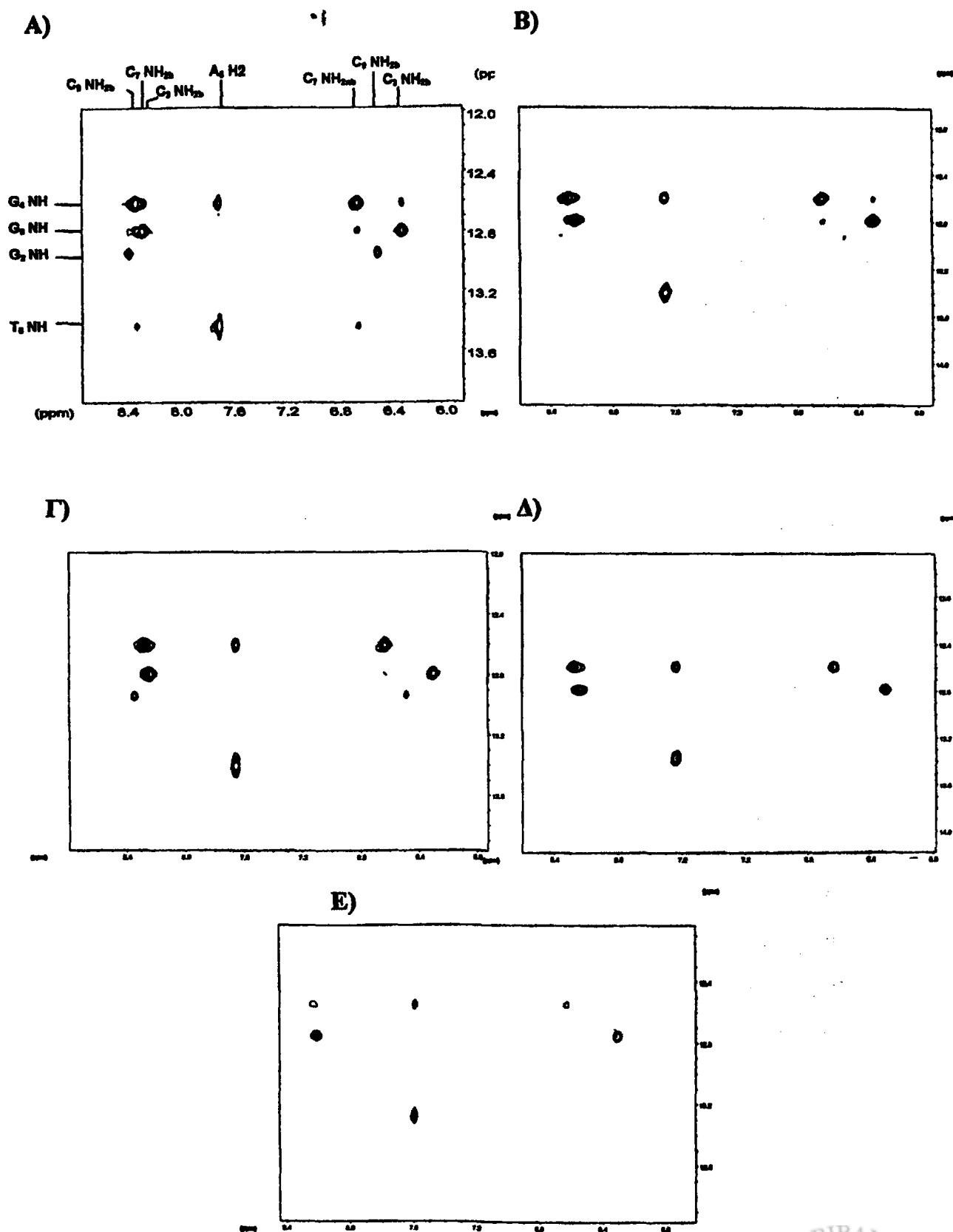
Πίνακας 9.18

Διανουκλεοτιδικά NOE cross-peaks ($\tau_m=250$ ms) του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ των οποίων η ένταση επηρεάζεται κατά την αλληλεπίδρασή του με τα Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺ σε 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH = 7,00), 90% H₂O/ 10%D₂O, στους 298 K.

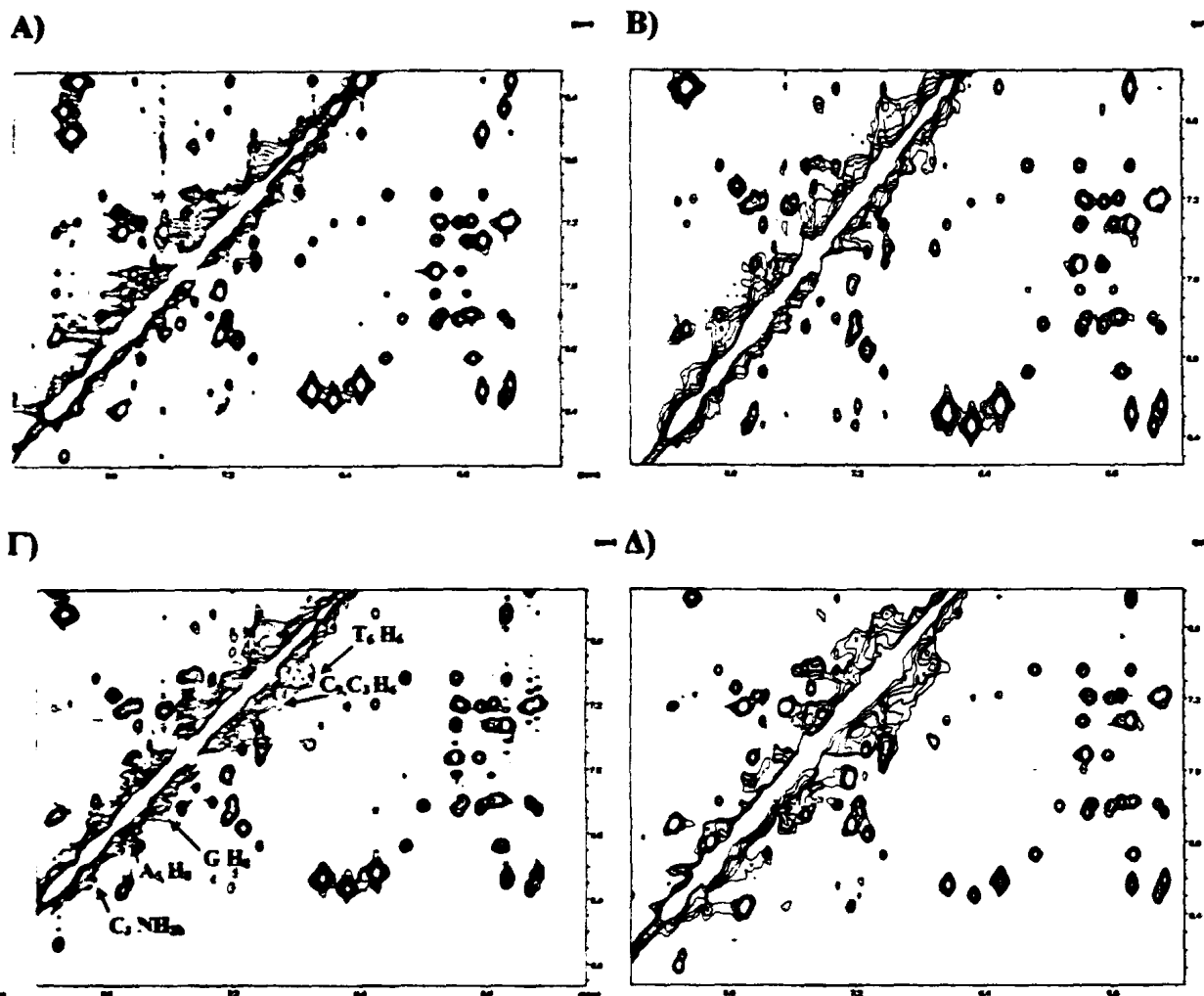
Λ (1:1)	Δ (1:1)	Δ (2:1)	Δ (5:1)
A ₅ NH _{2nb} -T ₆ NH	T ₆ NH-C ₇ NH _{2nb} ^a	T ₆ NH-G ₄ NH ^a	A ₅ H2-T ₆ NH
C ₉ NH _{2nb} -G ₂ NH	G ₈ NH-C ₇ NH _{2nb} ^a	G ₂ NH-G ₈ NH ^a	A ₅ H2-G ₄ NH
G ₂ NH-C ₉ NH _{2b} ^a	G ₄ NH-C ₃ NH _{2nb} ^a	G ₈ NH-G ₄ NH	C ₇ NH _{2b} -G ₄ NH
T ₆ NH-C ₇ NH _{2b} ^a	T ₆ NH-C ₇ NH _{2b} ^a	A ₅ NH _{2b} -T ₆ NH ^a	G ₈ NH-G ₄ NH
G ₈ NH-C ₇ NH _{2b} ^a	A ₅ NH _{2b} -T ₆ NH ^a	C ₉ NH _{2b} -G ₂ NH ^a	G ₂ NH-C ₉ NH _{2b} ^a
G ₂ NH-C ₉ NH _{2b} ^a	T ₆ NH-G ₄ NH	A ₅ NH _{2nb} -T ₆ NH ^a	G ₂ NH-C ₉ NH _{2nb} ^a
T ₆ NH-C ₇ NH _{2b} ^a		G ₄ NH-C ₇ H5	G ₄ NH-C ₇ NH _{2b}
A ₅ NH _{2b} -T ₆ NH		T ₆ NH-C ₇ NH _{2b} ^a	G ₄ NH-A ₅ H2
C ₉ NH _{2b} -T ₆ NH		G ₂ NH-C ₉ NH _{2b} ^a	G ₄ NH-C ₇ NH _{2nb}
T ₆ NH-G ₄ NH		T ₆ NH-C ₇ NH _{2nb} ^a	G ₈ NH-C ₃ H5
G ₂ NH-G ₈ NH		G ₈ NH-C ₇ NH _{2nb} ^a	G ₄ NH-T ₆ NH ^a
		G ₂ NH-C ₉ NH _{2nb} ^a	G ₂ NH-G ₈ NH ^a
		G ₄ NH-C ₃ NH _{2nb} ^a	T ₆ NH-C ₇ NH _{2b} ^a
			G ₈ NH-C ₇ NH _{2nb} ^a
			G ₂ NH-C ₉ NH _{2nb} ^a
			G ₄ NH-C ₃ NH _{2nb} ^a
			T ₆ NH-C ₇ NH _{2nb} ^a
			A ₅ NH _{2b} -T ₆ NH ^a
			C ₉ NH _{2b} -G ₂ NH ^a
			C ₃ NH _{2nb} -G ₄ NH

^a Εξαφάνιση του cross-peak.





Σχήμα 9.28. Μεταβολή στην ένταση των cross-peak της περιοχής NH-NH₂ του φάσματος NOESY ($\tau_m=250$ ms) του $d(CGCGATCGCG)_2$ (A) κατά την προσθήκη του Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺ σε αναλογία 1:1 (B) και του Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺ σε αναλογίες 1:1 (Γ), 2:1 (Δ) και 5:1 (Ε).



Σχήμα 9.29. Περιοχή H6,H8, H1'-H6,H8 του φάσματος NOESY ($\tau_m=250$ ms) όπου φαίνεται η παρουσία των cross-peak χημικών ανταλλαγής συμμετρικά γύρω από τη διαγώνιο του $d(CGCGATCGCG)_2$ παρουσία του $\Delta-[Ru(bpy)_3(m-GHK)]^{2+}$ 1:1 (A) και του $\Delta-[Ru(bpy)_3(m-GHK)]^{2+}$ σε αναλογία 1:1 (B), 2:1 (Γ) και 5:1 (Δ).

Μια θεωρητική μελέτη που έγινε από τους J. Ramstein και R. Lavery [269] έδειξε ότι υπάρχει ενεργειακή σύζευξη μεταξύ ανοίγματος των αλυσίδων και κάμψης του DNA. Δηλαδή, η ενέργεια που χρησιμοποιείται για να κάμψει τη διπλή έλικα του DNA μπορεί επίσης να προκαλέσει και άνοιγμα των αλυσίδων αλλά και αντιστρόφως δηλαδή αν ένα ζεύγος βάσεων χωρίσει, θα προκληθεί κάμψη του DNA και επιπλέον το DNA γίνεται πολύ εύκαμπτο για μεγάλο εύρος ακτίνας καμπυλότητας [269]. Αντιδραστήρια τα οποία μπορούν να μεταβάλλουν τη διαμόρφωση του DNA θεωρούνται πολύ σημαντικά και μπορούν να βρουν πολλές εφαρμογές όπως διευκολύνοντας ή παρεμποδίζοντας την πρόσβαση του DNA από άλλα μόρια που δεσμεύονται σε αυτό π.χ. ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας την αντιγραφή ή τη μεταγραφή του DNA. Επίσης, πιθανόν να μπορούν να προκαλέσουν την

κρυστάλλωση, τη σταθεροποίηση του DNA, ελεγχόμενη κάμψη του DNA, να μιμηθούν τη δράση πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο DNA, να χρησιμοποιηθούν ως αντιδραστήρια κοψίματος του DNA με πιθανή χρήση ως αντικαρκινικά φάρμακα [270]. Υπάρχει πληθώρα πειραματικών δεδομένων [271-273] που δείχνει ότι μπορεί να προκληθεί κάμψη του DNA από πολυσθενή ιόντα. Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για την ερμηνεία αυτού του φαινομένου. Έχει αναφερθεί η εξουδετέρωση των φωσφορικών ανιόντων [274], η κάμψη από πρωτεΐνες όπως αυτή που δεσμεύεται στην αλληλουχία TATA [275], η κάμψη μέσω σχηματισμού του ενδιαμέσου B/A/B [276]. Πρόσφατα, προτάθηκε από τους Rouzina και Bloomfield [277] ότι τα μικρά ευκίνητα κατιόντα προκαλούν κάμψη στο DNA με δέσμευση στην είσοδο της μείζονος αύλακος, ανάμεσα στις δύο φωσφορικές αλυσίδες, απωθώντας τα αντισταθμιστικά ιόντα νατρίου. Οπότε οι φωσφορικές ομάδες έλκονται από τα δεσμευμένα στην αύλακα κατιόντα με αποτέλεσμα το κλείσιμο της αύλακος και την κάμψη του DNA. Η κάμψη συνήθως κατανέμεται κατά μήκος ~ 6 ζευγών βάσεων με αποτέλεσμα να μην επηρεάζει σημαντικά τη B διαμόρφωση των αλυσίδων του DNA. Επίσης, το προτεινόμενο θεωρητικό μοντέλο των Rouzina και Bloomfield προβλέπει ότι η κάμψη θα είναι μεγαλύτερη για τις αλληλουχίες GC.

Η θεωρία που προτάθηκε από τον Rouzina και Bloomfield [277] φαίνεται να μπορεί να ερμηνεύσει ικανοποιητικά τα πειραματικά δεδομένα του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}\text{-d}(\text{CGCGATCGCG})_2$. Στην αναλογία 2:1, πληθώρα NOE παρατηρούνται που τοποθετούν το Δ -ισομερές εντός της μείζονος αύλακος ενώ ταυτόχρονα σημαντικές μετατοπίσεις παρατηρούνται για τα πρωτόνια του συμπλόκου αλλά και κάποια πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου. Καθώς όμως τα κατιόντα αυξάνονται σε μεγάλο βαθμό στην αναλογία Δ -ισομερούς-δεκανουκλεοτιδίου 5:1, γίνεται πλέον σημαντική η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στην είσοδο της αύλακος με αποτέλεσμα να προκαλείται σημαντική κάμψη του DNA και κλείσιμο της αύλακος. Τα κατιόντα φέρονται τελικά στην είσοδο της μείζονος αύλακος κι έτσι αυξάνεται η απόστασή τους από τις βάσεις του DNA, γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει τη μείωση στις μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων των διτυριδυλικών υποκαταστατών αλλά και την ταυτόχρονη αύξηση στις μετατοπίσεις των πρωτονίων του DNA. Οι πολυαμίνες (π.χ. σπερμίνη και σπερμιδίνη) είναι μόρια για τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι προκαλούν σημαντικές μεταβολές στη διαμόρφωση του DNA [270]. Ως μοντέλα των πολυαμινών



χρησιμοποιήθηκαν σύμπλοκα του Co(III) όπως τα $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, Λ - και Δ - $[\text{Co}(\text{en})_3]^{2+}$ και βρέθηκε ότι το $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ προκαλεί μετάπτωση του πλούσιου σε GC B-DNA σε Z-DNA [278]. Η μελέτη με φασματοσκοπία ^1H NMR της αλληλεπίδρασης του Δ - $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ με την αλληλουχία $d(\text{TCGGGATCCCGA})_2$ έδειξε ότι δεσμεύεται εκλεκτικά στη θέση GG προκαλώντας ταυτόχρονα propeller twisting των ζευγών βάσεων C_8G_5 και T_7A_6 [93]. Το Δ - $[\text{Co}(\text{en})_3]^{3+}$ δεν φαίνεται να προκαλεί μετάπτωση του DNA από τη B-μορφή στη Z και ακόμα και σε αναλογία 4:1 ως προς τη διπλή έλικα δεν παρατηρείται κάμψη του DNA [93]. Δεδομένου της ομοιότητας της αλληλουχίας με αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (τα τέσσερα νουκλεοτίδια GATC στο κέντρο της αλληλουχίας είναι ίδια) αλλά και το γεγονός ότι το Co(III) έχει μεγαλύτερο θετικό φορτίο από το Ru(II), είναι εμφανές ότι η δυνατότητα πρόκλησης κάμψης στο DNA δεν προέρχεται μόνο από το θετικό φορτίο του εκάστοτε μορίου ή μεταλλοϊόντος.

Όπως προκύπτει από τον πίνακα 9.16, ο μεγαλύτερος αριθμός των διαμοριακών NOE στην αναλογία 2:1 προκύπτει μεταξύ του πεπτιδίου Gly-His-Lys και πρωτονίων του σακχάρου που βρίσκονται στην είσοδο της μείζονος αύλακος. Φαίνεται λοιπόν ότι σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ με το Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}$ παίζει κυρίως το πεπτίδιο. Αντιθέτως, στην περίπτωση της δέσμευσης του Δ -ισομερούς στη μείζονα αύλακα της αλληλουχίας $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$, για την οποία δεν παρατηρήθηκε διαταραχή της δομής της διπλής έλικας, διαπιστώθηκε σημαντική συμμετοχή και από τον διπυριδυλικό υποκαταστάτη *bpy*. Η συμμετοχή βασικών αμινοξέων στην πρόκληση κάμψης στο DNA δεν αποτελεί κάτι καινούργιο. Υπάρχει πληθώρα πρωτεϊνών σημαντικών για τις κυτταρικές λειτουργίες όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή και για τις οποίες η κάμψη του DNA αποτελεί σημαντικό στοιχείο της δέσμευσης τους στο DNA. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι πρωτεΐνες HMG (High Mobility Group) [279], αυτές που δεσμεύονται στην αλληλουχία TATA [280], ο παράγοντας HIF (Host Integration Factor) ο οποίος προκαλεί κάμψη λόγω της εισαγωγής μιας προλίνης ανάμεσα στις βάσεις [281] αλλά και η DNAάση I η οποία προκαλεί κάμψη του DNA μέσω αλληλεπιδράσεων τύπου stacking μεταξύ της πλευρικής αλυσίδας μιας τυροσίνης και του δακτυλίου μιας δεοξυριβόζης [282-283]. Πρωτεΐνες όπως οι παράγοντες μεταγραφής bZIP [284-285], η CAP από το *Escherichia Coli* [286] και οι MATa1 και MATa1 από το *Saccharomyces cerevisiae* [287] προκαλούν κάμψη μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Διάφορες μελέτες της αλληλεπίδρασης με

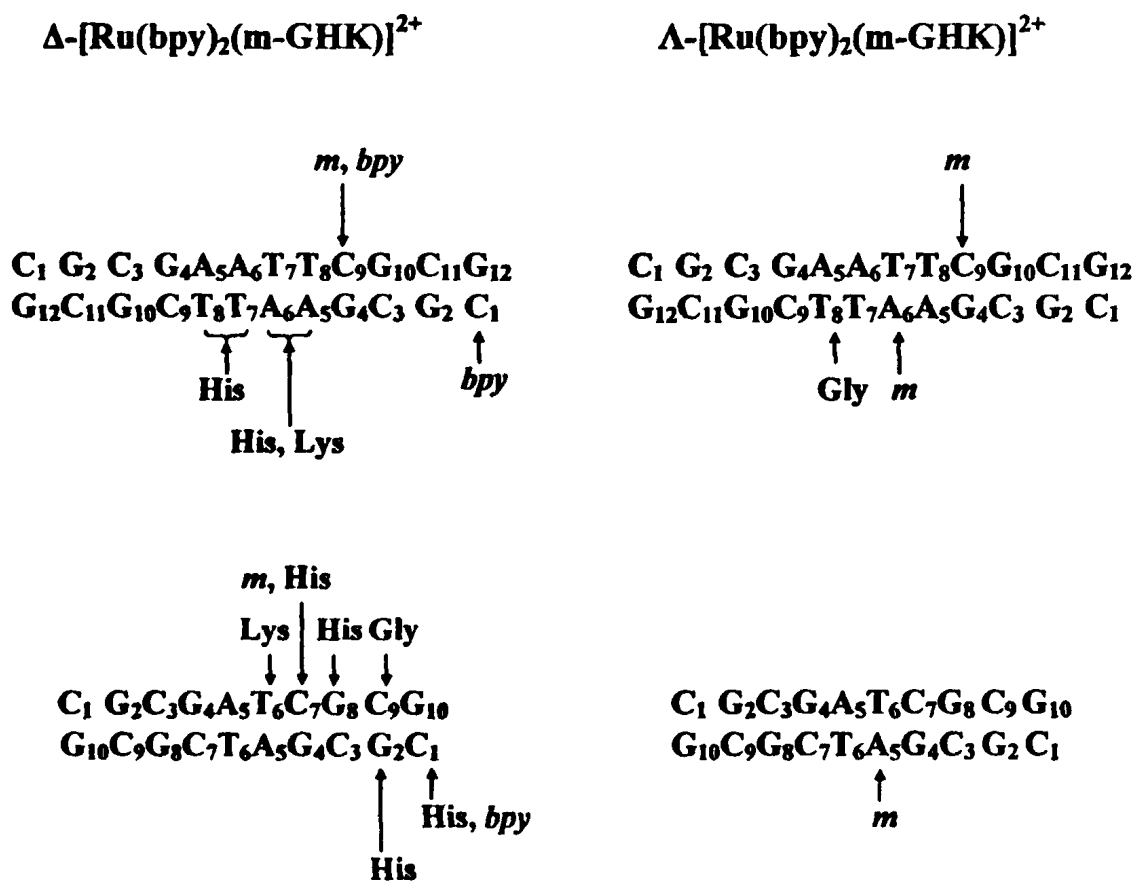


το DNA των παραγόντων μεταγραφής bZIP έδειξαν ότι για την πρόκληση κάμψης σημασία δεν έχει τόσο η διαμόρφωση του πεπτιδίου αλλά το τοπικό φορτίο που συγκεντρώνεται σε μια περιοχή από την παρουσία θετικά φορτισμένων βασικών αμινοξέων όπως η Arg και η Lys [288-289]. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά προτείνεται μοντέλο κατά το οποίο η εξουδετέρωση των φωσφορικών ανιόντων από τη μία πλευρά της διπλής έλικας οδηγεί σε ασύμμετρη κατανομή φορτίου κατά μήκος του DNA και κατάρρευση του προς την ουδέτερη επιφάνεια [288]. Επιβεβαίωση αυτού του μοντέλου έρχεται και από την αντικατάσταση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων από τις ουδέτερες μεθυλφωσφονικές ομάδες. Όταν οι μεθυλφωσφονικές ομάδες είναι διάσπαρτες κατά μήκος του DNA τότε παρατηρείται μικρότερη κάμψη συγκριτικά με το DNA στο οποίο υπάρχουν διαδοχικές αντικαταστάσεις των φωσφορικών ομάδων από μεθυλφωσφονικές ομάδες [290]. Η σημαντική συνεισφορά βασικών αμινοξέων όπως η Lys και η His στις μη ειδικές επαφές μιας πρωτεΐνης με το φωσφορικό σκελετό φαίνεται και στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της περιοριστικής ενδονουκλεάσης EcoRV με την αλληλουχία αναγνώρισής της, GATATC, στην οποία ταυτόχρονα προκαλεί κάμψη $\sim 50^\circ$ [291]. Από τα παραπάνω συνάγεται πως το Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺ μπορεί να μιμηθεί τη συμπεριφορά πρωτεϊνών σημαντικών για την κυτταρική λειτουργία οι οποίες μεταβάλλουν τη διαμόρφωση του DNA.

Όπως προκύπτει από τους πίνακες 9.13-9.15, δεν παρατηρούνται σημαντικές μετατοπίσεις για τις ομάδες (ή για τα γειτονικά τους πρωτόνια) τόσο του πεπτιδίου αλλά και του DNA που θα μπορούσαν να συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου. Συνεπώς αποκλείουμε την πιθανότητα σχηματισμού ειδικών επαφών μεταξύ του πεπτιδίου και των βάσεων μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Έτσι, φαίνεται ότι προεξάρχουν κυρίως οι αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσεως. Πέρα από τα διαμοριακά NOE μεταξύ των πρωτονίων του πεπτιδίου και του DNA στο σύστημα 2:1, τα συγκεκριμένα πρωτόνια (His H₂, H₅, Gly NH) παρουσιάζουν ποικίλου βαθμού μετατοπίσεις που πιθανότατα οφείλονται στην παρουσία σε κοντινή απόσταση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων. Από τα παραπάνω δεδομένα δεν προκύπτει συμπέρασμα όσον αφορά τη στοιχειομετρία του συμπλόκου του Δ -ισομερούς με το DNA. Βέβαια, καθώς αυξάνεται η αναλογία του Δ -ισομερούς υπάρχει η δυνατότητα της τοποθέτησης πέρα του ενός συμπλόκου ιόντος εντός της ευρύχωρης μείζονος αύλακος.



Σχετικά με την αλληλεπίδραση του Λ-ισομερούς με το δεκαμερές $d(CGCGATCGCG)_2$, καταλήγουμε ότι πρόκειται για ασθενή δέσμευση στην αύλακα του DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή συνοδεύεται από μικρές, σχεδόν αμελητέες μετατοπίσεις για τα πρωτόνια του συμπλόκου, ακόμη και για τα αρωματικά πρωτόνια των διπυριδυλικών υποκαταστατών. Η ύπαρξη του μοναδικού διαμοριακού NOE $H3' m - A_5 H2$ συνοδευόμενου και από τη μετατόπιση κατά $-0,03$ ppm των πρωτονίων $A_5 H2$ και $G_4 H1'$ τοποθετεί το Λ-ισομερές, και πιο συγκεκριμένα τον υποκαταστάτη m , στην ελάχιστονα αύλακα του DNA. Η ύπαρξη μετατοπίσεων των πρωτονίων $C_1 NH_{2nb}$ και $G_{10} NH_{2nb}$ συνιστά κάποια αλληλεπίδραση και με τα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου ενώ οι μετατοπίσεις του $T_6 NH$ αλλά και η μεταβολή στην ένταση των cross-peak των ιμινο πρωτονίων συνιστούν ότι το Λ-ισομερές επηρεάζει σε κάποιο βαθμό τη διαμόρφωση της διπλής έλικας πιθανότατα μέσω μη ειδικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.



Σχήμα 9.30. Σχηματική αναπαράσταση των NOE που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα Λ- και Δ- $[Ru(bpy)_2(m-GHK)]^{2+}$ και τις αλληλουχίες $d(CGCGAATTCGCG)_2$ (πάνω) και $d(CGCGATCGCG)_2$ (κάτω).



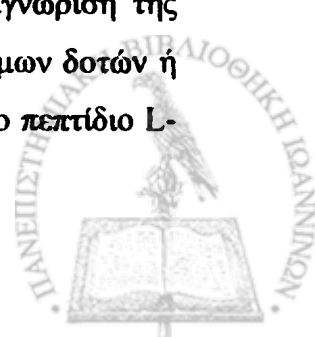
Η σύγκριση της αλληλεπίδρασης των Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺ με δύο διαφορετικές αλληλουχίες DNA, τις d(CGCGAATTCGCG)₂ και d(CGCGATCGCG)₂, μπορεί να μας οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την εκλεκτικότητα που παρουσιάζουν τα σύμπλοκα αυτού του τύπου κατά τη δέσμευσή τους στο DNA. Στο σχήμα 9.30 συνοψίζονται σχηματικά τα NOE που παρατηρήθηκαν για τα παραπάνω συστήματα. Κατ' αρχάς, το πιο σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι τα παραπάνω σύμπλοκα και ιδιαίτερα το Δ -ισομερές παρουσιάζουν διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης με τις δύο αλληλουχίες του DNA, οι οποίες διαφέρουν μόνο ως προς το κεντρικό τμήμα τους (AATT αντί AT), και συνεπώς είναι φανερό ότι μπορούν να «ανιχνεύσουν» σε μοριακό επίπεδο μικρές μεταβολές στην αλληλουχία του DNA. Έτσι, το Δ -ισομερές χρησιμοποιούμενο σε αναλογία 1:1 με τις παραπάνω αλληλουχίες του DNA θα αλληλεπιδράσει ισχυρά με το δωδεκαμερές ενώ η αλληλεπίδρασή του με το δεκαμερές θα είναι αμελητέα.

Ένα ερώτημα που προκύπτει, ιδιαίτερα αν κάποιος παρατηρήσει τη διαφορετική τοποθέτηση του πεπτιδίου (σχήμα 9.30) ως προς τις βάσεις του DNA όταν αλλάζει η αλληλουχία, είναι σε ποια περίπτωση σχηματίζεται πιο ειδικό σύμπλοκο με το DNA. Για να προσεγγίσουμε το ερώτημα αυτό θα πρέπει να ανατρέξουμε στη διαπίστωση που κάναμε για το άνοιγμα των αλυσίδων και την ενδεχόμενη κάμψη του DNA στο σύστημα Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺-d(CGCGATCGCG)₂ αλλά και στις δυνατότητες αλληλεπίδρασης ενός οποιουδήποτε κατιόντος με το DNA. Συνεπώς, τίθεται το ερώτημα: Μπορεί οποιοδήποτε κατιόν να προκαλέσει κάμψη στο DNA; Η απάντηση δίνεται από το θεωρητικό μοντέλο των Rouzina και Bloomfield [277] σύμφωνα με το οποίο ένα κατιόν για να μπορέσει να προκαλέσει κάμψη θα πρέπει να τοποθετηθεί κεντρικά στην είσοδο της μείζονος αύλακος. Όμως, είναι γνωστό ότι τα μικρά κατιόντα των μετάλλων αλλά βέβαια και κατ' επέκταση τα μεγαλύτερα σύμπλοκα κατιόντα είναι ευκίνητα όταν δεσμεύονται στο DNA. Διάφορες θεωρητικές μελέτες έχουν δείξει ότι η τοποθέτηση ενός κατιόντος σε διάφορες θέσεις του DNA οδηγεί στον σχηματισμό διαφόρων δεσμών υδρογόνου και van der Waals [292-293]. Ο σχηματισμός αυτών των «ειδικών» επαφών έχει ως αποτέλεσμα να ελαττώνεται η ενέργεια του κατιόντος αλλά δεν μειώνεται σημαντικά η ευκινησία του [277]. Αντιθέτως, δημιουργείται ένα φάσμα ενεργειακών καταστάσεων στις οποίες υπάρχει και μια μικρή μείωση της ευκινησίας του μεταλλοϊόντος. Όταν δεσμεύονται πολλά μεταλλοϊόντα στο DNA, δημιουργείται κορεσμός στις χαμηλότερες ενεργειακές καταστάσεις τόσο λόγω στερικών



αλληλεπιδράσεων αλλά και λόγω ηλεκτροστατικών απώσεων ανάμεσα στα κατιόντα. Επίσης, ένα μικρό τμήμα του πολυανιονικού DNA θα εξουδετερώνεται από ασθενώς δεσμευμένα κατιόντα. Ανάμεσα στα ισχυρώς και ασθενώς δεσμευμένα κατιόντα, θα υπάρχουν και κάποια που δεσμεύονται ισχυρά αλλά μη ειδικά όπως αυτά που βρίσκονται κεντρικά στην είσοδο της μείζονος αύλακος και είναι στην ενεργειακή κατάσταση του πολυηλεκτρολύτη δεδομένου ότι δεν σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και van der Waals παρά μόνο μετά την πρόκληση της κάμψης του DNA. Η ενεργειακή κατάσταση του πολυηλεκτρολύτη παραμένει κενή μέχρι να γεμίσουν οι στάθμες χαμηλότερης ενέργειας. Ένα κατιόν μπορεί να ανέβει σε αυτή τη στάθμη μέσω μιας διαδικασίας ενεργοποίησης αλλά ο χρόνος ζωής του θα είναι πολύ μικρός για να συμβεί η διαδικασία της κάμψης, η οποία είναι αργή. Η ικανότητα λοιπόν κάμψης του DNA περιορίζεται στα κατιόντα που μπορούν να τοποθετηθούν στην είσοδο της μείζονος αύλακος χωρίς να χρειαστεί η ενέργεια ενεργοποίησης. Τέτοια κατιόντα παρατηρούνται όταν αυξάνει η αναλογία δεσμευμένων μεταλλοϊόντων προς τα φωσφορικά [277]. Η ενδιαφέρουσα αυτή θεωρία της αλληλεπίδρασης των μεταλλοϊόντων με το DNA μας δείχνει ότι η απουσία μη ειδικών επαφών αυξάνει την πιθανότητα για την πρόκληση της κάμψης του DNA ώστε να αυξηθεί και η πιθανότητα για σχηματισμό των επαφών αυτών. Στη δική μας περίπτωση, θα μπορούσε να πει κανείς ότι στο σύστημα $\Delta\text{-[Ru(bpy)}_2\text{(m-GHK)]}^{2+}\text{-d(CGCGAATTCGCG)}_2$ δημιουργούνται οι κατάλληλες ειδικές επαφές που οδηγούν στη σταθεροποίηση του παραγώγου που σχηματίζεται και η σταθερότητα αυτή επιβεβαιώνεται και από την απουσία χημικής ανταλλαγής λόγω ισορροπίας μεταξύ διαμορφωμένων της δεσμευμένης μορφής του DNA. Αντιθέτως, στο σύστημα $\Delta\text{-[Ru(bpy)}_2\text{(m-GHK)]}^{2+}\text{-d(CGCGATCGCG)}_2$, οι αλληλεπιδράσεις είναι μη ειδικές, κυρίως ηλεκτροστατικού χαρακτήρα, με αποτέλεσμα το άνοιγμα των αλυσίδων και κατ' επέκταση την κάμψη του DNA.

Επίσης, ένα ερώτημα που αποτελεί αντικείμενο όλων των εργασιών πάνω στις αλληλεπιδράσεις συμπλόκων μετάλλων μετάπτωσης με το DNA είναι: Ποια αύλακα; Όπως είδαμε και στην εισαγωγή, στην ελάσσονα αύλακα δεσμεύεται πλήθος οργανικών μορίων και αντιβιοτικών τα οποία διαθέτουν ευκίνητες αλυσίδες, οι οποίες μπορούν να πάρουν το σχήμα της αύλακος ενώ το τελικό σύμπλοκο σταθεροποιείται συνήθως από τη δημιουργία ειδικών επαφών, συνήθως δεσμών υδρογόνου. Καθοριστικοί παράγοντες για την αναγνώριση της ελάσσονος αύλακος είναι συνεπώς το σχήμα του μορίου και οι θέσεις των ατόμων δοτών ή δεκτών δεσμών υδρογόνου. Παράδειγμα, αποτελεί το σύμπλοκο του Ni(II) με το πεπτίδιο L-



Arg-Gly-His που δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα της αλληλουχίας AATT μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και το σχήμα του θυμίζει σε μεγάλο βαθμό τη νετροψίνη και το Hoechst [172]. Τα κατιόντα που δεν χωράνε στην ελάσσονα αύλακα κατευθύνονται στη μείζονα αύλακα. Το Λ-ισομερές κατευθύνεται προς την ελάσσονα αύλακα κυρίως μέσω του υποκαταστάτη m και της αλυσίδας του πεπτιδίου GHK. Όμως οι στεरिकές αλληλεπιδράσεις που προέρχονται από τους δύο διτυριδυλικούς υποκαταστάτες, δεδομένου ότι η συμμετρία του Λ-ισομερούς δεν ταιριάζει με τη συμμετρία της δεξιόστροφης έλικας, δεν επιτρέπουν την αποτελεσματική αλληλεπίδραση του συμπλόκου με τις βάσεις του DNA, με αποτέλεσμα την ασθενή του δέσμευση. Από την άλλη, η ύπαρξη πιθανότατα ακόμα μεγαλύτερων στερικών αλληλεπιδράσεων στην περίπτωση του Δ-ισομερούς, το κατευθύνουν στη μείζονα αύλακα. Είναι γνωστό ότι το μοριακό σχήμα της μείζονος αύλακος ποικίλλει ανάλογα με την αλληλουχία σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με την ελάσσονα αύλακα [270]. Πιθανότατα αυτή είναι και η αιτία της μεγάλης διαφοροποίησης της αλληλεπίδρασης του Δ-ισομερούς με τις δύο αλληλουχίες του DNA που μελετήθηκαν. Έτσι, στην περίπτωση του δωδεκαμερούς, το Δ-ισομερές μεγιστοποιεί τις αλληλεπιδράσεις του χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα τον υποκαταστάτη m και το πεπτίδιο αλλά και έναν υποκαταστάτη hrg σχηματίζοντας παράγωγο που σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου, van der Waals αλλά και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η ελάσσονα αύλακα του δεκαμερούς είναι ακόμα στενότερη λόγω της παρουσίας του propeller twisting, παρέχοντας ένα ακόμα λόγο για να κατευθυνθεί το Δ-ισομερές στη μείζονα αύλακα, το μοριακό σχήμα όμως της οποίας δεν του επιτρέπει να δημιουργήσει τις κατάλληλες επαφές που θα σταθεροποιήσουν την αλληλεπίδραση. Το αποτέλεσμα είναι η αλληλεπίδραση να είναι ηλεκτροστατικού χαρακτήρα και να οδηγεί στη μεταβολή των χαρακτηριστικών της μείζονος αύλακος ώστε να σχηματιστεί ένα πιο σταθερό σύμπλοκο.



9.3.3. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂ με ολιγονουκλεοτίδια

9.3.3.1. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂ με τη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου d(CGCGATCGCG)₂.

Από τα φάσματα NOESY των συστημάτων των Λ- και Δ-διαστερομερών σε αναλογία 1:1 με το d(CGCGATCGCG)₂, είναι φανερό ότι η διαμόρφωση Β-τύπου του δεκανουκλεοτιδίου διατηρείται. Επιπλέον, το propeller twisting στην περιοχή A₅T₆C₇, που παρατηρήθηκε για το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο, δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη δέσμευση του Λ- ή Δ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺. Η προσθήκη του μεταλλικού συμπλόκου στο δεκανουκλεοτίδιο έδωσε μία κορυφή που αντιστοιχεί στην ελεύθερη και τη δεσμευμένη μορφή. Αυτό είναι ενδεικτικό της ταχείας κινητικής του συστήματος στην κλίμακα χρόνου του NMR σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συνεπώς, η ταχεία κινητική του συστήματος μας επιτρέπει μόνο ποιοτική προσέγγιση του τρόπου δέσμευσης των δύο ισομερών στο DNA αφού τα δεδομένα από τα πειράματα NMR πιθανόν να αποτελούν το μέσο όρο πολλών διαφορετικών διαμορφωμερών.

Η προσθήκη του Λ-διαστερομερούς δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις (>0,03 ppm) των πρωτονίων του δεκανουκλεοτιδίου. Οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του ολιγονουκλεοτιδίου παρουσία των Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺ δίνονται στον πίνακα 9.13.

Οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων C₁/G₁₀ NH₂ και G₁₀ H₂' που παρατηρήθηκαν παρουσία του Δ-ισομερούς συνιστούν τη δέσμευσή του στα άκρα του δεκανουκλεοτιδίου. Η απουσία σημαντικών μεταβολών στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του DNA κατά τη δέσμευση του Δ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺, οφείλεται πιθανότατα στη δέσμευση του στα άκρα της έλικας δεδομένου ότι η δομή της έλικας στα άκρα χάνεται λόγω του ανοίγματος των αλυσίδων [41]. Η επιπλέον προσθήκη Δ-ισομερούς (αναλογία Δ-ισομερούς:διπλής έλικας>1,0) δεν προκάλεσε περαιτέρω μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων του δεκανουκλεοτιδίου συνιστώντας ότι η στοιχειομετρία του σχηματιζόμενου προϊόντος είναι 1:1 και τα άκρα του δεκανουκλεοτιδίου είναι η κύρια θέση δέσμευσης. Η δέσμευση των Λ- και Δ-ισομερών στα άκρα του δεκανουκλεοτιδίου φαίνεται επιπλέον από την παρουσία διαμοριακών NOE (Πίνακας 9.14 και σχήμα 9.26).



Πίνακας 9.13

Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ παρουσία των συμπλόκων Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(m-7p)]\text{Cl}_2$ σε αναλογία 1:1, $\text{pH}=7,00$ (0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), στους 298 K σε 90% H_2O , 10% D_2O ^a.

Πρωτόνια ^b	Δ	Λ	Πρωτόνια ^b	Δ	Λ
C ₁ H1'	-0,01	-0,01	A ₅ H2''	0	0
C ₁ H2'	-0,01	-0,01	A ₅ H2	0	0
C ₁ H2''	0	0	A ₅ H8	0	0
C ₁ H5	-0,01	0	T ₆ H1'	0	0
C ₁ H6	0	0	T ₆ H2'	0	0
C ₁ /G ₁₀ NH _{2nb}	-0,04	^{na}	T ₆ H2''	-0,01	0
G ₂ H1'	0	0	T ₆ H6	0	+0,01
G ₂ H2'	0	+0,02	T ₆ CH ₃	0	+0,01
G ₂ H2''	-0,01	0	T ₆ NH	-0,01	-0,01
G ₂ H8	0	+0,01	C ₇ H1'	0	0
G ₂ NH	-0,01	-0,01	C ₇ H2'	0	+0,01
G ₂ /C ₉ NH _{2b}	-0,01	0	C ₇ H2''	-0,01	0
G ₂ /C ₉ NH _{2nb}	+0,01	+0,01	C ₇ H5	0	0
C ₃ H1'	0	0	C ₇ H6	0	+0,01
C ₃ H2'	0	0	G ₈ H1'	0	0
C ₃ H2''	-0,02	0	G ₈ H2'	0	+0,01
C ₃ H5	+0,01	+0,01	G ₈ H2''	0	0
C ₃ H6	0	0	G ₈ H8	0	0
C ₃ /G ₈ NH _{2b}	-0,01	0	G ₈ NH	0	0
C ₃ /G ₈ NH _{2nb}	+0,01	+0,01	C ₉ H1'	-0,01	-0,01
G ₄ H1'	-0,01	0	C ₉ H2'	-0,01	0
G ₄ H2'	0	0	C ₉ H2''	-0,01	-0,01
G ₄ H2''	0	0	C ₉ H5	0	0
G ₄ H8	-0,01	0	C ₉ H6	0	0
G ₄ NH	0	0	G ₁₀ H1'	-0,02	-0,01
G ₄ /C ₇ /A ₅ NH _{2b}	0	0	G ₁₀ H2'	-0,01	0
G ₄ /C ₇ /A ₅ NH _{2nb}	0	+0,01	G ₁₀ H2''	-0,03	-0,02
A ₅ H1'	-0,01	0	G ₁₀ H8	-0,01	+0,01
A ₅ H2'	0	0			

^a Οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις που είναι $\geq 0,03$ ppm είναι υπογραμμισμένες. Οι θετικές μεταβολές είναι ενδεικτικές μετατόπισης προς χαμηλότερα πεδία.

^b Το πρωτόνιο της εξωκυκλικής αμινομάδας που συμμετέχει στο δεσμό υδρογόνου Watson-Crick συμβολίζεται με το γράμμα b ενώ το nb συμβολίζει το πρωτόνιο το οποίο δεν συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου.

^{na} Η απόδοση κατέστη αδύνατη λόγω αλληλεπικάλυψης των κοροφών.

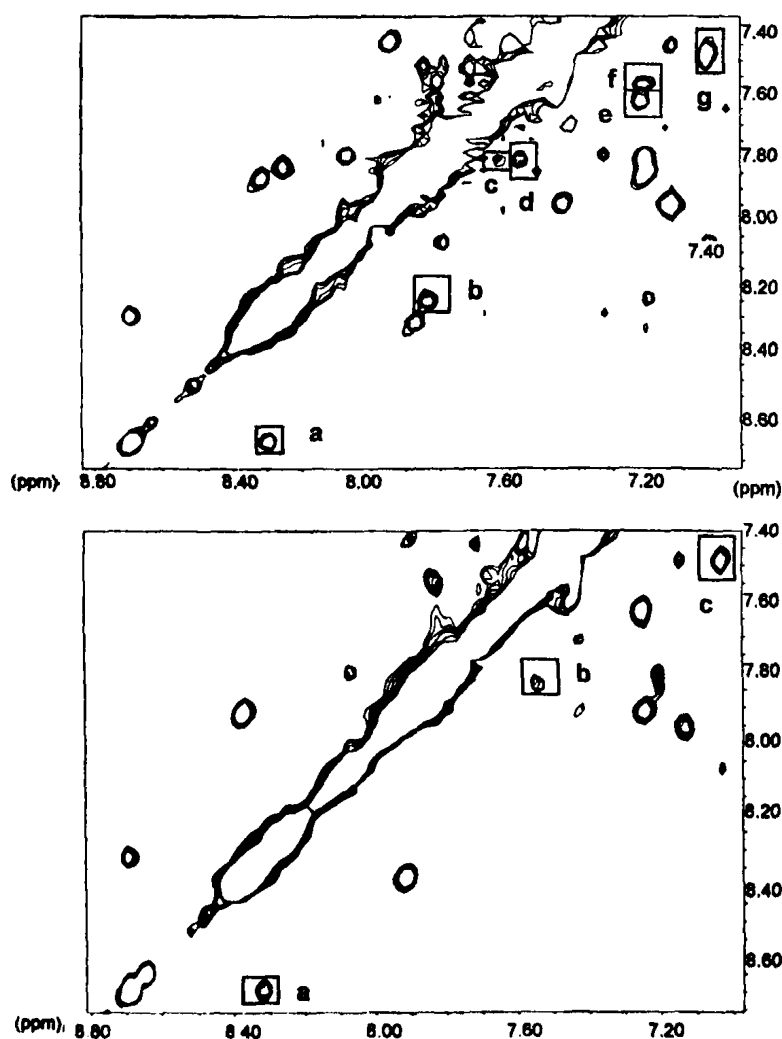


Πίνακας 9.14

Τα NOE cross-peaks που παρατηρούνται μεταξύ των πρωτονίων των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂ και του d(CGCGATCGCG)₂ σε αναλογία συμπλόκου / διπλής έλικας 1:1, σε 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH = 7,00), 90% H₂O/ 10%D₂O, στους 298 K*.

Δ-[Ru(bpy) ₂ (m-7p)] ²⁺	Λ-[Ru(bpy) ₂ (m-7p)] ²⁺
m H6-T ₆ H6 (m), m H6'-C ₉ H6 (w)	m H6-T ₆ H6 (s)
m H6'-G ₁₀ H8 (w), m H3'-C ₇ NH _{2b} (w)	m H6'-G ₁₀ H8 (m)
bpy H6-C ₉ H6 (w)	Ala ⁴ H _α -C ₃ NH _{2b} (w)
Arg ^{1,7} NH-G ₁₀ H8 (w)	m H3'-C ₇ NH _{2b} (m)

* Τα cross-peak χαρακτηρίζονται ποιοτικά ως ασθενής (w), μέτριας (m) και ισχυρής (s) έντασης βάσει της σύγκρισής τους με το ολοκλήρωμα του cross-peak C H5→C H6. (ppm)

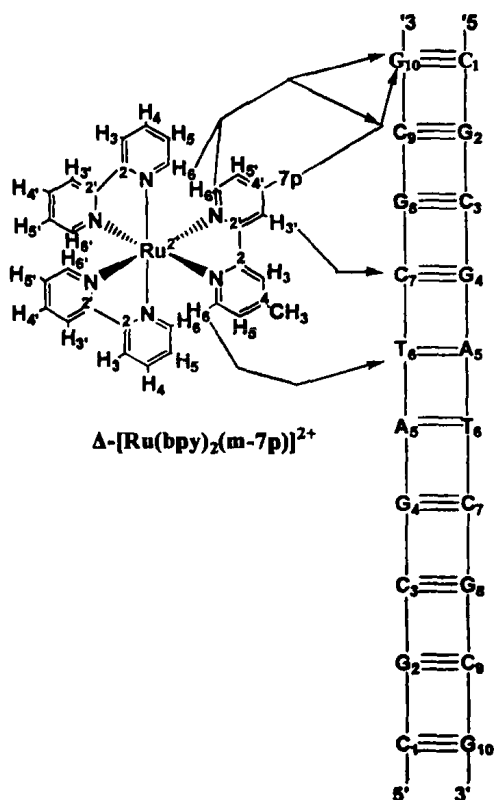


Σχήμα 9.26. Α) Μεγέθυνση του φάσματος 250 ms 2D-NOESY στους 298 K του συστήματος d(CGCGATCGCG)-Δ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺ 1:1 (1 mM σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων. Με τα γράμματα a-g φαίνονται τα διαμοριακά cross-peaks: (a) m H3'-C₇ NH_{2b}, (b) Arg^{1,7} NH-G₁₀ H8, (c) G₁₀ H8-bpy H6, (d) G₁₀ H8-m H6', (e) bpy H6-C₉ H6, (f) m H6'-C₉ H6 και (g) m H6-T₆ H6. Β) Μεγέθυνση του φάσματος 250 ms 2D-NOESY στους 298 K του συστήματος d(CGCGATCGCG)-Λ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺ 1:1 (1 mM σε 100 mM ρυθμιστικό δ. φωσφορικών, pH 7) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων. Με τα γράμματα a-c φαίνονται τα εξής διαμοριακά cross-peaks: (a) m H3'-C₇ NH_{2b}, (b) G₁₀ H8-m H6', (c) m H6-T₆ H6.



Είναι γνωστό ότι η εξωκυκλική 2-αμινομάδα της γουανίνης βρίσκεται εντός της ελάσσονος αύλακας [5, 254] ενώ τα πρωτόνια H2'' του σακχάρου βρίσκονται στη μείζονα αύλακα. Λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος του συμπλόκου και το γεγονός ότι η πλειοψηφία των NOE παρατηρείται με τα αρωματικά πρωτόνια H8/H6 τα οποία βρίσκονται στη μείζονα αύλακα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι το Δ-ισομερές δεσμεύεται στο δεκανουκλεοτίδιο κυρίως από τη μείζονα αύλακα. Η ύπαρξη του διαμοριακού NOE *m* H3'-C7 NH_{2b} συνιστά ότι το σύμπλοκο δεσμεύεται επίσης από την ελάσσονα αύλακα. Λόγω του σημαντικού ανοίγματος των αλυσίδων που παρατηρείται τόσο για το ελεύθερο όσο και για το δεσμευμένο ολιγονουκλεοτίδιο, η ομάδα C₁/G₁₀ NH₂ μπορεί να εκτίθεται στο ρεύμα δακτυλίου των αρωματικών υποκαταστατών *bpy*, με αποτέλεσμα να μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία κατά 0,04 ppm. Επιπλέον μειώνεται σημαντικά η ένταση των παρακάτω NOE cross-peaks: A₅ NH_{2b}-T₆ NH, C₉ NH_{2b}-G₂ NH, A₅ NH_{2nb}-T₆ NH, C₉ NH_{2nb}-G₂ NH and G₁₀ H8-G₁₀ H1', γεγονός που υποδηλώνει ότι η δέσμευση του Δ-ισομερούς στο DNA προκαλεί μικρές μεταβολές στη διαμόρφωση της διπλής έλικας του δεκαμερούς.

Οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των ισομερών Λ- και Δ-[Ru(*bpy*)₂(*m*-7p)]²⁺



Δ-[Ru(*bpy*)₂(*m*-7p)]²⁺

κατά τη δέσμευσή τους στο d(CGCGATCGCG)₂ δίνονται στον πίνακα 9.15. Παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές για τις χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων των *bpy* και *m*, με τις μεγαλύτερες μεταβολές για το Δ-ισομερές. Τα σήματα όλων των αρωματικών πρωτονίων μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία πιθανότατα επειδή βρίσκονται υπό την επίδραση των ρευμάτων δακτυλίου των βάσεων του DNA. Οι μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία που παρατηρούνται για τα αρωματικά πρωτόνια των *bpy* και *m* έχουν παρόμοια μεγέθη εκτός από τα πρωτόνια H3,3' του *bpy* τα οποία παρουσιάζουν και τη μεγαλύτερη μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία κατά 0,1 ppm. Πειραματικά δεδομένα και θεωρητικοί

Σχήμα 9.27. Σχηματικό διάγραμμα στο οποίο φαίνονται τα επτά διαμοριακά NOE ανάμεσα στο Δ-[Ru(*bpy*)₂(*m*-7p)]²⁺ και το d(CGCGATCGCG)₂.

υπολογισμοί έχουν δείξει ότι το πρόδρομο σύμπλοκο (Ru(*bpy*)₃)²⁺ δεν παρεμβάλλεται στο DNA και έχει

προταθεί ότι οι διπυριδυλικοί δακτύλιοι παραλληλίζονται με τα ζεύγη βάσεων του DNA [139]. Από την άλλη, η δέσμευση στις αύλακες συνήθως δεν προκαλεί καμία ή ασήμαντη προστασία στα πρωτόνια του δεσμευμένου μορίου [294]. Ενδιαφέρον έχει, στην περίπτωση του Δ-ισομερούς, ότι ο υποκαταστάτης *m*, παρόλο το μεγάλο του μέγεθος, παρουσιάζει την πλειοψηφία των NOE που παρατηρούνται μεταξύ του συμπλόκου και του DNA (Πίνακας 9.14, σχήματα 9.26 και 9.27). Όλα αυτά τα NOE κατανέμονται κατά μήκος της αλληλουχίας T₆C₇G₈C₉G₁₀ και μας οδηγούν στην υπόθεση ότι ένας από τους διπυριδυλικούς υποκαταστάτες τοποθετείται παράλληλα προς το ζεύγος C₉G₁₀ ενώ ο υποκαταστάτης *m* και ο άλλος υποκαταστάτης *bpy* αλληλεπιδρούν με τα τοιχώματα της αύλακας.

Πίνακας 9.15

Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR των συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(*bpy*)₂(*m*-7p)]Cl₂ παρουσία του d(CGCGATCGCG)₂ σε αναλογία 1:1, pH=7,00 (0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄), στους 298 K σε 90% H₂O, 10% D₂O.

Πρωτόνια	Δ	Λ	Πρωτόνια	Δ	Λ
4-CH ₃ <i>m</i>	-0,05	-0,04	NH Gly ²	<i>na</i>	0
H3 <i>m</i>	-0,06	-0,05	H _α Asn ³	0	-0,01
H3' <i>m</i>	-0,03	-0,03	H _{β2} Asn ³	0	0
H5 <i>m</i>	-0,06	-0,02	H _{β3} Asn ³	0	0
H5' <i>m</i>	-0,07	-0,06	NH Asn ³	<i>na</i>	<i>na</i>
H6 <i>m</i>	-0,07	-0,05	H _α Ala ⁴	0	0
H6' <i>m</i>	0	-0,02	H _β Ala ⁴	0	0
H3,3' <i>bpy</i>	-0,1	-0,05	NH Ala ⁴	-0,01	-0,01
H4,4' <i>bpy</i>	-0,05	-0,02	H _α His ⁵	+0,01	0
H5,5' <i>bpy</i>	-0,07	-0,03	H _{β2} His ⁵	+0,03	+0,02
H6,6' <i>bpy</i>	-0,06	-0,04	H _{β3} His ⁵	0	0
H _α Arg ^{1,7}	0	0	H ₂ His ⁵	0	0
H _{β2} Arg ^{1,7}	0	+0,02	H ₅ His ⁵	0	0
H _{β3} Arg ^{1,7}	0	0	H _α Glu ⁶	0	0
H _γ Arg ^{1,7}	0	-0,02	H _{β2} Glu ⁶	0	0
H _δ Arg ^{1,7}	0	0	H _{β3} Glu ⁶	0	0
NH Arg ^{1,7}	0	0	H _γ Glu ⁶	0	0
H _α Gly ²	<i>na</i>	0	NH Glu ⁶	0	0

^{na} Η απόδοση των σημάτων δεν κατέστη δυνατή λόγω αλληλεπικάλυψης των κορυφών.



Είναι αξιοσημείωτο ότι δεν μεταβάλλεται η χημική μετατόπιση για κανένα από τα πεπτιδικά πρωτόνια, γεγονός που σημαίνει ότι το πεπτίδιο δεν έρχεται σε επαφή με τις βάσεις του DNA. Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των θετικά φορτισμένων ομάδων των πλευρικών αλυσίδων του πεπτιδίου (αργινίνης και ιστιδίνης) και του αρνητικά φορτισμένου φωσφορικού σκελετού του DNA. Η παρουσία ενός NOE μεταξύ του πεπτιδικού NH της αργινίνης και τα πρωτόνια G₂ H₈ δείχνει ότι ο πεπτιδικός σκελετός προσανατολίζεται προς την έλικα του. Στο σχήμα 9.27 δίνεται σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ του Δ-ισομερούς και του δεκανουκλεοτιδίου βάσει των NOE που παρατηρήθηκαν.

Η δέσμευση του Λ-ισομερούς είναι πιθανόν μη ειδική και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την αλληλεπίδραση του με το DNA, με αποτέλεσμα οι μετατοπίσεις για τα πρωτόνια του DNA να μην είναι σημαντικές, οι μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων του Λ-ισομερούς να είναι μικρές και να παρατηρούνται συνολικά 4 NOE (πίνακας 9.14). Η σημαντική μείωση της έντασης των NOE cross-peaks: A₅ NH_{2b}-T₆ NH και A₅ NH_{2nb}-T₆ NH και η απουσία του cross-peak G₂ H₈-C₁ H₆ που υπήρχε στο φάσμα NOESY του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου, πιθανότατα οφείλονται σε μικρές μεταβολές στη διαμόρφωση γύρω από το ζεύγος A₅T₆.

9.3.3.2. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂ με τη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου d(GCGCTTAAGCGC)₂.

Όπως προκύπτει από τα φάσματα NOESY, η Β-τύπου διαμόρφωση του DNA κατά την αλληλεπίδρασή του και με τα δύο διαστερομερή διατηρείται. Όπως παρατηρήθηκε και για το d(CGCGATCGCG)₂, και τα δύο ισομερή δεσμεύονται στο d(GCGCTTAAGCGC)₂ μέσω ταχείας κινητικής.

Οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του d(GCGCTTAAGCGC)₂ και των Λ- και Δ-ισομερών δίνονται αντίστοιχα στους πίνακες 9.16 και 9.17.

Η δέσμευση στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται από την παρουσία σημαντικών μετατοπίσεων προς χαμηλότερα πεδία για τα αρωματικά πρωτόνια H₅ και H₆ της C₁₂ καθώς και για τα πρωτόνια C₂/G₁₁ NH_{2nb} στην περίπτωση του Λ-ισομερούς. Διαμοριακά NOE παρατηρούνται και για τα δύο ισομερή (πίνακας 9.18 και



σχήμα 9.28). Η παρατήρηση μόνο δύο διαμοριακών NOE cross-peaks και για τα δύο ισομερή είναι ενδεικτική της ασθενούς δέσμευσής τους στη διπλή έλκα του δωδεκανουκλεοτιδίου.

Πίνακας 9.16

Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$ παρουσία των συμπλόκων Λ^- και $\Delta^-[\text{Ru}(\text{bpy})_2(m-7p)]\text{Cl}_2$ σε αναλογία 1:1, $\text{pH}=7,00$ (0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), στους 298 K σε 90% H_2O , 10% D_2O ^a.

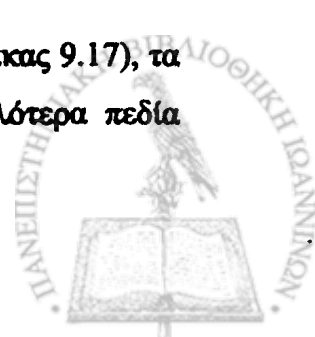
Πρωτόνια ^b	Δ	Λ	Πρωτόνια ^b	Δ	Λ	Πρωτόνια ^b	Δ	Λ
G ₁ H1'	0	+0,01	C ₄ /G ₉ NH _{2ab}	0	0	A ₈ H2	0	0
G ₁ H2'	0	0	C ₄ /G ₉ NH _{2b}	+0,01	+0,01	A ₈ H8	0	0
G ₁ H2''	0	+0,01	T ₅ H1'	-0,01	0	A ₈ NH _{2ab}	0	+0,01
G ₁ H8	+0,01	+0,01	T ₅ H2'	0	0	A ₈ NH _{2b}	0	0
G ₁ /C ₁₂ NH _{2ab}	⁼⁼	⁼⁼	T ₅ H2''	+0,01	+0,01	G ₉ H1'	+0,01	+0,01
C ₂ H1'	0	0	T ₅ H6	+0,01	+0,01	G ₉ H2'	+0,01	+0,02
C ₂ H2'	+0,01	+0,01	T ₅ CH ₃	0	0	G ₉ H2''	+0,01	+0,02
C ₂ H2''	0	0	T ₅ NH	0	0	G ₉ H8	0	0
C ₂ H5	+0,01	+0,01	T ₆ H1'	0	0	G ₉ NH	+0,01	+0,01
C ₂ H6	0	0	T ₆ H2'	0	0	C ₁₀ H1'	0	0
C ₂ /G ₁₁ NH _{2b}	0	+0,01	T ₆ H2''	0	+0,01	C ₁₀ H2'	0	+0,01
C ₂ /G ₁₁ NH _{2ab}	+0,02	+0,03	T ₆ H6	0	+0,02	C ₁₀ H2''	0	+0,01
G ₃ H1'	+0,01	+0,01	T ₆ CH ₃	0	0	C ₁₀ H5	0	0
G ₃ H2'	-0,01	-0,01	T ₆ NH	+0,01	+0,01	C ₁₀ H6	0	0
G ₃ H2''	0	0	A ₇ H1'	+0,01	+0,01	G ₁₁ H1'	+0,01	+0,01
G ₃ H8	0	0	A ₇ H2'	0	0	G ₁₁ H2'	+0,01	0
G ₃ NH	+0,01	+0,01	A ₇ H2''	0	+0,01	G ₁₁ H2''	0	+0,01
G ₃ /C ₁₀ NH _{2ab}	+0,01	+0,01	A ₇ H2	0	0	G ₁₁ H8	+0,02	+0,02
G ₃ /C ₁₀ NH _{2b}	+0,01	+0,02	A ₇ H8	0	0	G ₁₁ NH	0	+0,01
C ₄ H1'	+0,01	+0,02	A ₇ NH _{2ab}	0	+0,01	C ₁₂ H1'	0	+0,01
C ₄ H2'	+0,01	+0,01	A ₇ NH _{2b}	0	0	C ₁₂ H2'	-0,01	0
C ₄ H2''	0	+0,01	A ₈ H1'	0	+0,01	C ₁₂ H2''	-0,01	0
C ₄ H5	0	0	A ₈ H2'	0	+0,01	C ₁₂ H5	+0,05	+0,06
C ₄ H6	+0,01	+0,01	A ₈ H2''	+0,01	+0,01	C ₁₂ H6	+0,02	+0,03

^a Οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις που είναι $\geq 0,03$ ppm είναι υπογραμμισμένες. Οι θετικές μεταβολές είναι ενδεικτικές μετατόπισης προς χαμηλότερα πεδία.

^b Το πρωτόνιο της εξακυκλικής αμινομάδας που συμμετέχει στο δεσμό υδρογόνου Watson-Crick συμβολίζεται με το γράμμα b ενώ το nb συμβολίζει το πρωτόνιο το οποίο δεν συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου.

⁼⁼ Η ακόδοση κατέστη αδύνατη λόγω αλληλεπικάλυψης των κοροφών.

Όπως μπορεί κανείς να δει από τα δεδομένα των πειραμάτων NMR (πίνακας 9.17), τα H3 και H3' των bry εμφανίζουν την πιο σημαντική μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία



ειδικότερα στην περίπτωση του Δ-ισομερούς, ενδεικτική του παράλληλου προσανατολισμού τους με τις βάσεις του DNA.

Πίνακας 9.17

Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των Δ- και Λ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺ κατά την αλληλεπίδρασή τους με το d(GCGCTTAAGCGC)₂ σε αναλογία 1:1 σε 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH = 7,00), 90% H₂O/ 10%D₂O, στους 298 K.

Πρωτόνια	Δ	Λ	Πρωτόνια	Δ	Λ
4-CH ₃ m	na	na	H _α Asn ³	+0,01	0
H3,3' m	+0,02	na	H _{β2} Asn ³	0	+0,01
H5 m	-0,04	-0,05	H _{β3} Asn ³	0	+0,01
H5' m	-0,03	-0,02	NH Asn ³	na	na
H6 m	-0,03	-0,02	H _α Ala ⁴	+0,01	0
H6' m	-0,02	-0,02	H _β Ala ⁴	0	0
H3,3' bpy	-0,07	0	NH Ala ⁴	0	-0,01
H4,4' bpy	-0,04	-0,02	H _α His ⁵	0	0
H5,5' bpy	-0,05	-0,02	H _{β2} His ⁵	0	0
H6,6' bpy	-0,04	-0,03	H _{β3} His ⁵	0	-0,01
H _α Arg ^{1,7}	+0,01	0	H ₂ His ⁵	+0,02	-0,04
H _{β2} Arg ^{1,7}	0	-0,01	H ₄ His ⁵	0	+0,01
H _{β3} Arg ^{1,7}	-0,01	0	NH _{im} His ⁵	-0,02	-0,04
H _γ Arg ^{1,7}	+0,01	0	H _α Glu ⁶	0	0
H _δ Arg ^{1,7}	0	0	H _{β2} Glu ⁶	0	0
NH Arg ^{1,7}	na	na	H _{β3} Glu ⁶	-0,01	0
H _α Gly ²	na	na	H _γ Glu ⁶	-0,02	0
NH Gly ²	na	na	NH Glu ⁶	na	na

^{na} Η απόδοση των σημάτων δεν κατέστη δυνατή λόγω αλληλεπικάλυψης των κορυφών.

Πίνακας 9.18

Τα NOE cross-peaks που παρατηρούνται μεταξύ των πρωτονίων των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂ και του d(GCGCTTAAGCGC)₂ σε αναλογία συμπλόκου / διπλής έλικας 1:1, σε 0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH = 7,00), 90% H₂O/ 10%D₂O, στους 298 K*.

Δ-[Ru(bpy) ₂ (m-7p)] ²⁺	Λ-[Ru(bpy) ₂ (m-7p)] ²⁺
C ₂ NH _{2b} -m H5' (m)	A ₈ H8-bpy H6 (m)
His ⁵ NH _{im} -T ₆ H6 (m)	bpy H3-T ₆ H6 (m)

* Τα cross-peak χαρακτηρίζονται ποιοτικά ως ασθενής (w), μέτριας (m) και ισχυρής (s) έντασης βάσει της σύγκρισής τους με το ολοκλήρωμα του cross-peak C H5→C H6.

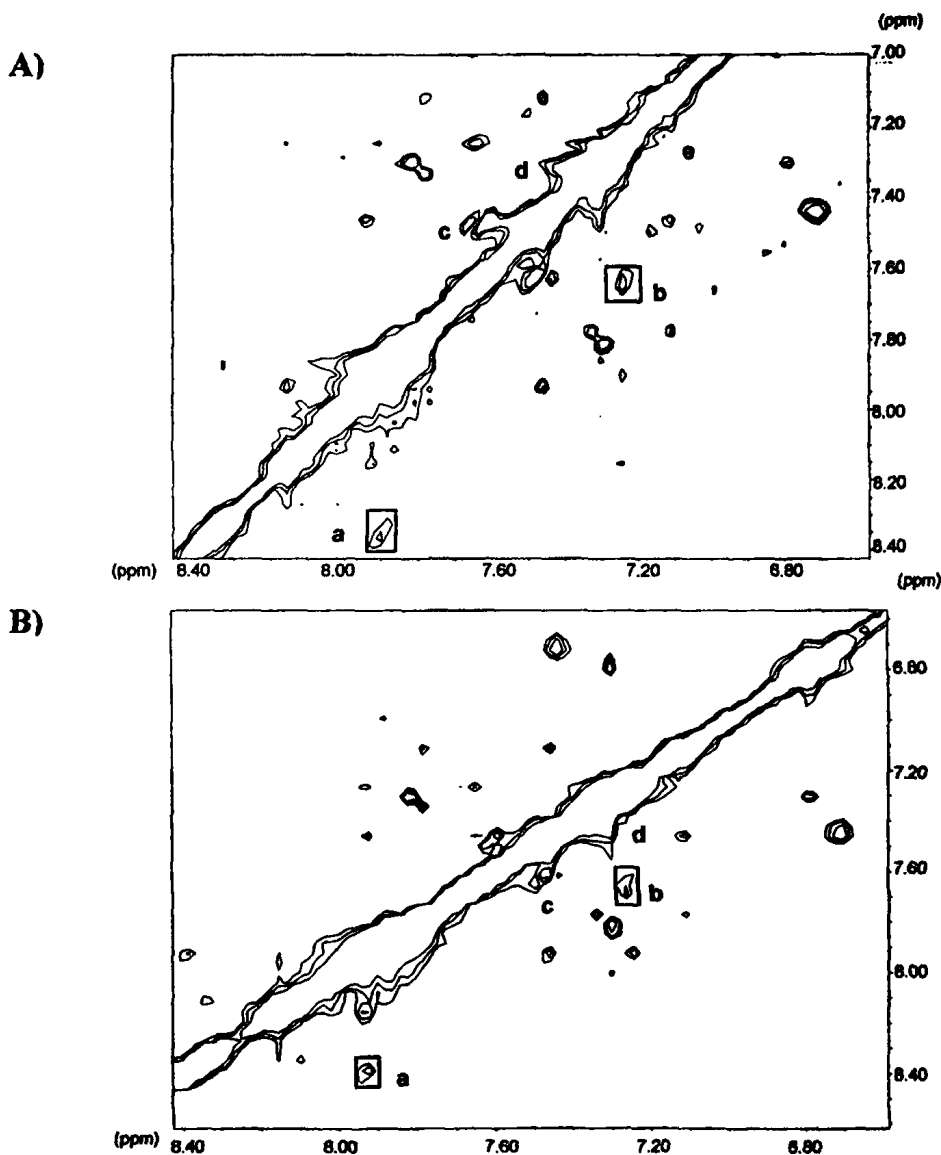


Γενικά, οι μικρές μετατοπίσεις που παρατηρούνται συνιστούν ασθενή δέσμευση των συμπλόκων στη δικλή έλικα του DNA. Για το Δ-ισομερές, το NOE $C_2/G_{11} NH_{2b}-m H_5'$ τοποθετεί τον υποκαταστάτη m κοντά στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου και στην ελάσσονα αύλακα ενώ το NOE $His^5 NH_{im}-T_6 H_6$ συνιστά ότι το συνδεδεμένο πεπτίδιο βρίσκεται στη μείζονα αύλακα. Είναι φανερό από τα παραπάνω ότι το σύμπλοκο κατά τη δέσμευσή του στη δικλή έλικα του DNA υιοθετεί πολλές διαφορετικές διαμορφώσεις. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από την παρουσία cross-peak (cross-peak c, d και e, σχήμα 9.28A) λόγω χημικής ανταλλαγής μεταξύ πρωτονίων του νουκλεϊνικού οξέος, η συμμετρία των οποίων μεταβάλλεται κατά τον σχηματισμό συμπλόκου με το Δ-ισομερές. Έτσι, τα μη ισοδύναμα πρωτόνια H_8 της G_9 δίνουν ένα cross-peak (cross-peak c, σχήμα 9.28A), όπως και τα μη ισοδύναμα πρωτόνια H_6 της T_5 (cross-peak d, σχήμα 9.28A) και της C_{10} (cross-peak e, σχήμα 9.28A). Κάθε ζεύγος σημάτων μπορεί να προσδιοριστεί με ευκολία αφού το cross-peak της ανταλλαγής βρίσκεται δίπλα στη διαγώνιο. Η παρουσία, λοιπόν, αυτών των cross-peak ανταλλαγής είναι ενδεικτική της ύπαρξης ισορροπίας μεταξύ δύο καταστάσεων όπου το Δ-ισομερές δεσμεύεται με δύο διαφορετικούς προσανατολισμούς στη μείζονα αύλακα του $d(GCGCTTAAGCGC)_2$ [89]. Επιπλέον, η παρουσία των cross-peak $T_6 H_1'-A_8 H_2$, $C_2 H_6-T_6 H_1'$ και $C_4 H_6-G_9 H_1'$ που δεν υπήρχαν στο φάσμα NOESY του ελεύθερου δωδεκανουκλεοτιδίου δείχνει ότι κατά τη δέσμευση του Δ-ισομερούς, λαμβάνουν χώρα μικρές μεταβολές στη διαμόρφωση του DNA. Από την άλλη, το Δ-ισομερές εμφανίζει δύο NOE (πίνακας 9.18 και σχήμα 9.28B) σύμφωνα με τα οποία, οι υποκαταστάτες bry βρίσκονται στη μείζονα αύλακα κοντά στις βάσεις A_8 και T_6 . Επιπλέον, παρατηρούνται και εδώ cross-peak ανταλλαγής κοντά στη διαγώνιο για τα πρωτόνια H_6 της T_6 (cross-peak c, σχήμα 9.28B) και τα πρωτόνια H_8 της G_9 (cross-peak d, σχήμα 9.28B).

Η $G_2/C_{11} NH_{2ab}$ αποτελεί μια καλή υποψήφια ομάδα για σχηματισμό δεσμού υδρογόνου με το συνδεδεμένο πεπτίδιο. Όμως, παρουσιάζει μικρή μετατόπιση (+0,04 ppm) κατά τη δέσμευση του Δ-ισομερούς, η οποία δεν θα μπορούσε να οφείλεται στον σχηματισμό δεσμού υδρογόνου. Μπορεί να οφείλεται είτε στο σχηματισμό δεσμού υδρογόνου πιο επιμήκους από το κανονικό ή στην πραγματικότητα σε αλληλεπίδραση Van der Waals μεταξύ του πεπτιδικού σκελετού ή των πλευρικών αλυσίδων του πεπτιδίου και την εξωκυκλική αμινομάδα των G_2/C_{11} [121]. Κατά παρόμοιο τρόπο, η δέσμευση στην αύλακα του φαρμάκου ντισταμυσίνη Α στο $d(CGCGAATTCGCG)_2$ προκαλεί μικρές μετατοπίσεις προς χαμηλότερα



πεδία τόσο στα πρωτόνια του δακτυλίου της αδενίνης και στις πυρρολικές ομάδες NH του φαρμάκου [121].



Σχήμα 9.28. Α) Μεγέθυνση του φάσματος 250 ms 2D-NOESY στους 298 K του συστήματος $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_7\text{-}\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$ 1:1 (1 mM σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων. Με τα γράμματα a-g φαίνονται τα διαμοριακά cross-peaks: (a) $\text{C}_7 \text{NH}_{28\text{-m}} \text{H}5'$, (b) $\text{His}^5 \text{NH}_{\text{im}}\text{-T}_6 \text{H}6$. Τα cross-peaks ανταλλαγής δίπλα στη διαγώνιο είναι τα εξής: (c) $\text{G}_9 \text{H}8$, (d) $\text{T}_3 \text{H}6$ και (e) $\text{C}_{10} \text{H}6$. Β) Μεγέθυνση του φάσματος 250 ms 2D-NOESY στους 298 K του συστήματος $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_7\text{-}\Lambda\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$ 1:1 (1 mM σε 100 mM ρυθμιστικό δ. φωσφορικών, pH 7) στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων. Με τα γράμματα a-c φαίνονται τα εξής διαμοριακά cross-peaks: (a) $\text{bry H}6\text{-A}_8 \text{H}8$, (b) $\text{bry H}3\text{-T}_6 \text{H}6$. Τα cross-peaks ανταλλαγής δίπλα στη διαγώνιο είναι τα εξής: (c) $\text{G}_9 \text{H}8$ και (d) $\text{T}_6 \text{H}6$.

Η δέσμευση των δύο ισομερών, Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$ στα ολιγονουκλεοτίδια $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ και $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$ μελετήθηκε με φασματοσκοπία NMR. Δεδομένου ότι το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ δεν δεσμεύεται στο DNA μέσω παρεμβολής, ήταν

αναμενόμενο ότι το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$ θα δεσμευόταν στα ολιγονουκλεοτίδια μάλλον μέσω δέσμησης είτε στη μείζονα ή στην ελάσσονα αύλακα παρά μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις. Τα δεδομένα NMR δείχνουν ότι το παραπάνω σύμπλοκο όντως δεσμεύεται στις αύλακες του ολιγονουκλεοτιδίου. Η δέσμηση των μεταλλικών συμπλόκων μέσω παρεμβολής χαρακτηρίζεται από μεγάλες μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία (0,5 ως 1,0 ppm) και σημαντική διεύρυνση των σημάτων των πρωτονίων του παρεμβαλλόμενου υποκαταστάτη (λόγω ενδιάμεσης κινητικής ανταλλαγής) [2]. Η δέσμηση των διαστερομερών του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$ δεν προκάλεσαν σημαντική διεύρυνση των κορυφών ενώ επίσης δεν υπήρξαν σημαντικές μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία των σημάτων του μεταλλικού συμπλόκου.

Τα περισσότερα διαμοριακά NOE που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στο Δ-ισομερές και το d(CGCGATCGCG)₂ εντοπίζονται στη μείζονα αύλακα της τελικής αλληλουχίας CG/GC, ενώ το Λ-ισομερές εμφανίζει NOE με την αλληλουχία GCT/CGA. Η δέσμηση στα άκρα της αλληλουχίας του ολιγονουκλεοτιδίου έχει επίσης παρατηρηθεί για τα σύμπλοκα ΛΛ, ΔΔ, ΔΛ- $[\{\text{Ru}(\text{Me}_2\text{bpy})_2\}_2(\mu\text{-brpm})]^{4+}$ που δεσμεύονται στις τελευταίες βάσεις CA/GT της αλληλουχίας (CAATCCGGATTG)₂ και για το Δ-cis-β-[Ru(RR-picchxnMe₂)(phen)]²⁺ (picchxnMe₂ = N,N'-διμεθυλ-N,N'-δι(2-πικολυλ)-1,2-διαμινοκυκλοεξάνιο) που δεσμεύεται και στα δύο άκρα της διπλής έλικας του d(CGCGATCGCG)₂ [58]. Είναι πιθανό ότι τα ογκώδη αυτά σύμπλοκα του ρουθηνίου μπορούν εύκολα να εισέλθουν στην ελάσσονα ή στη μείζονα αύλακα των τελευταίων ζευγών βάσεων δεδομένου ότι οι αύλακες αυτές έχουν διευρυνθεί σημαντικά λόγω του ανοίγματος των αλυσίδων στα άκρα της διπλής έλικας.

Η αλληλεπίδραση του Δ-ισομερούς με το δωδεκανουκλεοτίδιο d(GCGCTTAAGCGC)₂ δεν διαφέρει σημαντικά συγκριτικά με το Λ-ισομερές όπως φαίνεται από τις παρόμοιες μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις κατά τη δέσμηση τους στο DNA. Και τα δύο εναντιομερή δεν διαθέτουν άξονα συμμετρίας C₂ κι έτσι επηρεάζουν τη συμμετρία του 12-μερούς στο τελικό σύμπλοκο. Η παρουσία μόνο δύο διαμοριακών NOE cross-peak για κάθε ισομερές δείχνει ασθενή δέσμηση στη διπλή έλικα του DNA. Το Δ-ισομερές δεσμεύεται στο DNA υιοθετώντας δύο διαφορετικούς προσανατολισμούς όπως φαίνεται από την παρουσία ενός NOE με την ελάσσονα αύλακα και ενός με τη μείζονα αύλακα καθώς και από την παρουσία διπλών σημάτων για τα πρωτόνια G₉ H8, T₅ H6 και C₁₀ H6. Στην περίπτωση του Λ-ισομερούς, τα δύο NOE που παρατηρούνται τοποθετούν τον ένα



ή και τους δύο υποκαταστάτες *bpy* στη μείζονα αύλακα της κεντρικής αλληλουχίας TT/AA. Η προτίμηση του Λ -ισομερούς για τη μείζονα αύλακα μπορεί να ερμηνευτεί βάσει του μεγάλου μεγέθους του. Οι περισσότερες οργανικές ενώσεις και τα μονοπυρηνικά πολυπυριδυλικά σύμπλοκα του Ru(II) που δεσμεύονται στο DNA χωρίς παρεμβολή, δεσμεύονται στην ελάσσονα αύλακα με ισχυρή προτίμηση για αλληλουχίες πλούσιες σε A/T [17, 220, 295]. Αυτό συμβαίνει επίσης και για τη δέσμευση του $\Lambda\Lambda$ -[$\{\text{Ru}(\text{Me}_2\text{bpy})_2\}_2(\mu\text{-bpm})\}^{2+}$ στο $\text{d}(\text{CAATCGCGATTG})_2$ το οποίο προτιμά τις θέσεις AAT/TTA. Ενδιαφέρον αποτελεί ότι το ίδιο σύμπλοκο δεσμεύεται στην κεντρική αλληλουχία CCGG και στα τελικά νουκλεοτίδια CA/GT του δωδεκανουκλεοτιδίου $\text{d}(\text{CAATCCGGATTG})_2$, με το μέγεθος του συμπλόκου να αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα της αλληλεπίδρασης του με τις δύο διαφορετικές αλληλουχίες του DNA. Συνεπώς, θα μπορούσε να πει κανείς ότι το τμήμα $[\text{Ru}(\text{bpy})_2]^{2+}$ παρουσιάζει μικρή ή καμία εκλεκτικότητα ως προς την αλληλουχία κατά τη δέσμευσή του στο DNA.

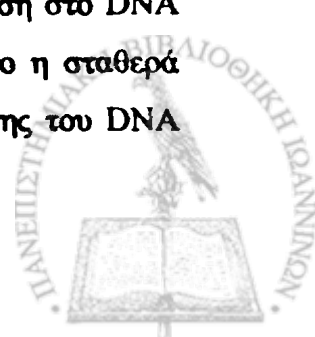
Τα ευρήματά μας δεν μπορούν να καταλήξουν σε ένα συμπέρασμα αν το συνδεδεμένο επταπεπτίδιο, το οποίο σχεδιάστηκε για τη δέσμευσή του στην αλληλουχία AATT/TTAA, παίζει καθοριστικό ρόλο στη δέσμευση του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$ στις αύλακες του DNA. Γενικά, σε όλα τα συστήματα που μελετήθηκαν, το συνδεδεμένο πεπτίδιο δεν παρουσίασε σημαντικές μετατοπίσεις που να δείχνουν την αλληλεπίδρασή του με το DNA. Από την άλλη, είναι συνηθισμένη η ελάχιστη ή καθόλου προστασία των πρωτονίων ενός μορίου που δεσμεύεται στις αύλακες [294]. Επιπλέον, δεν θα μπορούσε κανείς να πει ότι το πεπτίδιο είναι πλήρως εκτεθειμένο στο διαλύτη δεδομένου ότι παρουσιάζει NOE με τις βάσεις του DNA στην περίπτωση των συστημάτων Λ -, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$ - $\text{d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}$ - $\text{d}(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$. Για παράδειγμα, το NOE μεταξύ του His NH_{im} του Δ -ισομερούς και του T_6 H6 του $\text{d}(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$ θυμίζει την παρουσία παρόμοιων NOE cross-peaks που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στο His NH_{im} του Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}$ και τα T_7/T_8 H2'' και την T_8 Me του $\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ (ενότητα 9.3.1). Αυτό σημαίνει ότι το πεπτίδιο προσανατολίζεται προς την έλικα του DNA και πιθανόν να συμμετέχει στη δέσμευση στο DNA μέσω Van der Waals και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό σκελετό με συμμετοχή των θετικά φορτισμένων πλευρικών αλυσίδων των Arg¹, Arg⁷ και His⁵. Οι μη ειδικές επαφές αυτού του τύπου ανάμεσα στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων και τον σκελετό του DNA

είναι συνήθεις στην έμμεση ανάγνωση των ειδικών αλληλουχιών που αναγνωρίζονται από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες [12]. Οι μικρές μετατοπίσεις των μιδαζολικών πρωτονίων (+0,03 ppm για το H₅ και +0,04 ppm για το NH_{im}) στην περίπτωση του συστήματος Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(GCGCTTAAGCGC)₂ είναι υπέρ αυτής της υπόθεσης.

Το συνδεδεμένο επταπεπτιδίο, το οποίο αποτελείται από τα ίδια αμινοξέα όπως και ο βρόχος αναγνώρισης της *MunI*, δεν κατέστη δυνατό να δημιουργήσει τις ειδικές επαφές που χρησιμοποιεί η περιοριστική ενδονουκλεάση *MunI* για να αναγνωρίζει την αλληλουχία C/AATTG. Οι αλληλεπιδράσεις αργινίνης-γουανίνης είναι οι πιο συνήθεις και αναμενόμενες κατά το σχηματισμό συμπλόκων πρωτεΐνης-DNA. Τα άτομα NH1 και NH2 είναι αυτά που εμπλέκονται συχνότερα [214]. Στην περίπτωση της *MunI*, το άτομο N7 της δεύτερης αδενίνης βρίσκεται σε απόσταση δεσμού υδρογόνου από το άτομο NH1 της πλευρικής αλυσίδας της R121 [214]. Στην περίπτωση της δέσμευσης του Δ -ισομερούς στο d(CGCGATCGCG)₂, ένα NOE τοποθετεί το πεπτιδικό NH της αργινίνης κοντά στη βάση G2. Ωστόσο, υπό τις πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν εδώ, η παρατήρηση της γουανιδικής ομάδας της αργινίνης δεν κατέστη δυνατή λόγω ανταλλαγής με το διαλύτη ενώ δεν υπήρξε σημαντική μετατόπιση του πεπτιδικού NH της αργινίνης ή άλλων πρωτονίων γειτονικών στους πιθανούς δότες δεσμού υδρογόνου C6=O and N7 της γουανίνης. Συνεπώς, δεν υπάρχει κάποια ένδειξη σχηματισμού δεσμού υδρογόνου μεταξύ της αργινίνης και της βάσης G2.

Η N117 είναι επίσης ένα σημαντικό αμινοξύ του βρόχου αναγνώρισης της *MunI*, το οποίο σχηματίζει πολλές άμεσες επαφές. Το οξυγόνο OD της πλευρικής αλυσίδας της N117 γεφυρώνει τις εξωκυκλικές αμινομάδες των γειτονικών αδενινών σχηματίζοντας διακλαδούμενους δεσμούς υδρογόνου τριών κέντρων. Η αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας του ίδιου αμινοξέος N117 σχηματίζει επίσης δεσμό υδρογόνου με το άτομο N7 της εξωτερικής αδενίνης. Έτσι, η N117 σχηματίζει τρεις από τους πέντε δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του τετρανουκλεοτιδίου AATT και της πρωτεΐνης *MunI* [214]. Όμως, από τα πειραματικά δεδομένα δεν διαφαίνεται ειδικός ρόλος για την *Asp* κατά την αλληλεπίδραση του συνδεδεμένου πεπτιδίου με τα ολιγονουκλεοτίδια.

Ξεχωριστά στοιχεία αναγνώρισης, όπως οι α-έλικες, που χρησιμοποιούνται με σκοπό τη δέσμευση στη μείζονα αύλακα του DNA, δεν επαρκούν για ισχυρή δέσμευση στο DNA παρόλο που παρουσιάζουν σημαντική ειδικότητα ως προς τη δέσμευση. Τόσο η σταθερά δέσμευσης όσο και η ειδικότητα αυξάνονται στις φυσικές πρωτεΐνες δέσμευσης του DNA



μέσω του σχηματισμού διμερών, τετραμερών ή συνδεδεμένων ολιγομερών [295]. Με σκοπό την αύξηση της σταθεράς δέσμευσης μιας α-έλικας αναγνώρισης προς την αλληλουχία που αναγνωρίζει, η Barton και οι συνεργάτες της συνέδεσαν πεπτίδια σε ένα συνθετικό σύμπλοκο που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις, το $[Rh(\phi)(phen)]^{3+}$ (ϕ = 9,10-φαινανθρενοκινονο διϋμίνη, phen = 1,10-φαινανθρολίνη). Πειράματα κοπής του DNA που χρησιμοποιήθηκαν για να μελετήσουν την εκλεκτικότητα ως προς την αλληλουχία έδειξαν ότι τα σύμπλοκα που συνδέονται με πεπτίδια παρουσιάζουν μειωμένη ειδικότητα σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες δέσμευσης του και τα μονομερή της πρωτεΐνης [201]. Διάφοροι παράγοντες είναι υπεύθυνοι γι' αυτή την ελάττωση της εκλεκτικότητας. Ο πρώτος είναι η εκλεκτικότητα του μεταλλικού συμπλόκου ως προς τη δέσμευση σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία. Παρόλο που οι θετικά φορτισμένες ομάδες του συνδεδεμένου πεπτιδίου αυξάνουν τη σταθερά δέσμευσης του μεταλλικού συμπλόκου [201], το ίδιο το μεταλλικό σύμπλοκο εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης για το DNA συγκριτικά με το ελεύθερο πεπτίδιο, αν και με χαμηλή ειδικότητα, με αποτέλεσμα να παίζει το σημαντικότερο ρόλο κατά τη δέσμευση. Επιπλέον, τα πεπτίδια δεν σταθεροποιούνται πλήρως σε μία διακριτή διαμόρφωση. Αυτή η ευκινησία ως προς τη διαμόρφωση ελαττώνει το θερμοδυναμικό πλεονέκτημα που θα μπορούσε να αποκτηθεί από το σχηματισμό συνδυασμού επαφών με την αλληλουχία αναγνώρισης. Επιπλέον, η ύπαρξη πολλών διαμορφωμένων του συνδεδεμένου πεπτιδίου θα μπορούσε να οδηγεί ακόμα και στον σχηματισμό μη ειδικών αλληλεπιδράσεων με το φωσφορικό σκελετό, έτσι ώστε τελικά να καταλήγει η μεγαλύτερη συνεισφορά στην ειδικότητα ως προς τη δέσμευση στο DNA να προέρχεται κυρίως από το μεταλλικό σύμπλοκο.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Καταλήγοντας, θα πρέπει να αποφανθούμε αν τελικά ο ρόλος του πεπτιδίου στην αλληλεπίδραση των συμπλόκων με τις αλληλουχίες του DNA υπήρξε πραγματικά σημαντικός. Η διερεύνηση του θέματος μέσω της χρήσης δύο διαφορετικών αλληλουχιών πεπτιδίου μας δίνει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των πεπτιδίων ως αντιδραστήρια αναγνώρισης συγκεκριμένης αλληλουχίας νουκλεϊνικών οξέων. Έτσι, διαπιστώνουμε ότι πεπτίδια χωρίς συγκεκριμένη διαμόρφωση και ιδιαίτερα όταν αυτά έχουν μεγάλο μήκος, όπως στην περίπτωση του 7p, παρουσιάζουν μεγάλη ευκνησία η οποία δημιουργεί σημαντικό βαθμό δυσκολίας για τη δημιουργία σταθερών ειδικών επαφών με τις βάσεις του DNA. Από την άλλη, το τριπεπτίδιο GHK έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των συμπλόκων Λ - και Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺ με το DNA, οδηγώντας σε σημαντική διαφοροποίηση του τρόπου αλληλεπίδρασης με τις δύο αλληλουχίες που μελετήθηκαν. Συνεπώς, αυτό που προκύπτει είναι ότι τα πεπτίδια μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία στις αλληλεπιδράσεις αναγνώρισης συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA υπό ορισμένες συνθήκες και με τον κατάλληλο σχεδιασμό.

Επίσης, θα πρέπει να αξιολογηθεί και η συνεισφορά του πρόδρομου συμπλόκου [Ru(bpy)₃]²⁺ στις αλληλεπιδράσεις με το DNA. Η ιδανική και επιθυμητή συμπεριφορά του συμπλόκου αυτού θα ήταν η σταθεροποίηση της δεσμευμένης μορφής του DNA μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals αλλά και γενικότερα υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων χωρίς να επηρεάζει σημαντικά την αλληλουχία που δεσμεύεται το πεπτίδιο. Στην πραγματικότητα, όπως φαίνεται ήδη από τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν, σε καμία περίπτωση δεν κατευθύνεται η αλληλεπίδραση από το τμήμα [Ru(bpy)₂]²⁺ αλλά πάντοτε έχουμε συμμετοχή του υποκαταστάτη *m* μαζί με το πεπτίδιο. Ιδιαίτερα στην περίπτωση του Λ -ισομερούς, μόνο ο υποκαταστάτης *m* προσανατολίζεται προς τη διπλή έλικα ενώ οι δύο υποκαταστάτες *bpy* κατευθύνονται εκτός της έλικας. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι τα πολυπυριδυλικά σύμπλοκα του Ru(II) δεσμεύονται κατά προτίμηση στην ελάσσονα αύλακα αλληλουχιών AT. Αντιθέτως, πέρα από την περίπτωση των Λ -ισομερών που κατευθύνονται στην ελάσσονα αύλακα όπου και αλληλεπιδρούν κυρίως μέσω του *m*, τα Δ -ισομερή αλληλεπιδρούν μέσω της μείζονος αύλακας και οι διπυριδυλικοί υποκαταστάτες πλησιάζουν σε όλες τις περιπτώσεις αλληλουχίες GC. Όλα τα παραπάνω συντηγορούν επιπλέον για τον καθοριστικό ρόλο του πεπτιδίου στην αλληλεπίδραση με το DNA. Η συνεισφορά στη σταθεροποίηση της



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

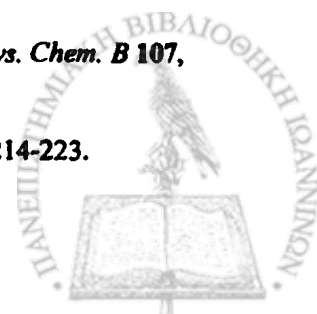
1. L. Stryer, "Βιοχημεία", Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1994.
2. S. Neidle, "DNA structure and recognition", Oxford University Press Inc., New York, 1994.
3. P. Murray-Rust, S. Motherwell (1978) *Acta Crystallographica B* 34, 2534-2546.
4. F. Aboul-ela, G. Varani, G. T. Walker, I. Tinoco (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 3559-3572.
5. G. M. Blackburn, M. J. Gait (Eds), "Nucleic Acids in Chemistry and Biology", 2nd Ed., Oxford University Press Inc, New York, 1996.
6. R. A. G. Friedman, G. S. Manning (1984) *Biopolymers* 23, 2671-2714.
7. C. Bailly, J. B. Chaires (1998) *Bioconjugate Chem.* 9, 513-538.
8. R. Lavery, K. Zakrzewska, B. Pullman (1986) *J. Biomol. Str. Dyn.* 3, 1155-1170.
9. M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Djura, R. E. Dickerson (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1376-1380.
10. M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Djura, R. E. Dickerson (1985) *J. Mol. Biol.* 183, 553-563. Το σχήμα αναπαράχθηκε από σελίδα του NDB Atlas από το διαδίκτυο.
11. M. Coll, C. A. Frederick, A. H.-J. Wang, A. Rich (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 8325-8329.
12. J. W. Lown (1988) *Anti-Cancer Drug Design* 3, 25-40.
13. E. C. Long, J. K. Barton (1990) *Acc. Chem. Res.* 23, 271-273.
14. Helene, J.-J. Toulme (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1049, 99-125.
15. R. A. G. Friedman, G. S. Manning (1984) *Biopolymers* 23, 2671-714.
16. A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, A. Rich (1987) *Biochemistry* 26, 1152-1163.
17. A. Pingoud, A. Jeltsch (2001) *Nucl. Acids Res.* 29, 3705-3727.
18. L. J. Beamer, C. O. Pabo (1992) *J. Mol. Biol.* 227, 177-196.
19. A. K. Aggarwal, D. W. Rodgers, M. Drottar, M. Ptashne, S. C. Harrison (1988) *Science* 242, 899-907.
20. Z. Otwinowski, R. W. Schevitz, R.-G. Zhang, C. L. Lawson, A. Joachimiak, R. Q. Marmorstein, B. F. Luisi, P. B. Sigler (1988) *Nature* 335, 321-329.
21. C. Metcalfe, J. A. Thomas (2003) *Chem. Soc. Rev.* 32, 215-224.
22. S. J. Lippard, M. Howe-Grant (1979) *Biochemistry* 18, 5762-5769 και οι παραπομπές του.
23. P. S. Sigman, T. W. Bruice, A. Mazumdor, C. L. Sutton (1993) *Acc. Chem. Res.* 26, 98-104.
24. L. S. Lerman (1961) *J. Mol. Biol.* 3, 18-30.
25. K. W. Jennette, S. J. Lippard, G. A. Vassiliades, W. R. Bauer (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3839-3843.
26. J. K. Barton, J. J. Dannenberg, A. L. Raphael (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4967-4969.
27. J. K. Barton, A. Danishefsky, J. M. Goldberg (1984) *J. Am. Chem. Soc.* 106, 2172-2176.
28. C. V. Kumar, J. K. Barton, N. J. Turro (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107, 5518-5523.
29. J. K. Barton, J. M. Goldberg, C. V. Kumar, N. J. Turro (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 2081-2088.
30. J. K. Barton, A. L. Raphael (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6460-6464.
31. J. P. Rehmann, J. K. Barton (1990) *Biochemistry* 29, 1701-1709.



32. J. P. Rehmann, J. K. Barton (1990) *Biochemistry* **29**, 1710-1717.
33. J. K. Barton (1986) *Science* **233**, 727-734.
34. A. Yamagishi (1983) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 572-573.
35. K. Kalyanasundaram (1982) *Coord. Chem. Rev.* **46**, 159-244.
36. A. Juris, V. Balzani, F. Barigelleti, S. Campagna, P. Belser, A. Von Zelewsky (1988) *Coord. Chem. Rev.* **84**, 85-277.
37. K. E. Erkkila, D. T. Odom, J. K. Barton (1999) *Chem. Rev.* **99**, 2277-2295.
38. B. Armitage (1998) *Chem. Rev.* **98**, 1171-1200 και οι παραπομπές του.
39. A. M. Pyle, J. P. Rehmann, R. Meshoyrer, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 3051-3058.
40. A. Yamagishi (1984) *J. Phys. Chem.* **88**, 5709-5713.
41. P. Lincoln, B. Norden (1998) *J. Phys. Chem. B* **102**, 9583-9594.
42. J. M. Kelley, A. B. Tossi, D. J. McConnell, C. OhUigin (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 6017-6034.
43. C. Stradowski, H. Gerner, L. J. Currell, D. Schulte-Frohlinde (1987) *Biopolymers* **26**, 189-201.
44. S. Mahadevan, M. Palaniandavar (1996) *Bioconjugate Chem.* **7**, 138-143.
45. T. Hard, B. Norden (1986) *Biopolymers* **25**, 1209-1228.
46. M. F. Ottaviani, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, J. K. Barton, H. Durr, N. J. Turro (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8946-8952.
47. G. S. Manning (1979) *Acc. Chem. Res.* **12**, 443-449.
48. I. Haq, P. Lincoln, D. Suh, B. Norden, B. Z. Chowdhry, B. Chaires (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 4788-4796.
49. M. T. Record, C. F. Anderson, T. M. Lohman (1978) *Q. Rev. Biophys.* **11**, 103-178.
50. R. Caspar, L. Musatkina, A. Tatosyan, H. Amouri, M. Cruselle, C. Guyard-Duhayon, R. Duval, C. Codier (2004) *Inorg. Chem.* **43**, 7986-7993.
51. P. P. Pellegrini, J. R. Aldrich-Wright (2003) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 176-183.
52. G. Yang, J. Z. Wu, L. Wang, L. N. Ji, X. Tian (1997) *J. Inorg. Biochem.* **66**, 141-144.
53. J. K. Barton (1983) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1**, 621-632.
54. B. M. Goldstein, J. K. Barton, H. M. Berman (1986) *Inorg. Chem.* **25**, 842-847.
55. J. K. Barton, L. A. Basile, A. Danishfesy, A. Alexandrescu (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1961-1965.
56. C. Hiort, B. Norden, A. Rodger (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1971-1982.
57. M. Eriksson, M. Leijon, C. Hiort, B. Norden, A. Graslund (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 4933-4934.
58. M. Eriksson, M. Leijon, C. Hiort, B. Norden, A. Graslund (1994) *Biochemistry* **33**, 5031-5040.
59. S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak, J. B. Chaires (1992) *Biochemistry* **31**, 9319-9324.
60. S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak, J. B. Chaires (1993) *Biochemistry* **32**, 2573-2584.
61. I. Haq, P. Lincoln, D. Suh, B. Norden, B. Z. Chowhry, J. B. Chaires (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 4788-4796.



62. J. E. Coury, J. R. Anderson, L. McFail-Isom, L. D. Williams, L. A. Bottomley (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3792-3796.
63. D. Z. M. Coggan, I. S. Haworth, P. J. Bates, A. Robinson, A. Rodger (1999) *Inorg. Chem.* **38**, 4486-4497.
64. A. E. Friedman, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 2595-2602.
65. H.-K. Kim, P. Lincoln, B. Norden, E. Tuite (1997) *Chem. Commun.* 2375-2376.
66. H.-Y. Mei, J. K. Barton (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 7414-7416.
67. B. Jing, M. Zhang, T. Shen (2004) *Spectrochimica Acta Part A* **60**, 2635-2641.
68. H. Xu, K.-C. Zheng, L.-J. Lin, H. Li, Y. Gao, L.-N. Ji (2004) *J. Inorg. Biochem.* **98**, 87-97.
69. Q.-L. Zhang, J.-H. Liu, J.-Z. Liu, P.-X. Zhang, X.-Z. Ren, Y. Liu, Y. Huang, L.-N. Ji (2004) *J. Inorg. Biochem.* **98**, 1405-1412.
70. J.-G. Liu, B.-H. Ye, Q.-L. Zhang, X.-H. Zou, Q.-X. Zhen, X. Tian, L.-N. Ji (2000) *J. Biol. Inorg. Chem.* **5**, 119-128.
71. A. Garoufis, J.-G. Liu, L.-N. Ji, N. Hadjiliadis (2003) *J. Inorg. Biochem.* **93**, 221-234.
72. J.-G. Liu, B.-H. Ye, H. Li, Q.-X. Zhen, L.-N. Ji, Y.-H. Fu (1999) *J. Inorg. Biochem.* **76**, 265-271.
73. K.C. Zheng, H. Deng, X. W. Liu, H. Lia, H. Chao, L.N. Ji (2004) *J. Mol. Structure (Theochem)* **682**, 225-233.
74. J. Liu, W. J. Mei, L. J. Lin, K. C. Zheng, H. Chao, F. C. Yun, L. N. Ji (2004) *Inorg. Chim. Acta* **357**, 285-293.
75. A. E. Friedman, J.-C. Chambron, J.-P. Sauvage, N. J. Turro, J. K. Barton (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4960-4962.
76. C. Hiort, P. Lincoln, B. Norden (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3448-3454.
77. P. Lincoln, A. Broo, B. Norden (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2644-2653.
78. I. Haq, P. Lincoln, D. Suh, B. Norden, B. Z. Chowdhry, J. B. Chaires (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 4788-4756.
79. C. G. Coates, L. Jacquet, J. J. McGarvey, S. E. J. Bell, A. H. R. Al-Obaidi, J. M. Kelly (1996) *Chem. Commun.* 35-36.
80. Y. Jenkins, A. E. Friedman, N. J. Turro, J. K. Barton (1992) *Biochemistry* **31**, 10809-10816.
81. A. E. Friedman, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 2595-2602.
82. C. Turro, S. H. Bossmann, Y. Jenkins, J. K. Barton, N. J. Turro (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9026-9032.
83. R. M. Hartshorn, J. K. Barton (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 5919-5925.
84. C. M. Dupureur, J. K. Barton (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 10286-10287.
85. E. Tuite, P. Lincoln, B. Norden (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 239-240.
86. R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton (1998) *Inorg. Chem.* **37**, 29-34.
87. B. P. Hudson, J. K. Barton (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 6877-6888.
88. C. L. Kielkopf, K.E. Erkkila, B.P. Hudson, J.K. Barton, D.C. Rees (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 117-121.
89. C. M. Dupureur, J. K. Barton (1994) *Inorg. Chem.* **36**, 33-43.
90. B. H. Yun, J.-O. Kim, B. W. Lee, P. Lincoln, B. Norden, J.-M. Kim, S. K. Kim (2003) *J. Phys. Chem. B* **107**, 9858-9864.
91. S.-D. Choi, M.-S. Kim, S. K. Kim, P. Lincoln, E. Tuite, B. Norden (1997) *Biochemistry* **36**, 214-223.



92. I. Greguric, J. R. Aldrich-Wright, J. G. Collins (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3621-3622.
93. J. V. Fry, J. G. Collins (1997) *Inorg. Chem.* **36**, 2919-2921.
94. J. G. Collins, A. D. Sleeman, J. R. Aldrich-Wright, I. Greguric, T. W. Hambley (1998) *Inorg. Chem.* **37**, 3133-3141.
95. J. G. Collins, J. R. Aldrich-Wright, I. D. Greguric, P. A. Pellegrini (1999) *Inorg. Chem.* **38**, 5502-5509.
96. B. Abraham, C. V. Sastri, B. G. Maiya, S. Umapathy (2004) *J. Raman Spectrosc.* **35**, 13-18.
97. C. Moucheron, A. Kirsch-De MesMaeker, J. M. Kelly (1997) *J. Photochem. Photobiol. B* **40**, 91-106.
98. D. L. Carlson, D. Huchital, E. J. Mantilla, R. D. Sheardy, W. R. Murphy (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6424-6425.
99. C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, S. Choua (1997) *Inorg. Chem.* **36**, 584-592.
100. L. Jacquet, A. Kirsch-De MesMaeker (1992) *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **88**, 2471-2480.
101. Q.-X. Zhen, B.-H. Ye, Q.-L. Zhang, J.-G. Liu, H. Li, L.-N. Ji, L. Wang (1999) *J. Inorg. Biochem.* **76**, 47-53.
102. Q.-X. Zhen, B.-H. Ye, J.-G. Liu, Q.-L. Zhang, L.-N. Ji, L. Wang (2000) *Inorg. Chim. Acta* **303**, 141-147.
103. Q.-Z. Zhen, Q.-L. Zhang, J.-G. Liu, B.-H. Ye, L.-N. Ji, L. Wang (2000) *J. Inorg. Biochem.* **78**, 293-298.
104. E. Ruiba, J. R. Hart, J. K. Barton (2004) *Inorg. Chem.* **43**, 4570-4578.
105. J.-G. Liu, Q.-L. Zhang, X.-F. Shi, L.-N. Ji (2001) *Inorg. Chem.* **40**, 5045-5050.
106. A. Greguric, I. D. Greguric, T. W. Hambley, J. R. Aldrich-Wright, J. G. Collins (2002) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 849-855.
107. J.-G. Liu, B.-H. Ye, H. Li, L.-N. Ji, R.-H. Li, J.-Y. Zhou (1999) *J. Inorg. Biochem.* **73**, 117-122.
108. A. M. Pyle, E. C. Long, J. K. Barton (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 4520-4522.
109. A. M. Pyle, M. Y. Chiang, J. K. Barton (1990) *Inorg. Chem.* **29**, 4487-4495.
110. J. Reinhold, R. Benedix, P. Birner, H. Hennig (1979) *Inorg. Chim. Acta* **33**, 209-213.
111. J. V. Caspar, T. D. Westmoreland, G. H. Allen, P. G. Bradley, T. J. Meyer, W. H. Woodruff (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 3492-3500.
112. P. G. Bradley, N. Kress, B. A. Hornberger, R. F. Dallinger, W. H. Woodruff (1981) *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 7441-7446.
113. R. F. Dallinger, W. H. Woodruff. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 4391-4393.
114. A. M. Pyle, J. K. Barton (1986) *Inorg. Chem.* **26**, 3820-3823.
115. T. P. Shields, J. K. Barton (1995) *Biochemistry* **34**, 15049-15056.
116. S. J. Franklin, J. K. Barton (1998) *Biochemistry* **37**, 16093-16105.
117. A. H. Krotz, L. Y. Kuo, T. P. Shields, J. K. Barton (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3877-3882.
118. N. W. Luedtke, J. S. Hwang, E. Nava, D. Gut, M. Kol, Y. Tor (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 5732-5740.
119. N. W. Luedtke, J. S. Hwang, E. C. Glazer, D. Gut, M. Kol, Y. Tor (2002) *ChemBioChem.* **3**, 766-771.
120. J. R. Aldrich-Wright, R. S. Vagg, P. A. Williams (1997) *Coord. Chem. Rev.* **166**, 361-389.
121. E. M. Proudfoot, J. P. Mackay, R. S. Vagg, K. A. Vickery, P. A. Williams, P. Karuso (1997) *Chem. Commun.* 1623-1624.
122. E. M. Proudfoot, J. P. Mackay, P. Karuso (2001) *Biochemistry* **40**, 4867-4878.
123. A. Garoufis, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis (2004) *Eur. J. Inorg. Chem.* 3326-3334.



124. H. Chao, W.-J. Mei, Q.-Q. Huang, L.-N. Ji (2002) *J. Inorg. Biochem.* **92**, 165-170.
125. X.-L. Hong, H. Chao, L.-J. Lina, K.-C. Zheng, H. Li, X.-L. Wang, F.-C. Yun, L.-N. Ji (2004) *Helvetica Chim. Acta* **87**, 1180-1193.
126. Y.-J. Liu, H. Chao, L.-F. Tan, Y.-X. Yuan, W. Wei, L.-N. Ji (2005) *J. Inorg. Biochem.* **99**, 530-537.
127. D. L. Carlson, D. H. Huchital, E. J. Mantilla, R. D. Sheardy, W. R. Murphy (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6424-6425.
128. B. Nordén, P. Lincoln, B. Aakerman, E. Tuite (1996) *Met. Ions Biol. Syst.* **33**, 177-252.
129. A. A. Kirsch-De Mesmaeker, C. Moucheron, N. Boutonnet (1998) *J. Phys. Org. Chem.* **11**, 566-576.
130. L. M. Wilhelmsson, E. K. Esbjorner, F. Westerlund, B. Norden, P. Lincoln (2003) *J. Phys. Chem. B* **107**, 11784-11793.
131. F. M. O'Reilly, J. M. Kelly (1998) *New J. Chem.* **22**, 215-217.
132. I. Sasaki, M. Imberdis, A. Gaudemer, B. Drahi, D. Azhari, E. Amouyal (1994) *New J. Chem.* **18**, 759-761.
133. P. Lincoln, B. Nordén (1996) *Chem. Commun.* 2145-2146.
134. F. O'Reilly, J. Kelly, A. A. Kirsch-De Mesmaeker (1996) *Chem. Commun.* 1013-1014.
135. X.-H. Zou, B.-H. Ye, H. Li, J.-G. Liu, Y. Xiong, L.-N. Ji (1999) *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1423-1428.
136. O. Van Gijte, A. A. Kirsch-De Mesmaeker (1999) *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 951-956.
137. F. M. O'Reilly and J. M. Kelly, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 7206-7213.
138. A. Brodkorb, A. A. Kirsch-De Mesmaeker, T. Rutherford, F. R. Keene (2001) *Eur. J. Inorg. Chem.* 2151-2160.
139. F. M. Foley, F. R. Keene, J. G. Collins (2001) *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2968-2974.
140. B. T. Patterson, J. G. Collins, F. M. Foley, F. R. Keene (2002) *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 4343-4350.
141. J. A. Smith, J. G. Collins, B. T. Patterson, F. R. Keene (2004) *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1277-1283.
142. L. M. Wilhelmsson, F. Westerlund, P. Lincoln, B. Nordén (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12092-12093.
143. C.-W. Jiang, H. Chao, X.-L. Hong, H. Li, W.-J. Mei, L.-N. Ji (2003) *Inorg. Chem. Commun.* **6**, 773-775.
144. J. Aldrich-Wright, C. Brodie, E. C. Glazer, N. W. Luedtke, L. Elson-Schwab, Y. Tor (2004) *Chem. Commun.* 1018-1019.
145. B. Onfelt, P. Lincoln, B. Norden (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 10846-10847.
146. B. Onfelt, P. Lincoln, B. Norden (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3630-3637.
147. C.-W. Jiang (2004) *J. Inorg. Biochem.* **98**, 497-501.
148. S. Mahadevan, M. Palaniandarar (1998) *Inorg. Chem.* **37**, 3927-3934.
149. J. G. Collins, R. M. Rixon, J. R. Aldrich-Wright (2000) *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 4377-4379.
150. J. K. Barton, A. L. Raphael (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 2466-2468.
151. C. Stinner, M. D. Wightman, S. O. Kelly, M. G. Hill, J. K. Barton (2001) *Inorg. Chem.* **40**, 5245-5250.
152. P. K. Bhattacharya, H. J. Lawson, J. K. Barton (2003) *Inorg. Chem.* **42**, 8811-8817.
153. T. P. Shields, J. K. Barton (1998) *Biochemistry* **37**, 16093-16105.
154. T. P. Shields, J. K. Barton (1995) *Biochemistry* **34**, 15049-15056.
155. B. P. Hudson, C. M. Dupureur, J. K. Barton (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9379-9380.
156. J. G. Collins, T. P. Shields, J. K. Barton (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9840-9846.



157. A. H. Krotz, B. P. Hudson, J. K. Barton (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12577-12578.
158. D. Campisi, T. Morii, J. K. Barton (1994) *Biochemistry* **33**, 4130-4139.
159. A. Sitlani, E. C. Long, A. M. Pyle, J. K. Barton (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 2303-2312.
160. A. Sitlani, C. M. Dupureur, J. K. Barton (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12859-12560.
161. R. H. Terbruggen, T. W. Johann, J. K. Barton (1998) *Inorg. Chem.* **37**, 6874-6883.
162. S. S. David, J. K. Barton (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 2984-2985.
163. C. A. Hastings, J. K. Barton (1999) *Biochemistry* **38**, 10042-10051.
164. A. M. Pyle, T. Morii, J. K. Barton (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9432-9434.
165. J. L. Kisko, J. K. Barton (2000) *Inorg. Chem.* **39**, 4942-4949.
166. C. S. Chow, L. S. Behlen, O. C. Uhlenbeck, J. K. Barton (1992) *Biochemistry* **31**, 972-982.
167. A. C. Lim, J. K. Barton (1998) *Biochemistry* **37**, 9138-9146.
168. T. P. Shields, J. K. Barton (1995) *Biochemistry* **34**, 8227-8234.
169. A. Sitlani, J. K. Barton (1994) *Biochemistry* **33**, 12100-12108.
170. D. T. Odom, C. S. Parker, J. K. Barton (1999) *Biochemistry* **38**, 5155-5163.
171. C. Turro, D. B. Hall, W. Chen, H. Zuilhof, J. K. Barton, N. J. Turro (1998) *J. Phys. Chem. A* **102**, 5708-5715.
172. Y.-Y. Fang, B. D. Ray, C. A. Claussen, K. B. Lipkowitz, E. C. Long (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 5403-5412.
173. N. R. Barnes, F. Schreiner (1998) *Inorg. Chem.* **37**, 6935-6938.
174. J. Caceres-Cortes, H. Sugiyama, K. Ikudome, I. Saito, A. H.-J. Wang (1997) *Biochemistry* **36**, 9995-10005.
175. Q.-L. Zhang, J.-G. Liu, H. Chao, G.-Q. Xue, L.-N. Ji (2001) *J. Inorg. Biochem.* **83**, 49-55.
176. Q.-L. Zhang, J.-G. Liu, J. Liu, G.-Q. Xue, H. Li, J.-Z. Liu, H. Zhou, L.-H. Qu, L.-N. Ji (2001) *J. Inorg. Biochem.* **85**, 291-296.
177. E. Kikuta, M. Murata, N. Katsube, T. Koike, E. Kimura (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5426-5436.
178. R. P. Houser, M. P. Fitzsimons, J. K. Barton (1999) *Inorg. Chem.* **38**, 1368-1370.
179. S. Routier, J.-L. Bernier, M. J. Waring, P. Colson, C. Houssier, C. Bailly (1996) *J. Org. Chem.* **61**, 2326-2331.
180. S. Routier, J.-C. Bernier, J. P. Catteau, P. Colson, C. Houssier, C. Rivalle, E. Bisagni, C. Bailly (1997) *Bioconjugate Chem.* **8**, 789-792.
181. H. Murner, B. A. Jackson, J. K. Barton (1998) *Inorg. Chem.* **37**, 3007-3012.
182. B. A. Jackson, C. M. Henling, J. K. Barton (1999) *Inorg. Chem.* **38**, 6218-6224.
183. B. A. Jackson, J. K. Barton (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 12986-12987.
184. B. A. Jackson, J. K. Barton (2000) *Biochemistry* **39**, 6176-6182.
185. L. Y. Kuo, T. P. Shields, J. K. Barton (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 3877-3882.
186. A. H. Krotz, L. Y. Kuo, J. K. Barton (1993) *Inorg. Chem.* **32**, 5963-5974.
187. N. Y. Sardesai, K. Zimmermann, J. K. Barton (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7502-7508.
188. C. A. Hastings, J. K. Barton (1999) *Biochemistry* **38**, 10042-10051.
189. C. S. Chow, J. K. Barton (1992) *Biochemistry* **31**, 5423-5429.

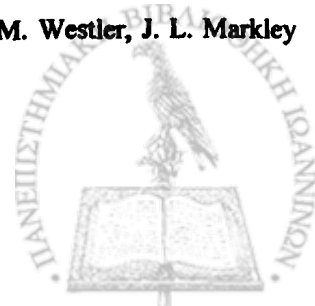


190. H. Junicke, J. R. Hart, J. Kisko, O. Glebov, I. R. Kirsch, J. K. Barton (2003) *Proc. Natl Acad. Sci.* **100**, 3737-3742.
191. R. V. Talanian, C. J. McKnight, P. S. Kim (1990) *Science* **249**, 769-771.
192. B. B. Cuenoud, A. Schepartz (1993) *Science* **259**, 510-513.
193. T. Morii, M. Simomura, S. Morimoto, I. Saito (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 1150-1151.
194. M. F. Bruist, S. J. Horvath, L. E. Hood, T. A. Steitz, M. I. Simon (1987) *Science* **235**, 777-780.
195. J. P. Sluka, S. J. Horvath, M. F. Bruist, M. I. Simon, P. B. Dervan (1987) *Science* **238**, 1129-1132.
196. M. Suzuki (1989) *EMBO J.* **8**, 797-804.
197. M. E. A. Churchill, M. Suzuki (1989) *EMBO J.* **8**, 4189-4195.
198. R. Reeves, M. S. Nissen (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 8573-8582.
199. M. Z. Radic, M. Sugubini, T. S. Elton, R. Reeves, B. A. Hamkalo (1992) *Chromosoma* **101**, 602-608.
200. B. H. Geierstanger, B. F. Volkman, W. Kremer, D. E. Wemmer (1994) *Biochemistry* **33**, 5347-5355.
201. N. Y. Sardesai, J. K. Barton (1997) *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**, 762-771.
202. Q. Liang, P. D. Eason, E. C. Long (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9625-9631.
203. R. Nagane, T. Koshigoe, M. Chikira, E. C. Long (2001) *J. Inorg. Biochem.* **83**, 17-23.
204. X. Huang, M. E. Pieczko, E. C. Long (1999) *Biochemistry* **38**, 2160-2166.
205. M. Chikira, T. Sato, W. E. Antholine, D. H. Petering (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 2859-2863.
206. C. Bailly, J.-S. Sun, P. Colson, C. Houssier, C. Helene, M.-J. Waring, J.-P. Henichort (1992) *Bioconjugate Chem.* **3**, 100-103.
207. K. D. Copeland, A. M. K. Lueras, E. D. A. Stemp, J. K. Barton (2002) *Biochemistry* **41**, 12785-12797.
208. M. Fitzsimons, J. K. Barton (1997) *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3379-3380.
209. K. D. Copeland, M. P. Fitzsimons, R. P. Houser, J. K. Barton (2002) *Biochemistry* **41**, 343-356.
210. S.-J. Lau, B. Sarkar (1981) *Biochem. J.* **199**, 649-656.
211. S. A. Daignault, A. P. Arnold, A. A. Isab, D. L. Rabenstein (1985) *Inorg. Chem.* **24**, 3984-3988.
212. J. H. Freedman, L. Pickart, B. Weinstein, W. B. Mims, J. Peisach (1982) *Biochemistry* **21**, 4540-4544.
213. S. L. Gronovski, V. A. Nikolaev, V. A. Zubarev, A. N. Suroyava, A. L. Zhuze, B. K. Chernov, N. Y. Sidorova, A. S. Zasedatelev, G. V. Gurskii (1993) *Mol. Biol.* **6**, 839-849.
214. M. Deibert, S. Grazulis, A. Janulaitis, V. Siksnys, R. Huber (1999) *EMBO J.* **18**, 5805-5816.
215. H. Drew, R. E. Dickerson (1981) *J. Mol. Biol.* **151**, 5353-5356.
216. W. Nerdal, D. R. Hare, B. R. Reid (1989) *Biochemistry* **28**, 10008-10021.
217. B. P. Sullivan, D. J. Salmon, T. J. Meyer (1978) *Inorg. Chem.* **17**, 3334-3341.
218. O. Morgan, S. Wang, S.A. Bac, R. J. Morgen, R.D. Baker, T.C. Streckas, R. Engel (1977) *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 3773-3776.
219. B.M. Peek, G.T. Ross, S.W. Edwards, G.J. Meyer, T.J. Meyer, B.W. Erickson (1991) *Int. J. Peptide Protein Res.* **38**, 114-123.
220. P. N. Borer, "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology", (Ed. G.D. Fasman) CRC Cleveland, 1975, p. 589-590.
221. B. Kolp, H. Viebrock, A. von Zelewsky, D. Abeln (2001) *Inorg. Chem.* **40**, 1196-1198.



240 Βιβλιογραφία

222. X. Huat, A. Von Zelewsky (1995) *Inorg. Chem.* **34**, 5791-5797.
223. I. V. Chernushevich, W. Ens, K. G. Standing, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry", (Ed. R. B. Cole), John Wiley & Sons, Inc, 1997, pp. 203-234.
224. <http://www.imb-jena.de>
225. T. J. Rutherford, O. V. Gijte, A. Kirsch-De Mesmaeker, F. R. Keene (1997) *Inorg Chem* **36**, 4465-4474.
226. G. D. Fasman (ed.), "Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules", Plenum Press, New York, 1996.
227. A. Garoufis, A. Koutsodimou, N. Katsaros, C.A. Mitsopoulou, N. Hadjiliadis (1999) *Polyhedron* **18**, 361-369.
228. G. Orellana, C. A. Ibarra, J. Santoro (1988) *Inorg. Chem.* **27**, 1025-1030.
229. B.V. Cheney (1968) *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 5386-5390.
230. R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini, M. L. Kopka (1982) *Science* **216**, 475-485.
231. D. R. Hare, D. E. Wemmer, S.-H. Chou, G. Drobny, B. R. Reid (1983) *J. Mol. Biol.* **171**, 319-336.
232. K. Wuthrich, "NMR of Proteins and Nucleic Acids", Wiley, USA, 1986.
233. M. S. Broido, G. Zen, T. L. James (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **119**, 663-670.
234. G. M. Clore, A. M. Gronenborn (1985) *FEBS Lett.* **179**, 187-198.
235. J. Feigon, W. Leupin, W. A. Denay, D. R. Kearns (1983) *Biochemistry* **22**, 5943-5951.
236. D. Frechet, D. M. Cheng, L. S. Kan, P. O. P. Ts'o (1983) *Biochemistry* **22**, 5194-5200.
237. C. A. G. Haasnoot, H. P. Westerink, G. A. van der Marel, J. H. van Boom (1983) *J. Biomol. Struct. Dynamics* **1**, 131-149.
238. R. V. Hosur, K. V. R. Chary, M. Ravikumar (1985) *Chem. Phys. Lett.* **116**, 105-108.
239. R. M. Scheek, N. Russo, R. Boelens, R. Kaptein, J. H. van Boom (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 2914-2916.
240. R. M. Scheek, R. Boelens, N. Russo, J. H. van Boom, R. Kaptein (1984) *Biochemistry* **23**, 1371-1376.
241. M. A. Weiss, D. J. Patel, R. T. Sauer, M. Karplus (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 130-134.
242. G. M. Clore, H. Lauble, A. Frenkiel, A. M. Gronenborn (1984) *Eur. J. Biochem.* **145**, 629-636.
243. S. J. Glaser, M. L. Remerowski, G. P. Drobny (1989) *Biochemistry* **28**, 1483-1492.
244. G. W. Kellog, B. I. Schweitzer (1993) *J. Biomol. NMR* **3**, 577-595.
245. D. J. Patel, S. A. Kozalowski, L. A. Marky, C. Broka, J. A. Rice, K. Itakura, K. J. Breslauer (1982) *Biochemistry* **21**, 428-436.
246. R. P. Boelens, M. Scheek, K. Diikstra, R. Kaptein (1985) *J. Magn. Reson.* **62**, 378-386.
247. S. H. Chou, D. R. Hare, D. E. Wemmer, B. R. Reid (1983) *Biochemistry* **22**, 3037-3041.
248. A. M. Gronenborn, G. M. Clore, M. Brunori, B. Giardina, G. Falcioni, M. F. Perutz (1984) *J. Mol. Biol.* **178**, 731-742.
249. E. L. Ulrich, E. M. M. John, G. R. Gough, M. J. Brunden, P. T. Gilham, W. M. Westler, J. L. Markley (1983) *Biochemistry* **22**, 4362-4365.



250. M. P. Singh, B. Plouvier, G. C. Hill, J. Gueck, R. T. Pon, J. W. Lown (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7006-7020.
251. J. G. Pelton, D. E. Wemmer (1988) *Biochemistry* **22**, 8088-8096.
252. C. Giessner-Prettre, B. Pullman (1976) *Acad. Sci. Paris Ser. D* **283**, 675-676.
253. C. Giessner-Prettre, B. Pullman, P. N. Borer, L. S. Kan, P. O. P. Ts'o (1976) *Biopolymers* **15**, 2277-2286.
254. W. D. Wilson, Y. Li., J. M. Veal, "Advances in DNA sequence specific agents" (Ed. L. H. Hurley), JAI Pres Inc., Greenwich, Connecticut, 1992, Vol. 1, p. 89-165.
255. R. Barthwal, A. Mujeeb, S. Kukreti, A. Gupta, G. Govil (1991) *J. Mol. Recogn.* **4**, 45-52.
256. F. Brun, J. J. Toulme, C. Helene (1975) *Biochemistry* **14**, 558-563.
257. J. G. Moe, I. M. Russu (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 821-827.
258. E. Liepinh, G. Otting, K. Wuthrich (1992) *Nucleic Acids Res.* **24**, 6549-6553.
259. N. A. Froystein, E. Sletten (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 3240-3250.
260. E. Moldreim, M. J. Hannon, I. Meisterman, A. Rodger, E. Sletten (2002) *J. Inorg. Biol. Chem.* **7**, 770-780.
261. N. Zhou, S. Manogaran, G. Zon, T. L. James (1988) *Biochemistry* **27**, 6013-6020.
262. J. Feigon, W. A. Denny, W. Leupin, D. R. Kearns (1984) *J. Med. Chem.* **27**, 450-465.
263. C. A. Franklin, J. V. Fry, J. G. Collins (1996) *Inorg. Chem.* **35**, 7541-7545.
264. N. J. Wheate, S. M. Cutts, D. R. Phillips, J. R. Aldrich-Wright, J. G. Collins (2001) *J. Inorg. Biochem.* **84**, 119-127.
265. T. P. Shields, J. K. Barton (1995) *Biochemistry* **34**, 15049-15056.
266. M. Kochoyan, J. L. Leroy, M. Gueron (1987) *J. Mol. Biol.* **196**, 599-609.
267. D. J. Patel, S. Ikuta, S. Kozlowski, K. Itakura (1983) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **80**, 2184-2188.
268. T. A. Early, D. R. Kearns, W. Hillen, R. D. Wells (1981) *Biochemistry* **20**, 3756-3764.
269. J. Ramstein, R. Lavery (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7231-7235.
270. A. Rodger, K. J. Sanders, Michael J. Hannon, I. Meistermann, A. Parkinson, D. S. Vidler, I. S. Haworth (2000) *Chirality* **12**, 221-236.
271. I. Brukner, S. Susic, M. Dlakie, A. Savie, S. Pongor (1994) *J. Mol. Biol.* **236**, 26-32.
272. D. Porschke (1986) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **4**, 373-389.
273. D. S. Goodsell, M. L. Kopka, D. Cascio, R. E. Dickerson (1993) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 2930-2934.
274. G. S. Manning, K. K. Ebrallidse, A. D. Mirzabekov, A. Rich (1989) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **6**, 877-889.
275. A. H. Elcock, J. A. McCammon (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 3787-3788.
276. A. Lebrun, Z. Shakked, R. Lavery (1997) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 2993-2998.
277. I. Rouzina, V. A. Bloomfield (1998) *Biophys. J.* **74**, 3152-3164.
278. D. M. Loprete, K. A. Hartman (1993) *Biochemistry* **32**, 4077-4082.
279. M. H. Werner, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, G. M. (1996) *Science* **271**, 778-784.
280. J. L. Kim, S. K. Burley (1994) *Nat. Struct. Biol.* **1**, 638-653.
281. P. A. Rice, S. Yang, K. Mizuuchi, H. A. Nash (1996) *Cell* **87**, 1295-1306.
282. S. A. Weston, A. Lahm, D. Suck (1992) *J. Mol. Biol.* **226**, 1237-1256.
283. A. Lahm, D. Suck (1991) *J. Mol. Biol.* **221**, 645-667.



242 Βιβλιογραφία

- 284. D. N. Paoella, Y. Liu, A. Schepartz, A. (1997) *Biochemistry* **36**, 10033-10038.
- 285. A. Sitlani, D. Crothers (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 1404-1409.
- 286. S. C. Schultz, G. C. Shields, T. A. Steitz (1991) *Science* **253**, 1001-1007.
- 287. T. Li, J. Mead, C. Wolberger, A. K. Vershon, A. K. (1995) *Science* **270**, 262-269.
- 288. J. K. Strauss-Soukup, L. J. Maher (1997) *Biochemistry* **36**, 10026-10032.
- 289. P. R. Hardwidge, J. D. Kahn, L. James Maher (2002) *Biochemistry* **41**, 8277-8288.
- 290. J. K. Strauss-Soukup, M. M. Vaghefi, R. I. Hogrefe, L. J. Maher (1997) *Biochemistry* **36**, 8692-8698.
- 291. F. W. Winkler, D. W. Banner, C. Oefner, D. Tsernoglou, R. S. Brown, S. P. Heathman, R. K. Bryan, P. D. Martin, K. Petratos, K. S. Wilson (1993) *EMBO J.* **12**, 1781-1795.
- 292. R. Lavery, H. Sklenar, B. Pullman (1986) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **3**, 1015-1031.
- 293. K. Zakrzewska, B. Pullman (1986) *Biopolymers* **25**, 375-392.
- 294. D. J. Patel, L. Shapiro (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 1230-1240.
- 295. T.-L. Hwang, A. J. Shaka (1995) *J. Magn. Reson. Series A* **112**, 275-279.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός των διαστερομερών συμπλόκων Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2$, (bpy = 2,2'-διτυριδύλιο, GHK = γλυκίνη-L-ιστιδίνη-L-λυσίνη) καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις τους με τη διπλή έλικα των δεοξυνουκλεοτιδίων ($5'$ - $\text{GCGCAATTGCGC-3}'$)₂ και $d(5'$ - CGCGATCGCG)₂ μελετήθηκαν με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας NMR, ESI-MS και CD. Το φάσμα NOESY του Λ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2$ εμφανίζει ενδομοριακά cross-peak μεταξύ των πρωτονίων bpy H3 ή H3' και τα αρωματικά H₂ και H₅ του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης, γεγονός που δείχνει ότι το πεπτίδιο υιοθετεί έναν προσανατολισμό με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο να πλησιάζει τον υποκαταστάτη bpy , κι ενδεχομένως να αλληλεπιδρά μέσω π -stacking αλληλεπίδρασης. Από την άλλη, η απουσία τέτοιων ενδομοριακών cross-peak στο φάσμα NOESY του Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2$, είναι ενδεικτική της διαφορετικής διαμόρφωσής του συγκριτικά με το Λ -ισομερές. Τα δύο ισομερή αλληλεπιδρούν με τη διπλή έλικα του δωδεκανουκλεοτιδίου διαφορετικά. Το Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2$ δεσμεύεται στη μείζονα αύλακα του δωδεκανουκλεοτιδίου κοντά στο κεντρικό τμήμα της αλληλουχίας. Το Λ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2$ δεσμεύεται πιθανότατα μη ειδικά, πλησιάζοντας τον έλικα από την ελάσσονα αύλακα. Τα δεδομένα από τη φασματοσκοπία NMR δείχνουν ότι το πεπτίδιο (GHK) διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στη σύνδεση του Δ -ισομερές στο δωδεκανουκλεοτίδιο. Η αλληλεπίδραση των Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2$ με το δεκαμερές $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ έχει ως αποτέλεσμα το άνοιγμα των δύο αλυσίδων της διπλής έλικας που γίνεται σημαντικότερο καθώς η αναλογία του Δ -ισομερούς ως προς το DNA αυξάνει. Το άνοιγμα των δύο σκελών και τελικά η κάμψη του DNA που το ακολουθεί είναι ενδεικτικό της μη ειδικής αλληλεπίδρασης και των δύο ισομερών με το δεκανουκλεοτίδιο.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός των διαστερομερών συμπλόκων Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]\text{Cl}_2$, (m-7p = 4-μεθυλ-4'-Arg-Gly-Asn-Ala-His-Glu-Arg-CONH₂-2,2'-διτυριδύλιο) και μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή τους με τη διπλή έλικα των δεοξυνουκλεοτιδίων $d(5'$ - $\text{CGCGATCGCG-3}'$)₂ και $d(5'$ - $\text{GCGCTTAAGCGC-3}'$)₂ με τη βοήθεια φασματοσκοπίας ¹H NMR. Το πεπτίδιο 7p είναι τμήμα του βρόχου αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *MunI*, ένα περιοριστικό ένζυμο τύπου II που προέρχεται από το *mycoplasma unidentifed*, που αναγνωρίζει την εξανουκλεοτιδική παλίνδρομη αλληλουχία G/AATTG και την κόβει στο σημείο που υποδεικνύεται από την κάθετο. Το Δ -ισομερές



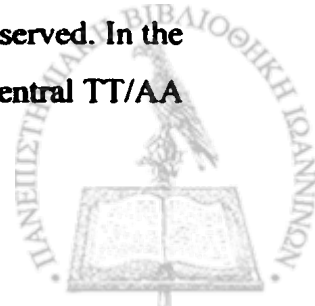
δεσμεύεται στη μείζονα αύλακα του τελικού τμήματος CG/GC του δεκανουκλεοτιδίου d(CGCGATCGCG)₂, ενώ το Λ -ισομερές πλησιάζει στην αλληλουχία GCT/CGA. Από την άλλη, παρατηρείται ασθενής δέσμευση του Δ -ισομερούς στα άκρα του d(GCGCTTAAGCGC)₂ λαμβάνοντας δύο τουλάχιστον διαφορετικούς προσανατολισμούς. Στην περίπτωση του Λ -ισομερούς, ο υποκαταστάτης (ες) *hpy* βρίσκεται (ονται) στη μείζονα αύλακα της κεντρικής αλληλουχίας TT/AA. Συζητείται εκτενώς ο ρόλος των συνδεόμενων πεπτιδίων σε οκταεδρικά σύμπλοκα του Ru(II) στην εκλεκτικότητα κατά τη δέσμευσή τους στο DNA.



ABSTRACT

The synthesis and characterization of the diastereomeric complexes Λ - and Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂, (bpy = 2,2'-bipyridine, GHK = Glycine-L-Histidine-L-Lysine) as well as their binding properties to the deoxynucleotide duplexes d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ and d(5'-CGCGATCGCG)₂ were studied by means of NMR, ESI-MS and CD spectroscopy. The NOESY spectrum of the Λ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ shows intramolecular crosspeaks between the bpy H3 or H3' protons and the aromatic H₂ and H₅ of the histidine imidazole ring, indicating that the peptide adopts an orientation with the imidazole ring close to the bpy ligand, possibly interacting by π -stacking. The absence of such intramolecular crosspeaks in the NOESY spectrum of Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ on the other hand, is indicative of its different conformation compared to the Λ -isomer. The isomers interact with the oligonucleotide duplex differently. The Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ binds in the oligonucleotide major groove close to the central part of the sequence. The Λ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ binds probably non selectively, approaching the helix from the minor groove. The NMR analysis shows that the peptide (GHK) plays a significant role in the binding of the Δ -isomer to the dodecanucleotide. The interaction of Λ - and Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ with the decamer d(CGCGATCGCG)₂ reveals opening of the two strands of the duplex which becomes more significant as the ratio of the Δ -isomer to DNA increases. The opening of the two strands and eventually the bending of DNA which follows is indicative of the non-specific interaction of both isomers with the decanucleotide.

Furthermore, the diastereomeric complexes Λ - and Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂, (m-7p = 4-methyl-4'-Arg-Gly-Asn-Ala-His-Glu-Arg-CONH₂-2,2'-bipyridine) were synthesized and characterized and their binding properties to the deoxynucleotide duplexes d(5'-CGCGATCGCG-3')₂ and d(5'-GCGCTTAAGCGC-3')₂ were studied by means of ¹H NMR spectroscopy. 7p is part of the recognition loop of the restriction endonuclease *MunI*, a type II restriction enzyme from *Mycoplasma unidentified* which recognizes the palindromic hexanucleotide sequence C/AATTG and cleaves it as indicated by the slash. The Δ -isomer binds to the terminal CG/GC major groove of d(CGCGATCGCG)₂ decanucleotide, whereas the Λ -isomer approaches the GCT/CGA sequence. On the other hand, weak binding of the Δ -isomer to the end of d(GCGCTTAAGCGC)₂ into two different orientations is observed. In the case of the Λ -isomer, the bpy ligand(s) are located into the major groove of the central TT/AA



sequence. The role of appended peptide sequences in sequence selectivity binding to DNA is being addressed.



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ATP= Adenotriphosphoric nucleotide

BCA= Bicinchoninic Acid

BSA= Bovine Serum Albumin

cDNA= complementary Deoxyribonucleic Acid

CD= Circular Dichroism

CT= Charge Transfer

DMF= N,N-Dimethyl-Formamide

DTT= 2,3-Dihydroxy-1,4-Dithiobutane

ESI-MS= ElectroSpray Ionization-Mass Spectroscopy

EXAFS=Extended X-ray Absorption Fine Structure

Fmoc= 9-fluorenyloxycarbonyl-

HBTU= O-benzotriazolylo-tetramethylo-isourinate

HSQC= Heteronuclear Single Quantum Coherence

LEC= Long-Evans Cinammon

LMCT= Ligand to Metal Charge Transfer

mRNA= messenger Ribonucleic Acid

NMR=Nuclear Magnetic Resonance

NOESY= Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

PAL-PEG-PS= Polyesterene-polyethylene glycol polymer support

PDB= Protein Data Bank

ROESY= Rotating Overhauser Effect Spectroscopy

SDS= Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE= Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TCA= Tricluoroacetic Acid

TFA= Trifluoroacetic acid

TIPS= Triisopropylsilane

TM6= Transmembrane segment 6

TOCSY= Total Correlation Spectroscopy

Tris= Tris(hydroxymethyl) aminomethane

WD6=Wilson Domain 6



ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής προέκυψαν οι παρακάτω δημοσιεύσεις:

1. A. Myari, A. Garoufis, N. Hadjiliadis "Synthesis and characterization of the diastereomers Λ - and Δ -[Ru(bpy)₂(m-bpy-Gly-L-His-L-Lys)]Cl₂. ¹H NMR studies on their interactions with the deoxynucleotide duplex d[(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂]." *Eur. J. Inorg. Chem.* (2004) 1427-1439.
2. A. Myari, N. Hadjiliadis, N. Fatemi, B. Sarkar "Copper(I) interaction with model peptides of WD6 and TM6 domains of Wilson ATPase: regulatory and mechanistic implications" *J. Inorg. Biochem.* (2004) **98**, 1483-1494.
3. A. Myari, N. Hadjiliadis, A. Garoufis "Synthesis and characterization of the diastereomers Λ - and Δ -[Ru(bpy)₂(m-bpy-L-Arg-Gly-L-Asn-L-Ala-L-His-L-Glu-L-Arg)]Cl₂. ¹H NMR studies on their interactions with the deoxynucleotide duplex d[(5'-GCGCTTAAGCGC-3')₂] and d[(5'-CGCGATCGCG-3')₂]" *J. Inorg. Biochem.* (2005) **99**, 616-626.
4. A. Myari, N. Hadjiliadis, A. Garoufis "¹H NMR study of the enantioselective binding of Λ - and Δ -[Ru(bpy)₂(m-bpy-GHK)]Cl₂ to the deoxynucleotide duplex d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂" *Bioinorg. Chem. App.* (2005) **3**, 109-117.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Συμβολισμοί των αμινοξέων

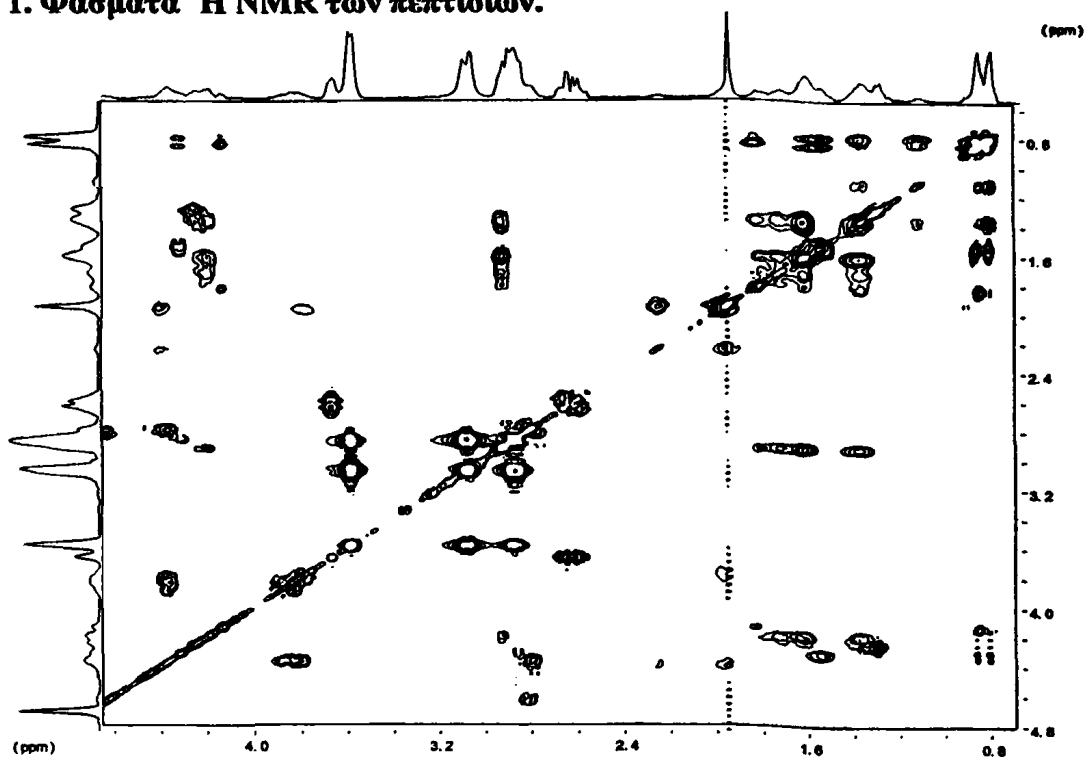
<i>Glycine (Gly) G</i>	<i>Alanine (Ala) A</i>	<i>Serine (Ser) S</i>	<i>Valine (Val) V</i>
<i>Threonine (Thr) T</i>	<i>Asparagine (Asn) N</i>	<i>Glutamine (Gln) Q</i>	<i>Proline (Pro) P</i>
<i>Glutamate (Glu) E</i>	<i>Aspartate (Asp) D</i>	<i>Leucine (Leu) L</i>	<i>Isoleucine (Ile) I</i>
<i>Histidine (His) H</i>	<i>Methionine (Met) M</i>	<i>Cysteine (Cys) C</i>	<i>Phenylalanine (Phe) F</i>
<i>Tyrosine (Tyr) Y</i>	<i>Tryptophan (Trp) W</i>	<i>Lysine (Lys) K</i>	<i>Arginine (Arg) R</i>

Π2 Παράρτημα II

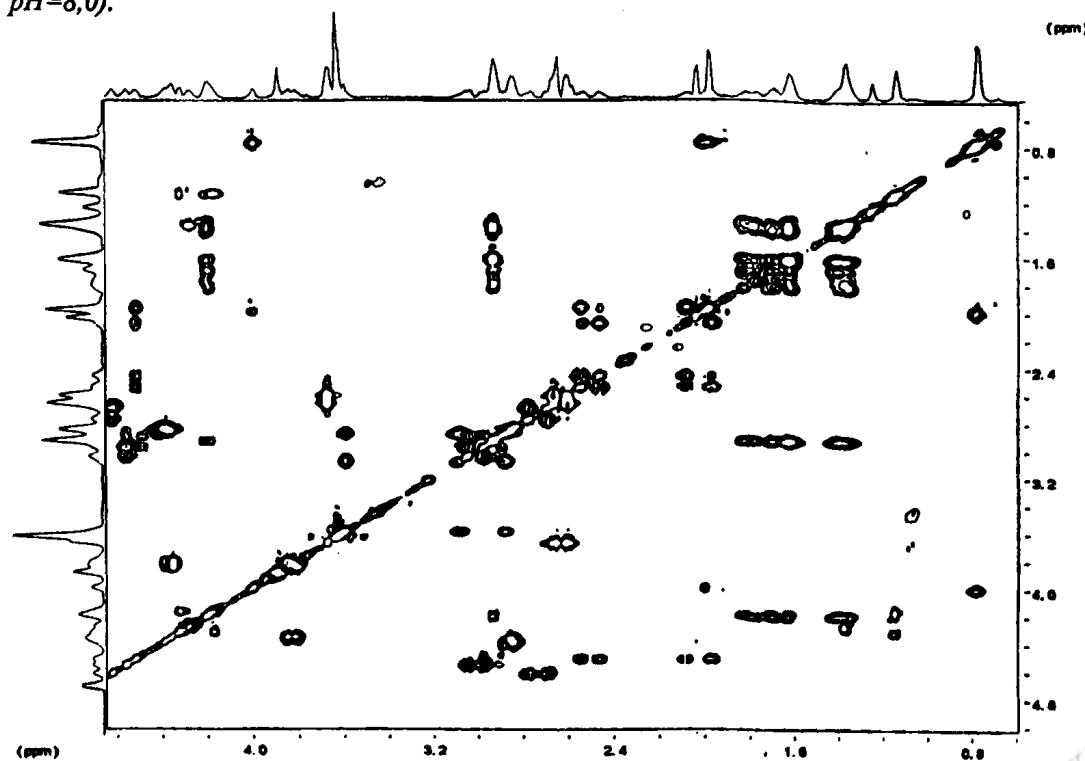
Παράρτημα II

Φάσματα ^1H NMR δύο διαστάσεων από το μέρος Α'.

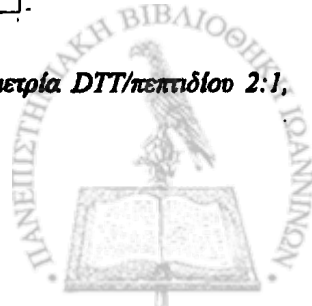
1. Φάσματα ^1H NMR των πεπτιδίων.

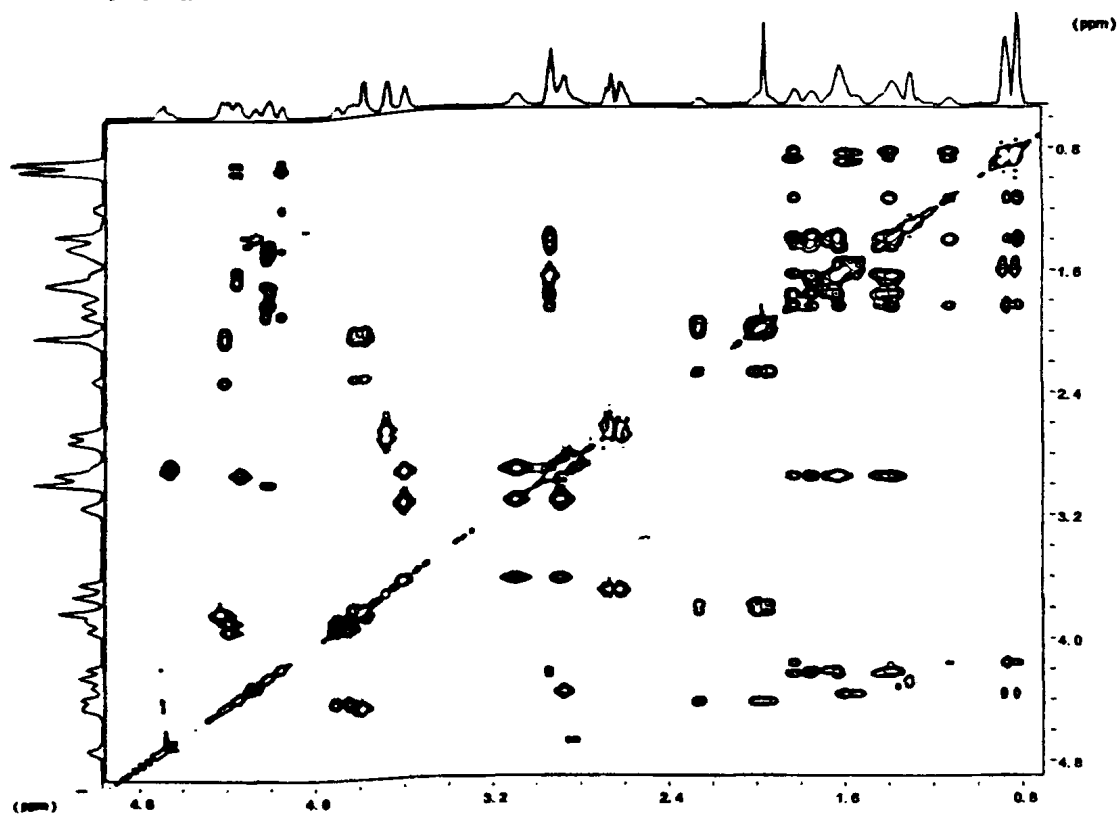


Σχήμα Π1. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του 2K8p σε D_2O (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, pH=8,0).

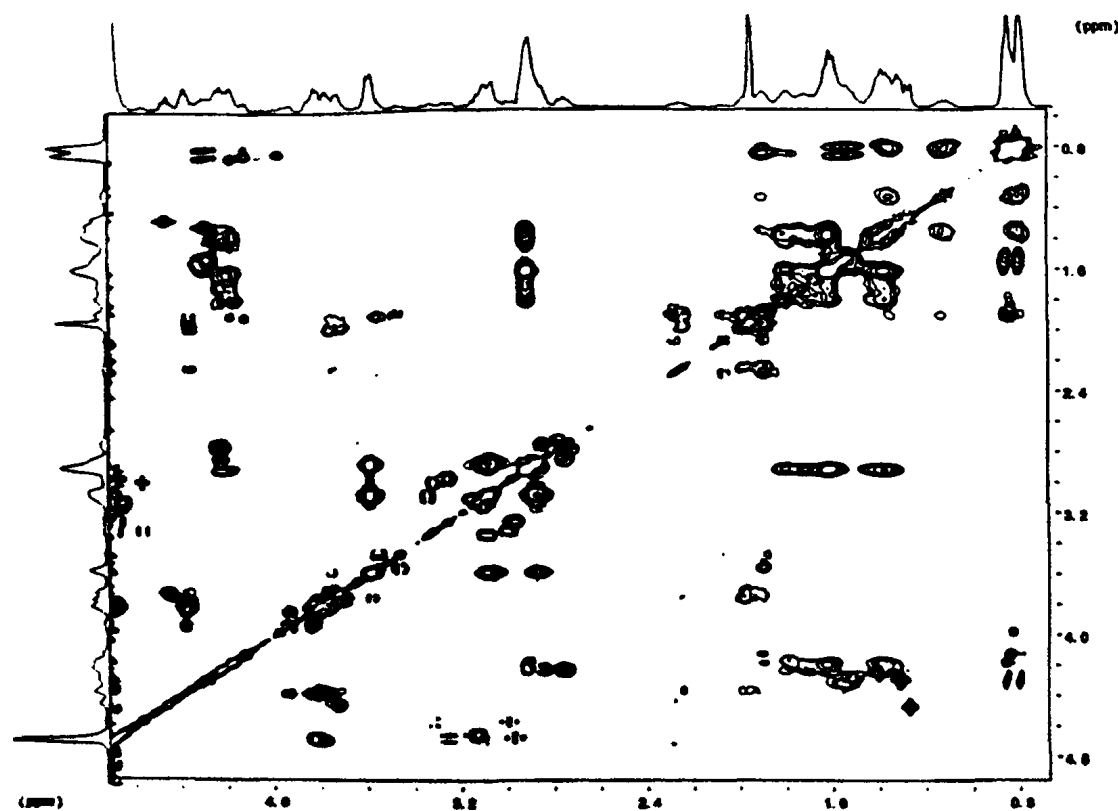


Σχήμα Π2. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του 2K10p σε D_2O (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, pH=8,0).



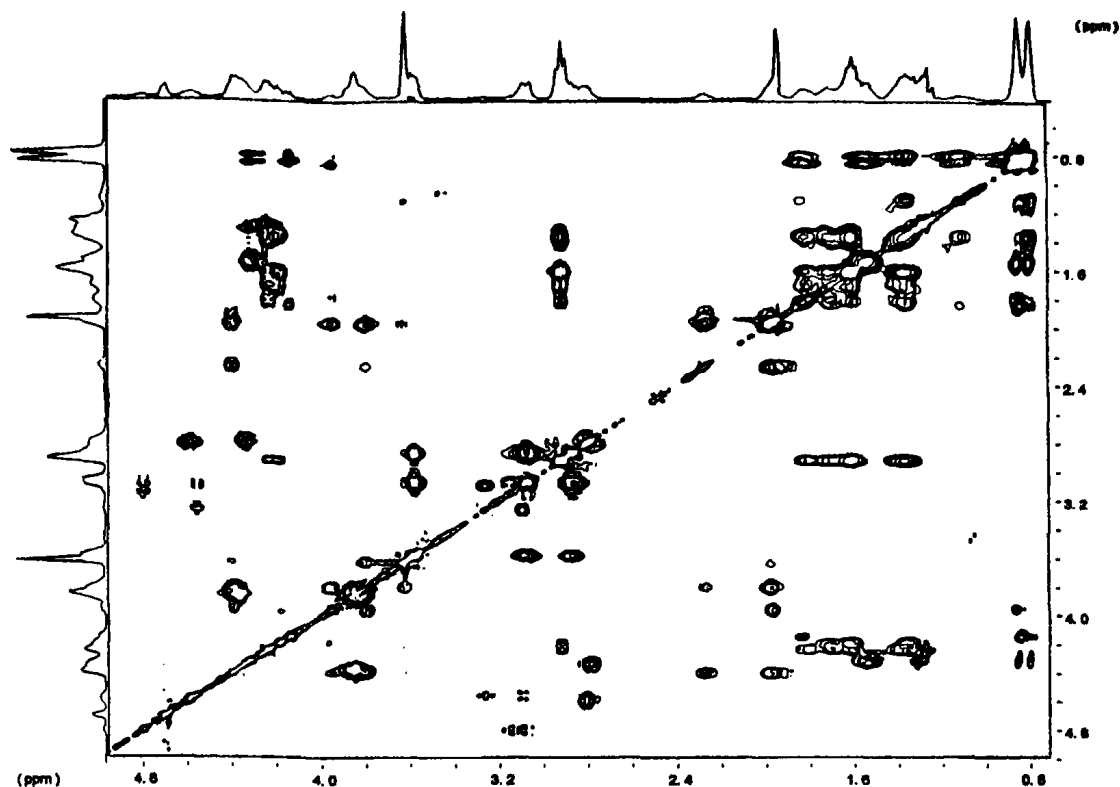


Σχήμα Π3. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του 1s σε D_2O (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, pH=8,0).



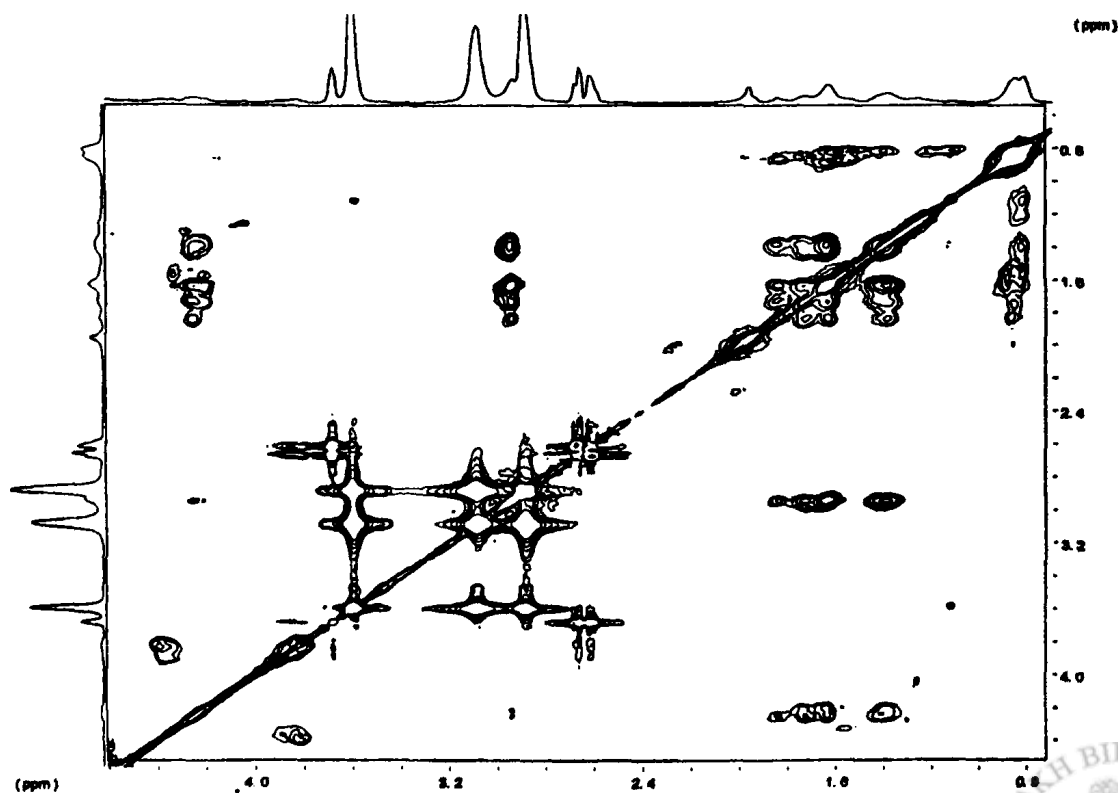
Σχήμα Π4. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του 2s σε D_2O (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, pH=8,0).

Π4 Παράρτημα II



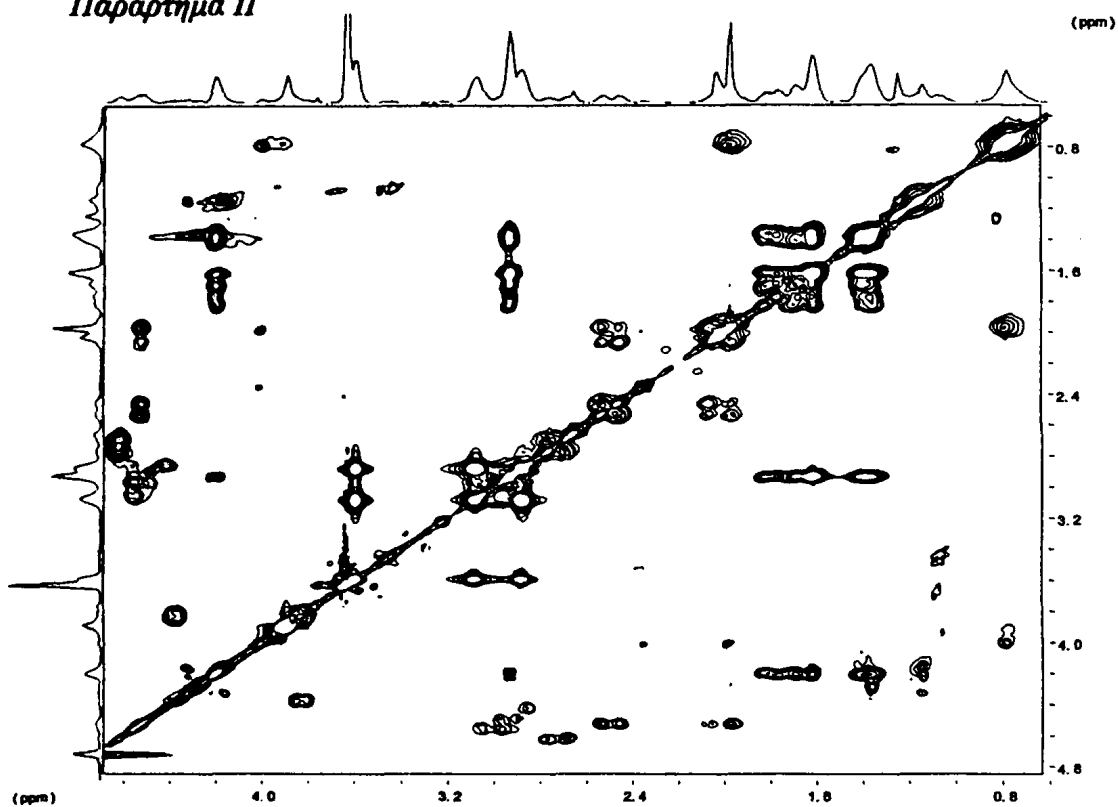
Σχήμα Π5. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65\text{ ms}$) του 3s σε D_2O (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, $\text{pH}=8,0$).

2. Φάσματα ^1H NMR των πεπτιδίων παρουσία Cu(I) .

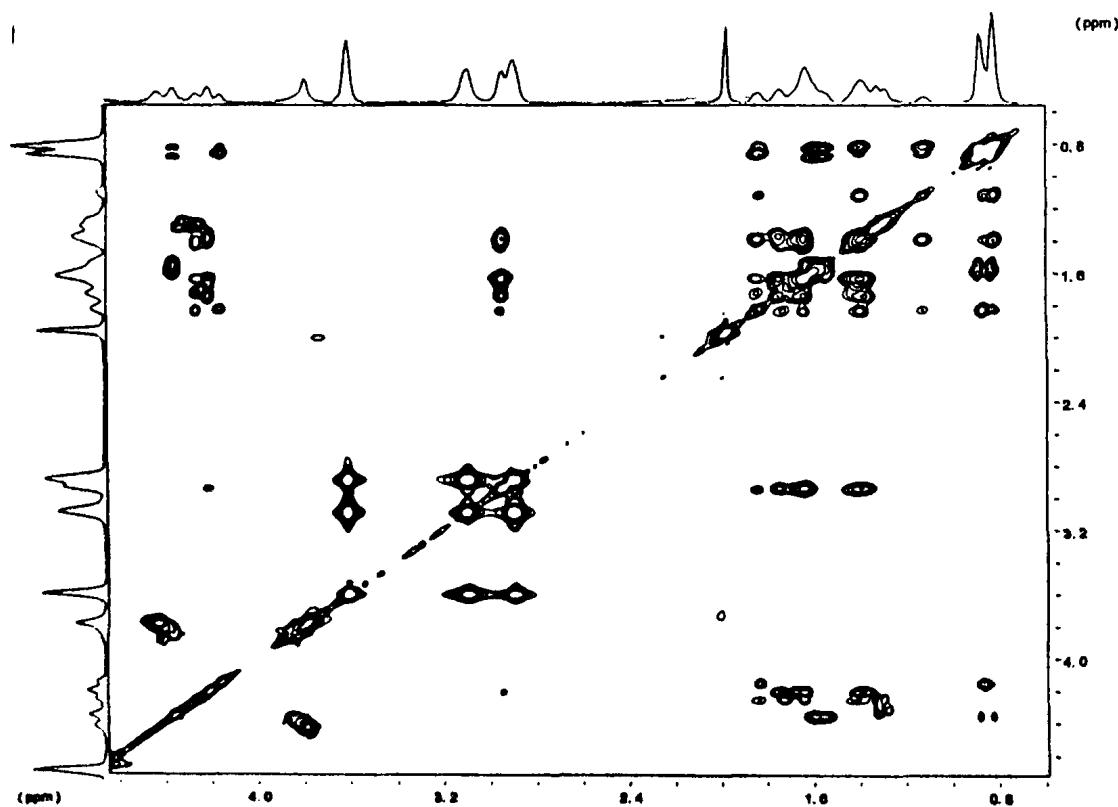


Σχήμα Π6. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65\text{ ms}$) του 2K8p σε D_2O παρουσία Cu(I) σε αναλογία 1:1 (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, $\text{pH}=8,0$).



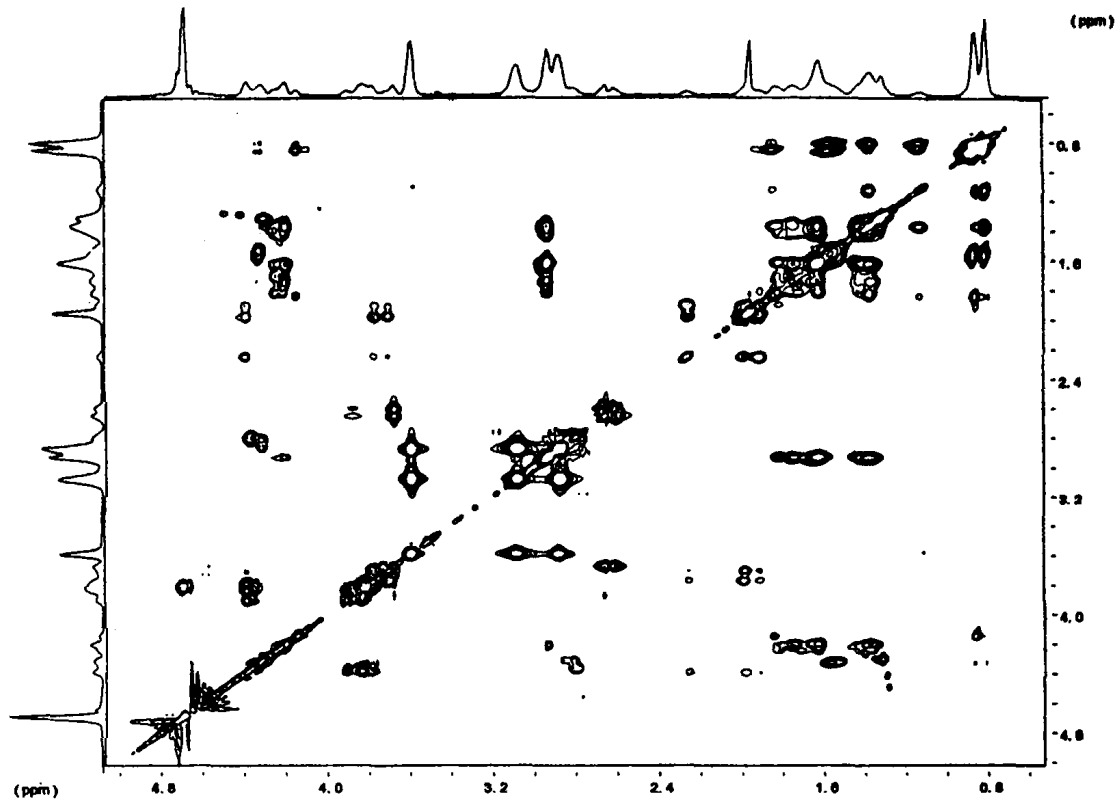


Σχήμα Π7. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του 2K10p σε D_2O παρουσία Cu(I) σε αναλογία 1:1 (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, $\text{pH}=8,0$).

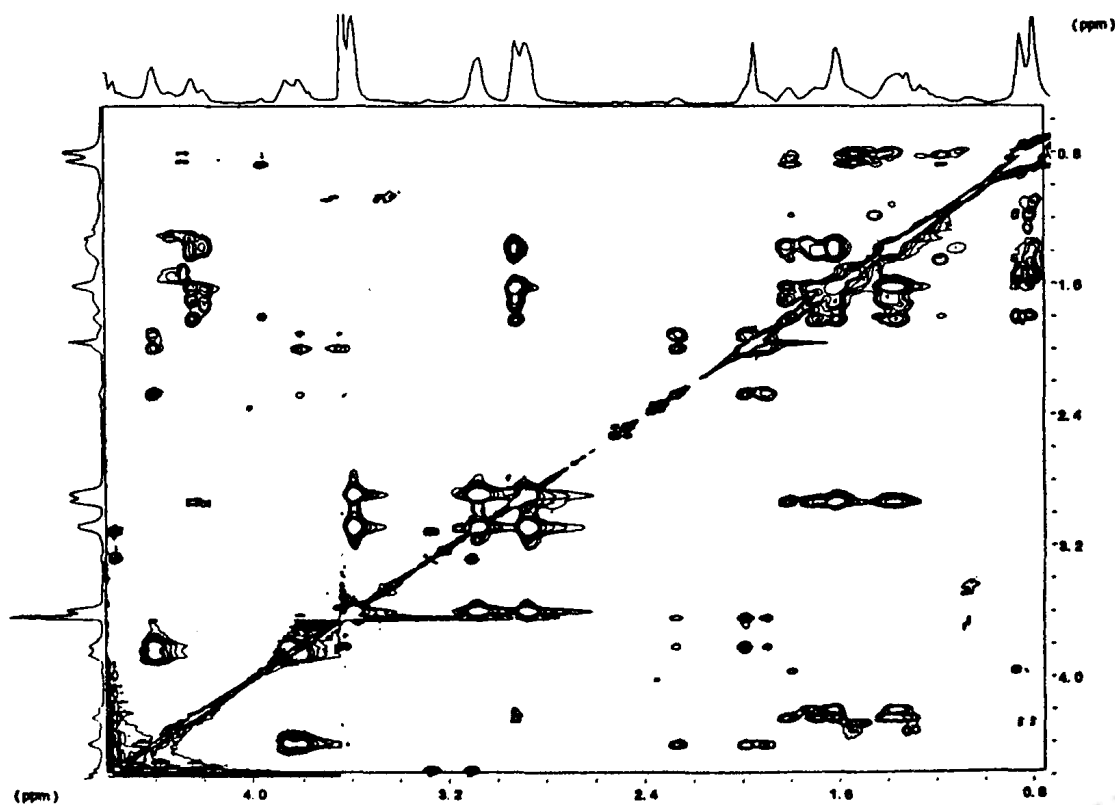


Σχήμα Π8. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του 1s σε D_2O παρουσία Cu(I) σε αναλογία 1:1 (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, $\text{pH}=8,0$).

Π6 Παράρτημα II

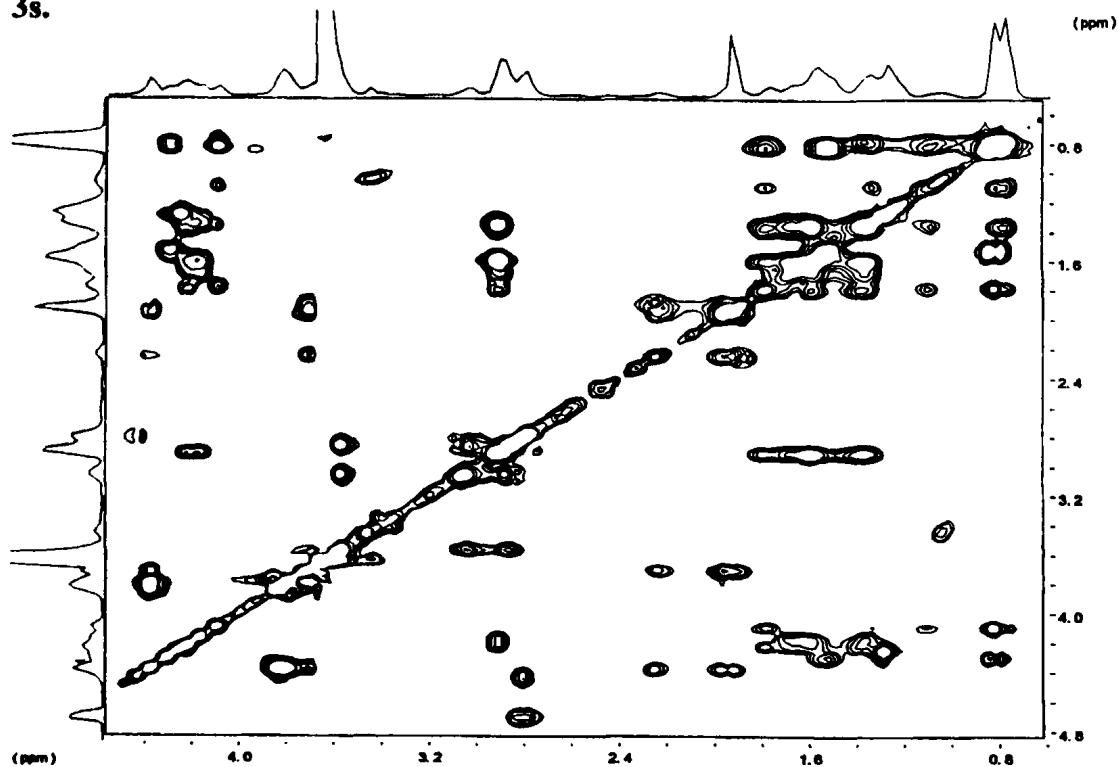


Σχήμα Π9. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του 2s σε D_2O παρουσία Cu(II) σε αναλογία 1:1 (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, $\text{pH}=8,0$).

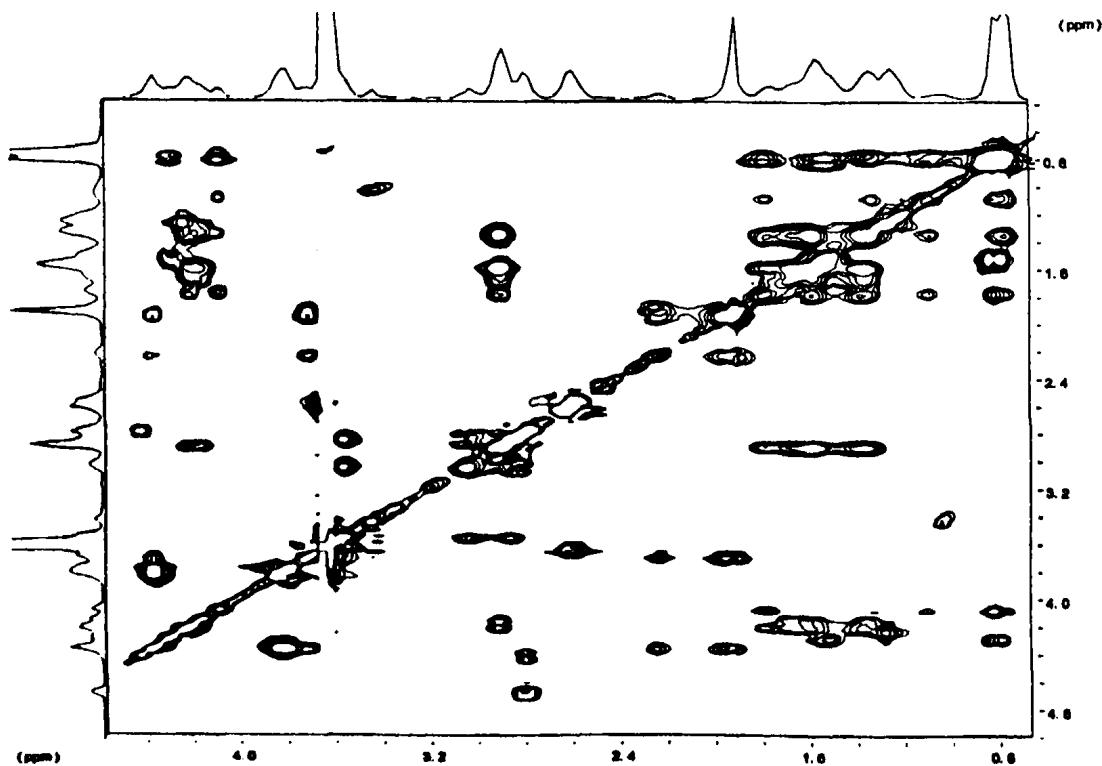


Σχήμα Π10. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του 3s σε D_2O παρουσία Cu(II) σε αναλογία 1:1 (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, $\text{pH}=8,0$).

3. Επίδραση της μεταβολής της αναλογίας πεπτιδίου:Cu(I) στα φάσματα ^1H NMR του 3s.



Σχήμα Π11. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του 3s σε D_2O παρουσία Cu(I) σε αναλογία 2,5:1 (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, pH=8,0) στους 298 K.



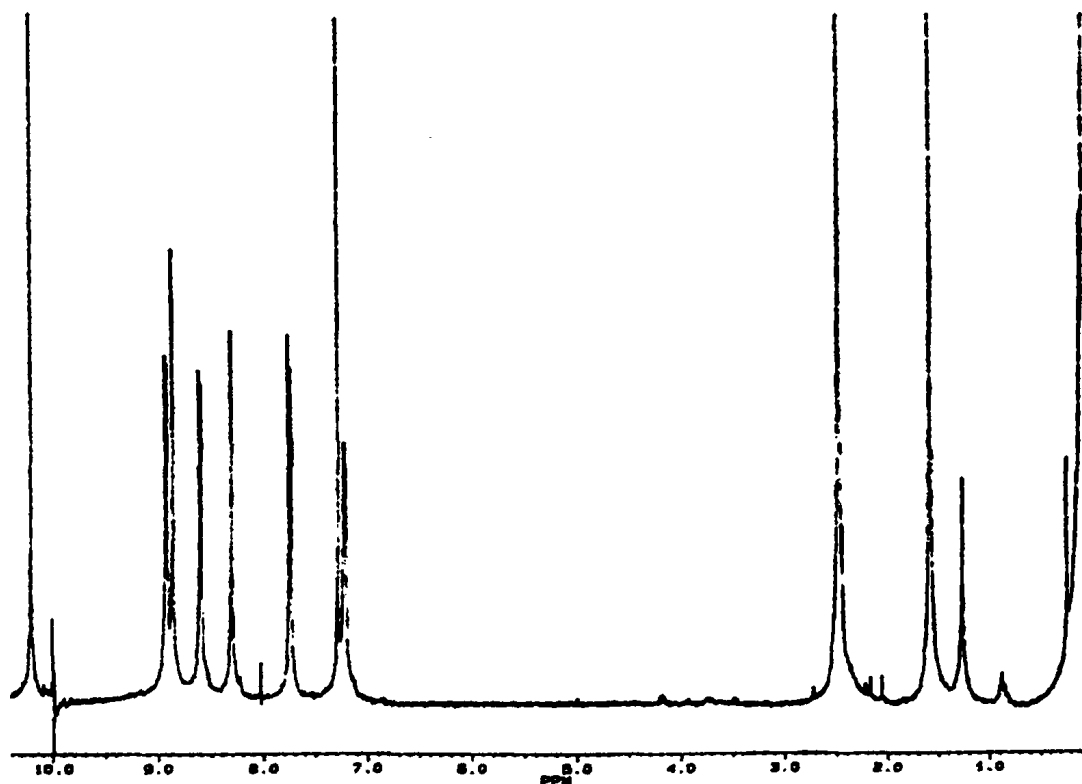
Σχήμα Π12. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του 3s σε D_2O παρουσία Cu(I) σε αναλογία 5:1 (στοιχειομετρία DTT/πεπτιδίου 2:1, pH=8,0) στους 298 K.

Παράρτημα ΠΙ

1. Χαρακτηρισμός των ενδιαμέσων προϊόντων της συνθετικής πορείας που περιγράφεται στην ενότητα.

1.1. *m*-H (4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδυλο-καρβοξαλδεύδη).

Σ.τ.: 130-132°.

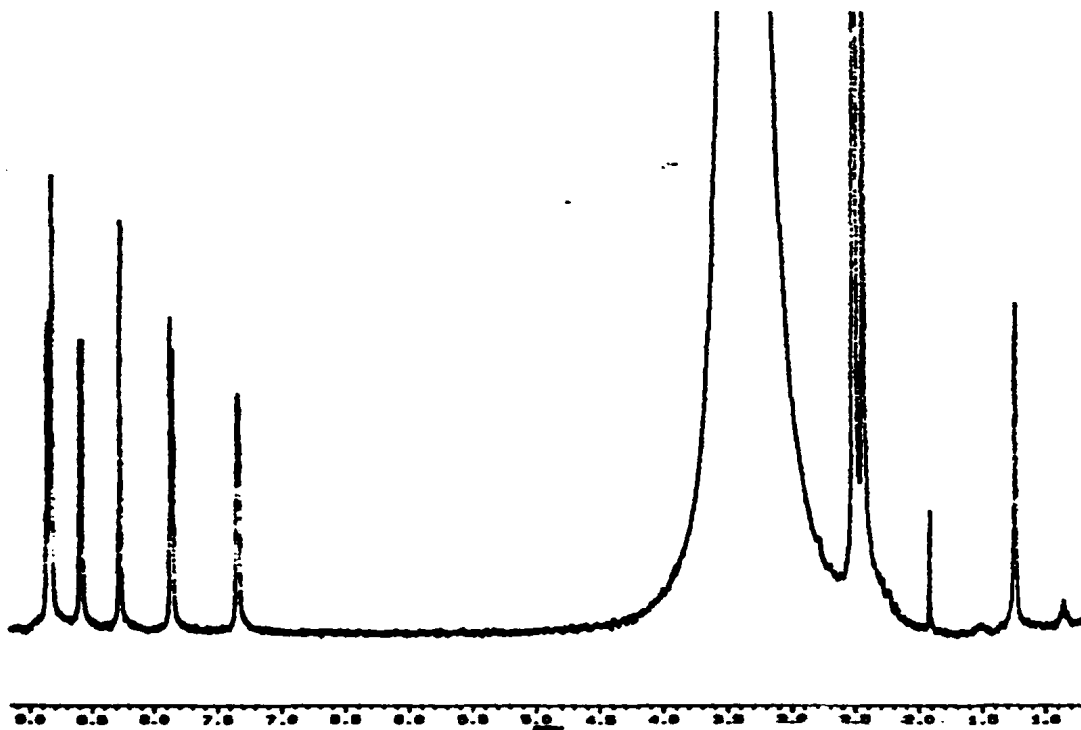


Π13. Φάσμα ^1H NMR 1D της *m*-H σε CDCl_3 .

^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 2,47 (4'- CH_3), 7,20 ($\text{H}5'$), 7,72 ($\text{H}5$), 8,28 ($\text{H}6'$), 8,58 ($\text{H}3'$), 8,83 ($\text{H}6$), 8,90 ($\text{H}3$) και 10,19 (4-CHO).

1.2. *m*-OH (4'-μεθυλ-2,2'-διυποριδυλο-4-καρβοξυλικό οξύ).

Σ.τ.: 271-272°.



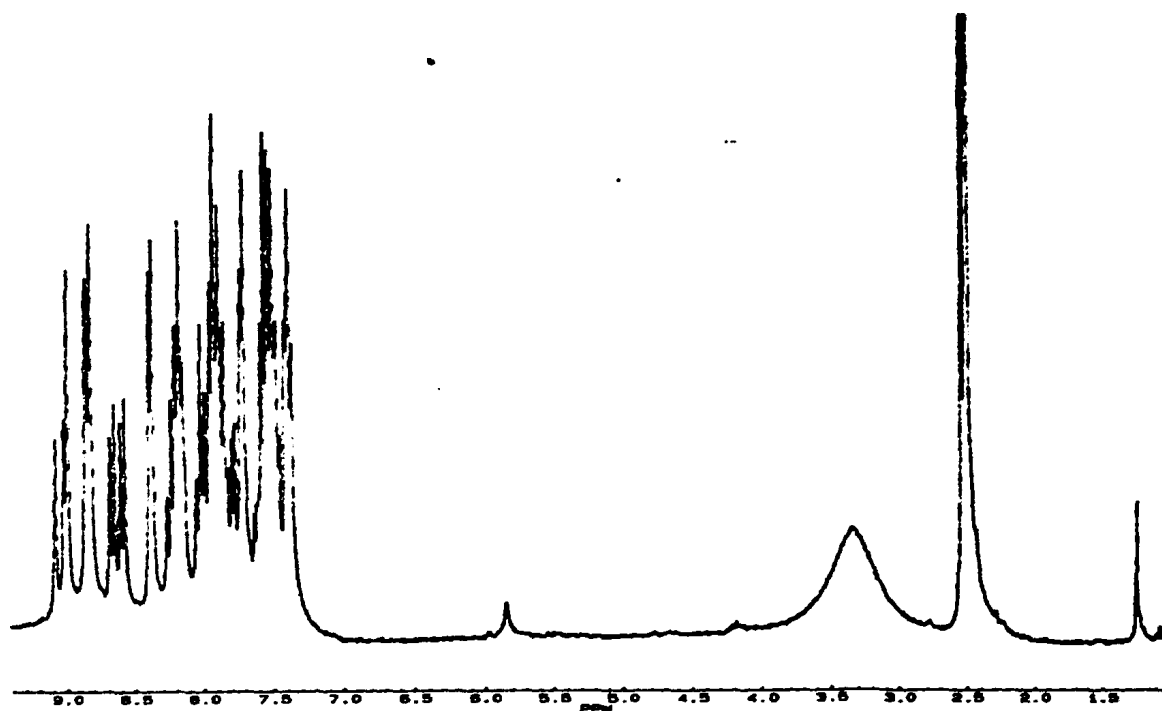
Π14. Φάσμα ^1H NMR 1D του *m*-OH σε d_6 -DMSO.

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ (ppm) 2,43 (4'-CH₃), 7,34 (H5'), 7,87 (H5), 8,27 (H6'), 8,59 (H3'), 8,84 (H6) και 8,87 (H3).

1.3. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-OH})](\text{PF}_6)_2$.

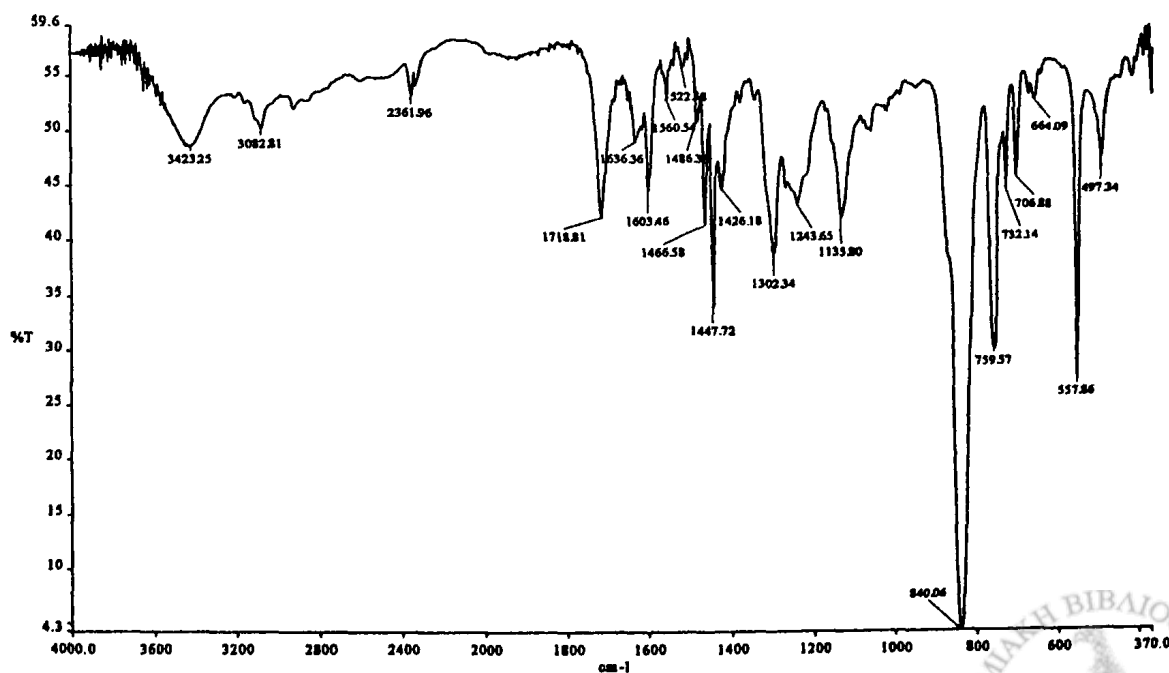


Π10 Παράρτημα III

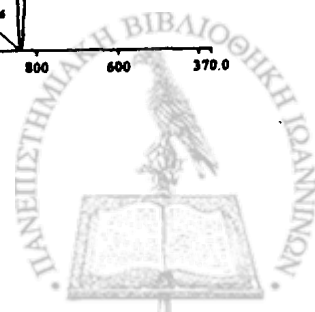


Π15. Φάσμα ^1H NMR 1D του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-OH})](\text{PF}_6)_2$ σε $d_6\text{-DMSO}$.

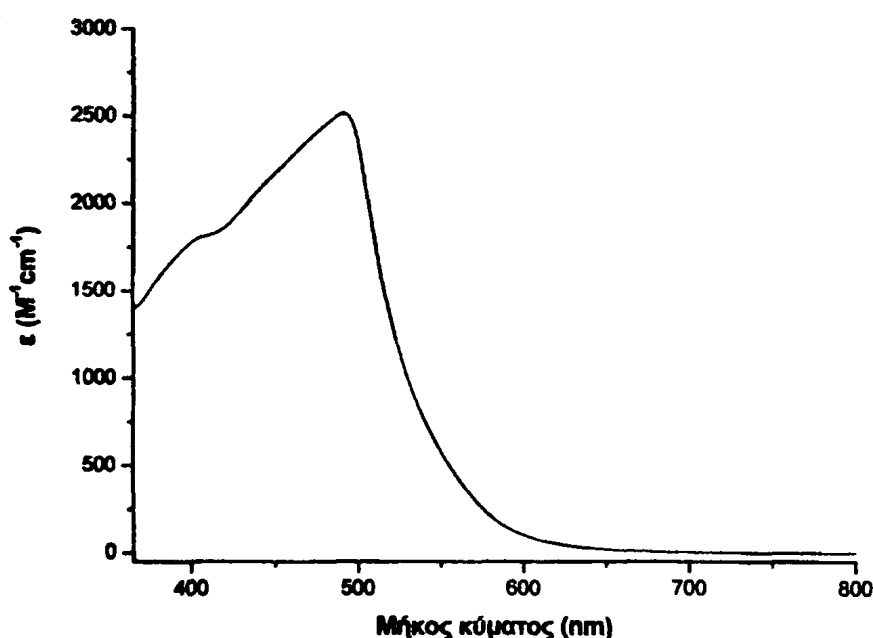
^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ (ppm) 2,50 ($4'\text{-CH}_3$), 7,36-7,60 ($\text{H}5'$ m και $\text{H}5'$ bpy), 7,72-8,05 ($\text{H}4'$ bpy, $\text{H}5$ bpy, $\text{H}6$ bpy και $\text{H}5$ και $\text{H}6$ m), 8,14-8,26 ($\text{H}4$ bpy και $\text{H}6'$ m), 8,38 ($\text{H}6'$ bpy), 8,57-8,68 ($\text{H}3'$ bpy), 8,84 ($\text{H}3$ m), 9,00 ($\text{H}3$ bpy) και 9,08 ($\text{H}3'$ m).



Π16. Φάσμα mid-IR του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-OH})](\text{PF}_6)_2$.



IR (KBr): ν (cm^{-1}) 3082: δόνηση τάσεως των αρωματικών C-H, 2917 και 2849: ασύμμετρη και συμμετρική, αντίστοιχα, δόνηση τάσεως της 4-CH₃, 1719: δόνηση τάσεως του C=O του 4'-COOH, 1636, 1603, 1486, 1466, 1447 και 1426: δονήσεις τάσεως των C-C και C-N των δακτυλίων (σκελετικές ταινίες), 1302: δόνηση τάσεως του C-O, 1243 και 1135: δονήσεις κάμψεως εντός επιπέδου των αρωματικών C-H, 840 και 759: δονήσεις κάμψεως εκτός επιπέδου των αρωματικών C-H.

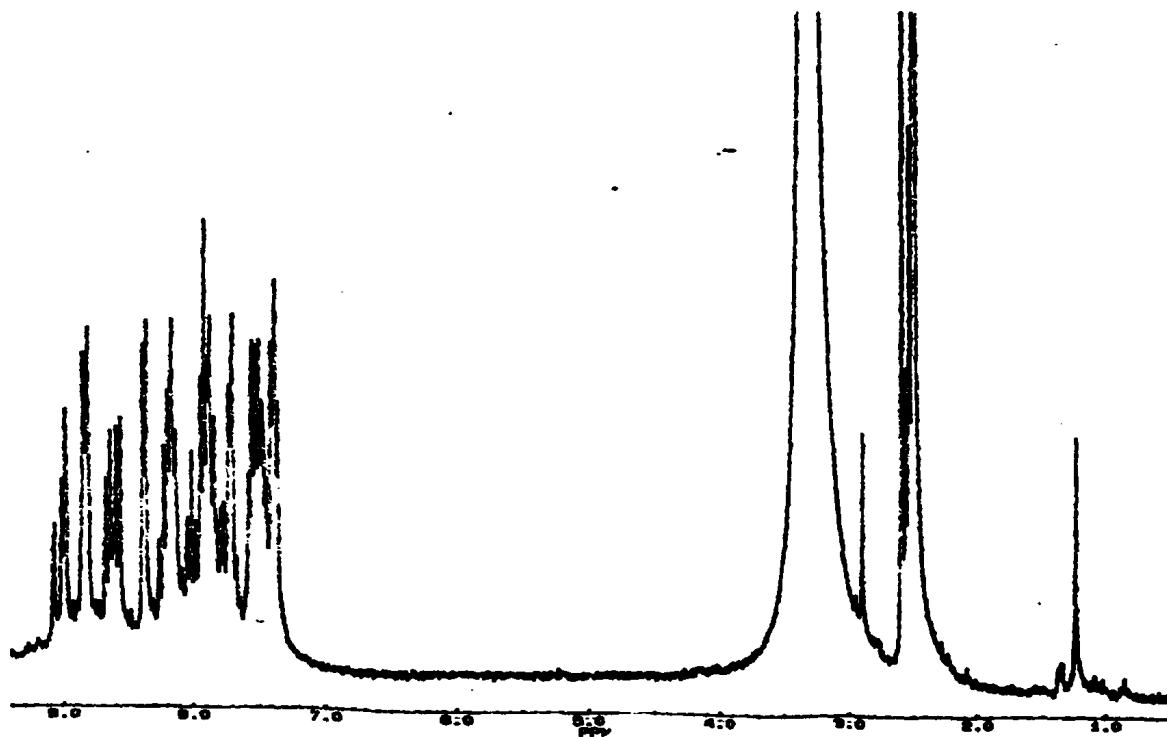


Π17. Φάσμα ορατό του $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]_2(\text{m-OH})](\text{PF}_6)_2$ σε DMSO.

Φάσμα ορατό (DMSO): λ (ϵ) 407sh ($1809 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 491 ($2510 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$):
Ταινίες MLCT.

Π12 Παράρτημα ΙΙΙ

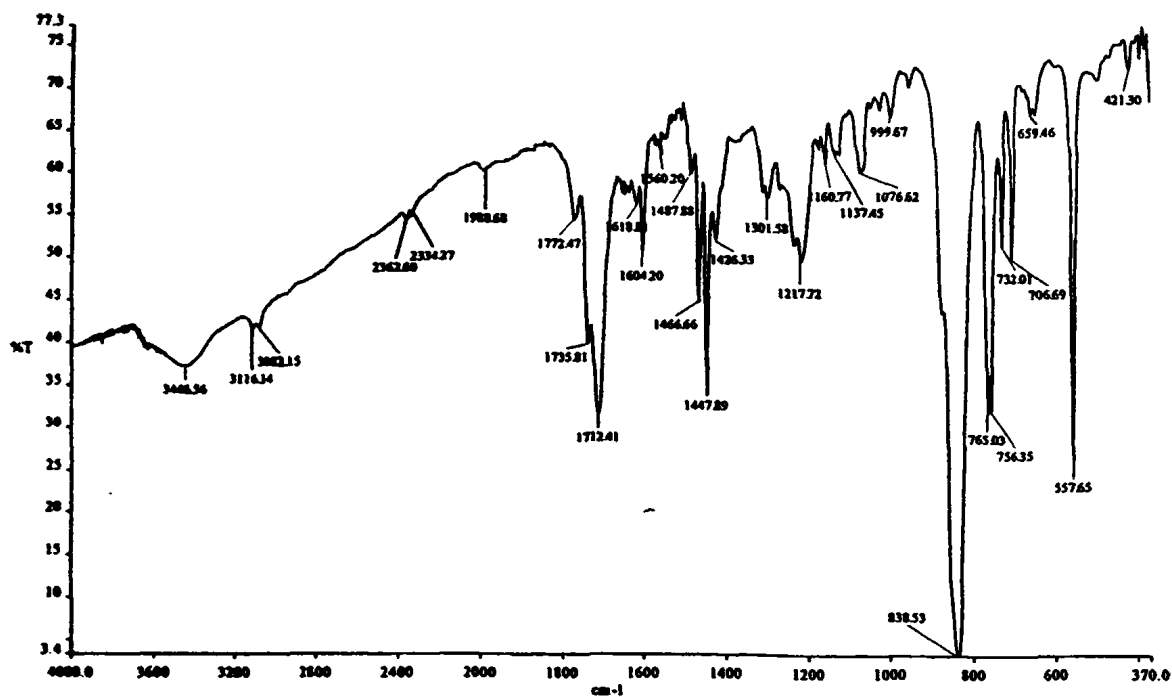
1.4. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-OSu})](\text{PF}_6)_2$ ($\text{m-OSu} = 1-(4'\text{-μεθυλ-2,2'\text{-διπυριδυλο-4-καρβονυλοξυ)-2,5-πυρρολιδινοδιονη}$).



Π18. Φάσμα ^1H NMR 1D του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-OSu})](\text{PF}_6)_2$ σε $d_6\text{-DMSO}$.

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ (ppm) 2,59 ($4'\text{-CH}_3$), 2,90 ($-\text{CH}_2 \text{ OSu}$), 7,35-7,55 ($\text{H5}'$ m και H5 bpy), 7,66-8,08 ($\text{H4}'$, H5 , H6 bpy και H5 και H6 m), 8,14-8,26 ($\text{H6}'$ m και H4 bpy), 8,38 ($\text{H6}'$ bpy), 8,57-8,68 ($\text{H3}'$ bpy), 8,84 (H3 m), 9,00 (H3 bpy) και 9,07 ($\text{H3}'$ m).



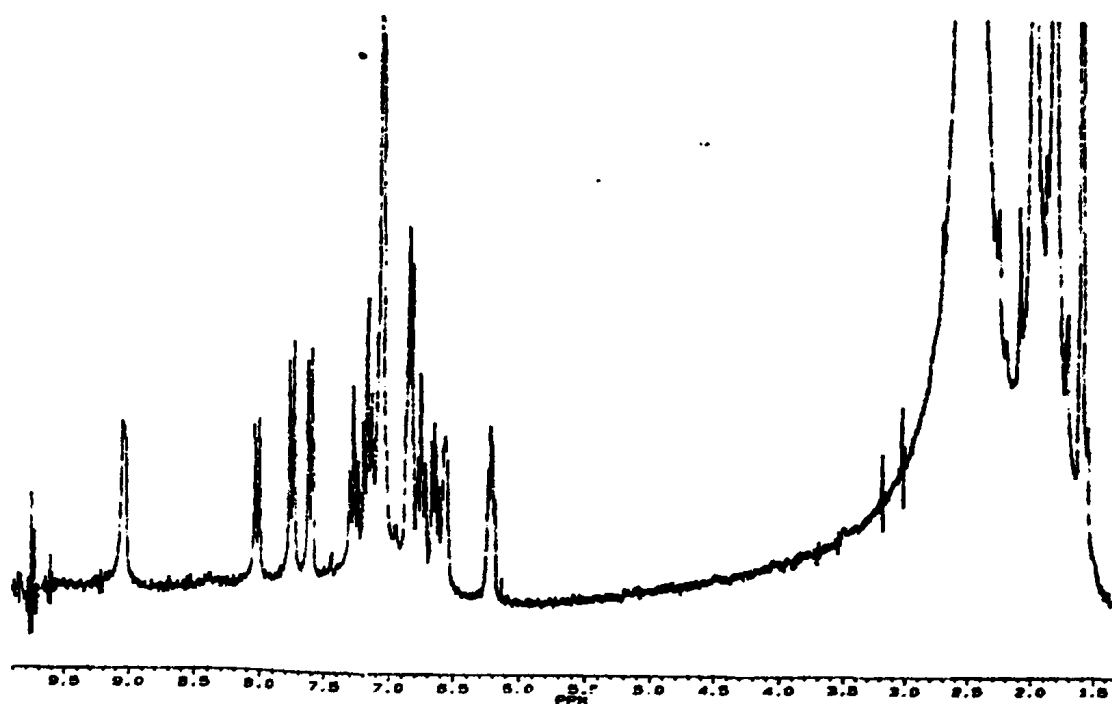


Π19. Φάσμα mid-IR του $[Ru(bpy)_2(m-OSu)](PF_6)_2$.

IR (KBr): ν (cm^{-1}) 3082: δόνηση τάσεως των αρωματικών C-H, 1772, 1736 και 1712: δονήσεις τάσεως των ομάδων C=O, 1619, 1604, 1488, 1467, 1447 και 1426: δονήσεις τάσεως των C-C και C-N του δακτυλίου (σκελετικές), 1302: ασύμμετρη δόνηση τάσεως του C-C(=O)-O του εστέρα, 1160: ασύμμετρη δόνηση του O-C-C του εστέρα, 1137: δόνηση κάμψεως εντός επιπέδου των αρωματικών C-H, 1076: δόνηση τάσεως του C-N, 838 και 765: δόνηση κάμψεως εκτός επιπέδου των αρωματικών C-H.

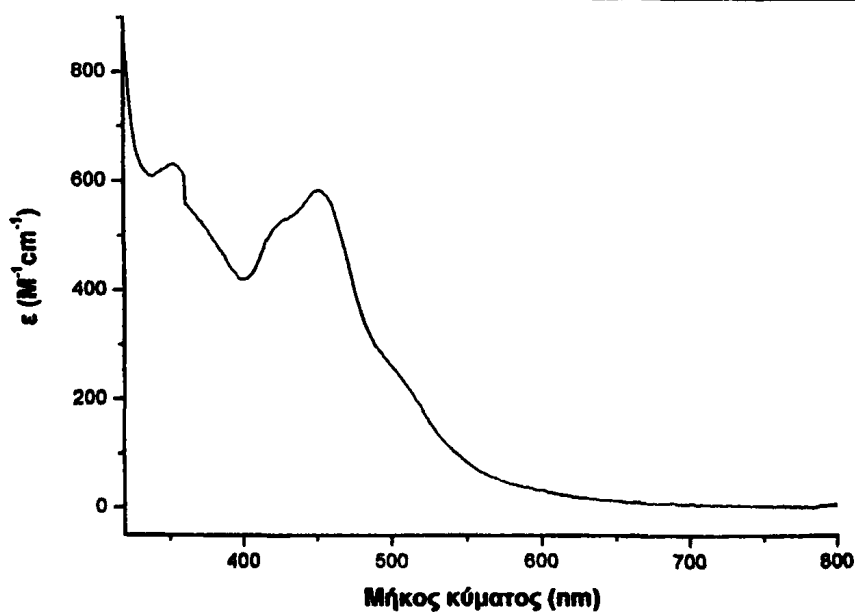
1.5. $cis-[Ru(bpy)_2Cl_2]$.





Π20. Φάσμα ^1H NMR 1D του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2](\text{PF}_6)_2$ σε $d_6\text{-DMSO}$.

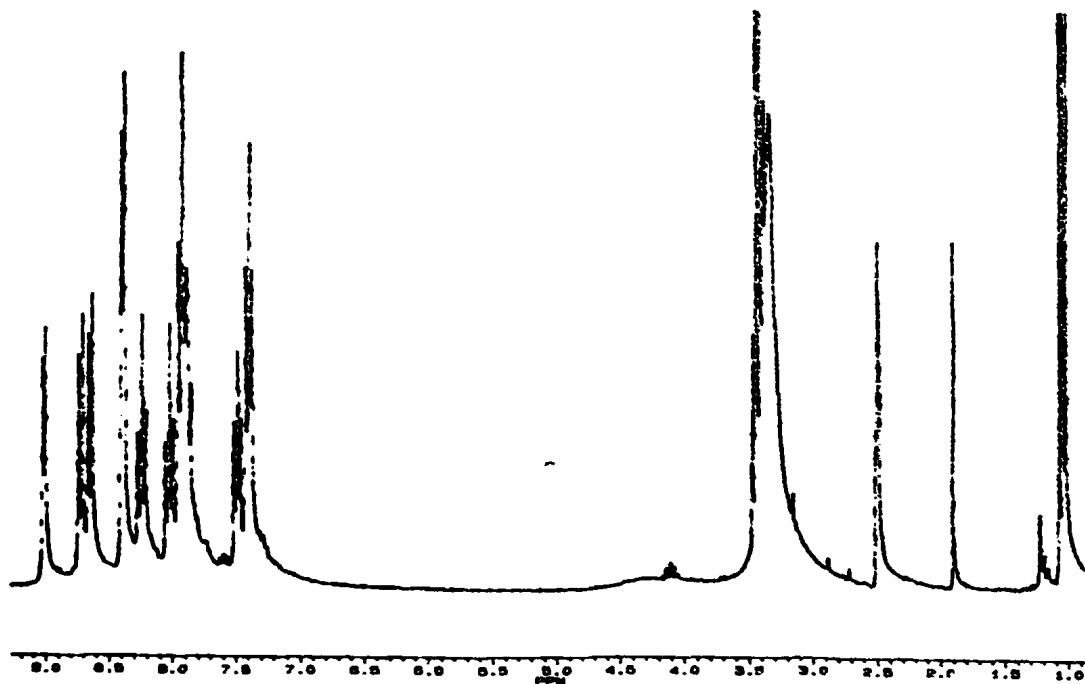
^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ (ppm) 7,10 (H5' bpy), 7,45 (H6' bpy), 7,54-7,76 (H4' bpy), 7,95 (H5 bpy), 7,95-8,19 (H4 bpy), 8,48-8,66 (H3' bpy), 8,91 (H3 bpy) και 9,93 (H6 bpy).



Π21. Φάσμα ορατού του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2](\text{PF}_6)_2$ σε H_2O .

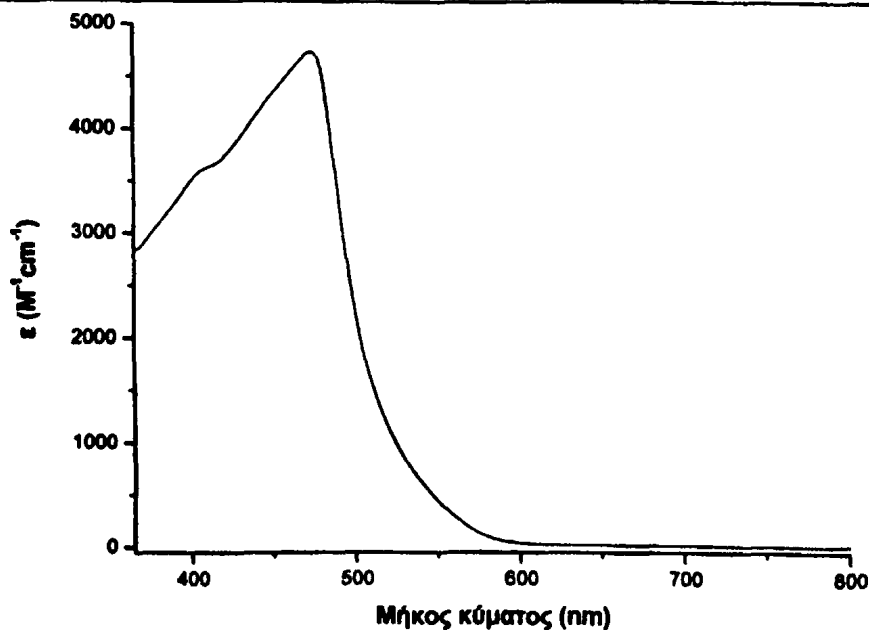
Φάσμα ορατού (H_2O): λ (ϵ) 353 ($633 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): μετάπτωση d-d, 428sh ($535 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) και 451 ($588 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): ταινίες MLCT.

1.6. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2]\text{Cl}_2$.



Π22. Φάσμα ^1H NMR 1D του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2](\text{PF}_6)_2$ σε $d_6\text{-DMSO}$.

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ (ppm) 7,38 (H5' bpy), 7,48 (H5 py) 7,85-7,94 (H4 και H5 py, H4,4' bpy), 8,02 (H6 py), 8,23 (H3 py), 8,38 (H6,6' bpy), 8,60-8,71 (H3' bpy) και 9,00 (H3 bpy).



Π23. Φάσμα ορατού του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2](\text{PF}_6)_2$ σε H_2O .

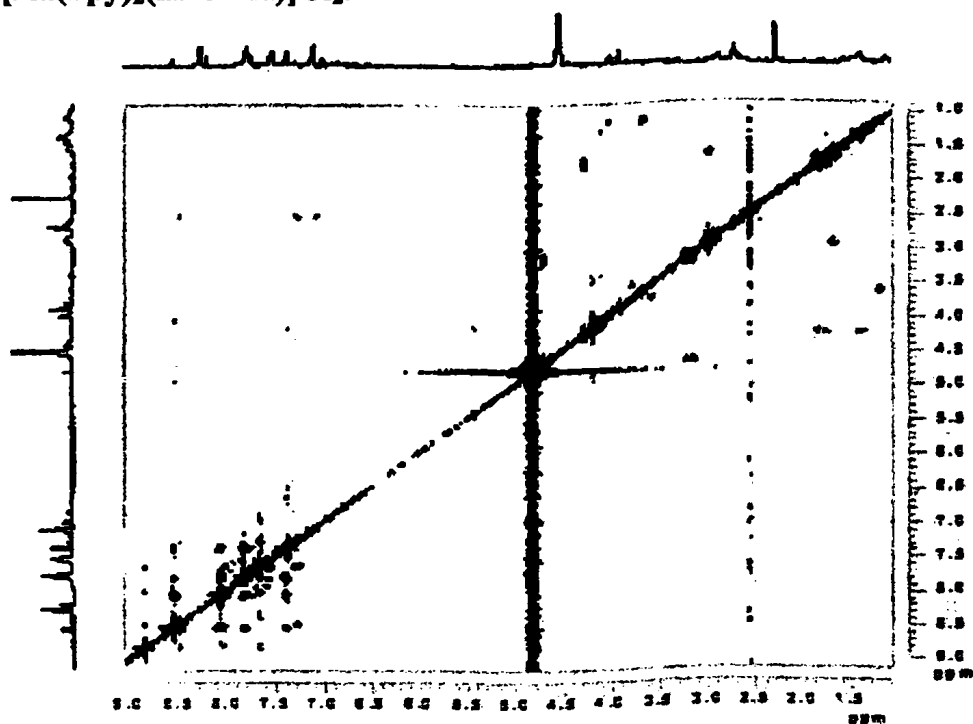
Φάσμα ορατού (H_2O): λ (ϵ) 409sh ($3614 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 474 ($4739 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): Ταινίες MLCT.



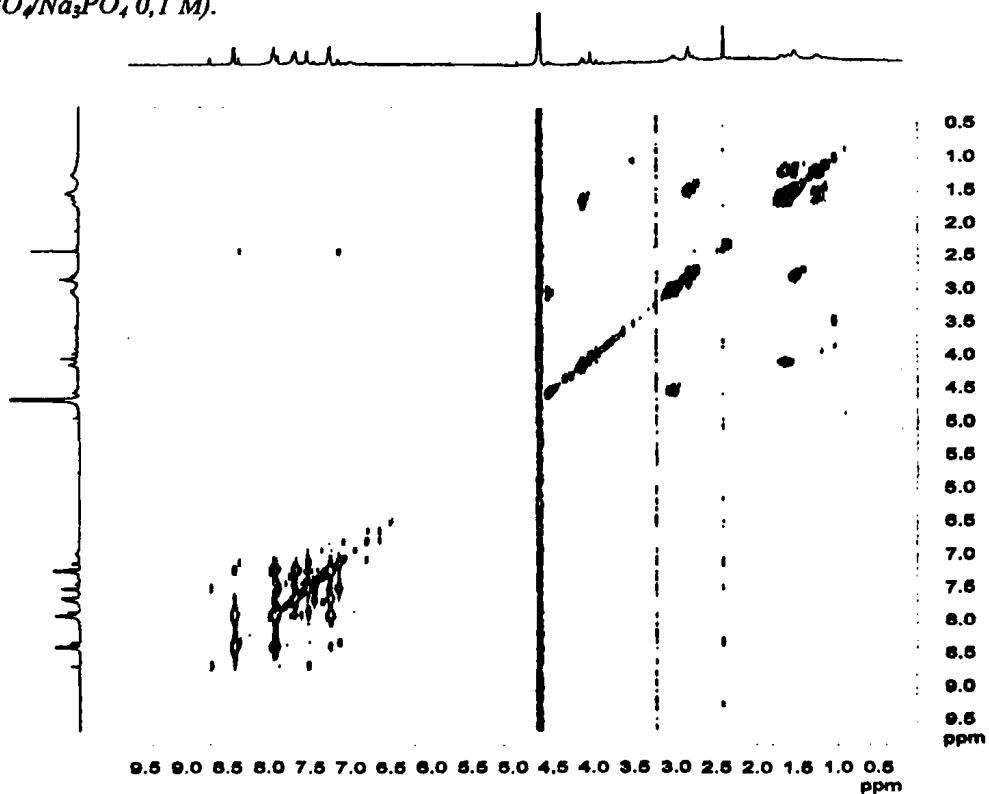
Π16 Παράρτημα III

2. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων.

2.1. Λ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂.

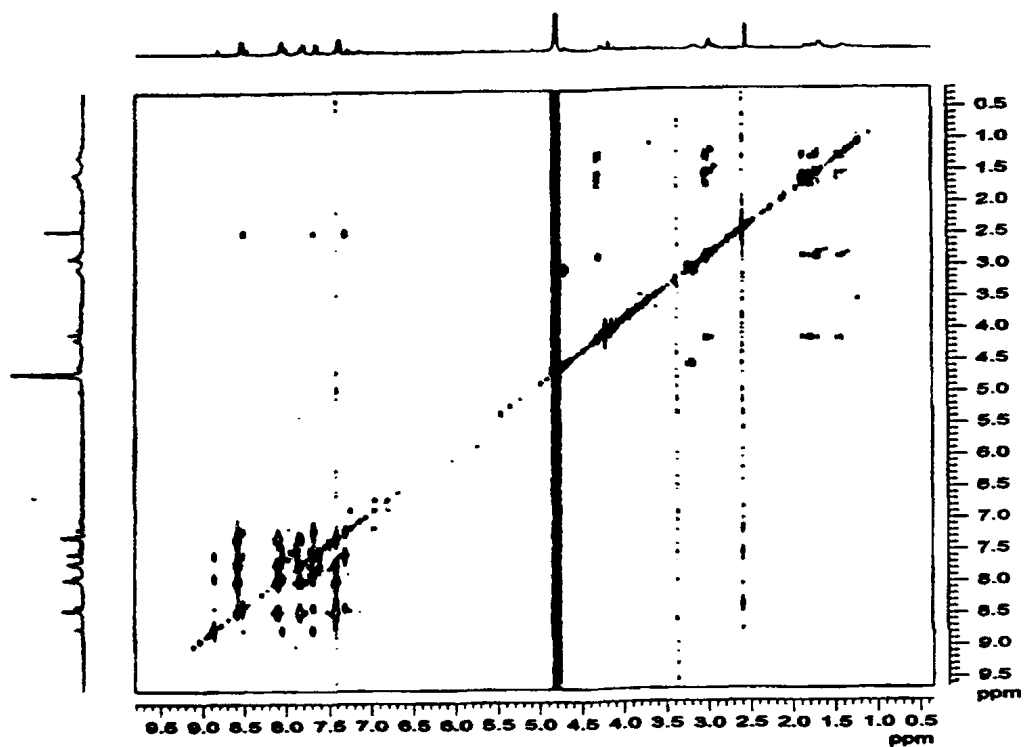


Σχήμα Π24. Φάσμα ¹H NMR 2D NOESY (τ_m=400 ms) του Λ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ σε D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).



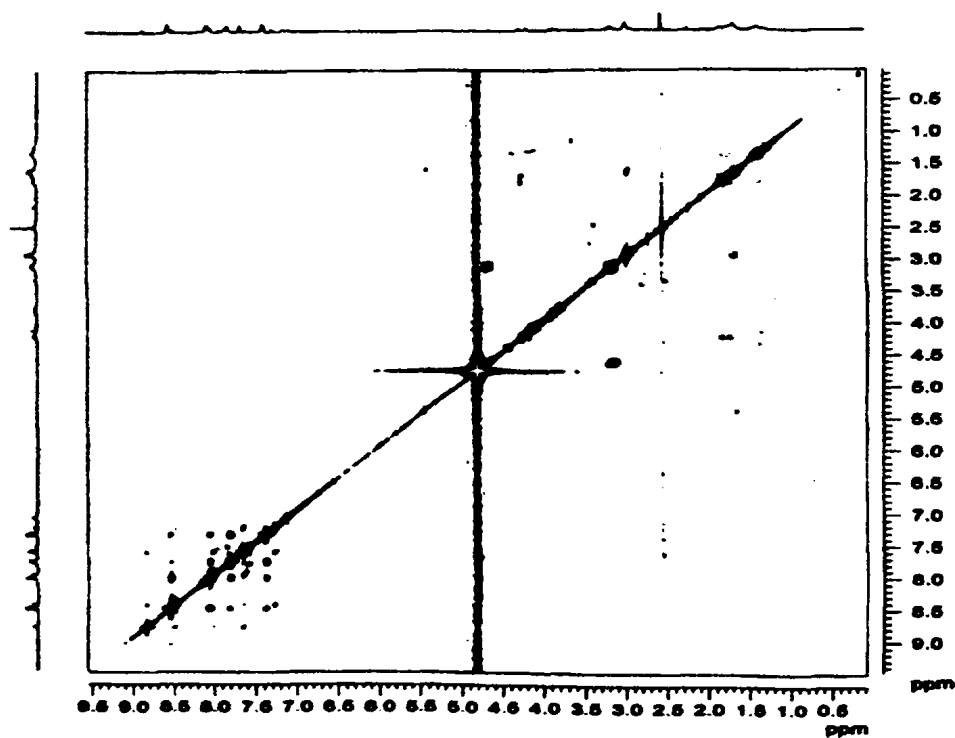
Σχήμα Π25. Φάσμα ¹H NMR 2D DQF COSY του Λ-[Ru(bpy)₂(m-GHK)]Cl₂ σε D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).



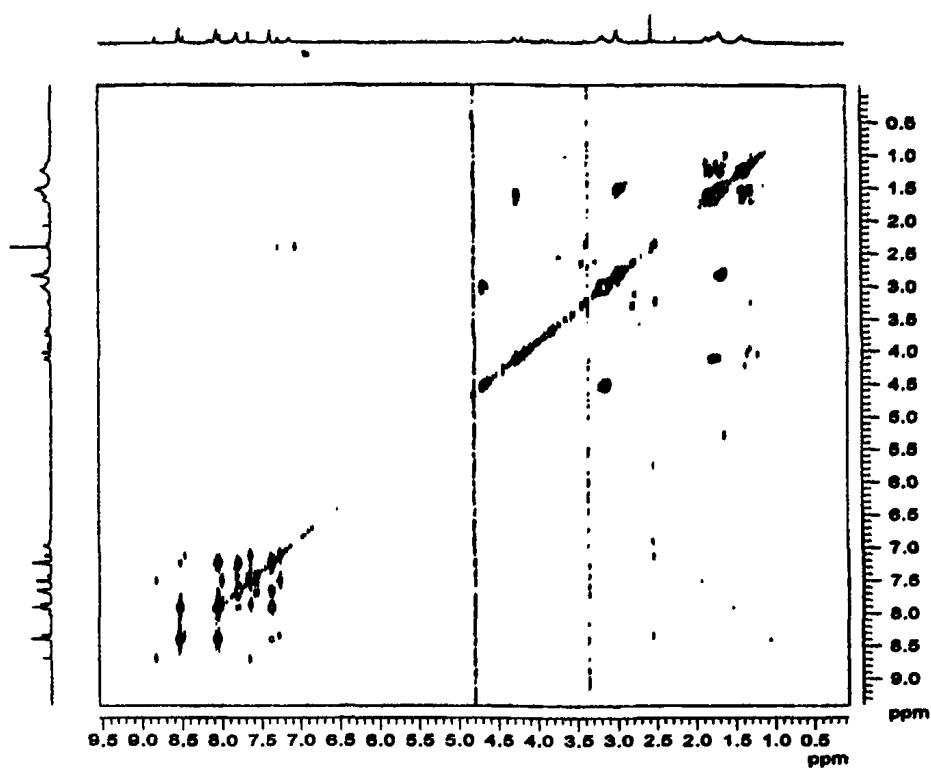


Σχήμα Π26. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY του $\Delta\text{-[Ru(bpy)}_2\text{(m-GHK)]Cl}_2$ σε D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).

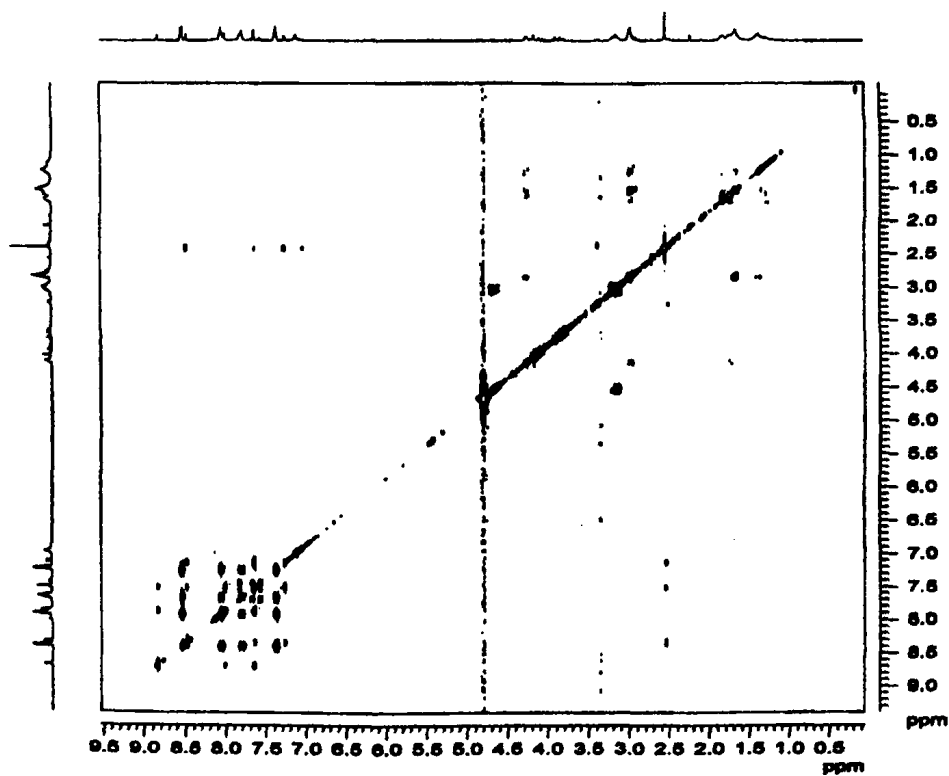
2.2. $\Delta\text{-[Ru(bpy)}_2\text{(m-GHK)]Cl}_2$.



Σχήμα Π27. Φάσμα ^1H NMR 2D NOESY ($\tau_m=400$ ms) του $\Delta\text{-[Ru(bpy)}_2\text{(m-GHK)]Cl}_2$ σε D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).

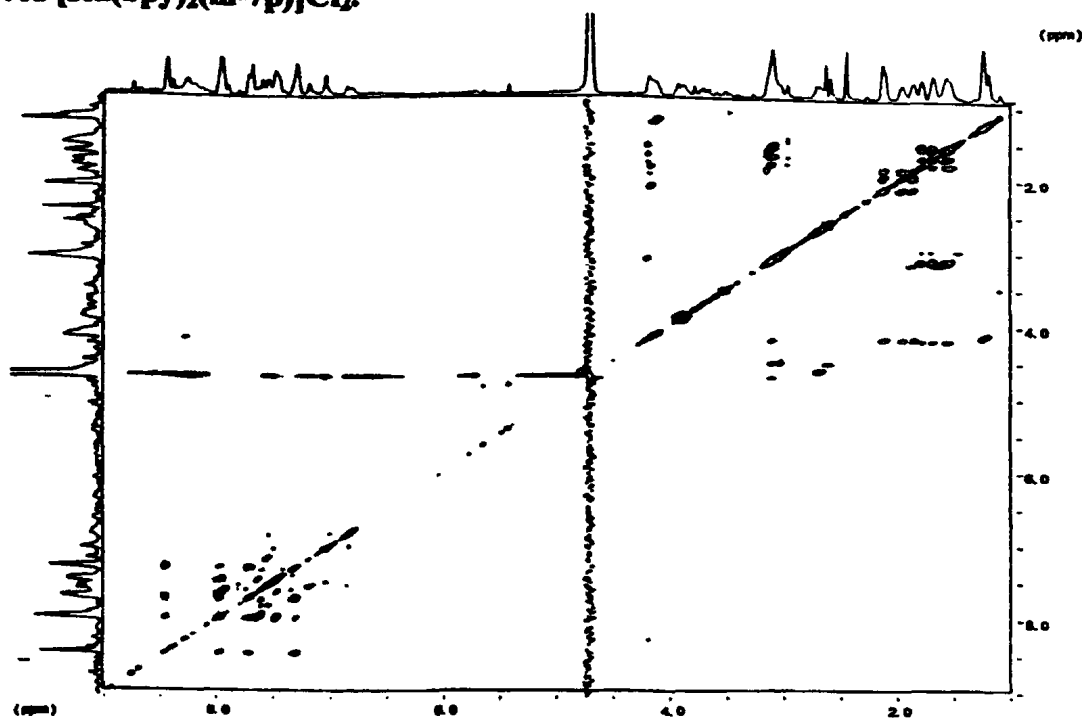


Σχήμα Π28. Φάσμα ^1H NMR 2D DQF COSY του $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2$ σε D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$, $0,1\text{ M}$).



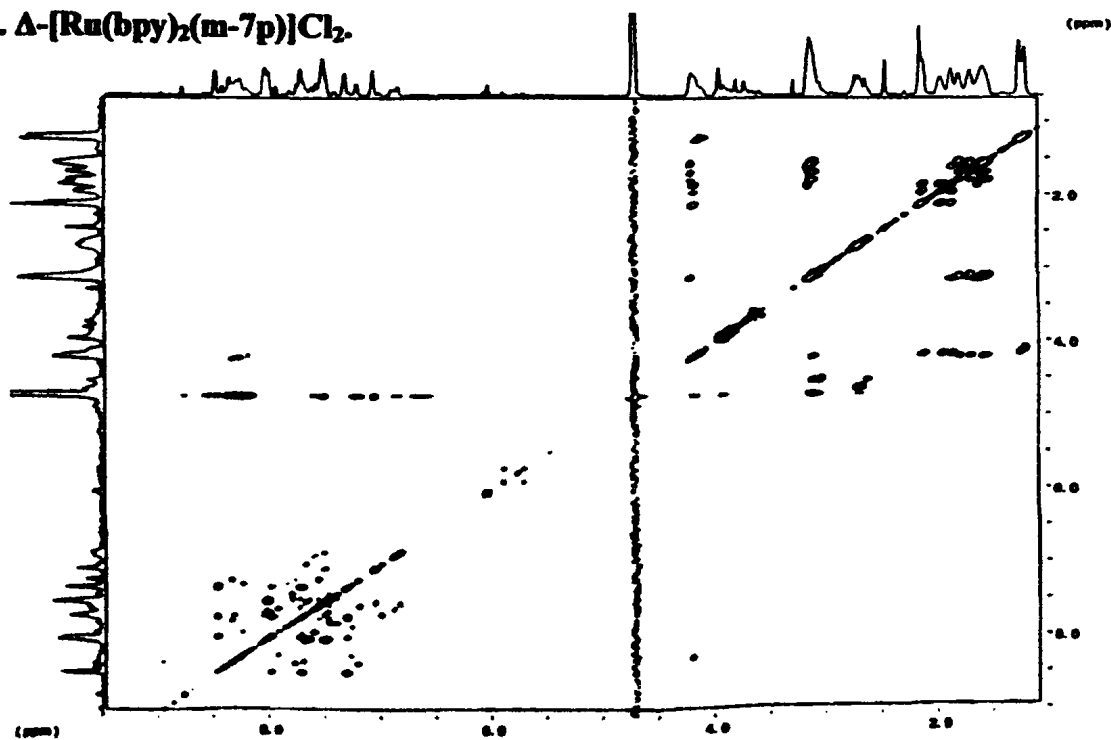
Σχήμα Π29. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY του $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]\text{Cl}_2$ σε D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$, $0,1\text{ M}$).

2.3. Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂.



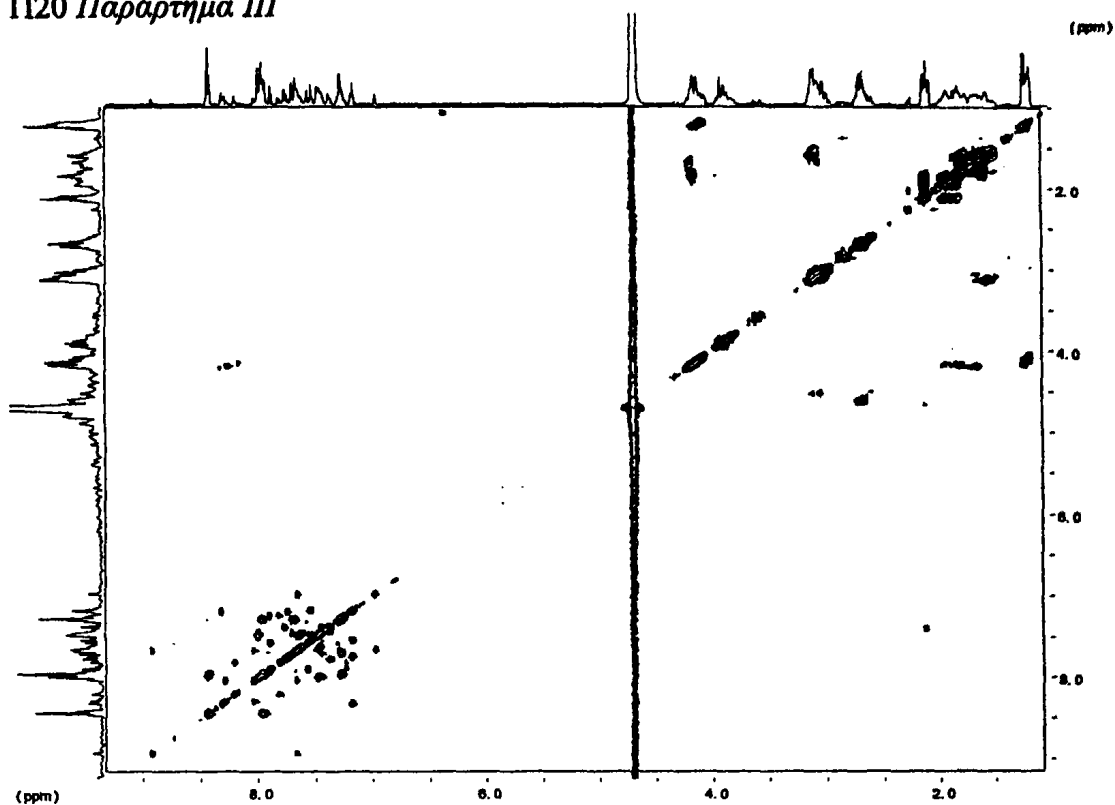
Σχήμα Π30. Φάσμα ¹H NMR 2D TOCSY (65 ms) του Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂ σε D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).

2.4. Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂.

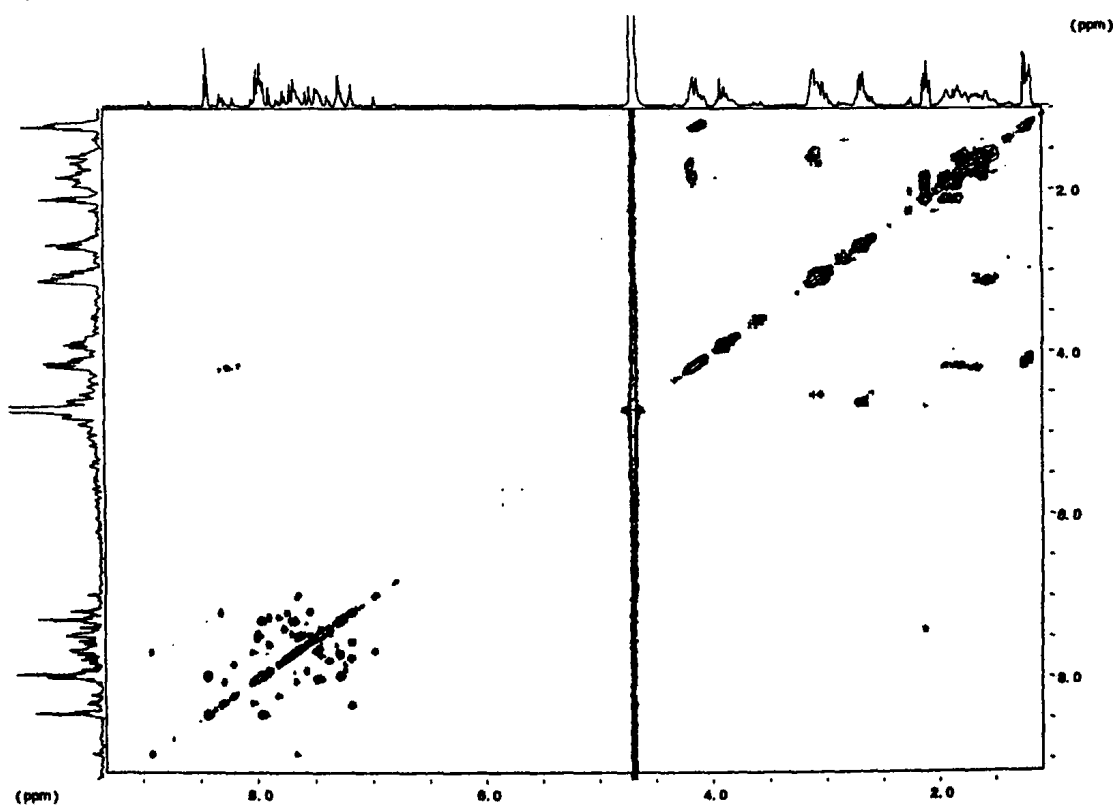


Σχήμα Π31. Φάσμα ¹H NMR 2D TOCSY (65 ms) του Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]Cl₂ σε D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).





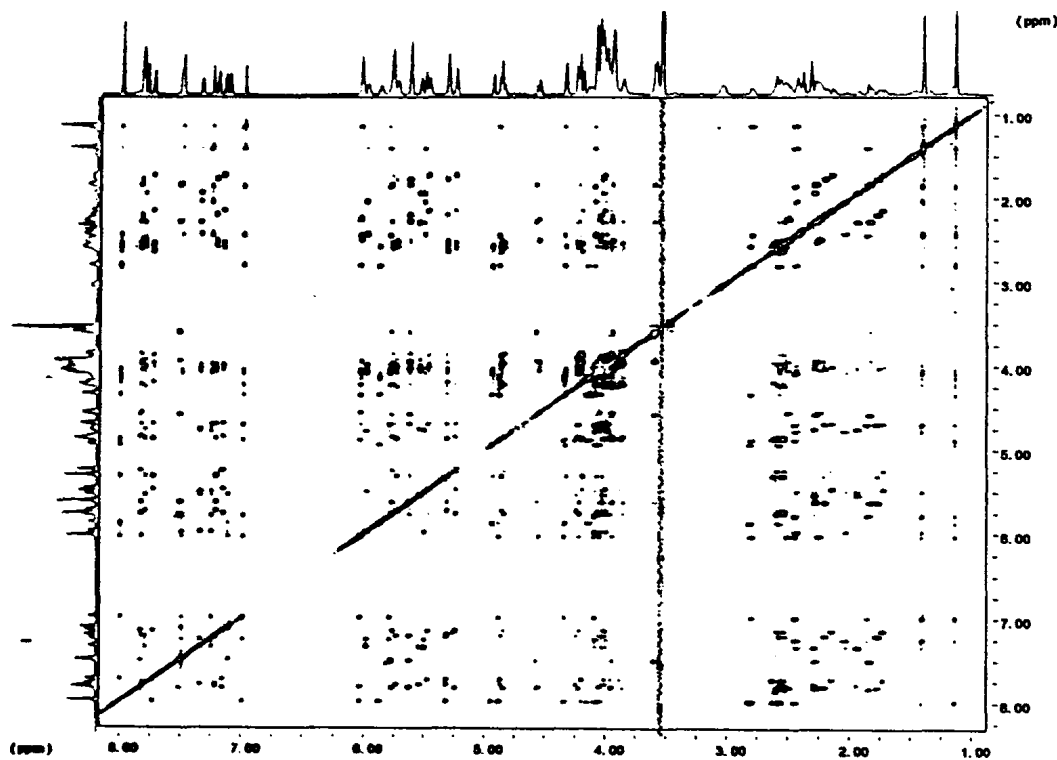
Σχήμα Π32. Φάσμα ^1H NMR 2D DQF COSY του $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]\text{Cl}_2$ σε D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).



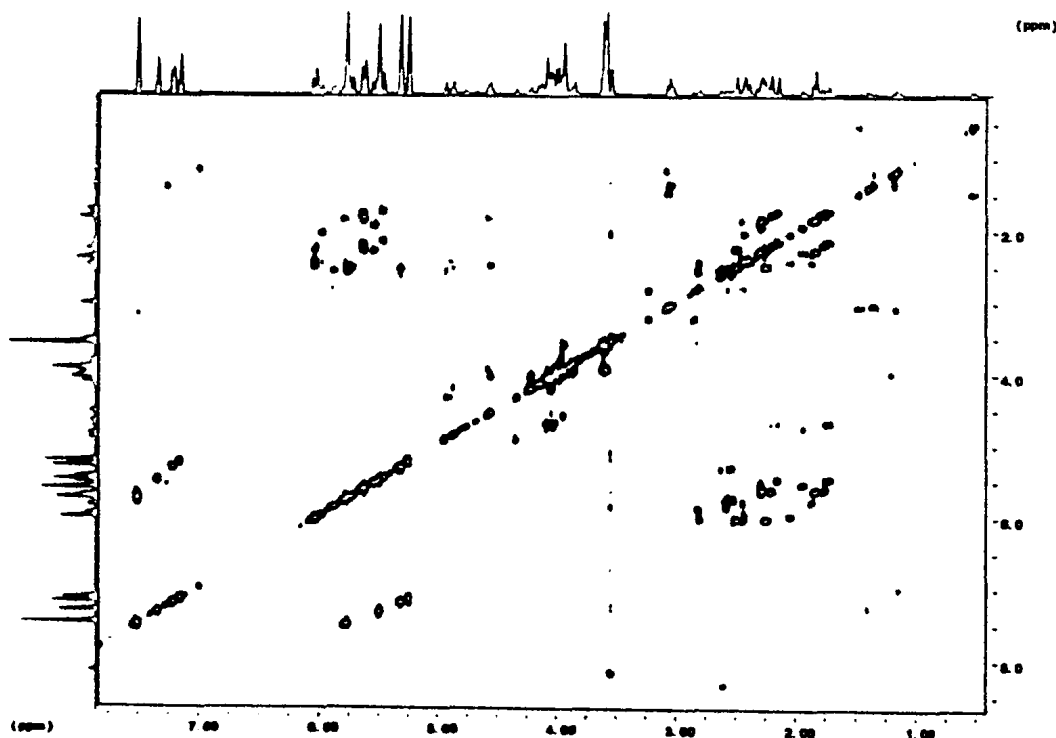
Σχήμα Π33. Φάσμα ^1H NMR 2D ROESY ($\tau_m=350$ ms) του $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]\text{Cl}_2$ σε D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).

3. Χαρακτηρισμός των ολιγονουκλεοτιδίων.

3.1. $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$.

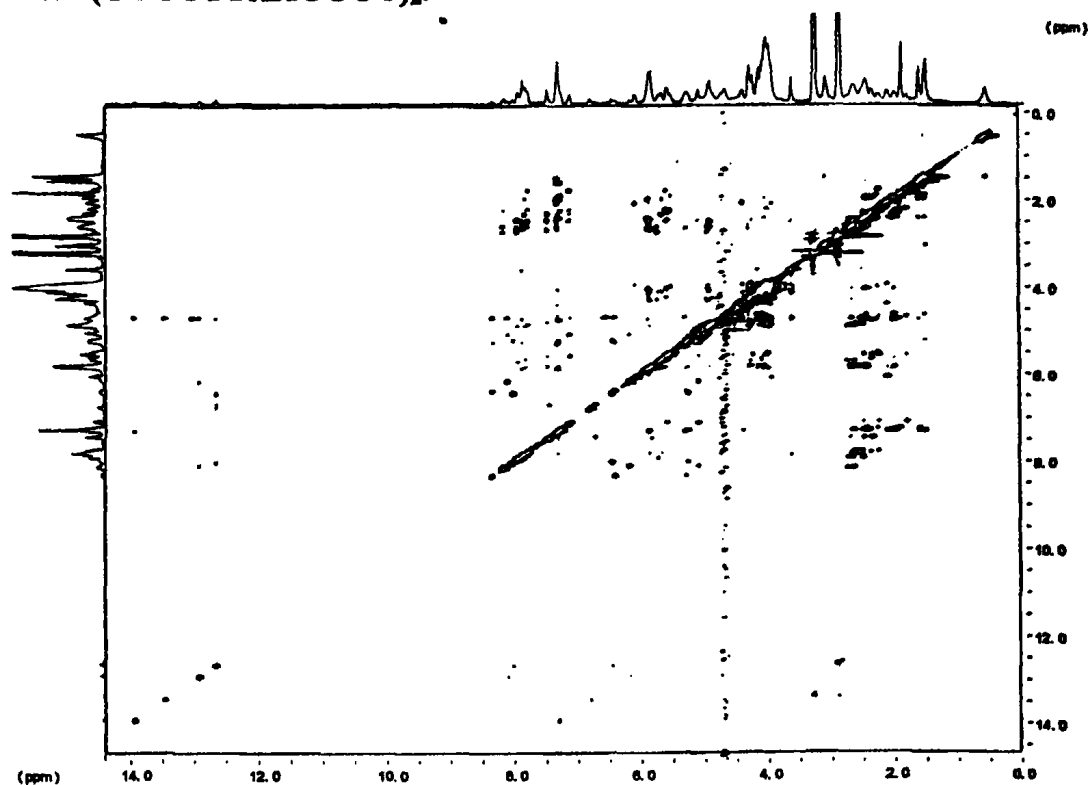


Σχήμα Π34. Φάσμα ^1H NMR 2D NOESY ($\tau_m=400$ ms) του $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ σε D_2O ($\text{pD}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{PO}_4$ 0,1 M).

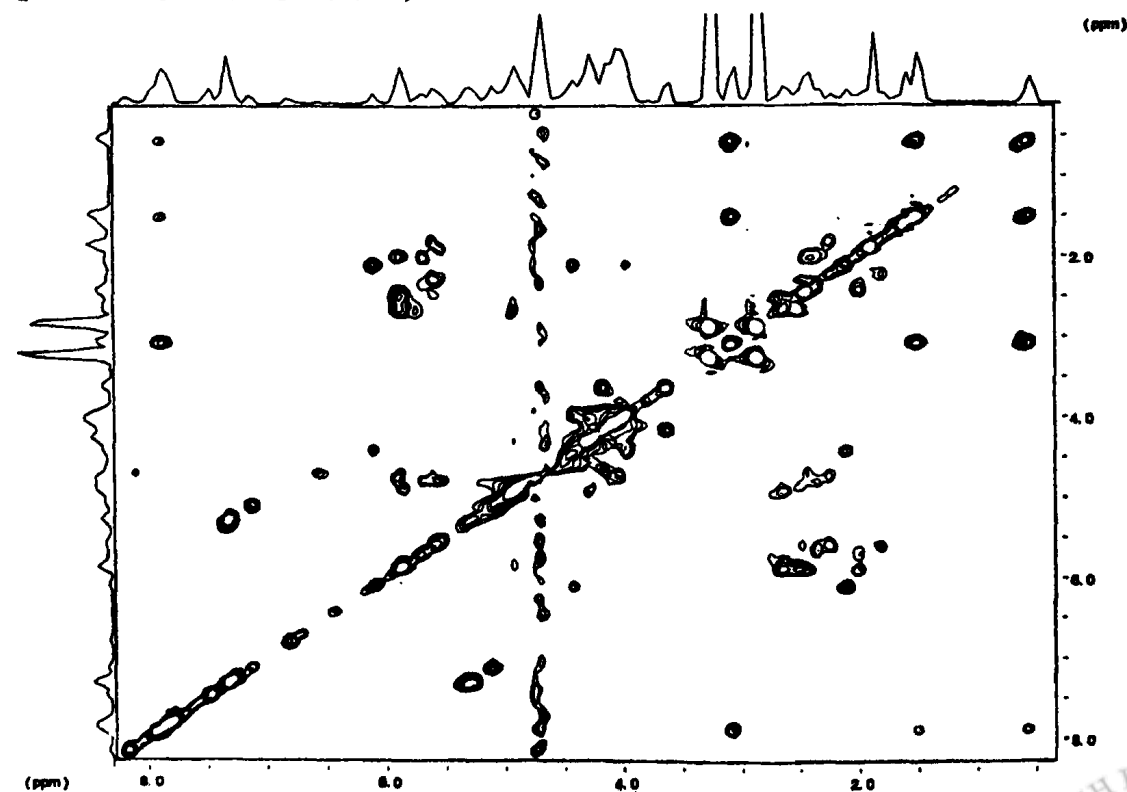


Σχήμα Π35. Φάσμα ^1H NMR 2D NOESY ($\tau_m=400$ ms) του $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ σε D_2O ($\text{pD}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{PO}_4$ 0,1 M).

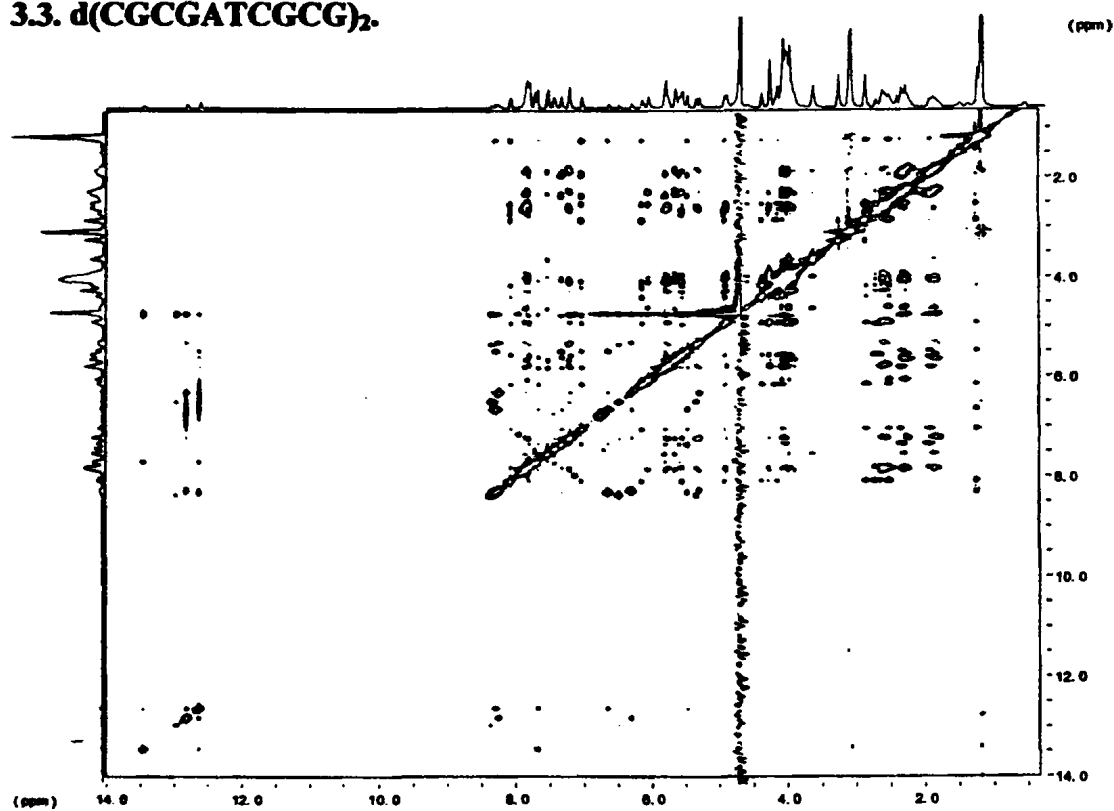
3.2. $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$.



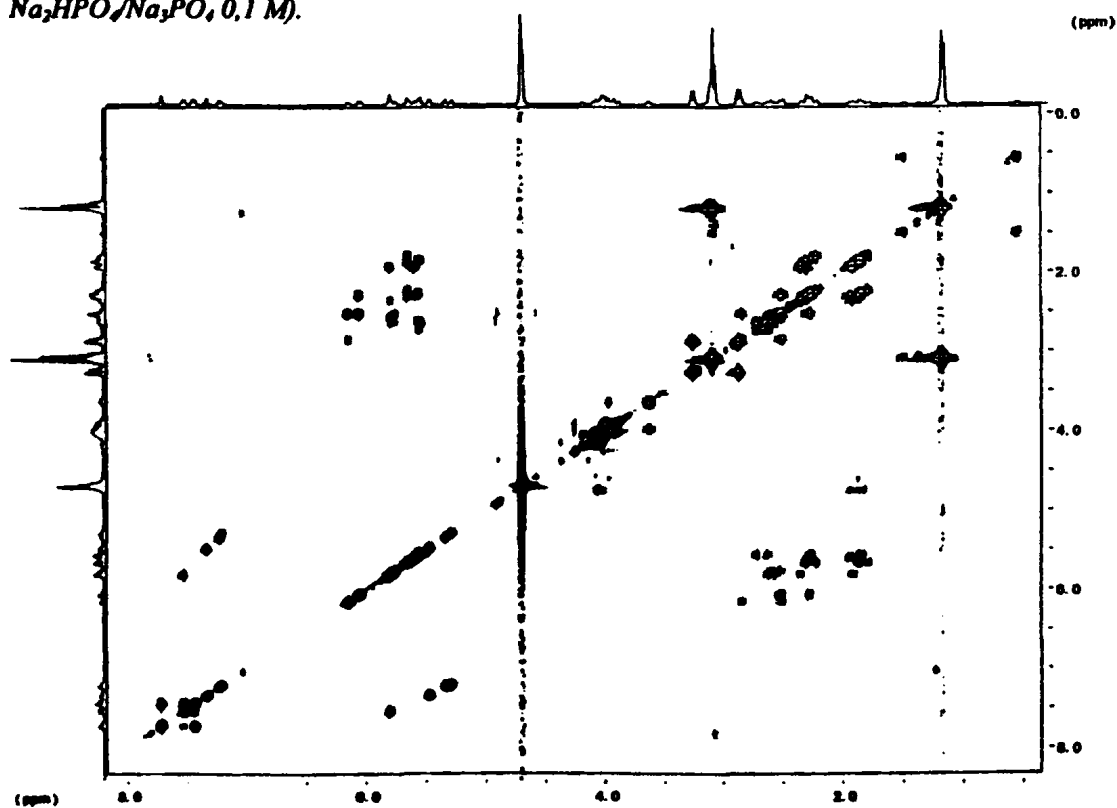
Σχήμα Π36. Φάσμα ^1H NMR 2D NOESY ($\tau_m=250$ ms) του $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$ σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).



Σχήμα Π37. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=250$ ms) του $d(\text{GCGCTTAAGCGC})_2$ σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).

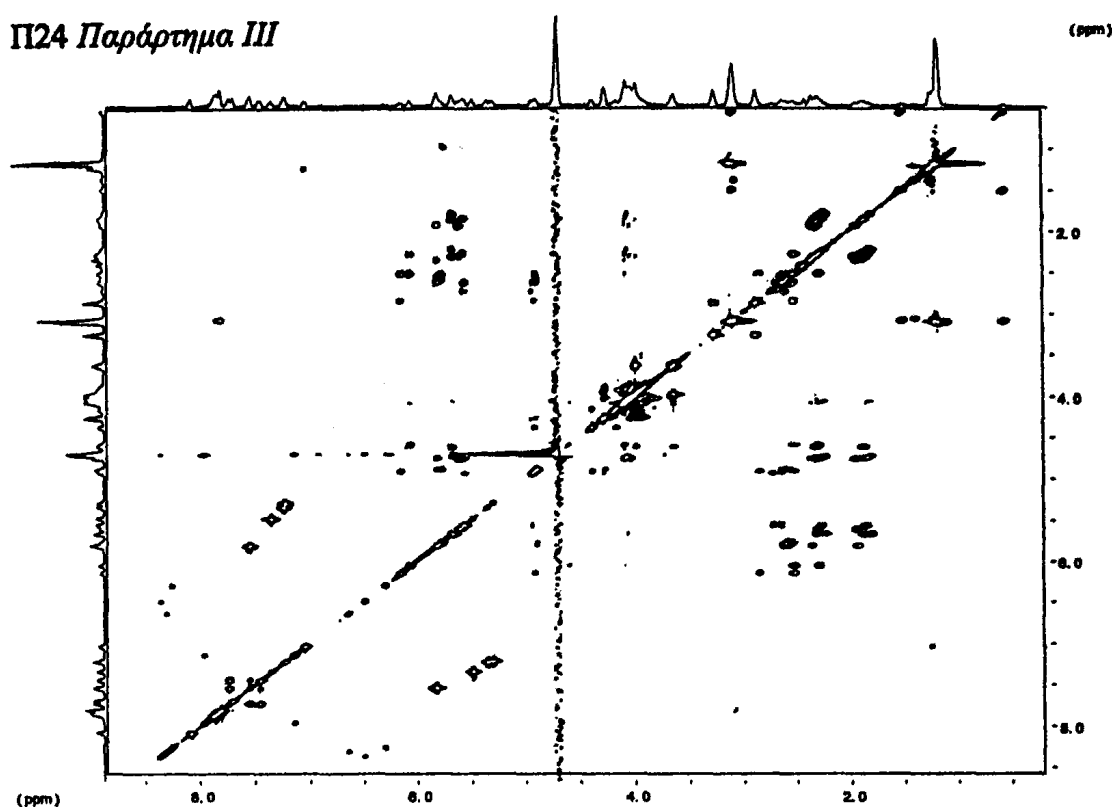
3.3. $d(\text{CGCGATCGCG})_2$.

Σχήμα Π38. Φάσμα ^1H NMR 2D NOESY ($\tau_m=250$ ms) του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (pH=7,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{PO}_4$ 0,1 M).



Σχήμα Π39. Φάσμα ^1H NMR 2D DQF COSY του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (pH=7,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_2\text{PO}_4$ 0,1 M).

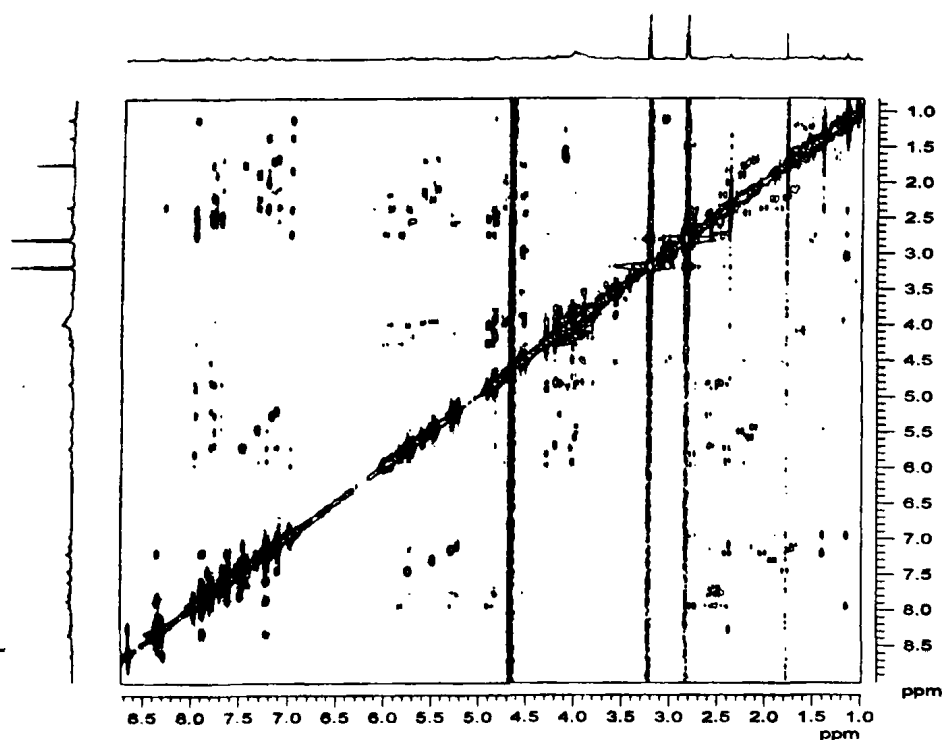




Σχήμα Π40. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ σε 90% H_2O /10% D_2O (pH=7,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).

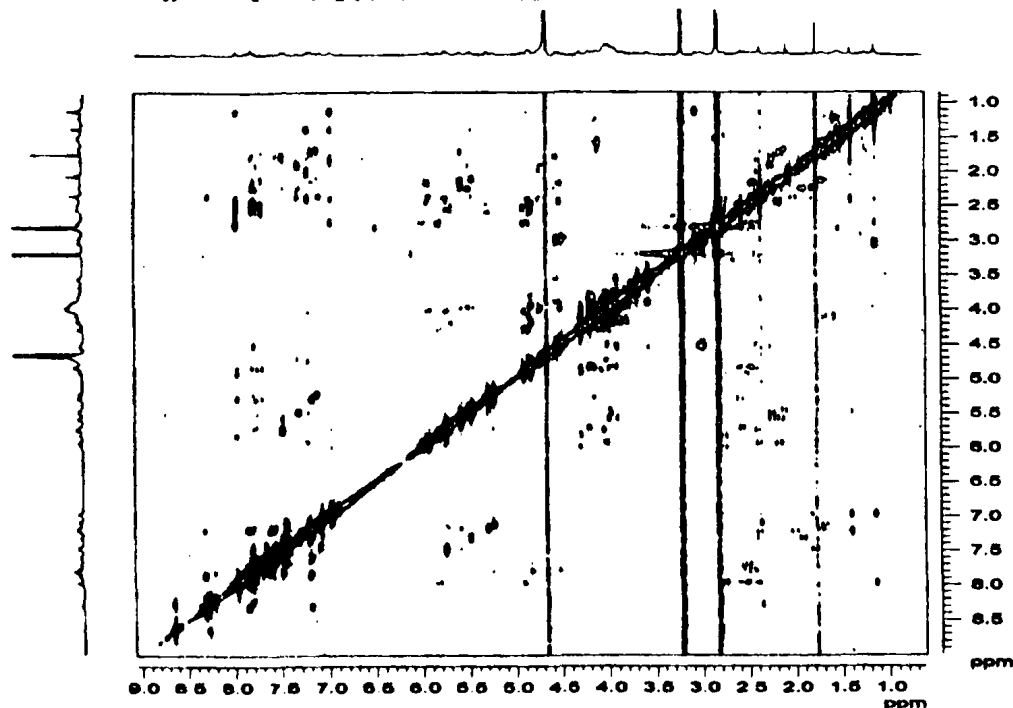
4. Αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων με ολιγονουκλεοτίδια.

4.1. Το σύστημα Λ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺-d(CGCGAATTCGCG)₂.



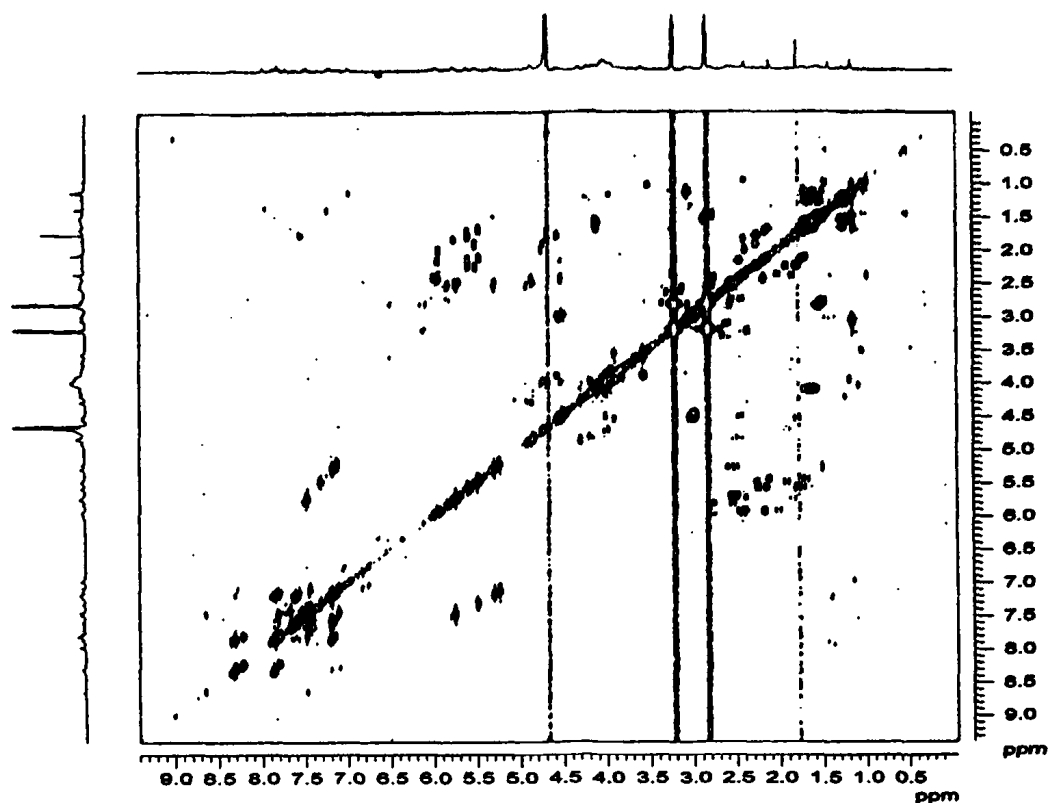
Σχήμα Π41. Φάσμα ¹H NMR 2D NOESY (τ_m=400 ms) του συστήματος Λ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺-d(CGCGAATTCGCG)₂ 1:1 σε 90% H₂O/10% D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).

4.2. Το σύστημα Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺-d(CGCGAATTCGCG)₂.



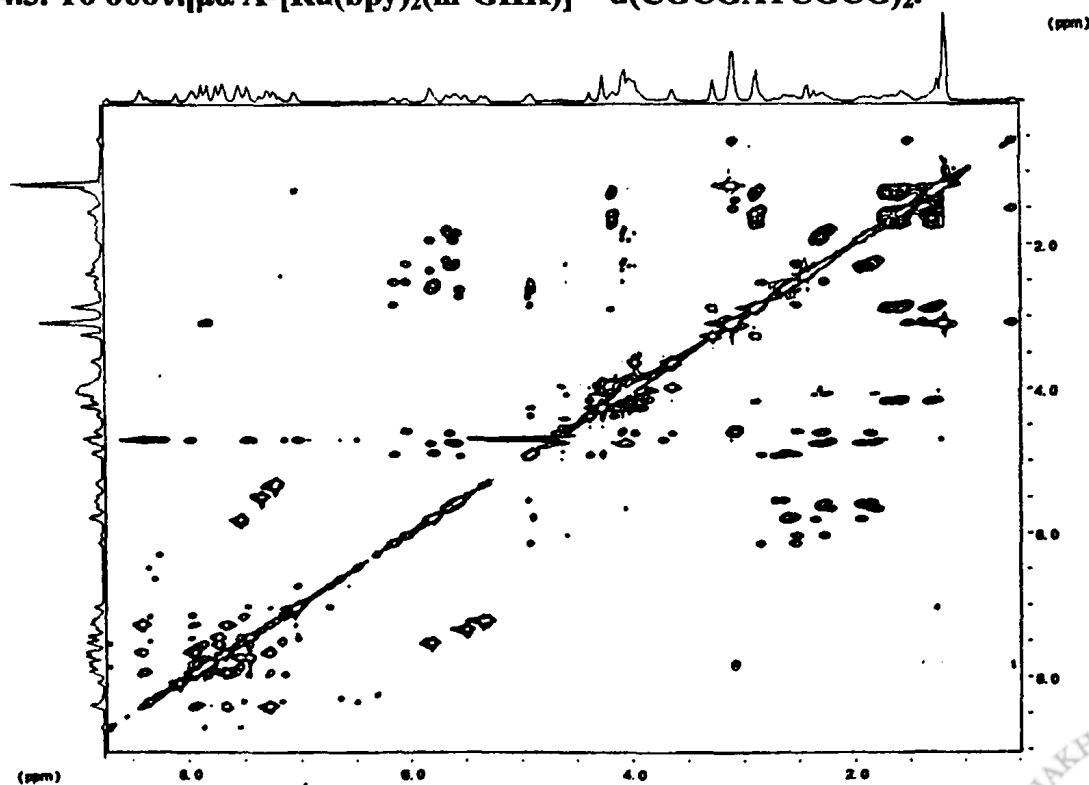
Σχήμα Π42. Φάσμα ¹H NMR 2D NOESY (τ_m=400 ms) του συστήματος Δ -[Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺-d(CGCGAATTCGCG)₂ 1:1 σε 90% H₂O/10% D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).



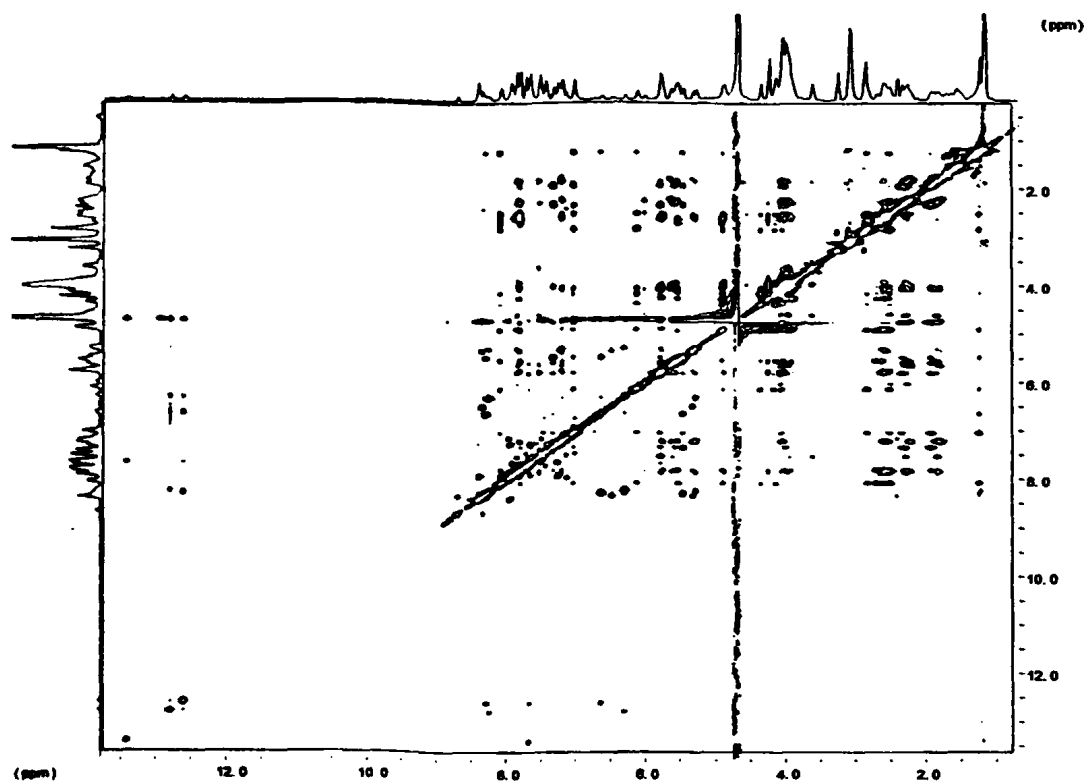


Σχήμα Π43. Φάσμα ^1H NMR 2D DQF COSY του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}\text{-d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ 1:1 σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).

4.3. Το σύστημα $\Lambda\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}\text{-d}(\text{CGCGATCGCG})_2$.

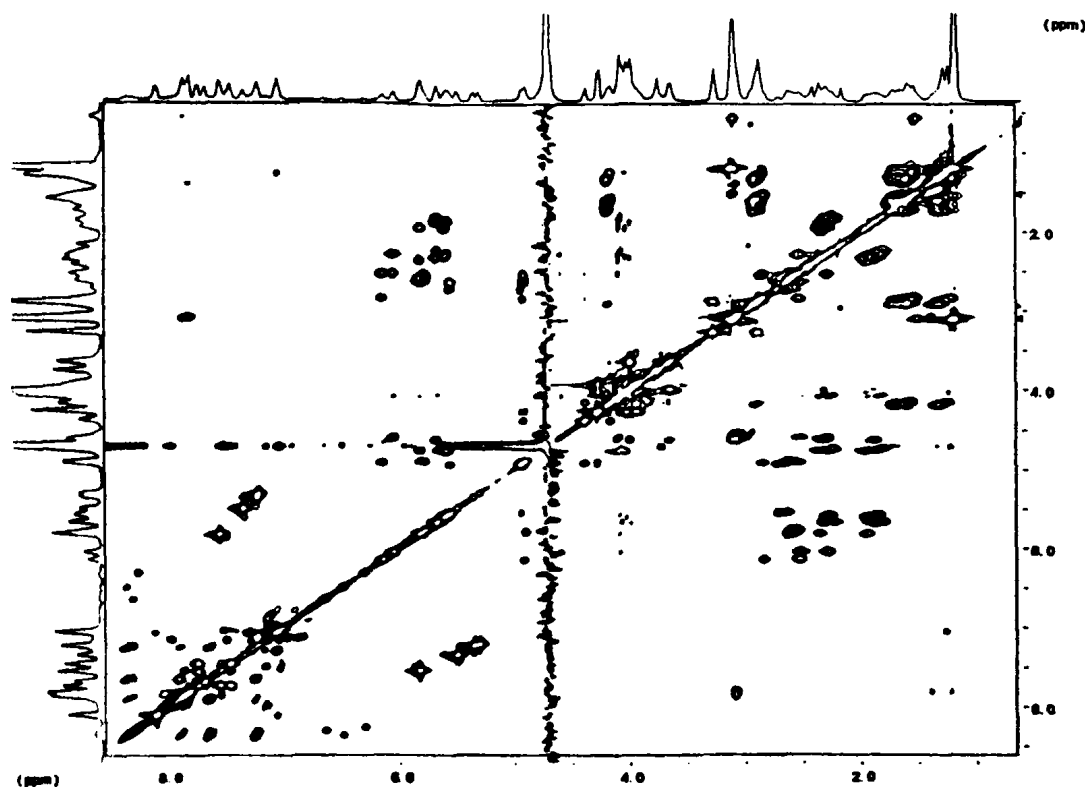


Σχήμα Π44. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του συστήματος $\Lambda\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}\text{-d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ 1:1 σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).

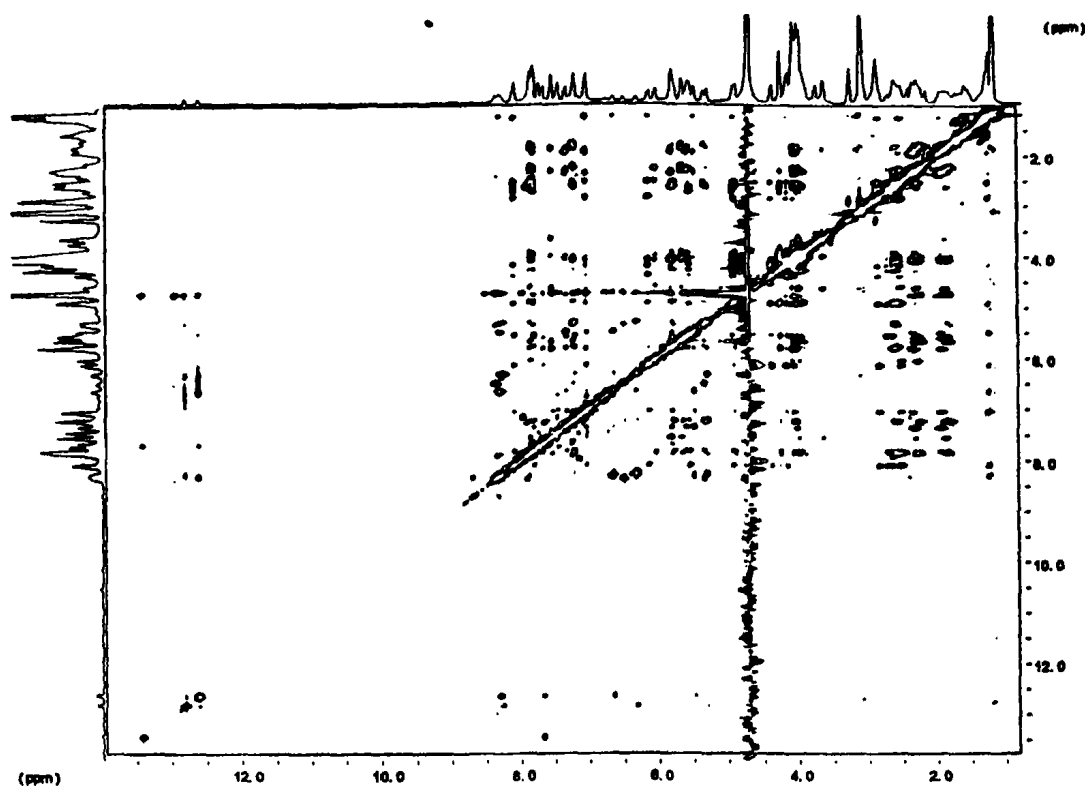


Σχήμα Π45. Φάσμα ^1H NMR 2D NOESY ($\tau_m=250$ ms) του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+} \cdot \text{d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ 1:1 σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (pH=7,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).

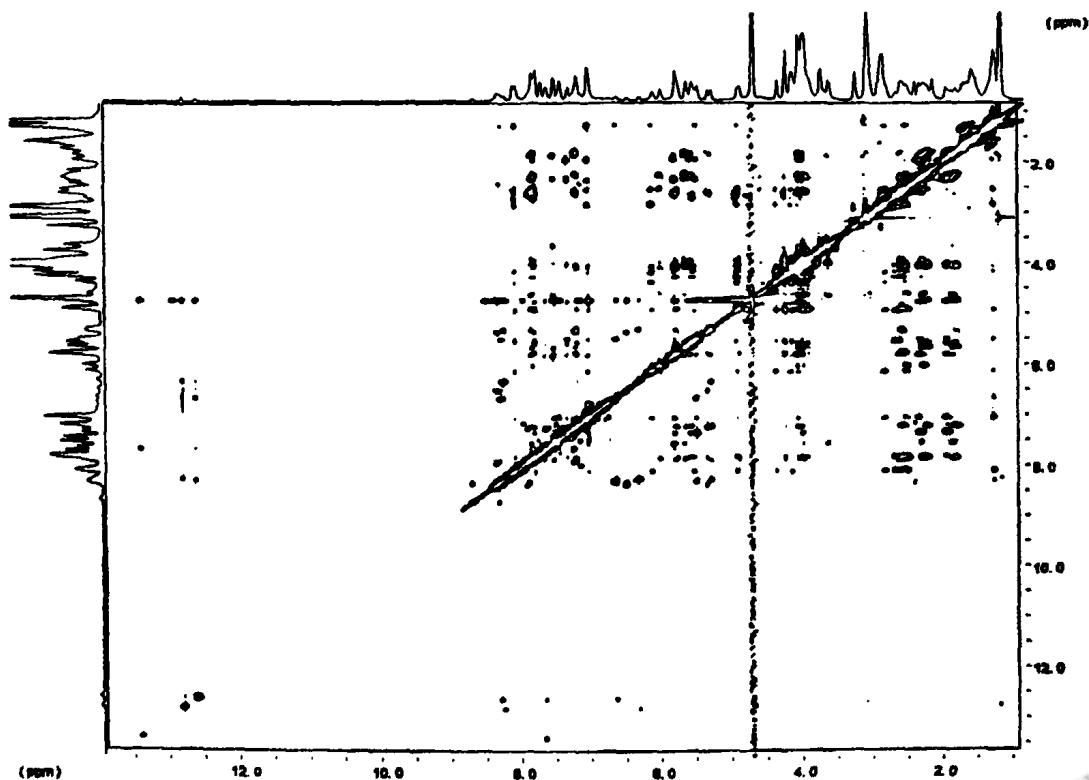
4.4. Το σύστημα $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+} \cdot \text{d}(\text{CGCGATCGCG})_2$.



Σχήμα Π46. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+} \cdot \text{d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ 1:1 σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (pH=7,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).

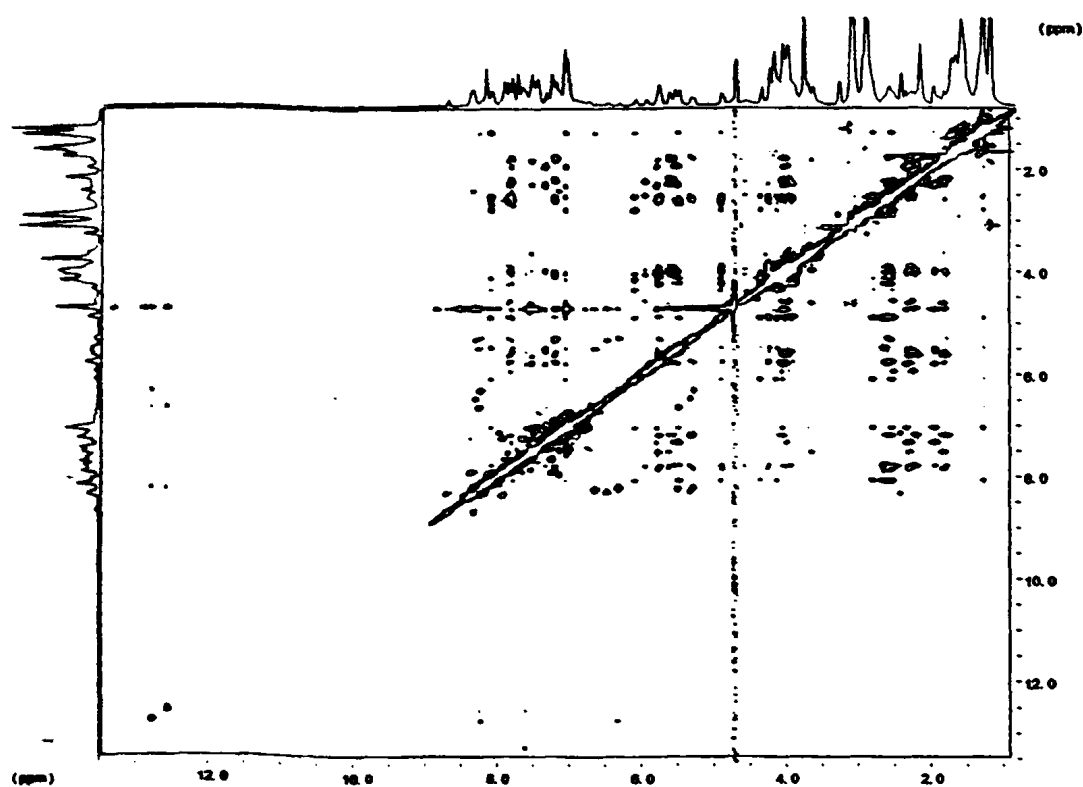


Σχήμα Π47. Φάσμα ^1H NMR 2D NOESY ($\tau_m=250$ ms) του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}\text{-d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ 1:1 σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (pH=7,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).

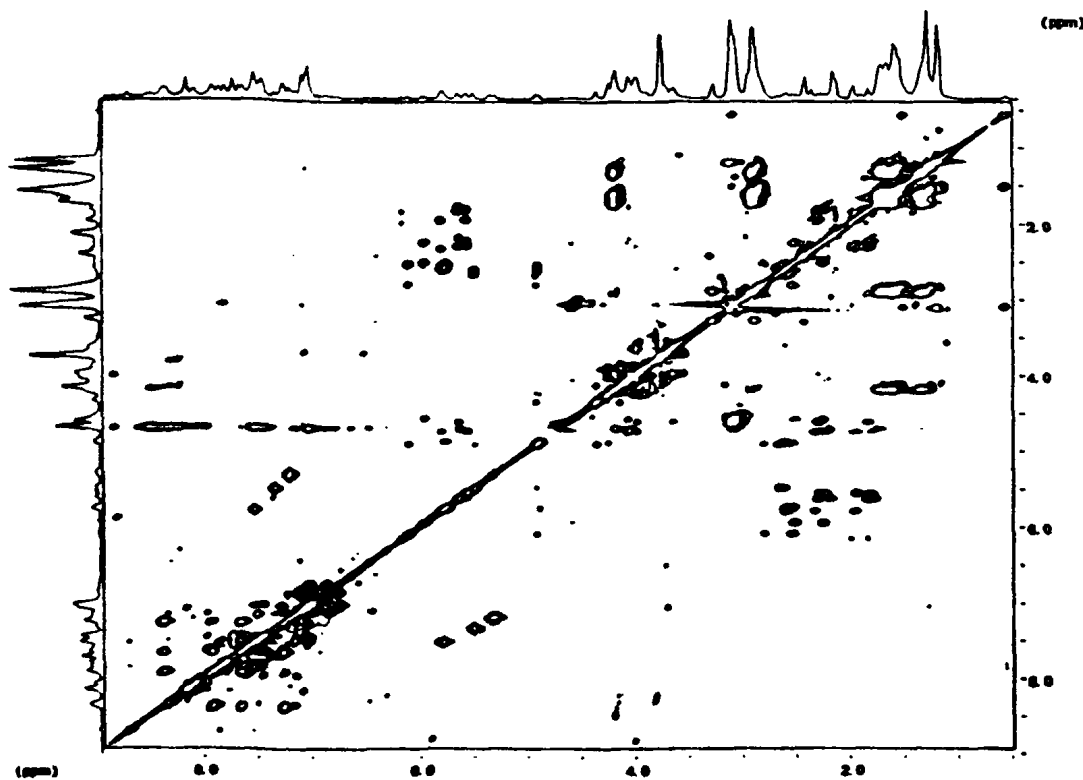


Σχήμα Π48. Φάσμα ^1H NMR 2D NOESY ($\tau_m=250$ ms) του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}\text{-d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ 2:1 σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (pH=7,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).





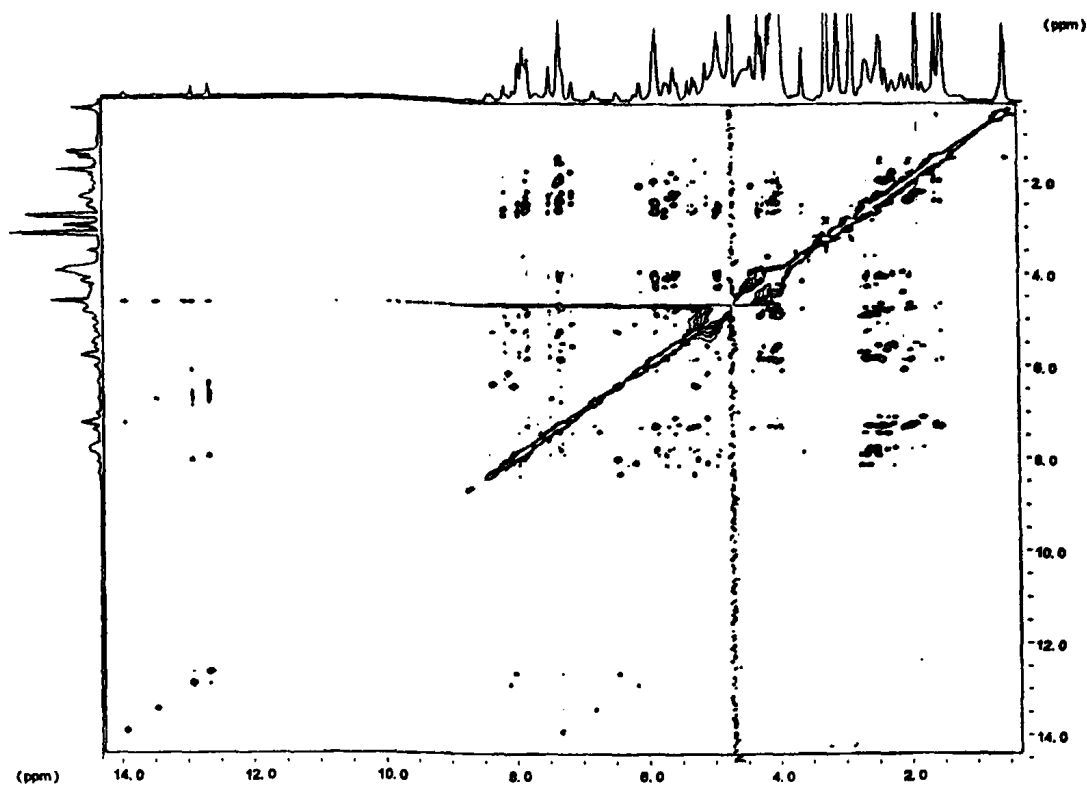
Σχήμα Π49. Φάσμα ^1H NMR 2D NOESY ($\tau_m=250$ ms) του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}\cdot\text{d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ 5:1 σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (pH=7,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).



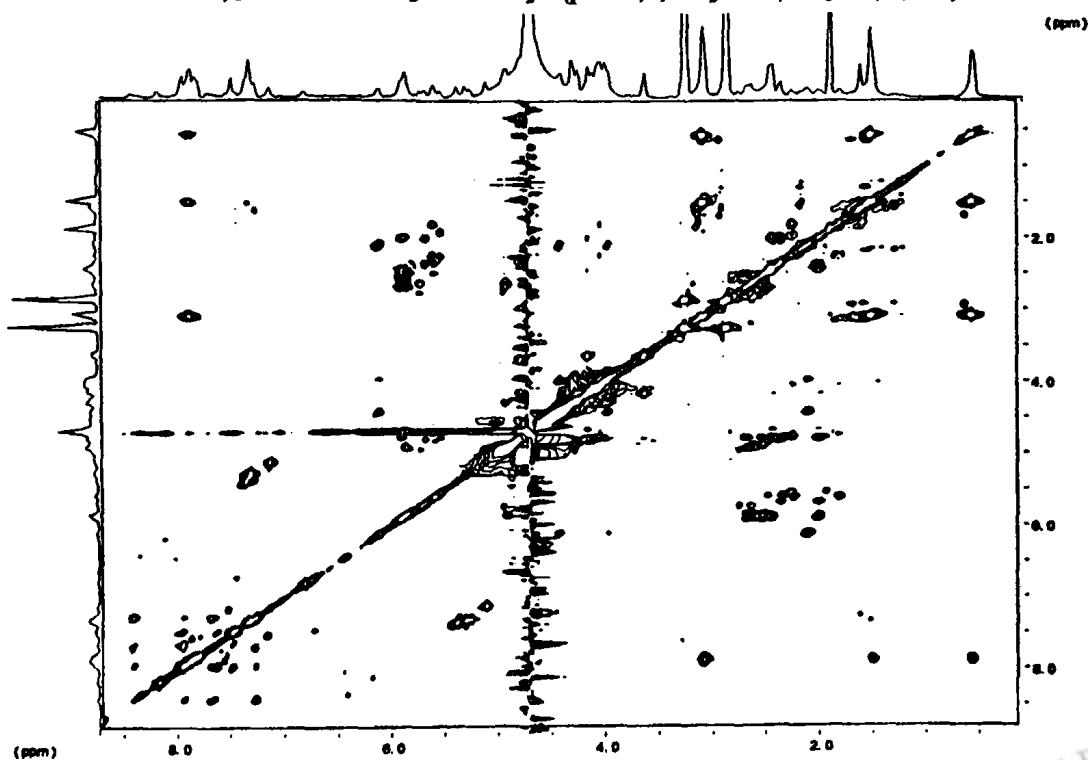
Σχήμα Π50. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}\cdot\text{d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ 5:1 σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O (pH=7,0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).



4.5. Το σύστημα Λ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(GCGCTTAAGCGC)₂.

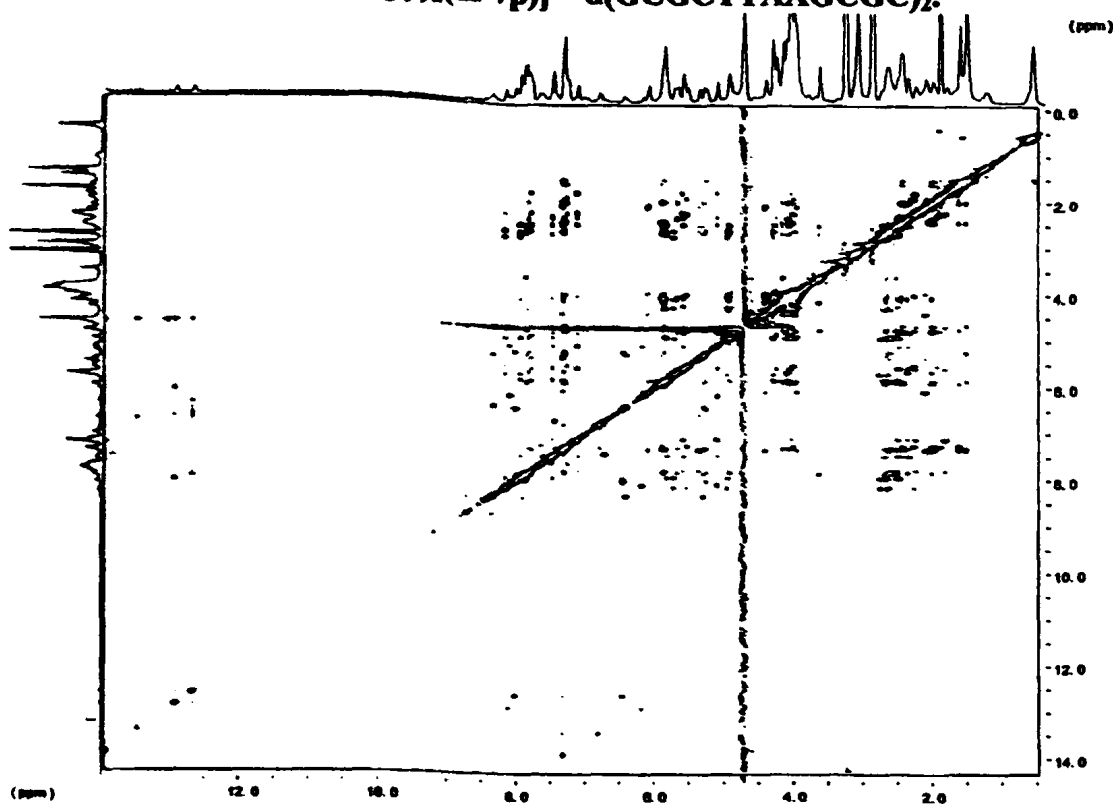


Σχήμα Π51. Φάσμα ¹H NMR 2D NOESY ($\tau_m=250$ ms) του συστήματος Λ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(GCGCTTAAGCGC)₂ 1:1 σε 90% H₂O/10% D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).

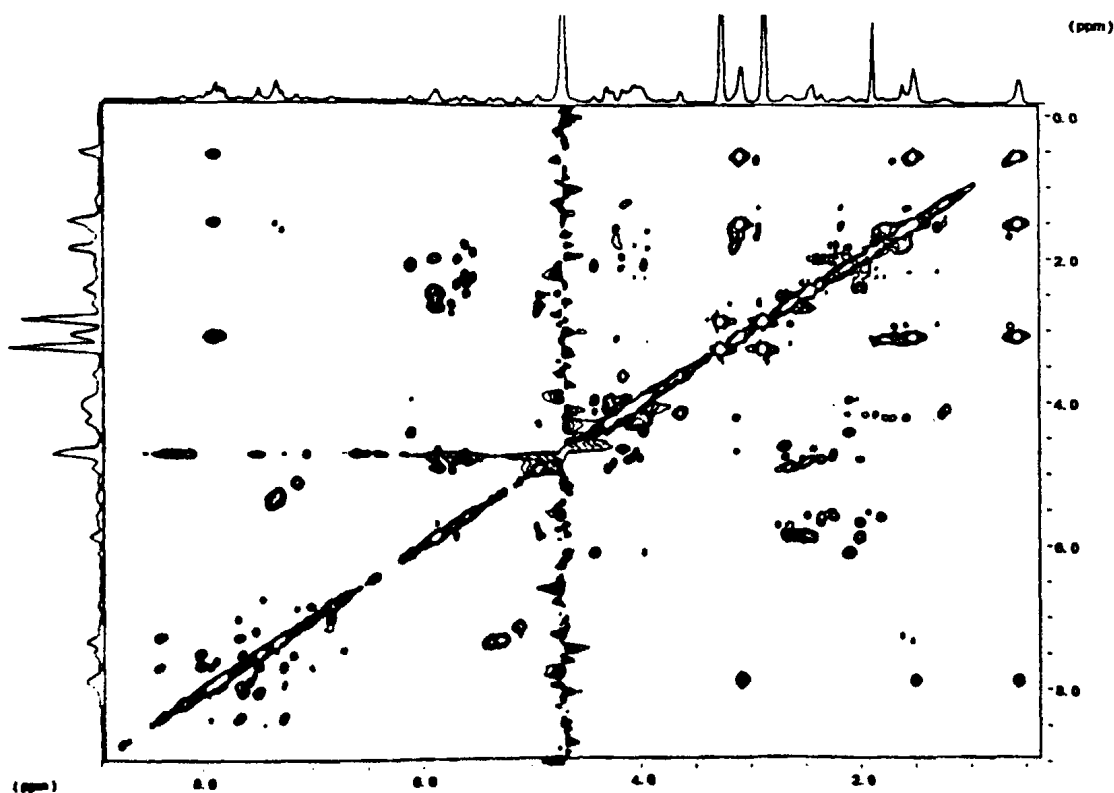


Σχήμα Π52. Φάσμα ¹H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του συστήματος Λ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(GCGCTTAAGCGC)₂ 1:1 σε 90% H₂O/10% D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).

4.6. Το σύστημα Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(GCGCTTAAGCGC)₂.

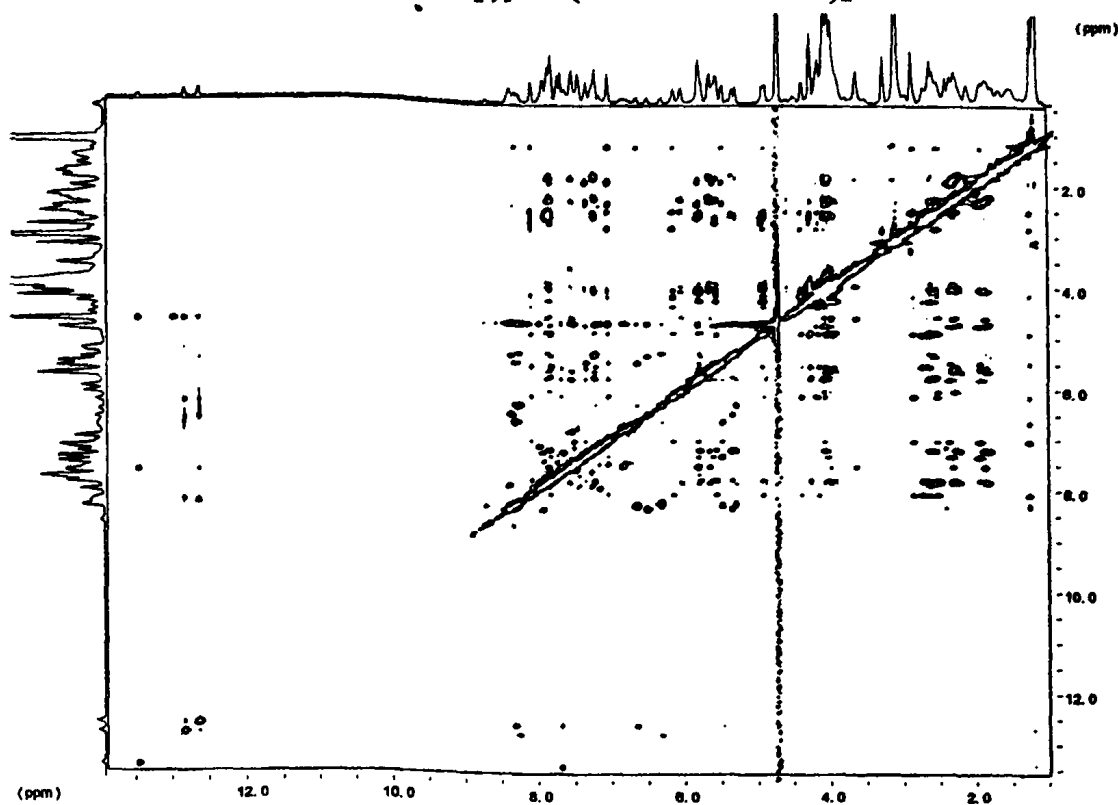


Σχήμα Π53. Φάσμα ¹H NMR 2D NOESY (τ_m=250 ms) του συστήματος Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(GCGCTTAAGCGC)₂ 1:1 σε 90% H₂O/10% D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).

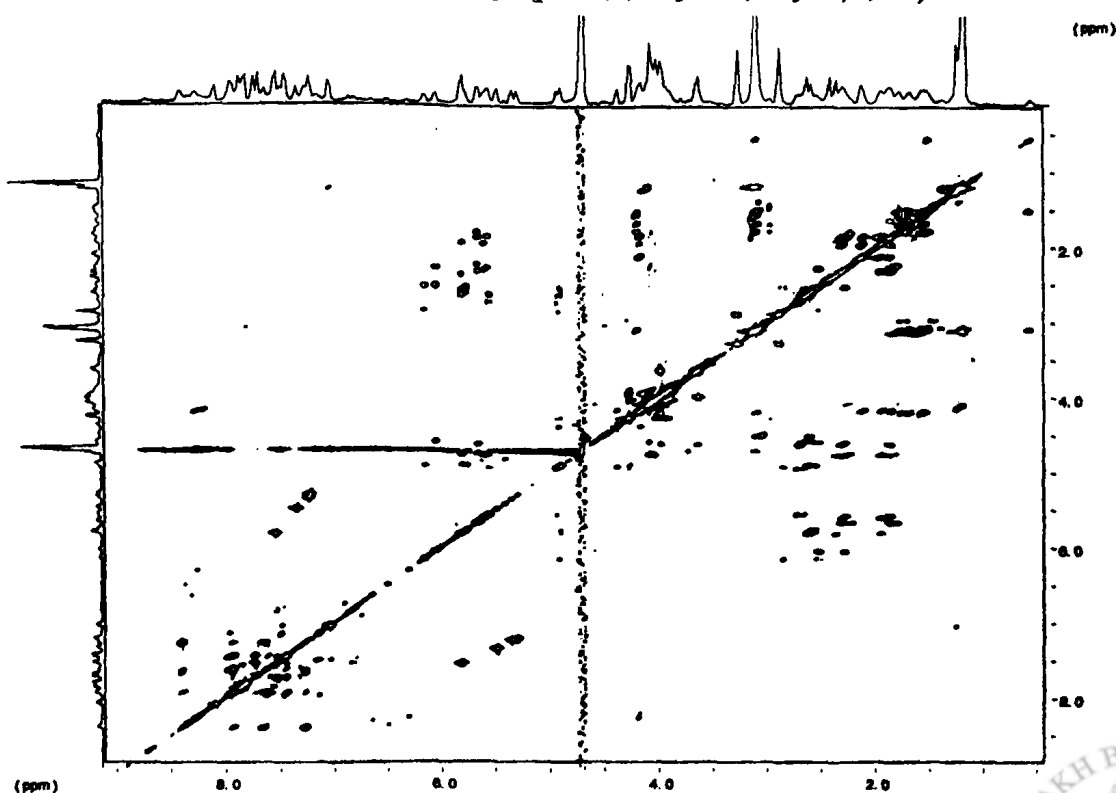


Σχήμα Π54. Φάσμα ¹H NMR 2D TOCSY (τ_m=65 ms) του συστήματος Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(GCGCTTAAGCGC)₂ 1:1 σε 90% H₂O/10% D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).

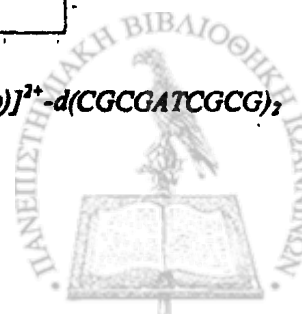
4.7. Το σύστημα Λ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(CGCGATCGCG)₂.

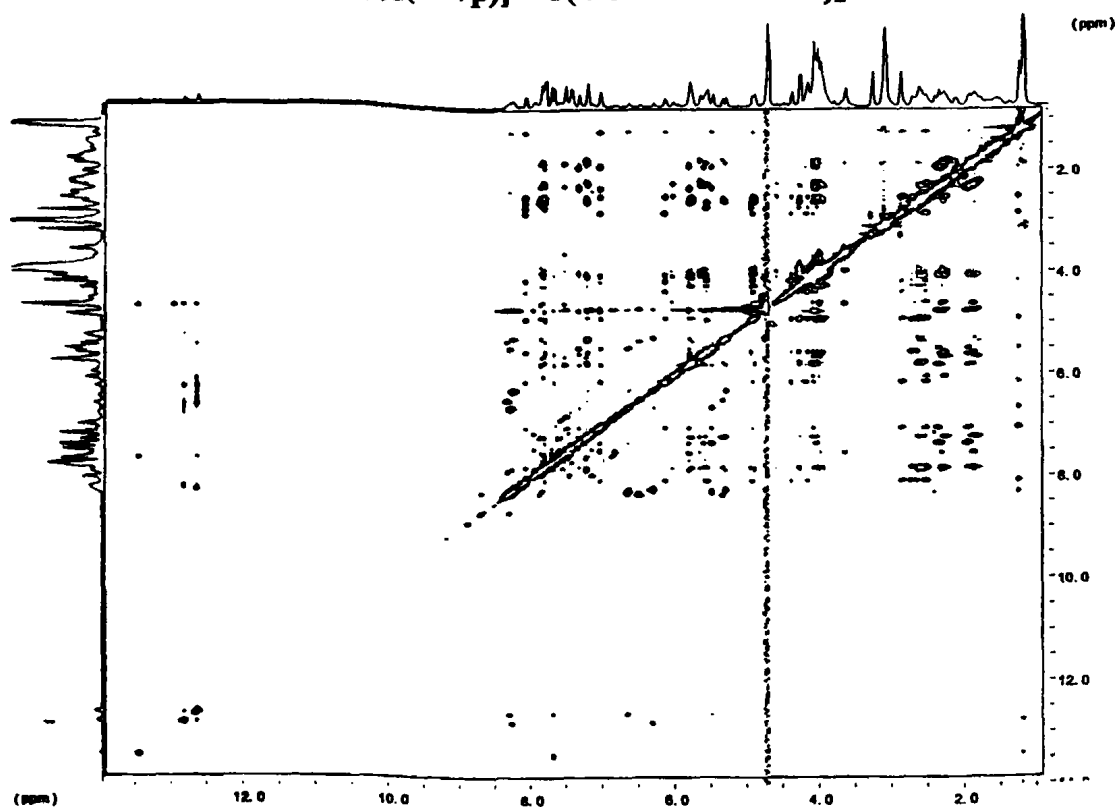


Σχήμα Π55. Φάσμα ¹H NMR 2D NOESY ($\tau_m=250$ ms) του συστήματος Λ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(CGCGATCGCG)₂ 1:1 σε 90% H₂O/10% D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).

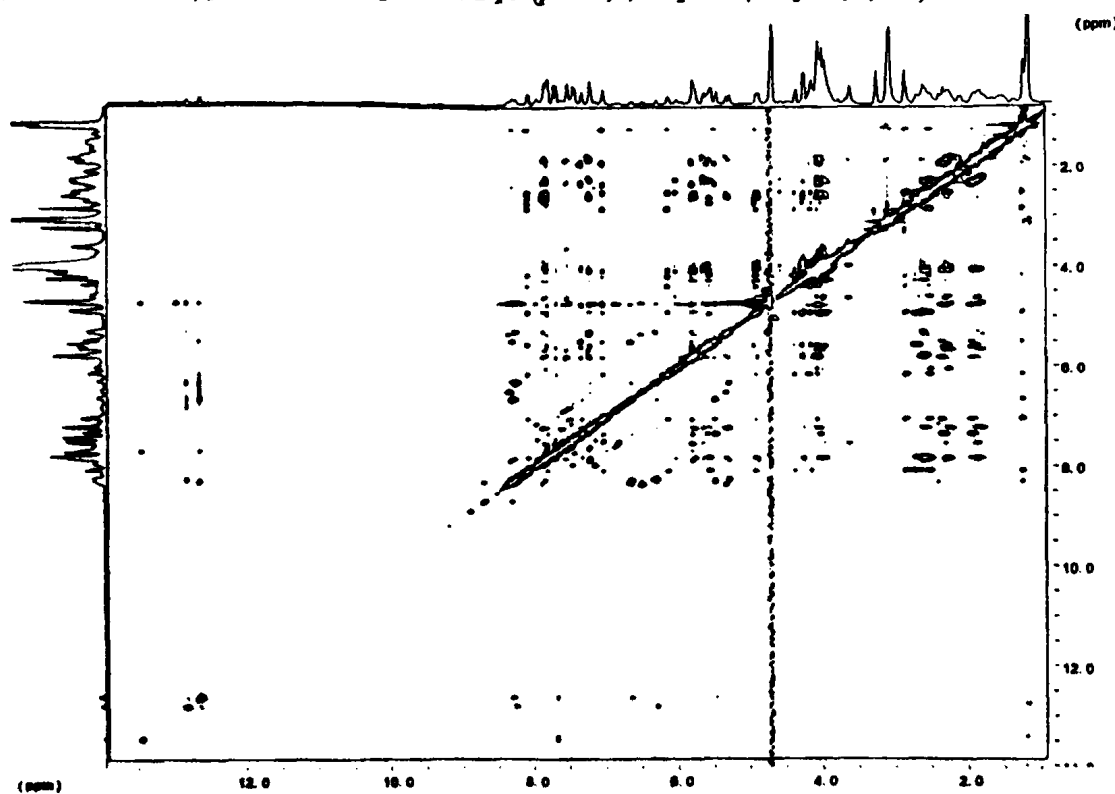


Σχήμα Π56. Φάσμα ¹H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του συστήματος Λ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(CGCGATCGCG)₂ 1:1 σε 90% H₂O/10% D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).

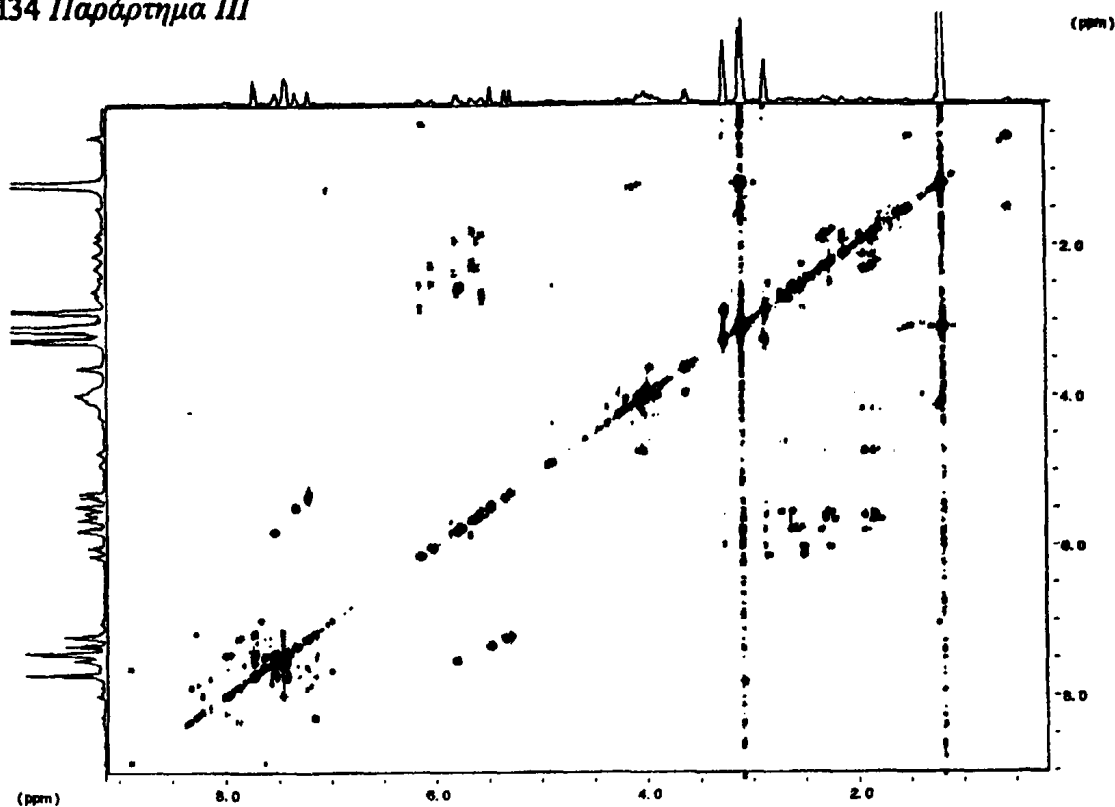


4.8. Το σύστημα Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(CGCGATCGCG)₂.

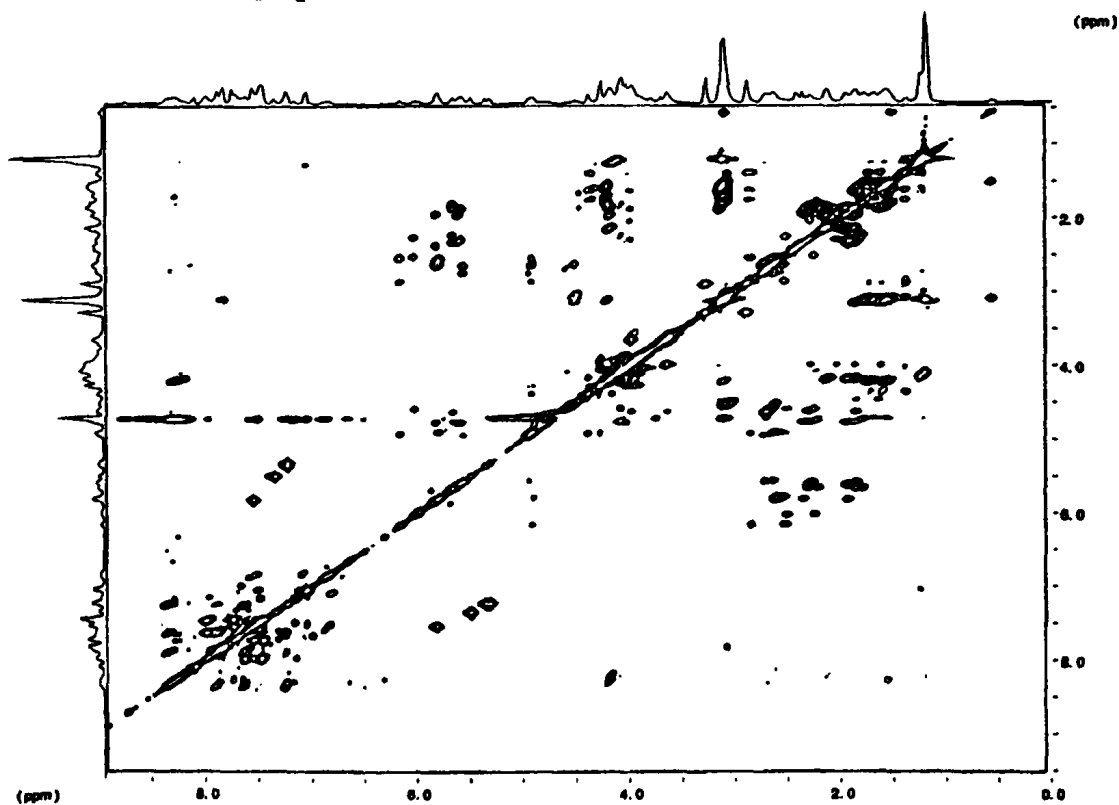
Σχήμα Π57. Φάσμα ¹H NMR 2D NOESY (τ_m=250 ms) του συστήματος Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(CGCGATCGCG)₂ 1:1 σε 90% H₂O/10% D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).



Σχήμα Π58. Φάσμα ¹H NMR 2D DQF COSY του συστήματος Δ -[Ru(bpy)₂(m-7p)]²⁺-d(CGCGATCGCG)₂ 1:1 σε 90% H₂O/10% D₂O (pH=7,0, Na₂HPO₄/Na₃PO₄ 0,1 M).



Σχήμα Π59. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}\text{-d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ 1:1 σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).



Σχήμα Π60. Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ($\tau_m=65$ ms) του συστήματος $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-7p})]^{2+}\text{-d}(\text{CGCGATCGCG})_2$ 2:1 σε 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ D_2O ($\text{pH}=7,0$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$ 0,1 M).