

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Τριανταφυλλίδη Κατελίτσα
Χημικός

**« Σύμπλοκα του Ru(II) με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες συζευγμένους
με αμινοξέα. Σύνθεση, χαρακτηρισμός και μελέτη των αλληλεπιδράσεών
τους με DNA και ολιγονουκλεοτίδια »**

Διδακτορική διατριβή

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



02600321956



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νικόλαος Χατζηλιάδης

Αχιλλέας Γαρούφης

Αναστάσιος Τρογκάνης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Νικόλαος Χατζηλιάδης

Καθηγήτρια Δήμητρα Κόβαλα

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιωάννης Πλακατούρας

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαρία Λουλούδη

Επίκουρος Καθηγητής Αχιλλέας Γαρούφης

Επίκουρος Καθηγητής Αναστάσιος Τρογκάνης

Επίκουρος Καθηγητής Γεράσιμος Μαλανδρίνος





ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ι. ΠΛΑΚΑΤΟΥΡΑΣ
Διευθυντής του Μεταπτυχιακού
Προγράμματος «Βιοανόργανη Χημεία»

Ιωάννινα, 2-12-2008
Αριθμ. Πρωτ.291

Δ/ΝΣΗ: Πανεπιστημιούπολη Ιωαννίνων
45 110 Ιωάννινα
ΤΗΛ.: 26510-98417, 98421, 98429,
FAX: 26510-44831, 98419
E-MAIL: iplakatu@cc.uoi.gr

Προς
Την ΕΔΕ του ΜΔΕ
στη Βιοανόργανη Χημεία
Του Παν/μίου Ιωαννίνων

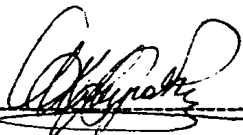
Η επταμελής εξεταστική επιτροπή που ορίστηκε για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της υποψηφίας κ. Τριανταφυλλίδη Κατελίτσας του Γιαννάκη, Χημικού, παρακολούθησε στις 2-12-2008 την υποστήριξη της εργασίας με τίτλο: «Σύμπλοκα του Ru(II) με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες συζευγμένους με αμινοξέα. Σύνθεση, χαρακτηρισμός και μελέτη των αλληλεπιδράσεων με DNA και ολιγονουκλεοτίδια». Μετά από συνεδρίαση στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων η επιτροπή έκρινε ότι η εργασία είναι πρωτότυπη και αποτελεί ουσιαστική συμβολή στην πρόοδο της Επιστήμης.
«Βαθμός ΑΡΙΣΤΑ.».

Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

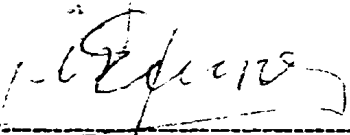
Επίκουρος Καθηγητής Γαρούφης Αχιλλέας, Έπιβλέπων.

Επίκουρος Καθηγητής Τρογγάνης Αναστάσιος, Μέλος.

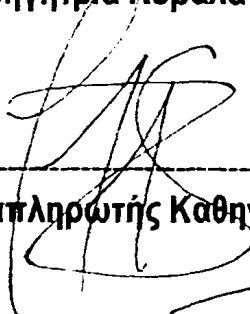




Καθηγητής Χατζηλιάδης Νικόλαος, Μέλος



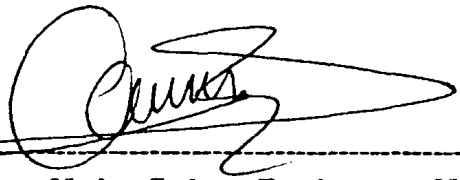
Καθηγήτρια Κόβαλα-Δεμερτζή Δήμητρα, Μέλος.



Αναπληρωτής Καθηγητής Πλακατούρας Ιωάννης, Μέλος.



Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Λουλούδη Μαρία, Μέλος.



Λέκτορας Μαλανδρίνος Γεράσιμος, Μέλος.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2005-2008, στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιοανόργανη Χημεία» με επιστημονικούς υπεύθυνους αρχικά τον καθηγητή κ. Ν. Χατζηλιάδη και στη συνέχεια τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Ι. Πλακατούρα. Η ανάθεση του θέματος, η επίβλεψη και η καθοδήγηση έγινε από τον επίκουρο καθηγητή Ανόργανης και Γενικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Α. Γαρούφη.

Οι ευχαριστίες μου απευθύνονται κατ' αρχήν στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Α. Γαρούφη για την επίβλεψη και καθοδήγηση, καθώς και την κατανόηση που έδειξε σε όλες τις επιστημονικές δυσκολίες που αντιμετώπισα.

Ευχαριστώ ακόμη τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής καθηγητή κ. Ν. Χατζηλιάδη και επίκουρο καθηγητή κ. Α. Τρογκάνη για τα εύστοχα σχόλια, τις υποδείξεις τους και τις επιστημονικές συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της διατριβής μου.

Οφείλω να εκφράσω τις ένθερμες ευχαριστίες μου στον κ. V. Brabec, επικεφαλής του εργαστηρίου Φαρμακολογίας, του Ινστιτούτου Βιοφυσικής, στο Μπρνο της Τσεχίας και στον συνεργάτη του Dr J. Malina για την φιλοξενία τους και για την γενναιόδωρη προσφορά τους στη διεξαγωγή πειραμάτων, απαραίτητων για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Ακόμη, ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής την καθηγήτρια κ. Δ. Κόβαλα, τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Ι. Πλακατούρα, την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Μ. Λουλούδη και τον επίκουρο καθηγητή κ. Γ. Μαλανδρίνο για τον κόπο και τον χρόνο που δέχτησαν για την μελέτη της διατριβής.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Κ. Καρύδη για την αμέριστη βοήθειά της κατά την εξέλιξη των ερευνητικών μου προσπαθειών, καθώς και την ακούραστη ηθική της συμπαράσταση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου Γενικής και Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που με τη φιλική τους διάθεση και την προθυμία για συνεργασία διευκόλυναν την έρευνά μου.



Τέλος η διατριβή αυτή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί δίχως την ανεξάντλητη υποστήριξη των γονιών μου. Η υπομονή και η ενθάρρυνσή τους έκαναν αυτή την προσπάθεια μου δυνατή.



[The text in this section is extremely faint and illegible due to heavy noise and low contrast. It appears to be several paragraphs of a letter or document.]

Αφιερωμένο στους γονείς μου



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1. Γενικά		3
1.2. Αρχές αναγνώρισης συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA		9
1.3. Ομοιοπολική δέσμευση μορίων ή συμπλόκων με το DNA		11
1.4. Μη ομοιοπολική δέσμευση μορίων ή συμπλόκων με το DNA		12
1.4.1. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις τύπου εξουδετέρωσης		14
1.4.2. Δέσμευση στις αύλακες του DNA		16
1.4.3. Παρεμβολή μεταξύ των βάσεων του DNA		19
1.5. Αλληλεπιδράσεις συμπλόκων των στοιχείων μετάπτωσης με το DNA		22
-1.5.1. Ιστορική αναδρομή		22
1.5.2. Σύμπλοκα που παρεμβάλλονται στο DNA		26
1.5.3. Αναγνώριση αλληλουχίας του DNA από σύμπλοκα που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA		30
1.5.4. Σύμπλοκα μετάλλων που εκτοπίζουν τις βάσεις του DNA		32
1.6. Αλληλεπιδράσεις συμπλόκων του ρουθηνίου με το DNA		33
1.6.1. Μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης συμπλόκων του ρουθηνίου		33
1.6.2. Δραστικά σύμπλοκα του Ru(II)		36
1.6.3. Σύμπλοκα του Ru(II) με 2,2'-διτυριδύλιο (bpy), 1,10-φαινανθρολίνη (phen) και παράγωγα τους		39
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ		51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
2.1. Υλικά και φυσικές μετρήσεις		55
2.1.1. Υλικά		55
2.1.2. Φυσικές μετρήσεις		55
2.2. Σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων του ρουθηνίου		56



2.2.1. Σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων του τύπου Λ-, Δ-[Ru(bpy) ₂ (Yn)](PF ₆) ₂ (Yn = Y1, Y2, Y3)	56
2.2.1.1. Σύνθεση του 4,4'-δικαρβοξυ-2,2'-διπυριδίνη	56
2.2.1.2. Σύνθεση του η 4,4'-διμέθοξυκαρβόνυλο-2,2'-διπυριδίνη	57
2.2.1.3. Σύνθεση του 4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy	57
2.2.1.4. Σύνθεση του 4,4'-(COHisCONH ₂) ₂ bpy	58
2.2.1.5. Σύνθεση του 4,4'-(COTyrCONH ₂) ₂ bpy	60
2.2.1.6. Σύνθεση του συμπλόκου cis-Ru(bpy) ₂ Cl ₂	61
2.2.1.7. Σύνθεση του συμπλόκου rac-[Ru(bpy) ₂ (py) ₂](Cl) ₂	61
2.2.1.8. Διαχωρισμός των εναντιομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (py) ₂](Cl) ₂	61
2.2.1.9. Σύνθεση του συμπλόκου Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)] ⁴⁺	62
2.2.1.10. Σύνθεση του συμπλόκου Λ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)] ⁴⁺	63
2.2.1.11. Σύνθεση του συμπλόκου Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COHisCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	63
2.2.1.12. Σύνθεση του συμπλόκου Λ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COHisCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	64
2.2.1.13. Σύνθεση του συμπλόκου Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COTyrCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	65
2.2.1.13. Σύνθεση του συμπλόκου Λ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COTyrCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	65
2.2.2. Σύνθεση του συμπλοκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ⁺	66
2.2.2.1. Σύνθεση του συμπλόκου Ru(terpy)Cl ₃	66
2.2.2.3. Σύνθεση του συμπλοκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺	66
2.3. Προετοιμασία των διαλυμάτων για τις αλληλεπιδράσεις με DNA	
2.3.1. Προετοιμασία των διαλυμάτων του ολιγονουκλεοτιδίου d(CGCGCG) ₂ και d(GTCGAC) ₂ για την φασματοσκοπία NMR	67
2.3.2. Προετοιμασία των διαλυμάτων των συμπλόκων του τύπου Λ- ή Δ-[Ru(bpy) ₂ (Yn)] ²⁺ με το DNA για την λήψη καμπύλων τήξης	67
2.3.3. Προετοιμασία των διαλυμάτων των συμπλόκων του τύπου Λ- ή Δ-[Ru(bpy) ₂ (Yn)] ²⁺ με το DNA για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης	68
2.3.4. Προετοιμασία των διαλυμάτων των συμπλόκων Λ- ή Δ-[Ru(bpy) ₂ (Yn)] ²⁺ για λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού του DNA	69
2.3.5. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ με το DNA για την λήψη	



καμπύλων τήξης	69
2.3.6. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ με το DNA για τη μελέτη της κινητικής	70
2.3.7. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ για λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού του DNA	71
2.3.8. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ για λήψη φασμάτων γραμμικού διχρωϊσμού του DNA	71
2.3.9. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου – [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ με το DNA για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης	72
2.3.10. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ σε αναλογία $r_b = 0.04$ με το DNA για το πείραμα ηλεκτροφόρησης	72
2.3.11. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ για τα πειράματα αναστολής της σύνθεσης του RNA	73
2.4. Βασικές αρχές των μεθόδων	73
2.4.1. Ηλεκτροφόρηση DNA – Αποελίκωση	73
2.4.2. Θερμοκρασία τήξης του DNA (T _m)	76
2.4.3. Μέθοδος Maxam – Gilbert	76
2.4.4. Γραμμικός διχρωϊσμός (LD)	79
2.4.5. Κυκλικός διχρωϊσμός (CD)	81
2.4.6. Φασματοσκοπία NMR	85
2.4.6.1. Γενικά	85
2.4.6.2. Φάσματα δύο διαστάσεων	87
2.4.6.3. Το φαινόμενο NOE	88



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Σύμπλοκα του τύπου Λ-, Δ-[Ru(bpy) ₂ (Yn)](PF ₆) ₂	93
3.1.1. Σύνθεση	93
3.1.2. Χαρακτηρισμός των υποκαταστατών	96
3.1.2.1. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy	96
3.1.2.1.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	96
3.1.2.2. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 4,4'-(COHisCONH ₂) ₂ bpy	96
3.1.2.2.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	96
3.1.2.3. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 4,4'-(COTyrCONH ₂) ₂ bpy	97
3.1.2.3.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	97
3.1.2.4. Συνοπτική παρουσίαση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων των υποκαταστατών Yn	97
3.1.3. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων	98
3.1.3.1. Χαρακτηρισμός των διαστερομερών συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)](PF ₆) ₄	98
3.1.3.1.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου	99
3.1.3.1.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους	100
3.1.3.1.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	101
3.1.3.1.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	102
3.1.3.2. Χαρακτηρισμός των διαστερομερών συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COHisCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	111
3.1.3.2.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου	112
3.1.3.2.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους	113
3.1.3.2.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	114
3.1.3.2.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	115
3.1.3.3. Χαρακτηρισμός των διαστερομερών συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COTyrCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	118
3.1.3.3.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου	119
3.1.3.3.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους	120
3.1.3.3.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	121



3.1.3.3.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού	122
3.1.4. Αλληλεπιδράσεις με το ολιγονουκλεοτιδιο d(3'-CGCGCG-5') ₂	127
3.1.4.1. Ανάλυση φάσματος ¹ H NMR του d(3'-CGCGCG-5') ₂	127
3.1.4.1.1. Απόδοση των μη ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων του d(3'-CGCGCG-5') ₂	128
3.1.4.1.2. Απόδοση των ανταλλάξιμων πρωτονίων του d(3'-CGCGCG-5') ₂	136
3.1.4.2. Αλληλεπίδραση των διαστερεομερων Λ- και Δ- [Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)](PF ₆) ₄ με το d(3'-CGCGCG-5') ₂	139
3.1.5. Αλληλεπιδράσεις με DNA	149
3.1.5.1. Σημείο τήξης του DNA	149
3.1.5.1.1. Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)](PF ₆) ₄	150
3.1.5.1.2. Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COHisCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	152
3.1.5.1.3. Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COTyrCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	153
3.1.5.2. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	156
3.1.5.2.1. Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)](PF ₆) ₄	156
3.1.5.2.2. Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COHisCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	158
3.1.5.2.3. Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COTyrCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	159
3.1.5.3. Φωτοδιάσπαση του DNA	161
3.1.5.3.1. Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)](PF ₆) ₄	162
3.1.5.3.2. Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COHisCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	163
3.1.5.3.3. Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COTyrCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	164
3.1.5.4. Μηχανισμός φωτοδιάσπασης του DNA	166
3.1.5.4.1. Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)](PF ₆) ₄	166
3.1.5.4.2. Δ-[Ru(bpy) ₂ (4,4'-(COHisCONH ₂) ₂ bpy)]Cl ₂	168
3.1.5.5. Έλεγχος της εκλεκτικότητας στην αλληλουχία των συμπλόκων τύπου Λ- ή Δ-[Ru(bpy) ₂ (Yn)] ²⁺	169

3.2. Το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH₂)₂bpy]Cl]Cl₃ μη ομοιοπολικού χαρακτήρα

3.2.1. Σύνθεση

173

173



3.2.2. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$	175
3.2.2.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου	175
3.2.2.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους	176
3.2.2.3. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και υδρόλυση του συμπλόκου	177
3.2.3. Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(3'-GTCGAC-5')_2$	185
3.2.3.1. Ανάλυση φάσματος 1H NMR του $d(3'-GTCGAC-5')_2$	185
3.2.3.2. Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(3'-GTCGAC-5')_2$	191
3.2.4. Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(3'-CGCGCG-5')_2$	194
3.2.5. Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ με DNA	199
3.2.5.1. Δέσμευση του συμπλόκου στο DNA	199
3.2.5.2. Σημείο τήξης του DNA	201
3.2.5.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού	203
3.2.5.4. Φασματοσκοπία γραμμικού διχρωϊσμού	206
3.2.5.5. Αποελίκωση του DNA	207
3.2.5.6. Φωτοδιάσπαση του DNA παρουσία του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ σε αναλογία $r_b = 0.04$ με την επίδραση ακτινοβολίας UVA	209
3.2.5.7. Αναστολή της <i>in vitro</i> σύνθεσης του RNA – Σημεία τερματισμού	211
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	217
Βιβλιογραφία	221
Παράρτημα	231



ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Y1 = 4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy

Y2 = 4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy

Y3 = 4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy

Δ1 = Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄

Λ1 = Λ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄

Δ2 = Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂

Λ2 = Λ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂

Δ3 = Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy)]Cl₂

Λ3 = Λ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy)]Cl₂

lys = λυσίνη

his = ιστιδίνη

tyr = τυροσίνη

bpy = 2,2'-διπυριδίνη

4,4'-(CO₂H)bpy = 4,4'-δικαρβοξυ-2,2'-διπυριδίνη

terpy = 2,2':6',2''-τερπυριδίνη

DIPEA = διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη

NMP = N- μέθυλο-πυρολιδόνη

PyBOP = βενζοτριαζόλο-1-οξυτρις(πυρολιδίν)φωσφάνιο εξαφθοροφωσφορικό

DMF = N,N-διμέθυλο-φορμαμίδιο

TFA = τριφθοροξικό οξύ

DMSO = διμεθυλο σουλφοξείδιο

Fmoc = 9-φλουορενυλοξυκαρβόνυλο

CD = κυκλικός διχρωϊσμός

LD = γραμμικός διχρωϊσμός

COSY = COrrrelation SpectroscopY

TOCSY = TOtal Correlation SpectroscopY

NOESY = Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY



ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. Σχηματική παράσταση του μορίου του DNA	3
Σχήμα 1.2. Δεσμοί υδρογόνου Watson – Crick για τα ζευγάρια των βάσεων A – T και G – C	4
Σχήμα 1.3. Τρόπος σύνδεσης του φαρμάκου με το DNA	8
Σχήμα 1.4. Οι θέσεις σχηματισμού δεσμών υδρογόνου στα ζεύγη A – T και G	9
Σχήμα 1.4. Τρόποι αντιστρεπτής αλληλεπίδρασης ενός μορίου με τη διπλή έλικα του DNA	13
Σχήμα 1.5. Παρεμβολή ενός μορίου μεταξύ των βάσεων του DNA	14
Σχήμα 1.6. Το μόριο της μπλεομυκίνης	24
Σχήμα 1.7. Δομή των εναντιομερών συμπλόκων Λ-, Δ-[Ru(phen) ₃]	25
Σχήμα 1.8. Σχηματική απεικόνιση των δομών των συμπλόκων [Ru(phen) ₂ dppz] ²⁺ και Δ-a-[Rh{(R,R)-Me ₂ trien}(phi)] ³⁺ και της ντισταμισίνης	27
Σχήμα 1.9. Δομή του συμπλόκου [Rh(phi) ₂ bpy] ³⁺	29
Σχήμα 1.10. Δομή του συμπλόκου [Ru(phen)(bpy')(dppz)] ²⁺	30
Σχήμα 1.11. Εκλεκτική αναγνώριση αλληλουχίας συμπλόκων	31
Σχήμα 1.12. Δομή του συμπλόκου Δ-[Rh(bpy) ₂ (chrysi)] ³⁺ και [Rh(bpy) ₂ (phzi)] ³⁺	33
Σχήμα 1.13. Δομή του συμπλόκου [RuCl ₂ (azpy) ₂]	36
Σχήμα 1.14. Δομή των υποκαταστατών κολχικίνη όταν R1 = C(O)CH ₃ και R2 = CH ₃ και τριμέθυλοκολχινικό οξύ όταν R1 = H and R2 = H	37
Σχήμα 1.15. Σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων <i>trans</i> -Na[RuCl ₄ (dmsO-S)(Him)] (NAMI) και <i>trans</i> -H ₂ Im[RuCl ₄ (dmsO-S)(Him)] (NAMI-A), (Him= ιμιδαζόλιο)	38
Σχήμα 1.16. Δομή συμπλόκων H ₂ Im{ <i>trans</i> -[RuCl ₄ (Him) ₂]} και H ₂ ind{ <i>trans</i> -[RuCl ₄ (Hind-kN ₂) ₂]}	39
Σχήμα 1.17. Δομές των συμπλόκων τύπου [Ru(bpy) ₂ L] ²⁺ (όπου L = 4-δικαρβοξυ-4'-διμεθυλο-2,2'-διπυριδίνη ή 4,4'-δικαρβοξυ-2,2'-διπυριδίνη)	41
Σχήμα 1.18. Δομή του συμπλόκου [Ru(bpyMe ₂) ₂ (dppz)] ²⁺	41
Σχήμα 1.19. Δομές των συμπλόκων με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες του τύπου [RuL ₂ L'] ²⁺	42
Σχήμα 1.20. Δομή του συμπλόκου [Ru(bpy) ₂ L] ²⁺	44
Σχήμα 1.21. Δομή των συμπλόκων [Ru(phen)(PBIP)] ²⁺ και [Ru(phen)(OBIP)] ²⁺	44
Σχήμα 1.22. Δομές των συμπλόκων του τύπου [Ru(phen) ₂ (p-L)] ²⁺	46
Σχήμα 1.23. Δομή του Δ-[Ru(bpy) ₂ (4-CO ₂ H-4'-Mebpy)] ²⁺	48
Σχήμα 1.24. Σύνπλοκα Λ-, Δ-[Ru(bpy) ₂ Cl ₂]	48



Σχήμα 1.25. Σύμπλοκα [Ru(terpy)(bpy)Cl]Cl και <i>mer</i> -[Ru(terpy)Cl ₃]	49
Σχήμα 1.26. Δομή των διαστερεωμερών συμπλόκων Λ- και Δ-[RuCl ₂ (phen) ₂]	50
Σχήμα 1.27. Δομή των ισομερών συμπλόκων του [Ru(terpy)(4-CO ₂ H-4'-Mebpy-GHK-CONH ₂)Cl](PF ₆) ₅	50
Σχήμα 2.1. Χαλαρή και υπερελικωμένη μορφή του DNA	74
Σχήμα 2.2. Διάγραμμα στο οποίο παρουσιάζεται η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της υπερελικωμένης και της χαλαρής μορφής του DNA	75
Σχήμα 2.3. Αυτοραδιογράφημα όπως προκύπτει από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε κομμάτι DNA με τη μέθοδο Maxam Gilbert	78
Σχήμα 2.4. Σχηματική αναπαράσταση λήψης φάσματος LD	79
Σχήμα 2.5. Σχηματική αναπαράσταση του φάσματος LD του DNA	80
Σχήμα 2.6. Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού του τύπου B του DNA (B), του τύπου C (C) και του τύπου A (A)	84
Σχήμα 2.7. Ενεργειακό διάγραμμα ενός πυρήνα spin, κβαντικού αριθμού <i>l</i> =1/2 παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου	86
Σχήμα 2.8. Ενεργειακό διάγραμμα ενός συστήματος δύο spin και οι πιθανές μετάπτωσης του	88
Σχήμα 3.1.1. Αντίδραση σύνθεσης του υποκαταστάτη 4,4'-(CO ₂ H) ₂ bpy	93
Σχήμα 3.1.2. Αντίδραση σύνθεσης των Λ- και Δ- [Ru(bpy) ₂ (py) ₂]Cl ₂	94
Σχήμα 3.1.3. Σύνθεση του [Ru(bpy) ₂ (Yn)] ²⁺ με την τεχνική της σύνθεσης σε στερεά φάση	95
Σχήμα 3.1.6. Σχηματική παράσταση της δομής των συμπλόκων ΔI και ΛI	98
Σχήμα 3.1.5. Φάσμα υπερύθρου του ΛI	99
Σχήμα 3.1.6. Φάσμα UV-Vis του ΛI	101
Σχήμα 3.1.7. Φάσματα CD των ΛI και ΔI	102
Σχήμα 3.1.8. Φάσμα 1D ¹ H NMR του συμπλόκου ΛI για την αρωματική περιοχή	103
Σχήμα 3.1.9. Σταθερά σύζευξης για το μόριο της διτυριδίνης	104
Σχήμα 3.1.10. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου ΛI για την αρωματική περιοχή	105
Σχήμα 3.1.11. Περιοχή φάσματος TOCSY όπου παρουσιάζονται οι συζεύξεις των αλειφατικών πρωτονίων της λυσίνης για το σύμπλοκο ΛI	106
Σχήμα 3.1.12. Φάσμα 1D ¹ H NMR του συμπλόκου ΔI για την αρωματική περιοχή	107
Σχήμα 3.1.13. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου ΔI για την αρωματική περιοχή	108
Σχήμα 3.1.14. Περιοχή φάσματος TOCSY όπου παρουσιάζονται οι συζεύξεις των αλειφατικών	



πρωτονίων της λυσίνης στο σύμπλοκο Δ1	109
Σχήμα 3.1.15. Προτεινόμενες διαμορφώσεις για των συμπλόκων Λ1 και Δ1	111
Σχήμα 3.1.16. Σχηματική παράσταση της δομής των συμπλόκων Δ2 και Λ2	111
Σχήμα 3.1.17. Φάσμα υπερύθρου του Λ2	112
Σχήμα 3.1.18. Φάσμα UV-Vis του Δ2	113
Σχήμα 3.1.19. Φάσματα CD των Λ2 και Δ2	114
Σχήμα 3.1.20. Φάσμα 1D ¹ H NMR του συμπλόκου Δ2 για την αρωματική περιοχή	115
Σχήμα 3.1.21. Φάσμα 1D ¹ H NMR του συμπλόκου Λ2 για την αρωματική περιοχή	116
Σχήμα 3.1.22. Σχηματική παράσταση της δομής των συμπλόκων Δ3 και Λ3	116
Σχήμα 3.1.23. Φάσμα υπερύθρου του Λ3	119
Σχήμα 3.1.24. Φάσμα UV-Vis του Λ3	120
Σχήμα 3.1.25. Φάσματα CD των Λ3 και Δ3	121
Σχήμα 3.1.26. Φάσμα 1D ¹ H NMR του συμπλόκου Λ3 για την αρωματική περιοχή	122
Σχήμα 3.1.27. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Λ3 για την αρωματική περιοχή	123
Σχήμα 3.1.28. Φάσμα 1D ¹ H NMR του συμπλόκου Δ3 για την αρωματική περιοχή	124
Σχήμα 3.1.29. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Δ3 για την αρωματική περιοχή	125
Σχήμα 3.1.30. Φάσμα ¹ H NMR μια διάστασης του d(3'-CGCGCG-5') ₂	127
Σχήμα 3.1.31. Περιοχή του φάσματος DQF COSY	128
Σχήμα 3.1.32. Φάσμα TOCSY της διπλής έλικας του d(3'-CGCGCG-5') ₂	129
Σχήμα 3.3.33. Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων που μπορούν να δώσουν NOE στο B-DNA	131
Σχήμα 3.1.34. Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων σε B-DNA, απαραίτητων για την απόδοση των πρωτονίων σύμφωνα με την αλληλουχία και βάσει των NOE	131
Σχήμα 3.1.35. Σχηματική αναπαράσταση των NOE του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5') ₂	133
Σχήμα 3.1.36. Φάσμα NOESY του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5') ₂	134
Σχήμα 3.1.37. Περιοχή φάσματος NOESY όπου φαίνονται τα NOE μεταξύ των H8 και H6 των Γουανίνων και Κυτοσίνων στην αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου	
Σχήμα 3.1.38. Περιοχή φάσματος NOESY όπου φαίνεται η σύνδεση των νουκλεοτιδίων από το C1 στο G6	135
Σχήμα 3.1.39. Τα ζευγάρια των συμπληρωματικών βάσεων στο ολιγονουκλεοτίδιο (G)-(C)	136



Σχήμα 3.1.40. Περιοχή φάσματος NOESY του ολιγονουκλεοτιδίου	138
Σχήμα 3.1.41. Περιοχή φασμάτων TOCSY για τα αρωματικά πρωτόνια. Λ1 και Δ1 με το ολιγονουκλεοτίδιο	141
Σχήμα 3.1.42. Περιοχή φασμάτων TOCSY για τα αρωματικά πρωτόνια. Δ1 και Δ1 με το Ολιγονουκλεοτίδιο	141
Σχήμα 3.1.43. Σχηματική αναπαράσταση της δέσμευσης του Λ1 διαστερομερεούς με το DNA	144
Σχήμα 3.1.44. Σχηματική αναπαράσταση της δέσμευσης του Δ1 διαστερομερεούς με το DNA	145
Σχήμα 3.1.45. Διαγράμματα όπου φαίνονται οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου για τα δύο ισομερή	146
Σχήμα 3.1.46. Καμπύλη τήξης για το Λ1	150
Σχήμα 3.1.47. Καμπύλη τήξης για το Δ1	150
Σχήμα 3.1.48. Καμπύλη τήξης για το Λ2	152
Σχήμα 3.1.49. Καμπύλη τήξης για το Δ2	152
Σχήμα 3.1.50. Καμπύλη τήξης για το Λ3	154
Σχήμα 3.1.51. Καμπύλη τήξης για το Δ3	154
Σχήμα 3.1.52. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο Λ1	156
Σχήμα 3.1.53. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο Δ1	157
Σχήμα 3.1.54. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο Λ2	159
Σχήμα 3.1.55. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο Δ2	159
Σχήμα 3.1.56. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο Λ3	160
Σχήμα 3.1.57. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο Δ3	160
Σχήμα 3.1.58. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pUC19, με την προσθήκη του συμπλόκου Λ1 και Δ1	162
Σχήμα 3.1.59. Διάσπαση του πλασμιδίου pUC19 από τα Λ1 και Δ1 σε συνάρτηση του χρόνου	162
Σχήμα 3.1.60. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pUC19, με την προσθήκη του συμπλόκου Λ2 και Δ2	163
Σχήμα 3.1.61. Διάσπαση του πλασμιδίου pUC19 από τα Λ2 και Δ2 σε συνάρτηση του χρόνου	164
Σχήμα 3.1.62. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pUC19, με την προσθήκη του Λ3 και Δ3	165
Σχήμα 3.1.63. Διάσπαση του πλασμιδίου pUC19 από τα Λ3 και Δ3 σε συνάρτηση του χρόνου	165



Σχήμα 3.1.64. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pSP73KB, με την προσθήκη του συμπλόκου Δ1 και την χρήση παγιδευτών	167
Σχήμα 3.1.65. Απεικόνιση της διάσπασης του πλασμιδίου pSP73KB με το σύμπλοκο Δ1 και την χρήση παγιδευτών	168
Σχήμα 3.1.66. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pSP73KB, με την προσθήκη του συμπλόκου Δ2 και την χρήση παγιδευτών	168
Σχήμα 3.1.67. Απεικόνιση της διάσπασης του πλασμιδίου pSP73KB με το σύμπλοκο Δ2 και την χρήση παγιδευτών	169
Σχήμα 3.1.68. Χαρακτηριστικό διάγραμμα της εκλεκτικής δέσμευσης των συμπλόκων στο DNA	170
Σχήμα 3.2.1. Αντίδραση σύνθεσης του συμπλόκου [Ru(terpy)Cl ₃]	173
Σχήμα 3.2.2. Σύνθεση του [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH ₂) ₂ bpy]Cl ³⁺ με την τεχνική της σύνθεσης σε στερεά φάση	174
Σχήμα 3.2.3. Φάσμα υπέρυθρου του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH ₂) ₂ bpy]Cl ³⁺	175
Σχήμα 3.2.4. Φάσμα UV-Vis του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH ₂) ₂ bpy]Cl ³⁺	176
Σχήμα 3.2.5. Φάσμα ¹ H NMR του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH ₂) ₂ bpy]Cl ³⁺ σε MeOD	178
Σχήμα 3.2.6. Φάσμα COSY του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH ₂) ₂ bpy]Cl ³⁺ σε MeOD	179
Σχήμα 3.2.7. Φάσμα ¹ H NMR του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH ₂) ₂ bpy]Cl ³⁺ σε D ₂ O	182
Σχήμα 3.2.8. Φάσμα ¹ H NMR μια διάστασης του d(3'-GTCCAC-5') ₂ σε H ₂ O / D ₂ O 90% / 10%	185
Σχήμα 3.2.9. Φάσμα NOESY του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-GTCGAC-5') ₂	186
Σχήμα 3.2.10. Περιοχή φάσματος NOESY όπου φαίνονται οι κορυφές διασταύρωσης μεταξύ της περιοχής H8 /H6 με τα H1'	188
Σχήμα 3.2.11. Φάσμα ¹ H NMR μια διάστασης του d(3'-GTCGAC-5') ₂ σε D ₂ O / H ₂ O	188
Σχήμα 3.2.12. Φάσμα ¹ H NMR μια διάστασης του d(3'-GTCGAC-5') ₂ σε D ₂ O / H ₂ O στο οποίο φαίνονται τα πρωτόνια των σακχάρων του ολιγονουκλεοτιδίου καθώς και τα πρωτόνια H5 των βάσεων της κυτοσίνης	189
Σχήμα 3.2.13. Περιοχή φάσματος NOESY όπου φαίνονται τα NOE μεταξύ των ιμίνο πρωτονίων με τα πρωτόνια των εξωκυκλικών αμινομάδων	190
Σχήμα 3.2.14. Περιοχή 12.0 – 14.0 ppm του φάσματος 1D του ολιγονουκλεοτιδίου όπου φαίνονται οι κορυφές των ιμίνο πρωτονίων του και πως αυτές μεταβάλλονται παρουσία του συμπλόκου στις διάφορες αναλογίες	192



Σχήμα 3.2.15. Περιοχή 9.0 – 7.70 ppm του φάσματος 1D του ολιγονουκλεοτιδίου όπου φαίνονται οι μεταβολές των σημάτων συντονισμού με την προσθήκη του συμπλόκου	193
Σχήμα 3.2.16. Περιοχή 12.0 – 14.0 ppm του φάσματος 1D του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5') ₂ όπου φαίνονται οι κορυφές των ιμίνου πρωτονίων των βάσεων της γουανίνης και πως αυτές μεταβάλλονται παρουσία του συμπλόκου στις διάφορες αναλογίες	196
Σχήμα 3.2.17. Περιοχή 8.5 – 7.7 ppm του φάσματος 1D του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5') ₂ όπου φαίνονται οι μεταβολές των σημάτων συντονισμού για τα αρωματικά πρωτόνια H8 των βάσεων της γουανίνης με την προσθήκη του συμπλόκου	197
Σχήμα 3.2.18. Περιοχή 7.8 – 7.0 ppm του φάσματος 1D του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5') ₂ όπου φαίνονται οι μεταβολές των σημάτων συντονισμού για τα αρωματικά πρωτόνια H6 των βάσεων της κυτοσίνης με την προσθήκη του συμπλόκου	198
Σχήμα 3.2.18. Γραφική παράσταση της χρονικής εξέλιξης της δέσμευσης του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ στο σκοτάδι στους 37 °C	199
Σχήμα 3.2.19. Γραφική παράσταση της χρονικής εξέλιξης της δέσμευσης του συμπλόκου (α) υπό ακτινοβολία UVA και (β) υπό ακτινοβολία UVA με την παρουσία NaCl	200
Σχήμα 3.2.20. Μεταβολή του <i>T_m</i> (ΔT_m) συναρτήσει της αναλογίας r_b στις διάφορες συγκεντρώσεις NaClO ₄	202
Σχήμα 3.2.21. Φάσμα CD του DNA παρουσία του συμπλόκου σε διάφορες αναλογίες r_b	204
Σχήμα 3.2.22. Φάσμα LD του DNA παρουσία του συμπλόκου σε διάφορες αναλογίες r_b	206
Σχήμα 3.2.23. Διάγραμμα αύξησης της απορρόφησης σε σχέση με την συγκέντρωση του συμπλόκου	207
Σχήμα 3.2.25. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pUC19, με την προσθήκη του συμπλόκου σε διάφορες αναλογίες r_b	209
Σχήμα 3.2.26. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pUC19, με την προσθήκη του συμπλόκου σε αναλογία $r_b = 0.04$ μετά από ακτινοβολία με UVA	210
Σχήμα 3.2.27. Διάσπαση του πλασμιδίου pUC19 από το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ σε αναλογία $r_b = 0.04$ σε συνάρτηση του χρόνου ακτινοβολίας	210
Σχήμα 3.2.28. (Α) Αυτοραδιογραφία πηκτή ουρίας 8 M / πολυακρυλαμιδίου 6% της T7 RNA πολυμεράσης με το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ σε αναλογία $r_b = 0.01$ (Β) Σχηματικό διάγραμμα της αλληλουχίας του εκμαγείου που χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της in vitro σύνθεσης του RNA από το σύμπλοκο του ρουθηνίου	212



ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1.1. Δράση και τρόπος δέσμευσης στο DNA κάποιων φαρμάκων	6
Πίνακας 3.1.1.1. Χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων των υποκαταστατών Υη σε D ₂ O	98
Πίνακας 3.1.2. Χημικές μετατοπίσεις ¹ H NMR των διαστερομερών συμπλόκων Λ1 και Δ1	110
Πίνακας 3.1.3. Χημικές μετατοπίσεις ¹ H NMR των συμπλόκων Λ2 και Δ2	118
Πίνακας 3.1.4. Χημικές μετατοπίσεις ¹ H NMR των συμπλόκων Λ3 και Δ3	126
Πίνακας 3.1.5. Οι χημικές μετατοπίσεις των μη ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων του d(3'-CGCGCG-5') ₂	136
Πίνακας 3.1.6. Χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων του d(3'-CGCGCG-5') ₂	138
Πίνακας 3.1.7. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ¹ H NMR των συμπλόκων Λ1 και Δ1 παρουσία του d(3'-CGCGCG-5') ₂	140
Πίνακας 3.1.8. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ¹ H NMR του d(3'-CGCGCG-5') ₂ παρουσία των συμπλόκων Λ1 και Δ1	140
Πίνακας 3.1.9. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων d(3'-CGCGCG-5') ₂ παρουσία των συμπλόκων Λ1 και Δ1	147
Πίνακας 3.1.10. Θερμοκρασία τήξης του DNA με τα σύμπλοκα Λ1 και Δ1	151
Πίνακας 3.1.11. Θερμοκρασία τήξης του DNA με τα σύμπλοκα Λ2 και Δ2	153
Πίνακας 3.1.12. Θερμοκρασία τήξης του DNA με τα σύμπλοκα Λ3 και Δ3	154
Πίνακας 3.1.13. Απόδοση της διάσπασης του πλασμιδίου pSP73KB με το Δ1 και την χρήση παγιδευτών	167
Πίνακας 3.1.14. Απόδοση της διάσπασης του πλασμιδίου pSP73KB με το σύμπλοκο Δ2 και την χρήση παγιδευτών	169
Πίνακας 3.1.15. Τα κυριότερα αποτελέσματα των συμπλόκων του τύπου Λ- και Δ-[Ru(bpy) ₂ (Yη)] ²⁺	172
Πίνακας 3.2.1. Χημικές μετατοπίσεις ¹ H NMR του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ⁺ 298 K σε MeOH - d ₄	181
Πίνακας 3.2.2. Χημικές μετατοπίσεις ¹ H NMR του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH ₂) ₂ bpy)Cl] ³⁺ σε D ₂ O	184
Πίνακας 3.2.3. Οι χημικές μετατοπίσεις των μη ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων του d(3'-GTTCGAC-5') ₂	189



Πίνακας 3.2.4. Αποτελέσματα δέσμευσης του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ στο σκοτάδι στους $37\text{ }^\circ\text{C}$	199
Πίνακας 3.2.5. Αποτελέσματα δέσμευσης του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ (α) υπό ακτινοβολία UVA (μέγιστη εκπομπή 350 nm) και (β) υπό ακτινοβολία UVA με NaCl	200
Πίνακας 3.2.6. Σημείο τήξης του CT-DNA σε διάφορες αναλογίες r_b και συγκεντρώσεις NaClO_4 . (α) 0.01 M NaClO_4 (β) 0.05 M NaClO_4 (γ) 0.1 M NaClO_4 (δ) 0.2 M NaClO_4	202



ABSTRACT

Diastereomeric oligopyridine-Ruthenium(II)-amino acid conjugated complexes of the general formulas Λ - and Δ -[Ru(bpy)₂(4,4'-(CO₂Y)₂-bpy)]²⁺, where Y = L-AlaCONH₂, L-LysCONH₂, L-HisCONH₂, L-TyrCONH₂, were synthesized and characterized. Their binding properties with ct-DNA and the oligonucleotide duplex d(5'-CGCGCG-3')₂, by means of circular dichroism (CD), NMR spectroscopy and DNA thermal denaturation (*T*_m) curves were studied. CD and *T*_m data indicate that all diastereomeric complexes bind to the DNA major groove, Δ - diastereomers in a similar manner, while Λ -ones in dependence of the nature of the amino acid. NMR studies of the d(5'-CGCGCG-3')₂, and the complexes Δ -1, Δ -2, Λ -1 and Λ -2 indicate that Δ -1 and Δ -2 were bound having the ancillary bpy ligands towards the DNA groove, while the corresponding Λ -1 and Λ -2 were orientated in a similar way, facing the ligand 4,4'-(CO₂Y)₂bpy towards the DNA major groove. Photoinduced DNA cleavage was observed in all cases studied, which take place through singlet oxygen production.

The complex [Ru(terpy)₂(4,4'-(CO₂LysCONH₂)₂-bpy)]²⁺ were spectroscopically characterized and its DNA-binding properties were studied with the oligonucleotide duplex d(5'-CGCGCG-3')₂ and the d(5'-CGCGCG-3')₂, CT-DNA and plasmid DNA. The results show that the complex interact by coordination to the DNA bases preferring the bases guanine with the conjugated amino acid able to provide an additional interaction with the DNA helix. In addition, electrostatic interactions between the studied complex and the DNA polyanion were observed.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύνθεσης πολυπυριδινικών συμπλόκων του Ru(II), του τύπου Λ- and Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(CO₂Y)₂-bpy)]²⁺, όπου Y = L-AlaCONH₂, L-LysCONH₂, L-HisCONH₂, L-TyrCONH₂, τα οποία χαρακτηρίστηκαν πλήρως με διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές τεχνικές. Μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων αυτών με ct-DNA και με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGCG-3')₂, με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD), με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και με την μέθοδο μέτρησης της θερμοκρασίας τήξης του DNA (*T_m*). Τα αποτελέσματα από το CD και το *T_m* έδειξαν ότι τα σύμπλοκα δεσμεύονται στην κύρια αύλακα. Τα Δ διαστερομερή αλληλεπιδρούν με την διπλή έλικα από την πλευρά των διπυριδιλίων με ανάλογο τρόπο, ενώ τα Λ βρέθηκε να αλληλεπιδρούν μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων λόγω του κατάλληλου προσανατολισμού της πλευρικής ομάδας των αμινοξέων του υποκαταστάτη. Επίσης βρέθηκε ότι, η νουκλεολυτική δραστηριότητα των συμπλόκων εξαρτάται από την φύση του συζευγμένου αμινοξέος και η διάσπαση του DNA πραγματοποιείται μέσω ¹O₂.

Συντέθηκε και χαρακτηρίστηκε το σύμπλοκο [Ru(terpy)₂(4,4'-(CO₂LysCONH₂)₂-bpy)]²⁺ και μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του με τα ολιγονουκλεοτίδια d(5'-CGCGCG-3')₂ και d(5'-CGCGCG-3')₂, με CT-DNA και πλασμιδιακό DNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύμπλοκο δεσμεύεται εκλεκτικά στις βάσεις της γουανίνης έχοντας μια επιπλέον αλληλεπίδραση των δύο συζευγμένων λυσινών κατά την δέσμευση του συμπλόκου στο DNA.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

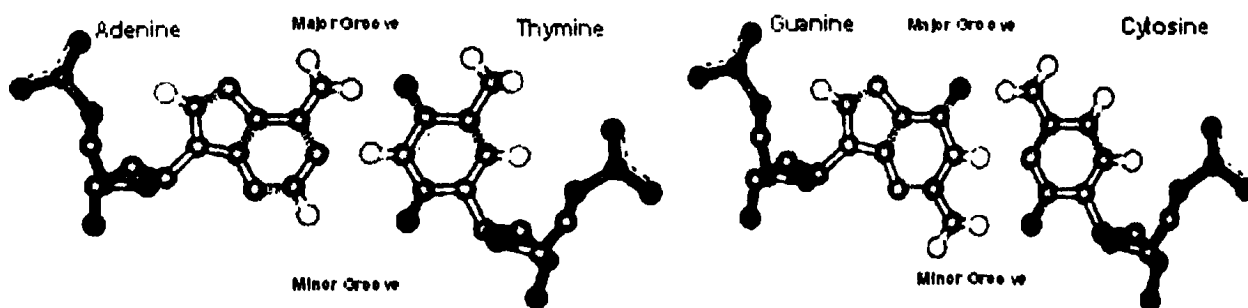


βρίσκονται στο εξωτερικό της έλικας και το επίπεδό τους είναι κάθετο στο επίπεδο των βάσεων και παράλληλο με τον άξονα της έλικας.

(γ) Η εξωτερική διάμετρος της έλικας είναι 20 Å ενώ οι 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 δεοξυριβονουλεοτίδια σε κάθε αλυσίδα, δηλαδή σε διαστήματα 34 Å.

(δ) Οι δύο αλυσίδες συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων με μοναδικό τρόπο, ώστε πάντα η αδενίνη να συνδέεται με την θυμίνη και 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 την 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 σχηματίζονται μεταξύ της αδενίνης και της θυμίνης ανάμεσα στο αρωματικό ιμίνο πρωτόνιο της θυμίνης με το N1 της αδενίνης και του ενός υδρογόνου της εξωκυκλικής αμινομάδας της αδενίνης με το O4 της θυμίνης. Για τα ζευγάρια των βάσεων γουανίνης - κυτοσίνης οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται ανάμεσα στο αρωματικό ιμίνο πρωτόνιο της γουανίνης με το N3 της κυτοσίνης, του ενός υδρογόνου της εξωκυκλικής αμινομάδας της κυτοσίνης με το O6 της γουανίνης και του ενός υδρογόνου της εξωκυκλικής αμινομάδας της γουανίνης με το O2 της κυτοσίνης (σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2. Δεσμοί υδρογόνου Watson – Crick για τα ζευγάρια των βάσεων A – T και G – C.

Εκτός από τα πιο πάνω δομικά στοιχεία συμπεράναν ακόμη ότι το DNA έχει δύο κύριες λειτουργίες:

1. Μεταγραφή: Οι πληροφορίες του περιέχονται στο DNA ανακτώνται από το ριβονουκλεϊνικό οξύ, το RNA, και χρησιμοποιούνται για την σύνθεση των πρωτεϊνών στο κύτταρο. Οι πρωτεΐνες συμμετέχουν σε όλες τις διαδικασίες του οργανισμού και διαδραματίζουν πολλούς ρόλους. π.χ. σαν ορμόνες, ένζυμα, μεταφορείς, δομικές πρωτεΐνες, δέκτες, ρυθμιστές κ.λ.π.
2. Αντιγραφή: Το DNA είναι αρμόδιο για τον αναδιπλασιασμό του, δηλαδή την αντιγραφή του. Κατά την αντιγραφή, οι δύο αλυσίδες της διπλής έλικας ξεδιπλώνονται και ξεχωρίζουν καθώς συντίθενται νέες αλυσίδες. Κάθε κλώνος της μητρικής αλυσίδας περιέχει την δομή του γενετικού κώδικα, οπότε το ξεδίπλωμα σε χωριστούς κλώνους με τον επακόλουθο σχηματισμό συμπληρωματικών κλώνων για κάθε έναν από τους μητρικούς, θα οδηγήσει στην δημιουργία δυο νέων θυγατρικών αλυσίδων DNA, κάθε μία από τις οποίες είναι αντίγραφο της μητρικής.

Η μεταγραφή και η αντιγραφή είναι ζωτικής σημασίας στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων καθώς επίσης και στην ομαλή λειτουργία όλων των διαδικασιών του οργανισμού. Το DNA αρχίζει την αντιγραφή ή την μεταγραφή του, μόνο όταν λαμβάνει σήμα, το οποίο είναι συχνά υπό μορφή ρυθμιστικής πρωτεΐνης που δεσμεύεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA. Έτσι, όταν ένα άλλο μόριο έχει την ικανότητα να μιμηθεί τις ιδιότητες αυτής της ρυθμιστικής πρωτεΐνης, τότε η λειτουργία του DNA μπορεί να διαμορφωθεί τεχνητά, να εμποδιστεί ή να ενεργοποιηθεί με τη δέσμευση αυτού του μορίου αντί της πρωτεΐνης. Κατά συνέπεια, ένα τέτοιο μόριο μπορεί να δράσει ως φάρμακο ενεργοποιώντας ή παρεμποδίζοντας την λειτουργία του DNA, όταν αυτό απαιτείται σε ασθένειες όπου αυτό θεωρείται κρίσιμο. Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται μερικά γνωστά μόρια που χρησιμοποιούνται σήμερα ως φάρμακα.

Πίνακας 1.1. Δράση και τρόπος δέσμευσης στο DNA κάποιων φαρμάκων.

Φάρμακο	Δράση	Τρόπος δέσμευσης	PDB
Hoechst 33258	Αντικαρκινικό	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	264D
Netripsin	Αντικαρκινικό, Αντιϊκό	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	121D
Pentamidine	Ενεργό ενάντια στην πνευμονοκύστη <i>carinii</i>	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	1D64
Berenil	Έναντι τρυπανοσώματος	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	1D63
Guanyl bisfuramidine	Ενεργό ενάντια στην πνευμονοκύστη <i>carinii</i>	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	227D
Distamycin	Αντικαρκινικό, Αντιϊκό	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	2DND
SN7167	Αντικαρκινικό, Αντιϊκό	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	328D
SN6999	Αντικαρκινικό, Αντιϊκό	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	144D
Nogalamycin	Ενεργό ενάντια στο πλασμίδιο <i>falciparum</i>	Δέσμευση με παρεμβολή	182D
Menogaril	Αντικαρκινικό, Αντιβιοτικό	Δέσμευση με παρεμβολή	202D
Mithramycin	Αντικαρκινικό, Αντιβιοτικό	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	146D
Plicamycin	Αντικαρκινικό, Αντιβιοτικό	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	1BP8
Chromomycin A3	Αντικαρκινικό, Αντιβιοτικό	Δέσμευση στην ελάσσονα αύλακα	1EKH
<i>cis-Platin</i>	Αντικαρκινικό, Αντιβιοτικό	Ομοιοπολική δέσμευση	1AU5



Η δέσμευση των πιο πάνω μορίων στο DNA θα παρήγε μικρότερες ποσότητες της απαραίτητης πρωτεΐνης και θα μπορούσε να σταματήσει την αντιγραφή του DNA, ανάλογα με ποια περιοχή στοχεύει το κάθε φάρμακο. Τελικά η παρεμπόδιση αυτή μπορεί να περιορίσει την πρωτεϊνική σύνθεση προκαλώντας το θάνατο των κυττάρων, αλλά κυρίως να πληγούν περισσότερο εκείνα τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται ανώμαλα με υψηλότερους των υγιών κυττάρων ρυθμούς, δηλαδή τα καρκινικά κύτταρα.

Μια κατηγορία τέτοιων μορίων είναι και τα σύμπλοκα μετάλλων τα οποία περιλαμβάνουν οργανικά μόρια ως υποκαταστάτες και τα οποία μπορούν να έχουν γεωμετρία η οποία συναρτάται από το μεταλλικό κέντρο, ενώ οι διαφορετικές βαθμίδες οξειδωσης του μεταλλικού ιόντος μπορούν να προσφέρουν άριστη βάση για καταλυτική οξείδωση βιομορίων που αλληλεπιδρούν μαζί του.

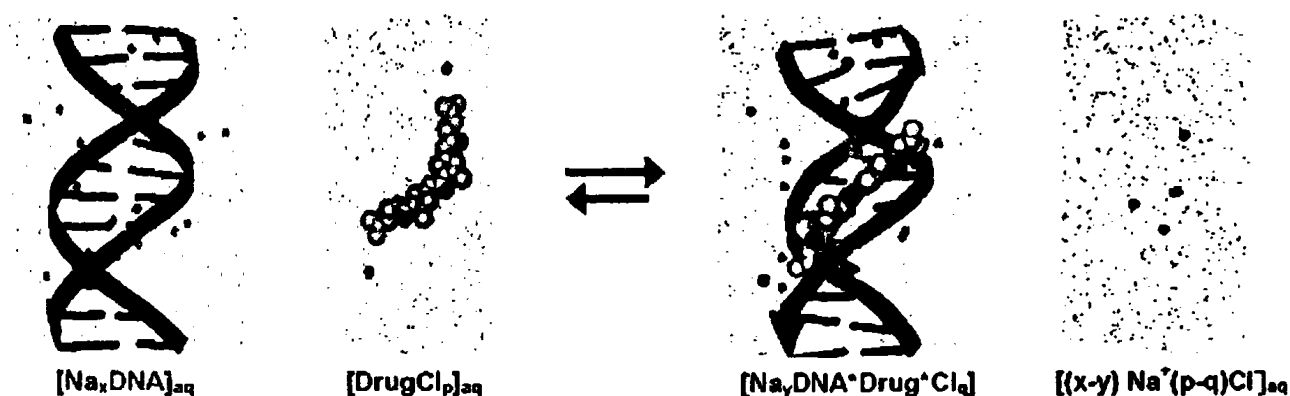
Οι τρόποι που μπορούν τα μεταλλικά σύμπλοκα να αλληλεπιδράσουν με το DNA περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις με απευθείας δεσμό ένταξης (υπάρχει πληθώρα από άτομα δότες στα βιολογικά μόρια), ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (για τις περιπτώσεις των ανιονικών ή κατιονικών συμπλόκων), δυνάμεις Van der Waals (εκ μέρους των υποκαταστατών), π -αρωματικές αλληλεπιδράσεις κ.λ.π. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν εκείνα τα σύμπλοκα που δεσμεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA, αλληλεπιδρώντας από την μείζονα ή την ελάσσονα αύλακα ή ακόμη να παρεμβάλλονται μεταξύ των νουκλεϊνικών βάσεων. Η φύση αλλά και τα δομικά χαρακτηριστικά των μορίων αυτών παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε μια πιθανή εκλεκτικότητα κατά την αλληλεπίδρασή τους με το DNA. Η αλληλεπίδραση χωρίς δεσμούς ένταξης είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία και προτιμάται στον σχεδιασμό φαρμάκων από τον σχηματισμό απευθείας δεσμού του συμπλόκου ή μορίου με το DNA, λόγω της υψηλής τοξικότητας που παρουσιάζει αυτή στον οργανισμό. Εντούτοις όμως, η ισχυρή δέσμευση των μορίων αυτών είναι ένα σημαντικό τους πλεονέκτημα.

Είναι σημαντικό, να κατανοηθεί ο τρόπος δράσης των μορίων που αλληλεπιδρούν με το DNA. Κατά αρχήν, ο σχεδιασμός των μορίων που έχουν την «απαραίτητη συγγένεια» για το DNA απαιτεί γνώση (α) του πώς η δομή του μορίου συσχετίζεται με τον τρόπο της δέσμευσης και (β) ποιές παραμορφώσεις στη δομή του DNA μπορούν να οδηγήσουν ένα μόριο στις επιθυμητές θεραπευτικές ιδιότητες. Αφετέρου, ο προσδιορισμός των δυνάμεων



που περιλαμβάνονται σε τέτοιες αλληλεπιδράσεις, είναι θεμελιώδους σημασίας, ούτως ώστε να σχεδιαστεί μια εκλεκτική αναγνώριση συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχο του DNA [2]. Ως ένα απλό παράδειγμα προσέγγισης ενός φαρμάκου με το DNA αποτελεί η αρχική ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του φαρμάκου και του DNA.

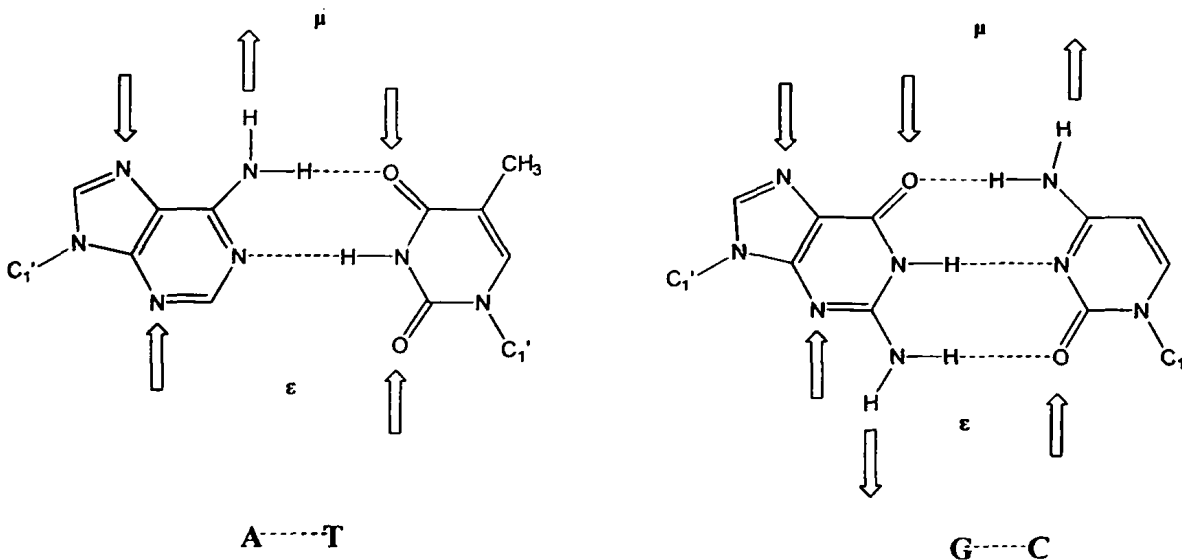
Το DNA είναι ένας πολυηλεκτρολύτης με υψηλό αρνητικό φορτίο λόγω των φωσφορικών ομάδων, όπου σε υδατικό διάλυμα αντισταθμίζονται με ιόντα Na^+ . Το φάρμακο στο διάλυμα παρέχει κατιόντα φαρμάκου και ανιόντα χλωρίου αφού πρόκειται για το υδροχλωρικό του άλας. Όταν το φάρμακο αλληλεπιδράσει με το DNA, ιόντα Na^+ από το DNA, μετατοπίζονται και το θετικό φορτίο του κατιόντος φαρμάκου πλέον αντισταθμίζει το ανιονικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων κοντά στην θέση δέσμευσης. Με αυτό τον τρόπο απελευθερώνονται ιόντα Na^+ από το DNA και ιόντα Cl^- από το άλας του φαρμάκου, τα οποία αντισταθμίζονται πλήρως μεταξύ τους. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση φαρμάκου-DNA προκαλεί κάποιες μικρές παραμορφώσεις της γεωμετρίας της διπλής έλικας του DNA καθώς και μια κατάλληλη διάταξη του φαρμάκου. Στη συνέχεια η προσαρμογή του φαρμάκου στην τελική θέση καθοδηγείται από άλλες δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ φαρμάκου και DNA.



Σχήμα 1.3. Τρόπος σύνδεσης του φαρμάκου με το DNA.

1.2. Αρχές αναγνώρισης συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA

Η αναγνώριση μιας αλληλουχίας ή μιας περιοχής ενός μορίου DNA, είτε αυτή πραγματοποιείται από μικρά μόρια είτε από πρωτεΐνες, μπορεί να είναι γενική και να αφορά οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο ή αλληλουχία νουκλεοτιδίων ή πολύ ειδική, αναγνωρίζοντας μόνο μια καθορισμένη αλληλουχία σε καθορισμένη θέση. Αυτό μπορεί να γίνει πολύ αποτελεσματικά από το ίδιο το DNA [3]. Η αναγνώριση μεταξύ των κλώνων του DNA στηρίζεται στον μοναδικό σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων. Αυτός είναι ο τρόπος με τον οποίο η άμεση αναγνώριση των πληροφοριών της αλληλουχίας του DNA μπορεί να επιτευχθεί από μικρά μόρια και πρωτεΐνες αλλά και από το ίδιο τον κλώνο του DNA. Για να πραγματοποιηθεί η άμεση αναγνώριση, το εισερχόμενο μόριο πρέπει να έχει πρόσβαση στα ζεύγη των βάσεων μέσω μιας από τις δύο αύλακες του DNA. Ο προσανατολισμός αυτής της εισερχόμενης ομάδας είναι σημαντικός αφού ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου, κι επομένως η άμεση αναγνώριση συνιστά ειδική αλληλεπίδραση με συγκεκριμένη κατεύθυνση.



Σχήμα 1.4. Οι θέσεις σχηματισμού δεσμών υδρογόνου στα ζεύγη A – T και G – C. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση όπου μπορούν να δεσμευτούν ομάδες άλλων μορίων με δεσμούς υδρογόνου.

Στα άκρα των βάσεων υπάρχουν ομάδες με δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (σχήμα 1.4) 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, κατέχει μια διάταξη (δότης, αποδέκτης, αποδέκτης) η οποία διαφέρει από το αντίστροφο ζεύγος G – C. 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 DNA B-τύπου, καθιστά απίθανο τον ταυτόχρονο σχηματισμό και των τριών δεσμών υδρογόνου στις διαθέσιμες θέσεις ενός ζεύγους C – G ή G – C, κυρίως για λόγους στερικής παρεμπόδισης.

Γενικά, η πρόσβαση στις βάσεις, σε οποιαδήποτε αύλακα, είναι απαραίτητη για την άμεση αναγνώριση μέσω δεσμών υδρογόνου. Αυτή η προσβασιμότητα εξαρτάται από το εύρος της αύλακας, το οποίο στη συνέχεια εξαρτάται άμεσα από την αλληλουχία μέσω διαφόρων παραγόντων. Έχει διαπιστωθεί από τις κρυσταλλικές δομές των ολιγονουκλεοτιδίων ότι οι ελάσσονες αύλακες αλληλουχιών πλούσιες σε A – T τείνουν να είναι στενότερες από το μέσο όρο. Το εύρος τους εξαρτάται τόσο από το μήκος όσο και από τη φύση της αλληλουχίας A – T. 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 αναγνώριση 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 εκλεκτική. Οι ίδιες οι βάσεις παρέχουν διάφορους μηχανισμούς για μια τέτοια αναγνώριση. Υπάρχουν επίσης σημαντικές διαφορές στον ηλεκτρονιακό χαρακτήρα μεταξύ των ζευγών A – T και G – C, με το τελευταίο να είναι πιο πλούσιο σε ηλεκτρονιακό φορτίο. Έτσι, επίπεδα μόρια με έλλειμμα ηλεκτρονίων που μπορούν να ευθυγραμμιστούν με ζεύγη βάσεων, τείνουν να δεσμεύονται κατά προτίμηση σε ζεύγη G – C. Η μεθυλομάδα της θυμίνης μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση



της αλληλουχίας, σχηματίζοντας σταθερές επαφές Van der Waals με υδροφοβικές πλευρικές αλυσίδες όπως αυτές τις λευκίνης, της ισολευκίνης και της αλανίνης. Η έμμεση αναγνώριση 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 – μορίου. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ογκώδης μεθυλομάδα της θυμίνης, η οποία επιτρέπει την πρόσβαση σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις [3].

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 η ανακάλυψη ότι για το DNA – B τύπου, παρατηρείται ελάχιστο του ηλεκτροστατικού δυναμικού στη μείζονα αύλακα των αλληλουχιών όλιγο (dG)(dC) και την ελάσσονα αύλακα των όλιγο (dA)(dT) στην αλληλουχία 5'-AATT του δωδεκαμερούς Dickerson – Drew d(CGCGAATTCGCG)₂. Όλα αυτά έχουν περισσότερο αρνητικά δυναμικά από εκείνα 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 ηλεκτρονιακός παράγοντας είναι σημαντικός στο να κατευθύνει ένα εισερχόμενο μόριο σε μια συγκεκριμένη περιοχή της αλληλουχίας.

1.3. Ομοιοπολική δέσμευση μορίων ή συμπλόκων με το DNA

Όπως προαναφέραμε η δέσμευση μεταλλικών συμπλόκων με απευθείας δεσμό ένταξης με το DNA οδηγεί στην πλήρη παρεμπόδιση των διαδικασιών λειτουργίας του DNA και επομένως στο θάνατο των κυττάρων. Η δέσμευση αυτή είναι μια μη αντιστρεπτή διαδικασία. Κατά την αλληλεπίδραση συμπλόκων μετάλλων με το DNA σχηματίζονται απ' ευθείας δεσμοί με τα άτομα αζώτου των βάσεων του DNA – B τύπου και του μεταλλικού κέντρου. Το N7 της γουανίνης και το N7 της αδερίνης είναι στερικά πιο «διαθέσιμα» για τέτοιου είδους αλληλεπίδραση ενώ στην μονόκλωνη έλικα του DNA πέρα από αυτά τα άτομα, είναι διαθέσιμα και το άτομο N3 της κυτοσίνης και το N1 της αδερίνης. Τα άτομα



δέσμευσης προτιμώνται σύμφωνα με την σειρά: N7 γουανίνης > N7 αδενίνης, N1 αδενίνης > N3 κυτοσίνης [4]. Ακόμη το N7 της αδενίνης αποτελεί μαζί με το N7 της γουανίνης ένα από τα πιο βασικά άτομα αζώτου της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας [5].

Το *cisplatin*, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], αποτελεί το πρώτο αντικαρκινικό φάρμακο που συνδέεται με απευθείας δεσμό στο DNA αναστέλλοντας έτσι την σύνθεση του DNA [6, 7]. Η



δραστηκότητα του *cisplatin* σε βιολογικά κύτταρα εξαρτάται από την συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου [8]. Όταν το φάρμακο χορηγείται, η υψηλή συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου στο πλάσμα του αίματος εμποδίζει την υδρόλυση των χλωρίων (επίδραση κοινού ιόντος) και κατά συνέπεια την δραστηκότητά του. Μετά την διάχυση μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, το φάρμακο συναντά συγκέντρωση χλωρίου 4 mM, ικανή για να απομακρυνθούν τα χλώρια ώστε να μπορούν να λάβουν χώρα αντιδράσεις με βιολογικούς στόχους.

Κατά την μετάβαση του *cisplatin* μέσω της κυτταρικής μεμβράνης πραγματοποιείται η υδρόλυση του όπου ένας Cl⁻ υποκαταστάτης ανταλλάσσεται αργά με ένα μόριο νερού, αποτελώντας έτσι το καθοριστικό βήμα στην δέσμευση του φαρμάκου με το DNA [9]. Αν και το *cisplatin* ενώνεται με όλες τις βάσεις του DNA, υπάρχει ισχυρή προτίμηση για σχηματισμό δεσμού με το άτομο N7 της γουανίνης [10, 11]. Το πιο πιθανό είναι με την δέσμευσή του στη γουανίνη να σχηματίζει εν συνεχεία ενδοκλωνικούς δεσμούς με γειτονικές βάσεις της γουανίνης, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό του DNA.

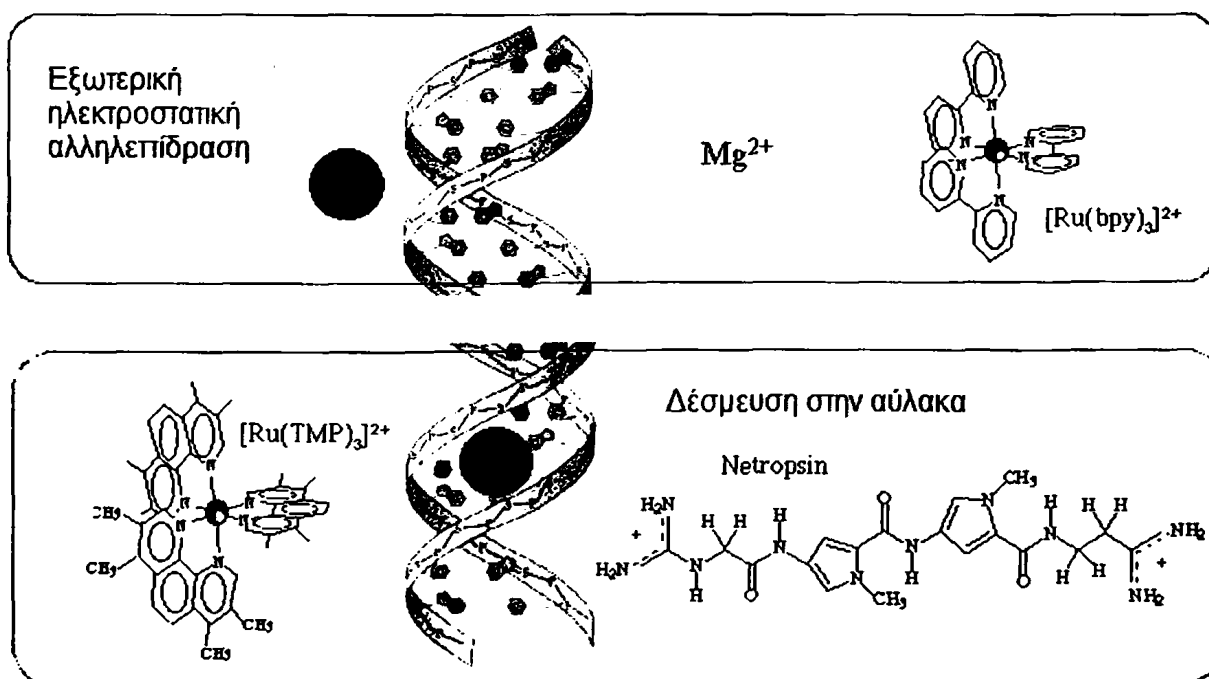
1.4. Μη ομοιοπολική δέσμευση μορίων ή συμπλόκων με το DNA

Σύμπλοκα μετάλλων που δεν διαθέτουν ελεύθερες θέσεις για την δημιουργία απ' ευθείας δεσμού με το DNA δεσμεύονται σε αυτό με τρεις κυρίως τρόπους :

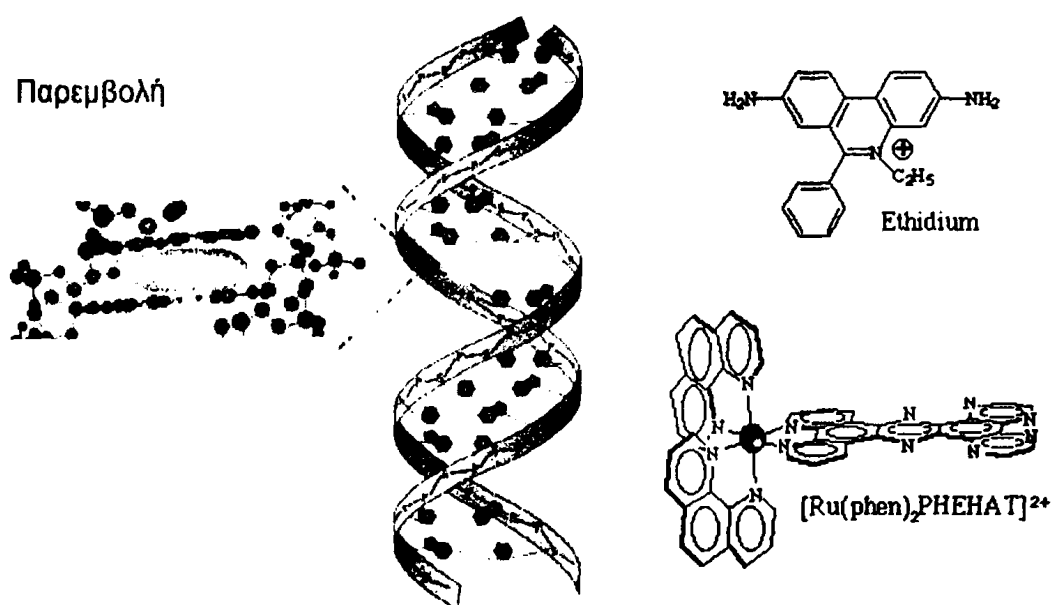
- Δέσμευση κατά μήκος της εξωτερικής επιφάνειας της έλικας μέσω αλληλεπιδράσεων οι οποίες είναι γενικά μη ειδικές και είναι κυρίως ηλεκτροστατικές.



- Δέσμευση στην αύλακα, η οποία περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις του δεσμευμένου μορίου με τα άκρα των ζευγών βάσεων σε οποιασδήποτε από τις αύλακες (μείζονα ή ελάσσονα) των νουκλεϊνικών οξέων.
- Παρεμβολή μεταξύ των βάσεων από υποκαταστάτες συμπλόκων με επίπεδη αρωματική επιφάνεια. Οι πρώτοι δύο τρόποι δέσμευσης δεν προκαλούν σημαντική μεταβολή στη διαμόρφωση του νουκλεϊνικού οξέος αλλά μπορεί να προκαλέσουν μεταπτώσεις μεταξύ διαφορετικών δομών σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Όμως σε αρκετές περιπτώσεις οι μικρές μεταβολές είναι ικανές να αναστείλουν βασικές λειτουργίες του κυττάρου. Η παρεμβολή όμως μεταξύ των βάσεων απαιτεί μεταβολή στις γωνίες της αλυσίδας σακχάρου – φωσφορικών λόγω του διαχωρισμού γειτονικών ζευγών βάσεων κατά μια 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, αποσπείρωση της έλικας κ.τ.λ.



Σχήμα 1.4. Τρόποι αντιστρεπτής αλληλεπίδρασης ενός μορίου με τη διπλή έλικα του DNA.



Σχήμα 1.5. Παρεμβολή ενός μορίου μεταξύ των βάσεων του DNA.

1.4.1. Ηλεκτροστατικές 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 [12] έχουν δείξει ότι απλά ιόντα, όπως αυτά των αλκάλιων, δεσμεύονται σε νουκλεϊνικά οξέα κυρίως ως συνάρτηση της πυκνότητας φορτίου του πολυμερούς. Σε DNA – B τύπου, για παράδειγμα, αν το μόριο παρασταθεί ως μια γραμμική κατιόντων αλκάλιων 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 DNA με φορτία που απέχουν μικρότερα διαστήματα των 7 Å, πρέπει να αντισταθμίζονται από επιπλέον ιόντα του διαλύματος ώστε να επιτύχουν την σταθεροποίηση. Η αλληλεπίδραση των ιόντων με το DNA δημιουργεί ένα όρο μη ευνοϊκής εντροπίας στην συνολική ενέργεια διαμόρφωσης του πολυμερούς. Αυτός ο μη ευνοϊκός όρος εξουδετερώνεται τελικά από τις πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις στην διπλή έλικα του DNA.

Τα αντισταθμιστικά ιόντα εξουδετερώνουν μέχρι να ελαττωθεί η πυκνότητα του φορτίου στο σταθερό επίπεδο του ενός φορτίου ανά 7 Å. Επιπλέον αντισταθμιστικά ιόντα αλληλεπιδρούν με τα εναπομείναντα φορτία του DNA 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 ιοντική ισχύς του διαλύματος μεταβάλλεται σε μεγάλο εύρος.

Για την B – μορφή της διπλής έλικας του 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 υπόψη και οι αλληλεπιδράσεις τύπου Debye – Hückel. Τα δεσμευμένα αντισταθμιστικά ιόντα ελαττώνουν το αποτελεσματικό φορτίο των νουκλεϊνικών οξέων και επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες του στο διάλυμα. Σε σταθερή θερμοκρασία, η απελευθέρωση των αντισταθμιστικών ιόντων μπορεί να οδηγήσει σε μετουσίωση αλλά και σε αύξηση της δέσμευσης κατιονικών συμπλόκων καθώς ελαττώνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος. Συνεπώς, τόσο η θερμοκρασία τήξης (T_m) των νουκλεϊνικών οξέων όσο και η σταθερά δέσμευσης (K_b) για την δέσμευση κατιονικών υποκαταστατών εξαρτάται σημαντικά από την ιοντική 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 είναι ταχεία. Κινητικές μελέτες δείχνουν ότι κατιονικά σύμπλοκα, τα οποία δεσμεύονται στο DNA στις αύλακες ή μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις, 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.

1.4.2. Δέσμευση στις αύλακες του DNA

Η δέσμευση ενός μορίου στις αύλακες του DNA ακολουθεί τον πιο κάτω μηχανισμό: Όταν η ένωση συνδέεται στις αύλακες, υφίσταται μεταφορά στο υδρόφοβο περιβάλλον της έλικας από το υδατικό διάλυμα στην αύλακα. Εκεί, πραγματοποιούνται ειδικές μοριακές αλληλεπιδράσεις όπως Van der Waals και δεσμοί υδρογόνου με το DNA [13]. Η μείζονα και η ελάσσονα αύλακα διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά το ηλεκτρονιακό δυναμικό τους, τα χαρακτηριστικά των δεσμών υδρογόνου, τις στερικές παρεμποδίσεις 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.

Γενικά, τα μόρια που συνδέονται στην ελάσσονα αύλακα έχουν διάφορους απλούς αρωματικούς υποκαταστάτες 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 ελάσσονα αύλακα του DNA γενικά δεν έχει τόσο μεγάλο εύρος στις πλούσιες σε A – T σε σχέση με τις πλούσιες σε C – G περιοχές και μπορεί να δεχτεί αρωματικά μόρια καλύτερα στις A – T παρά στις C – G αλληλουχίες. Με την κατάλληλη στρέψη των αρωματικών δακτυλίων, το μόριο μπορεί να ταιριάξει στην ελάσσονα αύλακα και να σχηματίζει 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 των βάσεων στο «πάτωμα» (floor) της αύλακας.

Δεσμοί υδρογόνου μπορούν να σχηματιστούν μεταξύ των ζευγών A – T και του δεσμευμένου μορίου στο καρβονυλικό οξυγόνο του C2 της θυμίνης ή στο άζωτο N3 της αδενίνης καθώς τα άτομα αυτά αποτελούν αποδέκτες δεσμών υδρογόνου. Παρόλο που παρόμοιες ομάδες υπάρχουν και στα ζεύγη C – G, η αμινομάδα της γουανίνης παρεμποδίζεται στερικά για τον σχηματισμό δεσμού υδρογόνου στο άζωτο N3 της γουανίνης και στο καρβονυλικό οξυγόνο του C2 της κυτοσίνης. Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της αμινομάδας της γουανίνης και του καρβονυλικού οξυγόνου στα ζεύγη των βάσεων C – G βρίσκεται στην ελάσσονα αύλακα και παρεμποδίζει στερικά την είσοδο των μορίων στην



αύλακα που είναι πλούσια σε C – G. Έτσι, οι αρωματικοί δακτύλιοι πολλών μορίων σχηματίζουν επαφές με τα πρωτόνια H₂ της αδενίνης της ελάσσονος αύλακας του DNA. Ο Pullman και οι συνεργάτες του [14] έδειξαν ότι το αρνητικό δυναμικό είναι υψηλότερο στην ελάσσονα αύλακα σε περιοχές A – T σε σχέση με τις πλούσιες σε C – G 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 C – G σχεδιάζοντας μόρια που μπορούν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου από την αμινομάδα της γουανίνης.

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 ντισταμινάση αποτελούν δύο τυπικά παραδείγματα μορίων που δεσμεύονται στην ελάσσονα αύλακα του DNA.



Ο Dickerson και οι συνεργάτες του [15] παρουσίασαν την κρυσταλλική δομή της νετροψίνης συνδεδεμένη με την διπλή έλικα d(CGCGAATTCGCG)₂ η οποία περιέχει σημαντικές μοριακές λεπτομέρειες σχετικά με την δέσμευση του μορίου 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 ολιγομερές. Οι τρεις αμιδικές ομάδες NH, που φέρει το μόριο της νετροψίνης, κατευθύνονται προς το εσωτερικό σχηματίζοντας επιμηκισμένους δεσμούς υδρογόνου με το άζωτο N₃ της αδενίνης και με το οξυγόνο του C₂ της θυμίνης. Το μόριο συγκρατείται στο κέντρο της αύλακας με δεσμούς Van der Waals με τα άτομα του DNA που σχηματίζουν τα τοιχώματα της αύλακας. Οι δεσμοί αυτοί συγκρατούν τους πυρολικούς δακτυλίους του μορίου σχεδόν παράλληλους προς τα τοιχώματα της αύλακας, ενώ λόγω της ελικοειδούς διαμόρφωσης της αύλακας, οι δύο πυρολικοί δακτύλιοι στρέφονται κατά 33 °, ο ένας ως προς τον άλλο.

Τα δύο κατιονικά άκρα της νετροψίνης επικεντρώνονται επίσης στην ελάσσονα αύλακα και δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τα άζωτα N₃ των εξωτερικών βάσεων της

αδενίνης της κεντρικής αλληλουχίας AATT. Στερικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πυρολικών - 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 ελάσσονας αύλακας στην περιοχή AATT και μια μικρή κάμψη του άξονα της έλικας γύρω από τη θέση σύνδεσης.

Η ντισταμυσίνη έχει δομή παρόμοια με τη νετροψίνη και αλληλεπιδρά με το DNA όπως και το μόριο της νετροψίνης. Οι Rich και Wang έλυσαν την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου του ολιγομερούς d(CGCGAAATTCGCG)₂ με τη ντισταμυσίνη [16] και βρήκαν ότι έχει σχήμα το οποίο ταιριάζει με την καμπυλότητα της ελάσσονος αύλακας στην οποία και δεσμεύεται τελικά το φάρμακο. Στην κρυσταλλική αυτή 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 άζωτο N3 της αδενίνης και με το οξυγόνο του C2 της θυμίνης. Τουλάχιστον 3 επιμηκισμένοι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται 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 νισταμυσίνης θα εξαρτάται αναμφίβολα από την τοπική αλληλουχία και τη γεωμετρία της έλικας. Το μόριο της ντισταμυσίνης φέρει τρεις πυρολικούς δακτυλίους συγκριτικά με τους δύο του μορίου της νετροψίνης και καλύπτει πέντε ζεύγη A - T στο σύμπλοκο συγκριτικά με τα τέσσερα στην περίπτωση της νετροψίνης.

Μετά την πρωτοποριακή ανακάλυψη της νετροψίνης και της ντισταμυσίνης, δύο φαρμάκων με εκλεκτικότητα ως προς τις αλληλουχίες A - T, έγιναν πολλές προσπάθειες για τη σύνθεση αναλόγων τους, που να παρουσιάζουν παρόμοια ή και μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ως προς τις αλληλουχίες A - T αλλά και C - G. Έτσι, βρέθηκαν αρκετά τέτοια παράγωγα όπως είναι οι λεξιτροψίνες και τα πολυαμίδια τύπου φουρκέτας τα οποία δείχνουν εκλεκτικότητα τόσο στις αλληλουχίες A - T αλλά και στις C - G [17].



1.4.3. Παρεμβολή μεταξύ των βάσεων του DNA

Στις αρχές του 1960, ο Legman και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν διάφορες φυσικές μελέτες πάνω στην αλληλεπίδραση του DNA με επίπεδα αρωματικά κατιόντα και συμπέραναν ότι τα επίπεδα αρωματικά μόρια μπορούσαν να συνδεθούν στο DNA μέσω μιας διαδικασίας την οποία ονόμασαν παρεμβολή [15]. Αυτός ο τύπος δέσμευσης έχει βρεθεί σήμερα για ένα μεγάλο αριθμό πολυκυκλικών αρωματικών κατιόντων. Όπως το κλασικό DNA - B τύπου, αποτελεί σήμερα μόνο μία από τις πολλές δυνατές 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 εισαχθούν μεταξύ των ζευγών των 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 (αποελίκωση, 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 είναι η κάμψη της έλικας στη θέση της παρεμβολής. Το μέγεθος της αποελίκωσης του DNA εξαρτάται από τη δομή της παρεμβαλλόμενης ένωσης και από την αλληλουχία του DNA με τέτοιο τρόπο ώστε δεν είναι ακόμη απόλυτα κατανοητό.

Το μέγεθος της αποελίκωσης του DNA λόγω παρεμβολής μπορεί να μετρηθεί πειραματικά με κυκλικό υπερελικωμένο DNA κλειστού κύκλου, κατά το οποίο η γωνία αποελίκωσης που υπολογίζεται από διάφορα πειράματα ηλεκτροφόρησης αποτελεί τον μέσο όρο όλων των θέσεων παρεμβολής στο DNA τυχαίας αλληλουχίας. Ωστόσο, οι πραγματικές γωνίες αποελίκωσης στην κάθε θέση δέσμευσης στις τοπικές αλληλουχίες μπορεί να ποικίλουν. Αντιπροσωπευτικά πειράματα αποτελούν οι μεταβολές κατά την μέτρηση του ιξώδους του DNA ή του συντελεστή καθίζησης ή της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του κυκλικού υπερελικωμένου DNA κλειστού κύκλου, που προκαλούνται από την αποελίκωση της έλικας [18].

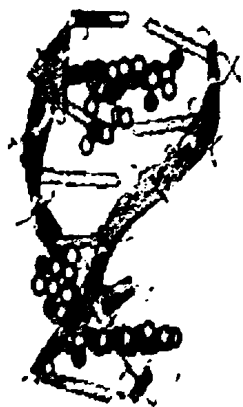
Κατά την παρεμβολή παρατηρείται ηλεκτρονιακή αλληλεπίδραση του παρεμβαλλόμενου μορίου με την έλικα [18]. Τα επίπεδα αρωματικά συστήματα των παρεμβαλλόμενων ενώσεων παραλληλίζονται (stack) με τα ζεύγη των βάσεων του DNA με αποτέλεσμα η παρεμβαλλόμενη επιφάνεια να καθλώνεται ισχυρά μεταξύ των αρωματικών, ετεροκυκλικών ζευγών βάσεων και να σταθεροποιείται εντός της έλικας μέσω αλληλεπιδράσεων συσώρευσης $\pi - \pi$ (stacking). Η ηλεκτρονιακή αυτή αλληλεπίδραση μεταξύ παρεμβαλλόμενου μορίου και των βάσεων του DNA μπορεί να διαπιστωθεί από διάφορα πειράματα. Μια κλασική μέθοδος για την ανίχνευση ενώσεων που συνδέονται με παρεμβολή παρέχεται από μεθόδους γραμμικού διχρωϊσμού (LD), από τις οποίες διαπιστώνονται παρόμοιες τιμές διχρωϊσμού των παρεμβαλλόμενων μορίων και των βάσεων του DNA. Ο προσανατολισμός των μορίων που συνδέονται στις αύλακες του DNA είναι συχνά κάθετος στις βάσεις του DNA (οι βάσεις είναι κάθετες ως προς τον άξονα z του DNA), ενώ στην περίπτωση των παρεμβαλλόμενων μορίων υιοθετείται μία παράλληλη διαμόρφωση με τις βάσεις. Η παρεμβολή ενός μορίου επηρεάζει σημαντικά την ευκαμψία του DNA και τον προσανατολισμό του [18]. Παρατηρείται σημαντική αλληλεπικάλυψη μεταξύ των ζευγών των βάσεων και του παρεμβαλλόμενου μορίου, που έχει ως αποτέλεσμα, το παρεμβαλλόμενο μόριο να συγκρατείται σταθερά και να υιοθετεί έναν κάθετο προσανατολισμό ως προς τον άξονα z της έλικας, δίνοντας ανάλογο με το DNA φαινόμενο γραμμικού διχρωϊσμού.

Οι απλές παρεμβαλλόμενες ενώσεις δεν παρουσιάζουν σημαντική εκλεκτικότητα σε κάποιο ζεύγος βάσεων κατά την δέσμευση. Υπάρχει μια μικρή προτίμηση για το ζεύγος C - G και αυτό έρχεται σε αντίθεση με την προτίμηση ως προς την αλληλουχία A - T πολλών ενώσεων που δεσμεύονται στο εξωτερικό μέρος της έλικας. Έχει προταθεί ότι η γενική προτίμηση για C - G οφείλεται στη μεγαλύτερη διπολική ροπή του ζεύγους C - G σε σχέση με το A - T με αποτέλεσμα τα ζεύγη C - G να προκαλούν πόλωση των δακτυλίων των παρεμβαλλόμενων μορίων. Έχουν συντεθεί παρεμβαλλόμενα μόρια με προτίμηση ως προς A - T και σε αυτή την περίπτωση η εκλεκτικότητα ως προς τη δέσμευση δεν εξαρτάται μόνο από τις διπολικές αλληλεπιδράσεις αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου, το μέγεθος, την εφυδάτωση και το δυναμικό των αυλάκων που αλληλεπιδρούν με τις όποιες υποκαταστάσεις του παρεμβαλλόμενου αρωματικού μορίου.



Συγκρίνοντας τα μόρια που δεσμεύονται στις αύλακες με τα μόρια παρεμβολής, είναι φανερό ότι τα μόρια που συνδέονται στις αύλακες παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη εκλεκτικότητα ως προς τη δέσμευση μορίων με παρεμβολή. Οι κοιλότητες παρεμβολής που δημιουργούνται στα ζεύγη βάσεων A – T ή C – G 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 δέσμευσης. Από την άλλη, τα μόρια που δεσμεύονται στις αύλακες μπορούν να δημιουργήσουν επαφές με περισσότερα ζεύγη βάσεων καθώς τοποθετούνται κατά μήκος της αύλακας και αυτό τους δίνει μεγαλύτερη δυνατότητα όσον αφορά την αναγνώριση.

Ο Helene και οι συνεργάτες του [19] ενίσχυσαν σημαντικά την εκλεκτικότητα των μορίων παρεμβολής συνδέοντας σε αυτά ολιγονουκλεοτίδια 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 δέσμευσης καθώς και επιπρόσθετη εκλεκτικότητα κατά την δέσμευση του συμπλόκου.



Το αντιβιοτικό ακτινομυκίνη D δεσμεύεται στην διπλή έλικα του DNA μέσω παρεμβολής παρεμποδίζοντας τη δράση των ενζύμων του *Streptomyces* που συμμετέχουν στην αντιγραφή και τη μεταγραφή του. Το μόριο αποτελείται από ένα σύστημα δακτυλίων φαινοξαζόνης, με το οποίο είναι συνδεδεμένα δύο κυκλικά πενταπεπίδια. Τα πεπτίδια αποτελούνται από θρεονίνη, αλανίνη, προλίνη, σαρκοσίνη και μέθυλο - βαλίνη. Οι αρωματικοί δακτύλιοι παρεμβάλλονται στο DNA, κατά προτίμηση στις βάσεις C – G στην κεντρική αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων $d(\text{GATGCTTC})_2$ και $d(\text{AAGCGCTT})_2$ σε παράλληλη διαμόρφωση με αυτές. Τα πεπτίδια συσσωρεύονται στην ελάσσονα αύλακα του DNA η οποία επιμηκύνεται κατά την αλληλεπίδραση του φαρμάκου [20]. Η δράση του φαρμάκου οφείλεται στην παρεμβολή των δακτυλίων του μορίου της φαινοξαζόνης στις βάσεις C – G, στις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις των πεπτιδίων με τις βάσεις της γουανίνης και στον σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ της αμινομάδας της φαινοξαζόνης και της ριβόζης του DNA.

1.5. Αλληλεπιδράσεις συμπλόκων των στοιχείων μετάπτωσης με το DNA

1.5.1. Ιστορική αναδρομή

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση μικρών μορίων που αναγνωρίζουν και δεσμεύονται σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA όπως είδαμε αποτελεί έναν τομέα ιδιαίτερου επιστημονικού ενδιαφέροντος. Ειδικότερα, η μελέτη συμπλόκων των στοιχείων μετάπτωσης που μπορούν να δεσμεύονται στο DNA αναπτύχθηκε σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Η ανάπτυξη αυτή οφείλεται σε μια πληθώρα ιδιοτήτων των συμπλόκων αυτών που σχετίζεται με την γεωμετρία τους, την φύση του μεταλλικού κέντρου, την καταλυτική τους δράση, τις φωτοχημικές και φωτοφυσικές ιδιότητές τους κ.λ.π. Κατά τη διάρκεια των προηγούμενων δεκαετιών, σύμπλοκα που δεσμεύονται στο DNA έχουν δώσει σημαντικές υποσχέσεις για την χρήση τους ως ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, αντιϊκά, αντικαρκινικά – αντιμεταστατικά φάρμακα κ.λ.π [21, 22]. Αρχικά δόθηκε έμφαση στον σχεδιασμό συμπλόκων που δεσμεύονται με απευθείας δεσμό με το DNA [23] εντούτοις, κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, το ενδιαφέρον έχει στραφεί ακόμη και σε μια άλλη κατηγορία μεταλλικών συμπλόκων που δεσμεύονται αντιστρεπτά στο DNA χωρίς απευθείας δεσμό.

Οι πρώτες έρευνες στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ συμπλόκων και DNA εστίασαν περισσότερο στην ισχύ της δέσμευσης των συμπλόκων αυτών στο DNA καθώς θεωρείτο ότι ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις δεν θα ήταν το ίδιο αποτελεσματικές [24]. Ακόμη πραγματοποιήθηκαν πειράματα με μεθόδους απλούστερες των σημερινών, όπως εκείνη της μέτρησης του σημείου τήξης του DNA για να προσδιοριστεί το είδος της αλληλεπίδρασης και κατά πόσο το σύμπλοκο σταθεροποιεί ή αποσταθεροποιεί την διπλή έλικα του DNA [25]. Αλληλεπιδράσεις μεταλλικών ιόντων ή κατιονικών συμπλόκων ηλεκτροστατικής φύσης με τις φωσφορικές ομάδες του DNA δημιουργούν σταθεροποίηση των διατεταγμένων δομών. Αυτή η σταθεροποίηση συνοδεύεται από μια αύξηση στο «σημείο τήξεως» (T_m) του DNA. Αλληλεπιδράσεις με τις νουκλεϊνικές βάσεις δημιουργούν αποσταθεροποίηση των διατεταγμένων δομών, καθώς τα μεταλλικά σύμπλοκα μπορούν να επηρεάσουν τους δεσμούς υδρογόνου ή την συσσώρευση των βάσεων που συγκρατούν και τους δύο κλώνους του DNA στην μορφή της διπλής έλικας. Η αποσταθεροποίηση συνοδεύεται από μείωση του «σημείου



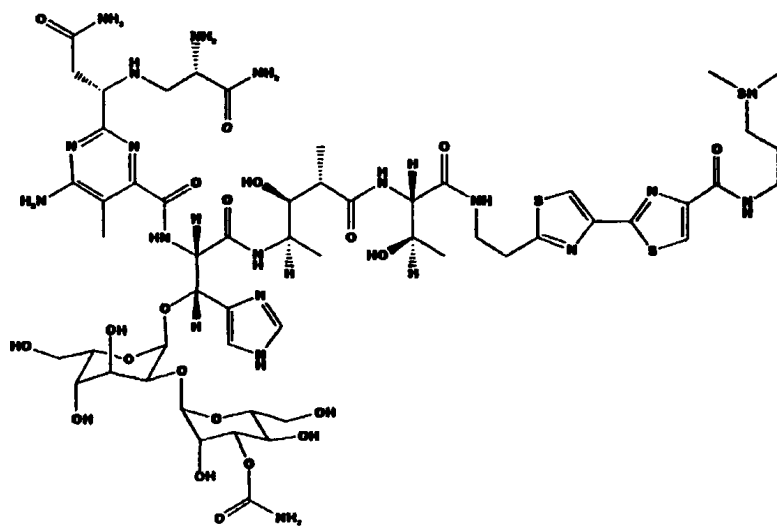
τήξης» (T_m) του DNA. Αργότερα εισήχθησαν στο πεδίο πιο σύγχρονες φυσικοχημικές, αναλυτικές και βιοχημικές μέθοδοι ενώ παράλληλα αναπτύχθηκε και η βιοφυσική, ένα επιστημονικό πεδίο έρευνας το οποίο προσέφερε διαρκώς όλο και περισσότερες πληροφορίες για την δομή και λειτουργία των βιομορίων.

Έτσι μελετήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία (EFM) σύμπλοκα μετάλλων με νουκλεοζίτες, προκειμένου να προσδιοριστεί η πιθανή θέση δέσμησης στην αλληλουχία των βάσεων του DNA που θα προτιμούσαν για την δέσμευσή τους [26]. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν μελέτες συμπλόκων υδραργύρου με θειολικούς υποκαταστάτες για την ανίχνευση και τον εντοπισμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA [27, 28]. Ο Dwyer και οι συνεργάτες του μελέτησαν τις αλληλεπιδράσεις DNA με πολυπυριδινικά σύμπλοκα του Ru(II) και Ni(II) στα οποία προηγουμένως είχε βρεθεί αντιϊκή δραστηριότητα. Τα σύμπλοκα αυτά σε αρκετές περιπτώσεις έδειξαν εκλεκτική δέσμευση σε αλληλουχίες –CGA– στην έλικα του DNA [29, 30].

Αργότερα ο Lippard και οι συνεργάτες του μελέτησαν τον τρόπο που το μονοκατιονικό, μονοδραστικό σύμπλοκο του Pt(II) με τον υποκαταστάτη 2,2'-6',2''τερπυριδύλιο, $[Pt(terpy)Cl]^+$, δεσμεύεται στο DNA και έδειξαν ότι το σύμπλοκο αυτό δεσμεύεται στην διπλή έλικα του DNA τόσο μέσω παρεμβολής των αρωματικών δακτυλίων της τερπυριδίνης (terpy) ανάμεσα στις βάσεις του DNA όσο και με απευθείας ένταξη του Pt(II) στις νουκλεϊνικές βάσεις της αδερίνης και γουανίνης [31]. Στην συνέχεια οι ίδιοι μελέτησαν το σύμπλοκο $[Pt(terpy)(SCH_2CH_2OH)]^+$ για να βρουν τον τρόπο που αυτό αλλά και ανάλογα σύμπλοκα παρεμβάλλονται στις βάσεις του DNA. Οι μελέτες με ακτίνες X έδειξαν να εμφανίζεται περιοδικότητα στη δέσμευση των συμπλόκων στο μόριο του DNA. Ακόμη, βρέθηκε ότι, το σύμπλοκο $[Pt(terpy)(SCH_2CH_2OH)]^+$ δεσμεύεται στο DNA ανά απόσταση 10 Å (σε κάθε ζευγάρι βάσεων) και έχει την ικανότητα να ξετυλίγει την διπλή έλικα του DNA [32, 33]. Επεκτείνοντας τις εργασίες τους, μελέτησαν σύμπλοκα με ετεροκυκλικούς αρωματικούς υποκαταστάτες όπως το σύμπλοκο $[Pt(bpy)(en)]^{2+}$ και $[Pt(rhen)(en)]^{2+}$ και βρέθηκε ότι αν και τα σύμπλοκα αυτά συνδεόταν μάλλον ασθενώς στο DNA (η σταθερά δέσμησης αυτής της αλληλεπίδρασης K_b είναι ίση με $2 \times 10^4 M^{-1}$ και $1.3 \times 10^5 M^{-1}$ αντίστοιχα) εν τούτοις προκαλούσαν ανάλογες μεταβολές με εκείνες του συμπλόκου $[Pt(terpy)(SCH_2CH_2OH)]^+$ που βρέθηκε να συνδέεται με παρεμβολή [34].



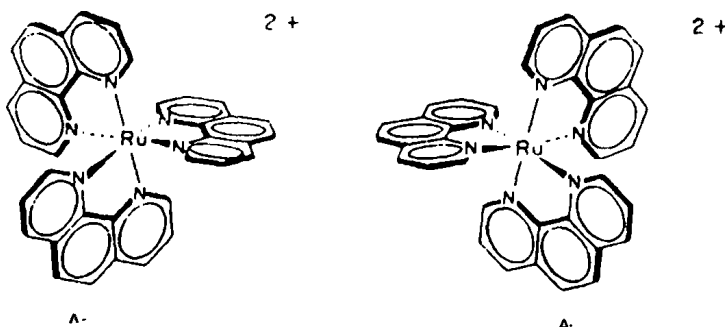
Αργότερα η Sigman και οι συνεργάτες της μελέτησαν την περίπτωση του τετραεδρικού συμπλόκου της 1,10-φαινανθρολίνης με Cu(I), $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ και βρέθηκε σημαντική νουκλεολυτική δραστικότητα παρουσία ήπιων οξειδωτικών όπως H_2O_2 [35]. Η δράση του συμπλόκου αυτού περιλαμβάνει την δέσμευσή του στην ελάσσονα αύλακα του DNA, την οξείδωση του συστήματος $\{[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+ + \text{DNA}\}$ και τέλος την διάσπαση της φωσφοροδιεστερικής αλυσίδας του DNA [36]. Η καταλυτική οξείδωση των φωσφοροδιεστερικών δεσμών του DNA αποδόθηκε ως ο πιθανότερος αντικαρκινικών μηχανισμός δράσης του μορίου της μπλεομυκίνης, το οποίο εμφανίζει την δραστικότητα μετά από την ένταξη ενός μεταλλικού κέντρου του σιδήρου στο μόριο του. Για τον λόγο αυτό μελέτησαν μια σειρά τις μπλεομυκίνης με Zn(II), Cu(II), Co(II) και Fe(II) [37, 38]. Τα σύμπλοκα αυτά δεν δεσμεύονται με απευθείας δεσμό του μετάλλου στο DNA και βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν κατά αρχήν ηλεκτροστατικά με το DNA λόγω τού θετικού φορτίου της πεπτιδικής ουράς, που φέρουν στο μόριο τους και εν συνεχεία παρεμβάλλουν ανάμεσα στις βάσεις του DNA, από την πλευρά της ελάσσοнос αύλακας του αρωματικού δακτυλίου της διθιαζολικής ομάδας [39]. Κατόπιν, ενεργοποιείται ένας καταλυτικός μηχανισμός οξείδωσης των φωσφοροδιεστερικών δεσμών του DNA, τεμαχίζοντάς το και αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό του.



Bleomycin

Σχήμα 1.6. Το μόριο της μπλεομυκίνης.

Σημαντικός σταθμός της έρευνας αυτής, αποτέλεσε και η μελέτη τρις-χηλικών συμπλόκων του Ru, Cr, Zn, Ni και Co με 1,10-φαινανθρολίνη [40-43]. Τα σύμπλοκα αυτά, βρέθηκε ότι μπορούν να δεσμευτούν στο DNA, είτε μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στην ελάσσονα αύλακα του DNA, είτε με μερική παρεμβολή του ενός υποκαταστάτη της φαινανθρολίνης από τη μείζονα αύλακα μεταξύ των βάσεων του DNA. Το σημαντικότερο όμως σημείο της έρευνας αυτών των συμπλόκων αποτέλεσε η εναντιοεκλεκτική δέσμευση τους στο DNA [44]. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των συμπλόκων του $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (σχήμα 1.7) το Δ εναντιομερές βρέθηκε ότι παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων στη μείζονα αύλακα του DNA ενώ το Λ εναντιομερές δεσμεύεται επιφανειακά μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η σταθερά δέσμευσης του συμπλόκου με το DNA είναι χαμηλή γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε στεरिकές παρεμποδίσεις, που δημιουργούνται από την παρουσία των άλλων δύο υποκαταστατών της φαινανθρολίνης στο οκταεδρικό σύμπλοκο [40]. Στη συνέχεια τα σύμπλοκα αυτά, ενεργοποιούνται φωτοχημικά προκαλώντας οξειδωτική διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του νουκλεϊνικού οξέος [45]. Αν και η διάσπαση αυτή δεν συμβαίνει μόνο στο σημείο σύνδεσής του συμπλόκου με το DNA γιατί χωρεί μέσω μηχανισμού δημιουργίας ελευθέρων ριζών (κυρίως ενεργά είδη οξυγόνων), εν τούτοις δημιούργησε ένα ολόκληρο πεδίο έρευνας με σκοπό την εκλεκτική ως προς την αλληλουχία διάσπαση των φωσφοροδιεστερικών δεσμών και τη συσχέτισή της με μια εκλεκτική δέσμευση.



Σχήμα 1.7. Δομή των εναντιομερών συμπλόκων Λ-, Δ- $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$.

Στη συνέχεια οι μελέτες στράφηκαν σε εναλλακτικούς της φαινανθρολίνης υποκαταστάτες, όπως η 4,7-διφένυλ-1,10-φαινανθρολίνη (dip), θεωρώντας ότι αυξάνοντας

την επιφάνεια του υποκαταστάτη, ο οποίος παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων θα μπορούσε να οδηγήσει σε αντίστοιχη αύξηση της σταθεράς δέσμευσης. Πράγματι, το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{dip})_3]^{2+}$ παρουσίασε μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης. Βρέθηκε λοιπόν ότι το Δ- εναντιομερές αλληλεπιδρά μέσω παρεμβολής του ενός υποκαταστάτη και διάσχιση του συνοδού υποκαταστάτη του φαινυλίου από την μείζονα αύλακα προς την ελάσσονα αύλακα ενώ το Λ- εναντιομερές συνδέεται στο DNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [46]. Παρόλη όμως την σχετικά μεγαλύτερη K_b (10^{-6}) δεν βρέθηκε καμία εκλεκτικότητα ως προς την διάσπαση των φωσφοριστερικών δεσμών του DNA. Μικρότερα αρωματικά “πλατώ”, όπως της 2,2'-διπυριδίνης και το τρις χηλικό σύμπλοκό του με Ru, $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, συγκέντρωσαν το ενδιαφέρον των ερευνητών κυρίως λόγω της ενδιαφέρουσας φωτοχημείας τους. Ήδη από τις πρώτες μελέτες αλληλεπίδρασης του $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ με το DNA διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζει σημαντική εναντιοεκλεκτικότητα [47-49]. Ο τρόπος δέσμευσής 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 [47, 49]. Από την άλλη, σύμφωνα με φωτοφυσικές μελέτες από την Barton και τους συνεργάτες της, η δέσμευση του συμπλόκου αυτού στο DNA χωρεί μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ενώ η πιθανότητα παρεμβολής είναι μάλλον αμελητέα [50].

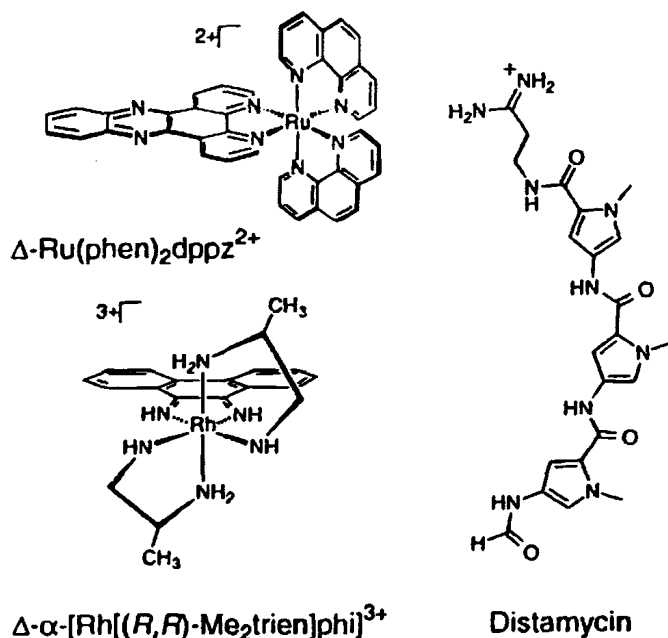
1.5.2. Σύμπλοκα που παρεμβάλλονται στο DNA (*intercalators*)

Η αναζήτηση υποκαταστατών σε σύμπλοκα κυρίως του Ru που θα παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις του DNA οδήγησε σε πληθώρα μελέτων γύρω από τον υποκαταστάτη dppz . Ακόμη άλλοι αντιπροσωπευτικοί πολυπυριδινικοί υποκαταστάτες συμπλόκων που συνδέονται με παρεμβολή στις βάσεις του DNA αποτελούν η 9,10-φαινανθρενοκινόνη-διμίνη (phi) καθώς και πολλά παράγωγα της διπυριδινό[3,2-α:2',3'-c]φαιναζίνη (dppz).

Τα σύμπλοκα του ρουθηνίου τα οποία παρεμβάλλονται στο DNA σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μην υπάρχει η δυνατότητα να συνδεθούν με δεσμό ένταξης στις βάσεις του DNA, δηλαδή όλες οι δυνατές θέσεις γύρω από το μεταλλικό κέντρο να είναι



κατειλημμένες από υποκαταστάτες που συνδέονται ισχυρά. Οι φωτοχημικές και φωτοφυσικές ιδιότητες των συμπλόκων αυτών μας παρέχουν την δυνατότητα να μελετήσουμε τον τρόπο της αλληλεπίδρασής τους με το DNA με μεγάλη ποικιλία φασματοσκοπικών τεχνικών. Έτσι για παράδειγμα το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ εμφανίζει φωτοδραστικότητα σε οργανικούς διαλύτες. Σε υδατικά διαλύματα δεν παρουσιάζονται αυτές οι ιδιότητες λόγω του ότι το νερό σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα ετεροάτομα N του αρωματικού δακτυλίου και δεν επιτρέπει στον υποκαταστάτη να πλησιάσει τις βάσεις του DNA. Παρόλα αυτά κατά την προσθήκη DNA στο διάλυμα παρουσιάζεται ισχυρή φωτοδραστικότητα καθώς το σύμπλοκο παρεμβάλλεται στις βάσεις του DNA και το υδρόφοβο περιβάλλον της διπλής έλικας προστατεύει τα άτομα N του δακτυλίου του υποκαταστάτη από τα μόρια του νερού [51]. Η μεταβολή στις φωτοχημικές ιδιότητες του συμπλόκου αυτού αποτελεί μέτρο του τρόπου με τον οποίον συνδέεται στο DNA.



Σχήμα 1.8. Σχηματική απεικόνιση των δομών των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ και Δ - α - $[\text{Rh}\{(\text{R},\text{R})\text{-Me}_2\text{trien}\}(\text{phi})]^{3+}$ και της νισταμισίνης.

Για την περαιτέρω διερεύνηση της δέσμευσης του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανταγωνισμού με την νισταμισίνη, ένα μόριο που δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα και το σύμπλοκο Δ - α - $[\text{Rh}\{(\text{R},\text{R})\text{-Me}_2\text{trien}\}(\text{phi})]^{3+}$, όπου

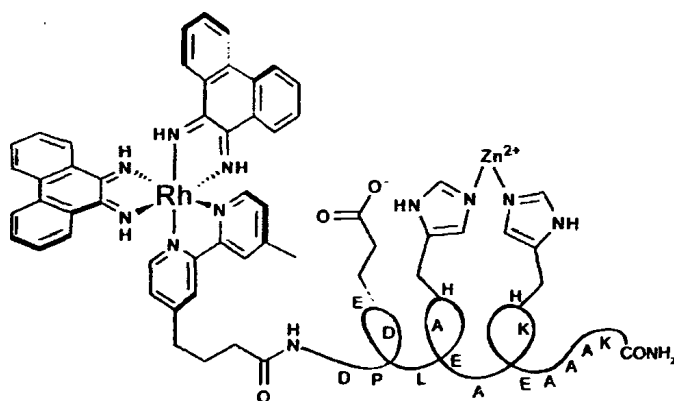
(R,R)-Me₂trien = 2*R*,9*R*-διακίνο-4,7-διαζαδεκάνιο, το οποίο παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA από τη μείζονα αύλακα [52, 53]. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι το Δ- $[\text{Rh}\{(\text{R,R})\text{-Me}_2\text{trien}\}(\text{phi})]^{3+}$ εκτόπιζε το Δ- $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpprz}]^{2+}$ από την έλικα του DNA. Αντιθέτως, τα πειράματα ανταγωνισμού με την ντισταμυσίνη έδειξαν ότι η φωτοδραστικότητα 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- $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpprz}]^{2+}$ και τη ντισταμυσίνη. Επιπλέον, κατά την αλληλεπίδραση του Δ- $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dpprz}]^{2+}$ με μίγμα 1:1 poly d(AT) poly και d(GC), το 85 % του συμπλόκου δεσμεύτηκε περισσότερο στην αλληλουχία A - T παρά στην C - G [53].

Ενώ τα σύμπλοκα του ρουθηνίου αποδείχτηκαν ισχυροί φωτοενεργοποιητές για την ανίχνευση του DNA, σύμπλοκα του ροδίου παρουσίασαν σημαντική φωτοδραστικότητα για τη διάσπαση του DNA. Τέτοια σύμπλοκα είναι σύμπλοκα με τον υποκαταστάτη phi, όπως είναι τα σύμπλοκα $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phi})]^{3+}$, $[\text{Rh}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{3+}$ και $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$ [54]. Σε πολλές περιπτώσεις, κατά την ακτινοβόληση του συμπλόκου με ακτινοβολία μήκους κύματος 325 nm, η διπλή έλικα διασπάται κοντά στο σημείο της δέσμευσης. Συγκεκριμένα, η ακτινοβόληση του συμπλόκου οδηγεί στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών, ενώ στη συνέχεια οξειδώνεται και τελικά διασπάται ο φωσφοροδιεστερικός δεσμός του DNA. Με βάση τις κρυσταλλικές δομές και των δεδομένων από την φασματοσκοπία NMR αποδεικνύεται ότι, το υδρογόνο που βρίσκεται στο C2' ενός γειτονικού φωσφορικού σκελετού πλησιάζει περισσότερο το σύμπλοκο που παρεμβάλλεται στις βάσεις του DNA από ότι το υδρογόνο C3' του σκελετού στον οποίο παρεμβάλλεται το σύμπλοκο. Συνεπώς, το υδρογόνο που αποσπάται κατά την φωτοδραστικότητα του συμπλόκου είναι το πρωτόνιο C2' [54].

Παρόλο που τα σύμπλοκα του ροδίου με την φωτοενεργοποίησή τους βρέθηκε να διασπούν αποτελεσματικά το DNA, η μη ειδική σύνδεσή τους περιόριζε τις όποιες εφαρμογές τους. Έτσι οι ερευνητές θέλησαν να συνθέσουν σύμπλοκα τα οποία να συνδέονται στο DNA με τρόπο εκλεκτικό αναγνωρίζοντας ενδεχομένως μικρές αλληλουχίες ή περιοχές του μακρομορίου. Για αυτό μελετήθηκαν σύμπλοκα τα οποία φέρουν στο μόριο τους συζευγμένα πεπτίδια όπως είναι το σύμπλοκο $[\text{Rh}(\text{phi})_2\text{bpy}']^{3+}$ (σχήμα 1.9). Το παρεμβαλλόμενο μέρος του συμπλόκου παρέχει την ισχυρή δέσμευση στο DNA, ενώ το πεπτίδιο συνεισφέρει στη



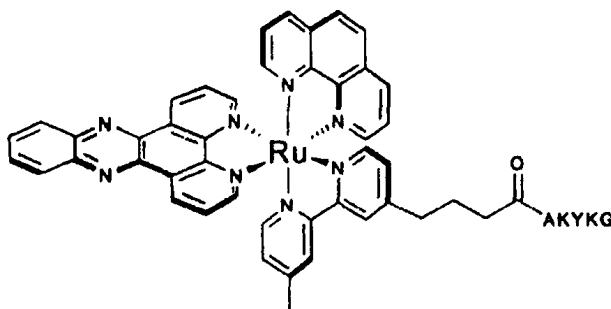
εκλεκτικότητα της δέσμευσης [55]. Τα πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα πεπτίδιο σε διαμόρφωση α - έλικας που φέρει δύο ιστιδίνες ώστε να μπορεί να δεσμεύει επιπλέον μεταλλοϊόντα και ένα δεύτερο πεπτίδιο σε διαμόρφωση τύπου φουρκέτας, μοντέλο του ενεργού κέντρου της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *BamHI*. Η δέσμευση Zn^{2+} στο πεπτίδιο οδήγησαν στον σχηματισμό μιας αποτελεσματικής συνθετικής νουκλεάσης του DNA με ικανότητα να κόβει τόσο το πλασμιδιακό όσο και το γραμμικό DNA. Το πρώτο πεπτίδιο παρουσιάζει και από μόνο του δράση, η οποία ενισχύεται σημαντικά όταν συζεύγνυται στο μεταλλικό σύμπλοκο. Το πεπτίδιο αυτό δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς την αλληλουχία και έτσι η θέση δέσμευσης καθορίζεται κυρίως από το παρεμβαλλόμενο σύμπλοκο. Η διάσπαση του DNA πραγματοποιείται μετά από ακτινοβολήση και φωτοοξειδωση σε γειτονική πυριμιδίνη, προς την κατεύθυνση 5', από την θέση παρεμβολής. Το πρώτο πεπτίδιο μεταφέρει το δισθενές Zn^{2+} στον φωσφοδιεστερικό δεσμό ο οποίος υφίσταται τελικά υδρολυτική διάσπαση και το δεύτερο πεπτίδιο βρέθηκε ότι κόβει το υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA χωρίς όμως να εμφανίζει δραστικότητα έναντι του γραμμικού DNA.



Σχήμα 1.9. Δομή του συμπλόκου $[Rh(phi)_2bpy']^{3+}$.

Στο ίδιο «μήκος κύματος» μελετήθηκε ακόμη το σύμπλοκο $[Ru(phen)(bpy')(dppz)]^{2+}$ (σχήμα 1.10) όπου ο υποκαταστάτης *bpy'* φέρει το πεπτίδιο Lys-Trp-Lys. Βρέθηκε ότι το σύμπλοκο αυτό, είναι ικανό να οξειδώσει το DNA κατά την ακτινοβολήση παρουσία όμως ενός ήπιου οξειδωτικού [56]. Επίσης παρατηρήθηκε ότι η φύση του πεπτιδίου έχει άμεση

επίδραση στη σταθερά δέσμευσης του. Η μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης παρατηρήθηκε με πεπτίδια τα οποία περιείχαν θετικά φορτισμένα αμινοξέα, όπως λυσίνη ή αργινίνη.



Σχήμα 1.10.. Δομή του συμπλόκου $[Ru(phen)(bpy')(dppz)]^{2+}$.

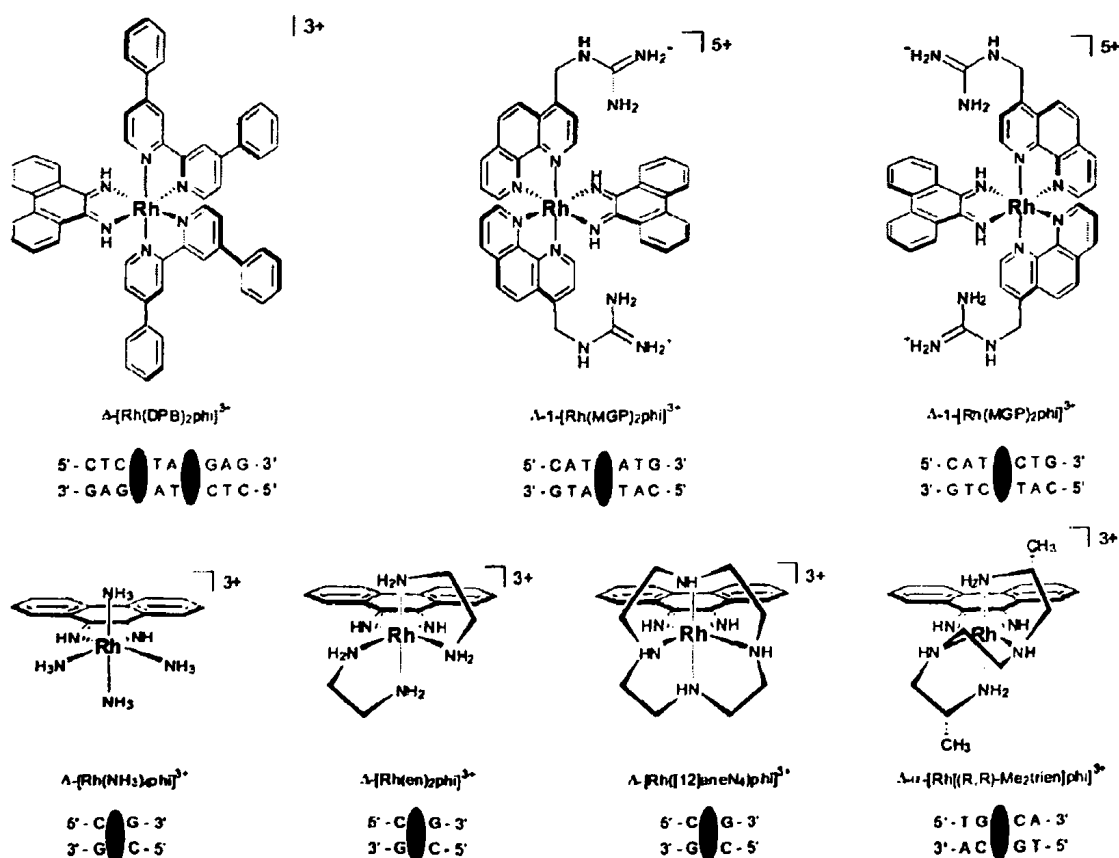
1.5.3. Αναγνώριση αλληλουχίας του DNA από σύμπλοκα που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA

Σημαντικό ρόλο στην εκλεκτική αναγνώριση των βάσεων από τα παρεμβαλλόμενα σύμπλοκα διαδραματίζει η φύση των δευτερευόντων υποκαταστατών (ancillary ligands), οι οποίοι βρίσκονται στην μείζονα αύλακα του DNA. Έτσι, τα σύμπλοκα $[Rh(NH_3)_4(phi)]^{3+}$, $[Rh([12]aneN_4)(phi)]^{3+}$ και Δ - $[Rh(en)_2(phi)]^{3+}$ αναγνωρίζουν και παρεμβάλλονται αποκλειστικά στις βάσεις C-G, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.11 [56]. Σε αυτές τις περιπτώσεις η εκλεκτική αναγνώριση εξασφαλίζεται από την C_2 συμμετρία των συμπλόκων καθώς επίσης και από την δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αμινικών αξονικών υποκαταστατών και του Ο6 της γουανίνης. Το Λ - $[Rh(en)_2(phi)]^{3+}$ σε αντίθεση με το Δ - ισομερές αναγνωρίζει τις βάσεις A-T και αλληλεπιδρά με υδρόφοβες δυνάμεις με το μεθυλίο της θυμίνης.

Το σύμπλοκο Δ - α - $[Rh\{(R,R)\text{-}Me_2\text{trien}\}\text{-}(phi)]^{3+}$ αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-T-G-C-A-3' και παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις G-C [57]. Το σύμπλοκο αυτό δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αμινικών αξονικών υποκαταστατών και του Ο6 της γουανίνης καθώς επίσης και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των μεθυλίων του με το μεθύλιο της θυμίνης. Με βάση δεδομένα από τη φασματοσκοπία NMR [52] καθώς και κρυσταλλογραφικών δεδομένων [58] φαίνεται ότι το σύμπλοκο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-T-G-C-A-3' και προκαλεί διαχωρισμό των ζευγών βάσεων στη θέση αυτή, επιμηκύνοντας ταυτόχρονα τη διπλή έλικα και ελαττώνοντας την ελίκωση στη θέση παρεμβολής.



Το σύμπλοκο Δ -[Rh(MGP)₂(phi)]⁵⁺, ένα παράγωγο του συμπλόκου [Rh(phen)₂(phi)]³⁺ που φέρει μια αμινο-αλειφατική πλευρική αλυσίδα στα μόρια της 1,10-φαινανθρολίνης, αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-CATCTG-3'. Σχεδιάστηκε για να δεσμεύει υπομονάδες της αλληλουχίας αυτής και να αναγνωρίζεται ειδικά από την τελική τριπλέτα 5'-Py-Py-Pu-3' (-CTG-). Κατά την παρεμβολή του συμπλόκου στο DNA, δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της παράπλευρης αλυσίδας της φαινανθρολίνης με το O6 της γουανίνης [59]. Αντίθετα το Λ -ισομερές του, Λ -[Rh(MGP)₂(phi)]⁵⁺ αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-CATATG-3'. Μελέτες έδειξαν ότι το σύμπλοκο αυτό δεσμεύεται στο DNA, ξετυλίγοντας την διπλή έλικα κατά 70° [60] με αποτέλεσμα η θέση N7 της γουανίνης να είναι η πιο προσιτή για αλληλεπίδραση. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώθηκε με την αντικατάσταση των βάσεων της γουανίνης με δεαζογουανίνες (χωρίς το άτομο N7) κατά την οποία δεν παρατηρήθηκε καμία εκλεκτικότητα του συμπλόκου. Το σύμπλοκο αυτό, λόγω αυτής της εκλεκτικότητάς του, αποτελεί ένα σημαντικότατο ανασταλτικό παράγοντα της μεταγραφής του DNA [61].



Σχήμα 1.11. Εκλεκτική αναγνώριση αλληλουχίας των συμπλόκων.

1.5.4. Σύμπλοκα μετάλλων που εκτοπίζουν τις βάσεις του DNA (insertors)

Όπως είναι γνωστό, τα περισσότερα σύμπλοκα που δεν δεσμεύονται με απευθείας δεσμό στο DNA είτε παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις είτε δεσμεύονται στις αύλακες του. Όμως, ο L.S. Lerman προτείνει ένα νέο ειδικό τρόπο δέσμευσης, την εισαγωγή (insertion) [62], κατά την οποία ένα μόριο καθώς παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, τις εκτοπίζει από την έλικα και τις αντικαθιστά. Παρόλο που αρχικά ο Lerman μελέτησε αυτό τον τρόπο σε οργανικές ενώσεις στη συνέχεια επεκτάθηκε και σε σύμπλοκα Ru και Rh. Έτσι λοιπόν τα σύμπλοκα αυτά φέρουν ένα επίπεδο αρωματικό δακτύλιο ο οποίος είναι υπεύθυνος για αυτή την ειδική δέσμευση με το DNA. Ενώ τα σύμπλοκα που παρεμβάλλονται στο DNA αποελικώνουν ελαφρώς το DNA και παρεμβάλλουν του υποκαταστάτη ανάμεσα στις βάσεις, τα σύμπλοκα «εισαγωγής» εκτοπίζουν την μία βάση στη θέση στην οποία γίνεται η παρεμβολή μεταφέροντας τον υποκαταστάτη ως αντικαταστάτη της. Το φαινόμενο αυτό δεν προκαλεί αποελίκωση του DNA.

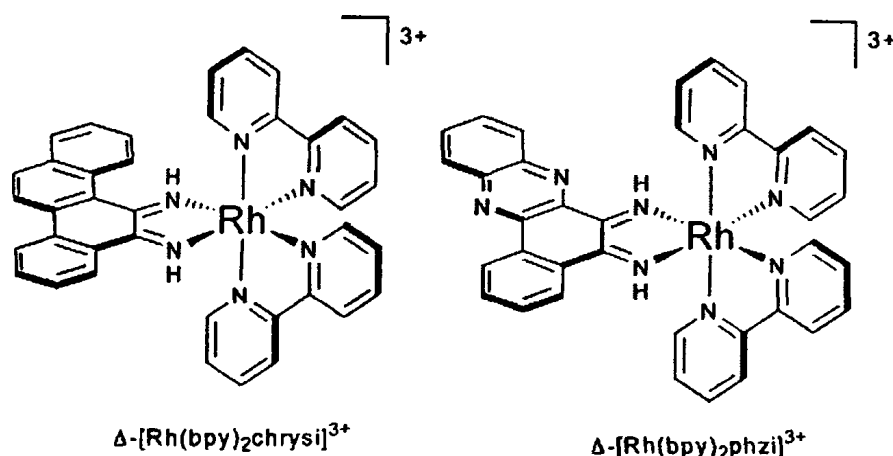
Τα σύμπλοκα αυτά έχουν ως στόχο να απομακρύνουν τους λανθασμένους συνδυασμούς από τα ζεύγη βάσεων, όπως είναι A - C, C - C κ.λ.π., τα οποία εμφανίζονται μέσα στα κύτταρα ως αποτέλεσμα λάθους κατά την μεταγραφή ή κατά την έκθεση του DNA σε διάφορα τοξικά διαλύματα [63]. Έτσι, σχεδιάζονται για να αναγνωρίζουν μόνο τις περιοχές αυτές που φέρουν ατελείς δεσμούς υδρογόνου και αποσταθεροποιούν την διπλή έλικα, χωρίς να έχουν εκλεκτικότητα στην δέσμευση σε κάποια βάση του DNA.

Αρχικά μελετήθηκε το σύμπλοκο $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{3+}$ (όπου $\text{chrysi} = 5, 6$ χρυσινο κινόνη) το οποίο λόγω στερικών παρεμποδίσεων από τον υποκαταστάτη δεν μπορεί να αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής στις βάσεις. Βρέθηκε λοιπόν ότι το σύμπλοκο αυτό δεσμεύεται στα σημεία με τους λανθασμένους συνδυασμούς και όταν ακτινοβολείται με ακτινοβολία υπεριώδους, φωτοενεργοποιείται και διασπά εκλεκτικά το DNA στα σημεία αυτά [64]. Το σύμπλοκο αυτό παρουσιάζει ισχυρή εναντιοεκλεκτικότητα καθώς μόνο το Δ-εναντιομερές συνδέεται ισχυρά στο DNA έναντι του Λ-εναντιομερούς το οποίο βρέθηκε να είναι σχεδόν αδρανές. Η σταθερά δέσμευσής του σε περιοχές που φέρουν λανθασμένα ζεύγη βάσεων A - A βρέθηκε ίση με $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ και σε περιοχές με C - C ίση με $2.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ενώ



δεν βρέθηκε καμία δραστηριότητα του συμπλόκου αυτού σε περιοχές που φέρουν βάσεις της γουανίνης [65].

Μελετήθηκε επίσης το σύμπλοκο $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})]^{3+}$ (όπου phzi = βενζο[α]-φαιναζινη-5,6-κινόνη διμίνη) και βρέθηκε παρόμοια συμπεριφορά με το πιο πάνω σύμπλοκο. Η σταθερά δέσμευση του συμπλόκου σε περιοχές που φέρουν τα ζεύγη βάσεων C - A βρέθηκε ίση με $0.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ και σε περιοχές με C - C ίση με $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ενώ δεν βρέθηκε ούτε σε αυτή την περίπτωση καμία δραστηριότητα σε περιοχές με γουανίνη [66].



Σχήμα 1.12. Δομή του συμπλόκου $\Delta\text{-}[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{chrysi})]^{3+}$ και $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phzi})]^{3+}$.

1.6. Αλληλεπιδράσεις συμπλόκων του ρουθηνίου με το DNA

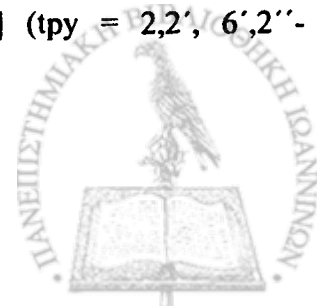
1.6.1. Μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης συμπλόκων του ρουθηνίου

Οι σταθερές οξειδωτικές καταστάσεις του ρουθηνίου είναι η Ru(II) και η Ru(III) όπου και στις δυο οξειδωτικές καταστάσεις το ρουθίνιο είναι συνήθως εξα-ενταγμένο με οκταεδρική γεωμετρία χαμηλού σπιν. Το Ru(III) με ηλεκτρονιακή διαμόρφωση d^5 , συνήθως αποδέχεται ηλεκτρονιακή πυκνότητα στα $d\pi$ τροχιακά του και για τον λόγο αυτό παρουσιάζει προτίμηση για υποκαταστάτες αλογόνα και ανιονικά οξυγόνα, ενώ το Ru(II) με ηλεκτρονιακή διαμόρφωση d^6 παρουσιάζει προτίμηση για υποκαταστάτες που είναι π-αποδέκτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας από τα $d\pi$ τροχιακά του μετάλλου.

Τα τρεις χηλικά σύμπλοκα του Ru(II) παρουσιάζουν τα εξής χαρακτηριστικά : (α) είναι κινητικά αδρανή λόγω της διαμόρφωσης d^6 χαμηλού spin, (β) παρουσιάζουν έντονη ταινία μεταφοράς φορτίου (MLCT) στο ορατό [40] και (γ) είναι από τα λίγα σύμπλοκα μετάλλων μετάπτωσης που παρουσιάζουν ισχυρή φωτοδραστικότητα σε διαλύματα θερμοκρασίας δωματίου και υπάρχει η δυνατότητα της φωτοευαισθητοποίησης τους ώστε να συμμετέχουν σε διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ενέργειας [67].

Η χημεία της διεγερμένης κατάστασης των τρις - χηλικών συμπλόκων του Ru(II) με τους υποκαταστάτες 2,2'-διπυριδύλιο και 1,10-φαιναθρολίνη έχει τραβήξει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια. Τα πολυπυριδινικά σύμπλοκα του Ru(II) χρησιμοποιούνται εκτεταμένα σε διαδικασίες μεταφοράς ενέργειας και ηλεκτρονίων [68].

Μεγάλο όμως ενδιαφέρον παρουσιάζει η αλληλεπίδραση των συμπλόκων του Ru(II) με τα νουκλεϊνικά οξέα. Κατ' αρχήν, η δέσμευση πολυπυριδινικών συμπλόκων του Ru(II) στο DNA με παρεμβολή ανάμεσα στις νουκλεϊνικές βάσεις συνοδεύεται από ενίσχυση της χημειοφωταύγειας και την μείωση της έντασης απορρόφησης της έντονης ταινίας μεταφοράς φορτίου (MLCT) του συμπλόκου [69]. Από την άλλη, είναι γνωστό ότι η φωτοδιέγερση συμπλόκων του Ru(II) που είναι δεσμευμένα στο DNA μπορεί να προκαλέσει διάσπαση της αλυσίδας του. Τα σύμπλοκα του Ru(II) δρουν συνήθως με το μηχανισμό της φωτοοξειδωσης είτε μέσω απευθείας μεταφοράς ηλεκτρονίου από μια βάση του DNA στο σύμπλοκο ή μέσω ενεργοποίησης του μοριακού οξυγόνου και σχηματισμού απλού οξυγόνου (1O_2), το οποίο αντιδρά στη συνέχεια με τη βάση. Η άλλη διεργασία έχει βρει εφαρμογή πειραματικά στη δυναμική φωτοθεραπεία (Photo Dynamic Therapy) καρκινικών όγκων [70]. Με τον πρώτο μηχανισμό έχει προταθεί ότι δρουν σύμπλοκα του Ru(II) με υποκαταστάτες όπως το 1,4,5,8-τετρααζαφαινανθρένιο (tap) και 1,4,5,8,9,12-εξααζατριφαινύλιο (hat) σε ένα εύρος συνδυασμού τους σε οκταεδρικά σύμπλοκα $[Ru(hat)_3]^{2+}$, $[Ru(tap)_3]^{2+}$ και $[Ru(hat)(tap)_2]^{2+}$ [71]. Με τον δεύτερο μηχανισμό δρουν συνήθως τα τρις - χηλικά σύμπλοκα του Ru(II) με 2,2'-διπυριδύλιο (bpy) και 1,10-φαιναθρολίνη (phen) [70, 71]. Πιο συγκεκριμένα, το τρις - χηλικό σύμπλοκο του Ru(II) με bpy μπορεί να διεγερθεί και παρουσία υπερθειϊκού οξέος (H_2SO_5) ή άλλου δότη οξυγόνου και να προκαλέσει απευθείας οξείδωση των βάσεων του DNA. Επίσης, απευθείας οξείδωση των βάσεων μπορεί να προκληθεί και από τα σύμπλοκα $trans-[Ru(O_2)(4-OMe-py)_4]^+$ py = πυριδίνη) και $[Ru(tpy)(dppz)O]$ (tpy = 2,2', 6',2''-



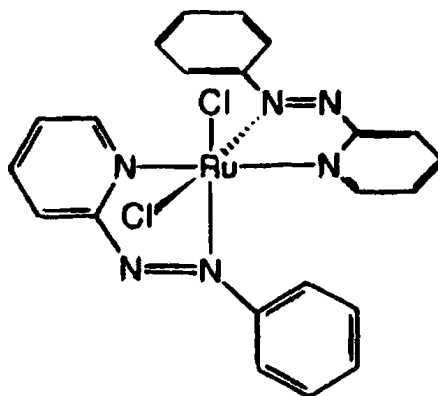
τερπυριδίνη, $dppz = \text{διπυριδο}[3,2\text{-}\alpha:2',3'\text{-c}]$ φαιναζίνη). Συνήθως η οξειδωση πραγματοποιείται σε μια γουανίνη, η οποία έχει και το μεγαλύτερο δυναμικό οξειδωσης από όλες τις βάσεις [70].

Στις μη αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις, η αντικαρκινική δραστηριότητα των συμπλόκων του Ru(III) μπορεί να εξηγηθεί με την «ενεργοποίηση με αναγωγή», όπως συμβαίνει στην περίπτωση των συμπλόκων $fac\text{-}[\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ και $cis\text{-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2]\text{Cl}$ [72]. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, τα αδρανή σύμπλοκα του Ru(III) θεωρούνται ως πρόδρομες ενώσεις, οι οποίες μπορούν να ενεργοποιηθούν από ένα μηχανισμό *in situ* αναγωγής και να προκύψουν τα λιγότερο αδρανή παράγωγα του Ru(II). Τα τελευταία είναι δυνατό να σχηματίσουν δεσμούς ένταξης με βιολογικούς στόχους. Ανιονικοί υποκαταστάτες όπως τα ενταγμένα χλώρια μπορούν να είναι αποχωρούσες ομάδες. Η απομάκρυνση τους και αντικατάσταση με μόρια H_2O αυξάνουν το φορτίο του συμπλόκου ώστε να διευκολύνεται η μεταφορά του μέσω των κυτταρικών μεμβρανών.

Θα περίμενε κανείς, το Ru(III) να ανάγεται πιο εύκολα σε καρκινικούς ιστούς, οι οποίοι θεωρούνται γενικά ως αναγωγικό περιβάλλον συγκρινόμενοι με τους περιβάλλοντες οξυγονωμένους ιστούς. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, η εκλεκτική κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων του ρουθηνίου αναμένεται να εξαρτάται από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες όπως το καθαρό φορτίο, η λιποφιλικότητα, το δυναμικό οξειδοαναγωγής του ζεύγους Ru(III) σε Ru(II) κ.λ.π. Στα καρκινικά κύτταρα υπάρχει μικρότερη περιεκτικότητα σε O_2 , εξαιτίας του γεγονότος ότι τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την ανάπτυξη νέων αγγείων αίματος (αγγειογένεση). Έτσι, η ενέργεια που χρειάζονται παρέχεται περισσότερο από την γλυκόλυση, παράγοντας μια περίσσεια γαλακτικού οξέος, το οποίο μειώνει σημαντικά το pH στους καρκινικούς ιστούς. Εξαιτίας λοιπόν, των διαφορετικών μεταβολικών διαδικασιών στα καρκινικά κύτταρα, το ηλεκτροχημικό δυναμικό για Ru(III) σε Ru(II) είναι γενικά χαμηλότερο από ότι στους περιβάλλοντες φυσιολογικούς ιστούς, γεγονός που ευνοεί την παραγωγή ενώσεων του Ru(II) στα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα υγιή. Έτσι, μεγαλύτερα ποσά δραστικών ενώσεων του Ru(II) μπορούν να παραχθούν σε καρκινικούς ιστούς, συγκρινόμενοι με τους υγιείς, προκαλώντας έτσι, συσσώρευση ποσότητας του συμπλόκου η οποία οδηγεί σε μια σχετικά εκλεκτική κυτταροτοξικότητα.

1.6.2. Δραστικά σύμπλοκα του Ru(II)

Το σύμπλοκο α-[RuCl₂(azpy)₂] (όπου azpy = 2-φαινυλαζοπυριδίνη) που φέρει ένα ετεροαρωματικό διδοντικό υποκαταστάτη (azpy) παρουσίασε σημαντική αντικαρκινική δραστηριότητα έναντι διαφόρων καρκινικών σειρών, της σειράς MCF-7 με IC₅₀ = 0.6 μM, της σειράς M19 με IC₅₀ = 0.2 μM και της σειράς EVSA-T με IC₅₀ = 0.1 μM, μεγαλύτερη από την δραστηριότητα του *cisplatin* με IC₅₀ = 2.3 μM, IC₅₀ = 1.9 μM και IC₅₀ = 1.4 μM στις αντίστοιχες καρκινικές σειρές [73, 74]. Η δράση του αυτή οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι (α) τα άτομα αζώτου ως π αποδέκτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας μειώνουν την δυνατότητα υδρόλυσης του Cl, πλησιάζοντας το ποσοστό υδρόλυσης του *cisplatin* (β) οι αρωματικοί δακτύλιοι των υποκαταστατών αυξάνουν τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το DNA και (γ) η όλη γεωμετρία του συμπλόκου με τον υποκαταστάτη μπορεί να παρεμποδίσει ή να διευκολύνει την πρόσβαση της πρωτεΐνης στο νουκλεϊνικό οξύ.

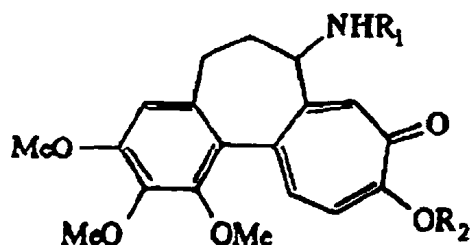


Σχήμα 1.13. Δομή του συμπλόκου [RuCl₂(azpy)₂].

Σύμπλοκα με υποκαταστάτες παράγωγα αρενίων βρέθηκε ότι σταθεροποιούν ιδιαίτερα την οξειδωτική κατάσταση Ru(II). Το σύμπλοκο [RuCl₂(Me₂-SO)(C₆H₆)], βρέθηκε να παρεμποδίζει την δράση της τοποϊσομεράσης II, η οποία είναι σημαντική στην κυτταροδιαίρεση [75]. Επίσης οργανομεταλλικά σύμπλοκα του τύπου [RuX(n⁶-arene)(en)]⁺, (όπου αρένιο = βενζόλιο ή υποκατεστημένο βενζόλιο, en = αιθυλενοδιαμίνη ή N-αιθυλενοδιαμίνη και X = αλογόνο) παρουσιάζουν υψηλή δραστηριότητα συγκρίσιμη με το *carboplatin*. Τέτοιου είδους σύμπλοκα βρέθηκαν δραστικά έναντι της καρκινικής σειράς

A2780 ($[\text{Ru}(\text{n}^6\text{-C}_6\text{H}_6)(\text{en})]^+$ με $\text{IC}_{50} = 20 \mu\text{M}$, $[\text{RuCl}(\text{n}^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{CO}_2\text{CH}_3)(\text{en})]^+$ με $\text{IC}_{50} = 55 \mu\text{M}$ και $[\text{RuCl}(\text{n}^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_5)(\text{en})]^+$ με $\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{M}$) [76]. Το σύμπλοκο $[\text{RuCl}(\text{n}^6\text{-p-cymene})(\text{en})]^+$ δεσμεύεται επιλεκτικά στις βάσεις της γουανίνης ενός ολιγονουκλεοτιδίου και βρέθηκε να μειώνει το σημείο τήξης του DNA [75]. Επίσης, βρέθηκε να είναι δραστικό έναντι της καρκινικής σειράς A2780 ($\text{IC}_{50} = 9 \mu\text{M}$), συγκρίσιμο με την δραστικότητα του carboplatin στην ίδια καρκινική σειρά ($\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{M}$).

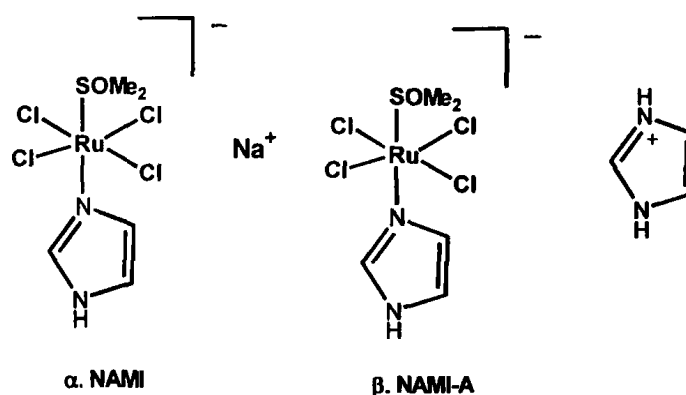
Το σύμπλοκο $[\text{RuCl}(\text{terpy})(\text{tmerphen})]^+$ (tmerphen = 3,4,7,8-τετραμεθυλο-1,10-φαινανθρολίνη) βρέθηκε να δεσμεύεται σχεδόν εκλεκτικά στις πουρίνικές βάσεις του DNA ενώ παρεμποδίζει *in vitro* τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [77]. Συμπλοκα του τύπου $[\text{RuL}(\text{bpy})_2]^+$ (όπου L = κολχικίνη (Col) και τριμεθυλοκολχικινικό οξύ (Tmca), βρέθηκε να είναι δραστικά ως προς την μυελογενή λευχαιμία K562, ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$) και στο αδενοκαρκίνωμα τύπου COLO 205 ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$) [78].



Σχήμα 1.14. Δομή των υποκαταστατών κολχικίνη όταν $\text{R}_1 = \text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ και $\text{R}_2 = \text{CH}_3$ και τριμέθυλοκολχικινικό οξύ όταν $\text{R}_1 = \text{H}$ and $\text{R}_2 = \text{H}$.

Ιδιαίτερη ώθηση έλαβε η έρευνα για αντικαρκινικά σύμπλοκα του Ru με την ανακάλυψη των αντιμεταστατικών ιδιοτήτων του συμπλόκου με την ονομασία NAMI (New Antitumor Metastasis Inhibitor) από την ομάδα του E. Alesio και του G. Sava [79]. Σήμερα βρίσκεται σε στάδιο κλινικών δοκιμών φάσης 2 καθώς ολοκλήρωσε επιτυχημένα την φάση 1 [81]. Το σύμπλοκο NAMI δηλαδή το *trans*- $\text{Na}[\text{RuCl}_4(\text{dmsO-S})(\text{Him})]$ (Him= ιμιδαζόλιο) έδειξε μια αύξηση του προσδόκιμου ζωής σε καρκίνωμα των πνευμόνων τύπου Lewis, σε καρκινώματα στήθους τύπου MCA και στο συνήθως θανατηφόρο κακόηθες μελάνωμα B16 [79]. Η αποτελεσματικότητα του NAMI στην αύξηση του προσδόκιμου ζωής καρκίνων σε αρχικό, αλλά και σε προχωρημένο στάδιο βρίσκεται στην δραστική μείωση σχηματισμού

μεταστάσεων. Ακόμη, ένα νέο σύμπλοκο ανάλογο του NAMI-A, το *trans*-H₂Im[RuCl₄(dmsso-S)(Im)], βρίσκεται σήμερα σε κλινικές δοκιμές. Τα πρώτα αποτελέσματα έδειξαν ότι η τοξικότητά του είναι ακόμα μικρότερη από αυτή που αναμενόταν από τις δοκιμές σε πειραματόζωα, ενώ παρουσιάζει ίδια περίπου αντιμεταστατική δραστηριότητα με το NAMI. Οι μεταστάσεις του καρκίνου είναι εξαιρετικά δύσκολο να αντιμετωπιστούν και για αυτό η αντιμεταστατική δραστηριότητα των NAMI και NAMI-A αποτελεί μια πολύ σημαντική ανακάλυψη [81]. Εντατικές έρευνες γίνονται για να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός δράσης της αντιμεταστατικής αυτής δραστηριότητας. Η αντιμεταστατική δραστηριότητα του NAMI-A δεν προέρχεται από άμεσες κυτταροτοξικές επιδράσεις ενώ η ικανότητα του αυτή, δεν περιλαμβάνει πιθανότητα ένταξής του στο DNA [82]. Οι δομές των NAMI και NAMI-A απεικονίζονται στο πιο κάτω σχήμα.

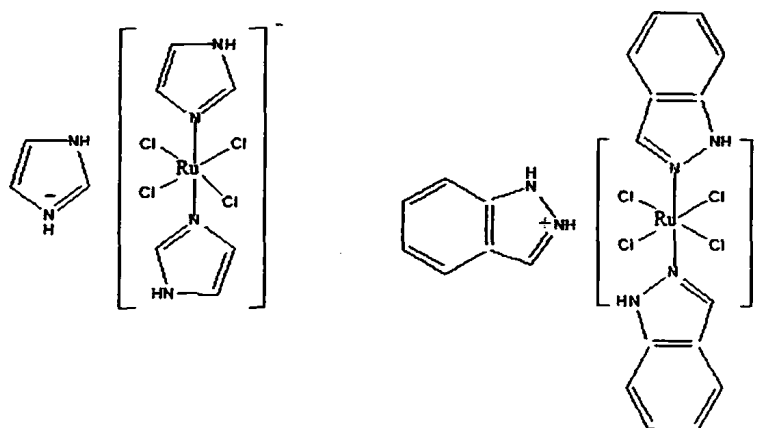


Σχήμα 1.15. Σχηματική απεικόνιση των συμπλόκων *trans*-Na[RuCl₄(dmsso-S)(Him)] (NAMI) και *trans*-H₂Im[RuCl₄(dmsso-S)(Him)] (NAMI-A), (Him= ιμιδαζόλιο).

Το ιμιδαζολικό σύμπλοκο, H₂im[*trans*-RuCl₄(Him)₂] (Him=ιμιδαζόλιο) μαζί με το ινδαζολικό παράγωγο του, δείχνουν εξαιρετική δραστηριότητα έναντι των καρκινικών σειρών HeLa και Jurkat T_{ag}. Και τα δύο σύμπλοκα (Σχήμα 1.16) βρίσκονται σε ένα προχωρημένο στάδιο κλινικών μελετών [83]. Το ινδαζολικό παράγωγο παρουσιάζει καλύτερη δραστηριότητα και μειωμένη τοξικότητα στις καρκινικές σειρές HeLa και Jurkat T_{ag}. από ότι το ιμιδαζολικό παράγωγο με IC₅₀ = 2.0 μM και IC₅₀ = 1.3 μM αντίστοιχα. Ο τρόπος δράσης τους φαίνεται να διαφέρει αν και ο μηχανισμός της βιολογικής δράσης τους δεν είναι ακόμη πλήρως διευκρινισμένος. Σε αντίθεση με το ινδαζολικό παράγωγο, το ιμιδαζολικό σύμπλοκο



παραμένει σταθερό για περισσότερο χρόνο σε υδατικά διαλύματα πλεονεκτώντας έναντι του ινδαζολικού.



Σχήμα 1.16. Δομή συμπλόκων $H_2im\{trans-[RuCl_4(Him)_2]\}$ και $H_2ind\{trans-[RuCl_4(Hind-kN^2)_2]\}$.

1.6.3. Σύμπλοκα του Ru(II) με 2,2'-διπυριδύλιο (bpy), 1,10-φαινανθρολίνη (phen) και παράγωγα τους

Το σύμπλοκο που αρχικά μελετήθηκε περισσότερο ήταν το $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, το οποίο συγκέντρωσε το ενδιαφέρον των ερευνητών λόγω της ενδιαφέρουσας φωτοχημείας του. Από τις πρώτες μελέτες αλληλεπίδρασης του με το DNA διαπιστώθηκε ότι παρουσιάζει σημαντική εναντιοεκλεκτικότητα κατά τη δέσμευσή του στη διπλή έλικα [28, 29, 30]. Το 2,2'-διπυριδύλιο (bpy) είναι ένα επίπεδο μόριο, ενώ συγκρινόμενο με την 1,10-φαινανθρολίνη (phen) διαθέτει ένα σαφώς λιγότερο εκτεταμένο αρωματικό π – σύστημα. Επιπλέον, η απουσία δεσμού μεταξύ των ατόμων άνθρακα 6 και 6' και δύο επιπλέον ατόμων άνθρακα που υπάρχουν στην 1,10-φαινανθρολίνη, δεν του επιτρέπει να εισχωρήσει βαθιά στην έλικα του DNA με αποτέλεσμα να ελαττώνεται περαιτέρω η διαθέσιμη επιφάνεια για παρεμβολή ανάμεσα στις βάσεις. Επίσης, αναμενόμενη είναι και η διαπίστωση ότι η σταθερά δέσμευσης του συμπλόκου $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ($K_b = 7 \times 10^2 M^{-1}$) είναι μικρότερη από του $[Ru(phen)_3]^{2+}$ ($K_b = 3 \times 10^4 M^{-1}$) και $[Ru(DIP)_3]^{2+}$ ($K_b = 4 \times 10^4 M^{-1}$) (όπου DIP = 4,7-διφαινυλ-1,10-φαινανθρολίνη) γεγονός που πιθανότατα οφείλεται και στη μικρότερη υδροφοβικότητα του bpy. Αν και ο υποκαταστάτης αυτός δεν παρουσιάζει τη δυνατότητα

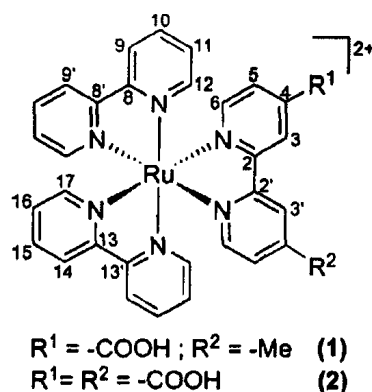
παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις του DNA, εντούτοις εμφανίζει την τάση να παραλληλίζεται με τις βάσεις [84].

Μελέτες τρις – χηλικών συμπλόκων του ρουθηνίου με bry και phen, έδειξαν ότι τα σύμπλοκα αυτά βρίσκονται κυρίως στην εξωτερική υδρόφιλη στιβάδα του DNA αλληλεπιδρώντας ηλεκτροστατικά με τον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό σκελετό [85]. Οι Mahadevan και Paliandavar τονίζουν τον ρόλο της ιοντικής ισχύος στη δέσμευση των συμπλόκων αυτών στο DNA. Η Barton και οι συνεργάτες της μελέτησαν την επίδραση της ιοντικής ισχύος διαλυμάτων στην σταθερά δέσμευσης K_b , του $[Ru(bry)_3]^{2+}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10 mM όπου παρατηρήθηκε ασθενής δέσμευση του στο DNA [86]. Επιπλέον σε χαμηλή ιοντική ισχύ < 5 mM (NaCl), η σταθερά δέσμευσης του συμπλόκου στο DNA βρέθηκε 2×10^5 mM [34], γεγονός που ενισχύει την άποψη για ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση. Η ιοντική ισχύς φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο και στη δέσμευση και άλλων συμπλόκων του Ru(II) στο DNA. Έτσι, η ίδια ομάδα [87] παρατήρησε ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl το σύμπλοκο $[Ru(phen)_3]^{2+}$ δεν δεσμεύεται σχεδόν καθόλου στο DNA. Συνεπώς, η αύξηση της ιοντικής ισχύος ελαττώνει το ποσοστό δέσμευσης των συμπλόκων αυτών στο DNA πιθανότατα γιατί η ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των θετικά φορτισμένων συμπλόκων του Ru(II) και του πολυανιονικού DNA ελαττώνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών [89]. Η ερμηνεία της επίδρασης αυτής της ιοντικής ισχύος στη σταθερά δέσμευσης στηρίζεται στη αντίληψη ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων δεν ευνοείται η απελευθέρωση των αντισταθμιστικών ιόντων που προέρχονται από τη θέση που θα καταλάβει το σύμπλοκο με αποτέλεσμα η προσέγγιση να δυσχεραίνεται. Η επίδραση της ιοντικής ισχύος στη σταθερά δέσμευση επεκτείνεται και σε σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής όπως το $[Ru(phen)_2(dppz)]^{2+}$ για το οποίο διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της σταθεράς δέσμευσης όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl [89].

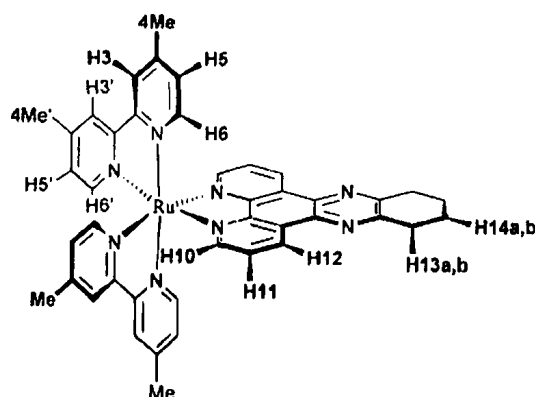
Η παρουσία υποκαταστάσεων στο bry σε σύμπλοκα του τύπου $[Ru(bry)_2L]^{2+}$ (όπου L = 4-καρβοξυ-4'-μεθυλο-2,2'-διπυριδίνη ή 4,4'-δικαρβοξυ-2,2'-διπυριδίνη) φαίνεται να αλλάζει τον τρόπο δέσμευσης στο DNA σε σύγκριση με το αρχικό σύμπλοκο $[Ru(bry)_3]^{2+}$. Ο R. Caspar και οι συνεργάτες του, μελέτησαν με φασματοσκοπία NMR την αλληλεπίδραση των Λ- και Δ- εναντιομερών των παραπάνω συμπλόκων με το DNA [90] και πρότειναν, την πιθανή συμμετοχή της καρβοξυλομάδας στη δέσμευση των συμπλόκων αυτών στο DNA. Ο



προσδιορισμός της σταθεράς δέσμευσης (K_b) τους στο DNA έδειξε ότι δεσμεύονται ισχυρότερα από το πρόδρομο σύμπλοκο $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, ενισχύοντας την άποψη της πιθανής συμμετοχής των καρβοξυλομάδων στη δέσμευση τους. Το Λ- εναντιομερές παρουσιάζει σχετικά μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης ($K_b = 2.22 \times 10^3 M^{-1}$) από το Δ- εναντιομερές, ($K_b = 0.91 \times 10^3 M^{-1}$) γεγονός ιδιαίτερα σπάνιο ενώ ανάλογο φαινόμενο είναι γνωστό στην βιβλιογραφία μόνο για το σύμπλοκο $[Ru(bpyMe_2)_2(dprc)]^{2+}$ (όπου $dprc =$ διπύριδο[3,2-*a*:2',3'-*c*](6,7,8,9-τετραυδροφαιναζίνη)) [91]. Για το τελευταίο, ενδιαφέρον ακόμη παρουσιάζει το γεγονός ότι το Λ- εναντιομερές δεν κόβει το πλασμιδιακό DNA ενώ το αντίστοιχο Δ- διασπά τους φωσφοροδιεστερικούς δεσμούς τόσο παρουσία όσο και απουσία φωτός.

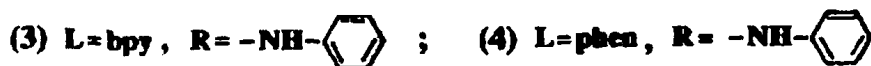
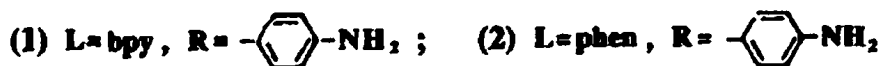
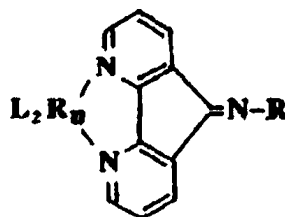


Σχήμα 1.17. Δομές των συμπλόκων τύπου $[Ru(bpy)_2L]^{2+}$ (όπου $L =$ 4-δικαρβοξυ-4'-διμεθυλο-2,2'-διπυριδίνη ή 4,4'-δικάρβοξυ-2,2'-διπυριδίνη).



Σχήμα 1.18. Δομή του συμπλόκου $[Ru(bpyMe_2)_2(dprc)]^{2+}$.

Η επίδραση των υποκαταστάσεων στους αρωματικούς δακτυλίους του bpy μελετήθηκε περαιτέρω και από τον G. Yang και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μελέτησαν την αλληλεπίδραση συμπλόκων του ρουθηνίου με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες, του τύπου $[RuL_2L']^{2+}$, όπου $L = \text{bpy}$ ή phen και $L' =$ βάσεις του Schiff ή φαινυλδραζόνες προερχόμενες από τη 4,5-διαζαφλουορεν-9-όνη, με CT-DNA [92]. Με χρήση διάφορων φασματοσκοπικών τεχνικών συμπεράναν ότι το σύμπλοκο (1) από το πιο κάτω σχήμα, έχει μόνο ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το DNA, το σύμπλοκο (2) αλληλεπιδρά χωρίς παρεμβολή, ενώ τα σύμπλοκα (3) και (4) παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις.



Σχήμα 1.19. Δομές των συμπλόκων με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες του τύπου $[RuL_2L']^{2+}$.

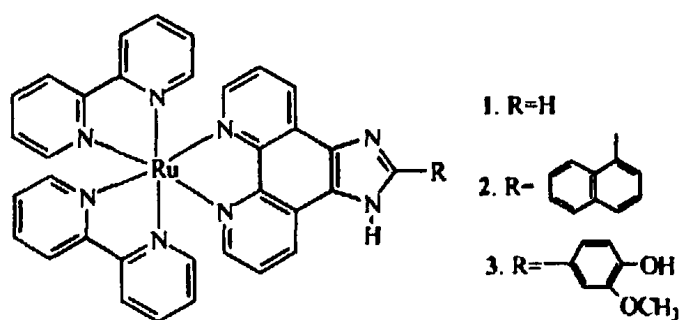
Οι αλληλεπιδράσεις των εναντιομερών συμπλόκων Λ - και Δ - $[Ru(\text{phen})_3]^{2+}$ με το DNA είναι αυτές που έχουν συζητηθεί περισσότερο. Διάφορες μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το Δ - $[Ru(\text{phen})_3]^{2+}$ είτε παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις [43, 50, 47, 93], είτε εισάγεται μερικώς [84, 94, 95] είτε δεσμεύεται στο DNA με διάφορους τρόπους [95, 96] (στην μείζονα [94, 95] ή στην ελάσσονα [81, 82] αύλακά του). Το Λ -ισομερές δεσμεύεται στο DNA είτε με ηλεκτροστατικές δυνάμεις [49, 47] είτε με διεπιφανειακές αλληλεπιδράσεις με μικρή δέσμευση στην μείζονα ή ελάσσονα αύλακα. Η πιο πρόσφατη εργασία του D. Z. M. Coggan και των συνεργατών του, αναφέρει ότι ο τρόπος δέσμευσης των εναντιομερών συμπλόκων του $[Ru(\text{phen})_3]^{2+}$ εξαρτάται από την συγκέντρωσή τους [96]. Το Λ -εναντιομερές σε όλες τις αναλογίες συμπλόκου - DNA δεσμεύεται με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε ο ένας υποκαταστάτης της φαινανθρολίνης να βρίσκεται σχεδόν παράλληλος προς τις βάσεις εντός



της μείζονος αύλακας (με μερική εισχώρηση). Το Δ-εναντιομερές σε χαμηλές συγκεντρώσεις δεσμεύεται στην ελάσσονα αύλακα ενώ σε υψηλότερες δεσμεύεται με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε ο ένας υποκαταστάτης να είναι τοποθετημένος κατά μήκος της αύλακας ενώ παρατηρείται επίσης και μερική εισχώρηση στη μείζονα αύλακα.

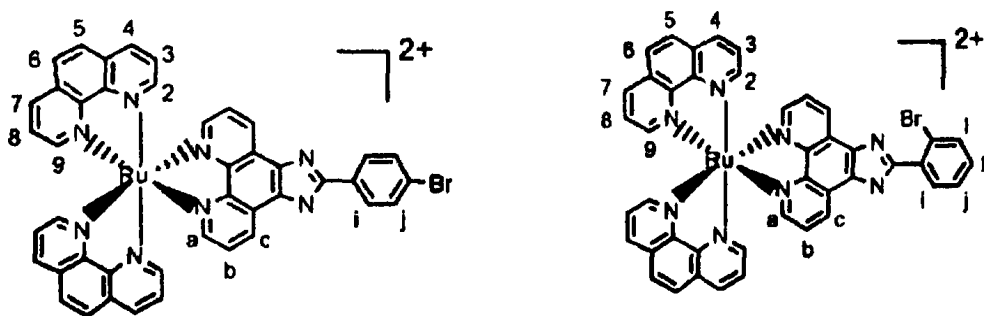
Η παρουσία υποκαταστάσεων στους αρωματικούς δακτυλίους μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα ενός συμπλόκου με τέτοιο τρόπο ώστε να αναγνωρίζει και να δεσμεύεται περισσότερο σε A - DNA αντί B - DNA. Όπως φαίνεται από την μελέτη των H. -Y. Mei και J. K. Barton [97], το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{TMP})_3]^{2+}$ (όπου TMP = 3,4,7,8-τετραμεθυλφαινανθρολίνη), δεσμεύεται εκλεκτικά σε A-DNA, ενώ μετά από ακτινοβολήση με ορατό φως κόβει εκλεκτικά τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το σύμπλοκο Λ- $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ δεσμεύεται κατά προτίμηση στην επιφάνεια του B -DNA και ότι η ελάσσονα αύλακα του A-DNA είναι ρηχή ενώ μείζονα αύλακα στενή, βαθιά και δυσπρόσιτη, ο σχεδιασμός $[\text{Ru}(\text{TMP})_3]^{2+}$ έγινε κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αλληλεπιδρά με την ελάσσονα αύλακα του A-DNA ώστε να μην μπορεί να αλληλεπιδράσει με B-DNA ούτε μέσω παρεμβολής λόγω του μεγέθους του υποκαταστάτη, αλλά ούτε και μέσω δέσμευσης στις αύλακες. Έτσι, το σύμπλοκο Λ- $[\text{Ru}(\text{TMP})_3]^{2+}$ 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.

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 σημαντικά τον τρόπο δέσμευσης. Ο J. Ling και οι συνεργάτες του μελέτησαν με φωτοφυσικές τεχνικές, όπως φασματοσκοπία ηλεκτρονικής απορρόφησης, φωταύγεια, 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 = 1,10-φαινανθρολίνη και παράγωγά του με α-ναφθυλο και 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-φαινυλο στη θέση 2) [98]. Διαπιστώθηκε ότι τα σύμπλοκα αυτά δεσμεύονται στο DNA μέσω παρεμβολής και τη μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης παρουσιάζει το τελευταίο παράγωγο ($K_b > 10^6 \text{ M}^{-1}$), γεγονός που αποδίδεται στον πιθανό σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του συμπλόκου και του DNA.



Σχήμα 1.20. Δομή του συμπλόκου $[Ru(bpy)_2L]^{2+}$ (όπου $L = 1,10$ -φαινανθρολίνη και παράγωγά του με (1) ιμιδαζόλιο (2) με α -ναφθυλο στη θέση 2 και (3) με 3-μεθοξυ-4-υδροξυ-φαινυλο στη θέση 2.

Επίσης, η μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων $[Ru(phen)(PBIP)]^{2+}$ (όπου $PBIP = 2$ -(4-βρωμοφαινυλο)ιμιδαζο[4,5-*f*]1,10-φαινανθρολίνη) και $[Ru(phen)(OBIP)]^{2+}$ (όπου $OBIP = 2$ -(2-βρωμοφαινυλο)ιμιδαζο[4,5-*f*]1,10-φαινανθρολίνη), με CT-DNA δείχνει ότι η διαφορετική θέση του παρεμβαλλόμενου υποκαταστάτη έχει ως αποτέλεσμα διαφορές στις σταθερές δέσμευσης ($K_b = 5.91 \times 10^4 M^{-1}$ και $K_b = 3.73 \times 10^4 M^{-1}$ αντίστοιχα) αλλά και στον τρόπο δέσμευσής του στο DNA [99]. Παρόμοια μελέτη συμπλόκων του Ru(II) με άλλα παράγωγα του IP, όπως $[Ru(bpy)_2(CNOIP)]^{2+}$ (όπου $CNOIP = 2$ -(2-χλώρο-5-νιτροφαινυλο)ιμιδαζο[4,5-*f*]1,10-φαινανθρολίνη), το σύμπλοκο $[Ru(bpy)_2(HPIP)]^{2+}$ (όπου $HPIP = 2$ -(2-υδροξυφαινυλο)ιμιδαζο[4,5-*f*]1,10-φαινανθρολίνη) και το σύμπλοκο $[Ru(bpy)_2(TAPTP)]^{2+}$ (όπου $TAPTP = 4,5,9,18$ -τετρααζαφαινανθρένο-[9,10-*b*]τριφαινύλιο) παρουσίασαν διαφορές στη συμπεριφορά κατά την δέσμευση στο DNA, τη φωτοδραστικότητα αλλά και τη διάσπαση του πλασμιδιακού DNA, pBR322, μετά από ακτινοβόληση [100].



Σχήμα 1.21. Δομή των συμπλόκων $[Ru(phen)(PBIP)]^{2+}$ (όπου $PBIP = 2$ -(4-βρωμοφαινυλο)ιμιδαζο[4,5-*f*]1,10-φαινανθρολίνη) και $[Ru(phen)(OBIP)]^{2+}$ (όπου $OBIP = 2$ -(2-βρωμοφαινυλο)ιμιδαζο[4,5-*f*]1,10-φαινανθρολίνη).

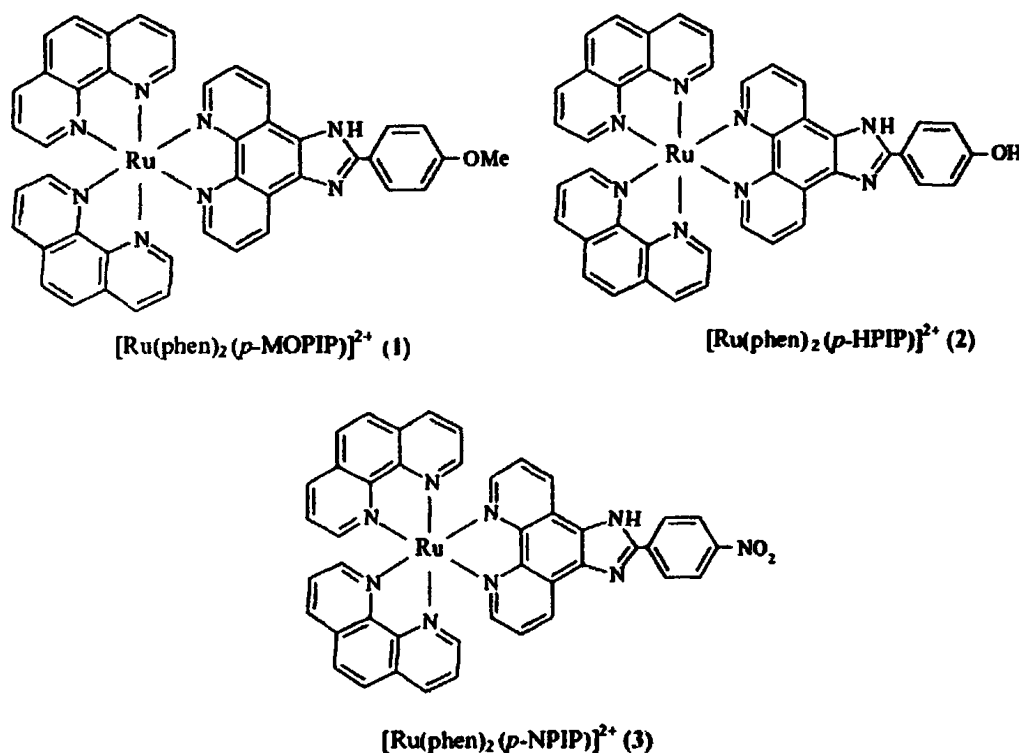


Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HPIP})]^{2+}$ έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά με το CT-DNA μέσω παρεμβολής [101]. Ο Liu και οι συνεργάτες του [102] αναφέρουν ότι δεν παρατηρήθηκε εναντιοεκλεκτικότητα κατά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το CT-DNA. Όμως με την χρήση φασματοσκοπίας NMR, σε μικρότερα τμήματα DNA όπως το εξανουκλεοτίδιο $d(\text{GTCGAC})_2$ [101], διαπιστώθηκε ότι το Δ-εναντιομερές παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις αδενίνη και κυτοσίνη στο κεντρικό μέρος της έλικας, ενώ το Λ-εναντιομερές δεσμεύεται ασθενώς στο DNA χωρίς παρεμβολή. Η παραπάνω διαπίστωση θα μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η δέσμευση των συμπλόκων αυτών στο DNA είναι συνάρτηση και άλλων χαρακτηριστικών του DNA όπως το μήκος, η αλληλουχία κ.λ.π.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση των σταθερών δέσμευσης των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HPIP})]^{2+}$ και $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{HNAIP})]^{2+}$ (όπου HNAIP = 2-(2-υδροξυ-1-ναφθυλο)ιμιδαζο[4,6-*f*]1,10-φαινανθρολίνη), όπου τόσο το HPIP όσο και το HNAIP είναι δύο υποκαταστάτες που παρουσιάζουν ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου αυξάνοντας την αρωματική επιφάνεια του υποκαταστάτη. Όπως προκύπτει από την εργασία του Liu και των συνεργατών του [103], το σύμπλοκο με τον υποκαταστάτη HPIP αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής με σταθερά δέσμευσης μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από το αντίστοιχο σύμπλοκο με τον υποκαταστάτη HNAIP, ο οποίος αλληλεπιδρά μέσω μερικής παρεμβολής. Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι ο μεγάλος ναφθαλικός δακτύλιος του HNAIP δεν βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με τον ιμιδαζολικό δακτύλιο οδηγώντας έτσι σε μερική παρεμβολή. Επίσης, θεωρητικές μελέτες με τον ημιδαζολικό δακτύλιο των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})]^{2+}$ (όπου L = IP, PIP, HPIP) έδειξαν ότι η παρουσία του ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου στο μόριο του HPIP έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση στην επίπεδη επιφάνεια του υποκαταστάτη και αυτό μπορεί να ερμηνεύσει την σχετικά υψηλή σταθερά δέσμευσης ($K_b = 6.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) που παρατηρείται στα σύμπλοκά του [104]. Από την άλλη, από τη σύγκριση της αλληλεπίδρασης με το DNA των συμπλόκων του τύπου $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{p-L})]^{2+}$, όπου L = MOPIP και NPIP (MOPIP = 2-(4-μεθοξυφαινυλο)ιμιδαζο[4,5-*f*]1,10-φαινανθρολίνη και NPIP = 2-(4-νιτροφαινυλο)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 πυκνότητες φαινυλικού δακτυλίου του PIP, εξ' αιτίας των υποκαταστάσεων του [105]. Συγκεκριμένα, η σειρά των σταθερών δέσμευσης



βρίσκεται σε συμφωνία με την ικανότητα έλξης ηλεκτρονίων της ομάδας υποκατάστασης από τον φαινυλικό δακτύλιο: $-OR < -OH < -NO_2$ και είναι $K_b = 0.20 \times 10^5 M^{-1}$, $K_b = 0.69 \times 10^5 M^{-1}$, $K_b = 1.56 \times 10^5 M^{-1}$ αντίστοιχα. Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι η επίδραση της ομάδας $-NO_2$ στη 2-νιτροφαινανθρολίνη παρόλο που παρέχει τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου και κατά συνέπεια την δημιουργία μεγάλης αρωματικής επιφάνειας, η δέσμευση στο DNA είναι μικρή και συγκρίσιμη με αυτή του συμπλόκου $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ [106].



Σχήμα 1.22. Δομές των συμπλόκων του τύπου $[Ru(phen)_2(p-L)]^{2+}$, όπου L = MOPIP, HPIP και NPIP.

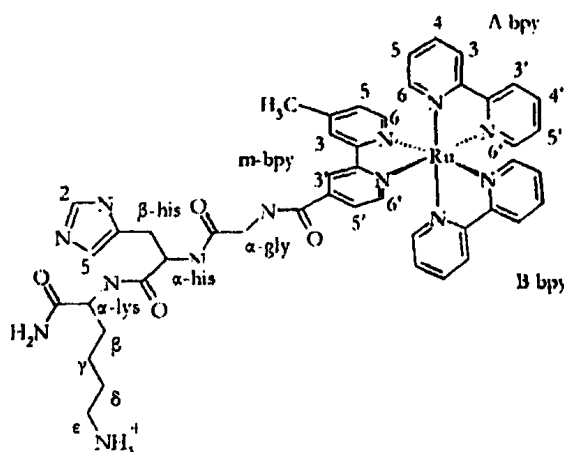
Πολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου με συζευγμένα αμινοξέα ή πεπτίδια στον υποκαταστάτη bpy, έχουν αναφερθεί σε μια προσπάθεια εκλεκτικής τους δέσμευσης στο DNA. Έτσι, μελετήθηκαν σύμπλοκα του τύπου $[Ru(bpy)_2(4-CO_2Y-4'-Mebpy)]^{2+}$ (όπου $4-CO_2Y-4'-Mebpy = 4'$ μέθυλο- 2,2'-διπυριδίνη-4-καρβοξυλικό οξύ και Y αμινοξύ ή πεπτίδιο) [107] καθώς και το σύμπλοκο $[Ru(phen)(bpy')(dppz)]^{2+}$ (όπου $bpy' = 4'$ μέθυλο- 2,2'-διπυριδίνη-4-βουτυρικό οξύ) [108] και βρέθηκε ότι ο τρόπος δέσμευσης των συμπλόκων αυτών με το DNA επηρεάζεται δραστικά από την φύση των συζευγμένων αμινοξέων. Τα



σύμπλοκα αυτά έχουν την δυνατότητα να φωτοοξειδώνουν το DNA κοντά στο σημείο σύνδεσής τους.

Επίσης μελετήθηκε από τον Ogawa και τους συνεργάτες του, το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phenIA})](\text{PF}_6)_2$ (όπου phenIA = *N* ιοδωακέτυλο-5-άμινο-1,10 φαινανθρολίνη) με σύζευγμένο ένα 54-πεπτίδιο σε διαμόρφωση α-έλικας, το οποίο δεν παρουσίασε καμία φωτοοξείδωση του DNA, πιθανότατα λόγω της μεγάλης απόστασης του μεταλλικού κέντρου από το σημείο σύνδεσής του με το DNA [109]. Αντίθετα, το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phenam})\text{-Cys-(Glu)}_5\text{-Gly}]^{3+}$ με μικρότερο μήκος πεπτιδίου παρουσίασε μεταφορά ηλεκτρονίου μεταξύ του μεταλλικού συμπλόκου και του Fe-κυτοχρώματος *c* [110].

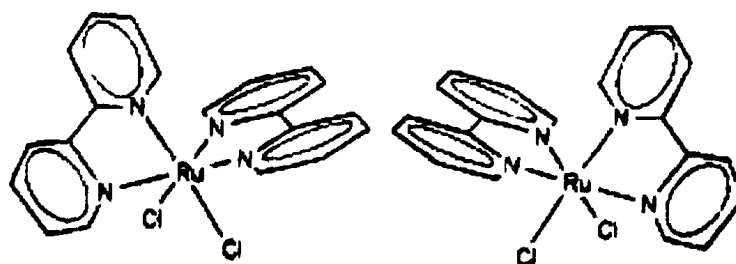
Το εργαστήριο μας [111] μελέτησε τις αλληλεπιδράσεις των δυο διαστερομερών συμπλόκων Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{-Gly-His-LysCONH}_2\text{-4'-Mebpy})]^{2+}$ με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(5'\text{-CGCGAATTCGCG-3}')$, στο οποίο ο ένας διπυριδινικός υποκαταστάτης είναι συζευγμένος με το τριπεπτίδιο Gly-His-Lys. Από την μελέτη αυτή αποδείχτηκε ότι τα δυο ισομερή αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο με το ολιγονουκλεοτίδιο. Το Δ -ισομερές δεσμεύεται στην μείζονα αύλακα κοντά στην κεντρική περιοχή της αλληλουχίας (-AATT-) του ολιγονουκλεοτιδίου, ενώ το Λ -ισομερές δεσμεύεται πιθανόν όχι εκλεκτικά, προσεγγίζοντας την έλικα από την πλευρά της ελάσσονος αύλακας. Το πεπτίδιο GHK φαίνεται να καθοδηγεί το Δ -ισομερές στον τρόπο της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο. Η προσθήκη μεγαλύτερων πεπτιδίων στο ίδιο αρχικό σύμπλοκο του Ru όπως το Arg-Gly-Asn-Ala-His-Glu-Arg που αποτελεί τμήμα της ενδονουκλεάσης MumI, οδήγησε στην δημιουργία διαστερομερών συμπλόκων όπου το Δ -ισομερές συνδέεται στα άκρα του ολιγονουκλεοτιδίου $d(\text{CGCGATCGCG})_2$ ενώ το Λ -ισομερές στο κέντρο του. Παρ' όλη την διαφορά που παρουσιάζουν στον τρόπο σύνδεσης τα δύο ισομερή δεν εμφανίζουν εκλεκτικότητα πιθανόν εξ αιτίας του μεγάλου μήκους του πεπτιδίου και του υψηλού βαθμού ελευθερίας στις διαμορφώσεις του [112].



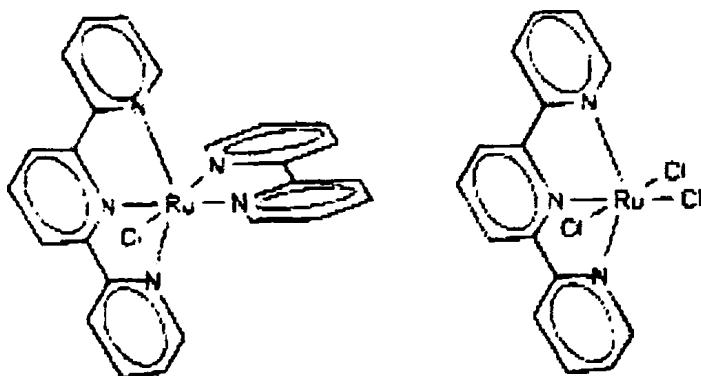
Σχήμα 1.23. Δομή του Δ -[Ru(bpy)₂(4-CO₂H-4'-Mebrpy)]²⁺.

Άλλα σύμπλοκα του ρουθηνίου με 2,2'-διπυριδίλιο και 1,10-φαινανθρολίνη που περιέχουν ακόμη ύδατο ή χλώρο ομάδες, έχουν επίσης μελετηθεί και βρέθηκε ότι δεσμεύονται στο DNA με απευθείας δεσμό [113]. Το νερό και οι χλώρο ομάδες αποτελούν ευκίνητους και εύκολα ανταλλάξιμους υποκαταστάτες σε σύγκριση με τους σταθερούς πυριδινικούς υποκαταστάτες [114, 115] με αποτέλεσμα τέτοια σύμπλοκα να αντιδρούν με διάφορους βιολογικούς στόχους.

Η κυτταροτοξικότητα των χλωροπολυπυριδινικών συμπλόκων του ρουθηνίου όπως [Ru(terpy)(bpy)Cl]Cl, *cis*-[Ru(bpy)₂Cl₂], and *mer*-[Ru(terpy)Cl₃] (Σχήμα 1.24, 1.25) έχει μελετηθεί σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σύμπλοκο *mer*-[Ru(terpy)Cl₃] παρουσιάζει μια σημαντικά υψηλότερη κυτταροτοξικότητα σε σύγκριση με τα άλλα σύμπλοκα (IC₅₀ = 8 μM ± 2 για L1210) [116].



Σχήμα 1.24. Σύμπλοκα Λ-, Δ-[Ru(bpy)₂Cl₂].

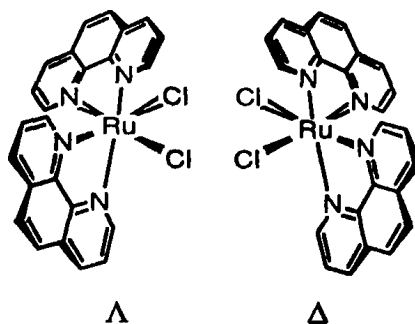


Σχήμα 1.25. Σύμπλοκα $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ και $\text{mer}-[\text{Ru}(\text{terpy})\text{Cl}_3]$.

Σε ένα μη κυτταρικό περιβάλλον βρέθηκε ότι τα παραπάνω χλωροπολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου αντιδρούν με το DNA παρουσιάζοντας μια προτίμηση στο N7 της βάσης της γουανίνης. Νωρίτερα, είχε επιβεβαιωθεί και η ένταξη ενός ανάλογου συμπλόκου, του $\text{cis}-[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]$ στο άτομο N7 της γουανίνης [117].

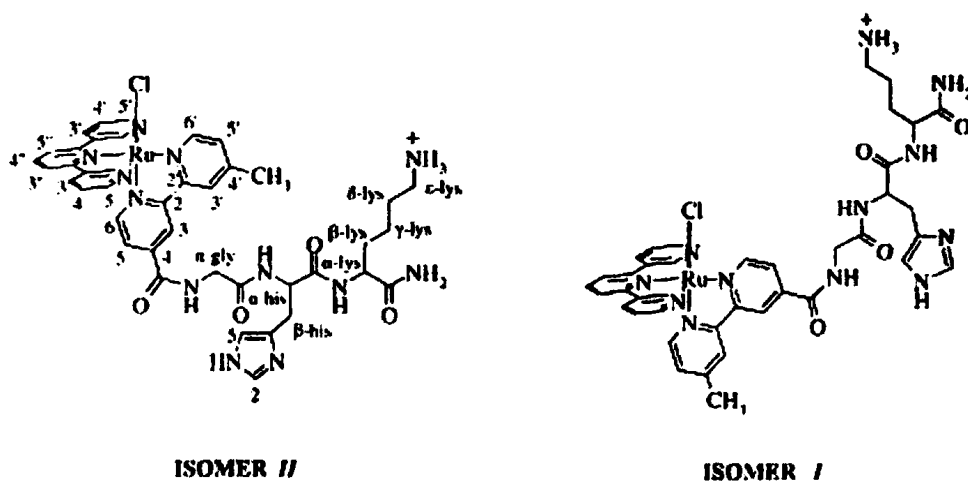
Ο Thorp και οι συνεργάτες του επέκτειναν τη μελέτη του τρόπου δέσμευσης στο B-DNA, των συμπλόκων $\text{cis}-[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $\text{cis}-[\text{Ru}(\text{L-L})_2(\text{py})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ και $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{L-L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (L-L = bpy, phen) [102]. Τα μονοδραστικά σύμπλοκα του τύπου $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{L-L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (L-L = bpy, phen) δεσμεύονται απ' ευθείας με δεσμό ένταξης στις βάσεις του B-DNA [118]. Μελέτες θερμικής μετουσίωσης της έλικας του DNA (T_m) υποδεικνύουν το σχηματισμό μονοπαραγώγων για το $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{L-L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ και το $\text{cis}-[\text{Ru}(\text{L-L})_2(\text{py})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (L-L = bpy, phen) με το DNA [114]. Τα διδραστικά σύμπλοκα που έχουν *cis*-διαμόρφωση προκαλούν μια μεγαλύτερη αύξηση στη θερμοκρασία τήξης από αυτή που προκαλούν τα *trans*-σύμπλοκα του λευκόχρυσου [114].

Έχει βρεθεί πως τα σύμπλοκα $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]\text{ClO}_4$ (phen = 1,10-φαινανθρολίνη,) και $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{ox})]$ (bpy = 2,2'-διπυριδίνη, ox = οξαλικό διανιόν) δεν παρουσιάζουν σημαντική αντικαρκινική δραστηριότητα. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις των πολυπυριδινικών συμπλόκων ρουθηνίου με το DNA, που περιέχουν ευκίνητους υποκαταστάτες (όπως π.χ. χλωροανιόντα), απέκτησαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν οι Barton και Lolis ανέφεραν το 1985 εναντιοεκλεκτική δέσμευση του Λ-ισομερούς του $\text{cis}-[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ με DNA Β-τύπου [113].



Σχήμα 1.26. Δομή των διαστερεωμερών συμπλόκων Λ- και Δ-[RuCl₂(phen)₂].

Στο εργαστήριο μας αναπτύξαμε πρόσφατα μια νέα τεχνική στη σύνθεση χλωροπολυπυριδινικών συμπλόκων του ρουθηνίου με συζευγμένα πεπτίδια σε πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες, η οποία βασίστηκε στην σύνθεση του συμπλόκου μέσω της σύνθεσης σε στερεή φάση (Solid Phase Synthesis) [119]. Έτσι μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του συμπλοκου [Ru(terpy)(4-CO₂Gly-His-LysCONH₂-4'-Mebpy)Cl](PF₆) με το CT-DNA και πλασμιδιακό DNA P388 και βρέθηκε ότι το σύμπλοκο δεσμεύεται στις βάσεις της γουανίνης και της κυτοσίνης, αλληλεπιδρώντας επιπλέον και ηλεκτροστατικά με το DNA εκτοπίζοντας αντισταθμιστικά ιόντα Na⁺, ενώ κατά την δέσμευσή τους προκαλεί απελίκωση του DNA ανάλογη με εκείνη που συμβαίνει κατά την μεταγραφή του από τις μεταγραφάσες.



Σχήμα 1.27. Δομή των ισομερών συμπλόκων του [Ru(terpy)(4-CO₂H-4'-Mebpy-GHK-CONH₂)Cl](PF₆).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Μία μεγάλη κατηγορία ενδονουκλεασών αναφέρεται σε τεχνητές ή χημικές νουκλεάσες που δρουν υδρολυτικά ή οξειδωτικά στην εκλεκτική διάσπαση του φωσφοροδιεστερικού δεσμού των νουκλεϊνικών οξέων.

Η βιομιμητική αυτή διάσπαση (υδρολυτική ή οξειδωτική) του DNA ή του RNA βρίσκεται σήμερα στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος της Βιοτεχνολογίας και της Ιατρικής. Τα συνθετικά αυτά νουκλεολυτικά ένζυμα σχεδιάζονται για να εμφανίσουν εκλεκτικότητα στη δράση τους ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και θα μπορούσαν να βρουν εφαρμογές στο χειρισμό-απομόνωση γονιδίων, ως διαγνωστικά αντιδραστήρια, στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη καινούριων φαρμάκων κ.λ.π.

- Σύμπλοκα των μετάλλων μετάπτωσης με κατάλληλους υποκαταστάτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκλεκτικές χημικές νουκλεάσες. Η ιδιότητα πολυπυριδινικών συμπλόκων του ρουθηνίου να φωτοδιασπούν το DNA αποτελεί μια σημαντική ευκαιρία για την ανάπτυξη τεχνητών νουκλεολυτικών ενζύμων. Η κατεύθυνση τέτοιων συμπλόκων σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA μπορεί να καθοδηγείται από το είδος του υποκαταστάτη.

Σκοπός της διατριβής είναι η μελέτη πολυπυριδινικών συμπλόκων του Ru(II) με συζευγμένα αμινοξέα σε ότι αφορά τον τρόπο σύνδεσής τους με το DNA και την νουκλεολυτική τους δραστηριότητα. Για το λόγο αυτό έγινε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός συμπλόκων του Ru(II) με διπυριδινικούς υποκαταστάτες, σε ένα από τους οποίους συνδέονται δύο αμινοξέα και η μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με τη διπλή έλικα του DNA με τη χρήση διάφορων φασματοσκοπικών και αναλυτικών τεχνικών.

Επιλέχθηκαν να συντεθούν και να χαρακτηριστούν σύμπλοκα του Ru(II) με υποκαταστάτες διπυριδιλία, όπου στον ένα υπάρχουν συζευγμένα μια σειρά από αμινοξέα. Τα σύμπλοκα αυτά (i) δεν διαθέτουν ελεύθερες θέσεις για την δημιουργία απ' ευθείας δεσμού με τις βάσεις του DNA και δεν παρεμβάλλονται ανάμεσα στις βάσεις αλλά μπορούν να δεσμευτούν στις αύλακές του, παρέχοντας δυνατότητα για τη δημιουργία ειδικών επαφών μεταξύ των υποκαταστάσεων στους αρωματικούς δακτυλίους του διπυριδιλίου και των βάσεων του DNA, (ii) το διπυριδιλίο ως βοηθητικός υποκαταστάτης έχει τις λιγότερες δυνατές στεरिकές αλληλεπιδράσεις συγκριτικά με πιο εκτεταμένους αρωματικούς

υποκαταστάτες και (iii) η ύπαρξη χειρικού κέντρου στα σύμπλοκα αυτά, προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης της αλληλεπίδρασης διαφορετικών ισομερών, διαπιστώνοντας με αυτό τον τρόπο την επίδραση μικρών μεταβολών στη δομή στον τρόπο δέσμευσης των συμπλόκων στο DNA. Έτσι, επιλέχθηκαν τα σύμπλοκα με γενικό τύπο Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(Yn)](PF₆)₂ όπου Yn είναι ένα διπυριδύλιο με συζευγμένα δύο αμινοξέα στη θέση 4 και 4'.

Ακόμη, μελετήθηκε το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH₂)₂bpy)Cl]Cl₃ προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των συζευγμένων λυσίνων στην αλληλεπίδραση με απευθείας δεσμό ένταξής του συμπλόκου αυτού με το DNA.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



2.1. Υλικά και φυσικές μετρήσεις

2.1.1. Υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια και οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός τους. Τα δεοξυνουκλεοτίδια d(3'-CGCGCG-5'), d(3'-GTCGAC-5') αγοράστηκαν από την εταιρία OSWEL DNA (Πανεπιστήμιο Southampton, UK) και καθαρίστηκαν με στήλη Sephadex G-25, 120 x 2.5 cm, χρησιμοποιώντας απιονισμένο νερό ως διαλύτη έκλουσης ενώ στη συνέχεια λυοφιλιοποιήθηκαν μέχρι ξηρού. Το CT-DNA (42 % G + C, μοριακής μάζας $\sim 2 \times 10^7$) παρασκευάστηκε και χαρακτηρίστηκε σύμφωνα με μεθόδους της βιβλιογραφίας [120]. Τα πλασμίδια pSP73 (2464 bp) και pUC19 (2686 bp) απομονώθηκαν σύμφωνα με καθιερωμένες τεχνικές. Το Riboprobe Gemini System II που περιέχει τον εκκινητή T7 RNA πολυμεράση αγοράστηκε από την Promega. Το EtBr, το ακριλαμίδιο, η ουρία και η αγαρόζη αγοράστηκαν από την Merck. Τα σύμπλοκα *cis*-Ru(bpy)₂Cl₂ [121], Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(py)₂]A (όπου A=O,O'-διβενζόυλ-τρυγικό οξύ) [102, 121], Ru(terpy)Cl₃ [122] και ο υποκαταστάτης 4,4'-δικαρβοξυ-2,2'-διπυριδίνη [123] συντέθηκαν με μικρή τροποποίηση των βιβλιογραφικών μεθόδων.

2.1.2. Φυσικές μετρήσεις

Η λήψη των φασμάτων υπερύθρου των συμπλόκων και των υποκαταστατών στην περιοχή 4000-300 cm⁻¹, λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer Spectrum GX - FT IR σε δισκία KBr. Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού UV - Vis λήφθηκαν σε όργανο Beckman DU 7400, χρησιμοποιώντας κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm σε διαλύτη tris HCl (τρις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο, pH = 7.4) και συγκέντρωσης δείγματος 4×10^{-5} M. Η λήψη των φασμάτων κυκλικού και γραμμικού διχρωϊσμού έγινε σε όργανο Jasco J-720, στην περιοχή 600-220 nm σε θερμοκρασία δωματίου, χρησιμοποιώντας κυψελίδα διαδρομής 1 cm σε διαλύτη tris HCl. Η συγκέντρωση των δειγματος για την λήψη των φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού ήταν 1×10^{-5} M. Για τις μετρήσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H-NMR

χρησιμοποιήθηκαν τα όργανα Bruker Avance 600 MHz, Bruker Avance 400 MHz και Bruker 250 MHz. Η θερμοκρασία λήψης των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ ήταν σταθερή στους 298 K. Χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες D_2O , MeOD και CDCl_3 και για την λήψη των φασμάτων στα πειράματα αλληλεπίδρασης με τα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7.0$). Για την επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα MestRE-C, TOPSPIN 1.3 και SPARKY. Οι τιμές του σημείου τήξης T_m για το DNA μετρήθηκαν σε μια συσκευή Varian Cary 4000 και ο υπολογισμός της διαφοράς ΔT_m έγινε με τις βιβλιογραφικές μεθόδους [12]. Για την επεξεργασία των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Cary WinUV. Στα πειράματα ηλεκτροφόρησης τα δείγματα αναλύθηκαν με πηκτική αγαρόζης 1 %, στα 68 Volt και ουρίας 8 M / πολυακρυλαμιδίου 6 % και οι ταινίες φωτογραφήθηκαν με συσκευή ανάλυσης BAS 2500 Fujifilm και οι εντάσεις των κορυφών βρέθηκαν με το πρόγραμμα AIDA (AIDA image analyzer software). Η ακτινοβόληση των διαλυμάτων κατά τις βιοχημικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκε με photoreactor LZC-1CH2 που περιείχε λάμπες UVA (μέγιστης εκπομπής 350 nm).

2.2. Σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων του ρουθηνίου

2.2.1. Σύνθεση των υποκαταστατών και των συμπλόκων του τύπου Λ -, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Yn})](\text{PF}_6)_2$ ($\text{Yn} = \text{Y1}, \text{Y2}, \text{Y3}$)

2.2.1.1. Σύνθεση του 4,4'-δικαρβοξυ-2,2'-διπυριδίνη

3 g (16.28 mmol) 4,4'-διμεθυλο-2,2'-διπυριδίνη διαλύονται σε 37.5 mL πυκνό H_2SO_4 . Μετά από ανάδευση, το μίγμα τοποθετείται σε πάγο και προστίθεται σταδιακά 9.75 g CrO_3 (97.69 mmol) με ταυτόχρονη ανάδευση για 1 ώρα. Το πράσινο-μπλε μίγμα που σχηματίζεται θερμαίνεται στους 75 $^\circ\text{C}$ υπό ανάδευση με κάθετο ψυκτήρα (reflux) για 4 ώρες. Το μίγμα αυτό παραμένει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος κάτω υπό ανάδευση για περίπου 12 ώρες και στη συνέχεια τοποθετείται σε ένα μίγμα H_2O -πάγου. Το στερεό που σχηματίζεται παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση. Επαναδιαλύεται αυτό με H_2O και προστίθεται KOH μέχρι βασικού περιβάλλοντος. Το μίγμα διηθείται υπό κενό και στο υγρό διήθημα



προστίθεται HCl 0.1 M μέχρι καταβύθισης στερεού ιζήματος, το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση σε κενό, έκπλυση με νερό, μεθανόλη, διέθυλ-αιθέρα και ξηραίνεται σε κενό. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το C₁₂H₈N₂O₄: C: 59.05 %, H: 3.28 %, N: 11.44 % (θεωρητικά: C: 59.02 %, H: 3.30 %, N: 11.47 %).

2.2.1.2. Σύνθεση του η 4,4'-διμεθοξυκαρβόνυλο-2,2'-διπυριδίνη

Το 4,4'-δικαρβοξυ-2,2'-διπυριδίνη είναι αδιάλυτο στους περισσότερους διαλύτες και έτσι για να γίνει η επεξεργασία και ο χαρακτηρισμός του, απαιτείται η μετατροπή του σε διμειθυλεστέρα.

50 mg 4,4'-δικαρβοξυ-2,2'-διπυριδίνη (4,4'-(CO₂H)₂bpy) διαλύονται σε 30 mL MeOH και σε 0.01 ml πυκνό H₂SO₄ και θερμαίνεται με reflux με ταυτόχρονη ανάδευση για 48 ώρες. Ακολουθεί συμπύκνωση μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα, εκχύλιση με χλωροφόρμιο και έκπλυση με H₂O μέχρι το pH του διαλύματος να γίνει ουδέτερο. Μετά από εξάτμιση του χλωροφορμίου στον περιστροφικό εξατμιστήρα παράγεται ο επιθυμητός εστέρας τον οποίο ταυτοποιούμε με φασματοσκοπία IR και ¹H-NMR. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το C₁₄H₁₂N₂O₂: C: 61.72 %, H: 4.47 %, N: 10.25 % (θεωρητικά: C: 61.76 %, H: 4.44 %, N: 10.29 %).

2.2.1.3. Σύνθεση του 4,4'-(COLysCONH₂)₂-bpy (Y1)

Η σύνθεση του 4,4'-(COLysCONH₂)₂-bpy πραγματοποιήθηκε με την στρατηγική της πεπτιδικής σύνθεσης και η καθαρότητά του μετά το κόψιμο από την ρητίνη με TFA / H₂O ελέγχθηκε με φασματοσκοπία ¹H NMR [124].

A. Σύνθεση του Lys-ρητίνη

700 mg ρητίνης TentaGel S RAM (0.154 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) εκπλένονται 5-6 φορές με NMP για να φουσκώσει η ρητίνη. Προστίθεται 2-3 mL διάλυμα πιπεριδίνης 20 % σε NMP, για την απομάκρυνση της Fmoc-προστατευμένης ομάδας της ρητίνης και αφήνονται υπό ανάδευση για 20 λεπτά. Το διάλυμα πιπεριδίνης ανανεώνεται



για άλλες 2 φορές και αναδεύεται για ακόμη 40 λεπτά. Στην συνέχεια γίνονται εκπλύσεις με NMP αρκετές φορές για απομάκρυνση των παραπροϊόντων (8-10 φορές από 1-2 mL) και Test Kaiser για πιστοποίηση της ελεύθερης αμινομάδας (θετικό).

0.616 mmol Fmoc-Lys(Boc)-OH (288.5 mg), 0.616 mmol PyBOP (320 mg) διαλύονται σε 1.232 mmol DIPEA (200 μ L) και NMP (1 mL) και αφήνονται υπό αναδευση για 5 περίπου λεπτά. Στην συνέχεια προστίθενται στην ρητίνη και αφήνονται υπό ανάδευση για 2 ώρες. Έπειτα πραγματοποιούνται πλύσεις με NMP αρκετές φορές για απομάκρυνση των παραπροϊόντων (8-10 φορές από 1-2 mL) και γίνεται Test Kaiser για πιστοποίηση της σύζευξης (αρνητικό).

B. Σύζευξη με 4,4'-(CO₂H)-bpy

Στο σύστημα ρητίνης-λυσίνης προστίθενται 2-3 mL διάλυμα πιπεριδίνης 20 % σε NMP και αφού γίνουν 2-3 γρήγορες πλύσεις, αφήνονται με το διάλυμα πιπεριδίνης για 15 λεπτά με ανάδευση ανανεώνοντας κάθε 5-6 λεπτά το διάλυμα της. Στην συνέχεια εκπλένεται με διάλυμα NMP αρκετές φορές για απομάκρυνση των παραπροϊόντων (8-10 φορές από 1-2 mL) και ελέγχεται η ύπαρξη της ελεύθερης αμινομάδας με test Kaiser (θετικό).

0.616 mmol του υποκαταστάτη 4,4'-(CO₂H)bpy (150 mg) διαλύονται σε 2 mL NMP κάτω από ταυτόχρονη ανάδευση και θέρμανση. Στην συνέχεια προστίθενται 0.616 mmol PyBOP (320 mg) και 3.75 mmol DIPEA (600 μ L) και αφού αντιδράσουν για λίγα δευτερόλεπτα προστίθενται στην ρητίνη και αναδεύονται όλο το βράδυ. Έπειτα γίνονται πλύσεις με NMP αρκετές φορές για απομάκρυνση των παραπροϊόντων (8-10 φορές από 1-2 mL) και test Kaiser για πιστοποίηση της σύζευξης (αρνητικό). Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το C₂₄H₃₆N₈O₄: C: 58.67 %, H: 5.31 %, N: 23.83 % (θεωρητικά: C: 58.70 %, H: 5.28 %, N: 23.81 %).

2.2.1.4. Σύνθεση του 4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy (Y2)

A. Σύνθεση του His-ρητίνη

800 mg ρητίνης TentaGel S RAM (0.208 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) εκπλένονται 5-6 φορές με NMP για να φουσκώσει η ρητίνη. Προστίθεται διάλυμα



πιπεριδίνης 20 % σε NMP για την απομάκρυνση της Fmoc-προστατευμένης ομάδας και αφού γίνουν πάλι 2-3 γρήγορες πλύσεις, η ρητίνη αναδεύεται με πιπεριδίνη για 15-20 λεπτά ανανεώνοντας κάθε 5-6 λεπτά το διάλυμα. Ακολουθούν αρκετές πλύσεις με NMP και στην συνέχεια η πιστοποίηση της ελεύθερης αμινομάδας με test Kaiser. Οι κόκκοι της ρητίνης χρωματίζονται έντονα κόκκινοι γεγονός που υποδηλώνει την αποπροστασία της τελικής αμινομάδας της ρητίνης. Στην συνέχεια ζυγίζονται 0.832 mmol Fmoc-His(Trt)-OH (528 mg), 0.832 mmol PyBOP (433 mg) διαλύονται σε 1.6 mmol DIPEA (270 μ L) και NMP (2 mL) και αφού αφήσουμε το μίγμα να αντιδράσει για 2 λεπτά το προσθέτουμε στην ρητίνη. Ακολουθεί ανάδευση για 2 ώρες και μετά αρκετές πλύσεις με NMP και test Kaiser για την πιστοποίηση της σύζευξης. Οι κόκκοι της ρητίνης παραμένουν άχρωμοι γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει ελεύθερη αμινομάδα άρα η σύζευξη έχει επιτευχθεί.

B. Σύζευξη με 4,4'-(CO₂H)-bpy

Σε 800 mg (0.208 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) ρητίνης-His προστίθεται 2-3 mL διαλύματος πιπεριδίνης 20 % σε NMP για 45 λεπτά, ανανεώνοντας κάθε 5-6 λεπτά το διάλυμα της πιπεριδίνης. Έτσι, απομακρύνεται η προστατευτική αμινομάδα Fmoc και παραμένει ελεύθερη η τελική αμινομάδα του αμινοξέος για την σύζευξη με τον υποκαταστάτη 4,4'-(CO₂H)-bpy. Η σύζευξη αυτή γίνεται με 0.832 mmol του υποκαταστάτη 4,4'-(CO₂H)bpy (203 mg) χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια σύζευξης PyBOP (0.832 mmol, 433 mg) και DIPEA (5.06 mmol, 810 μ L), τα οποία διαλύονται σε 2 mL NMP. και αφού αντιδράσουν για 2 λεπτά προστίθενται στην ρητίνη και αναδεύονται όλο το βράδυ. Η σύζευξη διαπιστώνεται με test Kaiser όπου οι κόκκοι της ρητίνης παραμένουν άχρωμοι γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει ελεύθερη αμινομάδα. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το C₂₄H₂₄N₁₀O₄: C: 55.72 %, H: 4.47 %, N: 26.97 % (θεωρητικά: C: 55.81 %, H: 4.68 %, N: 27.12 %).

2.2.1.5. Σύνθεση του 4,4'-(CO₂TyrCONH₂)₂bpy (Y3)

A. Σύνθεση του Tyr-ρητίνη

800 mg ρητίνης Tentagel S RAM (0.208 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) εκπλένονται 5-6 φορές με NMP για να φουσκώσει η ρητίνη. Προστίθεται διάλυμα πιπεριδίνης 20 % σε NMP για την απομάκρυνση της Fmoc-προστατευμένης ομάδας και αφού γίνουν πάλι 2-3 γρήγορες πλύσεις, η ρητίνη αναδεύεται με πιπεριδίνη για 15-20 λεπτά ανανεώνοντας κάθε 5-6 λεπτά το διάλυμα. Ακολουθούν αρκετές πλύσεις με NMP και στην συνέχεια η ύπαρξη της ελεύθερης αμινομάδας με test Kaiser. Οι κόκκοι της ρητίνης χρωματίζονται έντονα κόκκινοι γεγονός που υποδηλώνει την αποπροστασία της τελικής αμινομάδας της ρητίνης. Στην συνέχεια ζυγίζονται 0.834 mmol Fmoc-His(Trt)-OH (383 mg), 0.834 mmol PyBOP (432.9 mg) διαλύονται σε 1.7 mmol DIPEA (270 μ L) και NMP (2 mL) και αφού αφήσουμε το μίγμα να αντιδράσει για 2 λεπτά το προσθέτουμε στην ρητίνη. Ακολουθεί ανάδευση για 2 ώρες και μετά αρκετές πλύσεις με NMP και test Kaiser για την διαπίστωση της σύζευξης. Οι κόκκοι της ρητίνης παραμένουν άχρωμοι γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει ελεύθερη αμινομάδα άρα η σύζευξη έχει επιτευχθεί.

B. Σύζευξη με 4,4'-(CO₂H)-bpy

Σε 800 mg (0.208 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) ρητίνης-His προστίθεται 2-3 mL διαλύματος πιπεριδίνης 20 % σε NMP για 45 λεπτά, ανανεώνοντας κάθε 5-6 λεπτά το διάλυμα της πιπεριδίνης. Έτσι, απομακρύνεται η προστατευτική αμινομάδα Fmoc και παραμένει ελεύθερη η τελική αμινομάδα του αμινοξέος για την σύζευξη με τον υποκαταστάτη 4,4'-(CO₂H)-bpy. Η σύζευξη αυτή γίνεται με 0.834 mmol του υποκαταστάτη 4,4'-(CO₂H)bpy (200 mg) χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια σύζευξης PyBOP (0.834 mmol, 434 mg) και DIPEA (4.3 mmol, 690 μ L), τα οποία διαλύονται σε 2 mL NMP. και αφού αντιδράσουν για 2 λεπτά προστίθενται στην ρητίνη και αναδεύονται όλο το βράδυ. Η σύζευξη διαπιστώνεται με test Kaiser όπου οι κόκκοι της ρητίνης παραμένουν άχρωμοι γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει ελεύθερη αμινομάδα. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το C₃₀H₂₈N₆O₆: C: 63.17 %, H: 4.48 %, N: 13.29 % (θεωρητικά: C: 63.37 %, H: 4.96 %, N: 14.78 %).



2.2.1.6. Σύνθεση του συμπλόκου *cis*-Ru(*bpy*)₂Cl₂

1.6 g RuCl₃.x3H₂O (6.11 mmol), 1.9 g *bpy* (12.2 mmol) και 1.7 g LiCl (4 mmol) διαλύονται σε 10 mL DMF και θερμαίνεται στους 140 °C υπό ανάδευση με κάθετο ψυκτήρα (reflux) για 8 h υπό ατμόσφαιρα N₂. Το διάλυμα ψύχεται και στη συνέχεια προστίθεται ακετόνη (50 mL) και αφήνετε στους -20 °C για όλη τη νύχτα. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό με ηθμό Gooch, έκπλυση με διαιθυλαιθέρα (3 x 10 mL) και ξήρανση υπό κενό για 1-2 ώρες στους 50 °C. Το *cis*-[Ru(*bpy*)₂Cl₂] παραλαμβάνεται ως μαύρο-καφέ στερεό. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το C₂₀H₁₆Cl₂N₄Ru: C: 49.53 %, H: 3.40 %, N: 11.51 % (θεωρητικά: C: 49.60 %, H: 3.33 %, N: 11.57 %). Απόδοση 85.0 %.

2.2.1.7. Σύνθεση του συμπλόκου *rac*-[Ru(*bpy*)₂(*py*)₂]Cl₂

1.6 g *cis*-Ru(*bpy*)₂Cl₂, 39 mL H₂O και 19.5 mL πυριδίνης θερμαίνεται υπό ανάδευση με κάθετο ψυκτήρα (reflux) για 4 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης το μίγμα αφήνετε να κρυώσει και συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Το υπόλειμμα διαλύεται σε μικρή ποσότητα MeOH (10 mL) και επανακαθαρίζει εκ νέου πορτοκαλί στερεό με προσθήκη διέθυλαιθέρα (200 mL). Το στερεό παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό με ηθμό Gooch και εκπλένεται με διέθυλαιθέρα. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το C₃₀H₂₆Cl₂N₆Ru: C: 56.00 %, H: 4.08 %, N: 13.01 % (θεωρητικά: C: 56.08 %, H: 4.08 %, N: 13.08 %). Απόδοση 55.0 %.

2.2.1.8. Διαχωρισμός των εναντιομερών Λ- και Δ-[Ru(*bpy*)₂(*py*)₂]Cl₂

Το χειρικό αντιδραστήριο Ο,Ο'-διβενζουλ (R,R) ή (S,S)-τρυγικό νάτριο (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 *rac*-[Ru(*bpy*)₂(*py*)₂]Cl₂ (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. Όταν χρησιμοποιείται το O,O'-διβενζούλ (R,R) -τρυγικό νάτριο σχηματίζεται το Δ- ισομερές και όταν χρησιμοποιείται το O,O'-διβενζούλ (S,S)-τρυγικό νάτριο σχηματίζεται το Λ- ισομερές. Οι κρύσταλλοι διηθούνται υπό κενό σε ηθμό Gooch και εκπλένονται ταχέως με παγωμένο νερό (3 x 10 mL) και διαιθυλαιθέρα (2 x 10 mL). Λαμβάνονται κρύσταλλοι κόκκινου χρώματος, οι οποίοι ξηραίνονται υπό κενό. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το C₄₈H₃₈N₆O₈Ru: C: 62.04 %, H: 4.20 %, N: 9.00 % (θεωρητικά: C: 62.13 %, H: 4.13 %, N: 9.06 %). Απόδοση 32.0 %.

2.2.1.9. Σύνθεση του συμπλόκου Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ (Δ1)

500 mg (0.075 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) του μίγματος 4,4'-(COLysCONH₂)₂-bpy συζευγμένου στη ρητίνη και περίσσεια συμπλόκου Δ-[Ru(bpy)₂(py)₂]₂A₂ (100 mg, 0.175 mmol) προστίθενται σε σφαιρική φιάλη σε διάλυμα DMF/αιθυλενογλυκόλη (1:1) και αφήνονται για 24 h σε reflux κάτω από αέριο N₂ με ταυτόχρονη ανάδευση. Αφού το μίγμα της αντίδρασης κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μεταφέρεται σε σύριγγα και ακολουθούν πλύσεις με DMF (5 x 5 min) για την απομάκρυνση παραπροϊόντων αλλά και της περίσσειας του συμπλόκου Δ-[Ru(bpy)₂(py)₂]₂Cl₂, που δεν αντέδρασε. Μετά από τις πλύσεις με DMF, συνεχίζονται οι πλύσεις με CH₂Cl₂ (5 x 5 min) για την απομάκρυνση του DMF και την ξήρανση του προϊόντος πριν το κόψιμο από την ρητίνη. Το κόψιμο του συμπλόκου από την ρητίνη πραγματοποιείται με τη χρήση διαλύματος TFA/H₂O (95/5 v/v), το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση για 2 h. Το διάλυμα του TFA/H₂O που περιέχει το προϊόν εκχύνεται σε διαιθυλαιθέρα και έτσι πραγματοποιείται η καταβύθιση του. Το σύμπλοκο συλλέγεται με διήθηση και αφού ξηραθεί, διαλύεται σε 1 mL ακετόνης και προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH₄PF₆ για την καταβύθιση του ως εξαφθοροφωσφορικό άλας. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το Δ-C₄₄H₅₂N₁₂O₄RuP₄F₂₄: C: 57.00 %, H: 5.63 %, N: 18.01 % (θεωρητικά: C: 57.82 %, H: 5.73 %, N: 18.39 %). Απόδοση 85.0 %.



2.2.1.10. Σύνθεση του συμπλόκου Λ -[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ (A1)

500 mg (0.075 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) του μίγματος 4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy συζευγμένου στη ρητίνη και περίσσεια συμπλόκου Λ -[Ru(bpy)₂(py)₂]A₂ (100 mg, 0.175 mmol) προστίθενται σε σφαιρική φιάλη σε διάλυμα DMF/αιθυλενογλυκόλη (1:1) και αφήνονται για 24 h σε reflux κάτω από αέριο N₂ με ταυτόχρονη ανάδευση. Αφού το μίγμα της αντίδρασης κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μεταφέρεται σε σύριγγα και ακολουθούν πλύσεις με DMF (5 x 5 min) για την απομάκρυνση παραπροϊόντων αλλά και της περίσσειας του συμπλόκου Λ -[Ru(bpy)₂(py)₂]A₂, που δεν αντέδρασε. Μετά από τις πλύσεις με DMF, συνεχίζονται οι πλύσεις με CH₂Cl₂ (5 x 5 min) για την απομάκρυνση του DMF και την ξήρανση του προϊόντος πριν το κόψιμο από την ρητίνη. Το κόψιμο του συμπλόκου από την ρητίνη πραγματοποιείται με τη χρήση διαλύματος TFA/H₂O (95/5 v/v), το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση για 2 h. Το διάλυμα του TFA/H₂O που περιέχει το προϊόν εκχύνεται σε διαιθυλαιθέρα και έτσι πραγματοποιείται η καταβύθιση του. Το σύμπλοκο συλλέγεται με διήθηση και αφού ξειραθεί, διαλύεται σε 1 mL ακετόνης και προστίθεται κορεσμένο διάλυμα NH₄PF₆ για την καταβύθιση του ως εξαφθοροφωσφορικό άλας. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το Λ -C₄₄H₅₂N₁₂O₄RuP₄F₂₄: C: 57.87 %, H: 5.69 %, N: 18.78 % (θεωρητικά: C: 57.82 %, H: 5.73 %, N: 18.39 %). Απόδοση 65.0 %.

2.2.1.11. Σύνθεση του συμπλόκου Δ -[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂ (A2)

500 mg (0.075 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) του μίγματος 4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy συζευγμένου στη ρητίνη και περίσσεια συμπλόκου Δ -[Ru(bpy)₂(py)₂]A₂ (100 mg, 0.175 mmol) προστίθενται σε σφαιρική φιάλη σε διάλυμα DMF/αιθυλενογλυκόλη (1:1) και αφήνονται για 24 h σε reflux κάτω από αέριο N₂ με ταυτόχρονη ανάδευση. Αφού το μίγμα της αντίδρασης κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μεταφέρεται σε σύριγγα και ακολουθούν πλύσεις με DMF (5 x 5 min) για την απομάκρυνση παραπροϊόντων αλλά και της περίσσειας του συμπλόκου Δ -[Ru(bpy)₂(py)₂]A₂, που δεν αντέδρασε. Μετά από τις πλύσεις με DMF, συνεχίζονται οι πλύσεις με CH₂Cl₂ (5 x 5 min) για την απομάκρυνση του DMF και

την ξήρανση του προϊόντος πριν το κόψιμο από την ρητίνη. Το κόψιμο του συμπλόκου από την ρητίνη πραγματοποιείται με τη χρήση διαλύματος TFA/H₂O (95/5 v/v), το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση για 2 h. Το διάλυμα του TFA/H₂O που περιέχει το προϊόν εκχύνεται σε διαιθυλαιθέρα και έτσι πραγματοποιείται η καταβύθιση του. Το σύμπλοκο συλλέγεται με διήθηση και αφού ξειραθεί, διαλύεται σε 1 mL ακετόνης και προστίθεται κορεσμένο διάλυμα LiCl για την καταβύθιση του ως χλωριούχο άλας. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το Δ-C₄₄H₄₀N₁₄O₄RuCl₂: C: 52.36 %, H: 4.23 %, N: 18.84 %. (θεωρητικά: C: 52.80 %, H: 4.03 %, N: 19.59 %). Απόδοση 56.0 %

2.2.1.12. Σύνθεση του συμπλόκου Λ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂ (A2)

500 mg (0.075 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) του μίγματος 4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy συζευγμένου στη ρητίνη και περίσσεια συμπλόκου Λ-[Ru(bpy)₂(py)₂]A₂ (100 mg, 0.175 mmol) προστίθενται σε σφαιρική φιάλη σε διάλυμα DMF/αιθυλενογλυκόλη (1:1) και αφήνονται για 24h σε reflux κάτω από αέριο N₂ με ταυτόχρονη ανάδευση. Αφού το μίγμα της αντίδρασης κρυσταλλώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μεταφέρεται σε σύριγγα και ακολουθούν πλύσεις με DMF (5 x 5 min) για την απομάκρυνση παραπροϊόντων αλλά και της περίσσειας του συμπλόκου Λ-[Ru(bpy)₂(py)₂]A₂, που δεν αντέδρασε. Μετά από τις πλύσεις με DMF, συνεχίζονται οι πλύσεις με CH₂Cl₂ (5 x 5 min) για την απομάκρυνση του DMF και την ξήρανση του προϊόντος πριν το κόψιμο από την ρητίνη. Το κόψιμο του συμπλόκου από την ρητίνη πραγματοποιείται με τη χρήση διαλύματος TFA/H₂O (95/5 v/v), το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση για 2 h. Το διάλυμα του TFA/H₂O που περιέχει το προϊόν εκχύνεται σε διαιθυλαιθέρα και έτσι πραγματοποιείται η καταβύθιση του. Το σύμπλοκο συλλέγεται με διήθηση και αφού ξειραθεί, διαλύεται σε 1 mL ακετόνης και προστίθεται κορεσμένο διάλυμα LiCl για την καταβύθιση του ως χλωριούχο άλας. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το Λ-C₄₄H₄₀N₁₄O₄RuCl₂: C: 52.87 %, H: 4.11 %, N: 18.98 % (θεωρητικά: C: 52.80 %, H: 4.03 %, N: 19.59 %). Απόδοση 48.0 %



2.2.1.13. Σύνθεση του συμπλόκου Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy)]Cl₂ (Δ3)

500 mg (0.075 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) του μίγματος 4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy συζευγμένου με την ρητίνη και 100 mg (0.175 mmol) Δ-[Ru(bpy)₂(py)₂]A₂ διαλύονται σε διάλυμα DMF/Αιθυλενογλυκόλη (1:1) και αφήνονται για 24h σε reflux κάτω από αέριο N₂ με ταυτόχρονη ανάδευση. Μετά το πέρας της αντίδρασης η ρητίνη με το ακινητοποιημένο σύμπλοκο εκπλένεται με DMF αρκετές φορές για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων και έπειτα με διχλωρομεθάνιο για ξήρανση. Το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει το κόψιμο του συμπλόκου από την ρητίνη χρησιμοποιώντας διάλυμα TFA / H₂O (95/5 v/v), το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση για 2 h. Το σύμπλοκο λαμβάνεται με καταβύθιση σε διαιθυλαιθέρα και παραμονή του σε 0 °C για 24 h. Στην συνέχεια γίνεται διήθηση, επαναδιάλυση σε 1 mL ακετόνης και προσθήκη κορεσμένου διαλύματος LiCl οπότε καταβυθίζεται το κόκκινο ίζημα. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το Δ-C₆₈H₅₈N₁₀O₁₄RuCl₂: C: 60.16 %, H: 4.23 %, N: 10.04 %. (θεωρητικά: C: 60.94 %, H: 4.36 %, N: 10.45 %). Απόδοση 47.0 %.

2.2.1.13. Σύνθεση του συμπλόκου Λ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy)]Cl₂ (Λ3)

500 mg (0.075 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) του μίγματος 4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy συζευγμένου με την ρητίνη και 100 mg (0.175 mmol) Λ-[Ru(bpy)₂(py)₂]A₂ διαλύονται σε διάλυμα DMF/Αιθυλενογλυκόλη (1:1) και αφήνονται για 24 h σε reflux κάτω από αέριο N₂ με ταυτόχρονη ανάδευση. Μετά το πέρας της αντίδρασης η ρητίνη με το ακινητοποιημένο σύμπλοκο εκπλένεται με DMF αρκετές φορές για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων και έπειτα με διχλωρομεθάνιο για ξήρανση. Το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει το κόψιμο του συμπλόκου από την ρητίνη χρησιμοποιώντας διάλυμα TFA / H₂O (95/5 v/v), το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση για 2 h. Το σύμπλοκο λαμβάνεται με καταβύθιση σε διαιθυλαιθέρα και παραμονή του σε 0 °C για 24 h. Στην συνέχεια γίνεται διήθηση, επαναδιάλυση σε 1 mL ακετόνης και προσθήκη κορεσμένου διαλύματος LiCl οπότε καταβυθίζεται το κόκκινο ίζημα. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το Λ-

$C_{68}H_{58}N_{10}O_{14}RuCl_2$: C: 60.81 %, H: 4.11 %, N: 10.09 % (θεωρητικά: C: 60.94 %, H: 4.36 %, N: 10.45 %). Απόδοση 43.0 %.

2.2.2 Σύνθεση του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$

2.2.2.1 Σύνθεση του συμπλόκου $Ru(terpy)Cl_3$

200 mg $RuCl_3 \cdot 3H_2O$ (0.76 mmol) και 200 mg 2, 2', 6, 2''-τερπυριδίνη (terpy) διαλύονται σε 150 mL αιθανόλης θερμαίνονται στους 80 °C υπό ανάδευση με κάθετο ψυκτήρα (reflux) για 3 ώρες. Το διάλυμα ψύχεται και στη συνέχεια διηθείται υπό κενό με ηθμό Gooch και εκπλένεται με διάλυμα αιθανόλης (3 x 30 mL), διαιθυλαιθέρα (3 x 10 mL) και ξηραίνεται υπό κενό. Το $Ru(terpy)Cl_3$ παραλαμβάνεται ως καφέ – κόκκινο στερεό. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης για το $C_{15}H_{11}Cl_3N_3Ru$: C: 40.76 %, H: 2.40 %, N: 9.41 % (θεωρητικά: C: 40.88 %, H: 2.52 %, N: 9.53 %). Απόδοση 88.0 %.

2.2.2.3 Σύνθεση του συμπλοκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$

300 mg (0.045 mmol, υποκατάσταση ρητίνης 0.26 mmol/gr) του μίγματος 4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy συζευγμένου με την ρητίνη (παράγραφος 2.2.1.3) και 176 mg (0.04 mmol) $Ru(terpy)Cl_3$ διαλύονται σε διάλυμα DMF/EtOH (3:1) και παραμένουν για 7 h σε reflux κάτω από αέριο N₂ με ταυτόχρονη ανάδευση. Μετά το πέρας της αντίδρασης η ρητίνη με το ακινητοποιημένο σύμπλοκο εκπλένεται με DMF αρκετές φορές για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων και της περίσσειας των αντιδραστηρίων, όπως του $Ru(terpy)Cl_3$ που δεν αντέδρασε, και έπειτα με διχλωρομεθάνιο για ξήρανση (5 x 5 φορές). Το τελευταίο βήμα περιλαμβάνει το κόψιμο του συμπλόκου από την ρητίνη χρησιμοποιώντας διάλυμα TFA / H₂O (95/5 v/v), το οποίο παραμένει υπό ανάδευση για 2 h. Το σύμπλοκο λαμβάνεται με καταβύθιση σε διαιθυλαιθέρα και παραμονή του σε 0 °C για 24 h. Στην συνέχεια γίνεται διήθηση, επαναδιάλυση σε 1 mL ακετόνης και προσθήκη κορεσμένου διαλύματος LiCl, οπότε καταβυθίζεται το κόκκινο ίζημα. Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης



$C_{38}H_{47}Cl_4N_{11}O_4Ru$: C: 51.26 %, H: 5.13 %, N: 17.24 % (θεωρητικά: C: 51.71 %, H: 5.23 %, N: 17.01 %). Απόδοση 47.0 %.

2.3. Προετοιμασία των διαλυμάτων για τις αλληλεπιδράσεις με DNA

2.3.1. Προετοιμασία των διαλυμάτων του ολιγονουκλεοτιδίου $d(CGCGCG)_2$ και $d(GTCGAC)_2$ για την φασματοσκοπία NMR

Η ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου εκτιμάται αρχικά με τη ζύγιση και στη συνέχεια η συγκέντρωση του δείγματος προσδιορίζεται βάσει της απορρόφησης στα 260 nm [125] σύμφωνα με τη σχέση $C_{oligo} = A_{260} / E_{oligo} \times I$, όπου C_{oligo} είναι η συγκέντρωση του ολιγονουκλεοτιδίου σε $\mu\text{g}/\text{mL}$, A_{260} είναι η απορρόφηση στα 260 nm, E_{oligo} είναι ο ειδικός συντελεστής μοριακής απορρόφησης σε $(\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$ (για διπλής έλικας DNA, 1 OD_{260} αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) και I είναι το μήκος της διαδρομής της κυψελίδας σε cm. Σε όλα τα πειράματα NMR χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH = 7.0).

Τα δείγματα του ολιγονουκλεοτιδίου για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων παρασκευάστηκαν ως εξής: Σε 400 μL ρυθμιστικό διάλυμα συγκεντρώσεως 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH = 7.0) διαλύεται μια ζυγισμένη ποσότητα ολιγονουκλεοτιδίου και στο διάλυμα προστίθενται 20 μL D_2O ώστε να επιτευχθεί η αναλογία 95/5. Η ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου ποικίλει ανάλογα με το πείραμα NMR. Στα 1D πειράματα χρησιμοποιούνται περίπου 50 OD_{260} , ενώ στα 2D 300 περίπου OD_{260} .

2.3.2. Προετοιμασία των διαλυμάτων των συμπλόκων του τύπου A - ή Δ - $[Ru(bpy)_2(Yn)]^{2+}$ ($Yn = Y1, Y2, Y3$) με το DNA για την λήψη καμπύλων τήξης

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων του ρουθηνίου με το DNA χρησιμοποιώντας την καμπύλη τήξης του DNA, χρησιμοποιήθηκε κομμάτι γραμμικού DNA θυμοειδή αδένου (CT-DNA) που προήλθε μετά από κατάλληλη επεξεργασία DNA του εμπορίου. Οι αντιδράσεις μεταξύ των συμπλόκων και του CT-DNA πραγματοποιήθηκαν με



την προσθήκη διαλυμάτων συμπλόκου σε αναλογία CT-DNA/[Ru] 1:10 και 1:5, διαλύματος 5 mM tris HCl (τρις-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο, pH = 7.4) σε ένα διάλυμα CT-DNA $8 \cdot 10^{-5}$. Η καταγραφή της απορρόφησης γίνεται στα 260 nm και το εύρος της θερμοκρασίας από 25 °C έως 98 °C, ενώ τα δείγματα θερμαίνονται με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 0.5 °C ανά λεπτό.

2.3.3. Προετοιμασία των διαλυμάτων των συμπλόκων του τύπου Λ - ή Δ -[Ru(bpy)₂(Yn)]²⁺ με το DNA για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης

Στα πειράματα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA (pUC19 MB = 653.8 mg/mmol, C = $2.05 \cdot 10^{-3}$ M) συγκέντρωσης $2 \cdot 10^{-4}$ M, διάλυμα 10 mM tris-HCl (τρις-υδροξυμεθυλο-αμινομεθάνιο, pH = 7.4) και διάλυμα συμπλόκου $2 \cdot 10^{-5}$ M (αναλογία DNA/[Ru] = 10/1) μέχρι τελικό όγκο 10 mL. Τα σύμπλοκα ακτινοβολούνται με UVA (μέγιστη εκπομπή 350 nm) για 10, 20, 40 min και στο σκοτάδι (*) και στην συνέχεια προστίθεται χρωστική BBG διαλύματος γλυκερόλης και διαλύματος μπλε της βρωμοφαινόλης και παραμένουν σε πηκτή αγαρόζης 1 % για 3 ώρες.

Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάστηκε διαλύοντας 1.4 g αγαρόζης σε 2.8 mL διαλύματος 50 x TAE (0.04 M tris-acetate, 1 mM EDTA, pH = 7.0) και 150 mL ζεστό H₂O. Αφότου πήξει η αγαρόζη τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, προστίθεται διάλυμα 1 x TAE και στη συνέχεια προστίθενται τα διαλύματα και αφήνεται να τρέξει η ηλεκτροφόρηση για 3 ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, περιχύνεται η πηκτή με διάλυμα EtBr ούτως ώστε να μπορέσουν οι ταινίες να γίνουν ορατές.

Ο έλεγχος της εκλεκτικότητας της δέσμευσης των συμπλόκων πραγματοποιείται με τμήμα γραμμικού DNA θυμοειδή αδένος 158-βάσεων, το οποίο περιέχει ιχνηθετιμένα περιοριστικά κομμάτια βάσεων τα οποία αναγνωρίζουν διαφορετικές αλληλουχίες στο DNA και προκαλούν κόψιμο στο σημείο αυτό. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε τμήμα DNA θυμοειδή αδένος 158 - βάσεων συγκέντρωσης 150 μM, διάλυμα 10 mM tris-HCl και διάλυμα συμπλόκου 15 μM.



Η εύρεση του μηχανισμού διάσπασης του DNA από τα σύμπλοκα αυτά πραγματοποιείται σε τμήμα πλασμιδιακού DNA (pSP73KB 1130 mg/mmol) με την χρήση διάφορων παγιδευτών. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παγιδευτές:

DMSO/mannitol: παγιδευτής OH[·]

SOD: παγιδευτής O₂^{·-}

NaN₃: παγιδευτής ¹O₂

D₂O- μεγαλύτερη διάρκεια ζωής ¹O₂

Παρασκευάστηκαν διαλύματα με τμήμα πλασμιδιακού DNA pSP73KB συγκέντρωσης 2.10⁻⁴ M, σε διάλυμα 10 mM tris-HCl, διάλυμα συμπλόκου 2.10⁻⁵ M και διάλυμα από διαφορετικό παγιδευτή κάθε φορά. Τα δείγματα στη συνέχεια ακτινοβολήθηκαν με λάμπες UVA για 100 λεπτά και αφέθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1 % για 3 ώρες.

2.3.4. Προετοιμασία των διαλυμάτων των συμπλόκων Λ- ή Δ-[Ru(bpy)₂(Yn)]²⁺ για λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού του DNA

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων του ρουθηνίου με το DNA χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού χρησιμοποιήθηκε κομμάτι γραμμικού DNA θυμοειδή αδένα (CT-DNA) που προήλθε μετά από κατάλληλη επεξεργασία DNA του εμπορίου. Οι αντιδράσεις μεταξύ των συμπλόκων και του CT-DNA πραγματοποιήθηκαν σε διαλύματα συμπλόκου συγκέντρωσης 2.10⁻⁵ M και η προσθήκη του CT-DNA (C = 3.1 10⁻³ M) έγινε με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε η τελική αναλογία συμπλόκου-DNA κάθε φορά να είναι 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 και 12:1.

2.3.5. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺ με το DNA για την λήψη καμπύλων τήξης

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺ με το DNA χρησιμοποιώντας την καμπύλη τήξης του DNA, χρησιμοποιήθηκε κομμάτι γραμμικού DNA θυμοειδή αδένα (CT-DNA) που προήλθε μετά από κατάλληλη επεξεργασία DNA του εμπορίου. Παρασκευάστηκαν διαλύματα με CT-DNA



συγκέντρωσης 1.610^{-4} M, διάλυμα 5 mM tris HCl (τρεις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο, pH = 7.4) και διαλύματα συμπλόκου σε αναλογίες $r_b = 0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125$ μέχρι τελικού όγκου 1700 mL. Τα διαλύματα παραμένουν στο σκοτάδι για 24 h στους 37 °C. Στη συνέχεια, σε 400 mL από το κάθε δείγμα προστίθεται διάλυμα NaClO_4 διαφορετικής συγκέντρωσης κάθε φορά 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M και 0.2 M σε τελικό όγκο 800 mL. Η καταγραφή της απορρόφησης πραγματοποιείται στα 260 nm και το εύρος της θερμοκρασίας είναι από 25 °C έως 98 °C, ενώ τα δείγματα θερμαίνονται με ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας 0.5 °C ανά λεπτό.

2.3.6. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ με το DNA για την μελέτη της κινητικής

(Α) Διάλυμα CT-DNA συγκέντρωσης $3.1 \cdot 10^{-4}$ M, διάλυμα 5 mM tris HCl (τρεις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο, pH = 7.4) και διάλυμα συμπλόκου συγκέντρωσης $3.1 \cdot 10^{-5}$ M σε τελικό όγκο 500 mL παραμένει στο σκοτάδι στους 37 °C. Σε χρόνους 0 min, 20 min, 40 min, 80 min, 160 min, 480 min και 24 h, δείγμα 45 μL του πιο πάνω διαλύματος με 5 μL NaCl 1.5 M και 100 μL 100 % αιθανόλη παραμένει στην κατάψυξη για την περαιτέρω επεξεργασία.

(Β) Διάλυμα CT-DNA συγκέντρωσης $3.1 \cdot 10^{-4}$ M, διάλυμα 5 mM tris HCl (τρεις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο, pH=7.4) και διάλυμα συμπλόκου συγκέντρωσης $3.1 \cdot 10^{-5}$ M σε τελικό όγκο 500 mL ακτινοβολείται με UVA (μέγιστη εκπομπή 350 nm). Σε χρόνους 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min και 240 min, δείγμα 45 μL του πιο πάνω διαλύματος με 5 μL NaCl 1.5 M και 100 μL 100 % αιθανόλη παραμένει στην κατάψυξη για την περαιτέρω επεξεργασία.

(Γ) Διάλυμα CT-DNA συγκέντρωσης $3.1 \cdot 10^{-4}$ M, διάλυμα 5 mM tris HCl (τρεις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο, pH = 7.4), διάλυμα NaCl 0.15 M και διάλυμα συμπλόκου συγκέντρωσης $3.1 \cdot 10^{-5}$ M σε τελικό όγκο 500 mL ακτινοβολείται με UVA (μέγιστη εκπομπή 350 nm). Σε χρόνους 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min και 240 min, δείγμα 45 μL του πιο πάνω διαλύματος με 5 μL NaCl 1.5 M και 100 μL 100 % αιθανόλη παραμένει στην κατάψυξη για την περαιτέρω επεξεργασία.



Όλα τα δείγματα τοποθετούνται σε περιστροφικό αναδευτήρα και φυγοκεντρώνονται, θερμοκρασίας 0°C και ταχύτητας 183000 στροφών για 30 min. Με αυτό τον τρόπο διαχωρίζεται το σύμπλοκο που έχει δεσμευτεί με το DNA, αφού το δεσμευμένο σύμπλοκο καθιζάνει στον πυθμένα του σωλήνα ως μαύρο ίζημα και το υπόλοιπο παραμένει στο διάλυμα.

Στη συνέχεια μετρείται η συγκέντρωση του συμπλόκου από το υπερκείμενο σε κάθε δείγμα με φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (FAAS). Από την απορρόφηση του κάθε δείγματος υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις του μη δεσμευμένου συμπλόκου που βρισκόταν στο διάλυμα και έτσι προσδιορίστηκαν στη συνέχεια οι συγκεντρώσεις του δεσμευμένου συμπλόκου σε κάθε περίπτωση ξεχωριστά και κατασκευάστηκε η καμπύλη κινητικής της δέσμευσης του συμπλόκου σε CT-DNA.

2.3.7. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ για λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωϊσμού του DNA

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου του ρουθηνίου με το DNA χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού χρησιμοποιήθηκε κομμάτι γραμμικού DNA θυμοειδή αδένου (CT-DNA) που προήλθε μετά από κατάλληλη επεξεργασία DNA του εμπορίου. Σε διάλυμα CT-DNA ($C = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) προστίθεται διάλυμα συμπλόκου σε αναλογίες $r_b = 0.025, 0.05, 0.075, 0.10$ και 0.125 και διάλυμα 5 mM tris HCl (τρεις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο, $\text{pH} = 7.4$) μέχρι τελικού όγκου $600 \mu\text{L}$ και παραμένουν στο σκοτάδι στους 37°C για 24 h .

2.3.8. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ για λήψη φασμάτων γραμμικού διχρωϊσμού του DNA

Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου του ρουθηνίου με το DNA χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία γραμμικού διχρωϊσμού χρησιμοποιήθηκε κομμάτι γραμμικού DNA θυμοειδή αδένου (CT-DNA) που προήλθε μετά από κατάλληλη επεξεργασία DNA του εμπορίου. Σε διάλυμα CT-DNA ($C = 3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) προστίθεται διάλυμα συμπλόκου σε



αναλογίες $r_b = 0.025, 0.05, 0.075, 0.10$ και 0.125 , διάλυμα 5 mM tris HCl (τρις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο, $\text{pH} = 7.4$) και διάλυμα NaClO_4 20 mM μέχρι τελικού όγκου $600 \mu\text{L}$ και παραμένουν στο σκοτάδι στους 37°C για 24 h .

2.3.9. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ με το DNA για τα πειράματα ηλεκτροφόρησης

Στα πειράματα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA ($\text{pUC19 MB} = 653.8 \text{ mg/mL}$, $C = 2.05 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) συγκέντρωσης $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, διάλυμα 10 mM tris-HCl (τρις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο, $\text{pH} = 7.4$) και διάλυμα συμπλόκου σε αναλογίες $r_b = 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.15$ μέχρι τελικού όγκου 10 mL . Τα σύμπλοκα παρέμειναν στο σκοτάδι στους 37°C και στην συνέχεια προστέθηκε χρωστική BGG διαλύματος γλυκερόλης και διαλύματος μπλε της βρωμοφαινόλης και παρέμειναν σε πηκτή αγαρόζης 1% για 3 ώρες.

Η πηκτή αγαρόζης παρασκευάστηκε διαλύοντας 1.4 g αγαρόζης σε 2.8 mL διαλύματος $50 \times \text{TAE}$ (0.04 M tris-acetate, 1 mM EDTA, $\text{pH} = 7.0$) και 150 mL ζεστό H_2O . Αφότου πήξει η αγαρόζη τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, προστίθεται διάλυμα $1 \times \text{TAE}$ και στη συνέχεια προστίθενται τα διαλύματα και αφήνεται να τρέξει η ηλεκτροφόρηση για 3 ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, περιχύνεται η πηκτή σε διάλυμα EtBr ούτως ώστε να μπορέσουν οι ταινίες να γίνουν ορατές.

2.3.10. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ σε αναλογία $r_b = 0.04$ με το DNA για το πείραμα ηλεκτροφόρησης

Στα πειράματα ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA ($\text{pUC19 MB} = 653.8 \text{ mg/mL}$, $C = 2.05 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) συγκέντρωσης $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, διάλυμα 10 mM tris-HCl (τρις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο, $\text{pH} = 7.4$) και διάλυμα συμπλόκου σε αναλογία $r_b = 0.04$ μέχρι τελικού όγκου 50 mL . Το σύμπλοκο παρέμεινε στο σκοτάδι στους 37°C και στην συνέχεια χωρίζεται σε 5 σωληνάκια των 10 mL και ακτινοβολήθηκε για $0 \text{ min}, 15 \text{ min}, 30 \text{ min}, 60$



min, 90 min αντίστοιχα. Τέλος προστίθεται χρωστική BBG διαλύματος γλυκερόλης και διαλύματος μπλε της βρωμοφαινόλης και τοποθετούνται σε πηκτή αγαρόζης 1 % για 3 ώρες.

2.3.11. Προετοιμασία των διαλυμάτων του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ για τα πειράματα αναστολής της σύνθεσης του RNA

Από το πλασμίδιο pSP73KB στο οποίο επιδρούν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI/HpaI* απομονώθηκε ένα δίκλωνο ολιγονουκλεοτιδικό τμήμα μήκους 221-bp που περιέχει τον εκκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Το τμήμα αυτό λειτουργεί ως εκμαγείο της μεταγραφής. Έτσι στο τμήμα αυτό του πλασμιδίου προστίθεται διάλυμα συμπλόκου αναλογίας $r_b = 0.01$ καθώς και *cisplatin*, *transplatin* και *dienPt* για λόγους σύγκρισης. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν με σκοπό την απομάκρυνση της ποσότητας του συμπλόκου που δεν έχει αλληλεπιδράσει με το DNA και στην συνέχεια ακολουθεί η *in vitro* μεταγραφή με την T7 RNA πολυμεράση. Η παρεμπόδιση της σύνθεσης του RNA οδηγεί στο σχηματισμό ταινιών που δείχνουν ότι η σύνθεση εμποδίστηκε και τερματίστηκε στις ενταγμένες βάσεις όπως δείχνει το αυτοραδιογράφημα που προκύπτει κατά την ηλεκτροφόρηση τους σε αλκαλική πηκτή ουρίας 8 M / 6 % πολυακρυλαμιδίου στα 300V για περίπου 3 ώρες.

2.4. Βασικές αρχές των μεθόδων

2.4.1. Ηλεκτροφόρηση DNA – Αποελίκωση

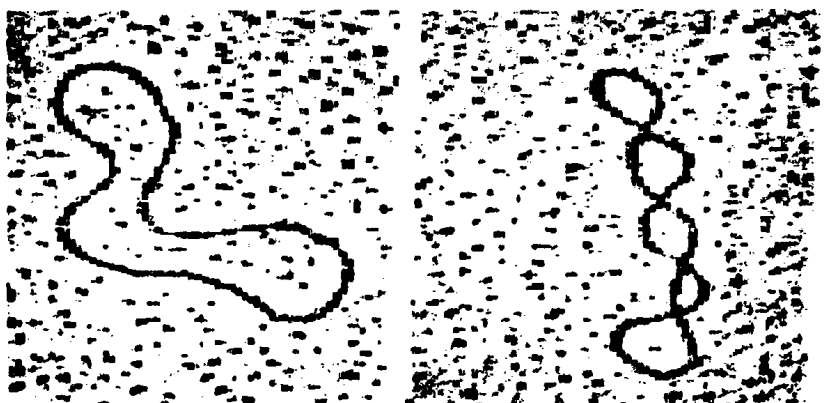
Η ηλεκτροφόρηση του DNA αποτελεί μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται στη βιοχημεία και τη μοριακή βιολογία για το διαχωρισμό του DNA ή του RNA, με βάση το μέγεθος ή τη μορφή τους. Στην ηλεκτροφόρηση ένα ηλεκτρικό πεδίο αναγκάζει το μόριο να κινηθεί δια μέσου της πηκτής [126]. Τα μόρια του DNA κινούνται από την κάθοδο στην άνοδο, λόγω του αρνητικού φορτίου που έχει το μόριο εξαιτίας του φωσφορικού σκελετού του. Τα μεγαλύτερα μόρια κινούνται πιο αργά, επειδή «παγιδεύονται» πιο εύκολα μέσα στην πηκτή [127]. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, ο διαχωρισμός των θραυσμάτων του



DNA του διαφορετικού μεγέθους ή της διαφορετικής μορφής γίνεται ορατός χρησιμοποιώντας κάποια χρωστική ουσία, όπως είναι το βρωμιούχο αιθίδιο, το οποίο φθορίζει κάτω από λάμπες UV, όταν παρεμβάλλεται στο DNA (ή το RNA). Το μέγεθος της θραύσης αναφέρεται συνήθως ανά «νουκλεοτίδιο», «ζεύγος βάσης» ή σε «kb» (για 1000' ζεύγη βάσεων) ανάλογα με το εάν η διπλή έλικα του DNA έχει διαχωριστεί.

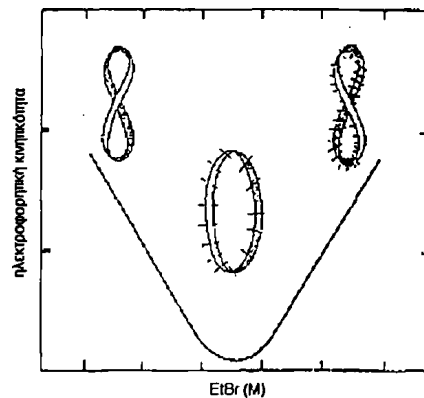
Οι τύποι πηκτής που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα για την ηλεκτροφόρηση του DNA είναι η αгарόζη (για μεγάλα μόρια DNA) και το πολυακριλαμίδιο (για υψηλή διαχωριστική ικανότητα μικρών μορίων DNA), ενώ η μέτρηση και η ανάλυση των ταινιών που προκύπτουν πραγματοποιούνται συνήθως με ένα εξειδικευμένο λογισμικό υψηλής ανάλυσης.

Τα μόρια του DNA ορισμένων βακτηρίων και ιών είναι κυκλικά. Σε ένα κλειστό κυκλικό μόριο όταν ο άξονας της διπλής έλικας υποστεί στροφές (είτε δεξιόστροφα είτε αριστερόστροφα) σχηματίζεται μια υπερέλικα δίνοντας την κλειστή υπερελικωμένη μορφή του μορίου (supercoiled). Ένα κλειστό κυκλικό μόριο DNA χωρίς να βρίσκεται στην υπερελικωμένη μορφή του, ονομάζεται χαλαρό μόριο, το οποίο δεν έχει τόσο συμπαγές σχήμα όσο το αντίστοιχο υπερελικωμένο (σχήμα 2.1). Η υπερελίκωση του μορίου είναι σημαντική για το «πακετάρισμα» του DNA στο κύτταρο και επίσης επηρεάζει την ικανότητα της διπλής έλικας να ξεδιπλώνεται και επομένως επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων.



Σχήμα 2.1. Χαλαρή και υπερελικωμένη μορφή του DNA.

Αποελίκωση ονομάζεται η μετατροπή της κλειστής υπερελικωμένης μορφής του (supercoiled) μορίου σε ανοιχτού κύκλου χαλαρή (open circle) κατά την οποία τα νουκλεοτίδια της διπλής έλικας γίνονται πιο προσιτά στα εισερχόμενα μόρια. Ο διαχωρισμός των δύο αυτών μορφών μπορεί να πραγματοποιηθεί με πειράματα ηλεκτροφόρησης στα οποία το υπερελικωμένο DNA κινείται ταχύτερα μέσα στην πηκτή όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.2.



Σχήμα 2.2. Διάγραμμα στο οποίο παρουσιάζεται η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της υπερελικωμένης και της χαλαρής μορφής του DNA.

Μόρια τα οποία αλληλεπιδρούν με το DNA έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν την κλειστή υπερελικωμένη μορφή του σε ανοιχτού κύκλου χαλαρή [128, 129]. Καθώς το ξετύλιγμα του υπερελικωμένου DNA προσδιορίζεται από συνεχείς περιστροφές, το μέγεθος που καθορίζει το βαθμό αποελίκωσής του ορίζεται σαν γωνία Φ . Η γωνία αποελίκωσης Φ ανά μόριο ένταξης στο DNA καθορίζεται από την αναλογία $r_{b(c)}$, στην οποία παρατηρείται πλήρης μετατροπή της υπερελικωμένης μορφής (sc) σε ανοιχτού κύκλου χαλαρή (oc) και υπολογίζεται από τη σχέση $\Phi = 18 \cdot \sigma / r_{b(c)}$, όπου σ είναι η υπερελικοειδής πυκνότητα για τις συνθήκες της ιοντικής ισχύος και της θερμοκρασίας του πειράματος και $r_{b(c)}$ η πραγματική τιμή r_b της μετατροπής της υπερελικωμένης μορφής (sc) σε ανοιχτού κύκλου χαλαρή (oc) [130].

2.4.2. Θερμοκρασία τήξης του DNA (T_m)

Η μετουσίωση του DNA είναι η διαδικασία, κατά την οποία η διπλή έλικα του DNA ξετυλίγεται και σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των βάσεων. Όταν όλοι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο κλώνων σπάσουν, η διπλή έλικα αποσταθεροποιείται και οι κλώνοι αλλάζουν δομή στο χώρο, αποκτώντας τυχαία διάταξη. Το φαινόμενο της μετουσίωσης του DNA προσομοιάζει με την διαδικασία της τήξης, γι' αυτό χρησιμοποιείται ο όρος «σημείο τήξης» (T_m) του DNA. Η θερμοκρασία τήξης (T_m) ορίζεται ως η θερμοκρασία, στην οποία η διπλή έλικα του DNA μετουσιώνεται κατά το ήμισυ και υπολογίζεται, καταγράφοντας τις αντιστρεπτές καμπύλες τήξης με μέτρηση της απορρόφησης του DNA στα 260 nm [131].

Η αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας μπορεί να προκληθεί από πολλούς φυσικούς παράγοντες, όπως είναι η αύξηση της θερμοκρασίας ή από την παρουσία κάποιου οργανικού διαλύτη ή ακόμη μπορεί να προκληθεί και σε υψηλές τιμές του pH. Στις περιπτώσεις αυτές προκαλείται μεταβολή των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν την διπλή έλικα και έτσι αποσταθεροποιείται η δομή του DNA και χαμηλώνει το σημείο τήξης του. Η παρουσία οποιουδήποτε ηλεκτρολύτη (όπως NaCl) επηρεάζει επίσης τη σταθερότητα της διπλής έλικας του DNA, λόγω της εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων. Σε μεγάλη ιοντική ισχύ οι δυνάμεις εξουδετέρωσης των αρνητικών αυτών φορτίων είναι αρκετά ισχυρές και έτσι αποσταθεροποιούν τη διπλή έλικα. Η αύξηση του σημείου τήξης του DNA προκαλεί πολλές φυσικές μεταβολές, όπως την αύξηση της πυκνότητας του συστήματος, τη μείωση του ιξώδους των διαλυμάτων και την αύξηση της απορρόφησης στα 260 nm.

2.4.3. Μέθοδος Maxam – Gilbert

Η μέθοδος αυτή αναφέρεται στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του DNA. Κατά την μέθοδο αυτή το DNA διασπάται στα σημεία που υπάρχουν οι βάσεις είτε της γουανίνης, είτε της αδερίνης, είτε της κυτοσίνης. Η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να προσδιορίσει άμεσα την θυμίνη αλλά μπορεί η βάση αυτή να προσδιοριστεί σε συνδυασμό με την



κυτοσίνη. Τα αποτελέσματα προκύπτουν με πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κατά τα οποία παράγονται θραύσματα ανάλογα με την αλληλουχία των βάσεων [132].

Η διαδικασία αυτή καθορίζει την αλληλουχία των βάσεων του DNA σε ένα ιχνηθετιμένο άκρο του με ^{32}P , διασπώντας το στις βάσεις της γουανίνης, της αδερίνης, της κυτοσίνης και της θυμίνης με την χρήση διάφορων αντιδραστηρίων. Η μερική διάσπαση του DNA σε κάθε βάση παράγει ένα σύνολο ραδιενεργών κομματιών που επεκτείνεται από το ιχνηθετιμένο μέρος σε κάθε μια από τις θέσεις της συγκεκριμένης βάσης. Στα αυτοραδιογραφήματα που προκύπτουν από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου για τις τέσσερις διαφορετικές διασπάσεις του DNA, παράγονται θραύσματα από τις τέσσερις διαφορετικές διασπάσεις, κάθε ένα συγκεκριμένο για κάθε βάση όπως περιγράφεται πιο κάτω. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσδιορίσει εκατό συνεχόμενες βάσεις από το ιχνηθετιμένο μέρος του DNA.

Αρχικά χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια τα οποία διασπούν το DNA στις διάφορες βάσεις και στην συνέχεια αφαιρούν την συγκεκριμένη βάση από το σάκχαρο της. Το εκτεθειμένο σάκχαρο είναι τότε ένα αδύνατο σημείο του σκελετού του DNA το οποίο εύκολα μπορεί να διασπαστεί είτε χρησιμοποιώντας μία αλκαλική βάση είτε μια αμίνη και να διασπάσει πλήρως το σάκχαρο από το 3' στο 5' φωσφορικό σκελετό. Η αντίδραση είναι αρκετά περιορισμένη αφού μπορεί να διασπάσει μόνο μια βάση για κάθε 50 έως 100 βάσεις κατά μήκος του DNA. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για να διασπάσει τις πουρίνες είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο ενώ για τις πυριμιδίνες η υδραζίνη [132].

Διάσπαση των βάσεων γουανίνης – αδερίνης: Το διμέθυλο σουλφοξείδιο μεθυλιώνει τις βάσεις της γουανίνης στη θέση N7 και της αδερίνης στο N3 του DNA. Ο γλυκοζιτικός δεσμός της μεθυλιωμένης πουρίνης είναι τότε ασταθής και μπορεί να διασπαστεί με θέρμανση σε ουδέτερο pH, αφήνοντας έτσι το σάκχαρο ελεύθερο. Στη συνέχεια με επεξεργασία με διάλυμα 0.1 M αλκαλικής βάσης στους 90 ° διασπάται πλήρως το σάκχαρο από τις γειτονικές ομάδες του φωσφορικού άλατος. Τα προκύπτοντα θραύσματα αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και από το αυτοραδιογράφημα προκύπτουν σκούρες ταινίες. Οι ταινίες αυτές που προκύπτουν λόγω της θραύσης, αναφέρονται στις βάσεις της γουανίνης, οι οποίες μεθυλιώνονται πέντε φορές γρηγορότερα από τις βάσεις της αδερίνης. Ωστόσο όμως,

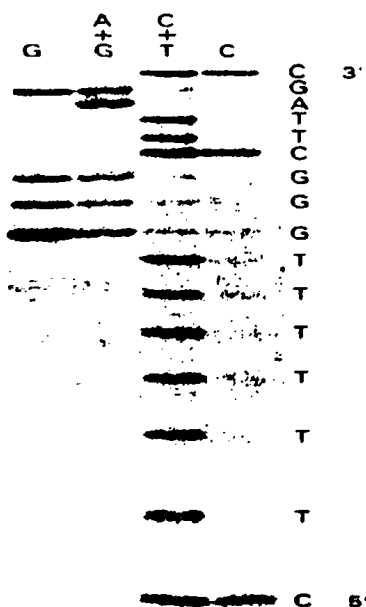


οι πληροφορίες που μπορούν να εξαχθούν για τις βάσεις της γουανίνης δεν είναι πλήρεις εξαιτίας του γεγονότος ότι η ένταση των ταινιών δεν μπορεί να αξιολογηθεί με ακρίβεια. Για να καθοριστεί πλήρως πρέπει πάντα να συγκρίνεται παράλληλα με τις ταινίες της θραύσης των βάσεων της αδενίνης.

Διάσπαση των βάσεων της αδενίνης: Ο γλυκοζιτικός δεσμός των βάσεων της αδενίνης είναι λιγότερο σταθερός από αυτόν της μεθυλιωμένης γουανίνης. Οπότε, κατάλληλη επεξεργασία με αραιό οξύ απελευθερώνει αποκλειστικά την αδενίνη. Στο επόμενο στάδιο, κατά την διάσπαση με την αλκαλική βάση παράγονται έντονες ταινίες που αντιστοιχούν στις βάσεις της αδενίνης και κάποιες ασθενείς για τις βάσεις της γουανίνης.

Διάσπαση των βάσεων της κυτοσίνης – θυμίνης: Η υδραζίνη αντιδρά με τις βάσεις της κυτοσίνης και της θυμίνης, τις διασπά δημιουργώντας ριβόσυλ-ουρία. Η υδραζίνη μπορεί έπειτα να αντιδράσει περαιτέρω και να παράγει υδραζόνη. Μετά από μερική υδραζινόλυση της υδατικής υδραζίνης στους 20°, το DNA διασπάται με 0.5 M πιπεριδίνη. Η ελεύθερη βάση αποτελεί πλέον μια κυκλική δευτεροταγή αμίνη και μετατοπίζει όλα τα προϊόντα της αντίδρασης υδροζινών από τα σάκχαρα καταλύοντας έτσι την απόσπαση των φωσφορικών αλάτων. Στο τελικό στάδιο, κατά την διάσπαση με πιπεριδίνη, παράγονται ταινίες που αντιστοιχούν στις βάσεις της κυτοσίνης και της θυμίνης.

Διάσπαση των βάσεων της κυτοσίνης: Η παρουσία NaCl 2 M αναστέλλει εκλεκτικά την αντίδραση των βάσεων της θυμίνης με την υδραζίνη. Κατόπιν, η θραύση με πιπεριδίνη παράγει μόνο ταινίες από τις βάσεις της κυτοσίνης.



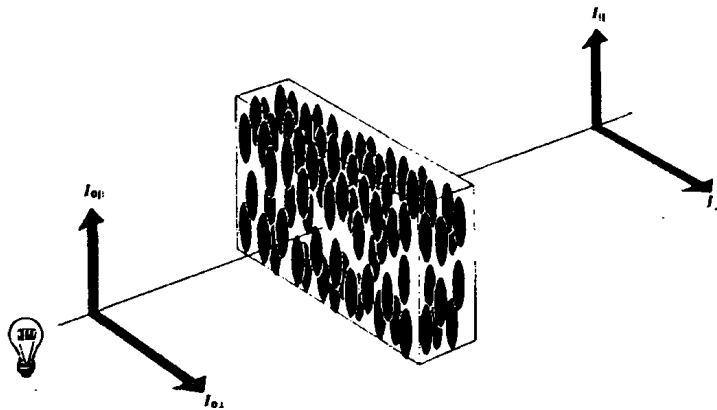
Σχήμα 2.3. Αυτοραδιογράφημα όπως προκύπτει από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε κομμάτι DNA με τη μέθοδο Maxam Gilbert.

2.4.4. Γραμμικός διχρωϊσμός (LD)

Το πολωμένο φως, του οποίου το ηλεκτρικό πεδίο κινείται κατά μία μόνο συνιστώσα, ορίζεται ως γραμμικά πολωμένο φως. Ο γραμμικός διχρωϊσμός (LD) αναφέρεται στην διαφορά της απορρόφησης από ένα μόριο μεταξύ δύο κάθετων μεταξύ τους πολώσεων, του γραμμικού φωτός. Αν θεωρηθεί η μια κατεύθυνση του γραμμικά πολωμένου φωτός, ως παράλληλη με τον κύριο άξονα προσανατολισμού ενός μορίου, τότε η άλλη κατεύθυνση του γραμμικά πολωμένου φωτός θα είναι κάθετη ως προς τον ίδιο άξονα. Η διαφορά των δύο αυτών απορροφήσεων παρέχει την τιμή του γραμμικού διχρωϊσμού για το συγκεκριμένο μόριο.

$$LD = A_{\parallel} - A_{\perp}$$

Ο γραμμικός διχρωϊσμός (LD) χρησιμοποιείται σε μόρια που είτε είναι προσανατολισμένα είτε προσανατολίζονται κατά την διάρκεια ενός πειράματος. Αρχικά μετριέται η απορρόφηση του πολωμένου φωτός που βρίσκεται παράλληλα με τον κύριο άξονα του μορίου και στην συνέχεια μετριέται η απορρόφηση του πολωμένου φωτός της κάθετης με τον κύριο άξονα πόλωσης του φωτός. Η διαφορά αυτών των δύο φασμάτων παρέχει το φάσμα LD [132].



Σχήμα 2.4. Σχηματική αναπαράσταση λήψης φάσματος LD. Ο κύριος άξονας των μορίων συμπίπτει με την παράλληλη ακτινοβολία.

Εάν η απορρόφηση του πολωμένου φωτός που μετριέται είναι πλήρως παράλληλη στην κατεύθυνση του άξονα προσανατολισμού του μορίου, όπως είναι στην περίπτωση μιας παράλληλης πόλωσης με τον κύριο άξονα ενός ραβδόμορφου μορίου, τότε ισχύει:

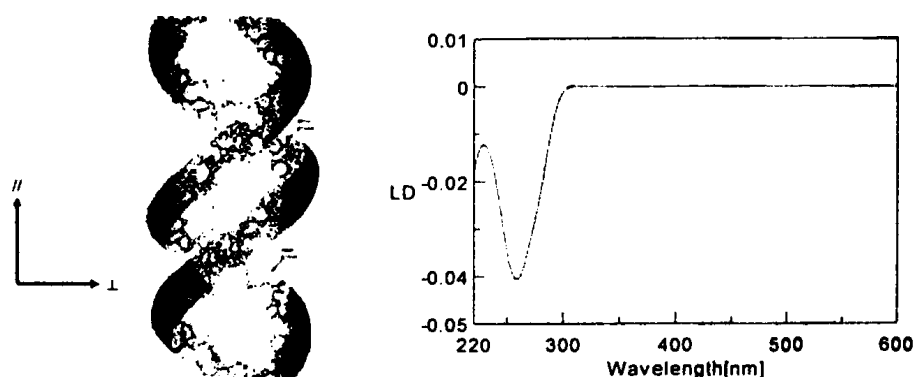
$$LD = A_{II} - A_{\perp} = A_{II} > 0$$

Ενώ εάν η πόλωση βρίσκεται κάθετα ως προς τον κύριο άξονα των μορίων, τότε:

$$LD = A_{II} - A_{\perp} = A_{II} < 0$$

Για ενδιάμεσες πολώσεις, ο γραμμικός διχρωϊσμός βρίσκεται μεταξύ των δύο πιο πάνω περιπτώσεων. Έτσι μπορούμε από ένα φάσμα LD να βρούμε τον βαθμό της πόλωσης για μια δεδομένη κατάσταση αν ξέρουμε σε τι διαμόρφωση βρίσκονται τα μόρια και αντίστροφα, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το LD για να βρούμε την διαμόρφωση των μορίων, αν ξέρουμε τον βαθμό της πόλωσης του μορίου για μια δεδομένη στιγμή.

Αφού η διαμόρφωση του μορίου αντιστοιχεί σε μια διπολική κατάσταση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί το πολωμένο φως για την εύρεση του τρόπου με τον οποίο μονάδες βιομορίων διευθετούνται στο χώρο, σε σχέση με τον άξονα του βιομορίου. Στην περίπτωση του DNA, μετριέται η απορρόφηση της ακτινοβολίας που είναι παράλληλη με τον κύριο άξονα της έλικας και η απορρόφηση που είναι κάθετη σε αυτόν. Οι βάσεις του DNA διευθετούνται κάθετα στον κύριο άξονα της διπλής έλικας και έτσι η πρώτη ακτινοβολία διαπερνά το δείγμα πλήρως και η δεύτερη απορροφάται πλήρως. Η διαφορά της παράλληλης με την κάθετη απορρόφηση δίνει το φάσμα LD του DNA, το οποίο φέρει ένα αρνητικό σήμα με απορρόφηση στα 260 nm.



Σχήμα 2.5. Σχηματική αναπαράσταση του φάσματος LD του DNA.

Μελετώντας τις αλληλεπιδράσεις μορίων με το DNA, με την τεχνική του γραμμικού διχρωϊσμού, λαμβάνονται πληροφορίες για τον προσανατολισμό των βάσεων του DNA και του δεσμευμένου μορίου κατά την αλληλεπίδραση ως προς τον κύριο άξονα z του DNA.

Μόρια τα οποία δεσμεύονται στο DNA και ο άξονας του είναι παράλληλος στον κύριο άξονα του DNA παρουσιάζουν ένα θετικό σήμα στα φάσματα LD. Αντιθέτως, μόρια που παρεμβάλλονται στις βάσεις, εμφανίζουν αρνητικό σήμα LD, αφού διευθετούνται κάθετα στον κύριο άξονα της διπλής έλικας [134].

2.4.5. Κυκλικός διχρωϊσμός (CD)

Στο κυκλικά πολωμένο φως, το διάνυσμα του ηλεκτρικού πεδίου έχει σταθερό μήκος αλλά περιστρέφεται γύρω από την διεύθυνσή του, διαμορφώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο μία έλικα. Αν αυτή είναι αριστερόστροφη, το φως αναφέρεται ως αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο, και αντίστροφα για μια δεξιόστροφη έλικα. Το ηλεκτρικό πεδίο μιας ακτινοβολίας προκαλεί εκτόπιση φορτίου κατά την αλληλεπίδραση με ένα μόριο, ενώ το μαγνητικό του πεδίο προκαλεί μεταφορά φορτίου. Ο συνδυασμός αυτών των δύο κινήσεων, οδηγεί σε μια ελικοειδή μετατόπιση κατά την πρόσκρουση του πολωμένου φωτός σε ένα μόριο. Δεδομένου ότι το ίδιο το πολωμένο φως είναι «χειρόμορφο», αλληλεπιδρά με διαφορετικό τρόπο με τα οπτικά ενεργά μόρια. Δηλαδή, η μια από τις δυο μορφές του κυκλικά πολωμένου φωτός απορροφάται σε διαφορετικό βαθμό. Σε ένα πείραμα κυκλικού διχρωϊσμού, ακτινοβολείται με ίσα ποσά αριστερόστροφου και δεξιόστροφου κυκλικά πολωμένου φωτός το χειρόμορφο μόριο. Η μία από τις δυο μορφές απορροφάται περισσότερο, οπότε μετράται η διαφορά της απορρόφησης ως συνάρτηση του μήκους κύματος.

Έτσι λοιπόν σε ένα δεδομένο μήκος κύματος ισχύει:

$$\Delta A = A_L - A_R$$

Όπου ΔA είναι η διαφορά της απορρόφησης του αριστερόστροφου (LCP) και δεξιόστροφου κυκλικά πολωμένου φωτός (RCP)

Η σχέση αυτή μπορεί να εκφραστεί εφαρμόζοντας τον νόμο του Beer ως εξής:

$$\Delta A = (\epsilon_L - \epsilon_R) \times C \times l$$

Όπου:



ϵ_L και ϵ_R είναι οι συντελεστές μοριακής απόσβεσης του αριστερόστροφα και δεξιόστροφα πολωμένου φωτός αντίστοιχα

C είναι η συγκέντρωση του δείγματος

l είναι το μήκος της κυψελίδας

τότε :

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$$

που είναι ο μοριακός κυκλικός διχρωϊσμός.

Όταν μετριέται η διαφορά της απορρόφησης ΔA , αναφερόμαστε σε βαθμούς ελλειπτικότητας. Ο μοριακός κυκλικός διχρωϊσμός και η μοριακή ελλειπτικότητα ($[\theta]$), συνδέονται με την εξής σχέση:

$$[\theta] = 3298.2 \Delta\epsilon$$

Αυτή η σχέση προκύπτει από τον ορισμό της ελλειπτικότητας, που δίνεται από την σχέση:

$$\tan\theta = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L}$$

όπου E_R και E_L είναι τα ανύσματα των ηλεκτρικών πεδίων του δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός, αντίστοιχα. Όταν το E_R είναι ίσο με το E_L (όταν δηλαδή δεν υπάρχει καμία διαφορά στην απορρόφηση του δεξιόστροφα και αριστερόστροφα κυκλικά πολωμένου φωτός), η ελλειπτικότητα θ είναι 0° και το φως είναι γραμμικά πολωμένο. Όταν είτε το E_R είτε το E_L είναι ίσο με μηδέν (όταν υπάρχει πλήρης απορρόφηση του κυκλικού πολωμένου φωτός σε μια κατεύθυνση), τότε η ελλειπτικότητα θ είναι 45° και το φως είναι κυκλικά πολωμένο.

Γενικά, το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού είναι μικρό και το μέγεθος $\tan\theta$ είναι μικρή, η ελλειπτικότητα θ μετριέται σε ακτίνια (radians). Από την ένταση της ακτινοβολίας (I) του φωτός, που είναι ανάλογη προς το τετράγωνο του ανύσματος του ηλεκτρικού πεδίου, προκύπτει ότι:

$$\theta(\text{radians}) = \frac{(I_R^{\frac{1}{2}} - I_L^{\frac{1}{2}})}{(I_R^{\frac{1}{2}} + I_L^{\frac{1}{2}})}$$

Και με αντικατάσταση του I από τον νόμο του Beer :

$$I = I_0 e^{-A \ln 10}$$



Η ελλειπτικότητα μπορεί τότε να γραφεί ως εξής:

$$\theta(\text{radian}) = \frac{(e^{\frac{-A_R \ln 10}{2}} - e^{\frac{-A_L \ln 10}{2}})}{(e^{\frac{-A_R \ln 10}{2}} + e^{\frac{-A_L \ln 10}{2}})} = \frac{e^{\frac{\Delta A \ln 10}{2}} - 1}{e^{\frac{\Delta A \ln 10}{2}} + 1}$$

Αφού $\Delta A \ll 1$, η πιο πάνω σχέση μπορεί να αναπτυχθεί σε σειρά Taylor και στην συνέχεια με την μετατροπή της ελλειπτικότητας από ακτίνια σε μοίρες (degrees), απλοποιείται στην πιο κάτω σχέση:

$$\theta(\text{degrees}) = \Delta A \left(\frac{\ln 10}{4} \right) \left(\frac{180}{\pi} \right)$$

Εφαρμόζοντας τον τύπο της μοριακής ελλειπτικότητας με βάση την συγκέντρωση του μορίου και του μήκους της διαδρομής, προκύπτει η σχέση:

$$[\theta] = \frac{100\theta}{Cl}$$

Κατόπιν, συνδυάζοντας τις δύο τελευταίες σχέσεις με τον νόμο του Beer, προκύπτει η τελική σχέση:

$$[\theta] = 100\Delta\epsilon \left(\frac{\ln 10}{4} \right) \left(\frac{180}{\pi} \right) = 3298.2\Delta\epsilon$$

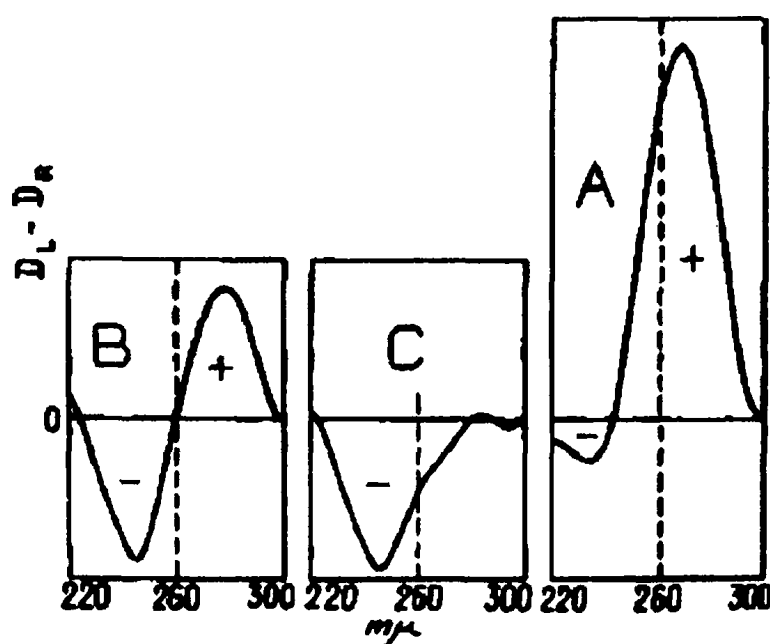
Το κυκλικά πολωμένο φως, εισέρχεται σε ένα οπτικά ενεργό μέσο με διαφορετικές ταχύτητες της δεξιόστροφης και αριστερόστροφης κυκλικά πολωμένης ακτινοβολίας, λόγω των διαφορετικών δεικτών διάθλασης. Η ικανότητα αυτή αναφέρεται ως στροφική ικανότητα. Η συνάρτηση της στροφικής ικανότητας με το μήκος κύματος ονομάζεται στροφική διασπορά (ORD). Η στροφική διασπορά επιτρέπει σε ένα χειρικό μόριο να στρέφει το επίπεδο του πολωμένου φωτός. Στον κυκλικό διχρωϊσμό, το δεξιόστροφο και αριστερόστροφο κυκλικά πολωμένο φως απορροφάται επίσης διαφορετικά στα διάφορα μήκη κύματος λόγω των διαφορών στο συντελεστή απόσβεσης για τις δύο πολωμένες ακτινοβολίες, καταγράφοντας το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού.

Ο κυκλικός διχρωϊσμός είναι άμεσα συνδεδεμένος με την οπτική στροφική διασπορά (ORD) Το CD μετριέται κοντά στο μήκος κύματος της απορρόφησης ενός μορίου, ενώ το ORD μπορεί να μετρηθεί σε ευρύτερες περιοχές. Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού είναι πιο ευαίσθητη τεχνική από την οπτική περιστροφική διασπορά και χρησιμοποιείται για

οποιοδήποτε οπτικά ενεργό μόριο όπως τα βιολογικά μακρομόρια, το DNA, το RNA, οι πρωτεΐνες, κ.λ.π.

Η άλφα έλικα των πρωτεϊνών και η διπλή έλικα των νουκλεϊνικών οξέων έχουν χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού, αντιπροσωπευτικά για τις δομές τους. Ο κυκλικός διχρωϊσμός είναι η καταλληλότερη τεχνική για την έρευνα των διαφορετικών τύπων των νουκλεϊνικών οξέων και αποτελεί μια εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική για μικρές αλλαγές στη δομή τους [135].

Οι Tunis-Schneider και Maestre [136] μελέτησαν το DNA με τον κυκλικό διχρωϊσμό στις ίδιες πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την μελέτη του με ακτίνες X και προέκυψαν τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού των τύπων A, B και C του DNA. Το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του τύπου B αποτελείται από μια αρνητική ταινία και μια θετική ταινία ίσης περίπου έντασης με το σημείο διατομής στο μέγιστο της απορρόφησης (σχήμα 2.6 B). Ο τύπος C έχει μια αρνητική ταινία, της οποίας η μορφή και η ένταση είναι παρόμοια με εκείνη της αρνητικής ταινίας του B τύπου, αλλά δεν εμφανίζει καμία θετική ταινία (σχήμα 2.6 C). Το φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού του τύπου A έχει μια στενότερη ομοιότητα με το φάσμα του B τύπου (σχήμα 2.6 A).



Σχήμα 2.6. Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού του τύπου B του DNA (B), του τύπου C (C) και του τύπου A (A).



2.4.6. Φασματοσκοπία NMR

2.4.6.1. Γενικά

Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR – nuclear magnetic resonance) οφείλεται στην διέγερση των μαγνητικών πυρήνων που βρίσκονται σε ισχυρό και ομογενές μαγνητικό πεδίο. Όταν ένας πυρήνας βρίσκεται μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο B , περικλείει δυναμική ενέργεια λόγω της μαγνητικής του ροπής.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, βασίζεται στην ανίχνευση πυρήνων με αυτοστροφορμή. Αυτοί οι πυρήνες έχουν είτε ατομικό είτε μαζικό αριθμό περιττό. Έτσι πυρήνες όπως ^1_1H , $^{13}_6\text{C}$, $^{15}_7\text{N}$, και $^{27}_{13}\text{Al}$ μπορούν να μελετηθούν με την μέθοδο αυτή.

Η μαγνητική ροπή εξαρτάται από τον κβαντικό αριθμό του πυρηνικού *spin* I που έχει τιμές $1/2, 1, 3/2, \dots$ ανάλογα με την φύση κάθε πυρήνα. Όταν ο κβαντικός αριθμός του πυρηνικού *spin* I δεν είναι μηδέν συνδέεται με την μαγνητική ροπή μ με την σχέση:

$$\mu = \gamma I$$

όπου γ είναι ο γυρομαγνητικός λόγος και αναφέρεται στην αναλογία των διανυσμάτων της μαγνητικής ροπής μ και του πυρηνικού *spin* I .

Εντός μαγνητικού πεδίου οι προσανατολισμοί του ανύσματος της στροφορμής του πυρήνα είναι ορισμένοι και ίσοι με $2I+1$ που δίνονται από το μαγνητικό κβαντικό αριθμό m_I , ο οποίος μπορεί να πάρει όλες τις ακέραιες τιμές μεταξύ $-I$ και $+I$. Οι τιμές αυτές αντιστοιχούν και στις ενεργειακές καταστάσεις του.

Το μέγεθος της στροφορμής ως προς τη διεύθυνση z που ορίζει το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο δίνεται από την σχέση:

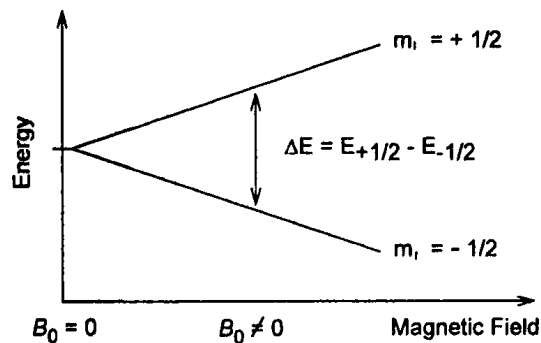
$$P_z = m_I \hbar$$

όπου $\hbar = h/2\pi$ και h η σταθερά του Planck

Έτσι, το μέγεθος της μαγνητικής ροπής ως προς τη διεύθυνση z που ορίζει το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο ορίζεται ως:

$$\mu = \gamma I_z = m_I \hbar$$

Εάν πυρήνες υδρογόνου, $I=1/2$, τεθούν σε μαγνητικό πεδίο, το άνυσμα του spin της στροφορμής του έχει δύο προσανατολισμούς σε σχέση με την διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου. Ο παράλληλος προσανατολισμός με $m_I=+1/2$, αποτελεί τη βασική στάθμη ενέργειας, ενώ ο αντιπαράλληλος προσανατολισμός με $m_I=-1/2$, που αποτελεί την διεγερμένη.



Σχήμα 2.7. Ενεργειακό διάγραμμα ενός πυρήνα spin, κβαντικού αριθμού $I=1/2$ παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Η ενέργεια της μαγνητικής ροπής μ , διεύθυνσης z , σε ένα μαγνητικό πεδίο B_0 δίνεται από την σχέση:

$$E = -B_0\mu = -\mu_z B_0$$

Έτσι,

$$E = -m_I \gamma \hbar B_0$$

Κατά συνέπεια, σε ένα μαγνητικό πεδίο τα διαφορετικά πυρηνικά spin έχουν διαφορετικές ενέργειες. Η διαφορά ενέργειας ΔE μεταξύ των δύο σταθμών ενέργειας ορίζεται ως:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0$$

Συνεπώς, εάν σε κάποιο πυρήνα εντός μαγνητικού πεδίου επιδράσει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία συχνότητας ν , τότε επέρχεται συντονισμός με απορρόφηση ενέργειας. Τα πρωτόνια, ως εκ τούτου θα διεγερθούν από την βασική κατάσταση στην διεγερμένη. Η ενέργεια της ακτινοβολίας δίνεται από την σχέση $E = h\nu$, όπου ν η συχνότητα της ακτινοβολίας. Έτσι, προκύπτει ότι η συχνότητα ν με την οποία προκαλείται αυτή η διέγερση και δίνεται από την σχέση:

$$\nu = \Delta E/h = \gamma B_0/2\pi$$



2.4.6.2. Φάσματα δύο διαστάσεων

Σε ένα φάσμα δύο διαστάσεων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (two dimensional NMR, 2D – NMR), υπάρχει καταγραφή δύο διαφορετικών πληροφοριών σε δύο διαφορετικούς άξονες συχνοτήτων F_2 και F_1 . Στον ένα άξονα F_2 καταγράφονται συνήθως οι απορροφήσεις ενός συγκεκριμένου πυρήνα ενός μορίου ενώ στον άλλο F_1 καταγράφονται άλλες πληροφορίες όπως η σταθερά σύζευξης ή οι απορροφήσεις άλλων πυρήνων που σχετίζονται ή αλληλεπιδρούν με αυτούς του άξονα F_2 .

Τα φάσματα COSY (COrrelation SpectroscopY) αναφέρονται στις συσχετίσεις των πυρήνων, ως αποτέλεσμα της σύζευξης των πυρήνων μέσω δεσμών και δίνει πληροφορίες όταν οι πυρήνες απέχουν μέχρι και τέσσερις δεσμούς (σπανίως 5), δηλαδή όταν συνδέονται μέσω σταθερών σύζευξης 2J , 3J και 4J . Η σύζευξη από την αλληλεπίδραση δύο γειτονικών πυρήνων του μορίου είναι δυνατόν να εντοπιστεί στο φάσμα δύο διαστάσεων NMR από συμμετρικά σημεία εκτός διαγωνίου, τα οποία συνδέουν τους συντονισμούς δύο συζευγμένων πυρήνων. Δηλαδή, ένα φάσμα COSY παρέχει πληροφορίες για τις υπάρχουσες συζεύξεις των πρωτονίων, που βρίσκονται δύο ή τρεις δεσμούς μακριά.

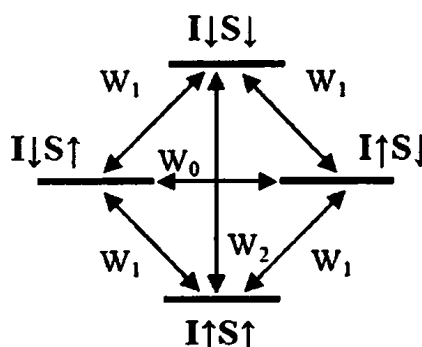
Τα φάσματα TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) αναφέρονται στην βαθμωτή σύζευξη μέσω ολόκληρου του συστήματος spin των συνδεδεμένων πυρήνων. Ενώ με το φάσμα COSY που προαναφέρθηκε, είναι εφικτή η συσχέτιση γειτονικών πυρήνων που συνδέονται με σταθερές σύζευξης 2J , 3J και 4J , με το φάσμα TOCSY μπορούν να συσχετιστούν όλοι οι πυρήνες ενός συγκεκριμένου συστήματος spin.

Τα φάσματα NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) αναφέρονται στην συσχέτιση πυρήνων που αλληλεπιδρούν μέσω χώρου. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι δυνατή όταν οι δύο πυρήνες είναι πολύ κοντά ($< 5 \text{ \AA}$) έτσι ώστε να υπάρχει αλληλεπίδραση διπόλου – διπόλου. Δηλαδή, ένα φάσμα NOESY παρέχει πληροφορίες για τις ενδομοριακές ή διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των πυρήνων ενός μορίου και επομένως για την διαμόρφωση των πυρήνων στο χώρο.

2.4.6.3. Το φαινόμενο NOE

Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης διπόλου-διπόλου είναι και το φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) που επηρεάζει την εμφάνιση του φάσματος NMR. Το NOE εξαρτάται από το αντίστροφο της έκτης δύναμης της απόστασης μεταξύ π.χ. δύο πρωτονίων, r^6 . Έτσι, για να εμφανίζουν δύο πρωτόνια NOE θα πρέπει να βρίσκονται αρκετά κοντά το ένα με το άλλο, ανεξάρτητα από το εάν τα πρωτόνια αυτά εμφανίζουν σύζευξη μέσω δεσμών ή όχι.

Έτσι, σε ένα σύστημα δύο spin, για τους πυρήνες I και S που έχουν διπολική σύζευξη, υπάρχουν τέσσερις πιθανές ενεργειακές καταστάσεις όπως φαίνεται στο σχήμα 2.8.



Σχήμα 2.8. Ενεργειακό διάγραμμα ενός συστήματος δύο spin και οι πιθανές μεταπτώσεις του.

Οι πιθανότητες μετάπτωσης W_1 , αντιστοιχούν σε απλή μεταβολή ενός spin (ο δείκτης τους υποδηλώνει τη μεταβολή του κβαντικού αριθμού m κατά ± 1) και οι πιθανότητες W_0 και W_2 αντιστοιχούν σε ταυτόχρονες μεταβολές του πυρηνικού spin και δηλώνουν μεταβάσεις μηδενικού ή διπλού κβάντου.

Η βάση των πειραμάτων NOE είναι η διατάραξη ενός συστήματος spin, όταν ο ένας πυρήνας βρίσκεται σε κατάσταση κορεσμού, έτσι ώστε να πραγματοποιηθούν οι μεταπτώσεις W_0 και W_2 . Σύμφωνα με το μηχανισμό αποδιέγερσης διπόλου – διπόλου, ένας πυρήνας αντιλαμβάνεται μια ευρεία κλίμακα τιμών μαγνητικού πεδίου που οφείλεται σε τοπικές ταλαντώσεις του γειτονικού πυρήνα καθώς το μόριο κινείται στο διάλυμα. Με αυτό τον μηχανισμό οι μεταπτώσεις W_0 και W_2 συνεισφέρουν στην πυρηνική αποδιέγερση και στην

ύπαρξη του φαινομένου NOE. Το μέγεθος NOE μπορεί να υπολογιστεί με τον ακόλουθο τύπο:

$$\varepsilon_{\text{NOE}} = 1 + \frac{\gamma_I}{\gamma_S} \frac{(W_2 - W_0)}{W_0 + 2W_1 + W_2}$$

Όπου γ_I και γ_S είναι ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα I και του πυρήνα S αντίστοιχα.

Η ένταση του NOE εξαρτάται από το χρόνο συσχέτισης τ_c που είναι ο χρόνος που απαιτείται για να περιστραφεί το μόριο κατά γωνία ίση με ένα ακτίνιο ($\sim 60^\circ$) και αποτελεί το μέτρο της περιστροφικής κίνησης μορίων στο διάλυμα. Έχει αποδειχθεί ότι οι πιθανότητες μετάπτωσης W όταν ένα μόριο περιστρέφεται πολύ γρήγορα, συνδέονται με το χρόνο συσχέτισης με τις πιο κάτω εξισώσεις:

$$W_1 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \frac{3\tau_c}{r^6}$$

$$W_2 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \frac{12\tau_c}{r^6}$$

$$W_0 \propto \gamma_I^2 \gamma_S^2 \frac{2\tau_c}{r^6}$$

Έχει βρεθεί ακόμη ότι σε μεγάλα μόρια όπως πολυμερή, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα κ.λπ τα οποία περιστρέφονται αργά σε ένα διάλυμα ευνοείται η μετάπτωση W_0 και παρουσιάζεται αρνητικό NOE. Αντίθετα, σε μικρά μόρια τα οποία περιστρέφονται γρήγορα σε ένα διάλυμα, η μετάπτωση W_2 είναι 6 φορές ισχυρότερη από την W_0 , με αποτέλεσμα να ενισχύεται το θετικό NOE.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

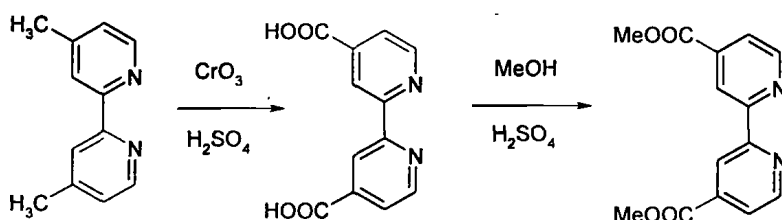


3.1. Σύμπλοκα του τύπου Λ-, Δ-[Ru(bpy)₂(Yn)](PF₆)₂

(Yn = Y1, Y2, Y3)

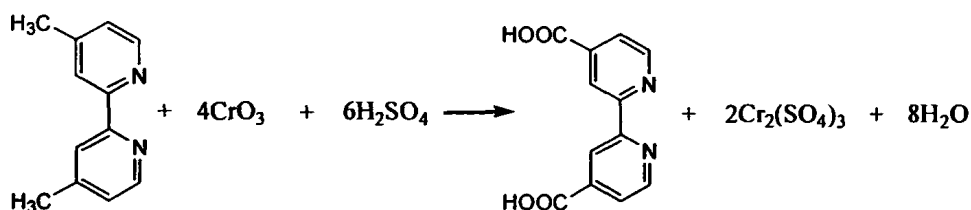
3.1.1. Σύνθεση

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του υποκαταστάτη 4,4'-(CO₂H)₂bpy και του διμεθυλεστέρα του σύμφωνα με τις εξής αντιδράσεις με μικρή τροποποίηση των μεθόδων της βιβλιογραφίας [123]:



Σχήμα 3.1.1. Αντίδραση σύνθεσης του υποκαταστάτη 4,4'-(CO₂H)₂bpy.

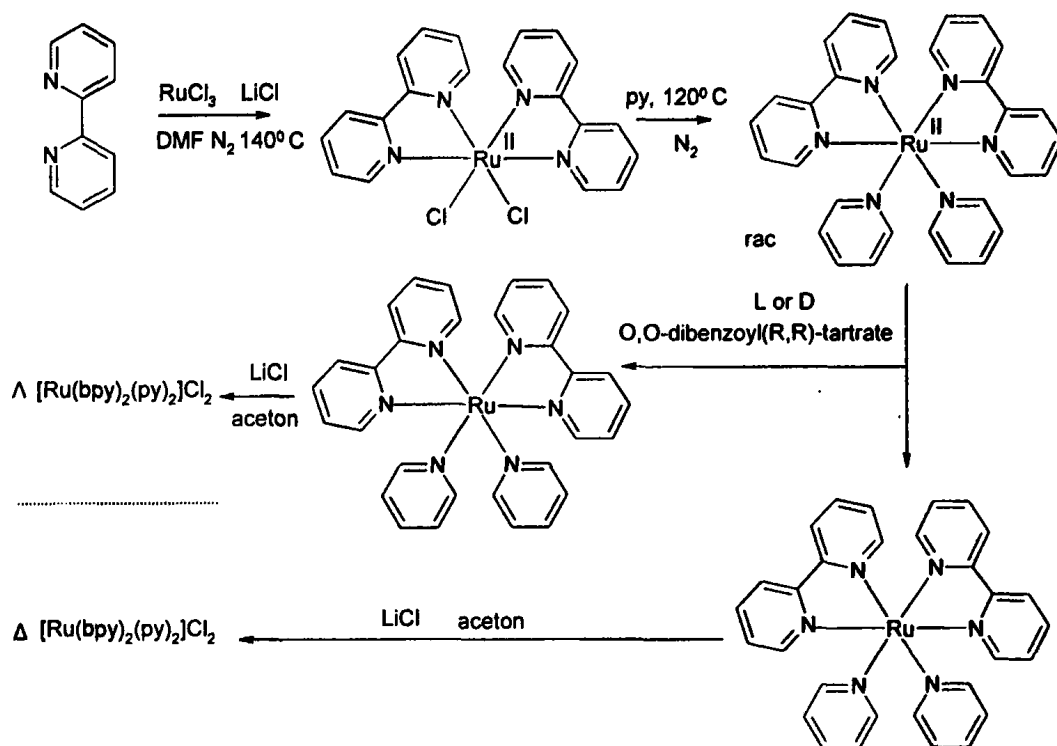
Όπως φαίνεται από τις πιο πάνω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκε η οξείδωση των δυο μεθυλομάδων του 4,4'-Me₂bpy με CrO₃ και H₂SO₄. Η στοιχειομετρία της οξείδωσης δίνεται από την αντίδραση:



Ο υποκαταστάτης αυτός είναι αδιάλυτος στους περισσότερους διαλύτες και έτσι για να γίνει η ταυτοποίηση μετατράπηκε σε διμεθυλεστέρα, ο οποίος είναι ευδιάλυτος σε πολλούς οργανικούς διαλύτες όπως το CHCl₃. Τα προϊόντα και των δύο σταδίων ταυτοποιήθηκαν με διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές μεθόδους.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των δύο εναντιομερών συμπλόκων Λ- και Δ- [Ru(bpy)₂(py)₂]Cl₂ ξεκινώντας από το σύμπλοκο *cis*-Ru(bpy)₂Cl₂ όπως φαίνεται στο σχήμα 3.1.2 [121, 102]. 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 διαμόρφωσή τους [4]. Συνεπώς, η προσθήκη του υποκαταστάτη Yn (Yn = Y1, Y2, Y3) που πραγματοποιείται στη συνέχεια δε μεταβάλλει την απόλυτη διαμόρφωση, όπως διαπιστώθηκε και από τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού.

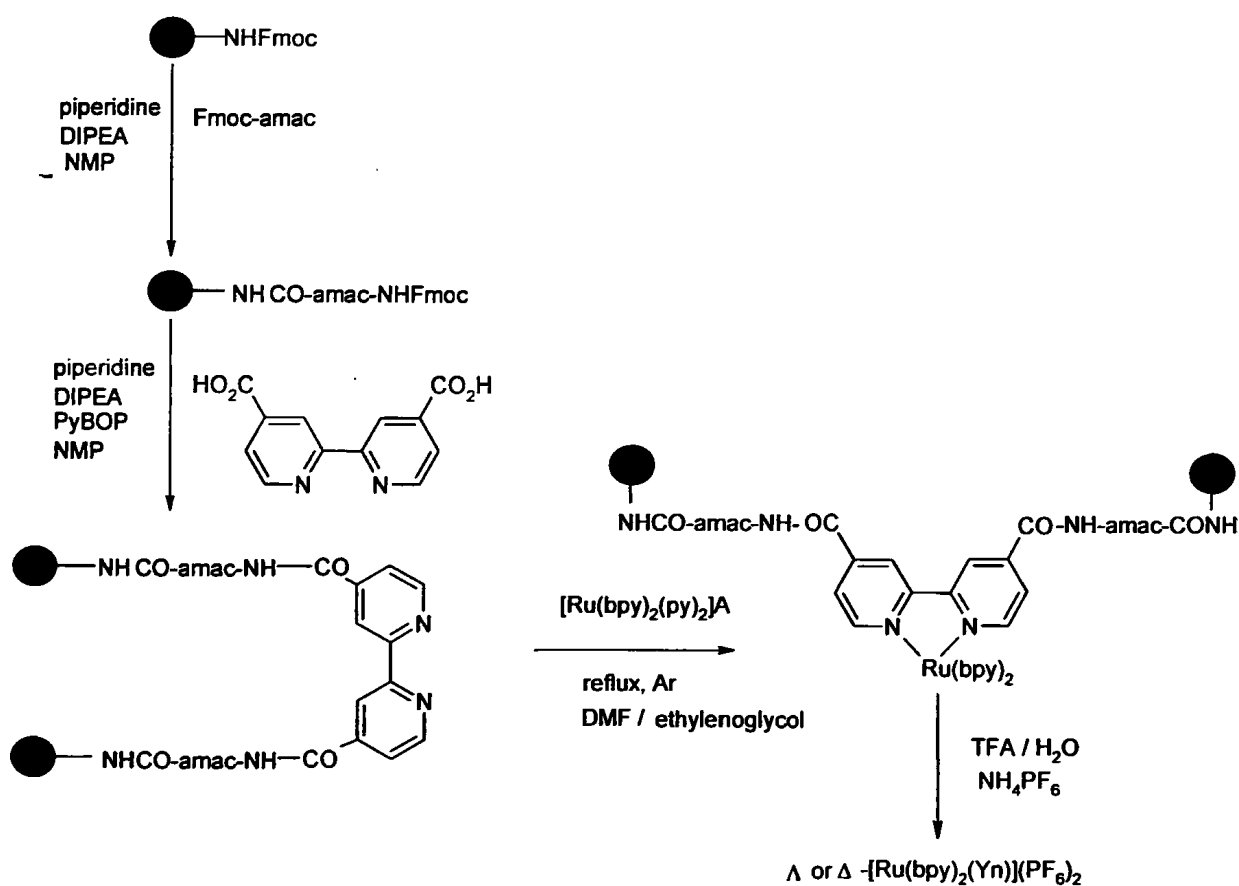


Σχήμα 3.1.2. Αντίδραση σύνθεσης των Λ- και Δ- [Ru(bpy)₂(py)₂]Cl₂.

Στον υποκαταστάτη 4,4'-(CO₂H)₂bpy συζεύχθηκαν τα αμινοξέα L-λυσίνη, L-ιστιδίνη και L-τυροσίνη με την στρατηγική της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεή φάση. Η σύζευξη γίνεται από την αμινομάδα των αμινοξέων τα οποία βρίσκονται ακινητοποιημένα πάνω στην ρητίνη tentagel S RAM και της καρβοξυλομάδας του υποκαταστάτη, με τα αντιδραστήρια ενεργοποίησης της πεπτιδικής σύζευξης (DIPEA και PyBOP). Τα τελικά σύμπλοκα Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(Yn)](PF₆)₂ συντέθηκαν με αντίδραση των συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(py)₂]Cl₂ και των υποκαταστατών Y1, Y2 και Y3 σε μίγμα DMF - αιθυλένογλυκόλης 1:1. Το DMF χρησιμοποιείται για το «ξετύλιγμα» της ρητίνης με τον ακινητοποιημένο υποκαταστάτη ώστε



να γίνεται πιο εύκολη η πρόσβαση του συμπλόκου Λ - ή Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2]\text{Cl}_2$ σε αυτόν. Η αιθυλενογλυκόλη έχει υψηλό σημείο βρασμού, διευκολύνοντας έτσι την αντίδραση που πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία (160 °C). Η τελική αυτή αντίδραση πραγματοποιείται πάνω στη ρητίνη ώστε να αποφεύγονται παραπροϊόντα. Το προϊόν που βρίσκεται μετά την αντίδραση ακινητοποιημένο στην ρητίνη αποτελεί και το τελικό προϊόν. Η «απελευθέρωση» των συμπλόκων στο διάλυμα πραγματοποιείται με το κόψιμό τους από την ρητίνη σε διάλυμα TFA/H₂O (95/5, v/v). Στο πιο κάτω σχήμα (σχήμα 3.1.3) δίνονται αναλυτικά οι πορείες των αντιδράσεων για τα τελικά σύμπλοκα.



Σχήμα 3.1.3. Σύνθεση του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Yn})]^{2+}$ με την τεχνική της σύνθεσης σε στερεή φάση.

3.1.2. Χαρακτηρισμός των υποκαταστατών

3.1.2.1. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy (Y1)

Η σύζευξη της λυσίνης στον υποκαταστάτη 4,4'-(CO₂H)₂bpy επιβεβαιώθηκε με το test Kaiser για την πιστοποίηση της ελεύθερης αμινομάδας του αμινοξέως, με στοιχειακή ανάλυση (βλέπε πειραματικό 2.2.1.3) και με φασματοσκοπία ¹H NMR.

3.1.2.1.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Στο φάσμα ¹H NMR παρατηρείται μόνο μια ομάδα σημάτων συντονισμού για τα πρωτόνια του υποκαταστάτη που βεβαιώνει την πλήρη σύζευξη της λυσίνης με τα καρβοξύλια και την διατήρηση της συμμετρίας του μορίου. Έτσι, στο φάσμα του υποκαταστάτη Y1 εμφανίζονται τρεις ταινίες συντονισμού που οφείλονται στα πρωτόνια της διπυριδίνης. Τα πρωτόνια H3 και H3' παρουσιάζονται στα 8.92 ppm, τα πρωτόνια H5 και H5' στα 8.02 ppm με ³J = 5.3 Hz και τα πρωτόνια H6 και H6' στα 8.26 ppm με ³J = 5.3 Hz. Τα αλειφατικά πρωτόνια της λυσίνης παρουσιάζουν χημικούς συντονισμούς στα 4.23 ppm για το Ha, στα 1.74 ppm για το Hβ, στα 1.30 ppm για το Hγ, στα 1.54 ppm για το Hδ και στα 2.91 ppm για το He. Οι τιμές αυτές είναι παρόμοιες με εκείνες των χημικών μετατοπίσεων του ελεύθερου αμινοξέως σε τελικό άκρο πεπτιδίου.

3.1.2.2. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy (Y2)

Ο υποκαταστάτης 4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy χαρακτηρίστηκε με στοιχειακή ανάλυση (βλέπε πειραματικό 2.2.1.4) και με φασματοσκοπία ¹H NMR.

3.1.2.2.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Στον δικάρβοξυ υποκαταστάτη με συζευγμένες δύο ιστιδίνες παρατηρείται επίσης όπως και στην περίπτωση του υποκαταστάτη με τις δύο λυσίνες, διατήρηση της συμμετρίας



του μορίου. Έτσι, στο φάσμα του υποκαταστάτη Y2 τα πρωτόνια H3 και H3' παρουσιάζουν ταινία συντονισμού στα 8.87 ppm, τα πρωτόνια H5 και H5' στα 8.02 ppm με $^3J = 5.5$ Hz και τα πρωτόνια H6 και H6' στα 8.26 ppm με $^3J = 5.5$ Hz. Τα αλειφατικά πρωτόνια της ιστιδίνης παρουσιάζουν ταινίες συντονισμού στα 4.74 ppm για το H_α και στα 3.26 ppm για το H_β ενώ τα αρωματικά πρωτόνια παρουσιάζουν ταινίες συντονισμού στα 8.10 ppm για το πρωτόνιο H2 και στα 6.99 ppm για το πρωτόνιο H5.

3.1.2.3. Χαρακτηρισμός του υποκαταστάτη 4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy (Y3)

Ο υποκαταστάτης 4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy χαρακτηρίστηκε με στοιχειακή ανάλυση (βλέπε πειραματικό 2.2.1.5) και με φασματοσκοπία ¹H NMR.

3.1.2.3.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Στον υποκαταστάτη 4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy τα πρωτόνια του δακτυλίου βρέθηκαν τα H3 και H3' στα 8.75 ppm, τα πρωτόνια H5 και H5' στα 7.94 ppm ($^3J = 5.3$ Hz) και τα πρωτόνια H6 και H6' στα 8.20 ppm ($^3J = 5.4$ Hz). Τα αλειφατικά πρωτόνια της τυροσίνης παρουσιάζονται ως συντονισμοί στα 4.58 ppm για το H_α και στα 3.04 ppm για το H_β ενώ τα αρωματικά πρωτόνια εμφανίζονται στα 7.15 ppm για τα πρωτόνια H2, H6 και στα 6.86 ppm για τα πρωτόνια H3 και H5.

3.1.2.4. Συνοπτική παρουσίαση των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων των υποκαταστατών Yn

Στον πίνακα 3.1.1 δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των υποκαταστατών Yn σε D₂O στους 298 K και οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του 4,4'-(CO₂Me)₂bpy σε CDCl₃ όπως αναφέρονται στην βιβλιογραφία [123]. Οι παρατηρούμενες χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των υποκαταστατών Yn δεν μπορούν να συγκριθούν με τις αντίστοιχες του 4,4'-(CO₂Me)₂bpy (H3H3' στα 8.96 ppm, H5H5' στα 7.86 ppm με $^3J = 5$ Hz και H6H6' στα 8.81 ppm με $^3J = 5$ Hz) καθώς η διαλυτότητα του 4,4'-

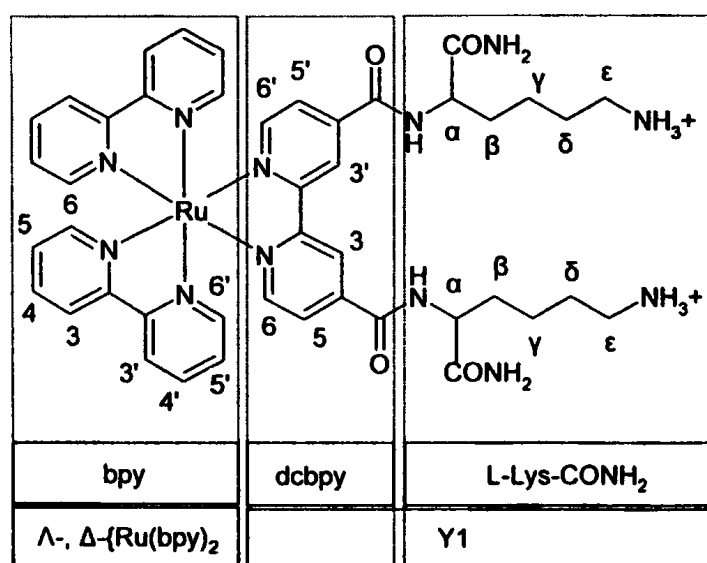
(CO₂Me)₂bpy είναι απαγορευτική στο D₂O όπου είναι διαλυτοί οι υποκαταστάτες Υη. Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των πυριδινικών δακτυλίων είναι ευαίσθητες ως προς τον διαλύτη και για παράδειγμα αναφέρουμε το μόριο της 2,2'-διπυριδίνης όπου σε διαφορετικό διαλύτη οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της μεταβάλλονται [137, 138].

Πίνακας 3.1.1. Χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων των υποκαταστατών Υη σε D₂O.

Υποκαταστάτης	πρωτόνια			Αμινοξύ
	H3H3'	H5H5'	H6H6'	
4,4'-(CO ₂ Me) ₂ bpy CDCl ₃	8.98	7.86	8.81	-
Υ1 D ₂ O	8.92	8.02	8.26	4.23 (Hα), 1.74 (Hβ), 1.30 (Hγ), 1.54 (Hδ), 2.91 (Hε)
Υ2 D ₂ O	8.87	8.02	8.26	4.74 (Hα), 3.26 (Hβ), 8.10 (H2), 6.99 (H5)
Υ3 D ₂ O	8.75	7.94	8.20	4.58 (Hα), 3.04 (Hβ), 7.15 (H2H6), 6.86 (H3H5)

3.1.3. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων

3.1.3.1. Χαρακτηρισμός των διαστερομερών συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ (Λ1 και Δ1)

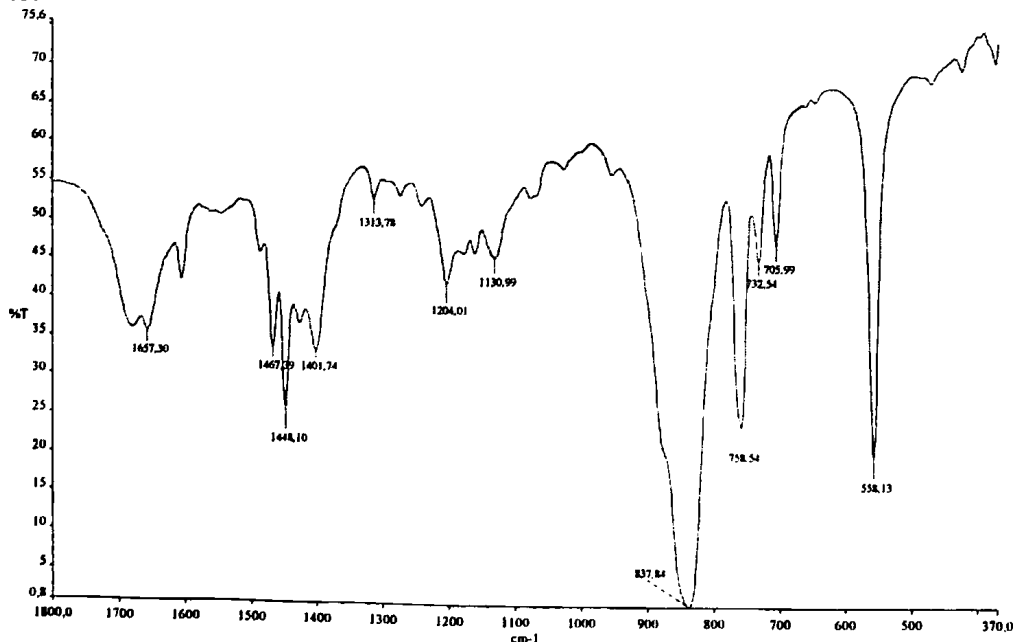


Σχήμα 3.1.6. Σχηματική παράσταση της δομής των συμπλόκων Δ- και Λ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄.

Τα σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν με διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές μεθόδους όπως, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD).

3.1.3.1.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου

Τα διαστερομερή σύμπλοκα Λ1 και Δ1 παρέχουν πρακτικά τα ίδια φάσματα οπότε η ανάλυση τους δεν γίνεται ξεχωριστά. Έτσι, στο σχήμα 3.1.5 δίνεται ενδεικτικά το φάσμα για το Λ1 ισομερές. Στα φάσματα των συμπλόκων Λ1 και Δ1 φαίνεται η παρουσία του υποκαταστάτη Y1 στο σύμπλοκο αφού παρατηρείται μια ισχυρή ταινία στα 1657 cm^{-1} και 1660 cm^{-1} αντίστοιχα, που αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C=O. Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι στο φάσμα του ελεύθερου υποκαταστάτη Y1 η δόνηση τάσης του δεσμού C=O εμφανίζεται στα 1663 cm^{-1} . Η μικρή διαφορά που παρατηρείται στην ταινία αυτή κατά τη συμπλοκοποίηση, οφείλεται στη ένταξη του υποκαταστάτη μέσω των αζώτων N1 και N1' στο ρουθίνιο.



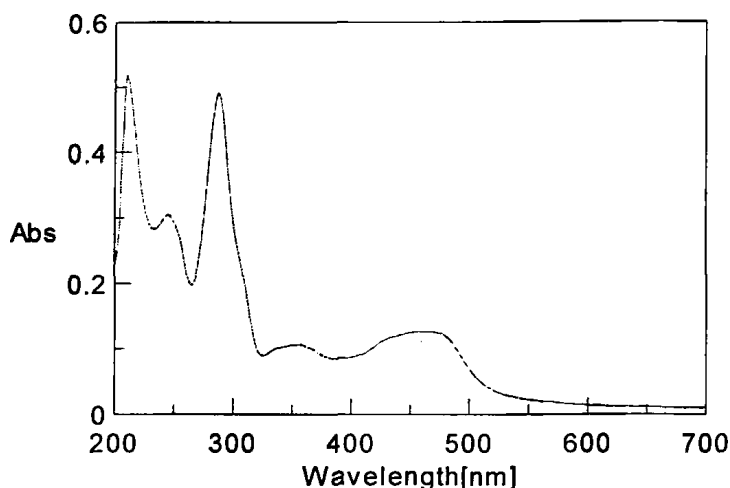
Σχήμα 3.1.5. Φάσμα υπερύθρου του Λ1.

Οι ταινίες δόνησης τάσης των αρωματικών πυριδινικών δακτυλίων βρίσκονται στην περιοχή $1401-1467\text{ cm}^{-1}$ για το $\Lambda 1$ και $1400-1456\text{ cm}^{-1}$ για το $\Delta 1$ και των C-N στα 1313 cm^{-1} για το $\Lambda 1$ και στα 1310 cm^{-1} για το $\Delta 1$. Οι δονήσεις κάμψης των αρωματικών C-H εντός του επιπέδου του δακτυλίου παρατηρούνται στα $1130-1243\text{ cm}^{-1}$ για το $\Lambda 1$ και στα $1123-1239\text{ cm}^{-1}$ για το $\Delta 1$, ενώ οι δονήσεις κάμψης C-H εκτός επιπέδου του δακτυλίου παρατηρούνται στα 837 cm^{-1} για το $\Lambda 1$ και στα 830 cm^{-1} για το $\Delta 1$. Η ταινία δόνησης στα 758 cm^{-1} αποδίδεται στην εντός επιπέδου δόνηση παραμόρφωση του δακτυλίου ($\delta(\rho\gamma)$) και στα 558 cm^{-1} στην εκτός επιπέδου παραμόρφωση ($\gamma(\rho\gamma)$). Οι δονήσεις τάσης του δεσμού C-H των αλειφατικών πρωτονίων της λυσίνης παρατηρούνται στα $2848-2924\text{ cm}^{-1}$ για το $\Lambda 1$ και στα $2859-2937\text{ cm}^{-1}$ για το $\Delta 1$ ενώ η συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού C-O παρατηρούνται στα 1277 cm^{-1} για το $\Lambda 1$ και στα 1270 cm^{-1} για το $\Delta 1$. Ακόμη οι δονήσεις τάσης του δεσμού N-H παρατηρούνται στα 3120 cm^{-1} για το $\Lambda 1$ και στα 3124 cm^{-1} για το $\Delta 1$.

3.1.3.1.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους UV-Vis χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων $\Lambda 1$ και $\Delta 1$ σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα tris-HCl (10^{-3} M) με $\text{pH} = 7.0$. Στα φάσματα των δύο διαστερομερών δεν υπάρχουν πρακτικά ουσιαστικές διαφορές στα μέγιστα των απορροφήσεων και έτσι ενδεικτικά παρουσιάζεται το φάσμα UV-Vis για το $\Lambda 1$ ισομερές (σχήμα 3.1.6.). Έτσι η ταινία στα 287 nm ($\epsilon = 3.9 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το $\Lambda 1$ και στα 288 nm ($\epsilon = 4.2 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το $\Delta 1$, αντιστοιχούν στις μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ των αρωματικών δακτυλίων των διπυριδυλίων, όπως εξάλλου έχει παρατηρηθεί στο σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ [139] αλλά και σε άλλα πολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου [21]. Οι ταινίες στα 350 nm ($\epsilon = 6 \times 10^3\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) και στα 467 nm ($\epsilon = 1.1 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το $\Lambda 1$, όπως και τα ίδια μέγιστα και για το $\Delta 1$ αποδίδονται σε ταινίες μεταφοράς φορτίου από τα $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*$ των αρωματικών δακτυλίων του διπυριδυλίου. Καθώς η MLCT $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$ στο σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ [139], βρίσκεται στα 450 nm , θα μπορούσε η μεν πρώτη, στα 350 nm , να αποδοθεί στο υποκατεστημένο διπυριδύλιο ως $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{Y1})$ και η δεύτερη, 467 nm , ως $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$.

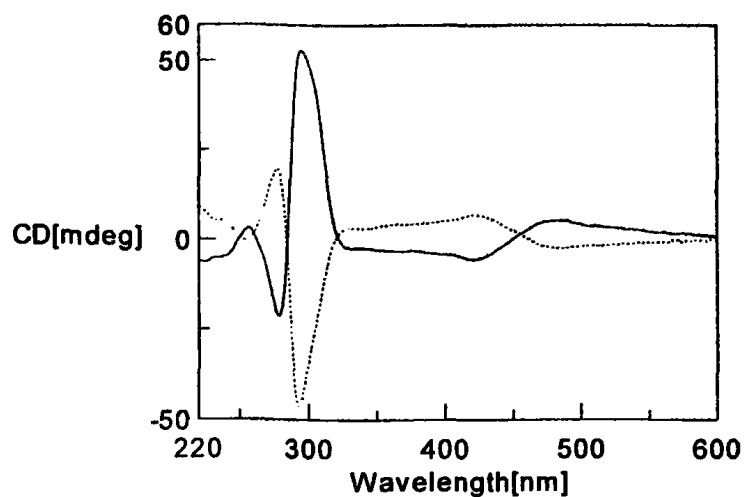




Σχήμα 3.1.6. Φάσμα UV-Vis του Δ1 στην περιοχή 200-700 nm.

3.1.3.1.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

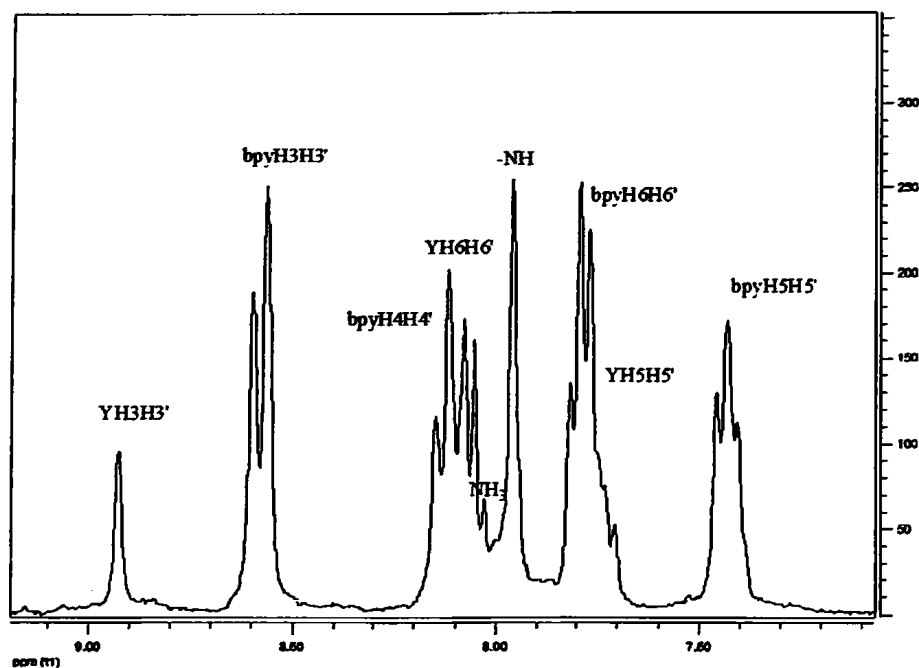
Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού των διαστερομερών συμπλόκων Δ1 και Δ1 (σχήμα 3.1.7) δεν έχουν ακριβώς τη σχέση ειδώλου - αντικειμένου όπως είναι αναμενόμενο λόγω της παρουσίας ενός επιπλέον χειρικού κέντρου από κάθε αμινοξύ. Η απόλυτη διαμόρφωση των συμπλόκων και η απόδοση των ταινιών απορρόφησης έγινε μετά από σύγκριση των φασμάτων CD με φάσματα παρόμοιων συμπλόκων γνωστής διαμόρφωσης της βιβλιογραφίας [102, 140, 141]. Έτσι στην περιοχή του υπεριώδους, οι $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεις των αρωματικών δακτυλίων του διπυριδυλίου δίνουν τα παρακάτω μέγιστα και ελάχιστα Cotton: $\lambda(\epsilon)$ 278 nm ($-21.22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 294.5 nm ($+52.91 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το Δ1 ισομερές και 276.5 nm ($+19.87 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 292.5 nm ($-46.44 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το Δ1 ισομερές. Ενώ στην περιοχή του ορατού, εμφανίζονται τα παρακάτω ελάχιστα και μέγιστα Cotton: 419.5 nm ($-5.60 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) και 481.5 nm ($+5.30 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το Δ1 ισομερές και 420.5 nm ($+6.96 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 480.5 nm ($-2.30 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το Δ1 ισομερές.



Σχήμα 3.1.7. Φάσματα CD των Δ1 και Δ1 (διακεκομμένη γραμμή) στην περιοχή 220 - 600 nm.

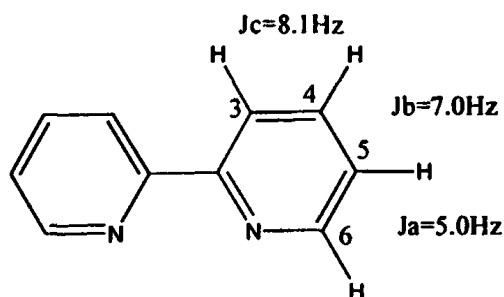
3.1.3.1.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Η απόδοση των σημάτων ^1H NMR των διαστερομερών Δ1 και Δ1 βασίστηκε σε πειράματα δύο διαστάσεων (COSY και TOCSY). Τα φάσματα ^1H NMR των συμπλόκων λήφθηκαν σε $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ 1:9 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε $\text{pH} = 7.0$. Στο σχήμα 3.1.8 δίνεται η αρωματική περιοχή του φάσματος μιας διάστασης του συμπλόκου Δ1, στο οποίο φαίνονται τα πρωτόνια των δύο διπυριδιλίων και του υποκαταστάτη Y1.



Σχήμα 3.1.8. Φάσμα ID ^1H NMR του συμπλόκου Λ1 για την αρωματική περιοχή.

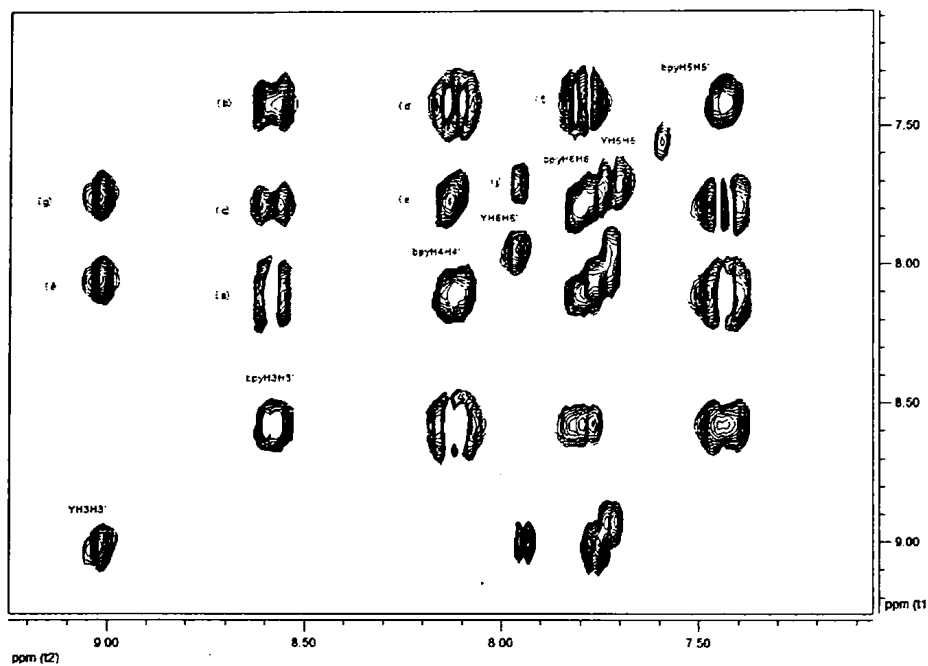
Τα πρωτόνια των δύο διπυριδυλίων (bry) καθώς και των δύο πυριδινικών δακτυλίων τους παρουσιάζουν μόνο μία ομάδα σημάτων συντονισμού, γεγονός που σημαίνει ότι είναι χημικά ισοδύναμα μεταξύ τους. Έτσι εμφανίζονται τέσσερα μόνο σήματα που αποδίδονται στα πρωτόνια $\text{H3H3}'$, $\text{H4H4}'$, $\text{H5H5}'$, $\text{H6H6}'$ που αντιστοιχούν και στα δύο διπυριδύλια (bry) του συμπλόκου. Οι κορυφές εμφανίζουν την πολλαπλότητα η οποία προβλέπεται λόγω της σύζευξης γειτονικών πρωτονίων. Έτσι η κορυφή των πρωτονίων $\text{H3H3}'$ εμφανίζεται με $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, η κορυφή των πρωτονίων $\text{H4H4}'$ με $^3J = 7.0 \text{ Hz}$, η κορυφή των πρωτονίων $\text{H5H5}'$ με $^3J = 7.0 \text{ Hz}$ και η κορυφή των πρωτονίων $\text{H6H6}'$ με $^3J = 6.2 \text{ Hz}$. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την βιβλιογραφία [142] η οποία αναφέρει ότι σε ένα πυριδινικό δακτύλιο οι σταθερές σύζευξης είναι $J_a = 5.0 \text{ Hz}$, $J_b = 7.0 \text{ Hz}$ και $J_c = 8.1 \text{ Hz}$ (σχήμα 3.1.9). Οι μικρές διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στην συμπλοκοποίηση του διπυριδυλίου μέσω N1 και $\text{N1}'$ με το Ru(II) .



Σχήμα 3.1.9. Σταθερά σύζευξης για το μόριο της διπυριδίνης.

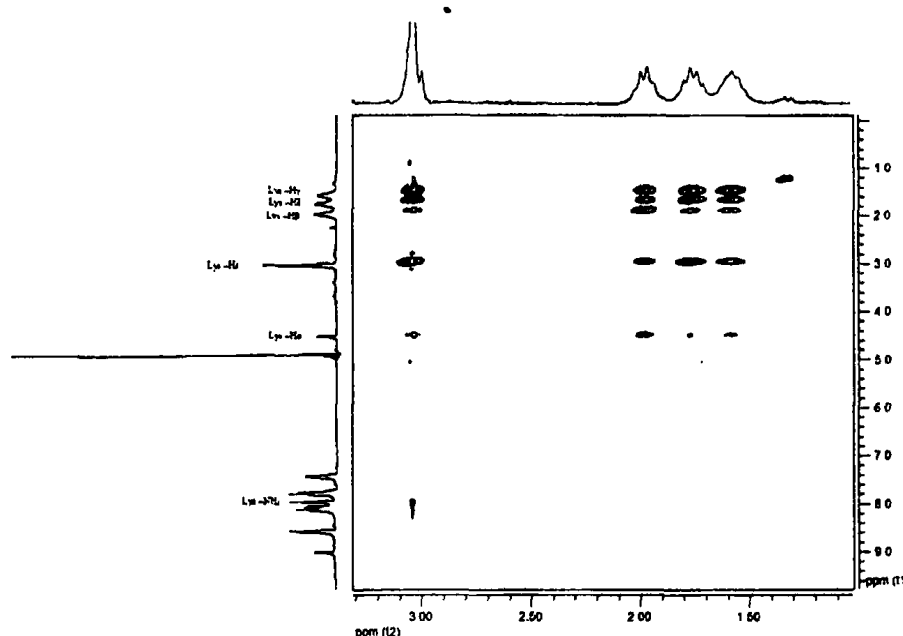
Τα πρωτόνια του υποκαταστάτη Y1 εμφανίζονται ως μία ομάδα σημάτων συντονισμού για τους δύο πυριδινικούς δακτυλίους εξαιτίας της συμμετρίας που παρουσιάζεται στο μόριο. Παρατηρούνται σήματα συντονισμού για τα πρωτόνια H3H3' σε $\delta = 8.93$ ppm ($\Delta\delta = 0.00$ ppm), για τα πρωτόνια H5H5' σε $\delta = 7.72$ ppm ($\Delta\delta = 0.30$ ppm) και με $^3J = 6.5$ Hz για τα πρωτόνια H6H6' σε $\delta = 7.96$ ppm ($\Delta\delta = 0.30$ ppm) με $^3J = 6.7$ Hz. Παρατηρούνται διαφορές στην πολλαπλότητα των κορυφών λόγω της σύζευξης με τα γειτονικά πρωτόνια, σε σχέση με τον υποκαταστάτη 4,4'-(CO₂Me)₂bpy, όπου τα H5H5' εμφανίζουν $^3J = 5$ Hz και τα H6H6' $^3J = 5$ Hz, που οφείλονται στην συμπλοκοποίηση με το ρουθίνιο [123]. Οι κορυφές των πρωτονίων H5H5' και H6H6' του Y1 παρατηρούμε ότι μετατοπίζονται σε υψηλότερα πεδία ($\Delta\delta > 0$), σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη. Τα πρωτόνια αυτά μετατοπίζονται λόγω του ότι βρίσκονται κοντά στα άτομα N1 και N1' που εντάσσονται στο Ru(II) ενώ τα πρωτόνια H3H3', βρίσκονται σχετικά μακρύτερα και δεν επηρεάζονται σημαντικά από την ένταξη.

Στο σχήμα 3.1.10 παρατίθεται τμήμα της αρωματικής περιοχής του φάσματος TOCSY του συμπλόκου Λ1 στο οποίο φαίνονται τα συστήματα *spin* των αρωματικών πρωτονίων του συμπλόκου. Έτσι φαίνονται οι κορυφές διασταύρωσης των πρωτονίων H3H3' του διπυριδιλίου με τα πρωτόνια H4H4' (a), με τα πρωτόνια H5H5' (b) και με τα πρωτόνια H6H6' (c) καθώς και των πρωτονίων H4H4' με τα H5H5' (d), των πρωτονίων H4H4' με τα H6H6' (e), των πρωτονίων H5H5' με τα H6H6' (f). Ακόμη παρατηρούνται οι κορυφές διασταύρωσης των πρωτονίων του Y1H3H3' με τα πρωτόνια Y1H5H5' (g) και με τα πρωτόνια Y1H6H6' (i) καθώς επίσης και των πρωτονίων Y1H5H5' με τα πρωτόνια Y1H6H6' (j).



Σχήμα 3.1.10. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Λ1 για την αρωματική περιοχή.

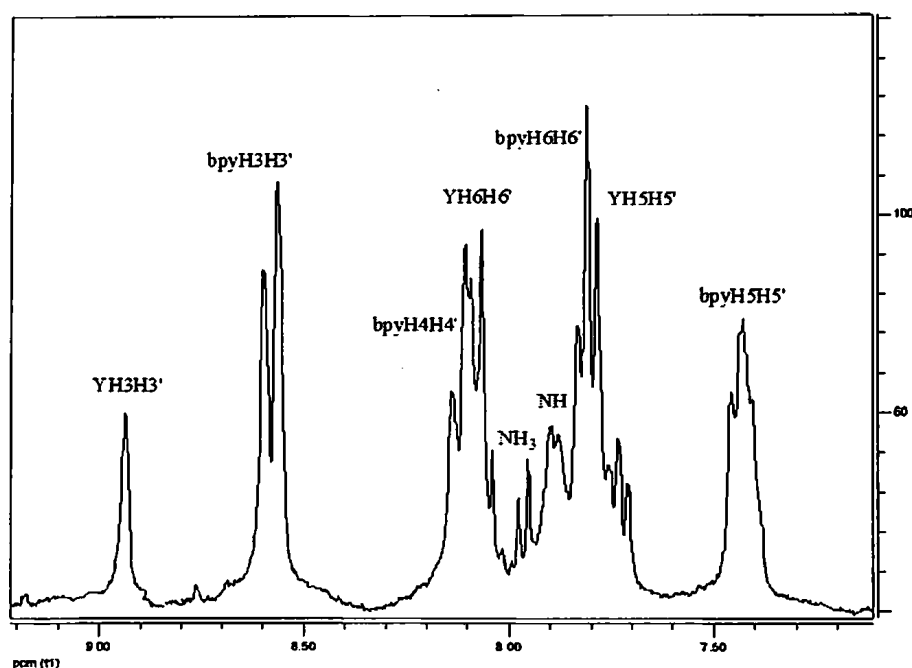
Τα πρωτόνια της αλειφατικής αλυσίδας της λυσίνης παρουσιάζουν μια ομάδα σημάτων συντονισμού και για τα δυο συζευγμένα αμινοξέα που δείχνει ότι είναι ισοδύναμες. Οι χημικές μετατοπίσεις βρίσκονται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με την ελεύθερη λυσίνη. Έτσι το πρωτόνιο Ηα βρίσκεται σε $\delta = 4.49$ ppm ($\Delta\delta = 0.26$ ppm), το πρωτόνιο Ηβ σε $\delta = 1.98$ ppm ($\Delta\delta = 0.14$ ppm), το πρωτόνιο Ηγ σε $\delta = 1.58$ ppm ($\Delta\delta = 0.28$ ppm), το πρωτόνιο Ηδ σε $\delta = 1.75$ ppm ($\Delta\delta = 0.21$ ppm) και το πρωτόνιο Ηε σε $\delta = 2.98$ ppm ($\Delta\delta = 0.07$ ppm).



Σχήμα 3.1.11. Περιοχή φάσματος TOCSY όπου παρουσιάζονται οι συζεύξεις των αλειφατικών πρωτονίων της λυσίνης για το σύμπλοκο Δ1.

Οι διαφορές αυτές στις χημικές μετατοπίσεις οφείλονται στη σύζευξη του αμινοξέως με το διπυριδύλιο και πιθανότατα την προάσπιση των πρωτονίων αυτών από το ηλεκτρονιακό νέφος των πυριδινικών δακτυλίων. Στο σχήμα 3.1.11, στο φάσμα TOCSY, παρουσιάζονται τα συστήματα *spin* των πρωτονίων της λυσίνης. Έτσι εμφανίζονται οι κορυφές διασταύρωσης των πρωτονίων Ηα με τα πρωτόνια Ηβ (α), με τα πρωτόνια Ηγ (b) και με τα πρωτόνια Ηδ (c). Όμοια και των πρωτονίων Ηβ, Ηγ, Ηδ και Ηε μεταξύ τους. Ακόμη παρατηρείται μια διευρυμένη κορυφή διασταύρωσης ανάμεσα στο Ηε και στο NH₃ (d) και μια κορυφή ανάμεσα στο Ηα και στο NH του πεπτιδικού δεσμού. Η ταινία συντονισμού για τα αμιδικά -CONH₂ δεν φαίνεται στο φάσμα πιθανόν λόγω γρήγορης ανταλλαγής με τα πρωτόνια του διαλύτη.

Στο σχήμα 3.1.12 παρουσιάζεται το φάσμα 1D του διαστερομερούς συμπλόκου Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ (Δ1). Γενικά είναι γνωστό ότι τα χειρόμορφα μόρια παρουσιάζουν τις ίδιες χημικές μετατοπίσεις των πυρήνων των πρωτονίων τους, αν και τα διαστερομερή που εξετάζουμε δεν είναι χειρόμορφα εντούτοις τα πρωτόνια του Δ1 συμπλόκου αναμένονται στην ίδια περιοχή με τα αντίστοιχα του Δ1.



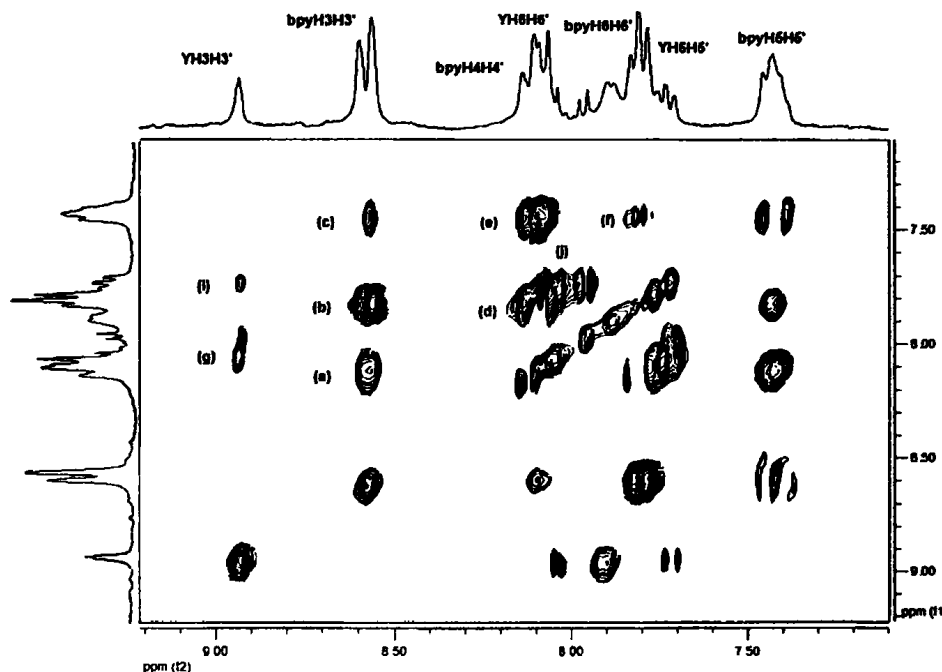
Σχήμα 3.1.12. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου Δ1 για την αρωματική περιοχή.

Η ταινία συντονισμού των πρωτονίων $\text{H3H3}'$ του διπυριδιλίου εμφανίζεται στα 8.57 ppm με $^3J = 9.0$ Hz, των πρωτονίων $\text{H4H4}'$ στα 8.09 ppm με $^3J = 7.7$ Hz, των πρωτονίων $\text{H5H5}'$ στα 7.44 ppm ως πολλαπλή με $^3J = 7.7$ Hz και η ταινία συντονισμού των πρωτονίων $\text{H6H6}'$ στα 7.82 ppm με $^3J = 5.8$ Hz. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά των συμπλόκων του Δ1 που αναφέρθηκαν πιο πάνω, με μερικές αποκλίσεις από τις αντίστοιχες χημικές μετατοπίσεις.

Στον υποκαταστάτη Y1 παρατηρούνται σήματα συντονισμού, για τα πρωτόνια $\text{H3H3}'$ σε $\delta = 8.93$ ppm ($\Delta\delta = 0.00$ ppm), για τα πρωτόνια $\text{H5H5}'$ σε $\delta = 7.74$ ppm ($\Delta\delta = 0.28$ ppm) με $^3J = 6.8$ Hz και για τα πρωτόνια $\text{H6H6}'$ σε $\delta = 8.04$ ppm ($\Delta\delta = 0.22$ ppm) με $^3J = 6.8$ Hz. Οι ταινίες συντονισμού των πρωτονίων $\text{H5H5}'$ και $\text{H6H6}'$ του υποκαταστάτη Y1 μετατοπίζονται σε υψηλότερα πεδία, σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη, όπως εξάλλου παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση του Δ1 συμπλόκου λόγω της εντάξης με το Ru(II).

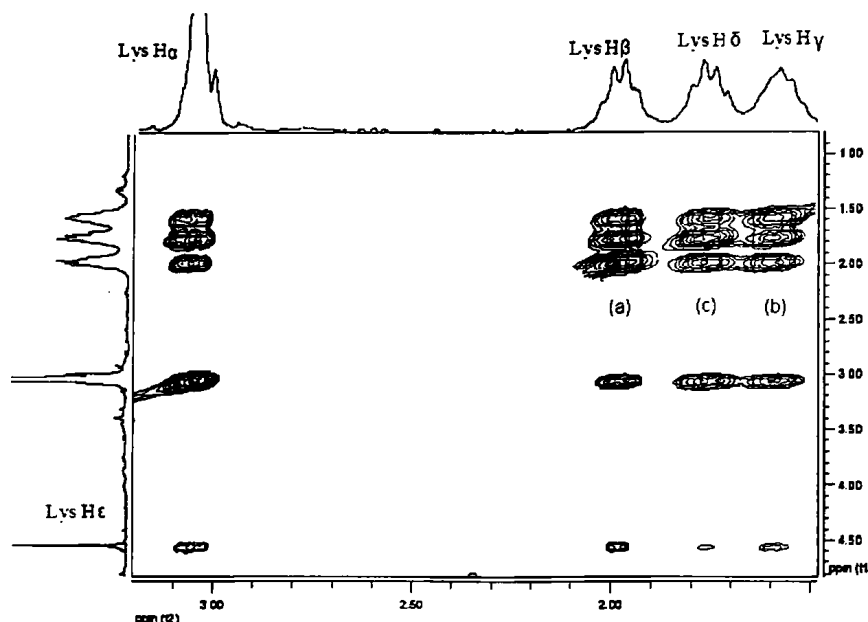
Τα συστήματα *spin* των αρωματικών πρωτονίων του συμπλόκου Δ1 φαίνονται στο σχήμα 3.1.13. Στην περιοχή (a) παρουσιάζονται οι κορυφές διασταύρωσης των αρωματικών πρωτονίων $\text{H3H3}'$ με τα πρωτόνια $\text{H4H4}'$, στην περιοχή (b) πρωτονίων $\text{H3H3}'$ με τα πρωτόνια $\text{H5H5}'$, στην περιοχή (c) των πρωτονίων $\text{H3H3}'$ τα πρωτόνια $\text{H6H6}'$, στην περιοχή (d) των πρωτονίων $\text{H4H4}'$ με τα $\text{H5H5}'$, στην (e) των πρωτονίων $\text{H4H4}'$ με τα $\text{H6H6}'$ και

στην (f) των πρωτονίων H5H5' με τα H6H6'. Ακόμη παρατηρούνται στην περιοχή (g) οι κορυφές διασταύρωσης των αρωματικών πρωτονίων του Y1H3H3' με τα πρωτόνια Y1H5H5' και στην περιοχή (j) των πρωτονίων του Y1H3H3' με τα πρωτόνια Y1H6H6' και στην (i) των πρωτονίων Y1H5H5' με τα πρωτόνια Y1H6H6'.



Σχήμα 3.1.13. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Δ1 για την αρωματική περιοχή.

Στο σχήμα 3.1.14 φαίνεται το φάσμα TOCSY όπου παρουσιάζονται τα συστήματα *spin* των πρωτονίων της λυσίνης. Οι χημικές μετατοπίσεις βρίσκονται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με την ελεύθερη λυσίνη και είναι πρακτικά οι ίδιες με αυτές που παρατηρήκαν στο σύμπλοκο Λ1. Το πρωτόνιο Hα βρίσκεται σε $\delta = 4.55$ ppm ($\Delta\delta = 0.22$ ppm), το πρωτόνιο Hβ σε $\delta = 1.98$ ppm ($\Delta\delta = 0.14$ ppm), το πρωτόνιο Hγ σε $\delta = 1.58$ ppm ($\Delta\delta = 0.28$ ppm), το πρωτόνιο Hδ σε $\delta = 1.75$ ppm ($\Delta\delta = 0.21$ ppm) και το πρωτόνιο Hε σε $\delta = 3.00$ ppm ($\Delta\delta = 0.09$ ppm). Η περιοχή (a) αναφέρεται στα συστήματα *spin* του πρωτονίου Hβ με τα πρωτόνια Hα, Hγ και Hδ, η περιοχή (b) στα συστήματα *spin* του πρωτονίου Hδ και η περιοχή (c) του πρωτονίου Hγ.



Σχήμα 3.1.14. Περιοχή φάσματος TOCSY όπου παρουσιάζονται οι συζεύξεις των αλειφατικών πρωτονίων της λυσίνης στο σύμπλοκο Δ1.

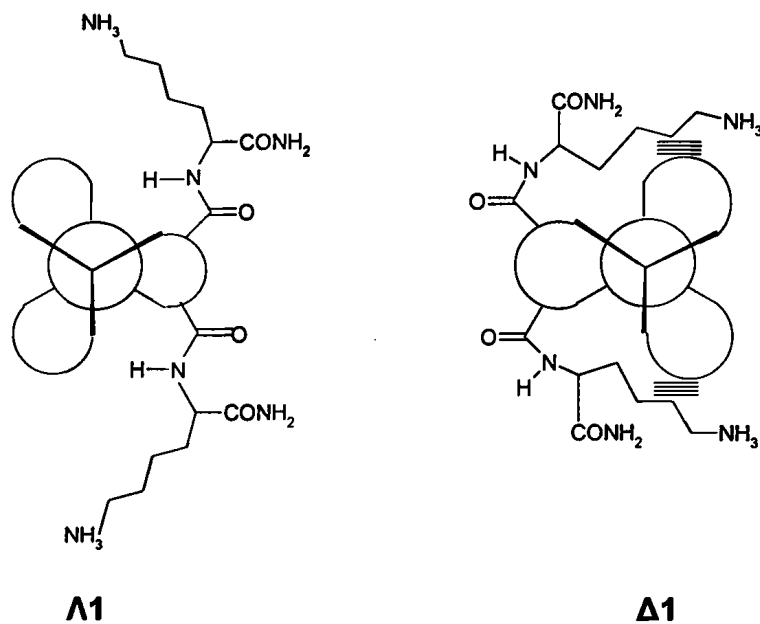
Οι χημικές μετατοπίσεις των δύο διαστερομερών συμπλόκων, Λ-, Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ φαίνονται στον πίνακα 3.1.2. Τα σύμπλοκα αυτά έχοντας τρία οπτικά κέντρα (ένα από το συμπλόκου και ένα από κάθε αμινοξύ) εμφανίζουν παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις διαφέροντας κατά μέσο όρο ~0.04 ppm για τους αρωματικούς δακτυλίους ενώ οι διαφορές είναι εμφανώς μεγαλύτερες για τα πρωτόνια της λυσίνης. Ενδεχομένως η απόλυτη διαμόρφωση του συμπλόκου να προσανατολίζει με διαφορετικό τρόπο τα δύο αμινοξέα στην περίπτωση του Λ1. Ανάλογο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση του συμπλόκου Λ-, Δ-[Ru(bpy)₂(m-GHK-bpy)]Cl₂ όπου στο Λ ισομερές βρέθηκε αλληλεπίδραση του μιδαζολίου της ιστιδίνης με τους πυριδινικούς υποκαταστάτες του bpy δημιουργώντας μια κλειστή διαμόρφωση ενώ στο αντίστοιχο Δ ισομερές το πεπτίδιο βρισκόταν μακριά από τα διπυριδύλια [111].

Πίνακας 3.1.2. Χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR των διαστερομερών συμπλόκων Δ1 και Δ1 στους 298 K σε 90% H₂O, 10% D₂O, pH = 7.0 (0,1 M Na₂HPO₄ / NaH₂(PO₄)₂).

Πρωτόνια	Δ1	Δ1
β _γ H3H3'	8.58	8.57
β _γ H4H4'	8.13	8.09
β _γ H5H5'	7.43	7.44
β _γ H6H6'	7.79	7.82
4,4'-dcb _γ H3H3'	8.93	8.93
4,4'-dcb _γ H5H5'	7.72	7.74
4,4'-dcb _γ H6H6'	7.96	8.04
H _α -Lys	4.49	4.43
H _β -Lys	1.98	1.87
H _γ -Lys	1.58	1.47
H _δ -Lys	1.75	1.63
H _ε -Lys	2.98	2.93

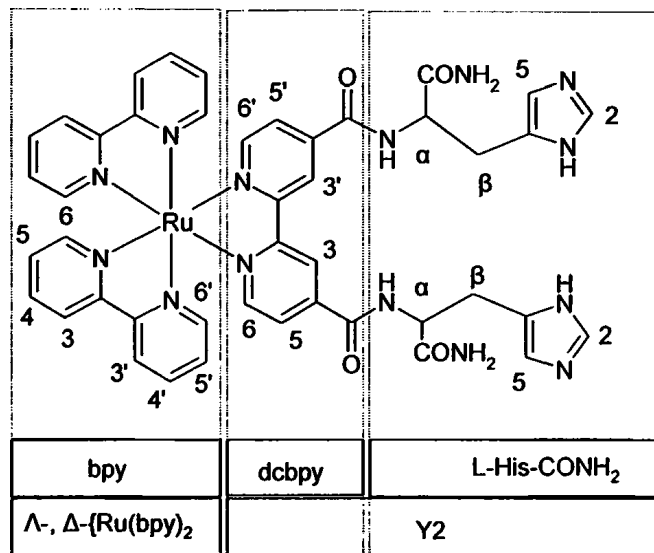
Στην περίπτωση των διαστερομερών συμπλόκων Δ1 και Δ1 η διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της λυσίνης εντοπίζεται περισσότερο στο κέντρο της αλειφατικής αλυσίδας H_β - H_γ - H_δ ώστε στο σύμπλοκο Δ1 αυτά να προστατεύονται περισσότερο από το ηλεκτρονιακό νέφος των πυριδινικών δακτυλίων. Σχηματικά μια υδρόφοβη τέτοια αλληλεπίδραση θα μπορούσε να αποδοθεί όπως στο πιο κάτω σχήμα (σχήμα 3.1.15).





Σχήμα 3.1.15. Προτεινόμενες διαμορφώσεις για τα διαστερομερή σύμπλοκα Λ1 και Δ1.

3.1.3.2. Χαρακτηρισμός των διαστερομερών συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂ (Λ2 και Δ2)

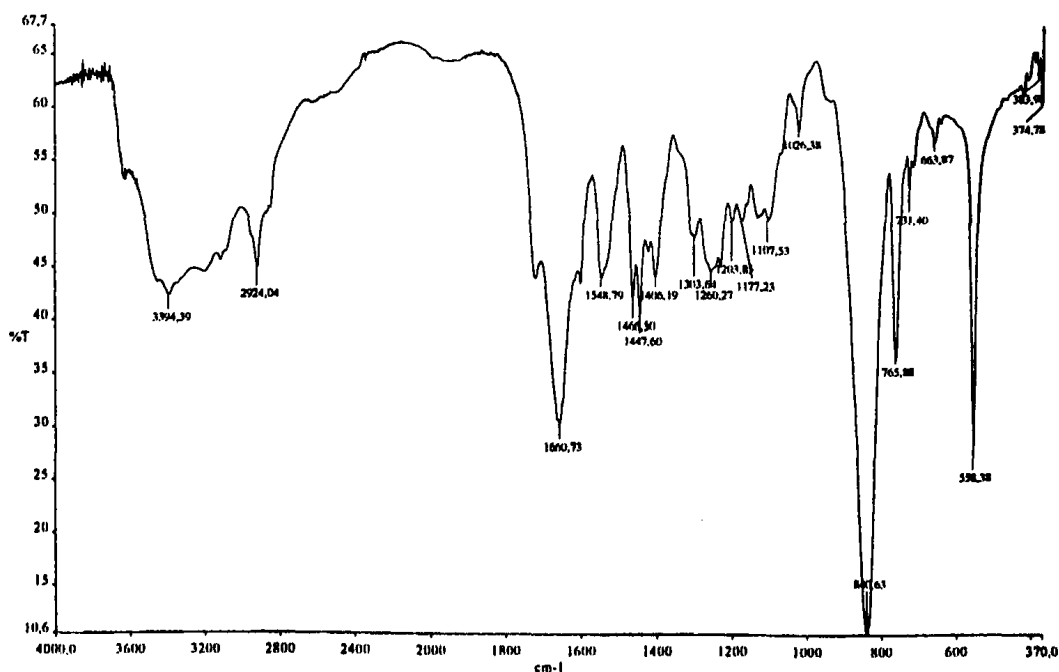


Σχήμα 3.1.16. Σχηματική παράσταση της δομής των συμπλόκων Δ- και Λ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂.

Τα σύμπλοκα Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂ χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) και φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD).

3.1.3.2.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου

Όπως και στην περίπτωση των διαστερομερών συμπλόκων Λ1 και Δ1 έτσι και τα σύμπλοκα αυτά, παρέχουν πρακτικά τα ίδια φάσματα υπερύθρου οπότε η ανάλυσή τους δεν γίνεται ξεχωριστά. Στο σχήμα 3.1.17 δίνεται ενδεικτικά το φάσμα για το Λ2 ισομερές, στο οποίο φαίνεται η παρουσία του υποκαταστάτη Υ2 στο σύμπλοκο καθώς παρατηρείται η ταινία δόνησης του δεσμού C=O στα 1660 cm⁻¹, στο σύμπλοκο Δ2 η ταινία αυτή εμφανίζεται ελαφρώς μετατοπισμένη στα 1665 cm⁻¹.



Σχήμα 3.1.17. Φάσμα υπερύθρου του Λ2.

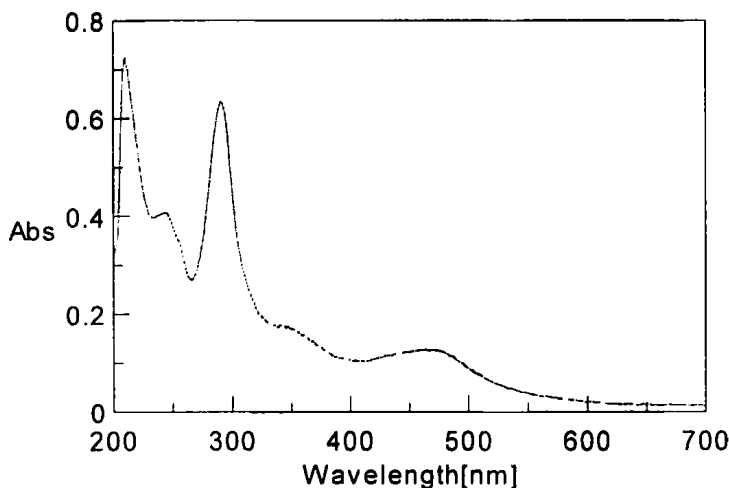
Οι ταινίες δόνησης τάσης των αρωματικών πυριδινικών δακτυλίων βρίσκονται στην περιοχή 1406 - 1466 cm⁻¹ για το Λ2 και 1411 - 1469 cm⁻¹ για το Δ2 και των C-N στα 1303



cm^{-1} για το $\Lambda 2$ και στα 1305 cm^{-1} για το $\Delta 2$. Οι δονήσεις κάμψης των αρωματικών C-H εντός του επιπέδου του δακτυλίου παρατηρούνται στα $1107 - 1203 \text{ cm}^{-1}$ για το $\Lambda 2$ και στα $1113 - 1222 \text{ cm}^{-1}$ για το $\Delta 2$, ενώ οι δονήσεις κάμψης C-H εκτός επιπέδου του δακτυλίου παρατηρούνται στα 840 cm^{-1} για το $\Lambda 2$ και στα 844 cm^{-1} για το $\Delta 2$. Η ταινία στα 765 cm^{-1} αποδίδεται στην εντός επιπέδου δόνηση παραμόρφωσης του δακτυλίου ($\delta(\rho\gamma)$) και στα 558 cm^{-1} στην εκτός επιπέδου παραμόρφωση ($\gamma(\rho\gamma)$). Οι δονήσεις τάσης του δεσμού C-H των αλειφατικών πρωτονίων της ιστιδίνης παρατηρούνται στα 2924 cm^{-1} για το $\Lambda 2$ και στα 2927 cm^{-1} για το $\Delta 2$ ενώ η συμμετρική δόνηση τάσης του δεσμού C-O παρατηρείται στα 1260 cm^{-1} για το $\Lambda 2$ και στα 1263 cm^{-1} για το $\Delta 2$. Ακόμη οι δονήσεις τάσης του δεσμού N-H παρατηρούνται στα 3394 cm^{-1} για το $\Lambda 2$ και στα 3396 cm^{-1} για το $\Delta 2$.

3.1.3.2.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Τα φάσματα ορατού-υπεριώδους UV-Vis των συμπλόκων με συζευγμένη ιστιδίνη λήφθηκαν σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα tris-HCl (10^{-3}M) με pH= 7.0. Στα φάσματα των δύο διαστερομερών δεν υπάρχουν πρακτικά ουσιαστικές διαφορές στα μέγιστα των απορροφήσεων και έτσι ενδεικτικά παρουσιάζεται το φάσμα UV-Vis για το $\Delta 2$ ισομερές (σχήμα 3.1.18).



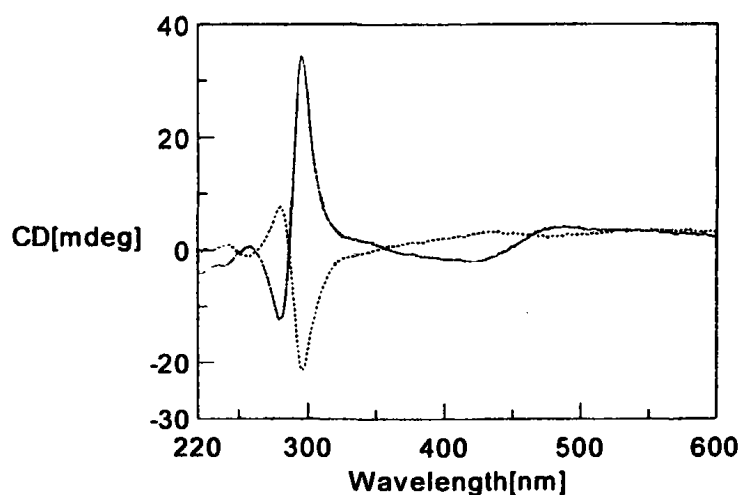
Σχήμα 3.1.18. Φάσμα UV-Vis του $\Delta 2$ στην περιοχή 200-700 nm.

Η ταινία στα 291 nm ($\epsilon = 4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το $\Delta 2$ και για το $\Lambda 2$, αντιστοιχούν στις

μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ των αρωματικών δακτυλίων των διπυριδυλίων, όπως εξάλλου έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση των διαστερομερών συμπλόκων $\Lambda 1$ και $\Delta 1$, καθώς και σε άλλα πολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου [7, 21]. Οι ταινίες στα 358 nm ($\epsilon = 6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) και στα 463 nm ($\epsilon = 1.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) για το $\Delta 2$, όπως και στα ίδια μέγιστα και για το $\Lambda 2$ αποδίδονται σε ταινίες μεταφοράς φορτίου από τα $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*$ των αρωματικών δακτυλίων του διπυριδυλίου. Όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση των διαστερομερών $\Lambda 1$ και $\Delta 1$ η πρώτη ταινία MLCT στα 358 nm ($\Delta 2$) και 355 nm ($\Lambda 2$) μπορεί να αποδοθεί στο υποκατεστημένο διπυριδύλιο $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{Y}2)$ και η δεύτερη (463 nm για $\Delta 2$ και $\Lambda 2$) ως $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bry})$.

3.1.3.2.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

Στο σχήμα 3.1.19 παρουσιάζονται τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού των συμπλόκων $\Lambda 2$ και $\Delta 2$ σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα tris -HCl (10^{-3} M). Όπως και στην περίπτωση των συμπλόκων $\Lambda 1$ και $\Delta 1$, έτσι και εδώ η παρουσία περισσότερων του ενός χειρικών κέντρων στο σύμπλοκο έχει ως αποτέλεσμα τα φάσματα τους να μην έχουν ακριβώς τη σχέση ειδώλου-αντικειμένου.



Σχήμα 3.1.19. Φάσματα CD των $\Lambda 2$ και $\Delta 2$ (διακεκομμένη γραμμή) στην περιοχή 220-600 nm.

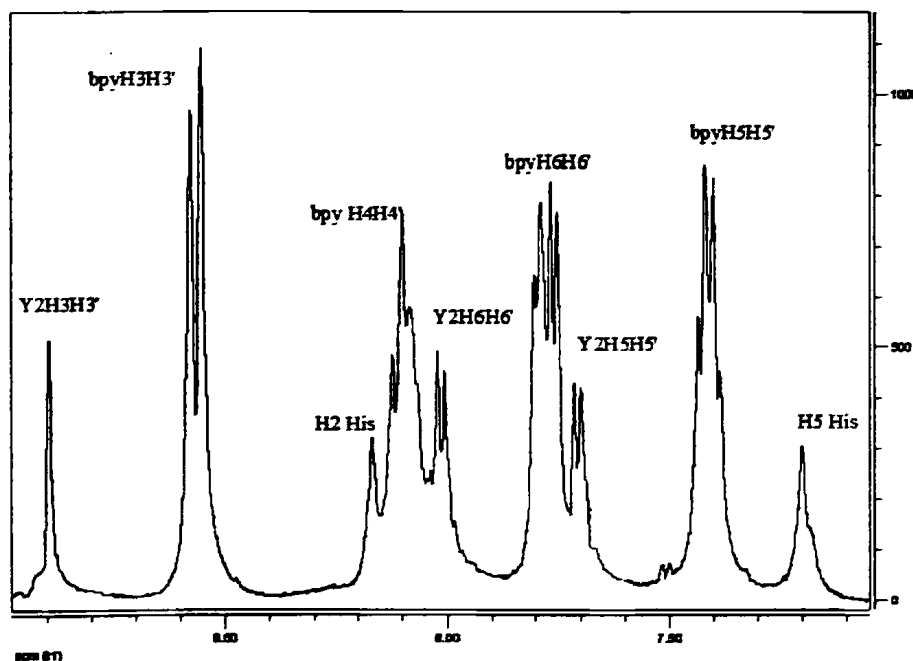
Έτσι, στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους, μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ των αρωματικών δακτυλίων του διπυριδυλίου δίνουν τα παρακάτω μέγιστα και ελάχιστα Cotton: $\lambda(\epsilon)$ 279.5 nm



($-12.42 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 295 nm ($+34.21 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το $\Lambda 2$ ισομερές και 279.5 nm ($+7.63 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 295.5 nm ($-21.38 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το $\Delta 2$ ισομερές. Ενώ στην περιοχή του ορατού, εμφανίζονται τα παρακάτω ελάχιστα και μέγιστα Cotton: 420.5 nm ($-2.39 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) και 481.5 nm ($+4.09 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το $\Lambda 2$ ισομερές και 422.5 nm ($+2.97 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 481.5 nm ($-2.50 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το $\Delta 2$ ισομερές. Η απόδοση των παραπάνω μεγίστων και ελαχίστων καθώς και η απόλυτη διαμόρφωση των διαστερομερών συμπλόκων $\Lambda 2$ και $\Delta 2$ έγινε κατόπιν σύγκρισης με γνωστά ανάλογα σύμπλοκα της βιβλιογραφίας [102, 140, 141].

3.1.3.2.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Τα φάσματα ^1H NMR των συμπλόκων λήφθηκαν σε $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ 1:9 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, $\text{pH} = 7.0$. Στο σχήμα 3.20 δίνεται η αρωματική περιοχή του φάσματος μιας διάστασης του συμπλόκου $\Delta 2$.

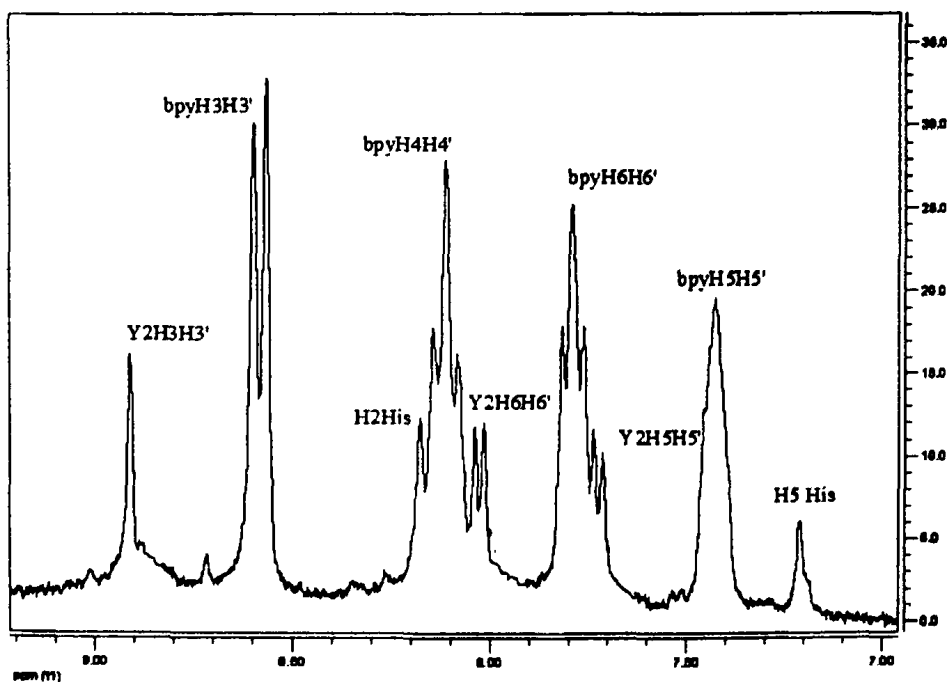


Σχήμα 3.1.20. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου $\Delta 2$ για την αρωματική περιοχή.

Τα πρωτόνια H3H3' των δύο διπυριδυλίων (bpy) εμφανίζονται στα 8.56 ppm με $^3J = 8.1$ Hz, τα πρωτόνια H4H4' στα 8.09 ppm με $^3J = 7.3$ Hz, τα πρωτόνια H5H5' στα 7.42 ppm με $^3J = 7.3$ Hz και τα πρωτόνια H6H6' στα 8.76 ppm με $^3J = 6.4$ Hz. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα των συμπλόκων Λ1 και Δ1 καθώς και με άλλα σύμπλοκα της βιβλιογραφίας [142].

Τα πρωτόνια H3H3' του υποκαταστάτη Y2 εμφανίζονται στα 8.87 ppm ($\Delta\delta = 0.00$ ppm), τα πρωτόνια H5H5' στα 7.72 ppm ($\Delta\delta = 0.30$ ppm) με $^3J = 6.8$ Hz και τα πρωτόνια H6H6' στα 7.96 ppm ($\Delta\delta = 0.30$ ppm) με $^3J = 6.6$ Hz. Το πρωτόνιο H2 του ημιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης εμφανίζεται στα 8.19 ppm ($\Delta\delta = 0.09$ ppm) και το πρωτόνιο H4 στα 7.21 ppm ($\Delta\delta = 0.03$ ppm). Τα αλειφατικά πρωτόνια εμφανίζονται στα 3.36 ppm ($\Delta\delta = 0.10$ ppm) και στα 4.89 ppm ($\Delta\delta = 0.30$ ppm) για το H β και το H α αντίστοιχα. Όπως και στην περίπτωση των συμπλόκων Λ1 και Δ1 παρατηρήθηκε αύξηση στη χημική μετατόπιση των πρωτονίων H5H5' και H6H6', που είναι γειτονικά στα N1 και N1' και των πρωτονίων H α και H β , λόγω της μείωσης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας των πυριδινικών δακτυλίων οφειλόμενες στην ένταξη στο ρουθίνιο.

Στο σχήμα 3.1.21 δίνεται η αρωματική περιοχή του φάσματος μιας διάστασης του συμπλόκου Λ2.



Σχήμα 3.1.21. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου Λ2 για την αρωματική περιοχή.



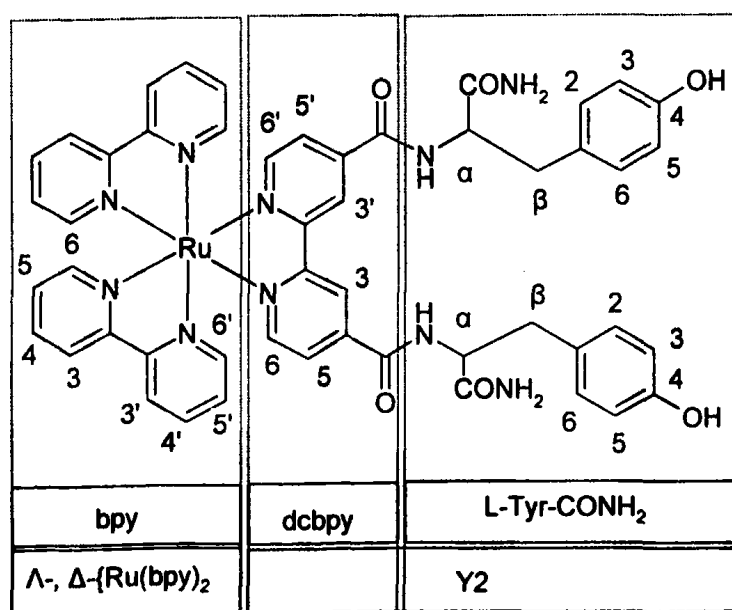
Τα πρωτόνια των υποκαταστατών του $\Lambda 2$ συμπλόκου αναμένονται στην ίδια περιοχή με τα αντίστοιχα του $\Delta 2$. Συγκεκριμένα, η ταινία συντονισμού των πρωτονίων $H3H3'$ του διπυριδιλίου εμφανίζεται στα 8.57 ppm με $^3J = 8.3$ Hz, των πρωτονίων $H4H4'$ στα 8.13 ppm με $^3J = 6.8$ Hz, των πρωτονίων $H5H5'$ στα 7.42 ppm με $^3J = 6.8$ Hz και η ταινία συντονισμού των πρωτονίων $H6H6'$ στα 7.76 ppm με $^3J = 7.7$ Hz. Για τον υποκαταστάτη $Y2$ παρατηρούνται σήματα συντονισμού για τα πρωτόνια $H3H3'$ σε $\delta = 8.91$ ppm ($\Delta\delta = 0.04$ ppm), για τα πρωτόνια $H5H5'$ σε $\delta = 7.72$ ppm ($\Delta\delta = 0.30$ ppm) με $^3J = 6.5$ Hz και για τα πρωτόνια $H6H6'$ σε $\delta = 8.05$ ppm ($\Delta\delta = 0.21$ ppm) με $^3J = 6.6$ Hz. Ακόμα, το πρωτόνιο $H2$ του αμινοξέως εμφανίζεται στα 8.13 ppm ($\Delta\delta = 0.03$ ppm) και το πρωτόνιο $H5$ στα 7.21 ppm ($\Delta\delta = 0.02$ ppm) ενώ τα αλειφατικά πρωτόνια εμφανίζονται στα 4.89 ppm ($\Delta\delta = 0.35$ ppm) και στα 3.35 ppm ($\Delta\delta = 0.09$ ppm) για το H_a και το H_b της ιστιδίνης αντίστοιχα. Ανάλογες χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των υποκαταστατών παρατηρήθηκαν και στα σύμπλοκα $[Ru(bpy)(m-bpy-GHK)]^{2+}$ [111] $[Ru(bpy)(m-bpy-7p)]^{2+}$ [112].

Οι χημικές μετατοπίσεις των δύο διαστερομερών συμπλόκων, Λ -, Δ - $[Ru(bpy)_2(4,4'-(COHisCONH_2)_2-bpy)]Cl_2$ φαίνονται στον πίνακα 3.1.3. Τα σύμπλοκα αυτά εμφανίζουν παρόμοιες χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση με το αντίστοιχο $[Ru(bpy)_2(4,4'-(COLysCONH_2)_2-bpy)]Cl_2$ κατά την οποία, πιθανόν η μεγαλύτερη και πιο εύκαμπτη αλειφατική αλυσίδα της λυσίνης να δημιουργεί κατάλληλους όρους για την αλληλεπίδραση της με τους αρωματικούς δακτυλίους στο ένα ισομερές, ενώ η σαφώς μικρότερου μήκους πλευρική αλυσίδα της ιστιδίνης να μην είναι αρκετή για τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις. Ακόμη η μικρή διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης από το ελεύθερο αμινοξύ δείχνει την απουσία π - π αλληλεπιδράσεων του εν λόγω αρωματικού δακτυλίου με τους δακτυλίους των διπυριδινών.

Πίνακας 3.1.3. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR των διαστερομερών συμπλόκων $\Lambda 2$ και $\Delta 2$ στους 298 K σε 90% H_2O , 10% D_2O , pH = 7.0 (0,1 M Na_2HPO_4 / $\text{NaH}_2(\text{PO}_4)_2$).

Πρωτόνια	$\Lambda 2$	$\Delta 2$
bpy H3H3'	8.57	8.56
bpy H4H4'	8.13	8.09
bpy H5H5'	7.42	7.42
bpy H6H6'	7.76	7.76
4,4'-dcbpy H3H3'	8.91	8.87
4,4'-dcbpy H5H5'	7.72	7.72
4,4'-dcbpy H6H6'	8.05	7.96
H α -His	4.89	4.94
H β -His	3.35	3.36
H2-His	8.13	8.19
H5-His	7.21	7.21

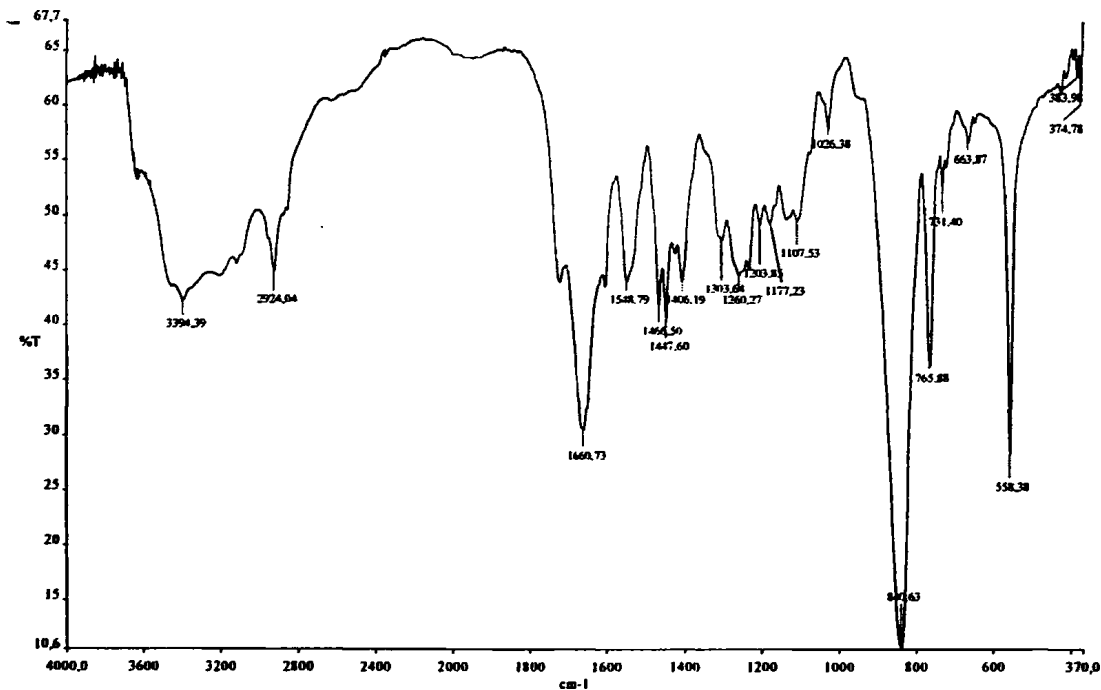
3.1.3.3. Χαρακτηρισμός των διαστερομερών συμπλόκων Λ - και Δ -[Ru(bpy) $_2$ (4,4'-(COTyrCONH $_2$) $_2$ bpy)]Cl $_2$ ($\Lambda 3$ και $\Delta 3$)



Σχήμα 3.1.22. Σχηματική παράσταση της δομής των συμπλόκων Δ - και Λ -[Ru(bpy) $_2$ (4,4'-(COTyrCONH $_2$) $_2$ bpy)]Cl $_2$.

3.1.3.3.1. Φασματοσκοπία υπερόθρου

Όπως και στην περίπτωση των διαστερομερών συμπλόκων Λ1, Δ1 και Λ2, Δ2 έτσι και τα σύμπλοκα αυτά, παρέχουν πρακτικά τα ίδια φάσματα οπότε η ανάλυση τους δεν γίνεται ξεχωριστά. Στο σχήμα 3.1.23 δίνεται ενδεικτικά το φάσμα για το Λ3 ισομερές, στο οποίο φαίνεται η παρουσία του υποκαταστάτη Υ3 στο σύμπλοκο αφού παρατηρείται η ταινία δόνησης τάσης του δεσμού C=O στα 1660 cm^{-1} μετατοπισμένη κατά 5 cm^{-1} , στο σύμπλοκο Δ3 η ταινία αυτή εμφανίζεται στα 1665 cm^{-1} . Στο φάσμα του ελεύθερου υποκαταστάτη Υ3 η δόνηση τάσης του δεσμού C=O, $\nu(\text{C}=\text{O})$ εμφανίζεται στα 1691 cm^{-1} , η διαφορά που παρατηρείται στην ταινία αυτή οφείλεται στη συμπλοκοποίηση του υποκαταστάτη μέσω των αζώτων N1 και N1' στο ρουθίνιο.



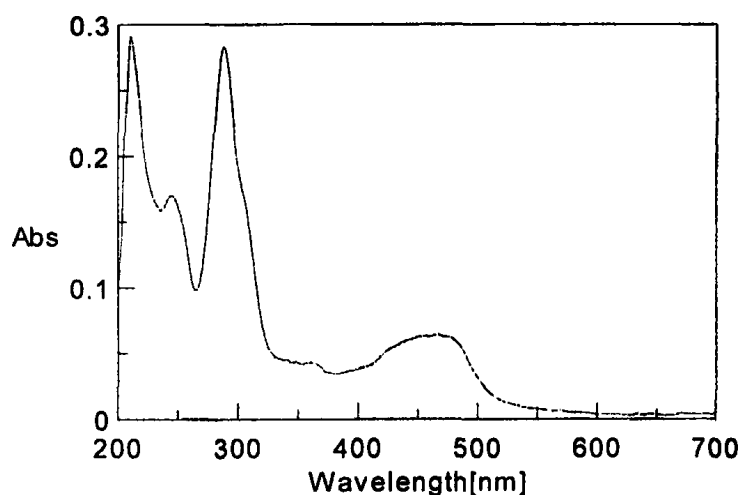
Σχήμα 3.1.23. Φάσμα υπερόθρου του Λ3.

Οι ταινίες δόνησης τάσης του σκελετού των αρωματικών πυριδινικών δακτυλίων βρίσκονται στην περιοχή $1406 - 1466\text{ cm}^{-1}$ για το Λ3 και $1411 - 1469\text{ cm}^{-1}$ για το Δ3 και των C-N στα 1303 cm^{-1} για το Λ3 και στα 1305 cm^{-1} για το Δ3. Οι δονήσεις κάμψης των αρωματικών C-H εντός του επιπέδου του δακτυλίου παρατηρούνται στα $1107 - 1203\text{ cm}^{-1}$ για

το Λ3 και στα 1113 - 1222 cm^{-1} για το Δ3, ενώ οι δονήσεις κάμψης C-H εκτός επιπέδου του δακτυλίου παρατηρούνται στα 840 cm^{-1} για το Λ3 και στα 844 cm^{-1} για το Δ3. Η ταινία στα 765 cm^{-1} αποδίδεται στην εντός επιπέδου παραμόρφωση του δακτυλίου ($\delta(\text{py})$) και στα 558 cm^{-1} στην εκτός επιπέδου παραμόρφωση ($\gamma(\text{py})$). Οι δονήσεις τάσης του δεσμού C-H των αλειφατικών πρωτονίων της ιστιδίνης παρατηρούνται στα 2924 cm^{-1} για το Λ3 και στα 2937 cm^{-1} για το Δ3, ενώ οι δονήσεις τάσης του δεσμού N-H παρατηρούνται στα 3394 cm^{-1} για το Λ3 και στα 3396 cm^{-1} για το Δ3.

3.1.3.3.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους UV-Vis χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων Λ3 και Δ3 σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα tris-HCl (10^{-3}M) με $\text{pH} = 7.0$.



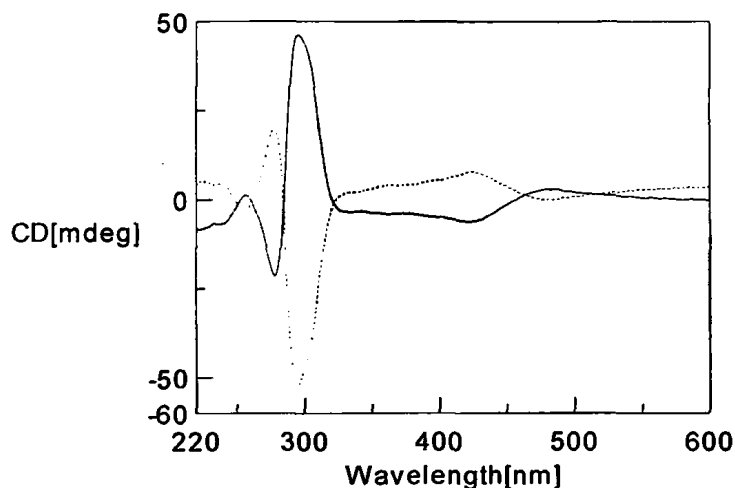
Σχήμα 3.1.24. Φάσμα UV-Vis του Λ3 στην περιοχή 200-700 nm.

Η ταινία στα 288 nm ($\epsilon = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το Λ3 και για το Δ3, αντιστοιχεί στις μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ των αρωματικών δακτυλίων των διπυριδυλίων, όπως εξάλλου έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση των διαστερομερών συμπλόκων Λ1, Δ1 και Λ2, Δ2, καθώς και σε άλλα πολυπυριδινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου [7, 21]. Οι ταινίες στα 360 nm ($\epsilon = 9.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) και στα 465 nm ($\epsilon = 1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) για το Λ3, όπως και στα ίδια μέγιστα και για το Δ3, αποδίδονται σε ταινίες μεταφοράς φορτίου από τα $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*$ των

αρωματικών δακτυλίων του διπυριδυλίου. Όπως αναφέρθηκε και στις περιπτώσεις των διαστερομερών συμπλόκων $\Lambda 1$, $\Delta 1$ και $\Lambda 2$, $\Delta 2$ που εξετάστηκαν ως εδώ, η πρώτη ταινία MLCT στα 353 nm ($\Delta 3$) και 360 nm ($\Lambda 3$) μπορεί να αποδοθεί στο υποκατεστημένο διπυριδύλιο ως $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(Y3)$ ενώ η δεύτερη, 461 nm ($\Delta 3$) και 465 nm ($\Lambda 3$) ως $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(bpy)$.

3.1.3.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού των δύο ισομερών στην περιοχή 220-600 nm φαίνονται στο σχήμα 3.1.25. Όπως και στην περίπτωση των συμπλόκων που εξετάστηκαν έτσι και εδώ η παρουσία επιπλέον χειρικών κέντρων στο σύμπλοκο έχει ως αποτέλεσμα τα δύο φάσματα να μην έχουν ακριβώς κατοπτρική σχέση αλλά να υπάρχουν μικρές διαφορές.

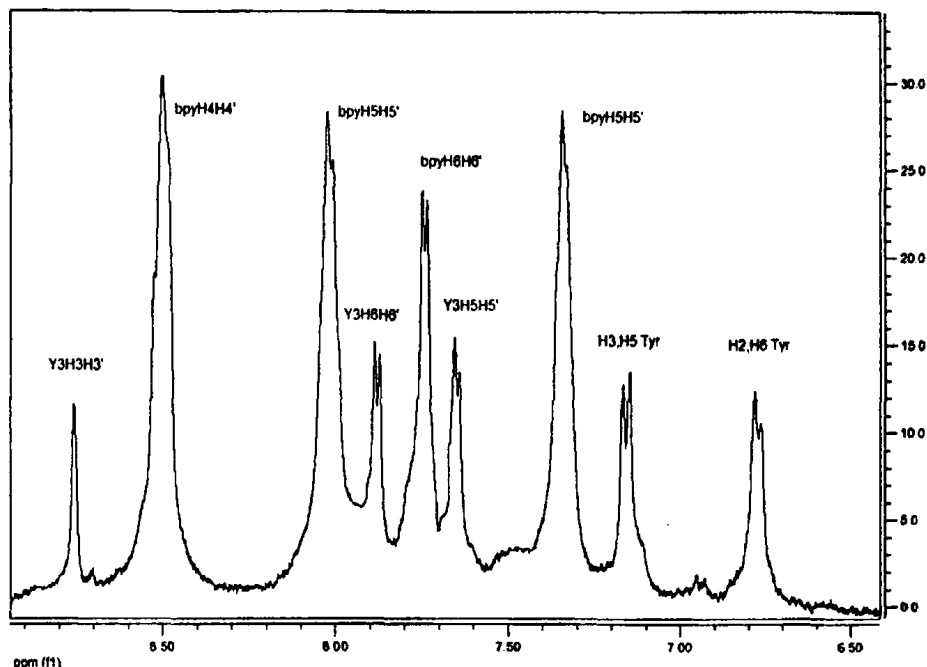


Σχήμα 3.1.25. Φάσματα CD των $\Lambda 3$ και $\Delta 3$ (διακεκομμένη γραμμή) στην περιοχή 220-600 nm.

Έτσι, στην περιοχή του εγγύς υπεριώδους, μεταπτώσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ των αρωματικών δακτυλίων του διπυριδυλίου δίνουν τα παρακάτω μέγιστα και ελάχιστα Cotton: $\lambda(\epsilon)$ 279 nm ($-21.05 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 295 nm ($+46.24 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) για το $\Lambda 3$ ισομερές και 277.5 nm ($+20.14 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 294 nm ($-52.26 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) για το $\Delta 3$ ισομερές. Ενώ στην περιοχή του ορατού, εμφανίζονται τα παρακάτω ελάχιστα και μέγιστα Cotton: 421.5 nm ($-6.19 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) και 480.5 nm ($+2.96 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) για το $\Lambda 3$ ισομερές και 423 nm ($+7.87 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 481.5 nm ($+0.12 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) για το $\Delta 3$ ισομερές.

3.1.3.3.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Τα φάσματα ^1H NMR των συμπλόκων λήφθηκαν σε $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ 1:9 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH=7.0).

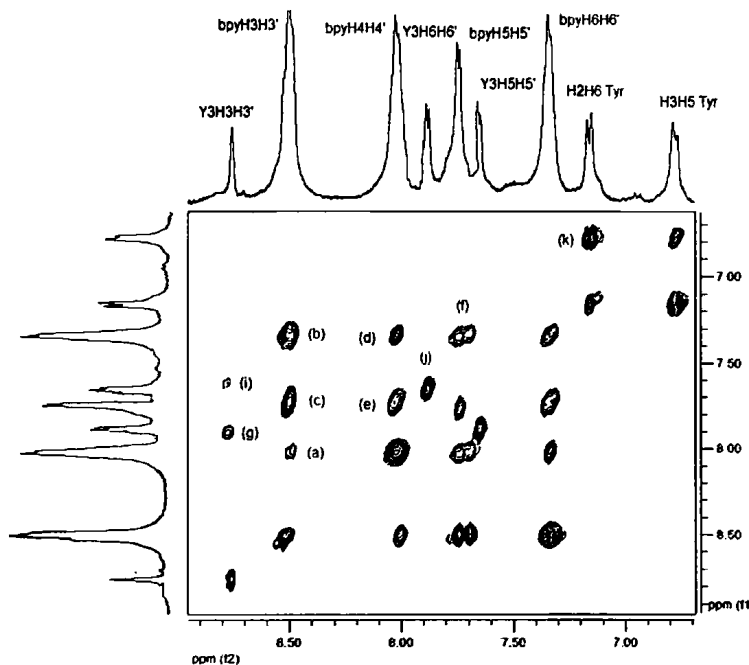


Σχήμα 3.1.26. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου Λ3 για την αρωματική περιοχή.

Με την βοήθεια φασμάτων δύο διαστάσεων βρέθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων $\text{H}3\text{H}3'$ του διπυριδιλίου στα 8.49 ppm ($^3J = 8.2$ Hz), των πρωτονίων $\text{H}4\text{H}4'$ στα 8.02 ppm ($^3J = 6.8$ Hz), των πρωτονίων $\text{H}5\text{H}5'$ στα 7.34 ppm ($^3J = 6.7$ Hz) και των πρωτονίων $\text{H}6\text{H}6'$ στα 7.74 ppm ($^3J = 6.8$ Hz). Ακόμη, τα πρωτόνια $\text{H}3\text{H}3'$ του Y3 στα 8.75 ppm ($\Delta\delta = 0.00$ ppm), τα πρωτόνια $\text{H}5\text{H}5'$ στα 7.64 ppm ($\Delta\delta = 0.30$ ppm) με $^3J = 6.8$ Hz και τα πρωτόνια $\text{H}6\text{H}6'$ στα 7.88 ppm ($\Delta\delta = 0.32$ ppm) με $^3J = 6.8$ Hz. Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις που εξετάσαμε, η ένταξη του Y3 στο Ru προκαλεί ελάττωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο $\text{H}6\text{H}6'$ και $\text{H}5\text{H}5'$ που βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις στα $\text{N}1\text{N}1'$ που εντάσσονται με αποτέλεσμα να μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία. Τα πρωτόνια $\text{H}3\text{H}5$ του αμινοξέος εμφανίζονται στα 6.77 ppm ($\Delta\delta = -0.10$ ppm) και τα πρωτόνια $\text{H}2\text{H}6$ στα 7.15 ppm ($\Delta\delta = 0.00$ ppm) ενώ τα αλειφατικά πρωτόνια $\text{H}\beta$ εμφανίζονται στα 3.20



ppm ($\Delta\delta = 0.14$ ppm) και τα πρωτόνια Ha στα 4.66 ppm ($\Delta\delta = 0.02$ ppm). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεγαλύτερη μετατόπιση σε υψηλότερα πεδία των H3H5 στα άκρα του φαινολικού δακτυλίου της τυροσίνης γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί σε αύξηση της ηλεκτρονιακής τους πυκνότητας λόγω της αλληλεπίδρασής με τους διπυριδιλικούς δακτυλίους.

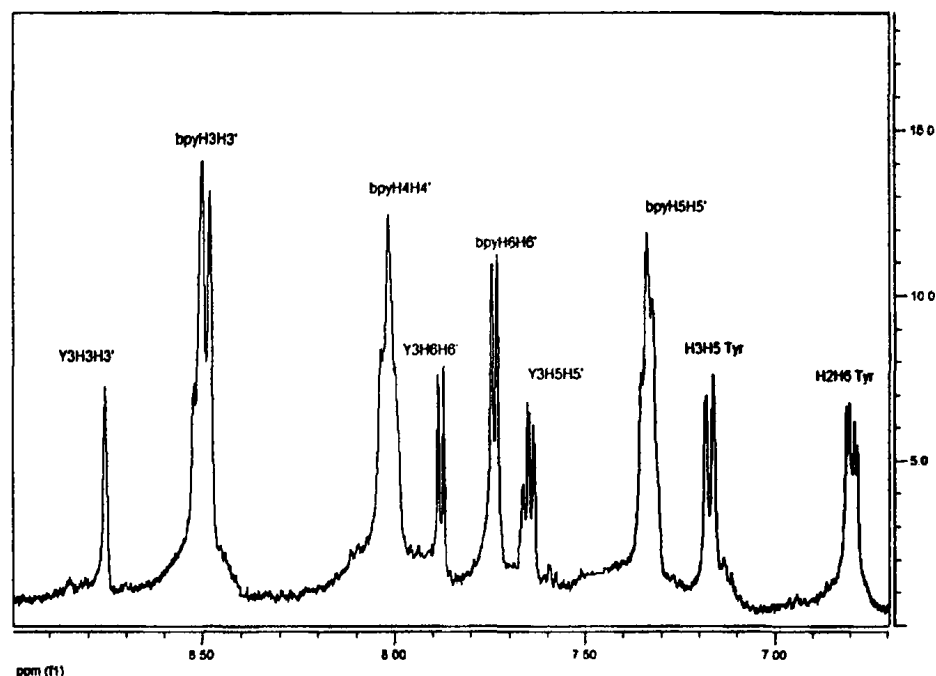


Σχήμα 3.1.27. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Λ3 για την αρωματική περιοχή.

Στο σχήμα 3.1.27 παρουσιάζονται τα συστήματα *spin* του συμπλόκου Λ3. Παρατηρούνται οι κορυφές διασταύρωσης των H3H3' με τα πρωτόνια H4H4' (a), με τα πρωτόνια H5H5' (b) και με τα πρωτόνια H6H6' (c) καθώς και των πρωτονίων H4H4' με τα H5H5' (d), των πρωτονίων H4H4' με τα H6H6' (e), των πρωτονίων H5H5' με τα H6H6' (f). Ακόμη παρατηρούνται οι κορυφές διασταύρωσης των πρωτονίων Y3 H3H3' με τα πρωτόνια Y3 H5H5' (i) των Y3 H3H3' με τα πρωτόνια Y3 H6H6' (g), των πρωτονίων Y3 H5H5' με τα πρωτόνια Y3 H6H6' (j) και των πρωτονίων H2H6 της τυροσίνης με τα H2H5 (k).

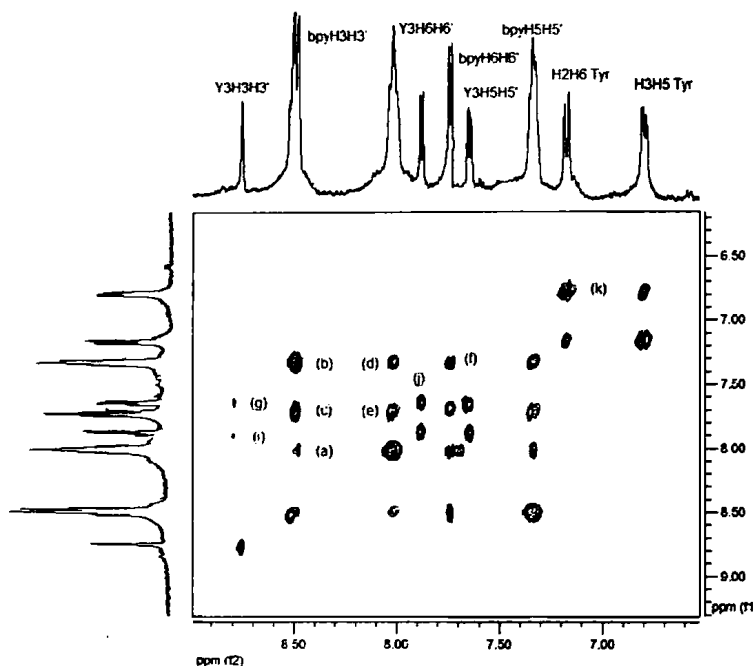
Στο σύμπλοκο Δ3 εμφανίζονται τα πρωτόνια H3H3' του διπυριδιλίου στα 8.49 ppm ($^3J = 8.6$ Hz), των πρωτονίων H4H4' στα 8.01 ppm ($^3J = 7.4$ Hz), των πρωτονίων H5H5' στα 7.33 ppm ($^3J = 6.2$ Hz) και των πρωτονίων H6H6' στα 7.73 ppm ($^3J = 7.4$ Hz). Στον

υποκαταστάτη Y3 παρατηρούνται σήματα συντονισμού των πρωτονίων H3H3' στα 8.75 ppm ($\Delta\delta = 0.00$ ppm), των πρωτονίων H5H5' στα 7.63 ppm ($\Delta\delta = 0.31$ ppm) με $^3J = 6.7$ Hz και των πρωτονίων H6H6' στα 7.87 ppm ($\Delta\delta = 0.33$ ppm) με $^3J = 6.6$ Hz. Ακόμα, τα πρωτόνια H3H5 του αμινοξέος εμφανίζονται στα 6.80 ppm ($\Delta\delta = -0.13$ ppm), τα πρωτόνια H2H6 στα 7.16 ppm ($\Delta\delta = 0.01$ ppm) και το αλειφατικό πρωτόνια H β εμφανίζεται στα 3.22 ppm ($\Delta\delta = 0.18$ ppm).



Σχήμα 3.1.28. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου $\Delta 3$ για την αρωματική περιοχή.

Στο σχήμα 3.1.29 δίνονται οι κορυφές διασταύρωσης (a) των πρωτονίων H3H3' με τα πρωτόνια H4H4', (b) των πρωτονίων H3H3' με τα πρωτόνια H5H5' (c) των πρωτονίων H3H3' με τα πρωτόνια H6H6', (d) των πρωτονίων H4H4' με τα H5H5', (e) των πρωτονίων H4H4' με τα H6H6' και (f) των πρωτονίων H5H5' με τα H6H6'. Ακόμη δίνονται οι κορυφές (g) των πρωτονίων του Y3 H3H3' με τα πρωτόνια Y3 H5H5', (i) των πρωτονίων Y3 H3H3' με τα πρωτόνια Y3 H6H6' και (j) των πρωτονίων Y3 H5H5' με τα πρωτόνια Y3 H6H6'. Παρατηρούνται επίσης και οι κορυφές διασταύρωσης των πρωτονίων H2H6 της τυροσίνης με τα πρωτόνια H2H5 (k).



Σχήμα 3.1.29. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Δ3 για την αρωματική περιοχή.

Οι χημικές μετατοπίσεις των δύο διαστερομερών συμπλόκων, Λ-, Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(CO₂TyrCONH₂)₂bpy)]Cl₂ φαίνονται στον πίνακα 3.1.4. Από τον πίνακα είναι εμφανές ότι τα δύο ισομερή Λ3 και Δ3 δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων τους ώστε να προκύπτει και διαφορά στην διαμόρφωσή τους, όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση των διαστερομερών της λυσίνης Λ1 και Δ1. Αν και γενικά αναμενόταν μια π-π αλληλεπίδραση ανάμεσα στους φαινολικούς δακτυλίους της Tyr και τους αρωματικούς πυριδινικούς δακτυλίους των διπυριδιλίων των συμπλόκων, συσχετιζόμενη με την απόλυτη διαμόρφωση του κάθε συμπλόκου, το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται πιθανόν λόγω της μικρής απόστασης ανάμεσα στο σημείο σύζευξης του αμινοξέος και της πλευρικής του αλυσίδας.

Πίνακας 3.1.4. Χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR των διαστερομερών συμπλόκων Λ3 και Δ3 στους 298 Κ σε 90% H₂O, 10% D₂O, pH = 7.0 (0,1 M Na₂HPO₄/ NaH₂(PO₄)₂).

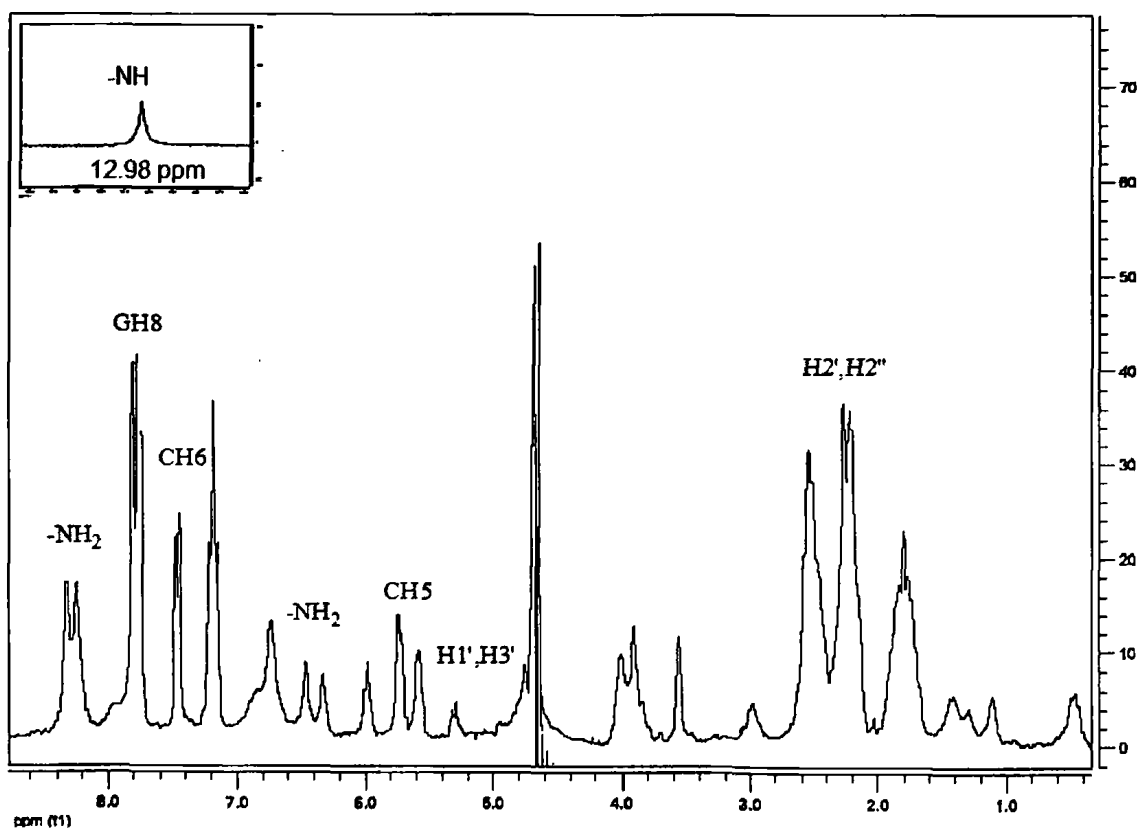
Πρωτόνια	Λ3	Δ3
bpy H3H3'	8.49	8.49
bpy H4H4'	8.02	8.01
bpy H5H5'	7.34	7.33
bpy H6H6'	7.74	7.73
4,4'-dcbpy H3H3'	8.75	8.75
4,4'-dcbpy H5H5'	7.64	7.63
4,4'-dcbpy H6H6'	7.88	7.87
H _α -Tyr	4.66	-
H _β -Tyr	3.20	3.22
H2H6-Tyr	7.15	7.17
H3H5-Tyr	6.77	6.80



3.1.4. Αλληλεπιδράσεις με το ολιγονουκλεοτιδιο $d(3'-CGCGCG-5')_2$

3.1.4.1. Ανάλυση φάσματος 1H NMR του $d(3'-CGCGCG-5')_2$

Το φάσμα 1H NMR, μιας διάστασης (σχήμα 3.1.30) του ολιγονουκλεοτιδίου λήφθηκε σε μίγμα διαλυτών H_2O/D_2O 90%/10% ώστε να αποδοθούν τόσο οι κορυφές για τα ανταλλάξιμα με τον διαλύτη πρωτόνια (αρωματικά ιμίνο πρωτόνια και πρωτόνια των εξωκυκλικών αμινομάδων) όσο και για τα μη ανταλλάξιμα με τον διαλύτη πρωτόνια (αρωματικά πρωτόνια των νουκλεϊνικών βάσεων και αλειφατικά του σακχάρου).

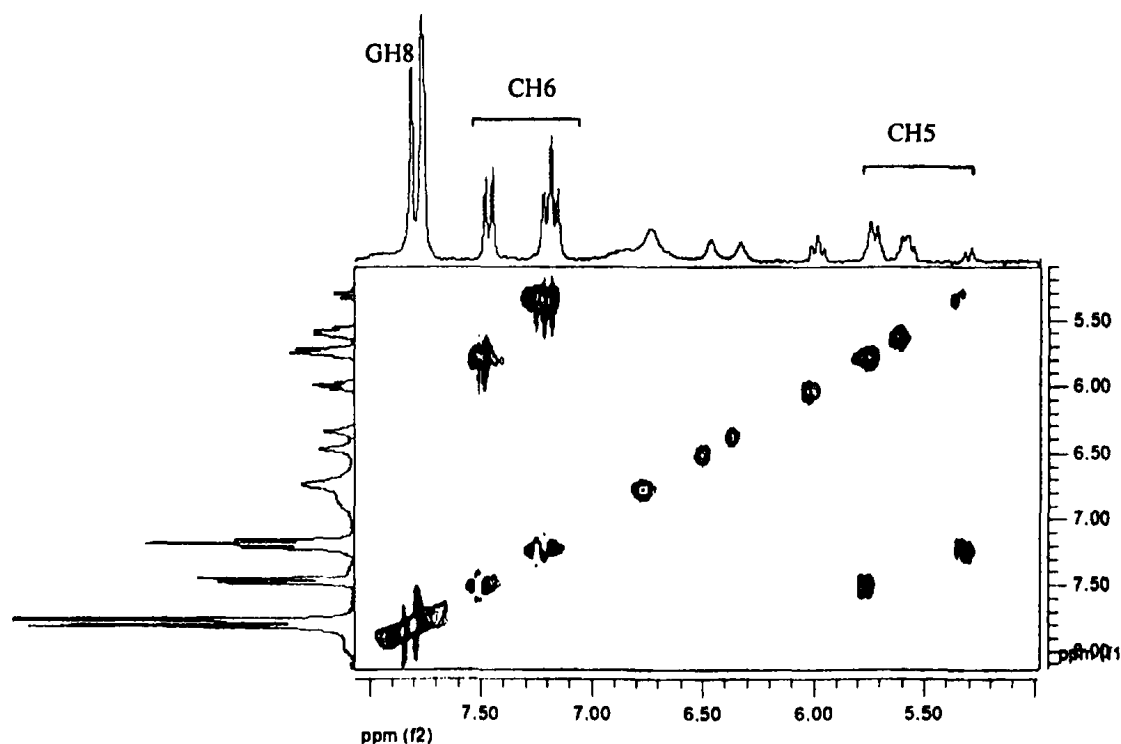


Σχήμα 3.1.30. Φάσμα 1H NMR μια διάστασης του $d(3'-CGCGCG-5')_2$ σε D_2O/H_2O στο οποίο φαίνονται οι διάφορες κατηγορίες πρωτονίων.

3.1.4.1.1. Απόδοση των μη ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων του $d(3'-CGCGCG-5')_2$

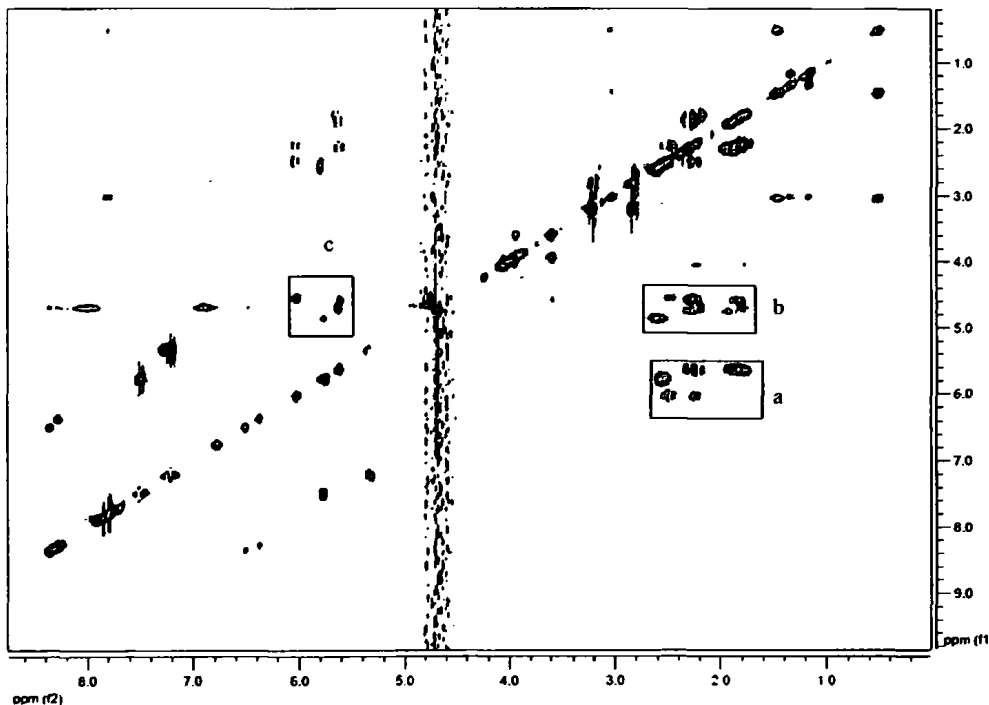
Η απόδοση των κορυφών των μη ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου, βασίστηκε σε τεχνικές φασματοσκοπίας δύο διαστάσεων (i) DQF COSY, (ii) TOCSY και (iii) NOESY. Η συμμετρία της αλληλόσυμπληρωματικής αλληλουχίας του ολιγονουκλεοτιδίου διευκολύνει την ερμηνεία των φασμάτων, δεδομένου ότι ο συνολικός αριθμός των σημάτων μειώνεται στο μισό.

Με βάση το φάσμα DQF COSY προσδιορίζονται τα πρωτόνια H8 και H6/H5 της Γουανίνης (G) και της Κυτοσίνης (C), αντίστοιχα. Τα αρωματικά αυτά πρωτόνια αναμένονται στην περιοχή περίπου των 7-8 ppm, ενώ συζεύγνυται μέσω τριών δεσμών 3J τα H6 και τα H5 της Κυτοσίνης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι κατά την τεχνική DQF COSY παρατηρείται μόνο η 3J σύζευξη μέσω δεσμών, παρατηρούμε τρεις ισχυρές κορυφές διασταύρωσης που μπορούν να αποδοθούν στη σύζευξη των H5 και H6 των τριών (C) του ολιγονουκλεοτιδίου. Οι υπόλοιπες τρεις ταινίες της αρωματικής περιοχής που δεν εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης και συνεπώς δεν συσχετίζονται με άλλα πρωτόνια, αποδίδονται στα τρία πρωτόνια H8 των (G) του ολιγονουκλεοτιδίου (σχήμα 3.1.31).



Σχήμα 3.1.31. Περιοχή του φάσματος DQF COSY του ολιγονουκλεοτιδίου για τα πρωτόνια H8/H6-H5.

Με την τεχνική TOCSY (σχήμα 3.1.32) μας επιτρέπεται, να ομαδοποιήσουμε τα πρωτόνια που ανήκουν στο ίδιο σύστημα spin άρα και στον ίδιο φουρανοζικό δακτύλιο του σακχάρου στον οποίο ανήκουν, μη παρέχοντας όμως πληροφορίες για τη θέση του σακχάρου στην αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου. Ακόμη, η ομαδοποίηση αυτή μας επιτρέπει να διακρίνουμε το διαφορετικό χημικό περιβάλλον των πρωτονίων αυτών που εμφανίζονται στο φάσμα. Έτσι, η σύζευξη μεταξύ των πρωτονίων του σακχάρου φαίνεται καθαρά στο φάσμα όπου τα πρωτόνια του σακχάρου που ανήκουν στο ίδιο νουκλεοτίδιο σχηματίζουν τη δική τους υποομάδα. Κάθε πρωτόνιο H1' συζεύγνυται 3J με το H2' και H2'' (περιοχή a). Παρομοίως, κάθε H2' και H2'' πρωτόνιο συζεύγνυται 3J με το αντίστοιχο H3' (περιοχή b), το οποίο με τη σειρά του συζεύγνυται με τα πρωτόνια H4'. Τα περισσότερα από τα H4', H5' και H5'' πρωτόνια δύσκολα διακρίνονται και αλληλεπικαλύπτονται με την κορυφή του διαλύτη. Ακόμη διακρίνονται 4J συζεύξεις των H1' με τα H3', οι οποίες φαίνονται στην περιοχή c.



Σχήμα 3.1.32. Φάσμα TOCSY της διπλής έλικας του $d(3'-CGCGCG-5')_2$.

Τέλος ο σκοπός της μελέτης του ολιγονουκλεοτιδίου με την τεχνική NOESY είναι να συσχετίσει τα πρωτόνια των σακχάρων (ριβοζών) που ήδη ομαδοποιήθηκαν με την τεχνική

COSY ή TOCSY, και τα πρωτόνια των δακτυλίων των νουκλεϊνικών βάσεων με τις θέσεις που αντιστοιχούν στην αλληλουχία της νουκλεοτιδικής αλυσίδας.

Γενικά, η απόδοση των κορυφών ενός ολιγονουκλεοτιδίου, εξαρτάται από κάποιες κύριες δομικές προϋποθέσεις της διπλής έλικας που σχηματίζεται, όπως π.χ η διαμόρφωση ανακλίντρου του φουρανοζικού δακτυλίου στο DNA τύπου [143 - 148]. Χαρακτηριστικά μια νουκλεϊνική βάση μέσα σε ένα περιβάλλον B τύπου υιοθετεί ένα *anti*-προσανατολισμό σε σχέση με την ριβόζη, ενώ η διαμόρφωση της ριβόζης μπορεί να περιγραφεί ως C2'-endo. Για αυτή τη διαμόρφωση της ριβόζης σε μεμονωμένα νουκλεοτίδια, έχουν βρεθεί οι ακόλουθες αποστάσεις μεταξύ των πρωτονίων των νουκλεϊνικών βάσεων και των πρωτονίων του σακχάρου της ριβόζης: H6/H8 → H1' ($r = 3.7 \text{ \AA}$), H6/H8 → H2' ($r = 2.2 \text{ \AA}$) και H6/H8 → H2'' ($r = 3.6 \text{ \AA}$) [149]. Καθώς όλες οι αποστάσεις που αναφέρονται είναι πολύ μικρότερες από 5.0 \AA μπορούν να δώσουν σήματα NOE σε θερμοκρασία δωματίου και να παρατηρηθούν εύκολα στα φάσματα ενός ολιγονουκλεοτιδίου. Το σημαντικότερο όμως σημείο για την απόδοση των κορυφών είναι ότι και η απόσταση μεταξύ αντίστοιχων πρωτονίων, γειτονικών στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων, είναι επίσης μικρότερη από 5.0 \AA . Έτσι εμφανίζονται και οι ταινίες : (n+1) H6/H8 → (n) H1' ($r = 3.1 \text{ \AA}$), (n+1) H6/H8 → (n) H2' ($r=3.8 \text{ \AA}$) και (n+1) H6/H8 → (n) H2'' ($r=2.4 \text{ \AA}$), όπου (n) και (n+1) δείχνουν τις θέσεις διαδοχικών νουκλεοτιδίων στον ίδιο κλώνο προς την κατεύθυνση 5' → 3'. Η επεξεργασία των κορυφών γίνεται ως εξής [150, 151, 152]:

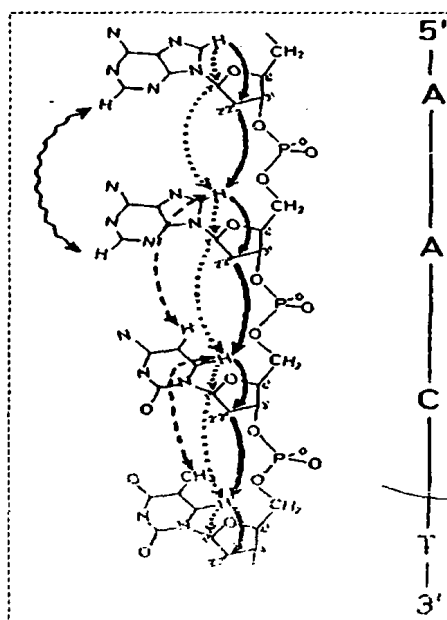


Όπου τα βέλη \rightarrow και \Rightarrow αντιπροσωπεύουν ενδό- και διά- νουκλεϊνικές αποστάσεις αντίστοιχα και η κάθε παρένθεση αντιπροσωπεύει μια απόσταση ($< 5.0 \text{ \AA}$). Ως εκ τούτου όλα τα πρωτόνια της ριβόζης και της νουκλεϊνικής βάσης μπορούν να αποδοθούν στο σωστό νουκλεϊνικό παράγωγο. Εναλλακτικά, οι πορείες που αφορούν τα πρωτόνια H2' και H2'' θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν εξίσου καλά και κάτω από ορισμένες συνθήκες να παρέχουν πολύτιμες συμπληρωματικές πληροφορίες.

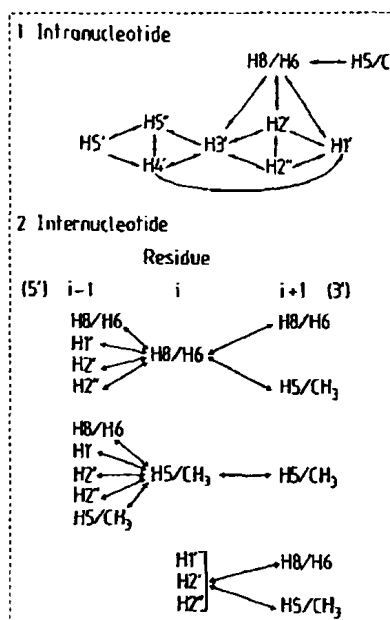
Πιο συγκεκριμένα, η δεξιόστροφη διπλή έλικα του DNA σε υδατικό διάλυμα μπορεί να θεωρηθεί ως DNA B τύπου, ενώ πολλοί συγγραφείς πρότειναν διαδικασίες για την απόδοση των μη ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων χρησιμοποιώντας το φάσμα NOESY [143-146, 153]. Εκτός από μικρές διαφορές, όλες οι προτεινόμενες στρατηγικές



βασίζονται στην απόδοση των σημάτων βάσει της αλληλουχίας όπως αυτή φαίνεται στο σχήμα 3.1.33. 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 τα COSY και TOCSY ώστε να ταυτοποιηθούν σε πρώτη φάση τα συστήματα spin και έπειτα να ακολουθήσει η ταυτοποίηση της αλληλουχίας. Η απόδοση των πρωτονίων που βασίζεται στην τεχνική NOE μπορεί επίσης να συνοψιστεί διαγραμματικά στο σχήμα 3.1.34, σύμφωνα με τον Clore και τους συνεργάτες του [154].



Σχήμα 3.3.33. Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων που μπορούν να δώσουν NOE στο B-DNA.

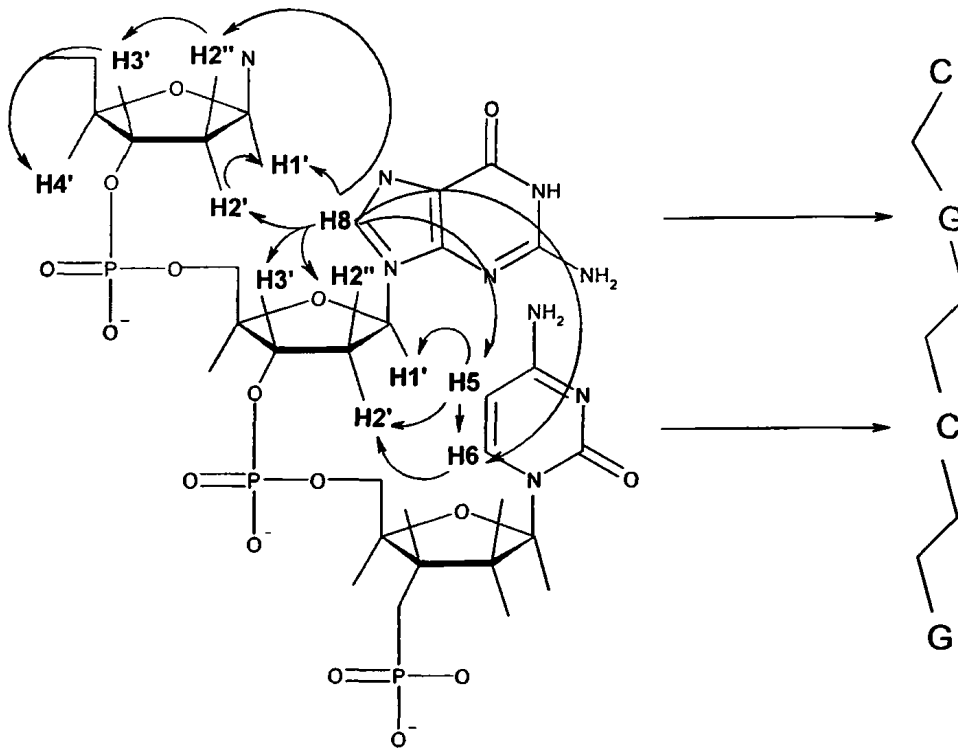


Σχήμα 3.1.34. Σχηματική αναπαράσταση των αποστάσεων σε B-DNA, απαραίτητων για την απόδοση των πρωτονίων σύμφωνα με την αλληλουχία και βάσει των NOE.

Βάσει των σχημάτων 3.1.33 και 3.1.34, σε οποιαδήποτε δεξιόστροφη έλικα, τα πρωτόνια H8 της πουρίνης ή τα H6 της πυριμιδίνης θα βρισκόταν κοντά στα H1' του (n-1) σακχάρου (σύμφωνα με την αρίθμηση από το 5' προς το 3' άκρο της κάθε αλυσίδας). Αφού κάθε βάση έχει ένα τουλάχιστον αρωματικό πρωτόνιο (H6/H8), η πιο πάνω μεθοδολογία που περιγράφηκε αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο προσδιορισμού της αλληλουχίας γειτονικών

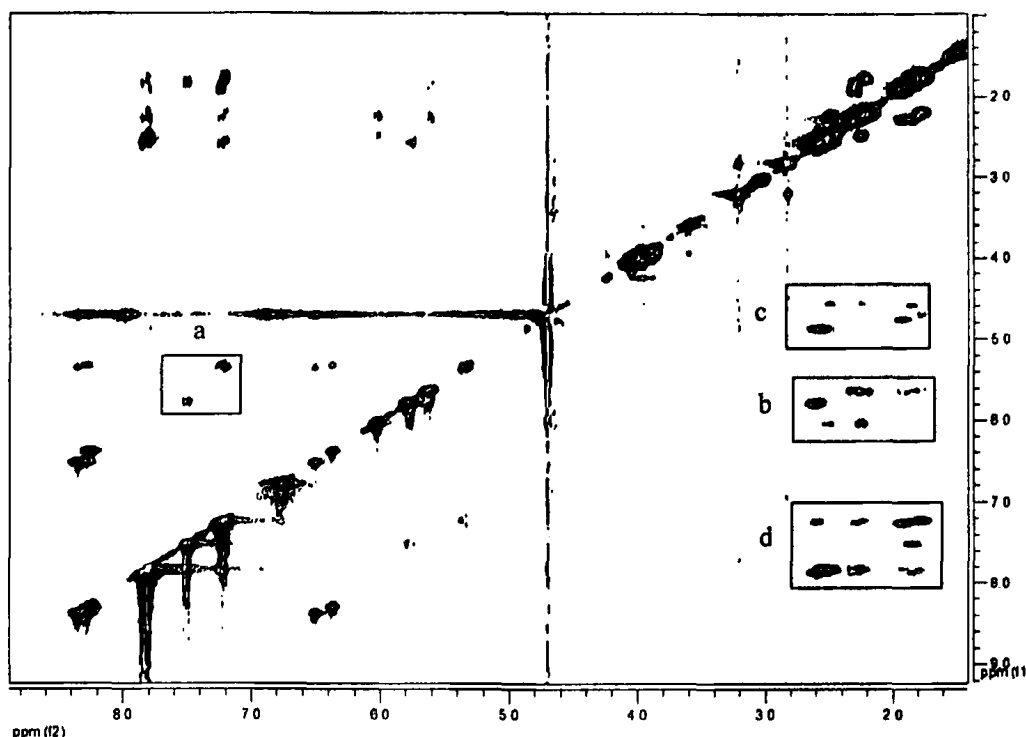
νουκλεοτιδίων μιας πολυνουκλεοτικής αλυσίδας. Επιπλέον, το πρωτόνιο H6/H8 είναι επίσης κοντά με το πρωτόνιο H2'' της γειτονικής (n-1) δεοξυριβόζης το οποίο συζεύγνται με το (n-1) H1'. Έτσι, η εναλλακτική μέθοδος η οποία χρησιμοποιεί τα σήματα NOE των (n) H6/H8 με το (n-1) H2'' παρέχει επιβεβαίωση για την απόδοση των σημάτων που γίνεται μέσω της κλασικής μεθόδου η οποία χρησιμοποιεί τα σήματα NOE των (n) H6/H8 με τα (n-1) H1' και την σύζευξη μέσω δεσμών μεταξύ των πρωτονίων H1' και H2''. Αν το πρωτόνιο H1' βρίσκεται σε μια «συνωστισμένη» περιοχή φάσματος, το NOE με το H2'' αποτελεί μια εναλλακτική οδό σύνδεσης των ομάδων πρωτονίων και τη συνέχιση του προσδιορισμού της αλληλουχίας. 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. Επιπλέον NOE παρατηρούνται μεταξύ του πρωτονίου (n) H1' και του πρωτονίου (n+1) H5 μιας πυριμιδίνης. Όπως προκύπτει από τα μοριακά μοντέλα όταν μια πυριμιδίνη ακολουθείται από μια 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 μια τέτοια διασταυρούμενη κορυφή θα εμφανιζόταν κοντά στη διαγώνιο όπου συχνά εμφανίζονται κορυφές. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι το αλληλοσυμπληρωματικό εξαμερές δεσοξυνουκλεοτιδίο d(3'-CGCGCG-5')₂ κρυσταλλούμενο από σχετικά υψηλή ιονική ισχύ ηλεκτρολυτών υιοθετεί διαμόρφωση αριστερόστροφης έλικας δομή [155], εν τούτοις σε διαλύματα ιονικής ισχύος ηλεκτρολυτών ανάλογες με εκείνες των πειραμάτων που θα πραγματοποιήσουμε στη συνέχεια υιοθετεί διαμόρφωση δεξιόστροφης έλικας B – τύπου [156] όπως φαίνεται και από τα φάσματα NOE. Στο σχήμα 3.1.35 δίνονται σχηματικά τα αναμενόμενα NOE με βάση τα οποία γίνεται η απόδοση των σημάτων των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5')₂.





Σχήμα 3.1.35. Σχηματική αναπαράσταση των NOE του ολιγονουκλεοτιδίου $d(3'-CGCGCG-5')_2$.

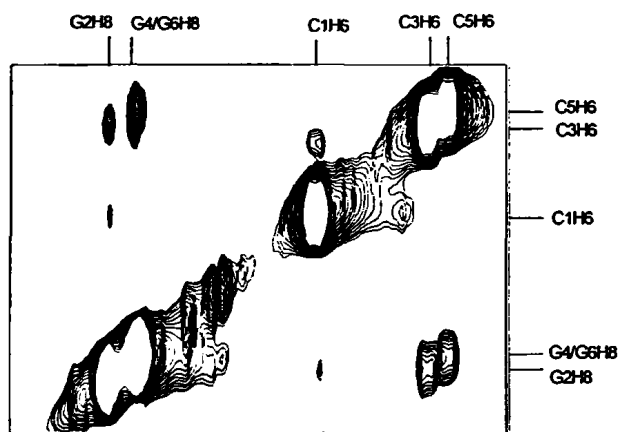
Στο σχήμα 3.1.36, δίνεται το φάσμα 2D NOE του $d(3'-CGCGCG-5')_2$, όπου επισημαίνονται με α έως δ οι περιοχές των κορυφών διασταύρωσης για πρωτόνια που βρίσκονται σε αποστάσεις μικρότερες των 5.0 Å. Στην περιοχή (α) φαίνονται τα σήματα NOE των αρωματικών πρωτονίων με τα H1' της ίδιας νουκλεϊνικής βάσης της ίδιας αλυσίδας. Με βάση αυτά προσδιορίζονται και τα υπόλοιπα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου. Τα H1' δίνουν εν συνεχεία σήματα NOE με τα H2' και H2'' όπως αυτά φαίνονται στην περιοχή (β) ενώ η διάκριση τους μπορεί να γίνει με σύγκριση των φασμάτων COSY και NOESY βάσει των διαφορών στη σύζευξη μεταξύ των H2 πρωτονίων με τα πρωτόνια H3'. Τα H2' και H2'' στη συνέχεια εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης με τα πρωτόνια H3' (βλέπε περιοχή γ). Στην περιοχή (δ) φαίνονται τα σήματα NOE μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων των βάσεων με τα πρωτόνια H2' και H2''.



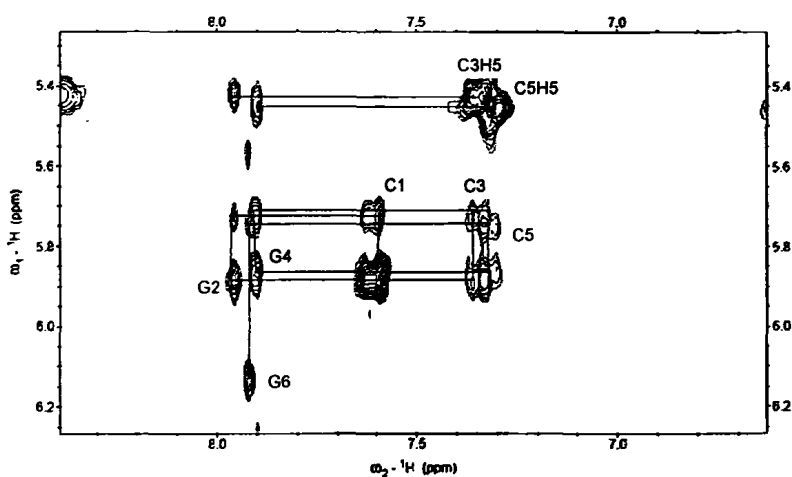
Σχήμα 3.1.36. Φάσμα NOESY του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5')₂.

Για να βρεθεί η τελική αλληλουχία των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5')₂ χρησιμοποιήθηκαν τα σήματα NOE των αρωματικών πρωτονίων γειτονικών βάσεων, ξεκινώντας από το H6 της Κυτοσίνης προς το H8 της γειτονικής Γουανίνης (σχήμα 3.1.37). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα σήματα NOE μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων H6/H8 με τα H1' της ίδιας νουκλεϊνικής βάσης της ίδιας αλυσίδας και έπειτα τα σήματα NOE των πρωτονίων H1' με τα πρωτόνια H6/H8 της επόμενης βάσης (σχήμα 3.1.38). Έτσι με βάση το σχήμα 3.1.38, παρατηρούμε κορυφές διασταύρωσης μεταξύ των πρωτονίων στα 7.46 ppm (CH6) με το 5.60 ppm (H1') και έπειτα αυτού με το πρωτόνιο (GH8) στα 7.82 ppm, το οποίο σχηματίζει κορυφή διασταύρωσης με το πρωτόνιο H1' στα 5.75 ppm. Το τελευταίο πρωτόνιο H1', παρουσιάζει κορυφή διασταύρωσης με το αρωματικό πρωτόνιο της επόμενης βάσης που είναι το πρωτόνιο (CH6) στα 7.23 ppm. Στη συνέχεια, το πρωτόνιο αυτό εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης με το πρωτόνιο H1' στα 5.61 ppm. Έτσι λοιπόν, ακολουθώντας το μονοπάτι αυτό βρέθηκαν και οι υπόλοιπες κορυφές διασταύρωσης για την εύρεση της αλληλουχίας του ολιγονουκλεοτιδίου. Το πρωτόνιο H1' στα 5.61 ppm με το πρωτόνιο της επόμενης βάσης (GH8) στα 7.77 ppm, αυτό με το πρωτόνιο H1' στα 5.92 ppm που εν

συνεχία εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης με το πρωτόνιο (CH6) στα 7.19 ppm. Το πρωτόνιο αυτό, εμφανίζει τέλος κορυφή διασταύρωσης με το πρωτόνιο H1' στα 5.74 ppm και αυτό με το πρωτόνιο της επόμενης βάσης (GH8) στα 7.79 ppm.



Σχήμα 3.1.37. Περιοχή φάσματος NOESY όπου φαίνονται τα NOE μεταξύ των H8 και H6 των Γουανίνων και Κυτοσίνων στην αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου.



Σχήμα 3.1.38. Περιοχή φάσματος NOESY όπου φαίνεται η σύνδεση των νουκλεοτιδίων από το C1 στο G6.

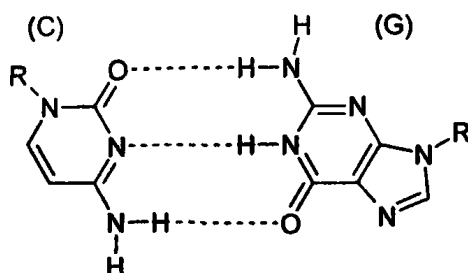
Από την απόδοση των κορυφών του φάσματος στα πρωτόνια κάθε νουκλεϊνικού παραγώγου βρίσκονται οι αντίστοιχες χημικές μετατοπίσεις (πίνακας 3.1.5).

Πίνακας 3.1.5. Οι χημικές μετατοπίσεις των μη ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων του $d(3'-CGCGCG-5')$ στους 298 K, pH = 7.0 ($Na_2HPO_4 / NaH_2(PO_4)_2$ 100 mM).

	H8/H6	H5	H1'	H2'	H2''	H3'
C1	7.46	5.74	5.60	1.79	2.27	4.56
G2	7.82		5.75	2.54	2.65	4.83
C3	7.23	5.76	5.61	1.85	2.15	4.69
G4	7.77		5.92	2.51	2.59	4.84
C5	7.19	5.32	5.74	2.51	2.59	4.84
G6	7.79		6.00	2.23	2.49	4.52

3.1.4.1.2. Απόδοση των ανταλλάξιμων πρωτονίων του $d(3'-CGCGCG-5')$

Για την απόδοση των σημάτων συντονισμού των αμινο και ιμινο πρωτονίων πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε μίγμα H_2O/D_2O 90/10 και η ανάλυση τους έγινε όπως προαναφέραμε με τεχνικές COSY, TOCSY και NOESY. Τα αμινο και ιμινο πρωτόνια εμπλέκονται στους δεσμούς υδρογόνου των Watson-Crick. Η κάθε ετεροκυκλική βάση του ολιγονουκλεοτιδίου $d(3'-CGCGCG-5')$ συνδέεται με δεσμούς υδρογόνου με την συμπληρωματική της δημιουργώντας τα ζευγάρια των βάσεων C-G. Οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται ανάμεσα στο αρωματικό ιμινο πρωτόνιο της γουανίνης (G) με το N3 της κυτοσίνης (C), του ενός υδρογόνου της εξωκυκλικής βάσης της C με το O6 της G και του ενός υδρογόνου της εξωκυκλικής αμινομάδας της G με το O2 της C (σχήμα 3.1.39).



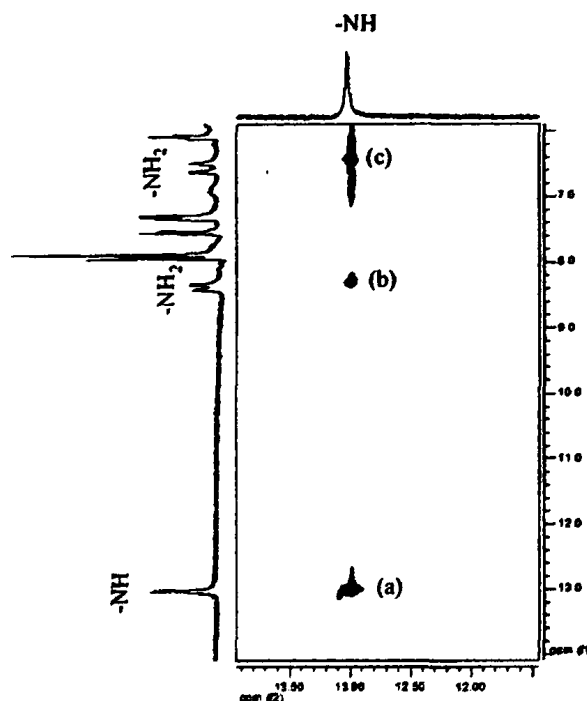
Σχήμα 3.1.39. Τα ζευγάρια των συμπληρωματικών βάσεων στο ολιγονουκλεοτίδιο, γουανίνης (G) – κυτοσίνης (C) (όπου R = σάκχαρο).

Στο φάσμα NMR τα ιμίνo πρωτόνια δίνουν σήματα συντονισμού στην περιοχή 11-15 ppm ενώ τα αμίνo πρωτόνια στα 6-9 ppm. Τα πρωτόνια των $-NH_2$ που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου συντονίζονται περίπου στα 9 ppm ενώ εκείνα που δεν συμμετέχουν σε τέτοιους δεσμούς εμφανίζουν τα σήματα συντονισμού τους αρκετά χαμηλότερα περίπου στα 6 ppm. Οι αμινομάδες που δεν εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου ανταλλάσσουν τα πρωτόνια πιο γρήγορα με τα μόρια του D_2O από ότι οι υπόλοιπες ομάδες και εμφανίζουν σήματα πολύ διευρυμένα στα φάσματα NMR. Σύμφωνα με τα πιο πάνω, κάθε ιμίνo πρωτόνιο από το ζεύγος C-G δίνει ένα σήμα NOE με το πρωτόνιο της εξωκυκλικής ομάδας $-NH_2$ της κυτοσίνης που συμμετέχει στο δεσμό υδρογόνου αλλά και με το ελεύθερο πρωτόνιο της ίδιας εξωκυκλικής αμινομάδας.

Έτσι λοιπόν, στα φάσματα NOESY του ολιγονουκλεοτιδίου $d(3'-CGCGCG-5')_2$ παρατηρούνται δύο ισχυρά NOE σήματα στα 8.32 ppm με 6.48 ppm και 8.23 ppm με 6.28 ppm τα οποία αποδίδονται στη σύζευξη των πρωτονίων των εξωκυκλικών αμινομάδων της C και G, εκείνων που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου και εκείνων που δεν συμμετέχουν. Αν λάβουμε υπόψη μας ότι στα χαμηλότερα πεδία (8.32 ppm και 8.23 ppm) παρατηρούνται οι κορυφές των πρωτονίων της G που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου με τα O_6 της C και εκείνων που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου με το O_4 της G, ενώ στα υψηλότερα πεδία, στα 6.48 ppm και στα 6.28 ppm, εκείνων των πρωτονίων που δεν εμπλέκονται σε τέτοιους δεσμούς. Ακόμη παρατηρείται μία διευρυμένη κορυφή στα 6.73 ppm η οποία αποδίδεται μάλλον στα μη συμμετέχοντα σε δεσμούς υδρογόνου αμινικά πρωτόνια των ακραίων C1 και G6 του ολιγονουκλεοτιδίου $d(3'-CGCGCG-5')_2$. Η κορυφή αυτή είναι διευρυμένη πιθανός λόγω γρήγορης ανταλλαγής των πρωτονίων αυτών με μόρια διαλύτη, ή εναλλακτικά λόγω μη συμμετοχής των ακραίων βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου σε δεσμούς Watson-Crick [157].

Στα 12.98 ppm, όπως φαίνονται από το φάσμα μιας διάστασης, παρατηρούμε μία σχετικά διευρυμένη κορυφή, που αντιστοιχεί στα ιμίνo πρωτόνια των (G) που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου για τον σχηματισμό των ζευγών των βάσεων G-C. Οι τρεις δεσμοί που σχηματίζουν C1-G2, C3-G4 και C5-G6 δίνουν ένα σήμα συντονισμού που σημαίνει ή ότι είναι ισοδύναμοι ή ότι η ανάλυση του οργάνου των 250 MHz δεν ξεχωρίζει τα περισσότερα σήματα συντονισμού όπως θα δούμε στο κεφάλαιο 3.2.4. Όπως φαίνονται από τα φάσματα

NOE δύο διαστάσεων (σχήμα 3.1.40) τα ιμινο πρωτόνια των (G) παρουσιάζουν ισχυρές κορυφές διασταύρωσης τόσο με το πρωτόνιο της αμινομάδας της C ή G που συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου όσο και με εκείνο που δεν μετέχει. Όλες οι χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων του d(3'-CGCGCG-5') δίνονται στον πίνακα 3.1.6.



Σχήμα 3.1.40. Περιοχή φάσματος NOESY όπου φαίνονται τα NOE μεταξύ των ιμινο πρωτονίων με τα πρωτόνια των εξωκυκλικών αμινομάδων. Όπου (α) διαγώνιος φάσματος NOESY, (β) κορυφή διασταύρωσης με τα $-NH_2$ που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, (c) κορυφή διασταύρωσης με τα $-NH_2$ που δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου.

Πίνακας 3.1.6. Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του d(3'-CGCGCG-5')₂ στους 298 K, pH = 7.0 (Na₂HPO₄ / NaH₂(PO₄)₂ 0.1 M)

	NH (G)	NH ₂	NH ₂ *
G2-C3	12.98	6.48	8.32
G4-C5	12.98	6.28	8.23
C1-G6	12.98	6.73	

* Αμινομάδα που συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου

3.1.4.2. Αλληλεπίδραση των διαστερομερών Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ με το εξαμερές d(3'-CGCGCG-5')₂

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των διαστερομερών συμπλόκων Λ1 και Δ1 με τη διπλή έλικα του DNA βασίστηκε σε πειράματα ¹H NMR δυο διαστάσεων DQF COSY και NOESY. Δείγμα γνωστής συγκέντρωσης του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5')₂ τιτλοδοτήθηκε με τα Λ1 και Δ1 έως αναλογίας 1:1. Κατά την τιτλοδότηση δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση νέων ταινιών αλλά μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των σημάτων που καταγράφηκαν έως αναλογία 1:1. Γενικά το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στην γρήγορη ισορροπία – ανταλλαγή η οποία όπως αναμένεται συμβαίνει για τέτοιου είδους μη ισχυρές αλληλεπιδράσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στην κλίμακα χρόνου του οργάνου, ανάμεσα στην δεσμευμένη μορφή του συμπλόκου στο ολιγονουκλεοτίδιο και στις ελεύθερες μορφές του συμπλόκου και ολιγονουκλεοτιδίου σύμφωνα με την ισορροπία :



Στους πίνακες 3.1.7 και 3.1.9, φαίνονται οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των διαστερομερών συμπλόκων και του ολιγονουκλεοτιδίου, αντίστοιχα κατά την αλληλεπίδραση σε αναλογία 1:1 ενώ στα σχήματα 3.1.41 και 3.1.42 περιοχή φασμάτων TOCSY για τα αρωματικά πρωτόνια των Λ1 και Δ1 συμπλόκων όπου δίνονται αυτές οι μεταβολές.

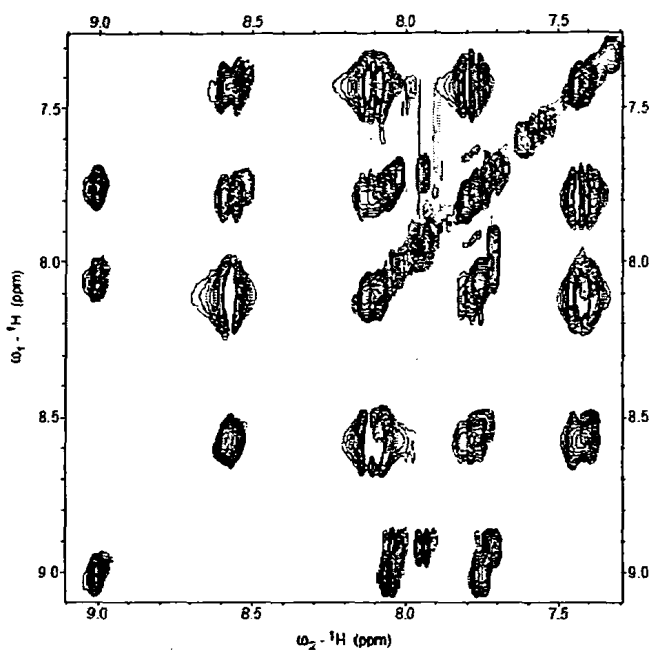
Πίνακας 3.1.7. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR των συμπλόκων Λ1 και Δ1 παρουσία του d(3'-CGCGCG-5')₂ σε αναλογία 1:1, pH = 7.00 (0.1 M Na₂HPO₄/NaH₂(PO₄)₂) στους 298K σε D₂O.

Πρωτόνια	Λ1	Δ1
	Δ(δ)	Δ(δ)
bpy H3H3'	-0.04	-0.07
bpy H4H4'	-0.08	-0.06
bpy H5H5'	-0.04	-0.08
bpy H6H6'	-0.04	-0.09
4,4'-dcbpy H3H3'	-0.03	-0.05
4,4'-dcbpy H5H5'	-0.05	-0.07
4,4'-dcbpy H6H6'	-0.03	-0.09
Hα-Lys	-0.06	-0.08
Hβ-Lys	-0.03	-0.05
Hγ-Lys	-0.03	-0.05
Hδ-Lys	-0.05	-0.05
Hε-Lys	-0.06	-0.00

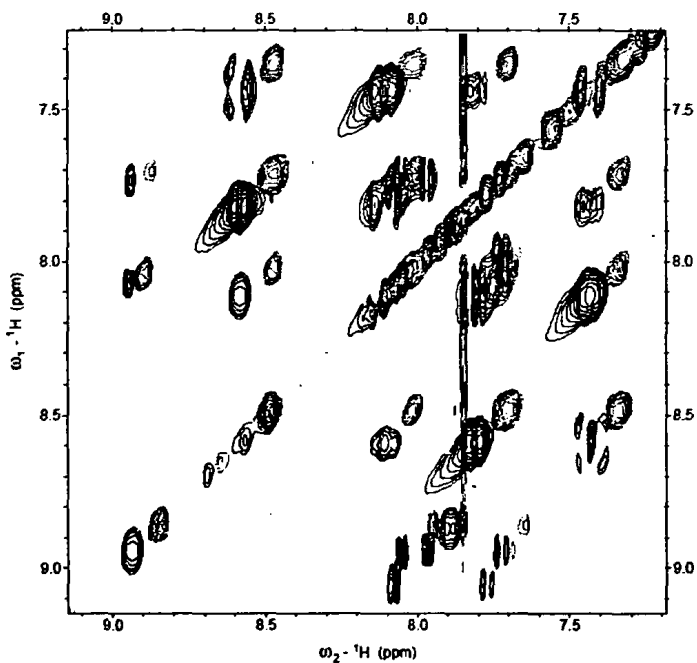
Πίνακας 3.1.8. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR του d(3'-CGCGCG-5')₂ παρουσία των συμπλόκων Λ1 και Δ1 σε αναλογία 1:1, pH = 7.00 (0.1 M Na₂HPO₄/NaH₂(PO₄)₂) στους 298K σε D₂O.

	H8/H6		H5		H1'		H2'		H2''		H3'	
	Λ1	Δ1	Λ1	Δ1	Λ1	Δ1	Λ1	Δ1	Λ1	Δ1	Λ1	Δ1
C1	+0.03	+0.04	+0.06	+0.04	+0.05	+0.03	+0.05	+0.02	+0.05	+0.02	+0.05	+0.02
G2	+0.03	+0.02			+0.05	+0.01	+0.05	+0.00	+0.05	+0.01	+0.05	+0.01
C3	+0.03	+0.01	+0.05	+0.03	+0.03	+0.02	+0.03	+0.02	+0.03	+0.00	+0.03	+0.01
G4	+0.03	+0.04			+0.04	+0.01	+0.03	+0.02	+0.03	+0.01	+0.03	+0.02
C5	+0.04	+0.02	+0.05	+0.02	+0.06	+0.02	+0.06	+0.02	+0.04	+0.00	+0.06	+0.02
G6	+0.06	+0.05			+0.04	+0.01	+0.05	+0.02	+0.04	+0.02	+0.06	+0.02





Σχήμα 3.1.41. Περιοχή φασμάτων TOCSY για τα αρωματικά πρωτόνια. (μπλε Δ1 και κίτρινο Δ1 με ολιγονουκλεοτίδιο).



Σχήμα 3.1.42. Περιοχή φασμάτων TOCSY για τα αρωματικά πρωτόνια. (κόκκινο Δ1 και πράσινο Δ1 με ολιγονουκλεοτίδιο).

Πιο αναλυτικά τα φάσματα ^1H NMR των συμπλόκων Δ1 και Δ1 σε αναλογία 1:1 με το ολιγονουλεοτίδιο παρουσιάζουν απλά σήματα συντονισμού, μετατοπισμένα σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο και το σύμπλοκο, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι το σύστημα ολιγονουκλεοτιδίου-δεσμευμένου συμπλόκου (DNA - Ru), (το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο = DNA και το ελεύθερο σύμπλοκο = Ru) βρίσκονται σε γρήγορη ανταλλαγή (στην κλίμακα χρόνου του NMR και σε θερμοκρασία δωματίου). Έτσι οι ταινίες συντονισμού που παρατηρούνται στα φάσματα ^1H NMR δεν προέρχονται απαραίτητα από ένα σωματίδιο αλλά μπορεί να αποτελούν το μέσο όρο διαφορετικών μορφών DNA - Ru σαν αποτέλεσμα μιας μη ειδικής δέσμευσης των διαστερομερών συμπλόκων στο ολιγονουκλεοτίδιο.

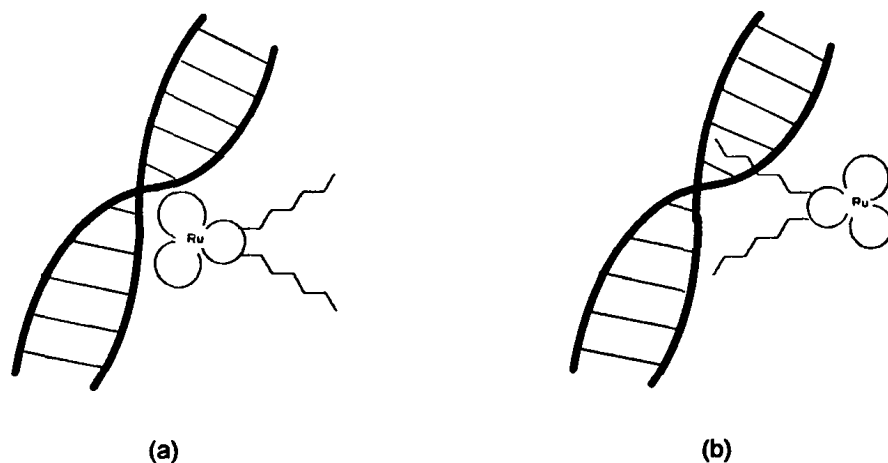
Τα σήματα των πρωτονίων των bry των δύο διαστερομερών συμπλόκων μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία, σε μεγαλύτερο βαθμό στην περίπτωση του Δ1 ισομερούς. Τα μεγέθη αυτών των μετατοπίσεων δείχνουν ότι οι δυπιριδιλικοί δακτύλιοι αλληλεπιδρούν με το ολιγονουκλεοτίδιο χωρίς όμως να παρεμβάλλονται ανάμεσα στις νουκλεϊνικές βάσεις. Είναι γνωστό ότι η παρεμβολή ανάμεσα στις βάσεις προκαλεί μεγάλες μετατοπίσεις των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων του συμπλόκου προς υψηλότερα πεδία (0.3 - 1.0 ppm) λόγω της αύξησης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας από τα π-αρωματικά νέφη των βάσεων του DNA. Ακόμη στις περιπτώσεις παρεμβολής μορίων ανάμεσα στις βάσεις του DNA παρατηρείται μια σημαντική διεύρυνση των σημάτων λόγω μιας ενδιάμεσης κινητικής για την αντίδραση $\text{DNA} + \text{Ru} \leftrightarrow \text{DNA} - \text{Ru}$ [158]. 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 αποστάσεως [159, 160]. Η παρατηρούμενη μετατόπιση ~ 0.1 ppm προς υψηλότερα πεδία αντιστοιχεί σε κάθετη απόσταση μεταξύ των επιπέδων των βάσεων και των αρωματικών πρωτονίων του bry περίπου 5 Å, η οποία δεν είναι αρκετή για να αποδοθεί σε δέσμευση μέσω παρεμβολής μεταξύ των βάσεων. Έτσι μικρότερες μεταβολές που παρατηρούνται στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων μπορούν να αποδοθούν σε δέσμευση του συμπλόκου με άλλους τρόπους, όπως δέσμευση στις αύλακες του DNA. Γενικά, τα μόρια που δεσμεύονται στις αύλακες του DNA αλληλεπιδρούν με τα άκρα των αρωματικών δακτυλίων των βάσεων, με αποτέλεσμα την μικρότερη από 0.1 ppm χημική μετατόπιση των πρωτονίων του μορίου [161]. Σύμπλοκα με υποκαταστάτες παρόμοιους με το bry, όπως στην περίπτωση του



$[\text{Ru}(\text{Me}_2\text{bpy})_2(\mu\text{-brpm})]^{4+}$ ($\mu\text{-brpm} = 2,2'$ -διπυριμιδίνη), δεσμεύονται στην ελάσσονα αύλακα του DNA και προκαλούν ανάλογες μεταβολές (< 0.1 ppm) στα σήματα των πρωτονίων του υποκαταστάτη [162]. Επίσης, παρατηρήθηκαν μικρές μεταβολές (< 0.2 ppm) στις χημικές μετατοπίσεις των πυριδυλικών και αλειφατικών πρωτονίων του υποκαταστάτη picchxnMe_2 ($\text{picchxnMe}_2 = \text{N,N}'$ -διμέθυλ- $\text{N,N}'$ -δι(2-πικολίλο)-1,2-διαμινοκυκλοεξάνιο) του συμπλόκου $\Delta\text{-cis-}\alpha\text{-}[\text{Ru}(\text{RR-picchxnMe}_2)(\text{phen})]^{2+}$, το οποίο δεσμεύεται επίσης στην ελάσσονα αύλακα των ολιγονουκλεοτιδίων $[\text{d}(\text{CGCGATCGCG})_2]$ και $[\text{d}(\text{ATATCGATAT})_2]$ [163]. Ακόμη είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ με DNA το οποίο δεσμεύεται στο DNA χωρίς να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις αλλά μάλλον δεσμεύεται στις αύλακες προκαλώντας ανάλογες μεταβολές στα σήματα των διπυριδιλίων [41]. Οι μικρές αυτές μεταβολές που παρατηρούνται στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των συμπλόκων $\Delta 1$ και $\Delta 1$ μπορούν ακόμη να αποδοθούν σε έναν μη ειδικό τρόπο δέσμευσης, σε περισσότερες δηλαδή από μία θέσεις ή τρόπους δέσμευσης τους στο $\text{d}(3'\text{-CGCGCG-}5')$ και κατά συνέπεια την εμφάνιση ενός μέσου όρου μετατοπίσεων ως την παρατηρούμενη μεταβολή.

Τα αρωματικά πρωτόνια των διπυριδιλίων του υποκαταστάτη Y1 παρουσιάζουν μικρές μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία (< 0.1 ppm) και για τα δύο ισομερή. Επιπλέον, τα πρωτόνια της λυσίνης μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία, πιθανότατα λόγω αλληλεπίδρασης της θετικά φορτισμένης NH_3^+ τελικής αμινομάδας της λυσίνης με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA προσφέροντας σχετική αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε γειτονικά πρωτόνια. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης του τριπεπτιδίου Lys-Tyr-Lys με το τετρανουκλεοτίδιο $\text{d}(5'\text{-GCGC-}3')$, όπου η λυσίνη αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με το φωσφοδιεστερικό σκελετό του DNA [164]. Ανάλογες μετατοπίσεις παρατηρούνται επίσης, κατά την ηλεκτροστατική δέσμευση του πεπτιδίου Lys-Tyr-Lys μέσω των λυσίνων στους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς του DNA [165]. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK-bpy})]\text{Cl}_2$ παρατηρήθηκε μετατόπιση του ίδιου μεγέθους προς υψηλότερα πεδία των πρωτονίων της λυσίνης που έχει επίσης αποδοθεί σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις της θετικά φορτισμένης NH_3^+ τελικής αμινομάδας της λυσίνης με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA [111].

Σε μια προσπάθεια να διευκρινιστεί πιθανή εναντιοεκλεκτική δέσμευση των δύο ισομερών $\Lambda 1$ και $\Delta 1$ συσχέτισαμε της παρατηρούμενες μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των συμπλόκων με τον προσανατολισμό του αντίστοιχου ισομερούς κατά την αλληλεπίδραση με το ολιγονουκλεοτίδιο. Έτσι στο σύμπλοκο $\Lambda 1$ παρατηρείται μια μεγαλύτερη μετατόπιση των πρωτονίων $H4H4'$ στα άκρα των δύο διπυριδιλίων καθώς και μια σημαντική μετατόπιση των $H\alpha$ και $H\epsilon/H\delta$ της λυσίνης. Καθώς τα τμήματα του ισομερούς $\Lambda 1$ όπου παρατηρούνται οι μεταβολές αυτές βρίσκονται μάλλον σε απόσταση μεταξύ τους, συνάγεται το συμπέρασμα ότι πιθανώς οφείλονται σε διαφορετικό προσανατολισμό του συμπλόκου κατά τη δέσμευσή του και θα μπορούσαν να αποδοθούν σε δύο τουλάχιστον μορφές δέσμευσης του συμπλόκου στο DNA σε ισορροπία (σχήμα 3.1.43). Εναλλακτικά είναι πιθανόν η διαμόρφωση του $\Lambda 1$ (σχήμα 3.1.15) να ευνοεί αλληλεπίδραση του συμπλόκου με έναν προσανατολισμό όπου και τα αλειφατικά πρωτόνια της λυσίνης αλλά και τα διπυριδύλια να βρίσκονται κοντα στην έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου.

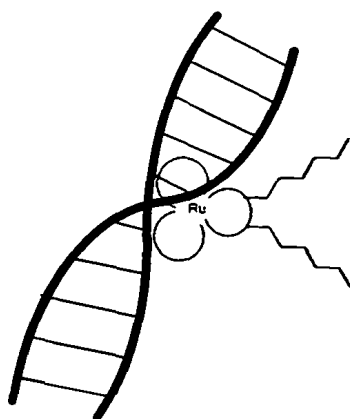


Σχήμα 3.1.43. Σχηματική αναπαράσταση της δέσμευσης του $\Lambda 1$ διαστερομερούς με το DNA. (a) τα δύο διπυριδύλια του συμπλόκου προσανατολίζονται προς την έλικα του DNA (b) οι αμινομάδες της λυσίνης αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις φωσφορικές ομάδες του ολιγονουκλεοτιδίου δίνοντας στο σύμπλοκο αντίθετο προσανατολισμό από το (a).

Τα πιο πάνω σχήματα θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν και τις μικρότερες μετατοπίσεις που παρατηρούνται σε όλα τα πρωτόνια του $Y1$, όπου και στις δυο περιπτώσεις βρίσκεται αρκετά μακριά από την διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου. Για την μεταβολή κατά 0.6 ppm

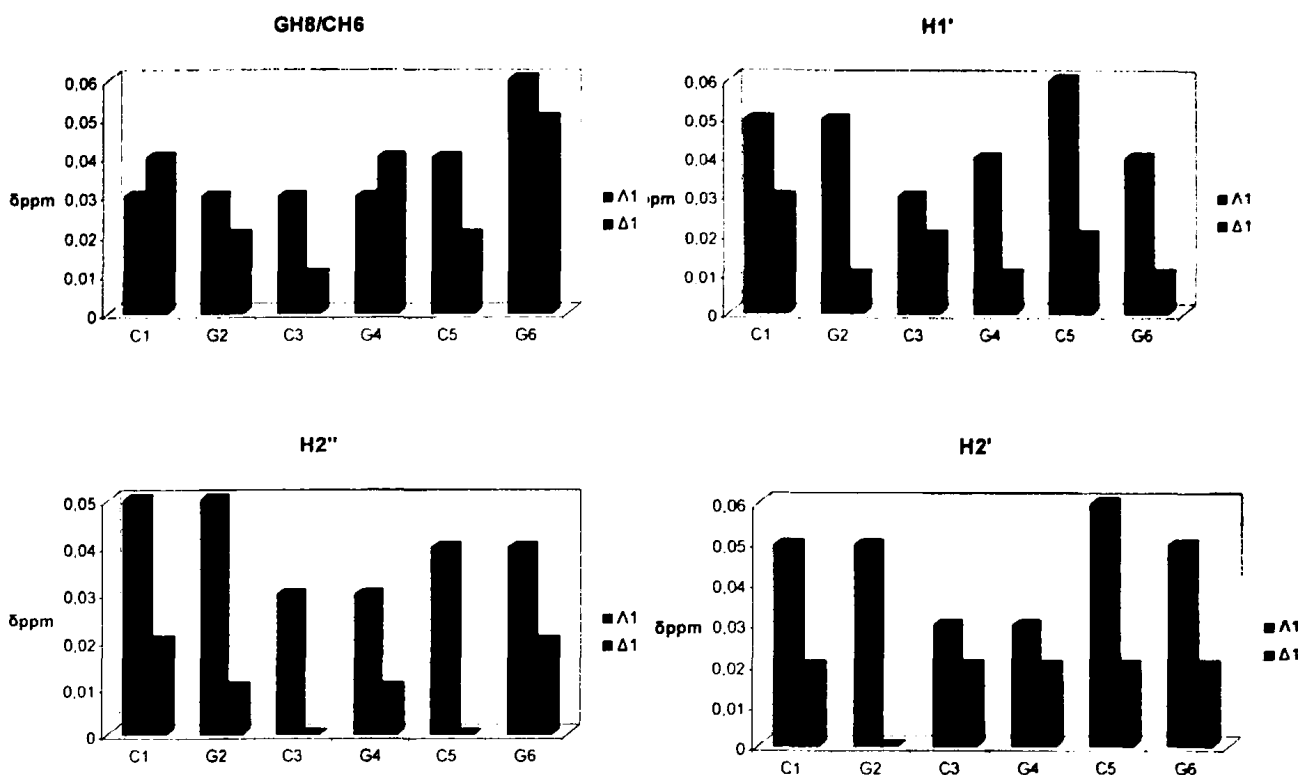
του Ηα της λυσίνης, ενδεχομένως ευθύνεται η συμμετοχή του τελικού $-\text{CONH}_2$ ή/και του ΝΗ του πεπτιδικού δεσμού σε ασθενή αλληλεπίδραση με την έλικα του DNA.

Για το Δ1 παρατηρούνται μεγαλύτερες μετατοπίσεις στα αρωματικά πρωτόνια των bry και του Y1, ενώ αντίθετα για τα αλειφατικά πρωτόνια της λυσίνης καθώς και το Ηε που βρίσκεται κοντά στη τελική NH_3^+ δεν παρατηρούνται αξιόλογες μεταβολές. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί με ένα πιο ειδικό τρόπο σύνδεσης του Δ1 με το ολιγονουκλεοτίδιο κατά τον οποίο οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μέσω των NH_3^+ της λυσίνης με τις φωσφορικές ομάδες του DNA αποτελούν μόνο πολύ μικρό ποσοστό του συνολικού τρόπου δέσμευσης (σχήμα 3.1.44).



Σχήμα 3.1.44. Σχηματική αναπαράσταση της δέσμευσης του Δ1 διαστερομερεούς με το DNA. Ο προσανατολισμός του συμπλόκου είναι ανάλογος εκείνου του Λ1 ισομερούς με τα διπυριδύλια προς την έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου.

Εξετάζοντας στη συνέχεια τις μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου παρατηρούμε ότι τα δυο ισομερή Λ1 και Δ1 δεν προκαλούν τις ίδιες μεταβολές στα σήματα των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου. Στα πιο κάτω διαγράμματα δίνονται οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου για τα δύο ισομερή.



Σχήμα 3.145. Διαγράμματα όπου φαίνονται οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου για τα δύο ισομερή (Λ1 μπλε και Δ1 κόκκινο).

Μπορούμε να ομαδοποιήσουμε τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου σε εκείνα που βρίσκονται κοντά στην κύρια αύλακα (GH8, CH6, CH5) και εκείνα που βρίσκονται στο εσωτερικό της δευτερεύουσας αύλακας, σχηματίζοντας υδρόφοβα τοιχώματα, που είναι τα πρωτόνια H1', H2', H2'' του σακχάρου [153].

Από τα διαγράμματα παρατηρούμε ότι τα δύο διαστερομερή επιδρούν στην κύρια αύλακα με ανάλογο τρόπο χωρίς να υπάρχει πρακτικά διάκριση και μάλιστα προκαλούν μεγαλύτερες μεταβολές στα αρωματικά πρωτόνια των δύο ακραίων βάσεων C1 και G6. Έτσι καθώς τα σύμπλοκα αυτά συνδέονται με περισσότερο από ένα τρόπο στο ολιγονουκλεοτίδιο θα μπορούσαμε να πούμε ότι ένα μέρος τους δεσμεύεται στις άκρες της έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου προσεγγίζοντάς την από την κύρια αύλακα. Σε ότι αφορά τις μεταβολές που παρατηρούνται στα σήματα συντονισμού των πρωτονίων που εντοπίζονται στη δευτερεύουσα αύλακα το Λ1 ισομερές δεσμεύεται πιθανότατα περισσότερο στις ακραίες βάσεις C1 και G6 και λιγότερο στην κεντρική αλληλουχία G2C3G4C5.



Εναλλακτικά μπορούμε να θεωρήσουμε ότι και τα δύο ισομερή δεσμεύονται παρόμοια στα άκρα από την κύρια αύλακα ενώ οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του σακχάρου που παρατηρούνται περισσότερο για το Λ1 ισομερές μπορεί να οφείλονται στην διαταραχή της δομής της διπλής έλικας και μόνο, καθώς το Δ1 ισομερές εμφανίζει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το φωσφοδιεστερικό σκελετό του DNA.

Τα NH πρωτόνια των G που μετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου βρίσκονται στο κέντρο της έλικας και φαίνεται να επηρεάζονται παρόμοια και από τα δύο ισομερή. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το Λ1 ισομερές προκαλεί μεγαλύτερη μεταβολή στη χημική μετατόπιση των N-H που βρίσκονται στην δευτερεύουσα αύλακα της έλικας.

Πίνακας 3.1.9. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων d(3'-CGCGCG-5')₂ παρουσία των συμπλόκων Λ1 και Δ1 σε αναλογία 1:1, pH = 7.00 (0.1M Na₂HPO₄ / NaH₂(PO₄)₂) στους 298K σε D₂O.

	NH (G)		NH ₂		NH ₂ *	
	Λ1	Δ1	Λ1	Δ1	Λ1	Δ1
G2-C3	+0.05	+0.04	+0.04	+0.04	+0.07	+0.05
G4-C5	+0.05	+0.04	+0.05	+0.05	+0.06	+0.04
C1-G6	+0.05	+0.04	+0.05	+0.02		

*Αμινομάδα που συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου

Έτσι, από την μελέτη των αλληλεπιδράσεων των συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂ bpy)](PF₆)₄ με το ολιγονουκλεοτίδιο d(3'-CGCGCG-5')₂ προκύπτει ότι:

(i) Οι μικρές μεταβολές που παρατηρούνται στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των συμπλόκων αποκλείουν κάθε περίπτωση παρεμβολής των αρωματικών υποκαταστατών στις βάσεις του ολιγονουκλεοτιδίου. Είναι όμως αρκετές για να συνηγορήσουν υπέρ της δέσμευσης των συμπλόκων στην έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου. Για το μεν Λ1 ισομερές οι μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του εντοπίζεται σε δύο «περιοχές» του συμπλόκου που δεν μπορούν να οδηγήσουν σε ένα μόνο τρόπο δέσμευσής του. Έτσι το σύμπλοκο φαίνεται να αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά μέσω των θετικά φορτισμένων τελικών

αμινομάδων της λυσίνης με τον φωσφορικό σκελετό, αλλά και με δέσμευση των διπυριδυλίων στην αύλακα του ολιγονουκλεοτιδίου. Είναι όμως πιθανόν η διαμόρφωση του $\Lambda 1$ όπως έχει προταθεί στο σχήμα 3.1.44 να φέρνει κοντά στην έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου τόσο τα πρωτόνια των διπυριδυλίων όσο και εκείνα της λυσίνης. Για το $\Delta 1$ ισομερές η δέσμευση του στο ολιγονουκλεοτίδιο γίνεται από την πλευρά των διπυριδυλίων μάλλον ειδικότερα σε σχέση με το $\Lambda 1$ ισομερές. Τα παραπάνω δείχνουν ότι το συζευγμένο αμινοξύ επιδρά στον προσανατολισμό του συμπλόκου όταν δεσμεύεται στην έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου.

(ii) Η απουσία σημάτων NOE κατά την αλληλεπίδραση δείχνει πως η απόσταση ανάμεσα στο σύμπλοκο και το ολιγονουκλεοτίδιο είτε είναι μεγαλύτερη από 5 Å είτε και το πιθανότερο ότι τα σήματα αυτά «διαχέονται» από την μη ειδική δέσμευση και την γρήγορη ισορροπία ώστε να είναι πολύ ασθενή.

(iii) Σε ότι αφορά το σημείο δέσμευσης των ισομερών συμπλόκων στο ολιγονουκλεοτίδιο αυτό φαίνεται να εντοπίζεται στην κύρια αύλακα και κυρίως κοντά στις ακραίες βάσεις G1 και G6 με ανάλογο τρόπο και για τα δύο ισομερή.



3.1.5. Αλληλεπιδράσεις με DNA

Για να διερευνηθεί περισσότερο ο τρόπος που τα σύμπλοκα $\Lambda 1$, $\Delta 1$, $\Lambda 2$, $\Delta 2$, $\Lambda 3$ και $\Delta 3$ αλληλεπιδρούν με το DNA πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πειραμάτων χρησιμοποιώντας μια ποικιλία τεχνικών.

3.1.5.1. Σημείο τήξης του DNA (T_m)

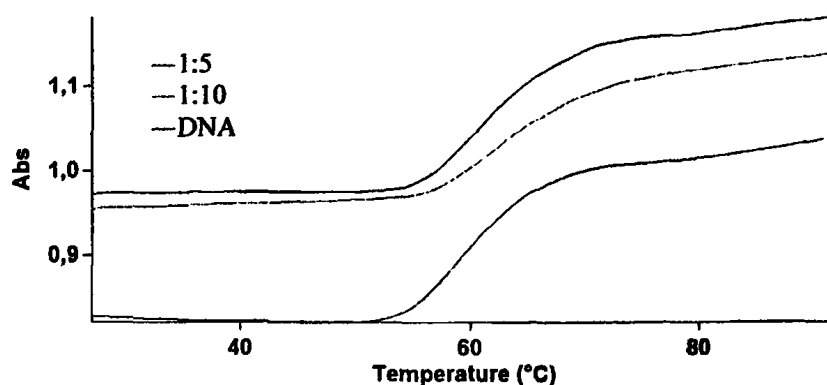
Όπως είναι γνωστό, η διπλή έλικα του DNA αποτελείται από δύο κλώνους που συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι σχηματίζονται μεταξύ των βάσεων γουανίνη - κυτοσίνη και αδενίνη - θυμίνη. Η αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας πραγματοποιείται όταν όλοι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο κλώνων σπάσουν και οι κλώνοι αλλάζουν δομή στο χώρο, αποκτώντας τυχαία διάταξη. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μετουσίωση του DNA. Η διαδικασία της μετουσίωσης είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία, γεγονός που μας επιτρέπει να μελετήσουμε την επαναδιευθέτηση των δεσμών κατά την διάρκεια θέρμανσης και στη συνέχεια ψύξης των διαλυμάτων. Η αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας μπορεί να προκληθεί από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η αύξηση της θερμοκρασίας, η συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών ή ακόμη μπορεί να προκληθεί και σε ακραίες τιμές του pH. Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί πολλές φυσικές μεταβολές, όπως την αύξηση της πυκνότητας του συστήματος, την μείωση του ιξώδους των διαλυμάτων και την αύξηση της απορρόφησης στα 260 nm. Σύμπλοκες ενώσεις είναι δυνατό να προκαλέσουν είτε την σταθεροποίηση της διπλής έλικας, δημιουργώντας δεσμούς μεταξύ των δύο κλώνων της, είτε την αποσταθεροποίηση, συνήθως σε σύμπλοκα που δρουν μονοδραστικά. Ειδικότερα στην περίπτωση των συμπλόκων που δεν αλληλεπιδρούν με απευθείας δεσμό, διαπιστώθηκε ότι προκαλούν μεταβολή στο σημείο τήξεως του DNA (T_m), είτε σταθεροποιώντας την διπλή έλικα είτε αποσταθεροποιώντας την, ανάλογα με το είδος της αλληλεπίδρασής τους.

Έτσι οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων του τύπου Λ - ή Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Yn})]^{2+}$ με CT-DNA μελετήθηκαν με βάση την διαφορά που προκαλούν στο T_m του CT-DNA (ΔT_m) προκειμένου να διαπιστωθεί αν σταθεροποιούν ή αποσταθεροποιούν την έλικα του. Για να υπολογιστούν τα T_m , καταγράφονται οι καμπύλες τήξης του CT-DNA με μέτρηση της

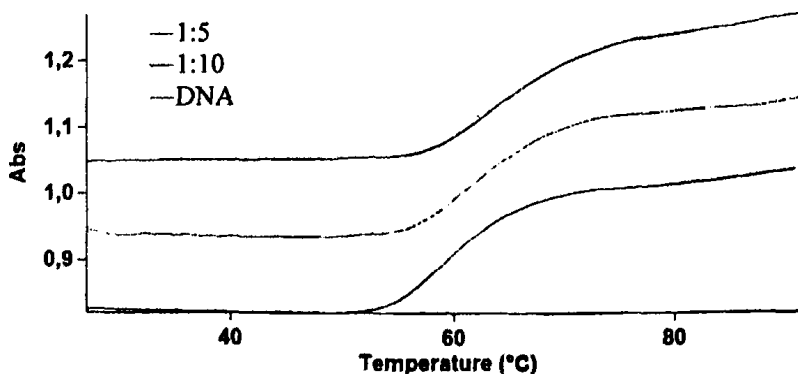
απορρόφησης στα 260 nm και σχηματίζονται τα διαγράμματα που δείχνουν την απορρόφηση σε συνάρτηση με την θερμοκρασία. Παρακάτω παραθέτουμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν για όλα τα σύμπλοκα.

3.1.5.1.1. Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ (Λ1 και Δ1)

Η μεταβολή του σημείου τήξης του DNA με την προσθήκη των συμπλόκων Λ1 και Δ1 έγινε σε δύο διαφορετικές αναλογίες για να διαπιστωθεί και η επίδραση της συγκέντρωσης των συμπλόκων στο DNA. Στα πιο κάτω διαγράμματα δίνονται οι καμπύλες τήξης του CT-DNA με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm.



Σχήμα 3.1.46. Καμπύλη τήξης για το Λ1.



Σχήμα 3.1.47. Καμπύλη τήξης για το Δ1.

Από τα σημεία μεταβολής της θερμοκρασίας υπολογίζονται τα T_m και ΔT_m (T_m Ru:DNA – T_m DNA) που δίνονται στον πίνακα 3.1.10.

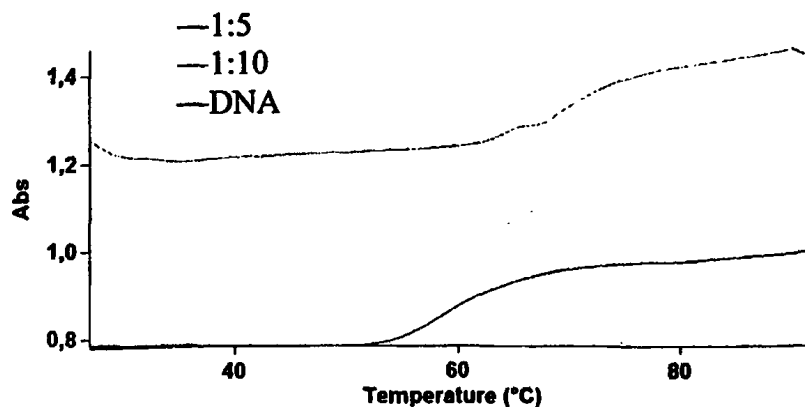
Πίνακας 3.1.10. Θερμοκρασία τήξης του DNA με τα σύμπλοκα $\Lambda 1$ και $\Delta 1$ σε αναλογίες 1:10 και 1:5 (σύμπλοκο : βάση).

	$\Delta 1$:CT-DNA (1:10)	$\Delta 1$:CT-DNA (1:5)	$\Lambda 1$:CT-DNA (1:10)	$\Lambda 1$:CT-DNA (1:5)	CT-DNA $8 \cdot 10^5$
T_m	61°C	63°C	60,5°C	62°C	59.0°C
ΔT_m	2.0°C	4.0°C	1.5°C	3.0°C	

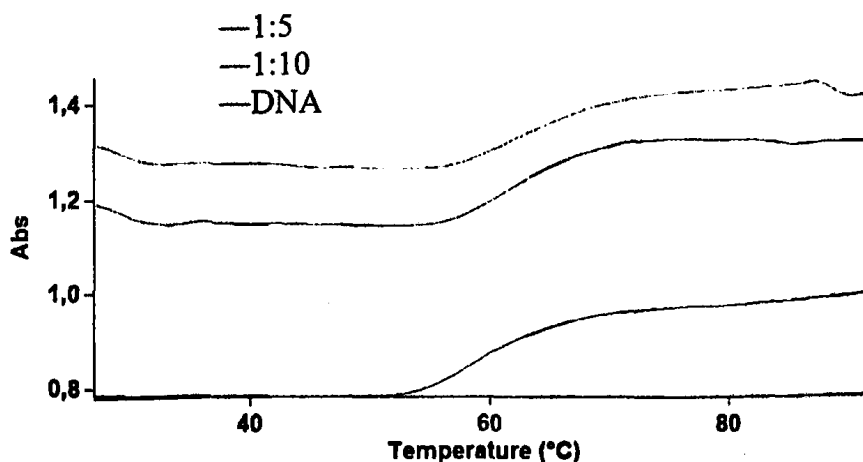
Κατά την προσθήκη των συμπλόκων $\Lambda 1$ και $\Delta 1$ το σημείο τήξης του DNA αυξάνεται κατά $\Delta T_m = +1.5$ έως 4 °C. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 3.1.10, η αύξηση της αναλογίας συμπλόκου : DNA επιφέρει μεγαλύτερη αύξηση του σημείου τήξης. Έτσι το σύμπλοκο $\Lambda 1$ αυξάνει το σημείο τήξης κατά $\Delta T_m = +3$ °C ενώ το $\Delta 1$ κατά $\Delta T_m = +4$ °C. Η αύξηση αυτή του σημείου τήξης του DNA προκαλείται από την σταθεροποίηση της διπλής έλικας και μπορεί να οφείλεται στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας από τα κατιοντικά σύμπλοκα ή ακόμη και από τη σύνδεση του συμπλόκου στις αύλακες του DNA. Είναι γνωστό ότι τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις προκαλούν αύξηση του T_m ενώ μεγαλύτερη αύξηση $\sim 10^\circ\text{C}$ προκαλούν μόρια που παρεμβάλλονται στο DNA [166]. Ακόμη, η διαφορά ανάμεσα στις τιμές του ΔT_m για τα δύο σύμπλοκα είναι μικρή με το $\Delta 1$ να σταθεροποιεί σχετικά περισσότερο τη διπλή έλικα. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το $\Delta 1$ δεσμεύεται περισσότερο ειδικά από το $\Lambda 1$ στην κύρια αύλακα της αλληλουχίας $d(\text{CGCGCG})_2$, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η σύνδεση αυτή ευνοεί περισσότερο την σταθερότητα της διπλής έλικας από ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των λυσινών με τον φωσφορικό σκελετό που βρέθηκε αντίστοιχα για το $\Lambda 1$.

3.1.5.1.2. Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂ (Λ2 και Δ2)

Στην περίπτωση των συμπλόκων Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂ βρέθηκε ότι το σημείο τήξης του DNA αυξήθηκε με την προσθήκη των συμπλόκων στις αναλογίες 1:5 και 1:10 (σύμπλοκο : CT-DNA). Έτσι σε αναλογίες 1:5 παρατηρήθηκε αύξηση για το Λ2 κατά $\Delta T_m = +10.3^\circ\text{C}$ και για το Δ2 κατά $\Delta T_m = +3^\circ\text{C}$ και σε αναλογίες 1:10 παρατηρήθηκε αύξηση για το Λ2 κατά $\Delta T_m = +7.2^\circ\text{C}$ και για το Δ2 κατά $\Delta T_m = +2.9^\circ\text{C}$.



Σχήμα 3.1.48. Καμπύλη τήξης για το Λ2.



Σχήμα 3.1.49. Καμπύλη τήξης για το Δ2.

Πίνακας 3.1.11. Θερμοκρασία τήξης του DNA με τα σύμπλοκα Λ2 και Δ2 σε αναλογίες 10:1 και 5:1 (βάση : σύμπλοκο).

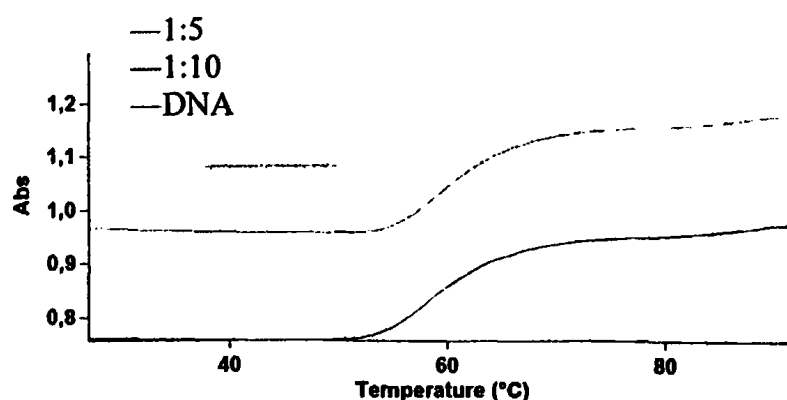
	<i>Δ2:CT-DNA</i> (1:10)	<i>Δ2:CT-DNA</i> (1:5)	<i>Λ2:CT-DNA</i> (1:10)	<i>Λ2:CT-DNA</i> (1:5)	<i>CT-DNA</i> 8.10^5
<i>T_m</i>	61.4°C	61.5°C	65.7°C	68.8°C	58.5°C
<i>ΔT_m</i>	2.9°C	3.0°C	7.2°C	10.3°C	

Η αύξηση του σημείου τήξεως στην περίπτωση του συμπλόκου Λ2 είναι σαφώς μεγαλύτερη από την περίπτωση των συμπλόκων Λ1 και Δ1, γεγονός που δείχνει την διαφορετική συνεισφορά τόσο του συζευγμένου αμινοξέως στο σύμπλοκο, όσο και τον ρόλο του χειρικού κέντρου του μετάλλου στην σταθεροποίηση της διπλής έλικας του DNA. Η αύξηση κατά 10.3 °C στην αναλογία 1:5 και 7.2 °C στην αναλογία 1:10 είναι ανάλογη με εκείνη κλασικών συμπλόκων του Ru με dpprz και 1,10- φαινανθρολίνη που δεσμεύονται με παρεμβολή όπως το $[Ru(Im)(dpprz)]^{2+}$ που προκαλεί αύξηση του T_m κατά 12.0 °C [167], του $[Ru(NH_3)_4dpprz]^{2+}$ που προκαλεί αύξηση κατά 5.2 °C και του $[Ru(phen)_2dpprz]^{2+}$ που προκαλεί αύξηση κατά 9.1 °C [168].

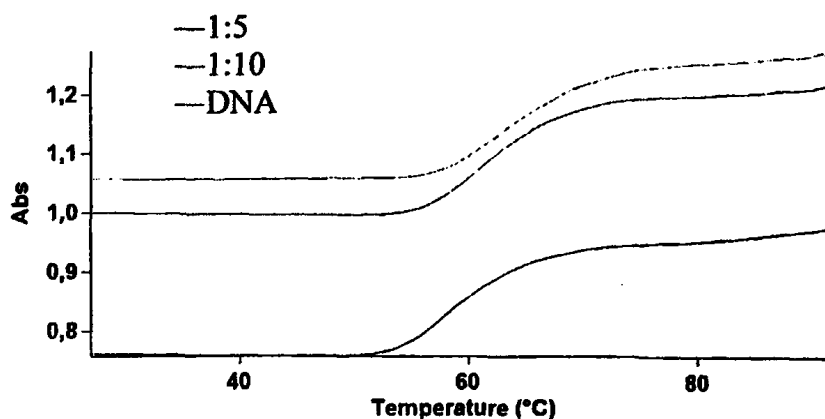
Από τα πιο πάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της His ενδεχομένως μπορεί να παρεμβάλλεται μερικώς μεταξύ των βάσεων του DNA ή ακόμη να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου δημιουργώντας όρους ώστε το σύμπλοκο Λ2 να συνδέεται σχετικά ισχυρά με την διπλή έλικα του DNA

3.1.5.1.3. Λ- και Δ- $[Ru(bpy)_2(4,4'-(COTyrCONH_2)_2bpy)]Cl_2$ (Λ3 και Δ3)

Η μεταβολή του σημείου τήξης του DNA με την προσθήκη των συμπλόκων Λ3 και Δ3 στις αναλογίες 1:5 και 1:10 (σύμπλοκο : βάση) παρουσιάζεται στις καμπύλες τήξης των σχήματα 3.1.50 και 3.1.51.



Σχήμα 3.1.50. Καμπύλη τήξης για το Λ3.



Σχήμα 3.1.51. Καμπύλη τήξης για το Δ3.

Πίνακας 3.1.12. Θερμοκρασία τήξης του DNA με τα συμπλοκα Λ3 και Δ3 σε αναλογίες 10:1 και 5:1 (βάση : σύμπλοκο).

	<i>Δ3:CT-DNA</i> (1:10)	<i>Δ3:CT-DNA</i> (1:5)	<i>Λ3:CT-DNA</i> (1:10)	<i>Λ3:CT-DNA</i> (1:5)	<i>CT-DNA</i> 8.10^5
<i>T_m</i>	61,1°C	62,7°C	59,4°C	59,2°C	58.0°C
<i>ΔT_m</i>	3.1°C	3.7°C	1.4°C	1.2°C	

Το σημείο τήξης του DNA απουσία των συμπλόκων βρέθηκε 58.0 °C και με την προσθήκη των συμπλόκων παρατηρήθηκε αύξηση. Έτσι σε αναλογίες 1:5 παρατηρήθηκε αύξηση για το Λ3 κατά $\Delta T_m = +1.2$ °C και για το Δ2 κατά $\Delta T_m = +4.7$ °C και σε αναλογίες

1:10 παρατηρήθηκε αύξηση για το $\Lambda 3$ κατά $\Delta T_m = +1.4$ °C και για το $\Delta 3$ κατά $\Delta T_m = +3.1$ °C.

Οι τιμές που παρατηρούνται για το $\Lambda 3$ είναι ιδιαίτερα μικρές δείχνοντας την ασθενή αλληλεπίδραση του συμπλόκου αυτού με το DNA. Καθώς για το $\Delta 3$ ισομερές παρατηρούνται σχεδόν τριπλάσιες τιμές (στην αναλογία 1:5) οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι υπάρχει εναντιοεκλεκτική σύνδεση των συμπλόκων αυτών με το DNA. Ακόμη, οι τιμές του $\Delta 3$ είναι ανάλογες των συμπλόκων $\Lambda 1$ και $\Delta 1$ δείχνοντας πιθανώς ένα ανάλογο τρόπο σύνδεσης.

Συμπερασματικά όλα τα σύμπλοκα που εξετάσαμε σταθεροποιούν την διπλή έλικα προκαλώντας αύξηση της τιμής του T_m . Στην περίπτωση των συμπλόκων Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{-bpy})](\text{PF}_6)_4$ δεν βρέθηκε ουσιαστική διάκριση ενώ στα σύμπλοκα Λ -, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4,4'-(\text{COHisCONH}_2)_2\text{-bpy})]\text{Cl}_2$ και Λ -, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4,4'-(\text{COTyrCONH}_2)\text{-bpy})]\text{Cl}_2$ βρέθηκε ότι το $\Lambda 2$ ισομερές και το $\Delta 3$ ισομερές σταθεροποιούν περισσότερο την διπλή έλικα από τα αντίστοιχα $\Delta 2$ και $\Lambda 3$.

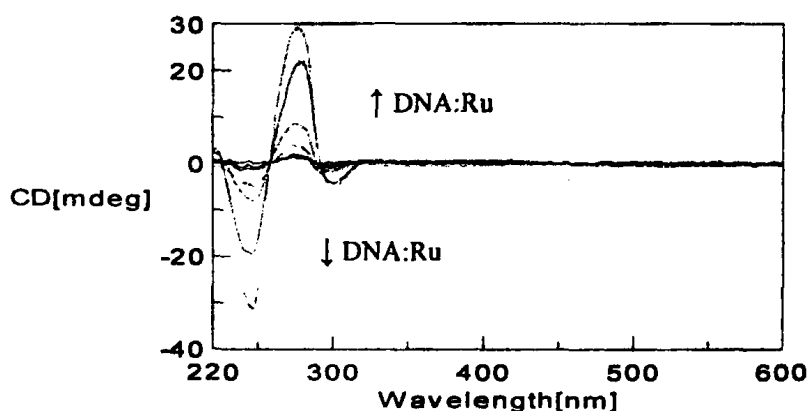
Το πιο πάνω φαινόμενο θα μπορούσε να ερμηνευτεί με το γεγονός ότι το συζευγμένο αμινοξύ είναι εκείνο που δημιουργεί τους όρους για μεγαλύτερη σταθεροποίηση της διπλής έλικας και όχι του χειρικού κέντρου του μετάλλου. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στο σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK-bpy})]\text{Cl}_2$ έχει βρεθεί ότι το Δ ισομερές σταθεροποιεί περισσότερο την διπλή έλικα κατά $\Delta T_m = +11$ °C από το Λ ισομερές ($\Delta T_m = +8.5$ °C). Σε μια γενικότερη κατάταξη σταθεροποίησης της διπλής έλικας του DNA θα μπορούσαμε να προτείνουμε την σειρά με βάση τις τιμές των ΔT_m και για την ίδια αναλογία συμπλόκου / DNA : $\Delta\text{-GHK} > \Lambda\text{-His} > \Lambda\text{-GHK} > \Delta\text{-Lys} > \Delta\text{-Tyr} > \Delta\text{-His} > \Lambda\text{-Lys} > \Lambda\text{-Tyr}$. Από την παραπάνω σειρά κατάταξης δεν μπορεί να προκύψει κάποιος γενικός κανόνας για τον ρόλο του χειρικού κέντρου του μετάλλου στη σταθεροποίηση της διπλής έλικας αλλά φαίνεται πως αυτό σχετίζεται με την όλη διαμόρφωση του συμπλόκου όπου εμπλέκονται και η φύση του συζευγμένου αμινοξέος. Αυτό δε, είναι προφανές καθώς το Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ προκαλεί μεταβολή του T_m του CT-DNA $\sim +1.2$ °C χωρίς πρακτική χειρική διάκριση.

3.1.5.2. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού

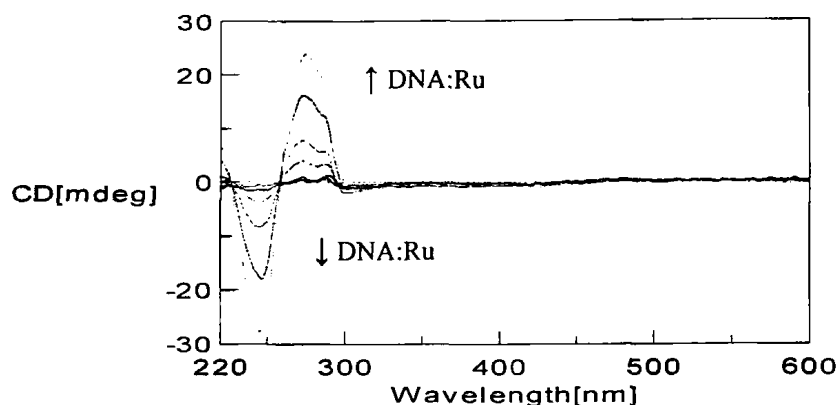
Οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων με γραμμικό CT-DNA μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού, προκειμένου να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται και οι αλλαγές που προκαλούν στη διαμόρφωση της διπλής έλικας. Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD) είναι μια ευαίσθητη φασματοσκοπική τεχνική που μας παρέχει πληροφορίες για τον τρόπο δέσμευσης ενός μορίου στο DNA σε σχέση με το είδος του μορίου, την συγκέντρωση του διαλύματος ή την αναλογία πρόσμιξης. Έτσι καταγράφηκαν φάσματα κατά την προσθήκη CT-DNA σε σταθερή συγκέντρωση συμπλόκων ($2 \cdot 10^{-5}$ M), σε αναλογίες (DNA : Ru) 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 και 12:1.

3.1.5.2.1. Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂-bpy)](PF₆)₄ (Λ1 και Δ1)

Στα σχήματα 3.1.52 και 3.1.53 παρουσιάζονται τα φάσματα CD για το σύμπλοκο Λ1 και Δ1 αντίστοιχα, κατά την τιτλοδότηση τους με CT-DNA. Στα φάσματα που παρατίθενται έχει αφαιρεθεί το αρχικό φάσμα του συμπλόκου από το φάσμα που προκύπτει κατά την τιτλοδότηση με το DNA, ώστε να παρατηρούνται μόνο οι μεταβολές που παρουσιάζονται στις ταινίες του DNA καθώς και νέα σήματα, αποκλειστικά οφειλόμενες στην αλληλεπίδραση με τα σύμπλοκα.



Σχήμα 3.1.52. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο Λ1 σε αναλογίες 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 και 12:1. Το βέλος συμβολίζει την αύξηση της αναλογίας DNA : Ru.



Σχήμα 3.1.53. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο $\Delta 1$ σε αναλογίες 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 και 12:1. Το βέλος συμβολίζει την αύξηση της αναλογίας DNA : Ru.

Έτσι, φαίνονται οι χαρακτηριστικές ταινίες του DNA Β-τύπου στα 278 nm και 245 nm που οφείλονται στη συσσώρευση των βάσεων και την διπλή έλικα του DNA μέχρι το τέλος της τιτλοδότησης, που σημαίνει ότι η έλικα διατηρεί την μορφή Β-τύπου σε όλες τις αναλογίες που εξετάζονται. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι στο σύμπλοκο $\Delta 1$ μια καινούρια αρνητική ταινία εμφανίζεται στα 300 nm σε αναλογίες 8:1 και 12:1. Η ταινία αυτή είναι πιθανόν να οφείλεται στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση του συμπλόκου $\Delta 1$ με το DNA. Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στα σύμπλοκα με γενικό τύπο $[\text{Ru}(\text{Ar-terpy})_2]\text{Cl}_2$ όπου Ar = anth (ανθρακένιο), bip (διφαινυλένιο), nap (ναφθαλένιο), phen (φαιναθρολίνη), pyg (πυρένιο) στα οποία σε παρόμοιες αναλογίες CT-DNA : συμπλόκου εμφανίζεται μια νέα ταινία στα 310 nm η οποία αποδίδεται σε μια ασθενή ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των πιο πάνω συμπλόκων με το DNA [169].

Κατά την αλληλεπίδραση του $\Delta 1$ με το DNA η ταινία αυτή δεν παρατηρείται, ενώ παρατηρείται ξεκινώντας από μικρές αναλογίες μια νέα ταινία (ώμος) στα 290 nm που συσχετίζεται με την συσσώρευση των βάσεων του DNA. Αυτή η διαφορά, ενδεχομένως αντανακλά στον διαφορετικό προσανατολισμό των αλυσίδων της λυσίνης στα δύο ισομερή από την αρχή ή κατά τη δέσμευσή τους, όπως είδαμε στην περίπτωση της αλληλεπίδρασής τους με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(3'-\text{CGCGCG}-5')_2$. Δηλαδή το γεγονός ότι η φορτισμένη ομάδα NH_3^+ της λυσίνης βρίσκεται μάλλον μακριά από τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στην περίπτωση του $\Delta 1$ προκαλεί την εμφάνιση του ώμου στα 290 nm ως αποτέλεσμα της

αλληλεπίδρασης των διπυριδιλίων με τις βάσεις του DNA με ανάλογο τρόπο όπως το $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ και το $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ [170, 94].

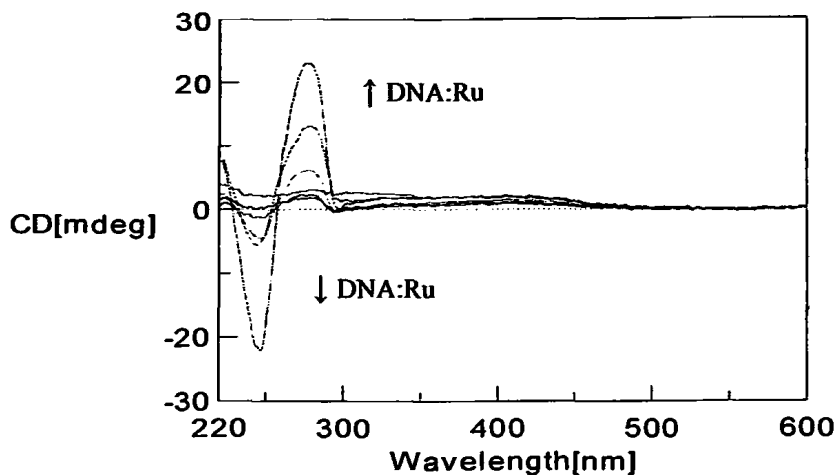
3.1.5.2.2. Λ- και Δ- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4,4'-(\text{COHisCONH}_2)_2\text{bpy})]\text{Cl}_2$ (Λ2 και Δ2)

Οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων Λ- και Δ- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4,4'-(\text{COHisCONH}_2)_2\text{bpy})]\text{Cl}_2$ με το DNA όπως προκύπτει από τον κυκλικό διχρωϊσμό φαίνονται στα σχήματα 3.1.54 και 3.1.55. Στα φάσματα παρατίθεται η αφαίρεση των σημάτων του συμπλόκου με το CT-DNA από το φάσμα του συμπλόκου πριν από την τιτλοδότηση, ώστε να παρατηρούνται οι μεταβολές που παρουσιάζονται στις ταινίες του DNA.

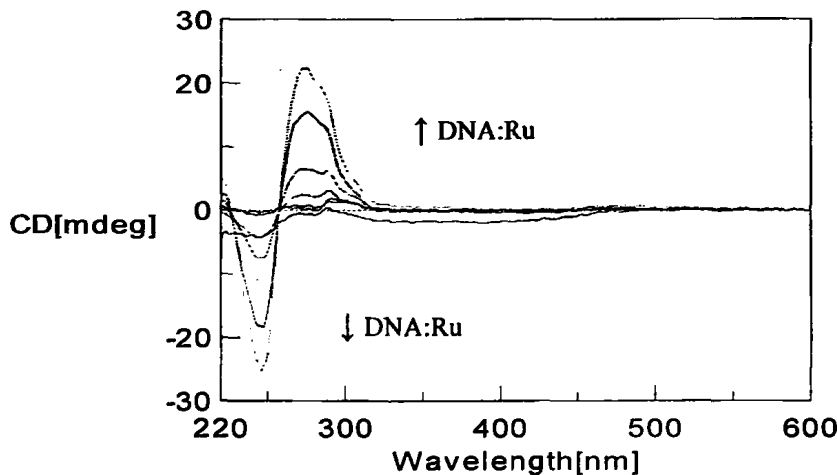
Όπως και στα σύμπλοκα Λ1 και Δ1 με την προσθήκη του CT-DNA παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες του DNA Β-τύπου στα 278 nm και 245 nm που οφείλονται στην αύξηση της συσσώρευσης των βάσεων και στην περιέλιξη της διπλής έλικας που σημαίνει ότι το DNA παραμένει Β- τύπου κατά την αλληλεπίδραση. Σε αντίθεση με το σύμπλοκο Λ1 το αντίστοιχο Δ2 της ιστιδίνης δεν εμφανίζει νέα ταινία στα 300 nm, γεγονός που αποδεικνύει ότι η θετικά φορτισμένη NH_3^+ της λυσίνης ήταν υπεύθυνη για το φαινόμενο αυτό. Ακόμη παρατηρείται μια εξαιρετικά απότομη μείωση στην ένταση της ταινίας στα 245 nm στις αναλογίες 8:1 και 12:1 που θα μπορούσε να αποδοθεί σε μερική παρεμβολή του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης στις βάσεις του DNA και σε μια σχετική αύξηση της περιέλιξης του DNA. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό και για άλλα (dppz) σύμπλοκα που παρεμβάλλονται στο DNA [167, 168].

Το Δ2 ισομερές αν και δεν παρουσιάζει διαφορά στον προσανατολισμό του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης στο σύμπλοκο (βλέπε χαρακτηρισμό 3.1.3.2.), εν τούτοις διαφέρει από το Λ1 αφού δεν εμφανίζει την απότομη μεταβολή στα 245 nm, την οποία επιφέρει το Λ1 σε μεγάλες αναλογίες, εμφανίζοντας ανάλογη συμπεριφορά (με ώμο στα 290 nm) με το Δ1 που αποδίδεται σε αλληλεπίδραση των υποκαταστατών του διπυριδιλίου με τις βάσεις του DNA.





Σχήμα 3.1.54. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο $\Lambda 2$ σε αναλογίες 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 και 12:1. Το βέλος συμβολίζει την αύξηση της αναλογίας DNA:Ru.



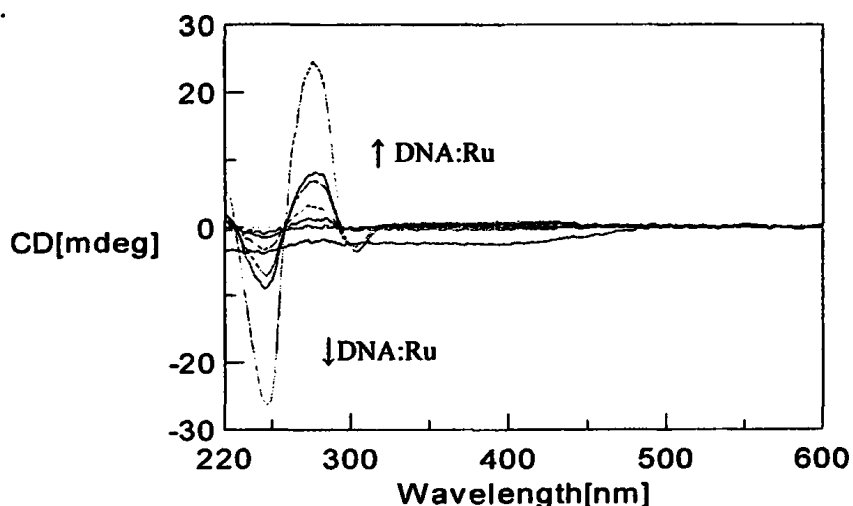
Σχήμα 3.1.55. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο $\Delta 2$ σε αναλογίες 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 και 12:1. Το βέλος συμβολίζει την αύξηση της αναλογίας DNA:Ru.

3.1.5.2.3. Λ - και Δ -[$Ru(bpy)_2(4,4'-(COTyrCONH_2)_2bpy)]Cl_2$ ($\Lambda 3$ και $\Delta 3$)

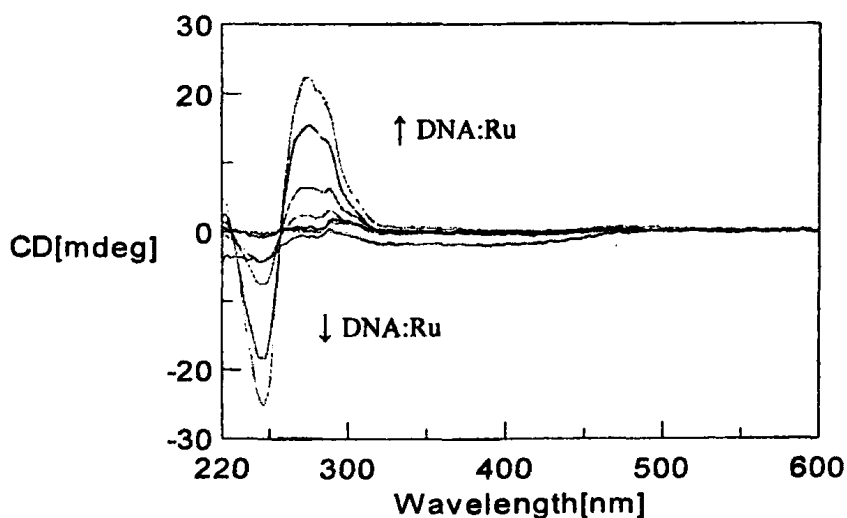
Στα σχήματα 3.1.56 και 3.1.57 παρουσιάζονται τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού για το σύμπλοκο $\Lambda 3$ και $\Delta 3$. Στα φάσματα παρατίθεται η αφαίρεση των σημάτων του συμπλόκου με το CT-DNA από το φάσμα του συμπλόκου πριν από την τιτλοδότηση, ώστε να παρατηρούνται οι μεταβολές που παρουσιάζονται στις ταινίες του DNA.

Όπως και στα υπόλοιπα σύμπλοκα που αναφέραμε πιο πάνω, με την προσθήκη του CT-DNA δεν παρατηρούνται ουσιαστικές μεταβολές στις χαρακτηριστικές ταινίες του DNA

B-τύπου στα 278 nm και 245 nm, γεγονός που ερμηνεύεται ότι το DNA κατά την αλληλεπίδραση παραμένει B-τύπου. Η αλληλεπίδραση του $\Lambda 3$ με το CT-DNA μοιάζει περισσότερο με εκείνη του $\Lambda 1$, εμφανίζοντας αρνητικό σήμα Cotton στα 300 nm λόγω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης του συμπλόκου $\Lambda 3$ με το DNA. Ταυτόχρονα όμως, παρουσιάζει και μια απότομη μεταβολή στην ταινία στα 245 nm όπως και το $\Lambda 2$ λόγω μιας μερικής παρεμβολής στις βάσεις του DNA και σε μια σχετική αύξηση της περιέλιξης του DNA.



Σχήμα 3.1.56. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο $\Lambda 3$ σε αναλογίες 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 και 12:1. Το βέλος συμβολίζει την αύξηση της αναλογίας DNA:Ru.



Σχήμα 3.1.57. Φάσμα CD του DNA με το σύμπλοκο $\Delta 3$ σε αναλογίες 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 και 12:1. Το βέλος συμβολίζει την αύξηση της αναλογίας DNA:Ru.

Κατά την αλληλεπίδραση του Δ3 με το DNA, εμφανίζεται όμως στα 290 nm όπως εξάλλου έχει παρατηρηθεί και στα Δ1 και Δ2 που θα μπορούσε να αποδοθεί στην αλληλεπίδραση των διπυριδιλίων με τις βάσεις του DNA με ανάλογο τρόπο για όλα τα Δ διαστερομερή σύμπλοκα.

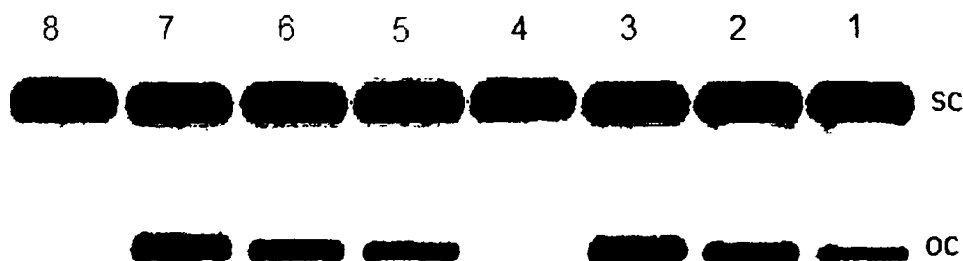
Συμπερασματικά από την φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού φαίνεται ότι τα Δ ισομερή κατά την αλληλεπίδραση τους με CT-DNA διευρύνουν την ταινία στα 275 nm εμφανίζοντας ένα νέο ώμο στα 290 nm που σχετίζεται με την μεταβολή της συσσώρευσης των βάσεων του DNA και ενδεχομένως προκαλείται από την δέσμευση των Δ διαστερομερών από την πλευρά των διπυριδιλίων στην έλικα του DNA με ανάλογο τρόπο. Τα σύμπλοκα Λ1 και Λ3 εμφανίζουν μια νέα αρνητική ταινία στα 300 nm που οφείλεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων λόγω του κατάλληλου προσανατολισμού της πλευρικής αλυσίδας των αμινοξέων του υποκαταστάτη Υn. Το Λ2 διαστερομερές δεν παρουσιάζει ανάλογη συμπεριφορά με τα άλλα Λ ισομερή, ενώ η απότομη μεταβολή της ταινίας στα 245 nm είναι ενδεικτική για σύμπλοκα που παρεμβάλλουν τους αρωματικούς δακτυλίους μεταξύ των βάσεων του DNA. Αυτό εξάλλου, διαπιστώθηκε και στην περίπτωση του σημείου τήξης του DNA παρουσία του Λ2 όπου παρουσίασε μεταβολή $\Delta Tm = 10.3$ °C ανάλογη συμπλόκων που παρεμβάλλονται στο DNA [167, 168].

3.1.5.3. Φωτοδιάσπαση του DNA

Η ικανότητα των δύο ισομερών συμπλόκων του Ru(II) να φωτοδιασπούν το DNA εξετάστηκε αρχικά με κυκλικό πλασμιδιακό DNA, pUC19. Έτσι πραγματοποιήθηκαν πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης με την προσθήκη των συμπλόκων Λ και Δ σε δείγματα πλασμιδιακού DNA αναλογίας 10:1 (DNA:Ru). Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA (μέγιστη εκπομπή 350 nm) για 10, 20 και 40 min και καταγράφηκε η φωτονουκλεολυτική τους δραστηριότητα.

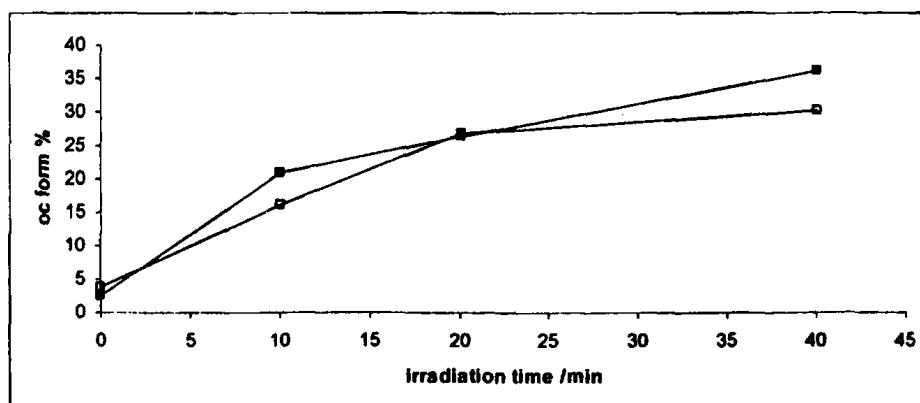
3.1.5.3.1. Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ (Λ1 και Δ1)

Τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για τα διαστερομερή σύμπλοκα Λ1 και Δ1 σε πλασμίδιο pUC19 φαίνονται στο παρακάτω σχήμα (σχήμα 3.1.58). Και τα δύο ισομερή βρέθηκε να προκαλούν διάσπαση των αλυσίδων του πλασμιδιακού pUC19 DNA (sc) σε ανοικτού κύκλου κομμένη μορφή (oc).



Σχήμα 3.1.58. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pUC19, με την προσθήκη του συμπλόκου Λ1 (ταινίες 1, 2, 3, 4) και Δ1 (ταινίες 5, 6, 7, 8) μετά από ακτινοβολία 10 (ταινίες 1, 5), 20 (ταινίες 2, 6), 40 (ταινίες 3, 7) λεπτά και στο σκοτάδι (ταινίες 4, 8).

Από το σχήμα 3.1.58 προκύπτει ότι κανένα από τα δύο ισομερή σύμπλοκα δεν διασπών το κυκλικό πλασμιδιακό DNA στο σκοτάδι (ταινίες 4 και 8) ενώ αντίθετα με την έκθεση του σε ακτινοβολία UVA (μέγιστη εκπομπή 350 nm) παρατηρείται νέα ταινία με μικρότερη κινητικότητα που αντιστοιχεί στην μετατροπή της αρχικής sc μορφής σε κομμένη oc. Η ένταση των ταινιών της oc μορφής αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου ακτινοβολίας των συμπλόκων (σχήμα 3.1.59).

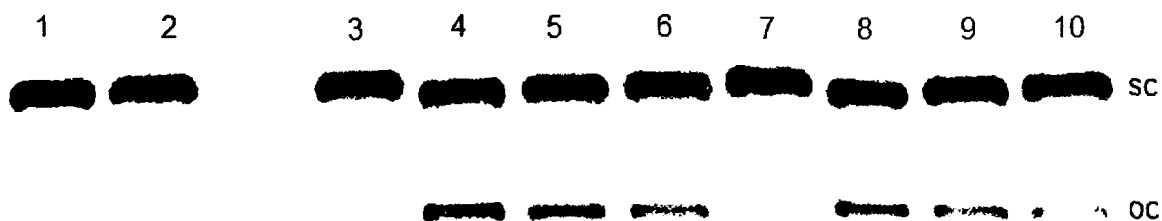


Σχήμα 3.1.59. Διάσπαση του πλασμιδίου pUC19 από τα Λ1 (□) και Δ1 (■) σε συνάρτηση του χρόνου ακτινοβολίας.

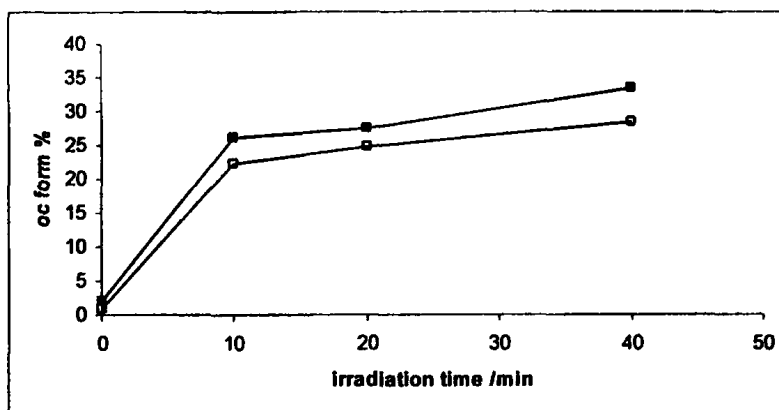
Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης δείχνουν ότι και τα δύο διαστερομερή σύμπλοκα διασπών το πλασμιδιακό DNA pUC19, με μεγαλύτερη απόδοση για το Δ1 ισομερές. Έτσι η μέγιστη απόδοση διάσπασης παρατηρείται σε χρόνο 40 min και είναι για το Δ1 ισομερές 33.6 % και για το Λ1 ισομερές 26.9 %. Το αποτέλεσμα αυτό έχει παρατηρηθεί και σε ανάλογα εναντιομερή σύμπλοκα όπως στο σύμπλοκο $[Ru(bpy)_2L]^{2+}$ (L=4,4'-δικάρβοξυ-2,2-διπυριδίνη) όπου το Δ ισομερές παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση στη φωτοδιάσπαση του DNA από το αντίστοιχο Λ [90]. Ανάλογα αποτελέσματα βρέθηκαν και για τα διαστερομερή σύμπλοκα του $[Ru(bpy)_2(HPIP)]^{2+}$ (HPIP = 2-(2-υδροξυμεθυλο)ιμιδαζόλιο [4, 5-f][1, 10]φαιναθρολίνη) όπου το Δ ισομερές παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση στην διάσπαση του DNA από το Λ ισομερές [100].

3.1.5.3.2. Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂ (Λ2 και Δ2)

Τα σύμπλοκα Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂ βρέθηκε να προκαλούν φωτοδιάσπαση του κυκλικού πλασμιδιακού DNA κατά την ακτινοβόλησή τους με UVA (μέγιστη εκπομπή 350 nm). Κατά την ακτινοβόληση του DNA το ποσοστό της διάσπασης αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου ακτινοβολίας (σχήμα 3.1.61).



Σχήμα 3.1.60. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pUC19, με την προσθήκη του συμπλόκου Δ2 (ταινίες 7, 8, 9, 10) και Δ2 (ταινίες 3, 4, 5, 6) μετά από ακτινοβολία 10 (ταινίες 10, 6), 20 (ταινίες 9, 5), 40 (ταινίες 8, 4) λεπτά και στο σκοτάδι (ταινίες 10, 3). Ταινίες 1,2 pUC19 πριν την προσθήκη του συμπλόκου.(ταινία 1 στο σκοτάδι, ταινία 2 μετά από ακτινοβόληση).

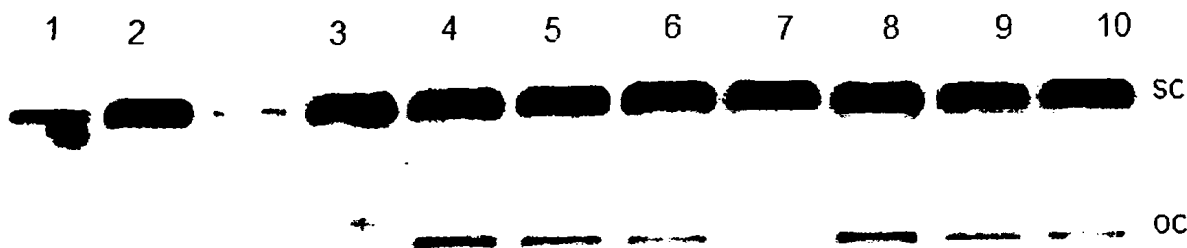


Σχήμα 3.1.61. Διάσπαση του πλασμιδίου pUC19 από τα Δ2 (□) και Δ2 (■) σε συνάρτηση του χρόνου ακτινοβολίας.

Όπως και στα σύμπλοκα Δ1 και Δ1, έτσι και στην περίπτωση των συμπλόκων Δ2 και Δ2 παρατηρείται ανάλογης κλίμακας διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του κυκλικού DNA με το Δ2 (31.1 %) να έχει μεγαλύτερη απόδοση από το Δ2 (27.6 %). Σε σύγκριση με τα Δ1 και Δ1 οι τιμές αυτές είναι ανάλογες. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ενώ το σύμπλοκο Δ2 συνδέεται ισχυρότερα στο DNA μέσω μερικής παρεμβολής του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης σε σχέση με τα Δ1, Δ2 και Δ2 εντούτοις το ποσοστό φωτοδιάσπασης του DNA που προκαλεί είναι ανάλογο των άλλων. Το γεγονός αυτό φαίνεται να αποδεσμεύει τον τρόπο σύνδεσης με τον μηχανισμό φωτοδιάσπασης.

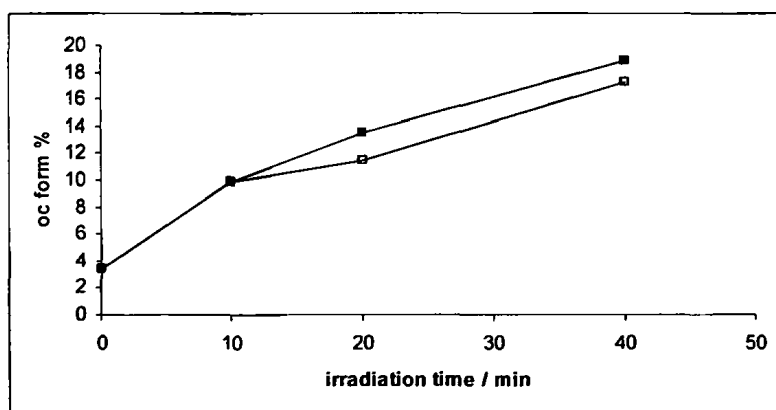
3.1.5.3.3. Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy)]Cl₂ (Δ3 και Δ3)

Τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για τα διαστερομερή σύμπλοκα Δ3 και Δ3 σε πλασμίδιο pUC19 φαίνονται στο πιο κάτω σχήμα (σχήμα 3.1.62). Σε κάθε γραμμή το πλασμίδιο pUC19 εμφανίζεται με μια έντονη ταινία που αντιστοιχεί στην κλειστή υπερελικωμένη μορφή του (sc) και μια λιγότερη διακριτή ταινία που αντιστοιχεί στο ποσοστό της ανοικτού κύκλου κομμένης μορφής (oc).



Σχήμα 3.1.62. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pUC19, με την προσθήκη του συμπλόκου $\Lambda 3$ (ταινίες 7, 8, 9, 10) και $\Delta 3$ (ταινίες 3, 4, 5, 6) μετά από ακτινοβολία 10 (ταινίες 10, 6), 20 (ταινίες 9, 5), 40 (ταινίες 8, 4) λεπτά και στο σκοτάδι (ταινίες 10, 3). Ταινίες 1, 2 pUC19 πριν την προσθήκη του συμπλόκου.(ταινία 1 στο σκοτάδι, ταινία 2 μετά από ακτινοβολήση).

Και τα δύο σύμπλοκα, $\Lambda 3$ και $\Delta 3$, προκαλούν φωτοδιάσπαση του πλασμιδιακού DNA, ενώ δεν παρατηρείται πρακτικά καμία μεταβολή στο σκοτάδι (ταινίες 7, 3) αλλά ούτε και στο ίδιο το DNA χωρίς την προσθήκη κάποιου από τα δυο ισομερή (ταινίες 1, 2). Κατά την ακτινοβολήση των δειγμάτων παρατηρείται αύξηση του ποσοστού διάσπασης των φωσφοδιεστερικών δεσμών του pUC19 με την αύξηση του χρόνου ακτινοβολίας (σχήμα 3.1.63).



Σχήμα 3.1.63. Διάσπαση του πλασμιδίου pUC19 από τα $\Lambda 3$ (\square) και $\Delta 3$ (\blacksquare) σε συνάρτηση του χρόνου ακτινοβολίας.

Όπως και στα προηγούμενα σύμπλοκα, έτσι και στην περίπτωση αυτών των συμπλόκων $\Lambda 3$ και $\Delta 3$ παρατηρείται ότι και τα δύο διαστερομερή σύμπλοκα διασπούν το κυκλικό πλασμιδιακό DNA pUC19 μετατρέποντας το σε ανοικτού κύκλου κομμένης μορφής

(oc), με μεγαλύτερη απόδοση για το Δ3 ισομερές (15.4 %) από ότι το Λ3 (12.4 %). Η απόδοση της διάσπασης του κυκλικού πλασμιδίου είναι μικρότερη και στις δύο περιπτώσεις σε σύγκριση με τα προηγούμενα σύμπλοκα, Λ1 Δ1 και Λ2 Δ2, αναδεικνύοντας τον ρόλο του συζευγμένου αμινοξέος και το ποσοστό διάσπασης του DNA.

Συμπερασματικά, σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν βρέθηκε ότι το Δ διαστεροεισομερές εμφανίζει μεγαλύτερη νουκλεολυτική δραστικότητα από το αντίστοιχο Λ. Ακόμη φαίνεται να εξαρτάται σε κάποιο βαθμό η δραστικότητα από την φύση του συζευγμένου αμινοξέος καθώς τα διαστεροεισομερή εμφανίζουν διαφορετικά ποσοστά φωτοδιάσπασης σε κάθε περίπτωση. Σημαντική είναι ακόμη και η διαπίστωση ότι το ποσοστό του κομμένου DNA δεν εξαρτάται άμεσα από τον γενικό τρόπο σύνδεσης καθώς το Λ2 που συνδέεται στο DNA διαφορετικά από τα άλλα μελετούμενα σύμπλοκα προκαλεί ανάλογο βαθμού διάσπαση.

3.1.5.4. Μηχανισμός φωτοδιάσπασης του DNA

Σε μια προσπάθεια εύρεσης του μηχανισμού φωτοδιάσπασης του DNA από τα σύμπλοκα αυτά πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε τμήμα πλασμιδιακού DNA (plasmid pSP73KB) για δύο από τα σύμπλοκα (έτσι ώστε να υπάρχει δυνατότητα σύγκρισης) με την χρήση διάφορων παγιδευτών. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής παγιδευτές:

DMSO/Mannitol (M):παγιδευτής OH[·]

SOD: παγιδευτής O₂^{·-}

NaN₃: παγιδευτής ¹O₂

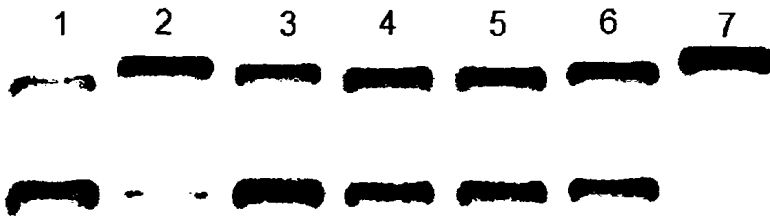
D₂O- μεγαλύτερη διάρκεια ζωής ¹O₂

3.1.5.4.1. Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ (Δ1)

Τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για το διαστερομερή σύμπλοκο Δ1 (συγκέντρωσης 2·10⁻⁵ M) σε πλασμιδιακού DNA pSP73KB πραγματοποιήθηκαν με διάλυμα



από διαφορετικό παγιδευτή κάθε φορά. Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με λάμπες UVA για 100 min και τα αποτελέσματα φαίνονται στο πιο κάτω σχήμα (σχήμα 3.1.64).



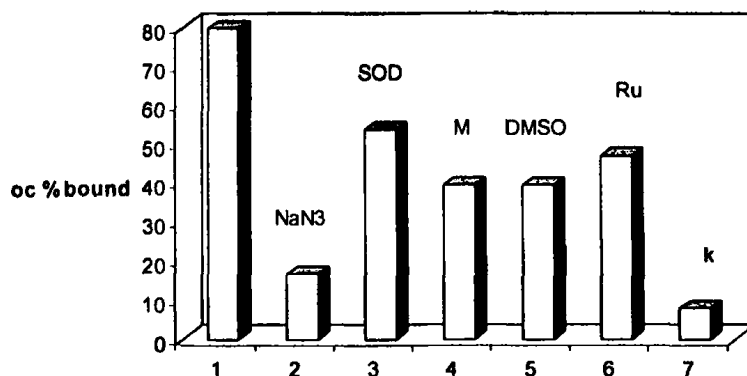
Σχήμα 3.1.64. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pSP73KB, με την προσθήκη του συμπλόκου Δ1 και την χρήση παγιδευτών. Ταινία 1 με τον παγιδευτή D₂O, ταινία 2 με NaN₃, ταινία 3 με SOD, ταινία 4 με Mannitol, ταινία 5 με DMSO, ταινία 6 του συμπλόκου χωρίς την χρήση κάποιου παγιδευτή και ταινία 7 του πλασμιδίου χωρίς οποιαδήποτε προσθήκη.

Έτσι, προκύπτει ο πιο κάτω πίνακας (πίνακας 3.1.13) με τα ποσοστά διάσπασης παρουσία των παγιδευτών που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Φαίνεται λοιπόν ότι το σύμπλοκο Δ1 διασπά το DNA μέσω παραγωγής ¹O₂ καθώς μόνο στην περίπτωση που προστίθεται ο παγιδευτής NaN₃ (παγιδευτής ¹O₂) η διάσπαση δεν πραγματοποιείται με τον ρυθμό της κανονικής του διάσπασης. Ακόμη, η παρουσία D₂O, που αυξάνει τον χρόνο ζωής του ¹O₂, αυξάνει ταυτόχρονα και το ποσοστό απόδοσης, ενώ το SOD που δεσμεύει τις ρίζες O₂⁻ φαίνεται να έχει θετική επίδραση στην απόδοση καθώς το O₂⁻ ευνοεί την δημιουργία ¹O₂. Ανάλογο μηχανισμός, μέσω δηλαδή παραγωγής ¹O₂, έχει βρεθεί και για άλλα σύμπλοκα του Ru όπως στις περιπτώσεις των [Ru(bpy)₃]²⁺ [170], [Ru(phen)₃]²⁺ [171] και [Ru(bpy)₂(m-GHK)]²⁺ [172].

Πίνακας 3.1.13. Απόδοση της διάσπασης του πλασμιδίου pSP73KB με το σύμπλοκο Δ1 και την χρήση παγιδευτών.

	<i>D₂O</i>	<i>NaN₃</i>	<i>SOD</i>	<i>M</i>	<i>DMSO</i>	<i>Ru</i>	<i>k</i>
oc% bound	61,63	24,20	60,24	41,24	47,81	46,08	7,31

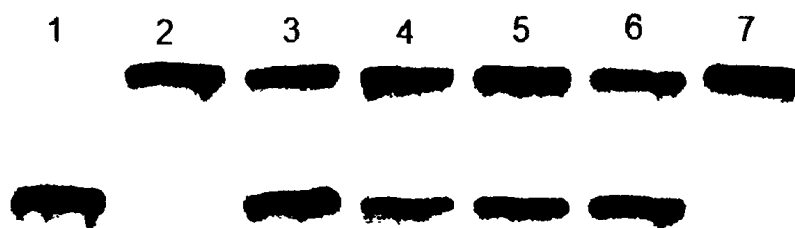
*Όπου k το πλασμιδιακό DNA pSP73KB χωρίς την χρήση κάποιου παγιδευτή.



Σχήμα 3.1.65. Απεικόνιση της διάσπασης του πλασμιδίου pSP73KB με το σύμπλοκο Δ1 και την χρήση παγιδευτών.

3.1.5.4.2. Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂ (Δ2)

Τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης για το διαστερομερή σύμπλοκο Δ2 (συγκέντρωσης $2 \cdot 10^{-5}$ M) σε πλασμιδιακού DNA pSP73KB πραγματοποιήθηκαν με διάλυμα από διαφορετικό παγιδευτή κάθε φορά. Τα δείγματα ακτινοβολήθηκαν με λάμπες UVA για 100 min και τα αποτελέσματα φαίνονται στο πιο κάτω σχήμα (σχήμα 3.1.66). Στον πίνακα 3.1.14 καθώς και στο διάγραμμα (σχήμα 3.1.67) φαίνονται τα ποσοστά διάσπασης παρουσία των παγιδευτών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα.

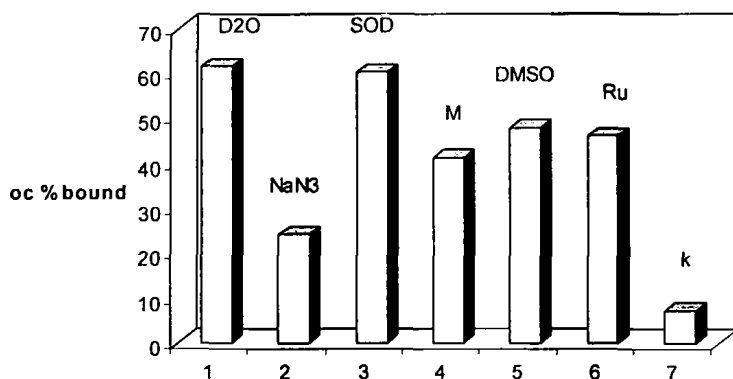


Σχήμα 3.1.66. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pSP73KB, με την προσθήκη του συμπλόκου Δ2 και την χρήση παγιδευτών. Ταινία 1 με τον παγιδευτή D₂O, ταινία 2 με NaN₃, ταινία 3 με SOD, ταινία 4 με Mannitol, ταινία 5 με DMSO, ταινία 6 του συμπλόκου χωρίς την χρήση κάποιου παγιδευτή και ταινία 7 του πλασμιδίου χωρίς οποιαδήποτε προσθήκη.

Πίνακας 3.1.14. Απόδοση της διάσπασης του πλασμιδίου pSP73KB με το σύμπλοκο Δ2 και την χρήση παγιδευτών.

	D_2O	NaN_3	SOD	M	DMSO	Ru	k
oc% bound	79,85	16,82	53,56	39,44	39,37	46,96	7,93

*Όπου k το πλασμιδιακό DNA pSP73KB χωρίς την χρήση κάποιου παγιδευτή.



Σχήμα 3.1.67. Απεικόνιση της διάσπασης του πλασμιδίου pSP73KB με το σύμπλοκο Δ2 και την χρήση παγιδευτών.

Ανάλογα το σύμπλοκο Δ2 διασπά το DNA μέσω παραγωγής 1O_2 όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του Δ1 ισομερούς, αφού μόνο στην περίπτωση που προστίθεται ο παγιδευτής NaN_3 (παγιδευτής 1O_2) η διάσπαση δεν πραγματοποιείται ενώ ανάλογα είναι και τα συμπεράσματα για την προσθήκη των D_2O και SOD.

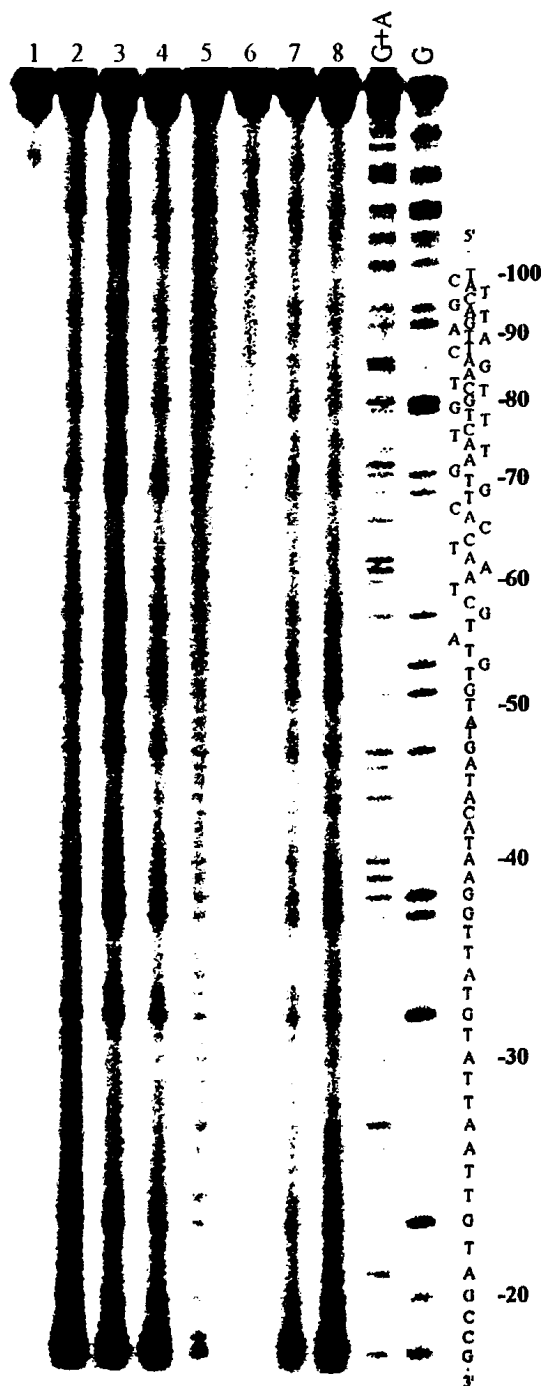
Συμπερασματικά φαίνεται ότι ο μηχανισμός διάσπασης του DNA πραγματοποιείται μέσω 1O_2 ενδεικτικός για μια σχετικά ειδική δέσμευση των συμπλόκων αυτών στο DNA.

3.1.5.5. Έλεγχος της εκλεκτικότητας στην αλληλουχία των συμπλόκων τύπου Λ - ή Δ - $[Ru(bpy)_2(Yn)]^{2+}$

Ο έλεγχος της εκλεκτικότητας της δέσμευσης των συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με κομμάτι γραμμικού DNA θυμοειδή αδένος 158-βάσεων, το οποίο περιέχει ιχνηθετιμένα

περιοριστικά κομμάτια βάσεων τα οποία αναγνωρίζουν διαφορετικές αλληλουχίες στο DNA και προκαλούν διάσπαση στο σημείο αυτό, με την μέθοδο Maxam-Gilbert.

Στο σχήμα 3.1.68 φαίνεται το χαρακτηριστικό διάγραμμα μιας σχετικά εκλεκτικής δέσμησης των συμπλόκων σε σύγκριση με το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}$. Έτσι, φαίνεται ότι όλα τα σύμπλοκα διασπών το κομμάτι του γραμμικού DNA με ανάλογο τρόπο και άρα δεσμεύονται ανάλογα. Από την ανάλυση του διαγράμματος Maxam-Gilbert είναι εμφανές ότι όλα τα σύμπλοκα παρουσιάζουν χαμηλή εκλεκτικότητα κατά τη δέσμηση τους.



Σχήμα 3.1.68. Χαρακτηριστικό διάγραμμα της εκλεκτικής δέσμησης των συμπλόκων στο DNA. Γραμμή 1: DNA, 2: $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{m-GHK})]^{2+}$, 3: Δ3, 4: Λ3, 5: Δ2, 6: Λ2, 7: Δ1, 8: Λ1, G+A και G κλίμακες Maxam-Gilbert

Τα σύμπλοκα που εξετάστηκαν δεσμεύονται στο DNA με τρόπους που σχετίζονται όχι μόνο από την απόλυτη (Λ -, Δ -) διαμόρφωση του μεταλλικού κέντρου αλλά από την όλη διαμόρφωση του συμπλόκου που καθορίζονται και από την φύση του αμινοξέος. Αν επεκτείνουμε τα συμπεράσματα από την μελέτη των $\Lambda 1$ και $\Delta 1$ με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(\text{CGCGCG})_2$ θα πρέπει τα σύμπλοκα να προσεγγίζουν από την κύρια αύλακα της έλικας και να είναι προσανατολισμένα με το μέρος των δύο διπυριδιλίων, σταθεροποιώντας την έλικα και μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων όπως βρέθηκε και από την φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Εξαιρέση αποτελεί το σύμπλοκο $\Lambda 2$ (Λ -[Ru(bpy) $_2$ (4,4'-(COHisCONH $_2$) $_2$ -bpy)]Cl $_2$) όπου είναι σαφές πως δεσμεύεται στο DNA ισχυρότερα υποβοηθούμενο από «μερική» παρεμβολή του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Αυτό όμως δεν μπορεί να συσχετιστεί με την φωτοδραστικότητα καθώς εμφανίζει ανάλογα ποσοστό διάσπασης των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA με το $\Lambda 1$, $\Delta 1$ και $\Delta 2$ που συνδέονται με άλλο τρόπο. Η φύση του συζευγμένου αμινοξέος μπορεί να συνδεθεί με την ικανότητα φωτοδιάσπασης καθώς στην περίπτωση των συμπλόκων $\Lambda 3$ και $\Delta 3$ το ποσοστό αυτό είναι μικρό υποδεικνύοντας ότι μπορεί και το συζευγμένο αμινοξύ να αποτελέσει στόχο του $^1\text{O}_2$ μειώνοντας την ποσότητα του για να αντιδράσει με το DNA. Ακόμη δείξαμε ότι για τα πιο πάνω σύμπλοκα ότι ο μηχανισμός φωτοδιάσπασης πραγματοποιείται μέσω $^1\text{O}_2$.

Συνοπτικά τα κυριότερα αποτελέσματα δίνονται στον πιο κάτω πίνακα:

Πίνακας 3.1.15. Τα κυριότερα αποτελέσματα των συμπλόκων του τύπου Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(Yn)]²⁺.

	<i>NMR</i>	Φωτοδιάσπαση	<i>T_m</i>	<i>CD</i>
Λ1	Σύνδεση στην κύρια αύλακα στις ακραίες βάσεις. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δέσμευση των διπυριδιλίων.	Φωτοδιάσπαση 26.9 %	Σταθεροποίηση της διπλής έλικας. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.	Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.
Δ1	Σύνδεση στην κύρια αύλακα στις ακραίες βάσεις. Δέσμευση των διπυριδιλίων.	Φωτοδιάσπαση 33.6 %	Σταθεροποίηση της διπλής έλικας. Μεγαλύτερη σταθεροποίηση από το Λ1. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.	Αλληλεπίδραση των διπυριδιλίων με τις βάσεις του DNA.
Λ2	-	Φωτοδιάσπαση 27.6 %	Σταθεροποίηση της διπλής έλικας. Μεγαλύτερη σταθεροποίηση από το Δ2. Παρεμβολή ιμιδαζολικού δακτυλίου.	Μερική παρεμβολή του ιμιδαζολικού δακτυλίου.
Δ2	-	Φωτοδιάσπαση 31.1 %	Σταθεροποίηση της διπλής έλικας. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.	Αλληλεπίδραση των διπυριδιλίων με τις βάσεις του DNA.
Λ3	-	Φωτοδιάσπαση 12.4 %	Σταθεροποίηση της διπλής έλικας. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.	Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.
Δ3	-	Φωτοδιάσπαση 15.4 %	Σταθεροποίηση της διπλής έλικας. Μεγαλύτερη σταθεροποίηση από το Λ3. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.	Αλληλεπίδραση των διπυριδιλίων με τις βάσεις του DNA.

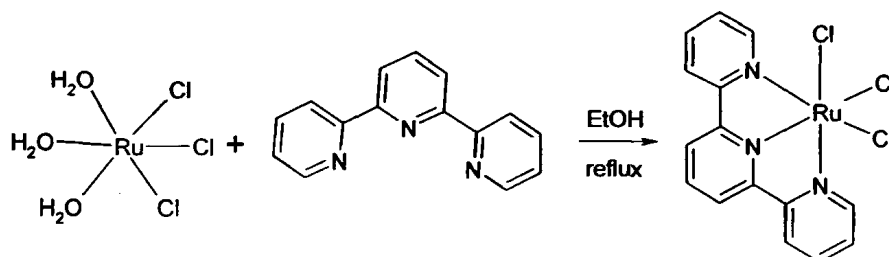


3.2. Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]\text{Cl}_3$ μη ομοιοπολικού χαρακτήρα

Έχοντας διευκρινίσει τον ρόλο του συζευγμένου αμινοξέος σε αλληλεπιδράσεις συμπλόκων του τύπου Λ -, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Yn})](\text{PF}_6)_2$ με DNA στο κεφάλαιο αυτό προσπαθούμε να διερευνήσουμε τον ρόλο των συζευγμένων λυσινών στην αλληλεπίδραση με απευθείας δεσμό ένταξης του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]\text{Cl}_3$ με DNA.

3.2.1 Σύνθεση

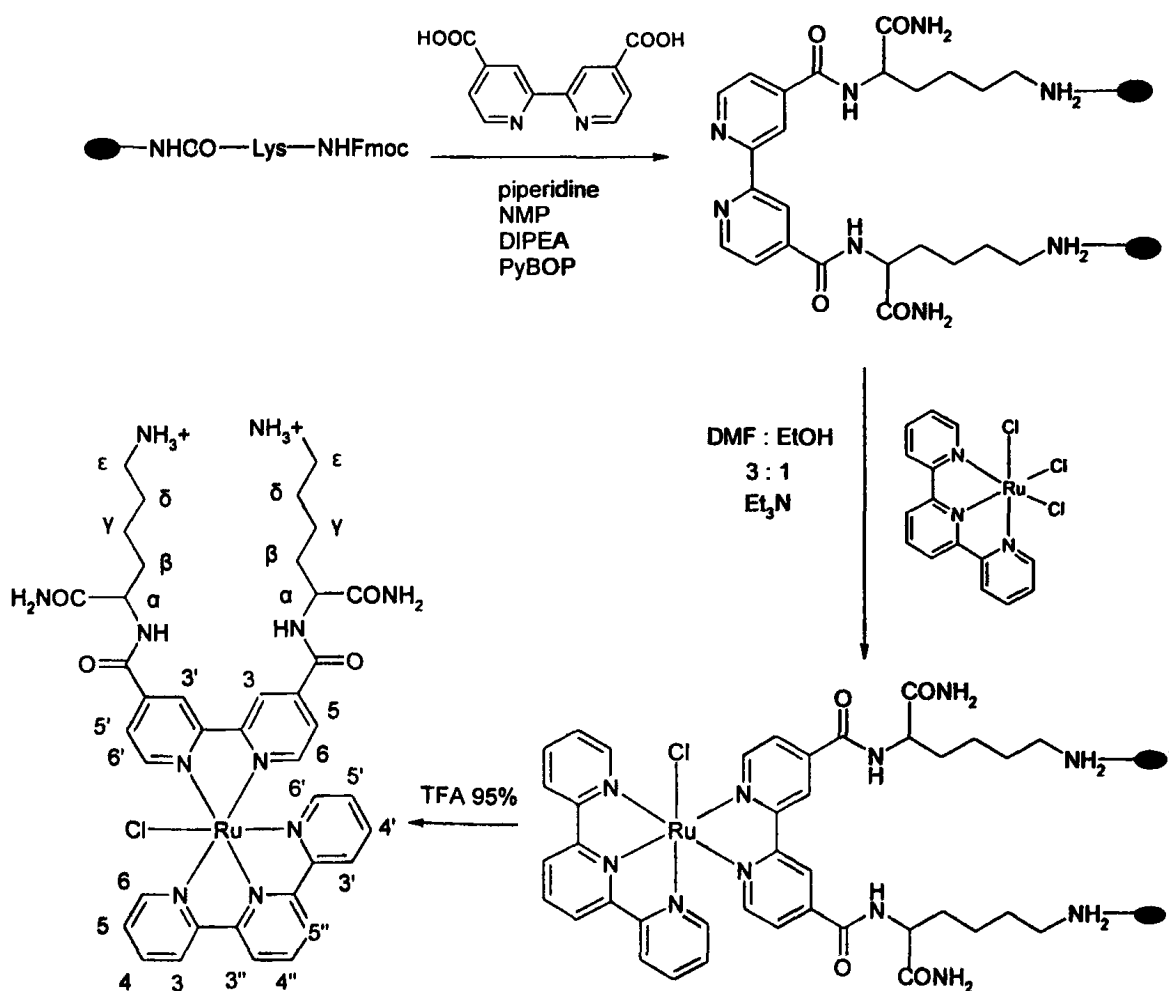
Η σύνθεση του αρχικού συμπλόκου πραγματοποιήθηκε με βάση τις μεθόδους της βιβλιογραφίας [122] όπως φαίνεται στο σχήμα 3.2.1.



Σχήμα 3.2.1. Αντίδραση σύνθεσης του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})\text{Cl}_3]$.

Η σύζευξη των λυσινών στην δικάρβοξυ διπυριδίνη πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση, όπως και στην περίπτωση των συμπλόκων Λ -, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Yn})]^{2+}$, που παρουσιάστηκε στην ενότητα 3.1.1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύζευξη της L-Λυσίνης στην ρητίνη tentagel S RAM με τη χρήση των αντιδραστηρίων σύζευξης DIPEA και PyBOP και στη συνέχεια του υποκαταστάτη 4,4'-(CO_2H)₂bpy σε αυτά. Η σύζευξη αυτή γίνεται από την αμινομάδα του αμινοξέος το οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο πάνω στην ρητίνη και της καρβοξυλομάδας του υποκαταστάτη, με τα αντιδραστήρια ενεργοποίησης της πεπτιδικής σύζευξης (DIPEA και PyBOP). Το τελικό σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]\text{Cl}_3$ συντέθηκε με αντίδραση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})\text{Cl}_3]$ και του υποκαταστάτη στους 80 °C σε μίγμα DMF-αιθανόλης (3:1). Η συγκεκριμένη ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε επιλέχθηκε για την αντοχή της σε υψηλές

θερμοκρασίες. Έτσι, το τελικό σύμπλοκο συντίθεται και βρίσκεται ακινητοποιημένο πάνω στη ρητίνη. Η ρητίνη πλένεται αρκετά για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων και της περίσσειας των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η μέγιστη καθαρότητα του συμπλόκου. Τέλος, το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]^{3+}$ απελευθερώνεται από την ρητίνη με την χρήση τριφθορικού οξέος (TFA), ενώ απομακρύνονται ταυτόχρονα και οι προστατευτικές ομάδες του αμινοξέος. Τελικά καταβυθίζεται ως χλωριούχο άλας (βλέπε πειραματικό 2.2.2.3). Στο πιο κάτω σχήμα (σχήμα 3.2.2) φαίνεται αναλυτικά η πορεία της αντίδρασης για το σύμπλοκο αυτό.



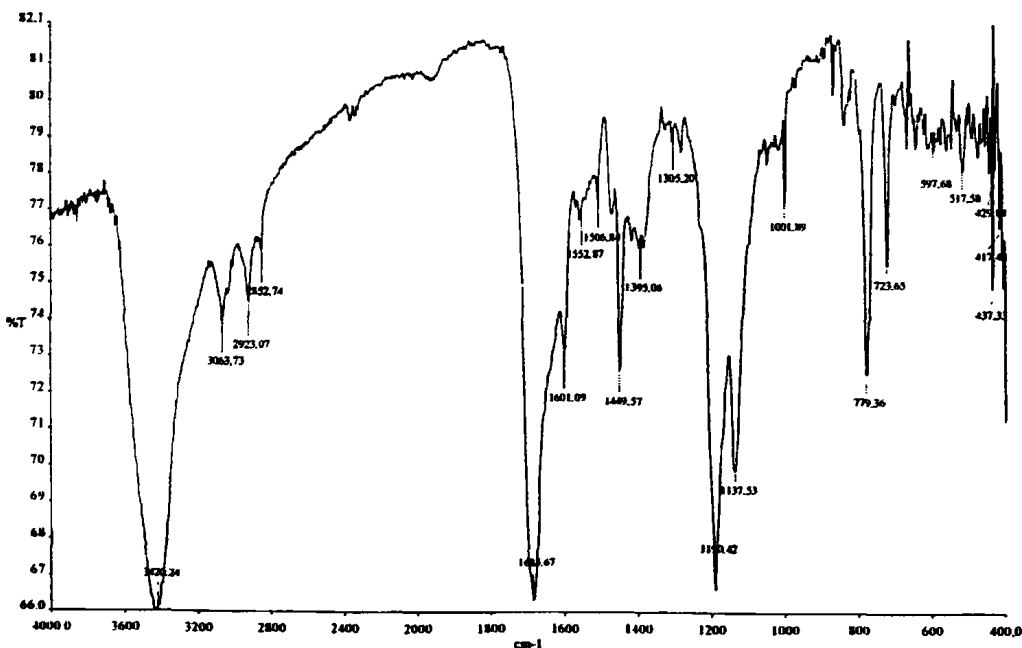
Σχήμα 3.2.2. Σύνθεση του $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]^{3+}$ με την τεχνική της σύνθεσης σε στερεά φάση.

3.2.2. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH_2)_2bpy]Cl]^{3+}$

Το σύμπλοκο χαρακτηρίστηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους, όπως φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (1H NMR), φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis).

3.2.2.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου

Με την φασματοσκοπία υπερύθρου ταυτοποιήθηκε η ένταξη του υποκαταστάτη 4,4'-(COLysCONH₂)bpy στο σύμπλοκο $[Ru(terpy)Cl_3]$. Στο φάσμα λοιπόν (σχήμα 3.2.3), του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH_2)_2bpy]Cl]^{3+}$ φαίνεται η παρουσία του υποκαταστάτη αυτού στο σύμπλοκο αφού παρατηρείται μια ισχυρή ταινία στα 1683 cm⁻¹, που αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C=O. Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι στο φάσμα του ελεύθερου υποκαταστάτη η δόνηση τάσης του δεσμού C=O εμφανίζεται στα 1663 cm⁻¹. Η διαφορά που παρατηρείται στην ταινία αυτή κατά τη συμπλοκοποίηση, είναι δυνατόν να οφείλεται στην ένταξη του υποκαταστάτη (4,4'-COLysCONH₂)₂bpy στο ρουθίνιο.

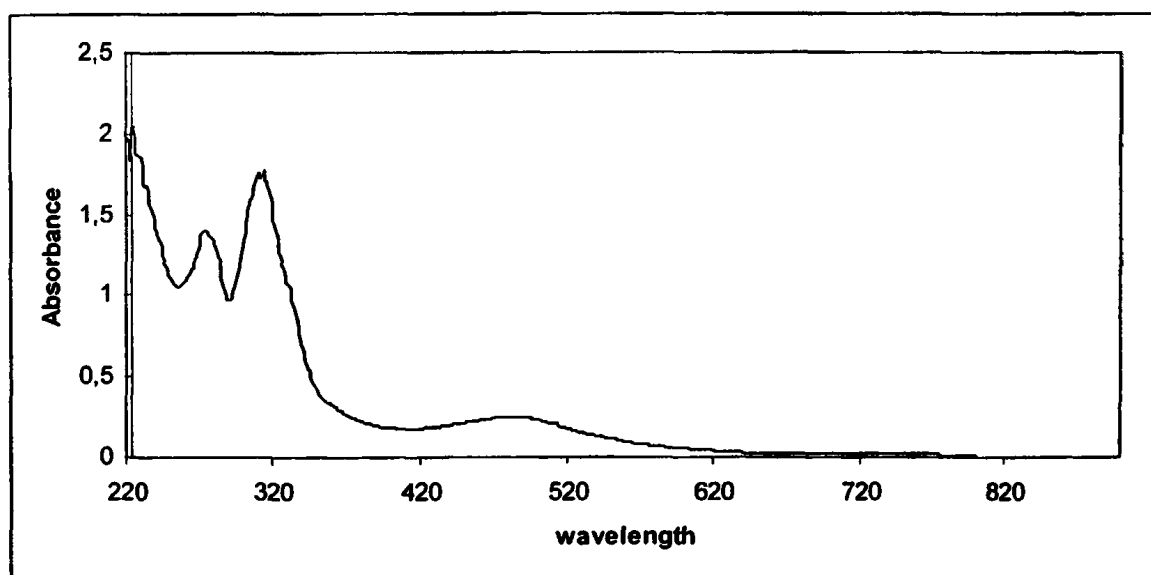


Σχήμα 3.2.3. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH_2)_2bpy]Cl]^{3+}$.

Οι ταινίες δόνησης τάσης των αρωματικών δακτυλίων βρίσκονται στην περιοχή 1500 cm^{-1} και των C-N στα 1395 cm^{-1} . Οι δονήσεις κάμψης των αρωματικών C-H εντός του επιπέδου του δακτυλίου παρατηρούνται στα 1190 cm^{-1} ενώ οι δονήσεις κάμψης C-H εκτός επιπέδου του δακτυλίου παρατηρούνται στα 779 cm^{-1} . Η ταινία δόνησης στα 723 cm^{-1} αποδίδεται στην εντός επιπέδου δόνηση παραμόρφωσης του δακτυλίου ($\delta(\text{py})$) και στα 597 cm^{-1} στην εκτός επιπέδου παραμόρφωση ($\gamma(\text{py})$). Οι δονήσεις τάσης του δεσμού C-H των αλειφατικών πρωτονίων της λυσίνης παρατηρούνται στα 2923 cm^{-1}

3.2.2.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους UV-Vis χρησιμοποιήθηκε, επίσης, για τον χαρακτηρισμό του συμπλόκου σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα tris-HCl (10^{-3}M) και σε pH = 7.0. (σχήμα 3.2.4).



Σχήμα 3.2.4. Φάσμα UV-Vis του συμπλόκου στην περιοχή 200-800 nm.

Η ταινία στα 274 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 2.2 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) αντιστοιχεί σε $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεις των πυριδινικών δακτυλίων του υποκαταστάτη τερπυριδίνη $\pi \rightarrow \pi^*$ (terpy) και του διπυριδυλίου $\pi \rightarrow \pi^*$ (bpy), όπως εξάλλου έχει παρατηρηθεί και σε ανάλογα πολυπυριδινικά σύμπλοκα [173, 174]. Οι ταινίες στα 314 nm και στα 480 nm αποδίδονται σε ταινίες μεταφοράς φορτίου από τα d τροχιακά του Ru στα π^* των υποκαταστατών $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*$. Στα 314 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 2.7 \times$



$10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) αποδίδεται στις μεταπτώσεις $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{terpy})$ και η ταινία στα 480 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 4.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), στο υποκατεστημένο δυριδύλιο $d_{\pi}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{Y1})$, όπως έχει προσδιοριστεί και στα σύμπλοκα Λ -, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Yn})]^{2+}$ με την αντίστοιχη υποκατάσταση.

3.2.2.3. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και υδρόλυση του συμπλόκου

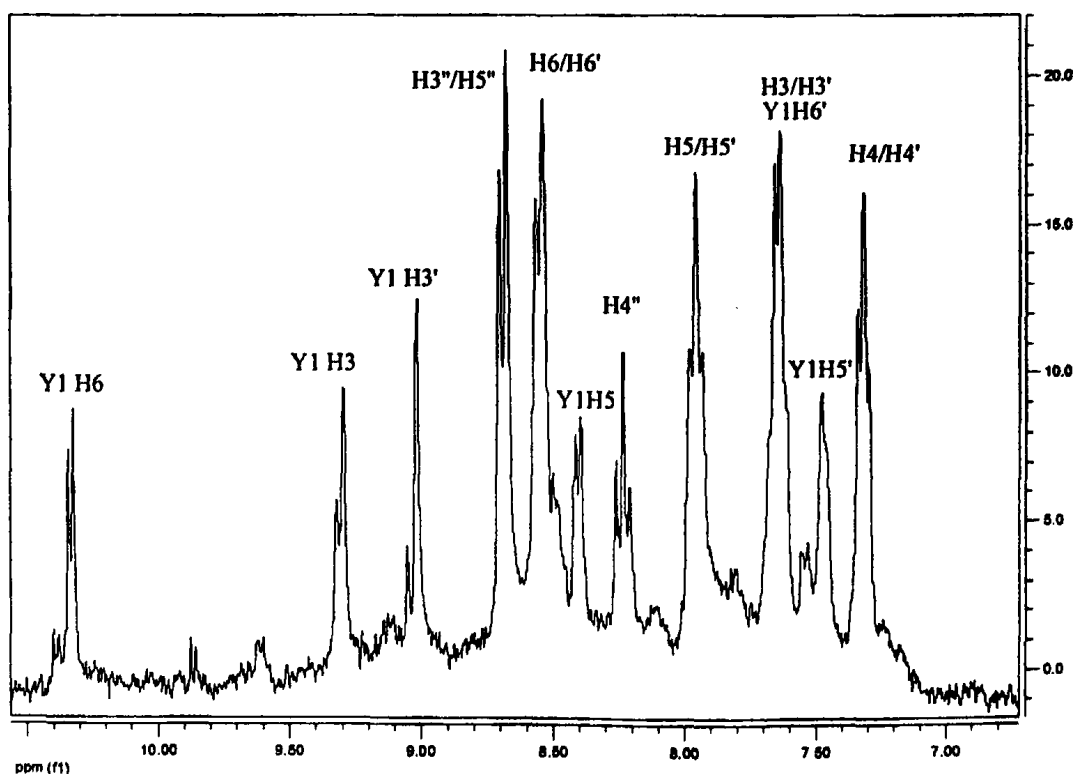
Η απόδοση των σημάτων ^1H NMR του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]^{3+}$ βασίστηκε σε πειράματα δύο διαστάσεων COSY σε διαλύτη MeOH - d_4 . Η υδρόλυση του συμπλόκου μελετήθηκε με την φασματοσκοπία αυτή τόσο σε διαλύτη MeOH - d_4 όσο και σε D_2O . Ακόμη μελετήθηκε η υδρόλυση και σε συνθήκες ακτινοβολήσης των δειγμάτων με λάμπες UVA σε διαλύτη D_2O χωρίς αξιόλογη μεταβολή ενώ λήφθηκαν φάσματα αμέσως με την διάλυση του συμπλόκου αλλά και με την πάροδο 24 h έτσι ώστε να παρακολουθήσουμε την πορεία της υδρόλυσης. Στα πιο κάτω σχήματα (σχήμα 3.2.5, 3.2.6) δίνεται η αρωματική περιοχή των φασμάτων μίας και δύο διαστάσεων του συμπλόκου, όπου φαίνονται τα αρωματικά πρωτόνια των δύο υποκαταστατών του (terpy και Y1).

Από το φάσμα ^1H NMR του συμπλόκου παρατηρούμε δύο ομάδες σημάτων συντονισμού για τα πρωτόνια του bpy δείχνοντας έτσι την ανισοδυναμία των δύο δακτυλών που προέρχονται από τον διαφορετικό προσανατολισμό τους ως προς το αξονικό χλώριο. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων δείχνουν ότι ο ένας δακτύλιος (H3, H5, H6) πιθανότατα να βρίσκεται σε ισημερινή θέση σε σχέση με το ενταγμένο χλώριο και ο άλλος (H3', H5', H6') σε αξονική.

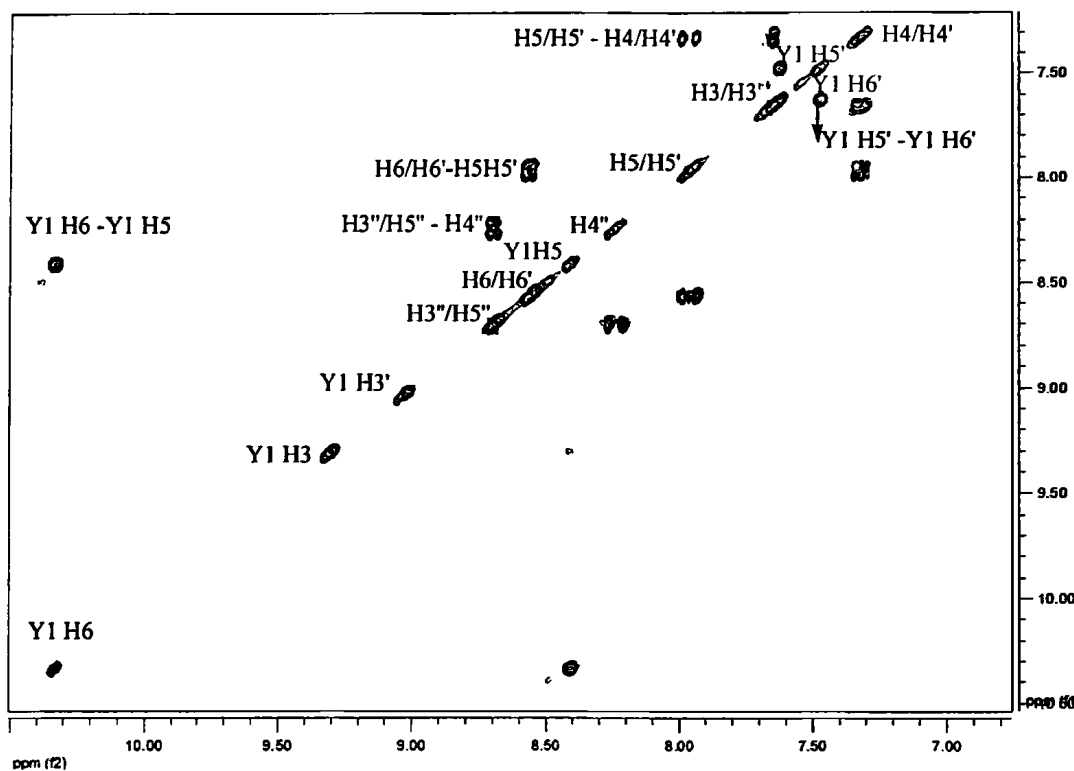
Έτσι λοιπόν, σε χαμηλότερα πεδία (10.33 ppm) βρίσκεται το H6 του ενός πυριδινικού δακτυλίου το οποίο βρίσκεται δίπλα από το ενταγμένο χλώριο. Η τιμή αυτή της χημικής μετατόπισης είναι αρκετά υψηλότερη σε σχέση με τα διαστερομερή σύμπλοκα Δ - και Λ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4,4'\text{-(COLysCONH}_2)_2\text{bpy})](\text{PF}_6)_4$ με τον ανάλογο υποκαταστάτη (Δ στα 8.04 ppm και Λ στα 7.96 ppm) λόγω της παρουσίας του ηλεκτραρνητικού χλωρίου το οποίο ελαττώνει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα του γειτονικού πρωτονίου αποπροασπίζοντάς το και συντονίζοντάς το σε χαμηλότερο πεδίο. Ανάλογες τιμές για τις χημικές μετατοπίσεις των

πρωτονίων H6 έχουν αναφερθεί και σε πολλές περιπτώσεις συμπλόκων του ρουθηνίου που περιέχουν ενταγμένο χλώριο [175, 176] καθώς και στην περίπτωση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4\text{-COGHKCONH}_2\text{-4'Mebpy})\text{Cl}]^+$ [119].

Η παρουσία του ηλεκταρνητικού χλωρίου επηρεάζει και τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων H5 και H3 του ίδιου πυριδινικού δακτυλίου τα οποία συντονίζονται στα 8.40 ppm και 9.30 ppm αντίστοιχα. Για τον άλλο δακτύλιο του bpy που βρίσκεται μακρύτερα από τα χλώριο, το H5' και H3' συντονίζονται στα 7.43 ppm και 9.03 ppm αντίστοιχα ενώ το πρωτόνιο H6' συντονίζεται στα 7.62 ppm.



Σχήμα 3.2.5. Φάσμα ^1H NMR του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}_2^{2+}$ σε MeOD.



Σχήμα 3.2.6. Φάσμα COSY του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]^{3+}$ σε MeOD.

Τα πρωτόνια των δύο ακραίων πυριδινικών δακτυλίων του υποκαταστάτη της τερπυριδίνης $\text{H6H6}'$, $\text{H5H5}'$, $\text{H4H4}'$ και $\text{H3H3}'$ παρουσιάζουν μια μόνο ομάδα σημάτων συντονισμού δείχνοντας έτσι ότι είναι χημικά ισοδύναμοι και δεν επηρεάζονται από την παρουσία του ενταγμένου χλωρίου. Έτσι, τα πρωτόνια $\text{H6H6}'$ εμφανίζονται ως μια διπλή ταινία συντονισμού στα 8.53 ppm λόγω της σύζευξής τους με τα πρωτόνια $\text{H5H5}'$. Τα $\text{H5H5}'$ συντονίζονται στα 7.95 ppm ως μια τριπλή ταινία συντονισμού και συζευγνύεται τόσο με τα $\text{H6H6}'$ όσο και με τα $\text{H4H4}'$. Τέλος τα πρωτόνια $\text{H4H4}'$ συντονίζονται στα 7.32 ppm και τα πρωτόνια $\text{H3H3}'$ στα 7.63 ppm και φέρουν μεταξύ τους συζεύξεις.

Η ανισοδυναμία των δυο πυριδινικών δακτυλίων επιφέρει ανάλογα αποτελέσματα και στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της λυσίνης που είναι συζευγμένη στην 4 θέση του κάθε δακτυλίου καθώς η μεταβολή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας του δακτυλίου λόγω της γειτονικής θέσης με το ενταγμένο χλώριο μεταβάλλει και τις χημικές μετατοπίσεις των λυσινών. Έτσι παρατηρήθηκε μια ομάδα σημάτων συντονισμού (H_α , H_β , H_γ , H_δ , H_ϵ) για τα συζευγμένα πρωτόνια με τον δακτύλιο που βρίσκεται δίπλα από το ενταγμένο χλώριο και μία

άλλη ομάδα σημάτων συντονισμού (Ha', Hβ', Hγ', Hδ', He') για τα συζευγμένα πρωτόνια της λυσίνης με τον δακτύλιο που βρίσκεται μακριά. Έτσι το πρωτόνιο Ha βρίσκεται σε $\delta = 4.74$ ppm, το πρωτόνιο Hβ σε $\delta = 2.08$ ppm, το πρωτόνιο Hγ σε $\delta = 1.49$ ppm, το πρωτόνιο Hδ σε $\delta = 1.81$ ppm και το πρωτόνιο He σε $\delta = 3.00$ ppm για τον ένα δακτύλιο. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων για τα πρωτόνια του άλλου δακτυλίου βρέθηκαν ως εξής: το Ha βρίσκεται σε $\delta = 4.50$ ppm, το πρωτόνιο Hβ σε $\delta = 1.91$ ppm, το πρωτόνιο Hγ σε $\delta = 1.49$ ppm, το πρωτόνιο Hδ σε $\delta = 1.68$ ppm και το πρωτόνιο He σε $\delta = 2.90$ ppm.

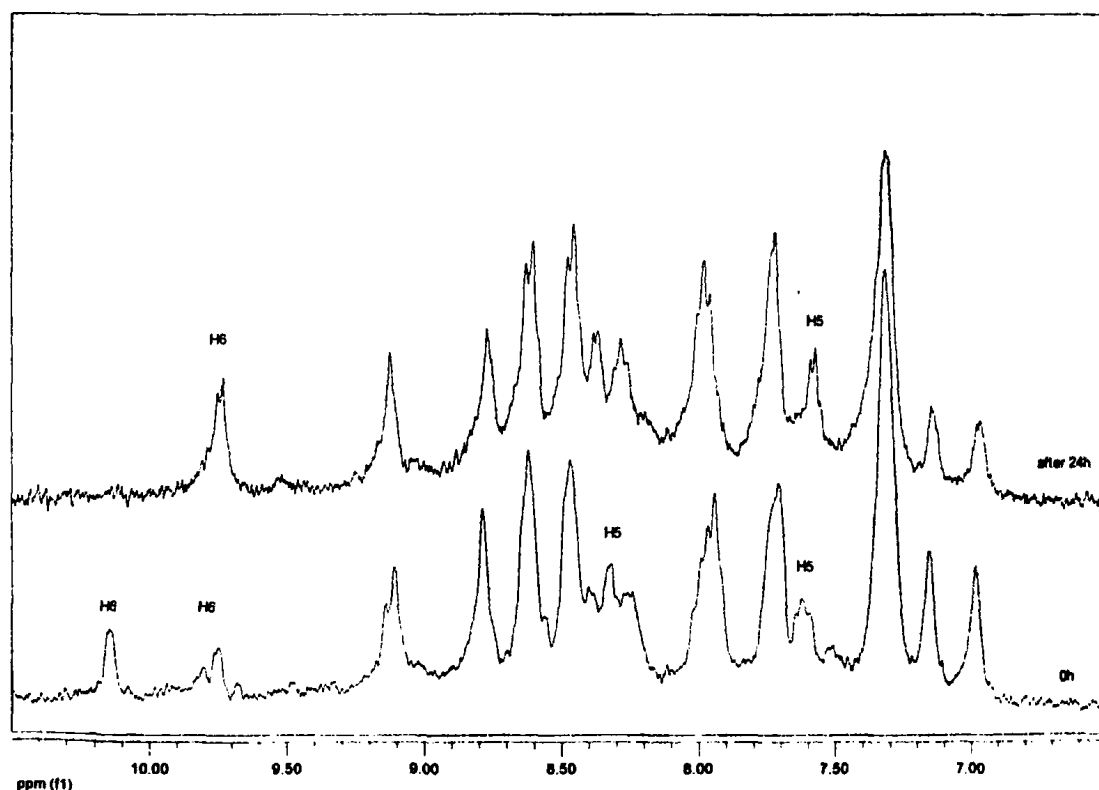
Στον πιο κάτω πίνακα παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων του συμπλόκου.



Πίνακας 3.2.1. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}^+$ 298 K σε $\text{MeOH} - d_4$.

<i>Πρωτόνια</i>	<i>Χημικές μετατοπίσεις σε ppm</i>
Y1 H3	9.30
Y1 H5	8.40
Y1 H6	10.33
Y1 H3'	9.03
Y1 H5'	7.43
Y1 H6'	7.62
Terpy H3H3'	7.63
Terpy H4H4'	7.32
Terpy H5H5'	7.95
Terpy H6H6'	8.53
Terpy H3''H5''	8.68
Terpy H4''	8.23
H α -Lys	4.74
H β -Lys	2.08
H γ -Lys	1.49
H δ -Lys	1.81
H ϵ -Lys	3.00
H α' -Lys	4.50
H β' -Lys	1.91
H γ' -Lys	1.49
H δ' -Lys	1.68
H ϵ' -Lys	2.90

Η αντικατάσταση του χλωρίου από διαλύτη μελετήθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR σε διαλύτη MeOH-d_4 με την πάροδο 24 h και παρατηρήθηκε ότι το σύμπλοκο παρουσία του διαλύτη αυτού δεν υδρολύεται καθώς το φάσμα παραμένει ακριβώς το ίδιο. Έτσι έγινε προσπάθεια μελέτης της υδρόλυσης του συμπλόκου αυτού σε διαλύτη D_2O και λήφθηκαν φάσματα αμέσως μετά την διάλυση και μετά από 24 h. Έτσι, το φάσμα του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]^{3+}$ σε D_2O σχεδόν αμέσως μετά την διάλυση εμφανίστηκαν δύο ομάδες συντονισμού των πρωτονίων του, ενώ παρατηρήθηκε μετά από την ολοκλήρωση των κορυφών του φάσματος η ύπαρξη δύο συμπλόκων σε αναλογία 1:2 για το υδρολυμένο όσο και το αρχικό χλώρο σύμπλοκο αντίστοιχα. Τα φάσματα αυτά φαίνονται στο σχήμα 3.2.7 και οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των συμπλόκων φαίνονται στον πίνακα 3.2.1.



Σχήμα 3.2.7. Φάσμα ^1H NMR του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]^{3+}$ σε D_2O (πάνω υδρολυμένο σύμπλοκο μετά τη πάροδο 24 h ,κάτω χλώρο και υδρολυμένο αμέσως μετά την διάλυση).

Μετά την πάροδο 24 h οι ταινίες του χλώρο συμπλόκου εξαφανίζονται δείχνοντας την πλήρη αντικατάσταση του χλωρίου από ένα μόριο νερού. Σημαντική είναι η μεταβολή των



χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων H6 και H5 του πυριδινικού δακτυλίου που βρίσκεται σε γειτονική θέση με τη θέση ένταξης του νερού η οποία μεταβάλλεται από τα 10.14 ppm στα 9.73 ppm για το πρωτόνιο H6 και από τα 8.32 ppm στα 7.63 ppm για το πρωτόνιο H5. Η μεγάλη αυτή μεταβολή τεκμηριώνει την ύπαρξη του υδρολυμένου συμπλόκου αφού η απομάκρυνση του ηλεκτροαρνητικότερου χλωρίου το οποίο αποπροάσπιζε τα πρωτόνια αυτά ελαττώνοντας τους την ηλεκτρονιακή πυκνότητα, τους συντονίζει πλέον σε υψηλότερα πεδία.

Το γεγονός της υδρόλυσης του συμπλόκου, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα για την δραστικότητα του συμπλόκου στο DNA καθώς η ένταξη του συμπλόκου στις βάσεις του DNA προϋποθέτει την υδρόλυσή του. Για τον λόγο αυτό τα πειράματα με το DNA, που παρουσιάζονται πιο κάτω, πραγματοποιήθηκαν σε D₂O μετά την πάροδο 24 h.

Πίνακας 3.2.2. Χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺ 298 K σε D₂O σε 0 h και σε 24 h.

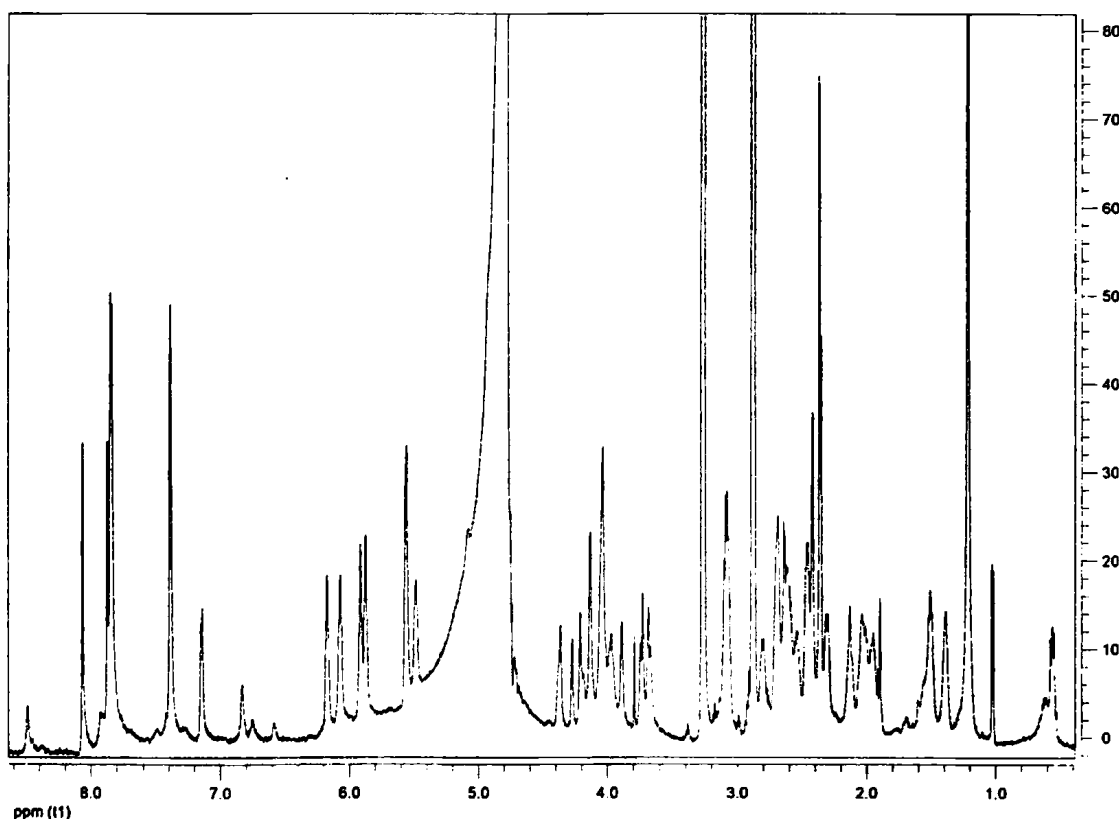
<i>Πρωτόνια</i>	<i>Χλώρο σύμπλοκο- υδρολυμένο σε 0 h</i>	<i>Υδρολυμένο σύμπλοκο σε 24 h</i>
Y1 H3	9.14 ppm - 9.12 ppm	9.12 ppm
Y1 H5	8.32 ppm - 7.60 ppm	7.58 ppm
Y1 H6	10.14 ppm - 9.73 ppm	9.73 ppm
Y1 H3'	8.78 ppm	8.77 ppm
Y1 H5'	6.98 ppm	6.97 ppm
Y1 H6'	8.39 ppm	8.37 ppm
Terpy H3H3'	7.71 ppm	7.72 ppm
Terpy H4H4'	7.32 ppm	7.32 ppm
Terpy H5H5'	7.98 ppm	7.98 ppm
Terpy H6H6'	8.47 ppm	8.46 ppm
Terpy H3''H5''	8.62 ppm	8.60 ppm
Terpy H4''	8.27 ppm	8.29 ppm
H α -Lys	4.64 ppm	4.63 ppm
H β -Lys	2.09 ppm	2.06 ppm
H γ -Lys	1.46 ppm	1.43 ppm
H δ -Lys	1.68 ppm	1.80 ppm
H ϵ -Lys	3.09 ppm	3.08 ppm
H α' -Lys	4.45 ppm	4.42 ppm
H β' -Lys	1.81 ppm	1.85 ppm
H γ' -Lys	1.46 ppm	1.43 ppm
H δ' -Lys	1.68 ppm	1.67 ppm
H ϵ' -Lys	2.97 ppm	2.95 ppm



3.2.3. Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(3'-GTCGAC-5')$

3.2.3.1. Ανάλυση φάσματος 1H NMR του $d(3'-GTCGAC-5')$

Το φάσμα 1H NMR, μιας διάστασης του ολιγονουκλεοτιδίου λήφθηκε σε μίγμα διαλυτών H_2O / D_2O 90% / 10%. Οι χημικές μετατοπίσεις του ολιγονουκλεοτιδίου τόσο για τα ανταλλάξιμα με τον διαλύτη πρωτόνια (αρωματικά μίνο πρωτόνια και πρωτόνια των εξωκυκλικών αμινομάδων) όσο και για τα μη ανταλλάξιμα με τον διαλύτη πρωτόνια (αρωματικά πρωτόνια των νουκλεϊνικών βάσεων και αλειφατικά του σακχάρου), έχουν ήδη ταυτοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες με διάφορες μεθόδους [153, 177, 178]. Στο πιο κάτω σχήμα παρουσιάζεται το 1D φάσμα του ολιγονουκλεοτιδίου.



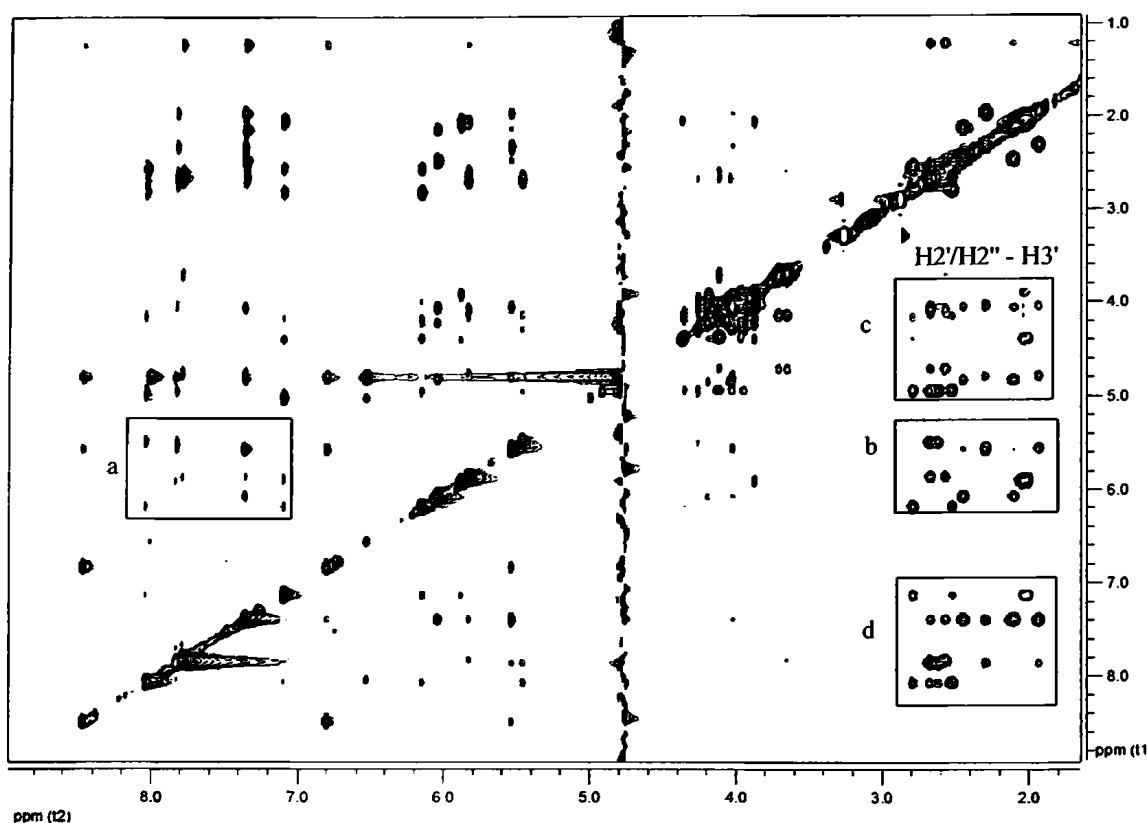
Σχήμα 3.2.8. Φάσμα 1H NMR μια διάστασης του $d(3'-GTCCAC-5')$ σε H_2O / D_2O 90% / 10%.

Απόδοση των μη ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων του $d(3'-GTCGAC-5')_2$

Με την βοήθεια των φασμάτων NOESY και DQF COSY καθώς και της βιβλιογραφίας [153, 177, 178] προσδιορίστηκαν τα αρωματικά πρωτόνια των νουκλεϊνικών βάσεων, των πρωτονίων H8 των βάσεων της γουανίνης (G1 και G4), των πρωτονίων H8 και H2 της αδενίνης (A2), του πρωτονίου H6 της θυμίνης και των πρωτονίων H6 και H5 των βάσεων της κυτοσίνης (C3 και C6) καθώς και τα πρωτόνια H1' H2' / H2'' και H3 των σακχάρων. Με βάση το φάσμα DQF COSY προσδιορίζονται τα πρωτόνια και H6 και H5 των βάσεων της κυτοσίνης (C3 και C6) αφού συζεύγγονται μέσω τριών δεσμών 3J δίνοντας δύο ισχυρές κορυφές διασταύρωσης καθώς και τα πρωτόνια H1' με H2' / H2'' και H2' / H2'' με H3' δίνοντας επίσης συζεύξεις 3J μεταξύ τους.

Στο σχήμα 3.2.9, φαίνεται το φάσμα 2D NOE του $d(3'-GTCGAC-5')_2$, όπου επισημαίνονται με α έως δ οι περιοχές των κορυφών διασταύρωσης για πρωτόνια που βρίσκονται σε αποστάσεις μικρότερες των 5.0 Å. Στην περιοχή (α) φαίνονται τα σήματα NOE των αρωματικών πρωτονίων με τα H1' της ίδιας νουκλεϊνικής βάσης της ίδιας αλυσίδας. Με βάση αυτά προσδιορίζονται και τα υπόλοιπα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου. Τα H1' δίνουν εν συνεχεία σήματα NOE με τα H2' και H2'' όπως αυτά φαίνονται στην περιοχή (b) ενώ η διάκριση τους μπορεί να γίνει με σύγκριση των φασμάτων COSY και NOESY βάσει των διαφορών στη σύζευξη μεταξύ των H2 με τα πρωτόνια H3'. Τα H2' και H2'' στη συνέχεια εμφανίζουν κορυφές διασταύρωσης με τα πρωτόνια H3' (βλέπε περιοχή c). Στην περιοχή (d) φαίνονται τα σήματα NOE μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων των βάσεων με τα πρωτόνια H2' και H2''.

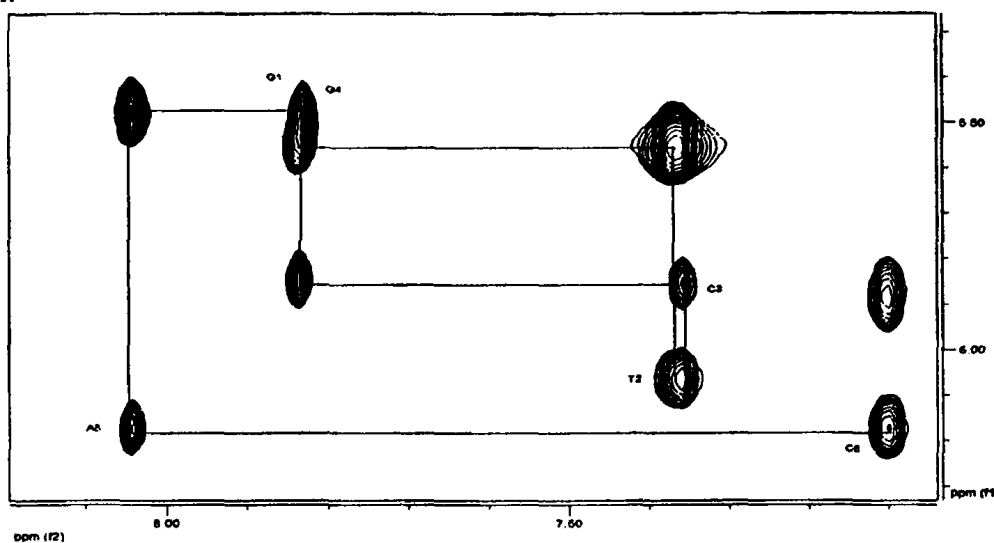




Σχήμα 3.2.9. Φάσμα NOESY του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-GTCGAC-5')₂.

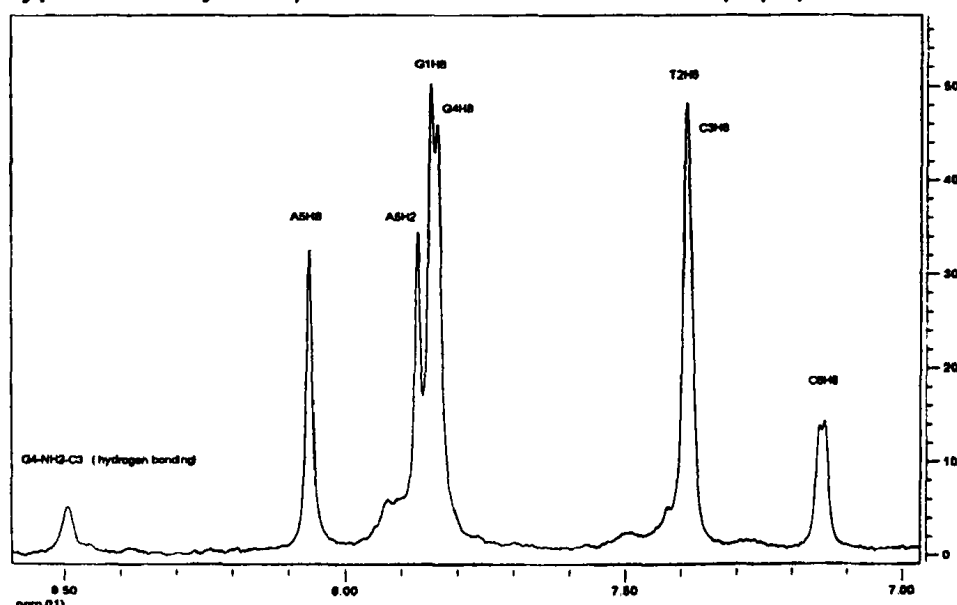
Με βάση το φάσμα NOESY, χρησιμοποιήθηκαν τα σήματα NOE μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων των βάσεων με τα H1' της ίδιας νουκλεϊνικής βάσης της ίδιας αλυσίδας και έπειτα τα σήματα NOE των πρωτονίων H1' με τα πρωτόνια H6/H8 της επόμενης βάσης (σχήμα 3.2.10). Έτσι με βάση το σχήμα αυτό παρατηρούμε κορυφές διασταύρωσης μεταξύ των πρωτονίων στα 7.84 ppm (G1H8) με το 5.56 ppm (H1') και έπειτα αυτού με το πρωτόνιο (T2H8) στα 7.39 ppm, το οποίο σχηματίζει κορυφή διασταύρωσης με το πρωτόνιο H1' στα 6.07 ppm. Το τελευταίο πρωτόνιο H1', παρουσιάζει κορυφή διασταύρωσης με το αρωματικό πρωτόνιο της επόμενης βάσης που είναι το πρωτόνιο (C3H6) στα 7.39 ppm. Το πρωτόνιο αυτό εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης με το πρωτόνιο H1' στα 5.87 ppm. Έτσι λοιπόν, ακολουθώντας το μονοπάτι αυτό βρέθηκαν και οι υπόλοιπες κορυφές διασταύρωσης για την απόδοση των κορυφών στην αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου. Το πρωτόνιο H1' στα 5.87 ppm με το πρωτόνιο της επόμενης βάσης (G4H8) στα 7.84 ppm, αυτό με το πρωτόνιο H1' στα 5.48 ppm που εν συνεχεία εμφανίζει κορυφή διασταύρωσης με το πρωτόνιο (A5H8) στα 8.06 ppm. Το πρωτόνιο αυτό, εμφανίζει τέλος κορυφή διασταύρωσης

με το πρωτόνιο H1' στα 6.17 ppm και αυτό με το πρωτόνιο της επόμενης βάσης (C6H6) στα 7.15 ppm.

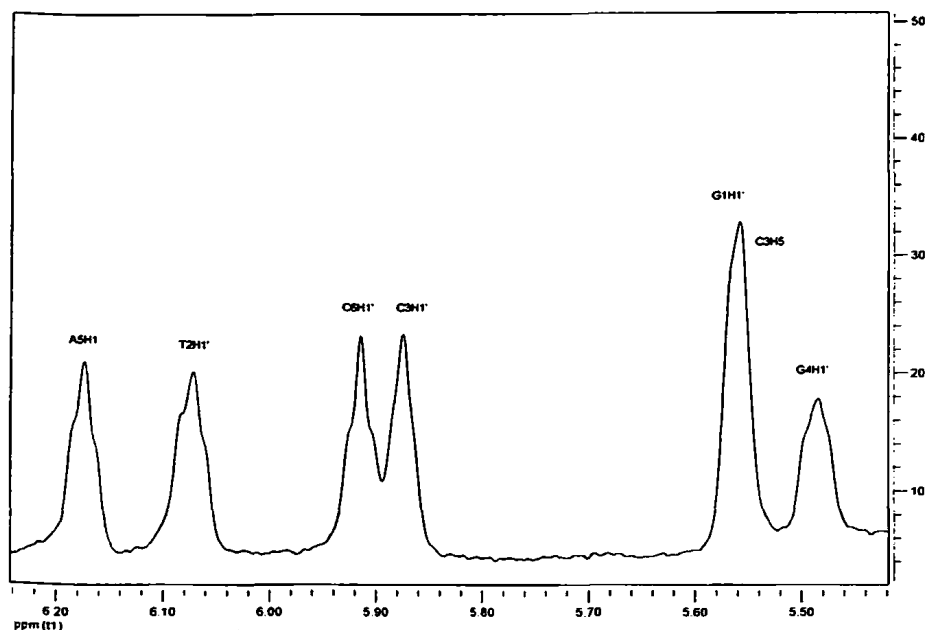


Σχήμα 3.2.10. Περιοχή φάσματος NOESY όπου φαίνονται οι κορυφές διασταύρωσης μεταξύ της περιοχής H8 /H6 με τα H1'. Φαίνεται η σύνδεση των ολιγονουλεσιδίων από το G1 στο C6 μέσω των NOE.

Στα επόμενα σχήματα φαίνονται δύο περιοχές από το φάσμα ^1H NMR για τα αρωματικά πρωτόνια των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου καθώς και τα πρωτόνια H1' του σακχάρου όπως αυτά προσδιορίστηκαν με βάση τα πιο πάνω φάσματα και τέλος ο πίνακας με τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων κάθε νουκλεϊνικού παραγώγου.



Σχήμα 3.2.11. Φάσμα ^1H NMR μια διάστασης του $d(3'-\text{GTCGAC}-5')_2$ σε $\text{D}_2\text{O} / \text{H}_2\text{O}$ στο οποίο φαίνονται τα αρωματικά πρωτόνια των βάσεων του ολιγονουλεσιδίου.



Σχήμα 3.2.12. Φάσμα ^1H NMR μια διάστασης του $d(3'-\text{GTCGAC}-5')_2$ σε $\text{D}_2\text{O} / \text{H}_2\text{O}$ στο οποίο φαίνονται τα πρωτόνια των σακχάρων του ολιγονουκλεοτιδίου καθώς και τα πρωτόνια H5 των βάσεων της κυτοσίνης.

Πίνακας 3.2.3. Οι χημικές μετατοπίσεις των μη ανταλλάξιμων με τον διαλύτη πρωτονίων του $d(3'-\text{GTCGAC}-5')_2$.

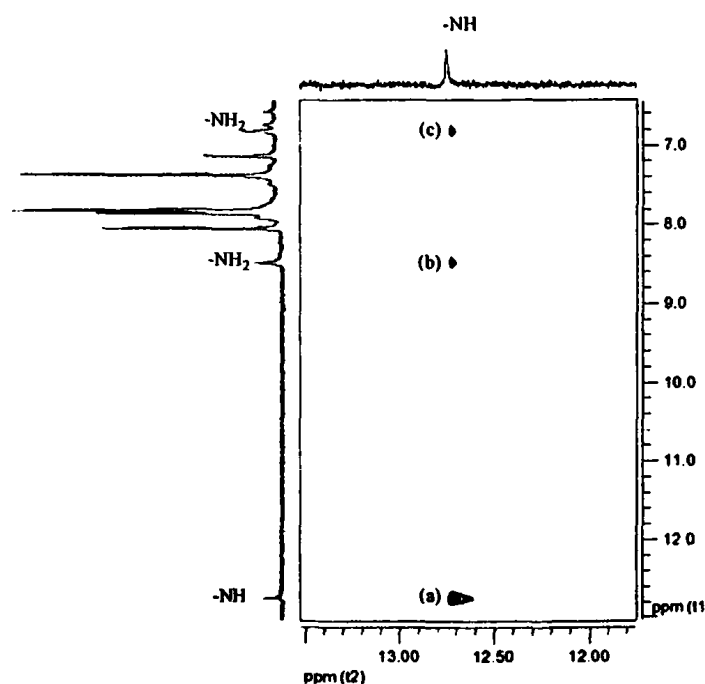
	H8 / H6	H1'	H2'	H2''	H3'	
G1	7.85ppm	5.56 ppm	2.28 ppm	2.44 ppm	4.94 ppm	
T2	7.39 ppm	6.07 ppm	2.10 ppm	2.44 ppm	4.82 ppm	1.20 ppm (-CH ₃)
C3	7.39 ppm	5.87 ppm	2.57 ppm	2.66 ppm	4.70 ppm	5.56 ppm (H5)
G4	7.84 ppm	5.48 ppm	1.92 ppm	2.10 ppm	4.83 ppm	
A5	8.06 ppm	6.17 ppm	2.52 ppm	2.79 ppm	4.94 ppm	7.87 ppm (H2)
C6	7.15 ppm	5.91 ppm	2.00 ppm	2.04 ppm	4.39 ppm	5.50 ppm (H5)

Απόδοση των ανταλλάξιμων με το διαλύτη πρωτονίων

Για τον προσδιορισμό των άμινο και ίμινο πρωτονίων λήφθηκε υπόψη το γεγονός του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου της κάθε βάσης του ολιγονουκλεοτιδίου με την συμπληρωματική της, δημιουργώντας τα ζευγάρια των βάσεων A - T και C - G (δεσμοί υδρογόνου Watson-Crick). Οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται ανάμεσα στο αρωματικό

ίμινο πρωτόνιο της θυμίνης με το N1 της αδενίνης και του ενός υδρογόνου της εξωκυκλικής αμινομάδας της αδενίνης με το O4 της θυμίνης για το ζευγάρι των βάσεων θυμίνης-αδενίνης. Για τα ζευγάρια των βάσεων γουανίνης - κυτοσίνης οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται ανάμεσα στο αρωματικό ίμινο πρωτόνιο της γουανίνης με το N3 της κυτοσίνης, του ενός υδρογόνου της εξωκυκλικής αμινομάδας της κυτοσίνης με το O6 της γουανίνης και του ενός υδρογόνου της εξωκυκλικής αμινομάδας της γουανίνης με το O2 της κυτοσίνης.

Στην περιοχή των 12 – 14 ppm όπου αναμένονται τα ίμινο πρωτόνια, παρατηρήθηκαν δύο σήματα συντονισμού, στα 13.80 ppm για το ίμινο πρωτόνιο της θυμίνης και στα 12.76 ppm για το ίμινο πρωτόνιο της γουανίνης (G4). Το γεγονός της απουσίας ταινίας συντονισμού για το ίμινο πρωτόνιο της γουανίνης (G1) δείχνει τη μη συμμετοχή των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου σε δεσμούς Watson - Crick και το άνοιγμα της διπλής έλικας του DNA στα δυο του άκρα ή την ανταλλαγή των πρωτονίων αυτών με τον διαλύτη [158]. Τα πρωτόνια των $-NH_2$ της γουανίνης (G4) που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου συντονίζονται στα 8.49 ppm ενώ εκείνα που δεν συμμετέχουν στα 6.83 ppm ενώ η απουσία σημάτων συντονισμού των $-NH_2$ των ακραίων βάσεων ενισχύει το φαινόμενο της ανοικτής διπλής έλικας στα άκρα. Στο πιο κάτω σχήμα φαίνονται τα σήματα NOE του ίμινο πρωτονίου των βάσεων της γουανίνης με τα πρωτόνια της αμινομάδας της κυτοσίνης, τόσο εκείνου που συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου όσο και με εκείνο που δεν μετέχει σε τέτοιους δεσμούς καθώς παρουσιάζουν ισχυρές κορυφές διασταύρωσης μεταξύ τους.



Σχήμα 3.2.13. Περιοχή φάσματος NOESY όπου φαίνονται τα NOE μεταξύ των ίμινο πρωτονίων με τα πρωτόνια των εξωκυκλικών αμινομάδων. Όπου (α) διαγώνιος φάσματος NOESY, (β) κορυφή διασταύρωσης με τα $-NH_2$ που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, (c) κορυφή διασταύρωσης με τα $-NH_2$ που δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου.

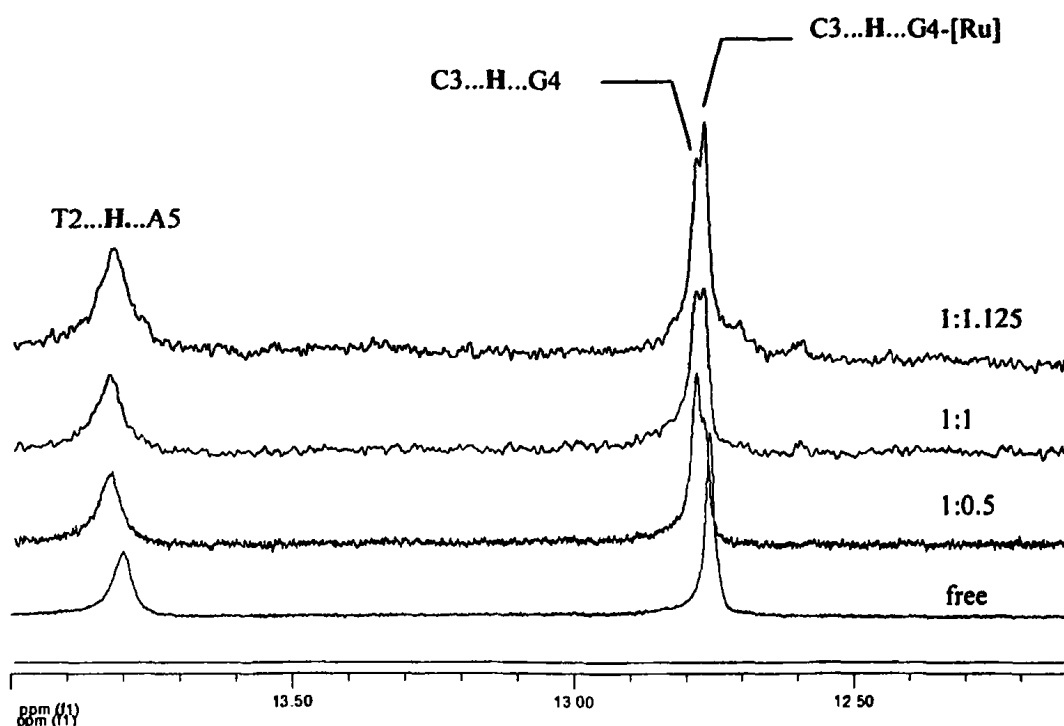


3.2.3.2. Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(3'-GTTCGAC-5')_2$

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ με τη διπλή έλικα του $d(3'-GTTCGAC-5')_2$ βασίστηκε σε πειράματα 1H NMR δυο διαστάσεων DQF COSY και NOESY. Δείγμα γνωστής συγκέντρωσης του ολιγονουκλεοτιδίου $d(3'-GTTCGAC-5')_2$ τιτλοδοτήθηκε με το σύμπλοκο σε αναλογίες 1 : 0.125, 1 : 0.25, 1 : 0.5, 1 : 0.75, 1 : 1, 1 : 1.075, 1 : 1.125 (οι αναλογίες συμπλόκου αναφέρονται ανά ζεύγος βάσεων) και καταγράφηκαν οι μεταβολές που επέρχονται σε κάθε στάδιο της τιτλοδότησης.

Αρχικά μελετήθηκαν οι μεταβολές για τα ιμίνιο πρωτόνια των βάσεων της αδενίνης (A5) και της γουανίνης (G4) του ολιγονουκλεοτιδίου που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου Watson - Crick που συγκρατούν την διπλή έλικα. Τα ιμίνιο αυτά πρωτόνια εμφανίζονται όπως αναφέραμε πιο πάνω στο ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο στα 13.80 ppm για την A5 και στα 12.76 ppm για την G4. Η μετατόπιση τους προς χαμηλότερα ή υψηλότερα πεδία προκαλείται όταν διαφοροποιείται το χημικό περιβάλλον από την παρουσία χημικών ενώσεων που δεσμεύονται στην διπλή έλικα. [179]. Στο σχήμα 3.2.14 φαίνεται η περιοχή των ιμίνιο πρωτονίων του φάσματος μιας διάστασης του ολιγονουκλεοτιδίου και πως αυτή μεταβάλλεται παρουσία του συμπλόκου στις διάφορες αναλογίες 1 : 0.5, 1 : 1 και 1 : 1.125.

Από το φάσμα (σχήμα 3.2.14) παρατηρούμε μια σημαντική μεταβολή των σημάτων των ιμίνιο πρωτονίων τόσο της αδενίνης A5 που δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με την T2 όσο και της γουανίνης G4 που δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με την C3. Η απλή ταινία στα 12.76 ppm που οφείλεται στο ιμίνιο πρωτόνιο της γουανίνης κατά την προσθήκη του συμπλόκου μειώνει την έντασή της, ενώ εμφανίζεται μια νέα ταινία σε χαμηλότερα πεδία που οφείλεται πιθανόν στην ένταξη του συμπλόκου στην G4. Ταυτόχρονα παρατηρείται μια διαπλάτυνση του σήματος στα 13.80 ppm του ιμίνιο πρωτονίου της αδενίνης.



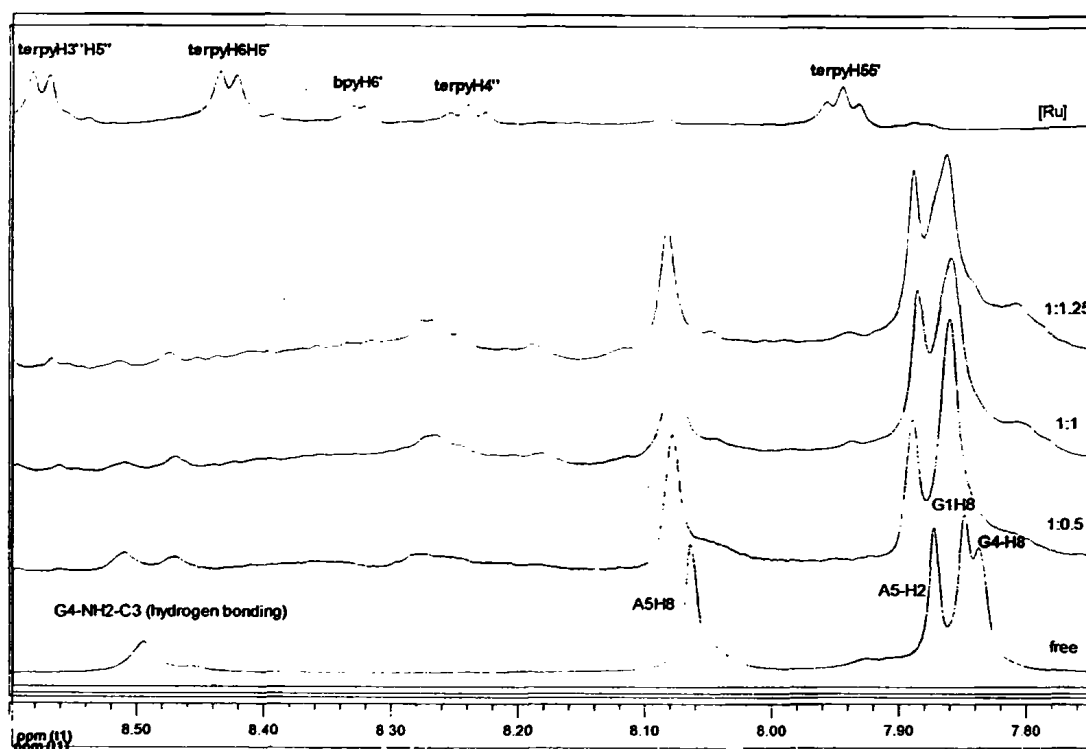
Σχήμα 3.2.14. Περιοχή 12.0 – 14.0 ppm του φάσματος 1D του ολιγονουκλεοτιδίου όπου φαίνονται οι κορυφές των μίνο πρωτονίων του και πως αυτές μεταβάλλονται παρουσία του συμπλόκου στις διάφορες αναλογίες.

Η αντίδραση αυτή είναι αργής κινητικής στην κλίμακα χρόνου του NMR, εμφανίζοντας μια νέα ταινία. Στην περίπτωση γρήγορης κινητικής, η υπάρχουσα ταινία θα μετατοπιζόταν σε χαμηλότερα ppm. Η διαπλάτυνση που παρατηρείται στην ταινία A5...H...T2 μπορεί να οφείλεται στην διασπορά των χημικών μετατοπίσεων των πυρήνων των μίνο πρωτονίων εξαιτίας της ανισοδυναμίας στο χημικό τους περιβάλλον καθώς υπάρχει στο διάλυμα και ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο και δεσμευμένο με σύμπλοκο ή εναλλακτικά σε δέσμευση μικρού μέρους του συμπλόκου και από την αδενίνη ή ακόμη και σε φαινόμενα ανταλλαγής με τον διαλύτη καθώς ο δεσμός αυτός βίσκεται στις ακραίες βάσεις της αλληλουχίας. Είναι φανερό λοιπόν ότι η ένταξη του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$, δεν χαλαρεί την διαμόρφωση της διπλής έλικας αφού οι δεσμοί υδρογόνου Watson - Crick που την συγκρατούν εξακολουθούν να υφίστανται.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η περιοχή των αρωματικών πρωτονίων των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου. Πράγματι στην περιοχή αυτή παρατηρήθηκε η σταδιακή μείωση του σήματος συντονισμού του πρωτονίου H8 της γουανίνης (G4) στα 7.84 ppm το οποίο στις αναλογίες 1 : 1 και 1 : 1.25 απουσιάζει εντελώς (σχήμα 3.2.15) ενώ δεν παρατηρείται

σημαντική μεταβολή στο σήμα συντονισμού της γουανίνης (G1) ούτε ως προς την ένταση ούτε ως προς την χημική μετατόπιση.

Η μικρή μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων των υπολοίπων βάσεων της αλληλουχίας σε χαμηλότερα πεδία από την αρχή της τιτλοδότησης δείχνει ότι η δέσμευση του συμπλόκου στην γουανίνη (G4) επιφέρει μικρές αλλαγές στη δομή της διπλής έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου. Σε αναλογία 1 : 1 το σύμπλοκο αποκλειστικά σχεδόν δεσμεύεται στην G4 που βρίσκεται στο κέντρο της διπλής έλικας. Η εκλεκτική αυτή δέσμευση συνεχίζεται και σε μεγαλύτερες αναλογίες όπως παρατηρείται στην περίπτωση του 1 : 1.125 και ενδεχομένως να συνεχίζεται μέχρι αναλογίας 1 : 2 που αντιστοιχεί στην πλήρη δέσμευση και από τους δύο κλώνους.



Σχήμα 3.2.15. Περιοχή 9.0 – 7.70 ppm του φάσματος 1D του ολιγονουκλεοτιδίου όπου φαίνονται οι μεταβολές των σημάτων συντονισμού με την προσθήκη του συμπλόκου.

Η εκλεκτικότητα του συμπλόκου να δεσμεύεται στο κέντρο της διπλής έλικας έχει σαν αποτέλεσμα την μετατόπιση ή διεύρυνση του σήματος συντονισμού και της αμινο ομάδας της γουανίνης που εμπλέκεται σε δεσμούς υδρογόνου Watson - Crick όπως φαίνεται

και στο πιο πάνω σχήμα. Η αντικατάσταση του H₂O στην αξονική θέση του συμπλόκου από το N7 της G4 επιφέρει σημαντική μετακίνηση και διαπλάτυνση των σημάτων συντονισμού όλου του συμπλόκου έτσι ώστε να είναι δύσκολο να αποδοθούν τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του συστήματος ολιγονουκλεοτιδίου G4 - [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺.

Αξίζει να αναφερθεί ότι ο μηχανισμός της αντικαρκινικής δραστηριότητας του *cisplatin* έχει συσχετισθεί με τον σχηματισμό ενδοκλωνικών δεσμών που σχηματίζονται μεταξύ του Pt και των ατόμων N7 των βάσεων της γουανίνης [180]. Ακόμη έχει βρεθεί ότι πληθώρα διδοντικά συμπλόκα του Pt και Ru που εμφανίζουν κυτταροτοξικές ιδιότητες δεσμεύονται στις βάσεις της γουανίνης [181, 182]. Επίσης, έχουν βρεθεί ότι οργανομεταλλικά σύμπλοκα του Ru (II) του τύπου [(*n*6-arene)Ru(II)-(en)Cl][PF₆] (όπου en = εθυλενοδιαμίνη και *n*6-arene = *n*6-διφαινύλιο (Bip) ή 5,8,9,10- τετραυδροανθρακένιο (THA) ή 9,10 -διυδροανθρακένιο (DHA) παρουσιάζουν σημαντική αντικαρκινική δραστηριότητα *in vitro* [183, 76] και *in vivo* [184] συγκρίσιμη με του *cisplatin*, η οποία οφείλεται στην ισχυρή και εκλεκτική δέσμευση τους με τα άτομα N7 των βάσεων της γουανίνης.

3.2.4. Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺ με το ολιγονουκλεοτίδιο d(3'-CGCGCG-5')₂

Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺ μελετήθηκε επίσης με το ολιγονουκλεοτίδιο d(3'-CGCGCG-5')₂ με βάση τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ¹H NMR μίας και δύο διαστάσεων DQF COSY και NOESY. Η ανάλυση του ολιγονουκλεοτιδίου αυτού παρουσιάστηκε στην ενότητα 3.1.4.1 Δείγμα γνωστής συγκέντρωσης του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5')₂ τιτλοδοτήθηκε με το σύμπλοκο σε αναλογίες 1 : 0.25, 1 : 0.5, 1 : 1.0, 1 : 2.0 και καταγράφηκαν οι μεταβολές των φασμάτων ¹H NMR σε κάθε στάδιο της τιτλοδότησης.

Αρχικά μελετήθηκαν οι μεταβολές για τα μίνο πρωτόνια των βάσεων της γουανίνης του ολιγονουκλεοτιδίου που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου Watson - Crick που συγκρατούν την διπλή έλικα. Εξαιτίας της μεγάλης ανάλυσης του οργάνου (600 MHz) παρατηρούμε δυο σήματα συντονισμού για τα μίνο πρωτόνια των βάσεων της γουανίνης ως

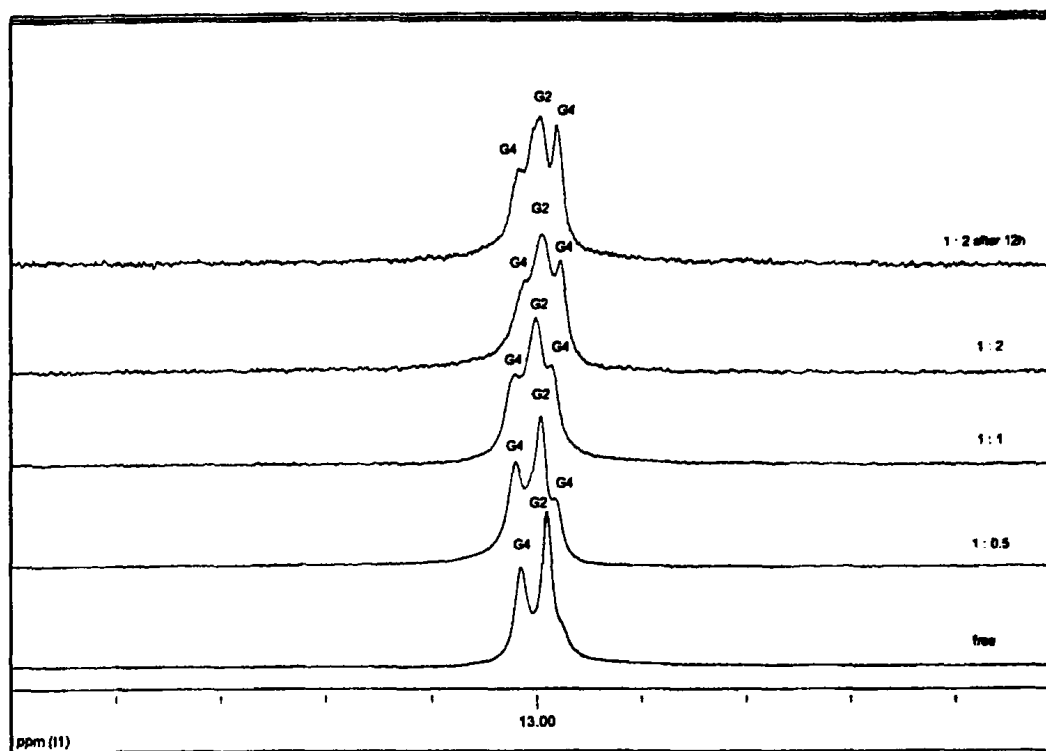


αποτέλεσμα της θέσης τους στη διπλή έλικα. Έτσι, τα ιμίνο πρωτόνια των βάσεων της γουανίνης G4 που βρίσκονται στο κέντρο της διπλής έλικας συντονίζονται στα 13.01 ppm για το ελευθερο ολιγονουκλεοτίδιο και τα ιμίνο πρωτόνια των βάσεων της γουανίνης G2 που βρίσκονται κοντά στα άκρα της διπλής έλικας συντονίζονται στα 12.99 ppm.



Η μεταβολή των σημάτων των ιμίνο πρωτονίων είναι ένα γεγονός που χαρακτηρίζει τις αλληλεπιδράσεις πληθώρας χημικών ενώσεων με το DNA [179]. Καθώς τα πρωτόνια αυτά λόγω της συμμετοχής τους σε δεσμούς υδρογόνου βρίσκονται σε χαμηλότερα πεδία, η δέσμευση διαφόρων μορίων στο DNA μπορεί να προκαλεί εξασθένηση των δεσμών αυτών και να τους μεταβάλει την χημική μετατόπιση προς χαμηλότερα ppm. Στο σχήμα 3.2.16 παρουσιάζεται η περιοχή των ιμίνο πρωτονίων του φάσματος μιας διάστασης του ολιγονουκλεοτιδίου και πως αυτή μεταβάλλεται παρουσία του συμπλόκου στις αναλογίες 1 : 0.5, 1 : 1 και 1 : 2 .

Από το φάσμα (σχήμα 3.2.16) παρατηρούμε σημαντικές μεταβολές των σημάτων των ιμίνο πρωτονίων των βάσεων της γουανίνης (G2 και G4). Συγκεκριμένα, σε αναλογία 1 : 0.5 η ταινία συντονισμού των ιμίνο πρωτονίων της γουανίνης G4 της I και II έλικας μειώνει αισθητά την ένταση της, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζεται μια νέα ταινία συντονισμού σε χαμηλότερα ppm. Ακόμη το εναπομένον σήμα που αποδίδεται στο ιμίνο πρωτόνιο της G4 της II αλυσίδας μετατοπίζεται σε χαμηλότερα πεδία (13.02 ppm) έχοντας μικρότερη ένταση. Εν συνεχεία, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του συμπλόκου η ταινία συντονισμού της G4 της I αλυσίδας εξασθενεί ακόμη, ενώ ενισχύεται η νέα ταινία συντονισμού που εμφανίζεται. Επίσης η ταινία συντονισμού της G2, στις αναλογίες 1 : 0.5, 1 : 1 μετατοπίζεται ελαφρώς σε χαμηλότερα πεδία (13.01 ppm) ενώ δεν μειώνεται καθόλου η ένταση της. Σε αναλογία 1 : 2 και με την πάροδο 12 h η ταινία συντονισμού της G2 αρχίζει σιγά σιγά να διευρύνεται.



Σχήμα 3.2.16. Περιοχή 12.0 – 14.0 ppm του φάσματος 1D του ολιγονουκλεοτιδίου $d(3'-CGCGCG-5')_2$ όπου φαίνονται οι κορυφές των ιμίνο πρωτονίων των βάσεων της γουανίνης και πως αυτές μεταβάλλονται παρουσία του συμπλόκου στις διάφορες αναλογίες.

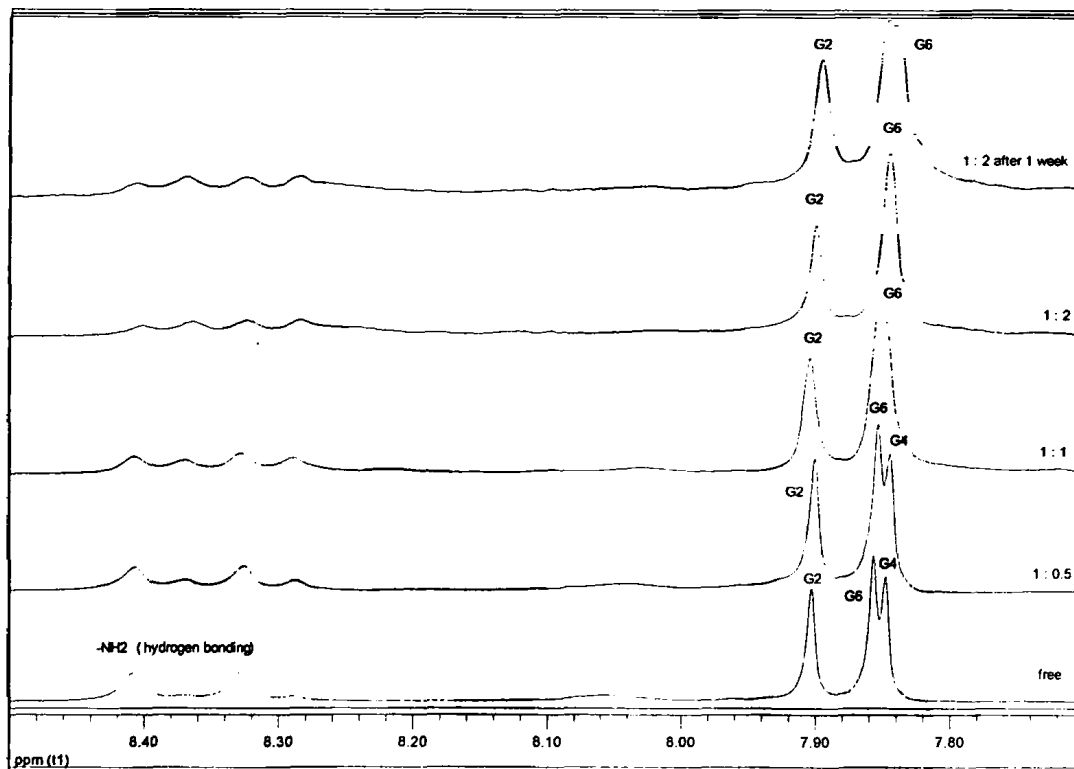
Η εμφάνιση της νέας ταινίας συντονισμού για το ιμίνο πρωτόνιο της μιας βάσης της γουανίνης G4 στα 12.98 ppm, στις αναλογίες 1 : 0.5 και 1 : 1, υποδηλώνει την δέσμευση του συμπλόκου στη βάση αυτή η οποία βρίσκεται στο κέντρο της διπλής έλικας. Με αυτό τον τρόπο το σύμπλοκο φαίνεται να δρα εκλεκτικά στην γουανίνη G4 της I έλικας η οποία βρίσκεται στο κέντρο της διπλής έλικας αφού το σήμα συντονισμού των βάσεων της γουανίνης G2 που βρίσκονται κοντά στα άκρα της διπλής έλικας δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα στις αναλογίες αυτές.

Καθώς προστίθεται σύμπλοκο σε μεγαλύτερη αναλογία, το σήμα συντονισμού του ιμίνο πρωτονίου στα 13.02 ppm δεν μεταβάλλεται πλέον δείχνοντας έτσι ότι το σύμπλοκο δεν προτιμά να αλληλεπιδράσει με την απομένουσα γουανίνη G4 της II αλυσίδας αλλά αντίθετα αρχίζει να αλληλεπιδρά με το ιμίνο πρωτόνιο της G2, ενδεχομένως της ίδιας αλυσίδας. Είναι φανερό λοιπόν, ότι το συμπλόκο $[Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH_2)_2bpy]Cl^{3+}$, δεσμεύεται στην



βάση της γουανίνης G4 εκλεκτικά ενώ δεν μεταβάλλει την δομή της διπλής έλικας καθώς οι δεσμοί υδρογόνου Watson - Crick που την συγκρατούν εξακολουθούν να υφίστανται.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η περιοχή των αρωματικών πρωτονίων των βάσεων της γουανίνης (G2, G4, G6) του ολιγονουκλεοτιδίου. Πράγματι στην περιοχή αυτή και σε αναλογία 1 : 0.5 παρατηρήθηκε η μείωση του σήματος συντονισμού του πρωτονίου H8 της γουανίνης (G4) στα 7.86 ppm το οποίο στις αναλογίες 1 : 1 και 1 : 2 απουσιάζει εντελώς (σχήμα 3.2.17) έχοντας μετατοπιστεί, ενώ δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή στα σήματα συντονισμού των βάσεων της γουανίνης G2 και G6 ούτε ως προς την ένταση ούτε ως προς την χημική μετατόπιση.



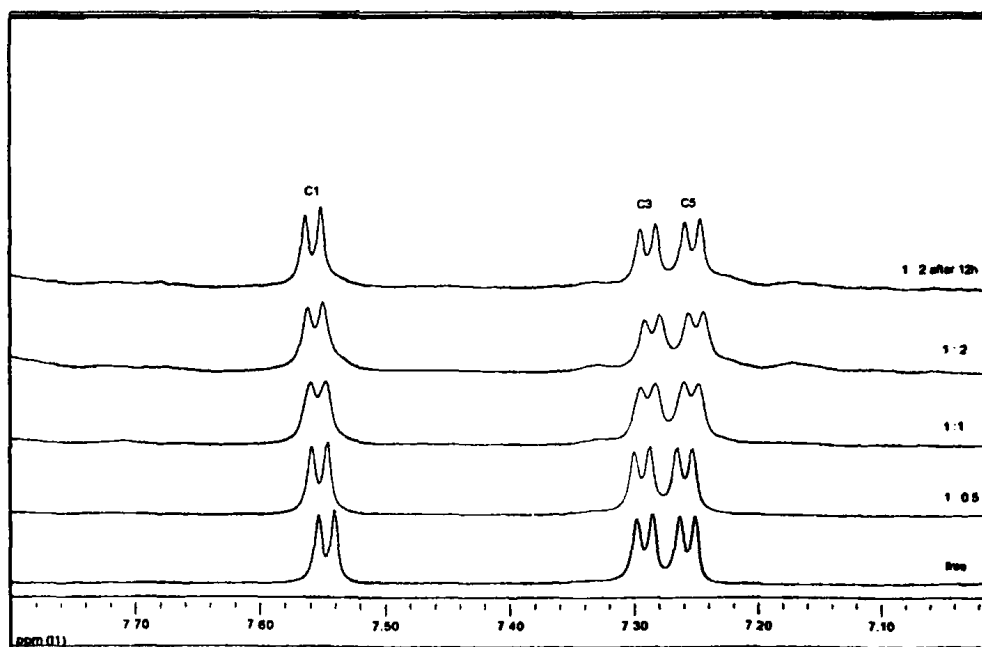
Σχήμα 3.2.17. Περιοχή 8.5 – 7.7 ppm του φάσματος 1D του ολιγονουκλεοτιδίου $d(3'-CGCGCG-5')_2$ όπου φαίνονται οι μεταβολές των σημάτων συντονισμού για τα αρωματικά πρωτόνια H8 των βάσεων της γουανίνης με την προσθήκη του συμπλόκου.

Μια μικρή μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των αρωματικών πρωτονίων των υπολοίπων βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου σε χαμηλότερα πεδία από την αρχή της

τιλοδότησης δείχνει ότι η δέσμευση του συμπλόκου στην γουανίνη (G4) επιφέρει μικρές αλλαγές στη δομή της διπλής έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου.

Η εκλεκτικότητα αυτή του συμπλόκου να δεσμεύεται για μια ακόμη φορά στο κέντρο της διπλής έλικας που βρίσκεται η G4 έχει σαν αποτέλεσμα την μετατόπιση και την διεύρυνση του σήματος συντονισμού του ενός πρωτονίου της άμινο ομάδας της γουανίνης που εμπλέκεται σε δεσμούς υδρογόνου Watson - Crick όπως φαίνεται και στο πιο πάνω σχήμα. Η αντικατάσταση του H₂O της αξονικής θέσης του συμπλόκου ενδεχομένως από το N7 της γουανίνης G4 επιφέρει σημαντική μετακίνηση και διαπλάτυνση των σημάτων συντονισμού όλου του συμπλόκου έτσι ώστε να είναι δύσκολο να αποδοθούν τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του συστήματος ολιγονουκλεοτιδίου G4 - [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι με την προσθήκη του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺ στο ολιγονουκλεοτίδιο d(3'-CGCGCG-5')₂ δεν παρατηρείται καμία μεταβολή στα σήματα συντονισμού των βάσεων της κυτοσίνης C1, C3 και C5 ούτε ως προς την ένταση ούτε ως προς την χημική μετατόπιση (σχήμα 3.2.18).



Σχήμα 3.2.18. Περιοχή 7.8 – 7.0 ppm του φάσματος 1D του ολιγονουκλεοτιδίου d(3'-CGCGCG-5')₂ όπου φαίνονται οι μεταβολές των σημάτων συντονισμού για τα αρωματικά πρωτόνια H6 των βάσεων της κυτοσίνης με την προσθήκη του συμπλόκου.

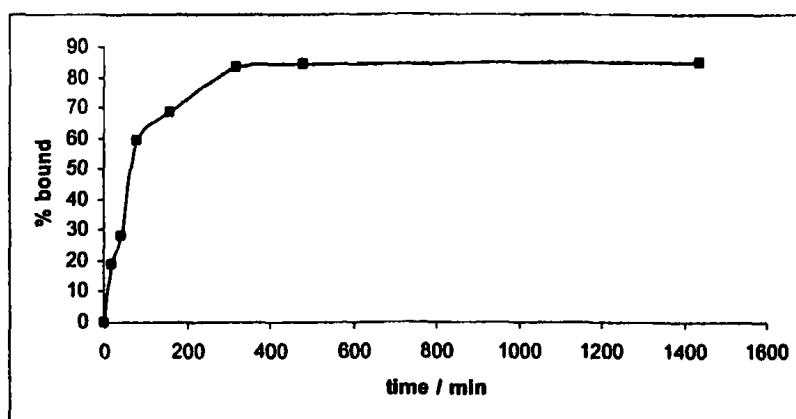
3.2.5. Αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ με DNA

3.2.5.1. Δέσμευση του συμπλόκου στο DNA

Στο πρώτο στάδιο μελέτης της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με CT-DNA προκειμένου να διαπιστωθούν οι πειραματικές συνθήκες, όπου ο βαθμός και ο χρόνος της δέσμευσης του συμπλόκου με αυτό βελτιστοποιούνται. Για την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών δέσμευσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα στο σκοτάδι στους 37 °C, υπό ακτινοβολία UVA (μέγιστη εκπομπή 350 nm) και υπό ακτινοβολία UVA με την παρουσία ηλεκτρολύτη (NaCl 0.15 M). Έτσι, προστέθηκε διάλυμα συμπλόκου (3.1×10^{-5} M) σε διάλυμα CT-DNA (3.1×10^{-4} M) στις πιο πάνω συνθήκες. Σε επιλεγμένα χρονικά διαστήματα πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -30 °C ούτως ώστε να διαπιστωθεί η χρονική εξέλιξη της δέσμευσης στο DNA. Καθώς το μέρος του συμπλόκου που δεσμεύεται στο DNA μπορεί να διαχωριστεί από το διάλυμα με υπερφυγοκέντριση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν με σκοπό την απομάκρυνση της ποσότητας του συμπλόκου που δεν έχει αλληλεπιδράσει με το DNA και μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά η απορρόφηση του ελεύθερου DNA και ακολούθως η περιεκτικότητά τους σε σύμπλοκο ρουθηνίου. Πιο κάτω φαίνονται οι καμπύλες κινητικής της δέσμευσης του συμπλόκου με CT-DNA όπως βρέθηκαν από τις συγκεντρώσεις του DNA που μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά (A_{260}) και τις τιμές περιεκτικότητας των αντίστοιχων διαλυμάτων σε ρουθίνιο με ατομική απορρόφηση (FAAS).

Πίνακας 3.2.4. Αποτελέσματα δέσμευσης του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ στο σκοτάδι στους 37 °C.

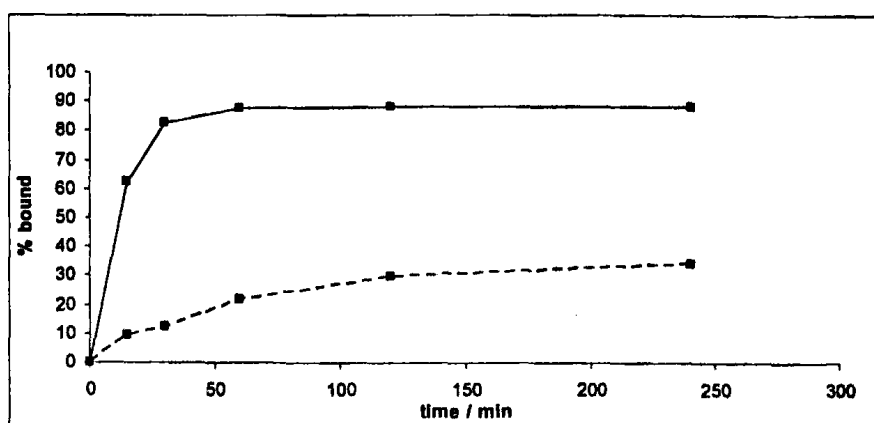
Χρόνος/min	0	20	40	80	160	320	480	24h
$C_{Ru} / 10^{-6}$ M	32.0	26.0	23.0	13.0	10.1	5.3	5.0	4.8
% bound	0	18.75	28.1	59.4	68.4	83.4	84.2	85.0



Σχήμα 3.2.18. Γραφική παράσταση της χρονικής εξέλιξης της δέσμευσης του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ στο σκοτάδι στους 37 °C.

Πίνακας 3.2.5. Αποτελέσματα δέσμευσης του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ (α) υπό ακτινοβολία UVA (μέγιστη εκπομπή 350 nm) και (β) υπό ακτινοβολία UVA με την παρουσία NaCl (0.15 M).

Χρόνος/min	0	15	30	60	120	240
$C_{\text{Ru}}/10^{-6}\text{M}$	32.0	12.0	5.6	3.99	3.77	3.74
%bound (α)	0	62.5	82.5	87.5	88.2	88.3
%bound (β)	0	9.4	12.5	21.9	29.7	34.4



Σχήμα 3.2.19. Γραφική παράσταση της χρονικής εξέλιξης της δέσμευσης του συμπλόκου (α) υπό ακτινοβολία UVA και (β) υπό ακτινοβολία UVA με την παρουσία NaCl (διακεκομμένη).

Από τα διαγράμματα (3.2.18, 3.2.19), παρατηρείται ότι η δέσμευση του συμπλόκου στο DNA παρεμποδίζεται από την παρουσία του NaCl αφού μόνο ένα μικρό ποσοστό του



συμπλόκου δεσμεύεται σε αυτό. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότατα στην παρεμπόδιση της υδρόλυσης του συμπλόκου και στην κατά συνέπεια παρεμπόδιση της δέσμευσης του στο DNA λόγω της περίσσειας των ιόντων χλωρίου στο διάλυμα.

Στις άλλες δύο περιπτώσεις (στο σκοτάδι στους 37 °C και υπό ακτινοβολία UVA με μέγιστη εκπομπή 350 nm) η δέσμευση αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου, πλησιάζοντας την πλήρη δέσμευση του συμπλόκου στο DNA σε ποσοστό 85 % σε χρόνο 240 min. Επομένως, από τα πειράματα αυτά είναι εμφανές ότι οι καταλληλότερες συνθήκες για την μελέτη της δέσμευσης του συμπλόκου στο DNA είναι η επώαση να γίνεται στο σκοτάδι και ο χρόνος στις 24 ώρες.

3.2.5.2. Σημείο τήξης του DNA (T_m)

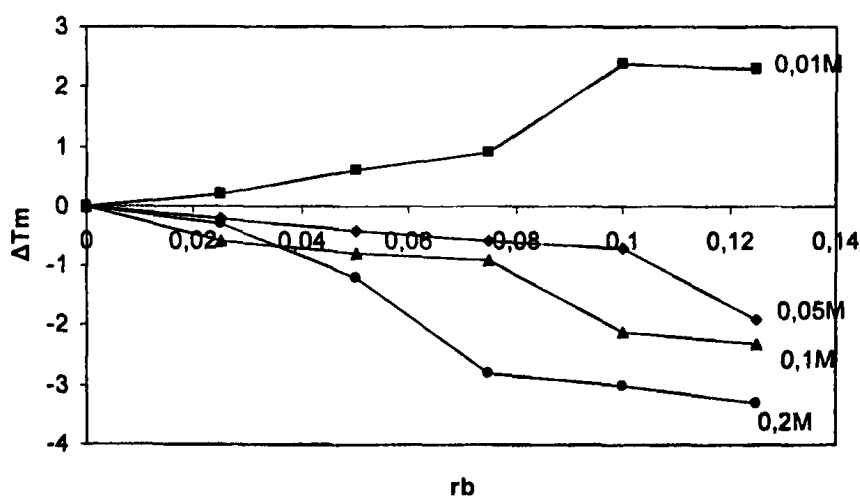
Είναι γνωστό ότι η διπλή έλικα του DNA αποτελείται από δύο κλώνους που συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι σχηματίζονται μεταξύ των βάσεων γουανίνη - κυτοσίνη και αδενίνη - θυμίνη. Η αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας πραγματοποιείται όταν όλοι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο κλώνων σπάσουν και οι κλώνοι αλλάζουν δομή στο χώρο, αποκτώντας τυχαία διάταξη. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται μετουσίωση του DNA. Η διαδικασία της μετουσίωσης είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία, γεγονός που μας επιτρέπει να μελετήσουμε την επαναδιευθέτηση των δεσμών κατά την διάρκεια θέρμανσης και στη συνέχεια ψύξης των διαλυμάτων. Το φαινόμενο της μετουσίωσης του DNA προσομοιάζει με την διαδικασία της τήξης, για αυτό χρησιμοποιείται ο όρος 'σημείο τήξης' T_m που είναι η θερμοκρασία όπου η δίκλωνη έλικα μετουσιώνεται και επαναδιατάσσεται. Σύμπλοκες ενώσεις είναι δυνατό να προκαλέσουν είτε την σταθεροποίηση της διπλής έλικας, δημιουργώντας δεσμούς μεταξύ των δύο κλώνων της, εμποδίζοντας έτσι το σπάσιμο των κλώνων της διπλής έλικας είτε την αποσταθεροποίηση, συνήθως σε σύμπλοκα που δρουν μονοδραστικά λόγω των διαταραχών που προκαλούνται στην διαμόρφωση της έλικας (κάμψη, αποελίκωση) [185].

Η μεταβολή του σημείου τήξης του CT-DNA εξαρτάται από την αναλογία του συμπλόκου του ρουθηνίου και από την συγκέντρωσή του σε ηλεκτρολύτη. Για να υπολογιστούν τα σημεία τήξης, καταγράφονται οι αντιστρεπτές καμπύλες τήξης του CT-

DNA με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm σε διάφορες αναλογίες r_b (0 – 0.125) καθώς και σε διάφορες συγκεντρώσεις άλατος NaClO_4 (0.01 M – 0.2 M). Η αναλογία r_b αναφέρεται στο λόγο της συγκέντρωσης του συμπλόκου ανά ζεύγος βάσης DNA. Με βάση τις τιμές που λαμβάνονται (πίνακας 3.2.6) σχηματίζεται το διάγραμμα που φαίνεται πιο κάτω (σχήμα 3.2.20) ως συνάρτηση της μεταβολής του T_m (ΔT_m) με την αναλογία r_b .

Πίνακας 3.2.6. Σημείο τήξης του CT-DNA σε διάφορες αναλογίες r_b και συγκεντρώσεις NaClO_4 . (α) 0.01 M NaClO_4 (β) 0.05 M NaClO_4 (γ) 0.1 M NaClO_4 (δ) 0.2 M NaClO_4 (k = CT-DNA απουσία συμπλόκου, $r_b = [\text{Ru}] / [\text{DNA}]$).

r_b	k	0.025	0.05	0.075	0.10	0.125
T_m (α)	68.2°C	68.4°C	68.8°C	69.1°C	70.6°C	70.5°C
T_m (β)	78.8°C	78.6°C	78.4°C	77.4°C	77.1°C	76.9°C
T_m (γ)	84.0°C	83.4°C	83.2°C	83.1°C	81.9°C	81.7°C
T_m (δ)	88.1°C	87.8°C	86.9°C	85.3°C	85.0°C	84.8°C



Σχήμα 3.2.20. Μεταβολή του T_m (ΔT_m) συναρτήσει της αναλογίας r_b στις διάφορες συγκεντρώσεις NaClO_4 (0.01 M – 0.2 M).

Έτσι σε χαμηλή συγκέντρωση NaClO_4 (0.01 M) παρατηρείται αύξηση του T_m ακόμα και σε σχετικά μεγάλη αναλογία συμπλόκου ($r_b = 0.125$). Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις NaClO_4 (0.05 M – 0.2 M) η προσθήκη του συμπλόκου στο CT-DNA μειώνει το T_m αυξανόμενη της αναλογίας του συμπλόκου r_b . Η αύξηση του T_m (2.3 °C) που παρατηρείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις ηλεκτρολύτη ενδεχομένως να οφείλεται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις όπως εξάλλου παρατηρήθηκε και στην προηγούμενη ενότητα για σύμπλοκα με ανάλογους υποκαταστάτες (Λ - και Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Yn})]^{2+}$).

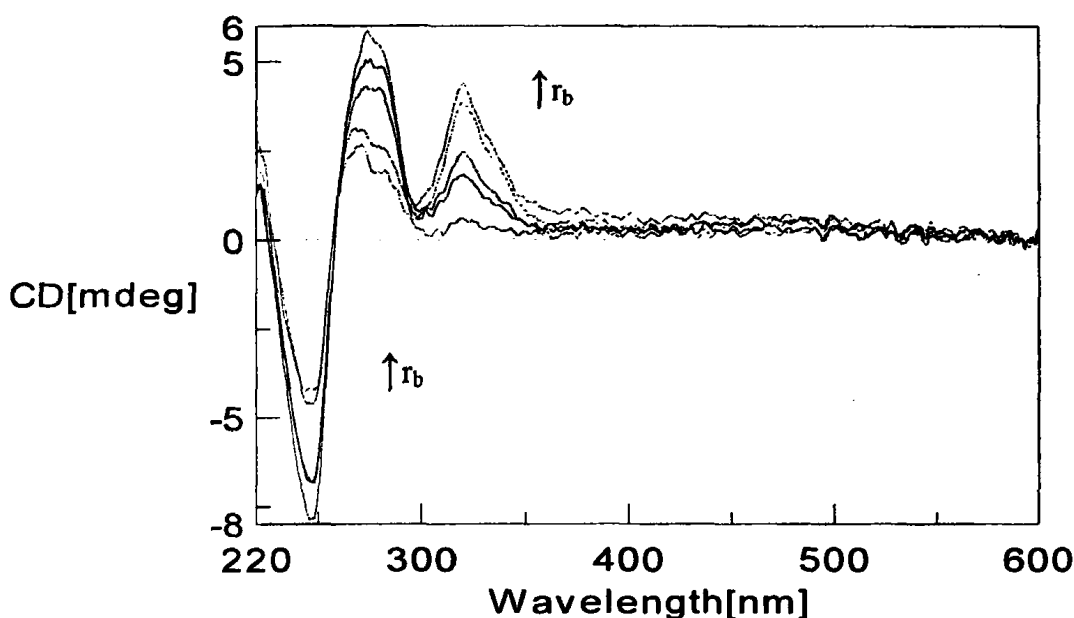
Κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη παρατηρείται μείωση του T_m σε όλες τις συγκεντρώσεις του συμπλόκου, πιθανότατα λόγω της εξουδετέρωσης των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων από τα θετικά ιόντα του ηλεκτρολύτη που βρίσκονται γύρω από την διπλή έλικα ή από τη διαταραχή της δομής της διπλής έλικας εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης του NaClO_4 . Ανάλογο φαινόμενο αύξησης του T_m και στη συνέχεια μείωσής του σε μεγάλες συγκεντρώσεις ηλεκτρολύτη παρουσίασαν και τα σύμπλοκα $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}_2]^{2+}$ (BBR3464) και $[\text{Pt}(\text{dien})\text{Cl}]^+$ [186, 187]. Έτσι η μείωση του T_m μπορεί να αποδοθεί μόνο στην αύξηση της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη καθώς είναι γνωστό και φαίνεται και από την στήλη k (πίνακας 3.2.6) ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του NaClO_4 προκαλεί από μόνη της μείωση του T_m . Για το τελευταίο και σε σύγκριση με το *cisplatin* όπου σε όλες τις συγκεντρώσεις NaClO_4 μειώνεται το σημείο τήξης του CT-DNA [187], θα μπορούσαμε να πούμε ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης του ηλεκτρολύτη μειώνεται η θερμοκρασία τήξης του DNA λόγω του ότι οι δυνάμεις εξουδετέρωσης των αρνητικών αυτών φορτίων είναι αρκετά ισχυρές με αποτέλεσμα να αποσταθεροποιούν τη διπλή έλικα. Έτσι λοιπόν, μετά την εξουδετέρωση των φωσφορικών ομάδων από τον ηλεκτρολύτη, μεγάλα μόρια και χαμηλού φορτίου μπορούν να προσεγγίσουν την έλικα του DNA και να αντιδράσουν ευκολότερα με το DNA.

3.2.5.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD)

Οι αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ με γραμμικό CT-DNA μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού προκειμένου να διαπιστωθεί ο τρόπος με τον οποίο συνδέονται και κατά επέκταση οι αλλαγές



που προκαλούν στη διαμόρφωση της διπλής έλικας. Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD) είναι μια ευαίσθητη φασματοσκοπική τεχνική που μας παρέχει πληροφορίες για τον τρόπο δέσμευσης ενός μικρού μορίου στο DNA σε σχέση με το είδος του μορίου, την συγκέντρωση του διαλύματος ή την αναλογία πρόσμιξης. Έτσι καταγράφηκαν φάσματα κατά την προσθήκη συμπλόκου σε αναλογίες $r_b = 0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125$ σε σταθερή συγκέντρωση CT-DNA $1.10^{-4} M$ (σχήμα 3.2.21).



Σχήμα 3.2.21. Φάσμα CD του DNA παρουσία του συμπλόκου σε αναλογίες $r_b = 0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125$ ($r_b = [Ru] / [DNA]$).

Κατά την προσθήκη του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στις χαρακτηριστικές ταινίες του DNA B-τύπου στα 268 nm και 245 nm. Γενικά μεταβολές στην ένταση της θετικής ταινίας Cotton στα 268 nm αποδίδονται σε μεταβολές στην συσσώρευση των βάσεων (stacking) της έλικας ενώ αλλαγές στην ένταση στην αρνητική ταινία Cotton στα 245 nm οφείλονται σε αλλαγές που προκαλούνται στην περιέλιξη της έλικας του B-DNA.

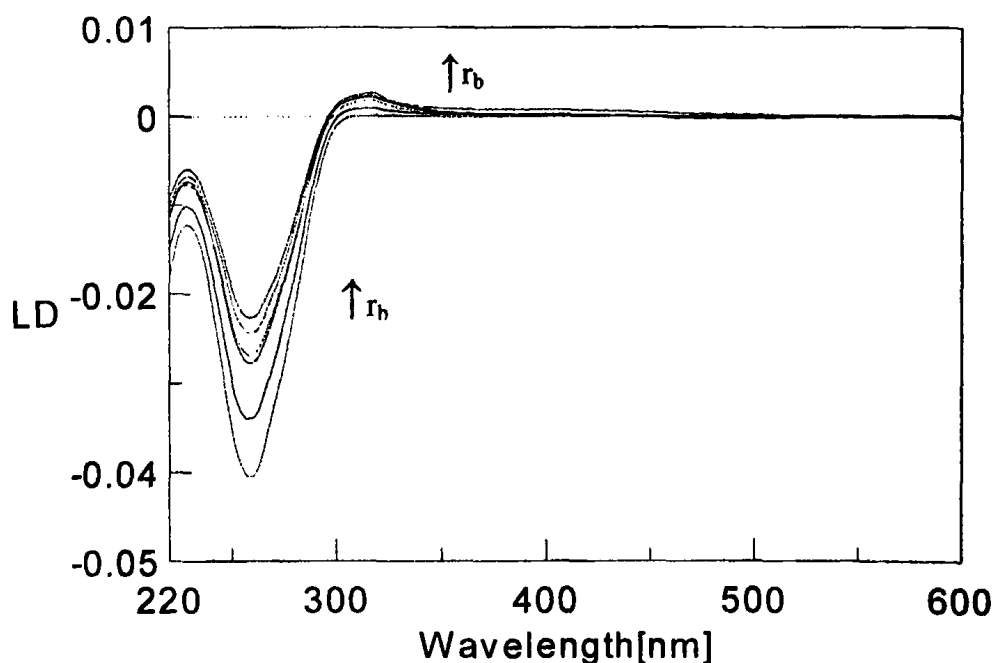
Καθώς αυξάνεται, η αναλογία r_b σε 0.025 σε 0.125 οι μεταβολές και στις δυο ταινίες γίνονται διαδοχικά όλο και πιο έντονες. Η ένταση της θετικής ταινίας Cotton καθώς και η ένταση της αρνητικής ταινίας μειώνονται, δείχνοντας ότι το σύμπλοκο προκαλεί μείωση στη

συσσώρευση των βάσεων του βιολογικού μορίου αλλά και ξετύλιγμα της έλικας του, αλλάζοντας δομή του DNA Β-τύπου. Επίσης μια καινούργια θετική ταινία Cotton εμφανίζεται στα 320 nm. Η ταινία αυτή είναι πιθανό να οφείλεται σε μια επιπλέον αλληλεπίδραση του συζευγμένου αμινοξέος με το DNA, καθώς έχει παρατηρηθεί και στα σύμπλοκα του τύπου Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(Yn)]²⁺ που μελετήθηκαν στην προηγούμενη ενότητα ενώ δεν παρατηρήθηκε σε απλά πολυπυριδινικά σύμπλοκα όπως [Ru(phen)₃] και [Ru(bpy)₃] [67]. Ανάλογη συμπεριφορά εμφανίζει και το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4-COGHKCONH₂-4'-Mebpy)Cl](PF₆) στο οποίο κατά την αλληλεπίδραση του με το CT-DNA εμφανίζεται μια νέα ταινία στην ίδια περιοχή που αποδόθηκε στην αλληλεπίδραση του συζευγμένου πεπτιδίου GHK με το DNA [119].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η παρατήρηση ότι η ταινία στα 245 nm δεν μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωση του συμπλόκου. Συγκεκριμένα σε αναλογία $r_b = 0.075$ και 0.05 η ένταση της ταινίας παραμένει η ίδια και στη συνέχεια σε αναλογία $r_b = 0.10$ αυξάνεται σημαντικά. Αυτή η ανομοιόμορφη μεταβολή μπορεί να έχει εξηγηθεί με βάση την τροποποίηση της δευτεροταγούς δομής του Β-DNA, σε δύο τουλάχιστον βήματα. Στο πρώτο σταθεροποιείται ενεργειακά μια ενδιάμεση διαμόρφωση μέχρι να καταναλωθεί η ποσότητα του συμπλόκου που την προκαλεί και στο δεύτερο βήμα σταθεροποιείται η τελική διαμόρφωση μέχρι την αναλογία $r_b = 0.075$. Παρόμοια συμπεριφορά προκαλούν μονοδραστικά σύμπλοκα του λευκοχρύσου όπως το [Pt(dien)Cl]⁺ [188]. Ανομοιόμορφες μεταβολές παρατηρήθηκαν επίσης κατά την αλληλεπίδραση οκταεδρικών *cis*-διχλωρο συμπλόκων του ρουθηνίου με DNA [117]. Αν και τα σύμπλοκα αυτά έχουν δυο θέσεις ένταξης στις βάσεις του DNA, φαίνεται ότι δεν είναι δυνατή η διδραστική ένταξη τους στις βάσεις του DNA λόγω είτε στερικών παρεμποδίσεων είτε λόγω υδρόλυσης του ενός μόνο χλωρίου [117]. Η ένταξη των συμπλόκων *trans*-[RuCl₄(dmsο-S)(Him)]⁻ γνωστό ως NAMI και H[RuCl₂(PDTA-H₂)] γνωστό ως RAP στο DNA προκάλεσε παρόμοιες μεταβολές στις χαρακτηριστικές ταινίες του στα φάσματα CD [189].

3.2.5.4. Φασματοσκοπία γραμμικού διχρωϊσμού (LD).

Οι αλληλεπιδράσεις του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'-(\text{COLysCONH}_2)_2\text{bpy})\text{Cl}]^{3+}$ με γραμμικό CT-DNA μελετήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική του γραμμικού διχρωϊσμού, ο οποίος μας παρέχει πληροφορίες για τον προσανατολισμό των βάσεων του DNA και του δεσμευμένου συμπλόκου σε αυτό. Το DNA παρέχει από μόνο του ένα αρνητικό σήμα LD στην περιοχή 200 - 300 nm που οφείλεται σε $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεις των βάσεων του DNA που είναι κάθετες στον άξονα z του DNA [170]. Κατά την δέσμευση του συμπλόκου με το DNA παρατηρούνται σήματα LD τόσο στην περιοχή του DNA όσο και στην περιοχή του συμπλόκου δείχνοντας έτσι τον προσανατολισμό του συμπλόκου και των βάσεων του DNA ως προς τον άξονα z οι οποίες επέρχονται λόγω της αλληλεπίδρασής τους. Έτσι, καταγράφηκαν φάσματα κατά την προσθήκη συμπλόκου σε αναλογίες $r_b = 0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125$ σε σταθερή συγκέντρωση CT-DNA $3 \cdot 10^{-4}$ M (σχήμα 3.2.22).

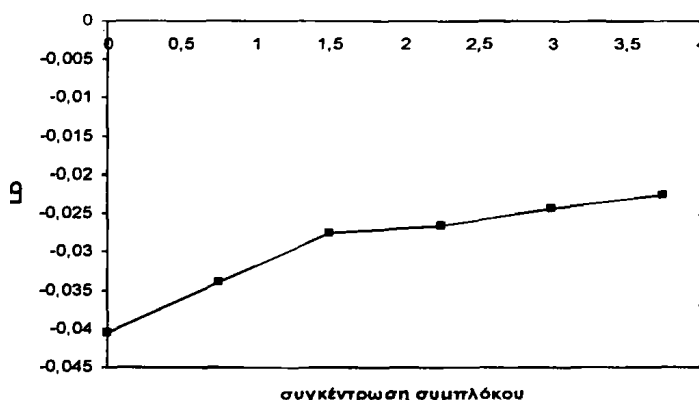


Σχήμα 3.2.22. Φάσμα LD του DNA παρουσία του συμπλόκου σε αναλογίες $r_b = 0.025, 0.05, 0.075, 0.10, 0.125$ ($r_b = [\text{Ru}] / [\text{DNA}]$).

Καθώς αυξάνεται η αναλογία r_b (0.025 - 0.125) το σήμα LD του DNA στα 260 nm, που οφείλεται στην καθετότητα των βάσεων ως προς τον άξονα των z, μειώνει την ένταση

του σε μια σχεδόν γραμμική εξάρτηση (σχήμα 3.2.23) χωρίς κάποιο συγκεκριμένο «πλατώ» κορεσμού. Η μείωση του σήματος LD οφείλεται προφανώς στην μεταβολή της καθετότητας των βάσεων προς μια περισσότερο παράλληλη θέση ως προς τον άξονα των z που προκαλείται από την ένταξη του συμπλόκου σε αυτές ή από μια τυχαία διάταξη τους που συνηγορεί με το ξεδίπλωμα της έλικας και την αποσυσσώρευση τους όπως διαπιστώθηκε από το CD.

Η εμφάνιση μιας νέας ταινίας θετικού σήματος LD στα 350 nm οφειλόμενη σε $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάπτωση του υποκαταστάτη terpy μπορεί να ερμηνευτεί από τον παράλληλο προσανατολισμό του υποκαταστάτη αυτού ως προς τον άξονα των z του DNA ακολουθώντας ενδεχομένως τον παράλληλο προσανατολισμό των βάσεων. Αυτό σημαίνει ότι το επίπεδο του terpy και το επίπεδο της βάσης είναι μεταξύ τους σε παράλληλο προσανατολισμό. Το γεγονός αυτό θα ευνοούσε μια περαιτέρω αλληλεπίδραση των συζευγμένων λυσινών του διπυριδιλίου με το DNA. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασε και το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^+$ με τον ένα φαινανθρολικό δακτύλιος να παραλληλιζείται με τον κύριο άξονα του DNA [94].



Σχήμα 3.2.23. Διάγραμμα αύξησης της απορρόφησης σε σχέση με την συγκέντρωση του συμπλόκου ($10^{-5} / \text{M}$).

3.2.5.5. Αποελίκωση του DNA

Είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση διαφόρων μορίων ή συμπλόκων μετάλλων με το κυκλικό DNA μπορεί να μετατρέπει την κλειστή υπερελικομένη μορφή του (supercoiled) σε ανοιχτού κύκλου χαλαρή (open cycle) ή/και να ξετυλίγει την διπλή έλικα του DNA σε δύο κλώνους, έτσι ώστε να προκαλείται σημαντική αλλαγή στη δομή του. Το φαινόμενο αυτό

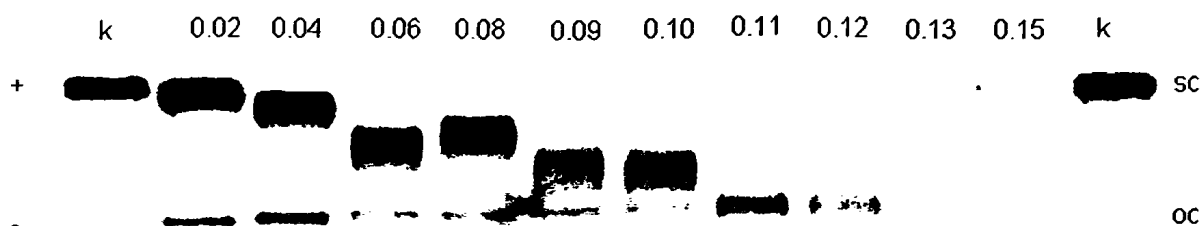
ονομάζεται αποελίκωση του DNA [129]. Η υπερελικωμένη μορφή του DNA είναι η μορφή στην οποία ο άξονας της διπλής έλικας του κλειστού κυκλικού DNA έχει υποστεί στροφές, δίνοντας έτσι μια υπερέλικα. Ένα κυκλικό DNA χωρίς υπερελικωμένη μορφή λέγεται χαλαρό μόριο. Η ικανότητα του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ στην αποέλιξη του DNA εξετάστηκε με κυκλικό πλασμιδιακό DNA, pUC19 με πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Έχει βρεθεί ότι η κινητικότητα του πλασμιδιακού DNA κατά την ηλεκτροφόρηση μπορεί να μεταβληθεί εξαιτίας της αλληλεπίδρασης διαφόρων συμπλόκων [190, 191]. Συγκεκριμένα, το *cisplatin* καθώς εντάσσεται στα N των βάσεων του DNA προκαλεί μείωση στην κινητικότητα της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου, κατά τα πειράματα ηλεκτροφόρησης. Οι μεταβολές αυτές στην κινητικότητα που προκαλεί το *cisplatin* αποδόθηκαν στον απευθείας δεσμό μετάλλου - DNA που τελικά οδηγεί στο ξεδίπλωμα της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδιακού DNA και στην μετατροπή της σε χαλαρή. Καθώς το ξετύλιγμα του υπερελικωμένου DNA προσδιορίζεται από συνεχείς περιστροφές το μέγεθος που καθορίζει το βαθμό αποελίκωσης του ορίζεται σαν γωνία Φ . Η γωνία αποελίκωσης Φ ανά μόριο ένταξης στο DNA καθορίζεται από την αναλογία $r_{b(c)}$ στην οποία παρατηρείται πλήρη μετατροπή της υπερελικωμένης μορφής σε χαλαρή και υπολογίζεται από τη σχέση $\Phi = 18 \sigma / r_{b(c)}$, όπου σ είναι η υπερελικοειδής πυκνότητα για τις συνθήκες της ιοντικής ισχύος και της θερμοκρασίας του πειράματος [129].

Έτσι πραγματοποιήθηκαν πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης με την προσθήκη συμπλόκου σε δείγμα πλασμιδιακού DNA, pUC19, σε αναλογίες r_b (0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.15). Τα δείγματα παρέμειναν στο σκοτάδι στους 37 °C για 24 ώρες και ακολούθως αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (σχήμα 3.2.25).

Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.2.25, η προσθήκη του συμπλόκου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της κινητικότητας της ταινίας του pUC19 για τις αναλογίες $r_b = 0.02 - 0.11$, ενώ στις αναλογίες $r_b = 0.12 - 0.15$ εμφανίζεται μια μικρή αύξηση στην κινητικότητα της ταινίας αυτής. Η μείωση της κινητικότητας οφείλεται στο ξεδίπλωμα της υπερελικωμένης μορφής του DNA, καθώς το σύμπλοκο εντάσσεται στις βάσεις. Στην αναλογία $r_b = 0.12$ η ταινία αρχίζει να διαχέεται, καθώς η συγκέντρωση του συμπλόκου αυξάνεται και το πλασμιδιακό DNA αρχίζει να ξετυλίγεται περαιτέρω χάνοντας την δομή της διπλής έλικας Β-τύπου. Στις



αναλογίες $r_b = 0.13 - 0.15$ είναι πιθανό το πλασμιδιακό DNA να παραμένει κυκλικό αλλά τα νουκλεοτίδια των δυο κλώνων να μην είναι πλέον ζευγαρωμένα.



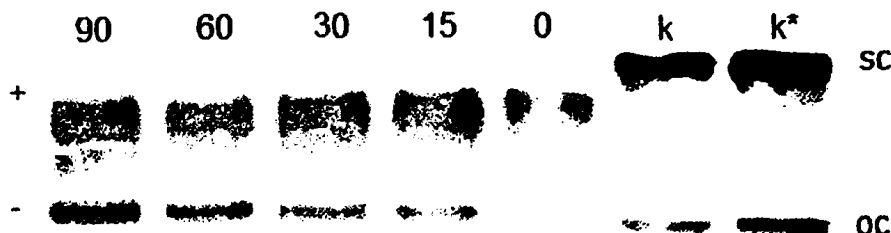
Σχήμα 3.2.25. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pUC19, με την προσθήκη του συμπλόκου σε αναλογίες $r_b = 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.15$ (όπου k = ταινία του pUC19 χωρίς την προσθήκη του συμπλόκου).

Έτσι λοιπόν, σε αναλογία $r_b = 0.11$ παρατηρείται πλήρως μετατροπή της υπερελικωμένης μορφής της σε χαλαρή και με βάση την κινητική μελέτη της ένταξης του συμπλόκου (παράγραφος 3.2.5.1) σε 24 ώρες δεσμεύεται στο DNA το 85% του συμπλόκου οπότε η τιμή $r_{b(c)} = 85/100 \times r_b = 0.85 \times 0.11$ που υπολογίζεται σε $r_{b(c)} = 0.093$. Στις παρούσες πειραματικές συνθήκες το σ έχει την τιμή - 0.063 με βάση την βιβλιογραφία [57]. Έτσι λοιπόν προκύπτει ότι η γωνία αποελικώσης Φ στη περίπτωση του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ είναι $\Phi = 12^\circ \pm 2^\circ$ που πλησιάζει την τιμή του *cisplatin* με $\Phi = 13^\circ$ και άλλων αναλόγων του στις ίδιες πειραματικές συνθήκες [129]. Παρά το γεγονός ότι τα δύο σύμπλοκα (*cisplatin* και $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$) διαφέρουν ως προς την δημιουργία διασταυρούμενων δεσμών με το DNA (το πρώτο δρα διδραστικά ενώ το δεύτερο μονοδραστικά), εν τούτοις εμφανίζουν ανάλογα μεγέθη της γωνίας Φ που ενδεχομένως μπορεί να προοιωνίσει και μια ανάλογη κυτταροστατική δραστηριότητα.

3.2.5.6. Φωτοδιάσπαση του DNA παρουσία του συμπλόκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ σε αναλογία $r_b = 0.04$ με την επίδραση ακτινοβολίας UVA

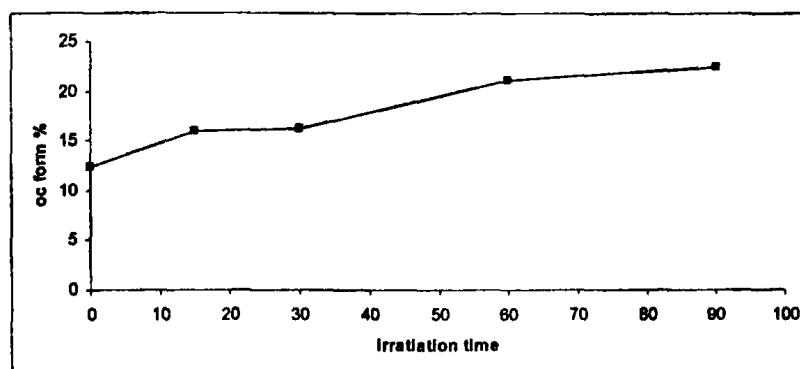
Προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση της ακτινοβολίας UVA (μέγιστη εκπομπή 350 nm) στον βαθμό φωτοδιάσπασης του DNA σε μικρες συγκέντρωσεις συμπλόκου,

πραγματοποιήθηκαν πειράματα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης με κυκλικό πλασμιδιακό DNA, pUC19 και το σύμπλοκο σε αναλογία $r_b = 0.04$. Τα δείγματα αφού παρέμειναν στο σκοτάδι για 24 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C ακτιβολήθηκαν με UVA για 15 min, 30 min, 60 min και 90 min και στη συνέχεια καταγράφηκε η κινητικότητα του pUC19 (σχήμα 3.2.26).



Σχήμα 3.2.26. Πείραμα ηλεκτροφόρησης του πλασμιδιακού DNA, pUC19, με την προσθήκη του συμπλόκου σε αναλογία $r_b = 0.04$ μετά από ακτιβολία με UVA για 0 min, 15 min, 30 min, 60 min και 90 min (όπου k = ταινία του pUC19 χωρίς την προσθήκη του συμπλόκου και k* = μετά από ακτιβολία για 90 min).

Η ένταση των ταινιών της κομμένης μορφής (oc) του DNA φαίνεται στο σχήμα 3.2.27 από το οποίο προκύπτει ότι με την αύξηση του χρόνου ακτινοβολίας αυξάνεται η απόδοση της μορφής oc του DNA. Έτσι σε χρόνο 90 min παρατηρείται ο μέγιστος βαθμός φωτοδιάσπασης 21.5 % έναντι 12 % όταν το σύμπλοκο δεν ακτινοβολείται καθόλου.



Σχήμα 3.2.27. Διάσπαση του πλασμιδίου pUC19 από το σύμπλοκο $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ σε αναλογία $r_b = 0.04$ σε συνάρτηση του χρόνου ακτινοβολίας.

Από τα πιο πάνω είναι εμφανές ότι η ακτινοβολήση του δείγματος συμπλόκου - DNA επιδρά στην αύξηση της διάσπασης των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA

διπλασιάζοντάς τον σχεδόν, από εκείνο που παρατηρείται κατά την παραμονή των δειγμάτων μόνο στο σκοτάδι. Αυτό το γεγονός αποτελεί μια σημαντική διαφορά από τα σύμπλοκα του κεφαλαίου 3.1.5 τα οποία καθώς δεν δεσμεύονται με απευθείας δεσμό στο DNA δεν προκαλούν διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών απουσία ακτινοβολίας UVA.

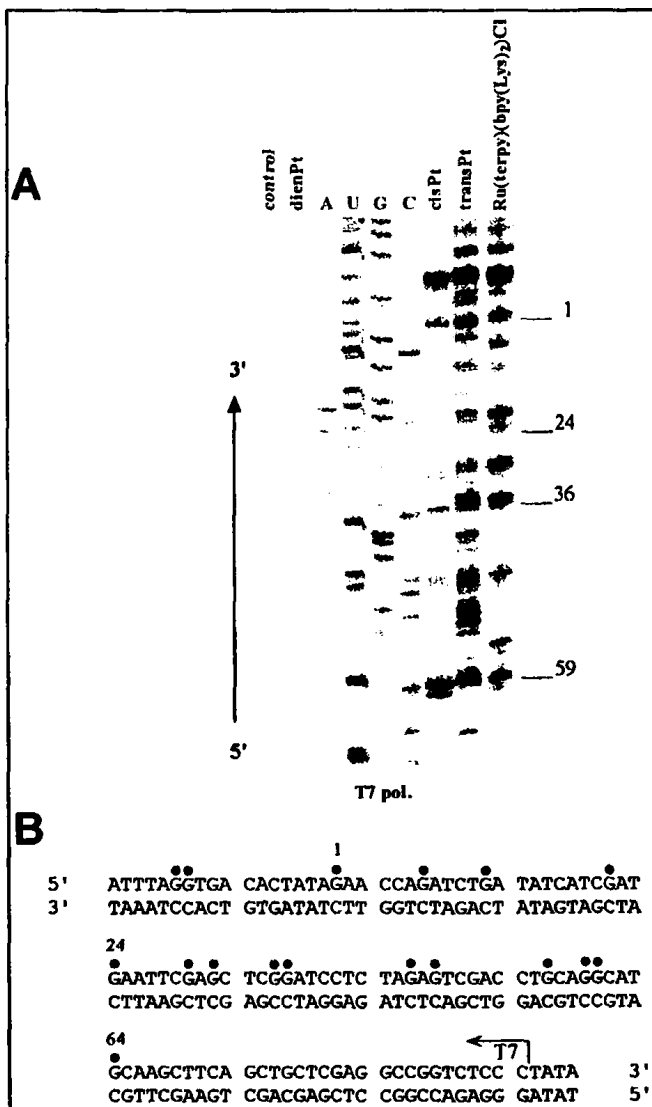
3.2.5.7. Αναστολή της *in vitro* σύνθεσης του RNA – Σημεία τερματισμού

Η εκλεκτικότητα της δέσμευσης του συμπλόκου στις νουκλεολυτικές βάσεις ελέγχεται με την παρεμπόδιση της μεταγραφής του DNA σε RNA λόγω του ότι τα σύμπλοκα που σχηματίζουν απευθείας ομοιοπολικούς δεσμούς με τις βάσεις του DNA εμποδίζουν την *in vitro* μεταγραφή του σε RNA ακριβώς στα σημεία της ένταξης [192, 193, 194]. Έτσι, από το πλασμίδιο pSP73KB στο οποίο επιδρούν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NdeI/HpaI* απομονώθηκε ένα δίκλωνο ολιγονουκλεοτιδικό τμήμα μήκους 221-bp που περιέχει τον εκκινητή της T7 RNA πολυμεράσης [192, 193]. Το τμήμα αυτό λειτουργεί ως εκμαγείο της μεταγραφής. Έτσι στο τμήμα αυτό του πλασμιδίου προστίθεται διάλυμα συμπλόκου αναλογίας $r_b = 0.01$ καθώς και *cisplatin*, *transplatin* και *dienPt* για λόγους σύγκρισης. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν με σκοπό την απομάκρυνση της ποσότητας του συμπλόκου που δεν έχει αλληλεπιδράσει με το DNA και στην συνέχεια ακολουθεί η *in vitro* μεταγραφή με την T7 RNA πολυμεράση.

Η παρεμπόδιση της σύνθεσης του RNA οδηγεί στο σχηματισμό ταινιών που δείχνουν ότι η σύνθεση εμποδίστηκε και τερματίστηκε στις ενταγμένες βάσεις (Πειραματικό μέρος, Μέθοδος Maxam – Gilbert 2.4.3) όπως φαίνεται και στο αυτοραδιογράφημα που προέκυψε κατά την ηλεκτροφόρηση τους σε αλκαλική πηκτή ουρίας 8M/ 6% πολυακρυλαμιδίου (σχήμα 3.2.28A). Έτσι, φαίνεται ότι το σύμπλοκο σταματά την σύνθεση του RNA, όπως και το *cisplatin* και το *transplatin*, στις βάσεις της γουανίνης, παρουσιάζοντας παρόμοια συμπεριφορά με το *transplatin* [193].

Στο σχήμα 3.2.28B φαίνεται το τμήμα της νουκλεολυτικής αλληλουχίας του εκμαγείου που χρησιμοποιήθηκε αλλά και οι θέσεις όπου σταμάτησε η μεταγραφή και δημιουργήθηκαν ταινίες δείχνοντας έτσι τον τερματισμό της. Έτσι διαπιστώνεται μια μοναδική προτίμηση του συμπλόκου για τις βάσεις της γουανίνης που βρίσκονται στο

εκμαγείο. Ακόμη ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι το σύμπλοκο προτιμά μόνο τις γουανίνες του ενός κλώνου. Συμπερασματικά λοιπόν φαίνεται ότι το σύμπλοκο σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς ένταξης αποκλειστικά με τις γουανίνες του ενός κλώνου του DNA τερματίζοντας με αυτό τον τρόπο την μεταγραφή.



Σχήμα 3.2.28. (A) Αυτοραδιογραφία πηκτή ουρίας 8 M / πολυακρυλαμιδίου 6% της T7 RNA πολυμεράσης με το σύμπλοκο $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ σε αναλογία $r_b = 0.01$ (B) Σχηματικό διάγραμμα της αλληλουχίας του εκμαγείου που χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της *in vitro* σύνθεσης του RNA από το σύμπλοκο του ρουθηνίου. Το βέλος δείχνει την έναρξη της T7 πολυμεράσης ενώ οι κλειστοί κύκλοι δείχνουν τα σημεία τερματισμού της μεταγραφής. Η αρίθμηση βασίζεται στο χάρτη αλληλουχίας του πλασμιδίου pSP73KB.

Συμπερασματικά η δέσμευση του συμπλοκου $[Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH_2)_2bpy)Cl]^{3+}$ στα δύο ολιγονουκλεοτίδια έδειξε μια σημαντική εκλεκτικότητα ως προς την γουανίνη στο κέντρο της αλληλουχίας ενώ η διπλή έλικα παρέμεινε στη διαμόρφωση B- τύπου. Η δέσμευση του στο DNA έδειξε μια επιπλέον αλληλεπίδραση των



δύο λυσινών όπως διαπιστώθηκε από τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού ενώ τα φάσματα γραμμικού διχρωϊσμού έδειξε μια απόκλιση στην καθετότητα των βάσεων ως προς τον άξονα z του DNA κατά την ένταξη του συμπλόκου.

Τόσο η γωνία αποελίκωσης όσο και η υψηλή εκλεκτικότητα στις βάσεις της γουανίνης αποτελούν για το σύμπλοκο αυτό σημαντικό βήμα για ενδεχόμενη υψηλή κυτταροτοξικότητα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διερευνηθεί η κατάσταση των υπηρεσιών υγείας στην Ελλάδα, με έμφαση στην πρωτοβάθμια φροντίδα υγείας. Τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική διαφορά στην ποιότητα των υπηρεσιών ανά περιοχή, με την πρωτεύουσα να διαθέτει καλύτερες συνθήκες. Η έλλειψη προσωπικού και η ανεπάρκεια των υποδομών αποτελούν τα κύρια προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι ασθενείς. Η μελέτη υποδηλώνει την ανάγκη για επένδυση στην εκπαίδευση του προσωπικού και στην αναβάθμιση της υποδομής των νοσοκομείων και των κέντρων υγείας. Επιπλέον, η βελτιστοποίηση της διαχείρισης των πόρων και η ενίσχυση της συνεργασίας μεταξύ των υπηρεσιών είναι απαραίτητα για την βελτίωση της φροντίδας των ασθενών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η έρευνα έδειξε ότι η πρωτεύουσα διαθέτει καλύτερες συνθήκες υγείας σε σύγκριση με τις περιφέρειες. Η έλλειψη προσωπικού και η ανεπάρκεια των υποδομών αποτελούν τα κύρια προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι ασθενείς. Η μελέτη υποδηλώνει την ανάγκη για επένδυση στην εκπαίδευση του προσωπικού και στην αναβάθμιση της υποδομής των νοσοκομείων και των κέντρων υγείας. Επιπλέον, η βελτιστοποίηση της διαχείρισης των πόρων και η ενίσχυση της συνεργασίας μεταξύ των υπηρεσιών είναι απαραίτητα για την βελτίωση της φροντίδας των ασθενών.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο κεφάλαιο αυτό παραθέτονται αναλυτικά τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα αποτελέσματα κατά την εκπόνηση της διατριβής αυτής. Στην παρούσα μελέτη παρουσιάστηκαν τα αποτελέσματα της σύνθεσης πολυπυριδινικών συμπλόκων του Ru(II), του τύπου Λ- και Δ-[Ru(bpy)₂(Yn)](PF₆)₂ (όπου Yn = διπυριδύλιο με συζευγμένα δύο αμινοξέα στη θέση 4 και 4'), τα οποία χαρακτηρίστηκαν πλήρως με διάφορες φασματοσκοπικές και αναλυτικές τεχνικές και μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις τους με DNA, προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος του συζευγμένου αμινοξέος και το είδος της αλληλεπίδρασής τους. Επίσης μελετήθηκε το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4,4'-COLysCONH₂)₂bpy)Cl]Cl₃ προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των συζευγμένων λυσινών στην αλληλεπίδραση με απευθείας δεσμό ένταξης του συμπλόκου αυτού με το DNA.

(i) Το σύμπλοκο Λ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ δεσμεύεται με δύο τρόπους στο DNA, που οφείλονται στον διαφορετικό προσανατολισμό του συμπλόκου κατά τη δέσμευσή του (α) ηλεκτροστατικά, αλληλεπιδρώντας με τον φωσφορικό σκελετό μέσω των θετικά φορτισμένων τελικών αμινομάδων της λυσίνης, και (β) με δέσμευση στην αύλακα του ολιγονουκλεοτιδίου από την πλευρά των διπυριδυλίων.

(ii) Η δέσμευσή του Δ-[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ στο DNA γίνεται από την πλευρά των διπυριδυλίων ειδικότερα σε σχέση με το Λ- ισομερές.

(iii) Το συζευγμένο αμινοξύ επιδρά στον προσανατολισμό του συμπλόκου όταν δεσμεύεται στην έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου.

(iv) Τα σύμπλοκα δεσμεύονται στην κύρια αύλακα και κυρίως κοντά στις ακραίες βάσεις G1 και G6 με ανάλογο τρόπο και για τα δύο ισομερή.

(v) Όλα τα σύμπλοκα που εξετάστηκαν σταθεροποιούν την διπλή έλικα προκαλώντας αύξηση της τιμής του *T_m*. Το συζευγμένο αμινοξύ είναι εκείνο που δημιουργεί τους όρους για μεγαλύτερη σταθεροποίηση της διπλής έλικας.

(vi) Τα σύμπλοκα αυτά δεσμεύονται στο DNA με τρόπους που σχετίζονται όχι μόνο από την απόλυτη (Λ-, Δ-) διαμόρφωση του μεταλλικού κέντρου αλλά από την όλη διαμόρφωση του συμπλόκου, που καθορίζονται και από την φύση του αμινοξέος.

(vii) Τα Δ διαστερομερή αλληλεπιδρούν με την διπλή έλικα του DNA από την πλευρά των διπυριδιλίων με ανάλογο τρόπο, όπως βρέθηκε από την φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού. Τα σύμπλοκα Λ -[Ru(bpy)₂(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)](PF₆)₄ και Λ -[Ru(bpy)₂(4,4'-(COTyrCONH₂)₂bpy)]Cl₂ βρέθηκε να αλληλεπιδρούν μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων λόγω του κατάλληλου προσανατολισμού της πλευρικής αλυσίδας των αμινοξέων του υποκαταστάτη.

(viii) Το σύμπλοκο Λ -[Ru(bpy)₂(4,4'-(COHisCONH₂)₂bpy)]Cl₂ δεσμεύεται στο DNA ισχυρότερα υποβοηθούμενο από «μερική» παρεμβολή του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης ανάμεσα στις βάσεις του DNA.

(ix) Τα Δ διαστερομερή εμφανίζουν μεγαλύτερη νουκλεολυτική δραστικότητα από τα αντίστοιχα Λ. Η δραστικότητα εξαρτάται από την φύση του συζευγμένου αμινοξέος καθώς τα διαστεροϊσομερή εμφανίζουν διαφορετικά ποσοστά φωτοδραστικότητας σε κάθε περίπτωση.

(x) Ο μηχανισμός διάσπασης του DNA πραγματοποιείται μέσω ¹O₂ που είναι ενδεικτικός για μια σχετικά ειδική δέσμευση αυτών των συμπλόκων στο DNA.

(xi) Το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺ δεσμεύεται εκλεκτικά στις βάσεις του DNA και συγκεκριμένα στην γουανίνη, που βρίσκεται στο κέντρο της αλληλουχίας.

(xii) Τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού έδειξαν μια επιπλέον αλληλεπίδραση των δύο συζευγμένων λυσινών κατά την δέσμευση του συμπλόκου [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺ στο DNA.

(xiii) Τα φάσματα γραμμικού διχρωϊσμού έδειξαν μια απόκλιση στην καθετότητα των βάσεων ως προς τον άξονα z του DNA κατά την ένταξη του συμπλόκου.

(xiv) Το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺ εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς τις βάσεις της γουανίνης του ενός κλώνου.

(xv) Το σύμπλοκο σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς ένταξης αποκλειστικά με τις γουανίνες του ενός κλώνου του DNA τερματίζοντας με αυτό τον τρόπο την *in vitro* μεταγραφή του σε RNA ακριβώς στα σημεία της ένταξης

(xvi) Η γωνία αποελικώσης που εμφανίζει το σύμπλοκο [Ru(terpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)Cl]³⁺ καθώς και η υψηλή εκλεκτικότητα στις βάσεις της γουανίνης αποτελούν σημαντικό βήμα για ενδεχόμενη υψηλή κυτταροτοξικότητα.



1. Ημερολόγιο του 1914
2. Ημερολόγιο του 1915
3. Ημερολόγιο του 1916
4. Ημερολόγιο του 1917
5. Ημερολόγιο του 1918
6. Ημερολόγιο του 1919
7. Ημερολόγιο του 1920
8. Ημερολόγιο του 1921
9. Ημερολόγιο του 1922
10. Ημερολόγιο του 1923
11. Ημερολόγιο του 1924
12. Ημερολόγιο του 1925
13. Ημερολόγιο του 1926
14. Ημερολόγιο του 1927
15. Ημερολόγιο του 1928
16. Ημερολόγιο του 1929
17. Ημερολόγιο του 1930
18. Ημερολόγιο του 1931
19. Ημερολόγιο του 1932
20. Ημερολόγιο του 1933
21. Ημερολόγιο του 1934
22. Ημερολόγιο του 1935
23. Ημερολόγιο του 1936
24. Ημερολόγιο του 1937
25. Ημερολόγιο του 1938
26. Ημερολόγιο του 1939
27. Ημερολόγιο του 1940
28. Ημερολόγιο του 1941
29. Ημερολόγιο του 1942
30. Ημερολόγιο του 1943
31. Ημερολόγιο του 1944
32. Ημερολόγιο του 1945
33. Ημερολόγιο του 1946
34. Ημερολόγιο του 1947
35. Ημερολόγιο του 1948
36. Ημερολόγιο του 1949
37. Ημερολόγιο του 1950
38. Ημερολόγιο του 1951
39. Ημερολόγιο του 1952
40. Ημερολόγιο του 1953
41. Ημερολόγιο του 1954
42. Ημερολόγιο του 1955
43. Ημερολόγιο του 1956
44. Ημερολόγιο του 1957
45. Ημερολόγιο του 1958
46. Ημερολόγιο του 1959
47. Ημερολόγιο του 1960
48. Ημερολόγιο του 1961
49. Ημερολόγιο του 1962
50. Ημερολόγιο του 1963
51. Ημερολόγιο του 1964
52. Ημερολόγιο του 1965
53. Ημερολόγιο του 1966
54. Ημερολόγιο του 1967
55. Ημερολόγιο του 1968
56. Ημερολόγιο του 1969
57. Ημερολόγιο του 1970
58. Ημερολόγιο του 1971
59. Ημερολόγιο του 1972
60. Ημερολόγιο του 1973
61. Ημερολόγιο του 1974
62. Ημερολόγιο του 1975
63. Ημερολόγιο του 1976
64. Ημερολόγιο του 1977
65. Ημερολόγιο του 1978
66. Ημερολόγιο του 1979
67. Ημερολόγιο του 1980
68. Ημερολόγιο του 1981
69. Ημερολόγιο του 1982
70. Ημερολόγιο του 1983
71. Ημερολόγιο του 1984
72. Ημερολόγιο του 1985
73. Ημερολόγιο του 1986
74. Ημερολόγιο του 1987
75. Ημερολόγιο του 1988
76. Ημερολόγιο του 1989
77. Ημερολόγιο του 1990
78. Ημερολόγιο του 1991
79. Ημερολόγιο του 1992
80. Ημερολόγιο του 1993
81. Ημερολόγιο του 1994
82. Ημερολόγιο του 1995
83. Ημερολόγιο του 1996
84. Ημερολόγιο του 1997
85. Ημερολόγιο του 1998
86. Ημερολόγιο του 1999
87. Ημερολόγιο του 2000
88. Ημερολόγιο του 2001
89. Ημερολόγιο του 2002
90. Ημερολόγιο του 2003
91. Ημερολόγιο του 2004
92. Ημερολόγιο του 2005
93. Ημερολόγιο του 2006
94. Ημερολόγιο του 2007
95. Ημερολόγιο του 2008
96. Ημερολόγιο του 2009
97. Ημερολόγιο του 2010
98. Ημερολόγιο του 2011
99. Ημερολόγιο του 2012
100. Ημερολόγιο του 2013

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. L. Stryer, *Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηρακλειο, 1994
2. L. H. Hurley, *Nature Reviews Cancer*, 2002, **2**, 188-200
3. S. Neidle, '*DNA structure and recognition*', Oxford University Press Inc., New York, 1994
4. S. Mansy, G. Y. H. Chu., R. E. Duncan, R. S. J. Tobias, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 607
5. M. J. Clarke, M. Stubbs, *Metal ions in Biological Systems*, 1996, **32**, 727
6. B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature*, 1969, **222**, 385
7. B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, 1965, **205**, 698
8. J. A. Bernards, L. N. Bouman, *Fysiologie van de mens*, 5th ed., Bohn, Scheltema & Holkema, Utrecht, The Netherlands, 1988, 20
9. D. P. Bancroft, C. A. Lepre, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 6860
10. A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. H. J. der Hartog, P. H. M. Lohman, J. Reedijk, *Biochemistry*, 1985, **24**, 707
11. A. M. J. Fichtinger-Schepman, P. H. M. Lohman, J. Reedijk, *Nucl. Acids Res.*, 1982, **10**, 5345
12. R. A. G. Friedman, G. S. Manning, *Biopolymers*, 1984, **23**, 2671
13. C. Bailly, J. B. Chaires, *Bioconjugate Chem.*, 1998, **9**, 513
14. R. Lavery, K. Zakrzewaska, B. Pullman, *J. Biol. Str. Dyn.*, 1986, **3**, 1155
15. M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Djure, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, **82**, 1376
16. M. Coll, C. A. Frederick, A. H.-J. Wang, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, **84**, 8325
17. J. W. Lown, *Anti-Cancer Drug Design*, 1988, **3**, 25
18. E. C. Long, J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.*, 1990, **23**, 271
19. C. Helene, J.-J. Toulme, *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gene structure and expression*, 1990, **1049**, 99
20. C. Lian, H. Robinson, A. H.-J. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 8791
21. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, *Platinum metals Rev.*, 2001, **45**, 62
22. M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **232**, 69
23. M. C. Demeunynck, W. D. Bailly, *Synthesis to Nucleic Acid Complexes*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002
24. R. M. Izatt, J. J. Christensen, J. W. Rytting, *Chem. Rev.*, 1971, **71**, 439
25. G. A. Eichhorn, Y. A. Shin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 7323
26. M. Beer, E. N. Moudrianakis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **48**, 409
27. L. S. Kan, N. C. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 4823
28. H. I. Heitner, S. J. Lippard, G. A. Vasiliades, W. R. Bauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1972, **94**, 8936
29. W. W. Brandt, F. P. Dwyer, E. C. Gyrfas, *Chem. Rev.*, 1954, **54**, 959
30. F. P. Dwyer, E. C. Gyrfas, W. P. Rogers, J.H. Koch, *Nature*, 1952, **170**, 190
31. K. W. Jennette, S. J. Lippard, G. A. Vasiliades, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1974, **71**, 3839
32. P. J. Bond, R. Langridge, K. W. Jennette, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1975, **72**, 4825
33. S. J. Lippard, P. J. Bond, K. C. Wu, W. R. Bauer, *Science*, 1976, **194**, 726



34. M. Howe-Grant, S. J. Lippard, *Biochemistry*, 1979, **18**, 5762
35. D. S. Sigman, R. Landgraf, D. M. Perrin, L. Pearson, *Met. Ions in Biol. Syst.*, 1996, **33**, 485
36. D. S. Sigman, D. R. Graham, V. D'Aurora, A. M. Stern, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 12279
37. H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, Y. Okami, *J. Antibiot.*, 1966, **19**, 200
38. J. Chen, J. Stubbe, *Natl. Rev. Cancer*, 2005, **5**, 102
39. W. Wu, D. E. Vanderwall, S. Teramoto, S. M. Lui, S. T. Hoehn, X. J. Tang, C. J. Turner, D. L. Boger, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 2239
40. J. K. Barton, J. J. Dannenberg, A. L. Raphael, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 4967
41. J. K. Barton, J. M. Goldberg, C. V. Kumar, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 2081
42. J. K. Barton, A. L. Raphael, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, **82**, 6460
43. J. P. Rehmman, J. K. Barton, *Biochemistry*, 1990, **29**, 1701
44. J. K. Barton, *Science*, 1986, **233**, 727
45. C.-H. B. Chen, L. Milne, R. Landgraf, D. M. Perrin, D. S. Sigman, *Chem. Bio. Chem.*, 2001, **2**, 735
46. J. K. Barton, L. A. Basile, A. T. Danishefsky, A. Alexandrescu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1984, **81**, 1961
47. A. Yamagishi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1983, 572
48. A. M. Pyle, J. P. Rehmman, R. Meshoyrer, C. V. Kumar, N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 3051
49. A. Yamagishi, *J. Phys. Chem.*, 1984, **88**, 5709
50. C. V. Kumar, J. K. Barton, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 5518
51. E. J. C. Olson, D. Hu, A. Hormann, A. M. Jonkman, M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, P. F. Barbara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 11458
52. B. P. Hudson, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 6877
53. R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 29
54. A. Sitlani, E. C. Long, A. M. Pyle, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 2303
55. M. P. Fitzsimons, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 3379
56. T. P. Shields, J. K. Barton, *Biochemistry*, 1995, **34**, 15049
57. A. H. Krotz, B. P. Hudson, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 12577
58. C. L. Kielkopf, K. E. Erkkila, B. P. Hudson, J. K. Barton, D. C. Rees, *Nat. Struct. Biol.*, 2000, **7**, 117
59. R. H. Terbruggen, T. W. Johann, J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 6874
60. S. J. Franklin, J. K. Barton, *Biochemistry*, 1998, **37**, 16093
61. D. T. Odom, C. S. Parker, J. K. Barton, *Biochemistry*, 1999, **38**, 5155
62. L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.*, 1961, **3**, 18
63. R. Kolodner, *Genes Dev.*, 1996, **10**, 1433
64. B. A. Jackson, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 12986
65. B. A. Jackson, J. K. Barton, *Biochemistry*, 2000, **39**, 6176



66. H. Junicke, J. R. Hart, J. Kisko, O. Glebov, I. R. Kirsch, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2003, **100**, 3737
67. K. Kalyanasundaram, *Coord. Chem. Rev.*, 1982, **46**, 159
68. A. Juris, V. Barigelletti, S. Campagna, P. Belser, A. Von Zelewsky, *Coord. Chem. Rev.*, 1988, **84**, 85
69. J. K. Barton, A. Danishefsky, J. M. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 2172
70. K. E. Erkkila, D. T. Odom, J. K. Barton, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2777
71. B. Armitage, *Chem. Rev.*, 1988, **98**, 1171
72. G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni, E. Alessio, *Clin. Exp. Metastasis*, 1992, **10**, 273
73. A. C. G. Hotze, A. H. Velders, F. Ugozzoli, M. Biagini-Cingi, A. M. Manotti-Lanfredi, J. G. Haasnoot, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 3838
74. A. H. Velders, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, D. De Vos, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 2966
75. Y. N. V. Gopal, D. Jayaraju, A. K. Kondapi, *Biochemistry*, 1999, **38**, 4382
76. R. E. Morris, R. E. Aird, S. Murdoch, H. M. Chen, J. Cummings, N.D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 3616
77. C.-C. Cheng, W.-L. Lee, J.-G. Su, C.-L. Liu, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2000, **47**, 213
78. J. Helms, B. L. Huang, R. Price, B. P. Sullivan, B. A. Sullivan, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 5335
79. G. Sava; A. Bergamo, *Current Topics in Pharmacology*, 1997, **3**, 207
80. J. M. Rodemaker-Lakhi, D. van den Bongard, D. Pluim, J.H M. Schellens, *Clin. Cancer. Res.*, 2006, **10**, 3717
81. J. R. Durig, J. Danneman, W. D. Behnke, E. E. Mercer, *Chem.-Biol. Interact.*, 1976, **13**, 287
82. A. Bergamo, R. Gagliardi, V. Scarcia, A. Furlani, E. Alessio, G. Mestroni, G. Sava, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, **289**, 559
83. M. Hartmann, B. K. Keppler, *Comments Inorg. Chem.*, 1995, **16**, 339
84. P. Lincoln, B. Norden, A. Rodger, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 9583
85. S. Mahadevan, M. Palaniandavar, *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 138
86. J. M. Kelley, A. B. Tossi, D. J. McConnell, C. Oh Uigin, *Nucleic Acids Res.*, 1985, **13**, 6017
87. M. F. Ottaviani, N. D.Ghatlia, S. H. Bossmann, J. K. Barton, H. Durr, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 8946
88. G. S. Manning, *Acc. Chem. Res.*, 1979, **12**, 443
89. I. Hag, P. Lincoln, D. Suh, B. Norden, B. Z. Chowdhry, B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **114**, 8946
90. R. Caspar, L. Musatkina, A. Tatosyan, H. Amouri, M. Cruselle, C. Guyard-Duhayon, R. Duval, C. Codier, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 7986
91. P. P. Pellegrini, J. R. Aldrich-Wright, *J. Chem. Soc. Dalton Trans*, 2003, 176
92. G. Yang, J. Z. Wu, L. Wang, L. N. Ji, X. Tian, *J. Inorg. Biochem.*, 1997, **66**, 141
93. I. S. Haworth, A. H. Elock, J. Freeman, A. Rodger, W. G. Richards, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1991, **9**, 023



94. C. Hiort, B. Norden, A. Rodger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 1971
95. J. E. Coury, J. R. Anderson, L. McFail-Isom, L. D. Williams, L. A. Bottomley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 3792
96. D. Z. M. Coggan, I. S. Haworth, P. J. Bates, A. Robinson, A. Rodger, *Inorg. Chem.*, 1997, **38**, 4486
97. H.-Y. Mei, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 7414
98. B. Ling, M. Zhang, T. Shen, *Spectrochimica Acta Part A*, 2004, **60**, 2635
99. H. Xu, K.-C. Zheng, L.-J. Lin, H. Li, Y. Gao, L.-N. Ji, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 87
100. Q.-L. Zhang, J.-H. Liu, J.-Z. Liu, P.-X. Zhang, X.-Z. Ren, Y. Liu, Y. Huang, L.-N. Ji, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1405
101. A. Garoufis, J.-G. Liu, L.-N. Ji, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **93**, 221
102. J.-G. Liu, B.-H. Ye, Q.-L. Zhang, X.-H. Zou, Q.-X. Zhen, X. Tian, L.-N. Ji, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2000, **5**, 119
103. J.-G. Liu, B.-H. Ye, H. Li, Q.-X. Zhen, L.-N. Ji, Y.-H. Fu, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **76**, 265
104. K. C. Zheng, H. Deng, X. W. Liu, H. Li, H. Chao, L. N. Ji, *J. Mol. Structure (Theochem)*, 2004, **682**, 225
105. J. Liu, W. J. Mei, L. J. Lin, K. C. Zheng, H. Chao, F. C. Yun, L. N. Ji, *Inorg. Chim. Acta*, 2004, **357**, 285
106. I. Hag, P. Lincoln, D. Suh, B. Norden, B. Z. Chowdhry, B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 4788
107. B. M. Peek, G. T. Ross, S. W. Edwards, G. J. Meyer, T. J. Meyer, B. W. Erickson, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1991, **38**, 114
108. K. D. Copel, A. M. K. Lueras, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Biochemistry*, 2002, **41**, 12785
109. R. C. Lasey, S. S. Banerji, M. Y. Ogawa, *Inorg. Chim. Acta*, 2000, **300**, 822
110. L. Liu, J. Hong, M. Y. Ogawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 50
111. A. Myari, N. Hadjiliadis, A. Garoufis, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2004, 1427
112. A. Myari, N. Hadjiliadis, A. Garoufis, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 616
113. J. K. Barton, E. Lolis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 708
114. N. Grover, T. W. Welch, T. A. Fairley, M. Cory, H. H. Thorp, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 3544
115. B. A. Moyer, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, 1981, **20**, 436
116. P. M. van Vliet, J. G. Haasnoot, J. Reedijk, O. Novacova, O. Vrana, V. Brabec, *Inorg. Chim. Acta*, 1995, **231**, 57
117. P. M. Vanvliet, J. G. Haasnoot, J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 1994, **33**, 1934
118. N. Grover, N. Gupta, P. Singh, H. H. Thorp, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 2014
119. K. Karidi, A. Garoufis, N. Hadjiliadis, J. Reedijk, *Dalton Trans.*, 2005, 728
120. B. P. Sullivan, D. J. Salmon, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, 1978, **17**, 3334
121. V. Brabec, E. Palecek, *Biophysik*, 1970, **6**, 290
122. B. P. Sullivan, J. M. Calvert, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, 1980, **19**, 1404
123. M. Mella, E. Fasani, A. Albin, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 3051



124. E. Atherton R. C. Sheppard, *Solid Phase Peptide Synthesis: E. A Practical Approach*, IRL, Oxford, UK, 1989, 87.
125. B. Kolp, H. Viebrock, A. Von Zelewsky, D. Abeln, *Inorg. Chem.*, 2000, **40**, 1196
126. J. M. Berg, J. L Tymoczko, L. Stryer, *Molecular Cell Biology*, 5th ed., WH Freeman, 2002
127. J. Sambrook, D.W. Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, 2001
128. L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.*, 1961, **3**, 18
129. W. Keller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, **72**, 4876
130. M. V Keck, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 3386
131. J. SantaLucia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95** (4), 1460
132. A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl Acad.*, 1977, **74**, 560
133. B. Bulheller, A. Rodger, J. D. Hirst, *Physical Chemistry Chemical Physic*, 2007, **9**, 2020
134. B. Norden, T. Kurucsev, *J. of Molec. Rec.*, 1994, **7**, 141
135. V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schyolkina, A. I. Poletayev, *Polymers*, 1973, **12**, 189
136. M.-J. B. Tunis-Schneider, M. F. Maestre, *J. MoZ. Biol.*, 1970, **52**, 521
137. L. Pazderski, J. Toušek, A. Wojtczak, J. Sitkowski, L. Kozerski, E. Szlyk, *Polyhedron*, 2008, **27**, 3067
138. S. Castellano, H. Gunther, S. Ebersole, *J. Phys. Chem.*, 1965, **69**, 4166
139. A. Juris, V. Balzani, F. Barigelleti, S. Campagna, P. Belser, A. Von Zelewsky, *Coord. Chem. Rev.*, 1988, **84**, 85
140. X. Huat, A. Von Zelewsky, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 5791
141. T. J. Rutherford, O. V. Gijte, A. Kirsch-De Mesmaeker, F. R. Keene, *Inorg Chem.*, 1997, **36**, 4465
142. J. Wiley, *Structure elucidation by NMR in organic chemistry*, 1993
143. M. Leng, *Biophys. Chem.* 1990, **35**, 150
144. J. A. Rice, D. M. Crothers, A. L. Pinto, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 4158
145. S. F. Bellon, J. Lippard, *Biophys. Chem.*, 1990, **35**, 179
146. S. F. Bellon, J. H. Coleman, S. J. Lippard, *Biochemistry*, 1991, **30**, 8026
147. I. P. Evans, A. Spencer, G. Wilkinso, *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.*, 1973, 204
148. B. R. James, E. Ochiai, G. I. Rempel, *Inorganic & Nuclear Chemistry Letters*, 1971, **7**, 781.
149. S. Arnott, D. W. Hukins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, **47**, 1504
150. D. R. Hare, D. E. Wemmer, S-H. Chou, G. J. Drobny, *Mol. Biol.*, 1983, **171**, 319
151. R. M. Scheek, N. Russo, R. Boelens, R. Kaptein, J. H. Van Boom, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 2914
152. R. M. Scheek, R. Boelens, N. Russo, J. H. Van Boom, R. Kaptein, *Biochemistry*, 1984, **23**, 1371
153. S. Neidle, *DNA structure and recognition*, IRL Press, 1994, 33-34.
154. G. M. Clore, H. Lauble, A. Frenkiel, A. M. Gronenborn, *Eur. J. Biochem.*, 1984, **145**, 629
155. H. Ohishi, Y. Tozuka, Z. Da-Yang, T. Ishida, K. Nakatani, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, **358**, 24
156. A. N. Veselkov, R. J. Eaton, D. B. Daries, *J. Struct. Chem.*, 2001, **42**, 193

157. S. J. Glaser, M. L. Remerowski, G. P. Drobny, *Biochemistry*, 1989, **28**, 1483
158. C.M. Dupureur, J.K Barton, *Inorg. Chem.*, 1994, **36**, 33
159. C. Giessner-Prettre, B. Pullman, *Acad Sci. Paris Ser. D*, 1976, **283**, 675
160. C. Giessner-Prettre, B. Pullman, P. N. Borer, L. S. Kan, *Biopolymers*, 1976, **15**, 2277
161. W. D. Willson, Y. Li, J. M. Veal, 'Advances in DNA sequence specific agents' (Ed. L. H. Hurley), JAI Pres Inc., Greenwich, Connecticut, 1992, **1**, 89
162. J. A. Smith, J. G. Collins, B. T. Patterson, F. R. Keene, *J. Chem. Soc., Dalton Trans*, 2004, 1277
163. E. M. Proubfoot, J. P. Mackay, P. Karuso, *Biochemistry*, 2001, **40**, 4867
164. R. Barthwal, A. Mujeeb, S. Kukreti, A. Gupta, G. Govil, *J. Mol. Recog.*, 1991, **4**, 45.
165. F. Brun, J. J. Toulme, C. Helene, *Biochemistry*, 1975, **14**, 558
166. W. D. Wilson, R. L. Jones, *Adv. Pharmacol. Chemother.*, 1981, **18**, 177
167. L-M. Chen, J. Liu, J-C. Chen, C-P. Tan, S. Shi, K-C. Zheng, L-N. Ji., *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 330
168. R. B. Nair, E. S. Teng, S. L. Kirkland, C. J. Murphy, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 139
169. K. K. Patel, E. A. Plummer, M. Darwish, A. Rodger, M. Hannon, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **91**, 220
170. J. M. Kelly, A. B. Tossi, G. D. Connell, C. OhUigin, *Nucleic Acids Res.*, 1985, **13**, 6017
171. M. B. Fleisher, K. C. Waterman, N. J. Turro, J.K. Barton, *Inorg. Chem.*, 1986, **25**, 3549
172. A. Myari, N. Hadjiliadis, A. Garoufis, J. Malina, V. Brabec, *J. Biol. Inorg. Chem*, 2007, **12**, 279
173. D. W. Pipes, T. J. Meyer, *Inorg. Chem*, 1984, **23**, 2466
174. R. W. Callahan, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, 1977, **16**, 574
175. C. M. Hartshorn, K. A. Maxwell, P. S. White, J. M. DeSimone, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 601
176. S. M. Zakeeruddin, M. K. Nazeeruddin, P. Pechy, F. P. Rotziger, R. HumphryBaker, K. Kalyanasundaram, M. Gratzel, V. Shklover, T. Haibach, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 5937
177. J. Feigon, W. Leupin, W. A. Denny, D. R. Kearns, *Biochemistry*, 1983, **22**, 5943
178. D. J. Patel, L. Shapiro, D. Hare, *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**, 1223
179. J. Feigon, W. A. Denny, W. Leupin, D. R. Kearns, *J. Med. Chem.*, 1984, **35**, 7541
180. M. J. Clarke, *Prog. Clin. Biochem. Med.*, 1989, **10**, 25
181. J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 1992, **873**, 198
182. W. I. Sundquist, S. J. Lippard, *Coord. Chem. Rev.*, 1990, **100**, 293
183. P. J. Sadler, J. F. Smyth, D. I. Jodrell, *Clin. Cancer Res.*, 2000, **6**, 142
184. R. E. Aird, J. Cummings, R. Morris, A. A. Ritchie, P. J. Sadler, D. I. Br. Jodrell, *J. Cancer*, 2001 **85**, 101
185. R. Zaludova, V. Kleinwschter, V. Brabec, *Biophys. Chemistry*, 1996, **60**, 135
186. V. Brabec, J. Kasparkova, O. Vrana, O. Novakova, J. W. Cox, Y. Qu, N. Farrell, *Biochem.*, 1999, **38**, 6781
187. R. Zaludova, A. Zakovska, J. Kasparkova, Z. Balcarova, O. Vrana, N. Farrell, V. Brabec, *Eur. J. Biochem.*, 1997, **246**, 508
188. J. P. Macquet, J. L. Butour, *Eur. J. Biochem.*, 1979, **83**, 375



189. E. Gallori, C. Vettori, E. Alessio, F.G. Vilchez, R. Vilaplana, P. Orioli, A. Casini, L. Messori, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **376**, 156
190. S. E. Sherman, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 1987, **87**, 1153
191. G. L. Cohen, W. R. Bauer, K. Barton, S. J. Lippard, *Science*, 1979, **203**, 1014
192. M. A. Lemaire, A. Schwartz, A. R. Rahmouni, M. Leng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 1982
193. V. Brabec, M. Leng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 5345
194. V. Brabec, V. Boudny', Z. Balcarova', *Biochemistry*, 1994, **32**, 1316

0.24

0.2

0.1

0 200 300 400 500 600 700

Wavelength (nm)

Figure 1: Spectral Power Distribution

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

0.5

0.4

0.3

0.2

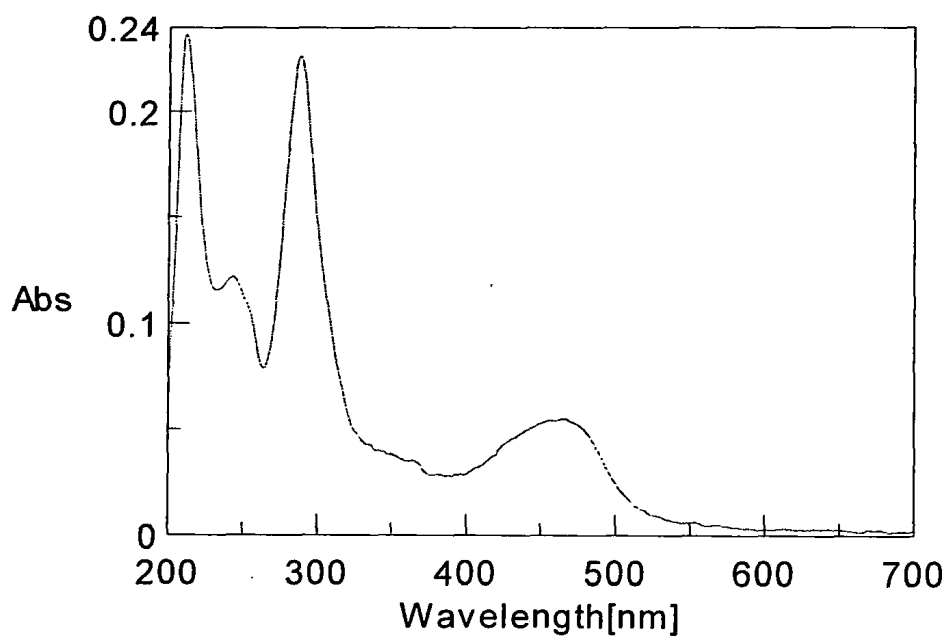
0.1

200 300 400 500 600 700

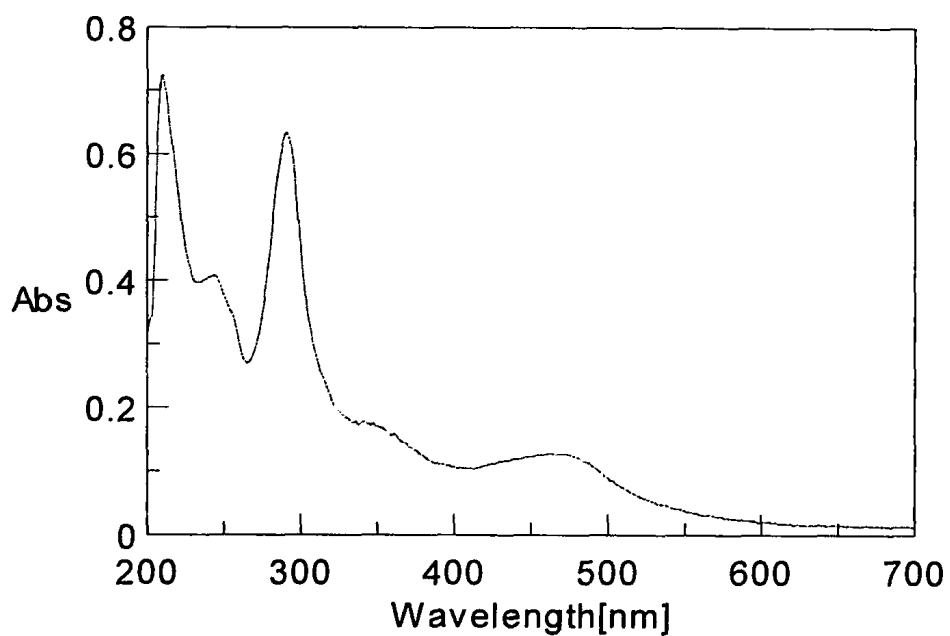
Wavelength (nm)

Figure 2: Spectral Power Distribution

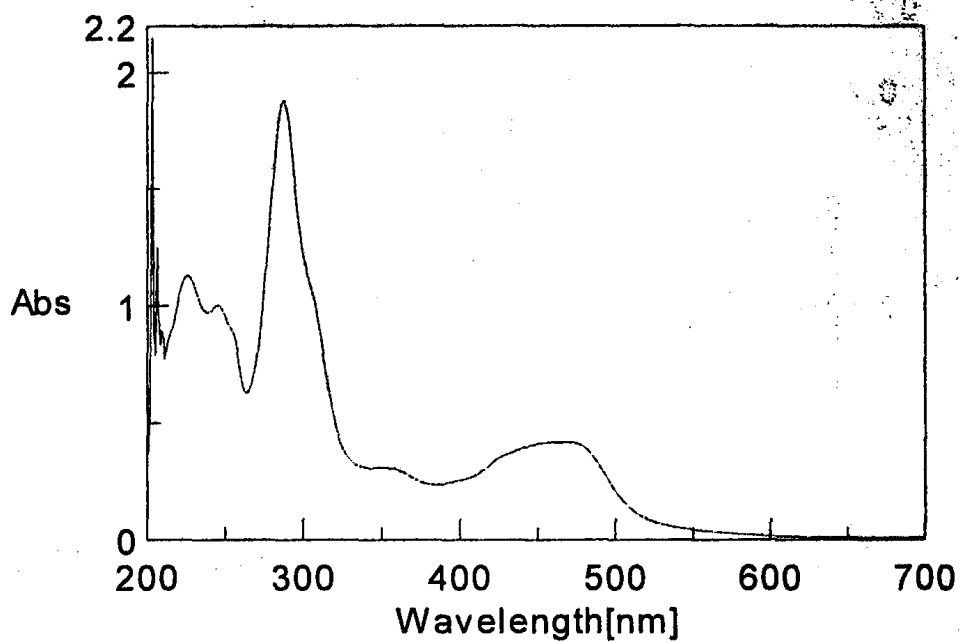




Σχήμα 1. Φάσμα UV-Vis του Δ1 συμπλόκου.

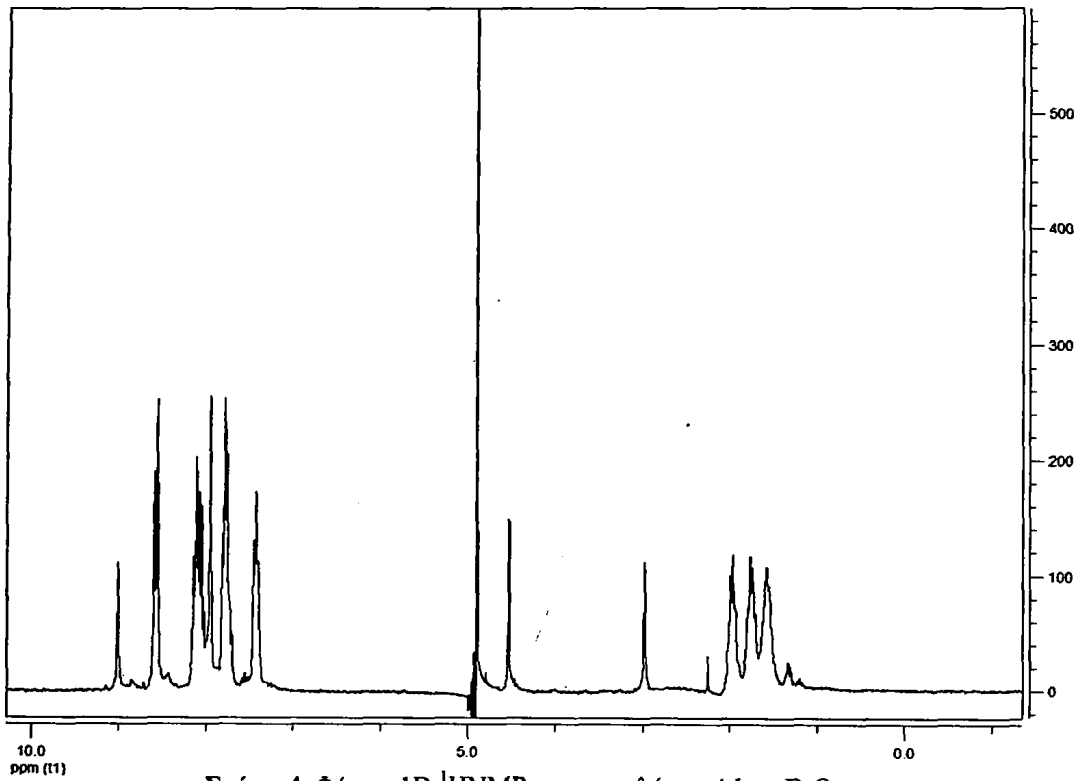


Σχήμα 2. Φάσμα UV-Vis του Λ2 συμπλόκου.

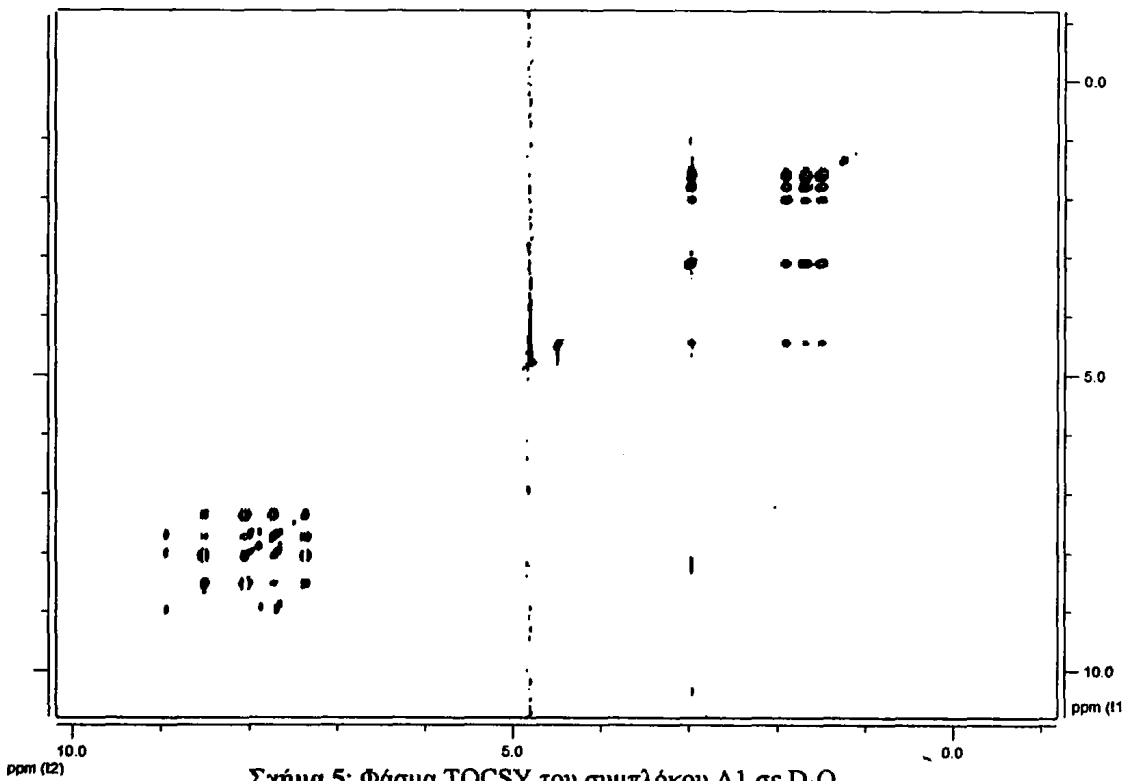


Σχήμα 3. Φάσμα UV-Vis του Δ3 συμπλόκου.

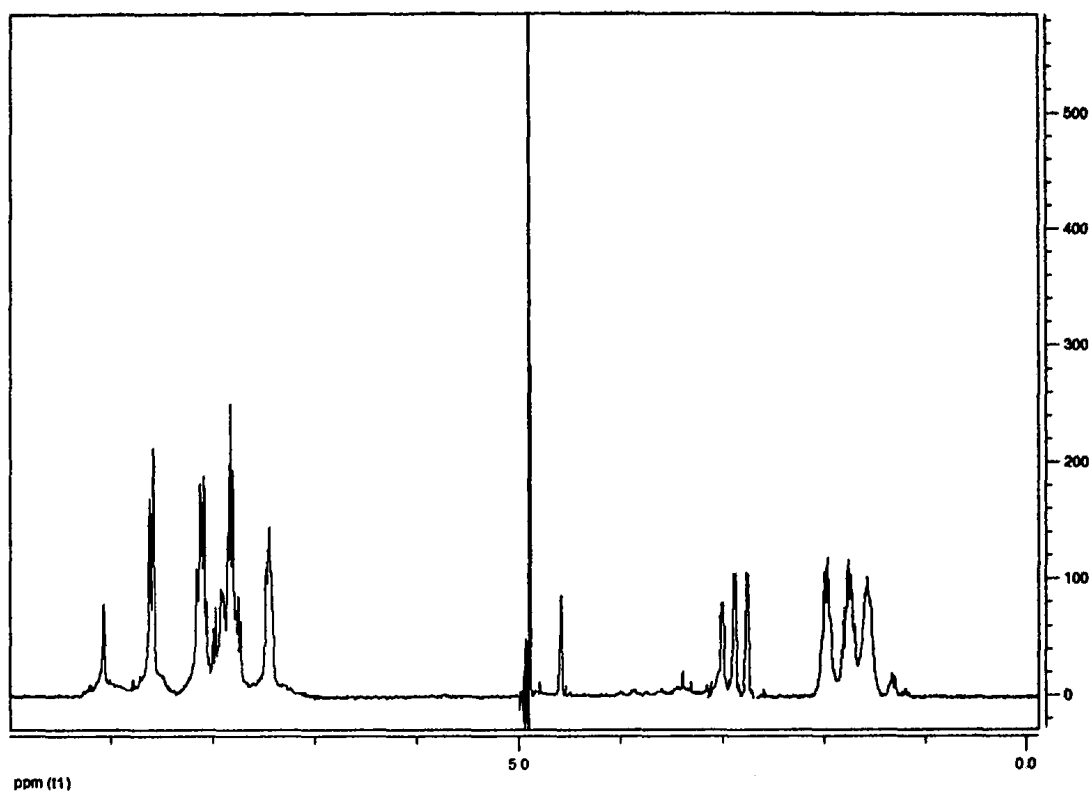




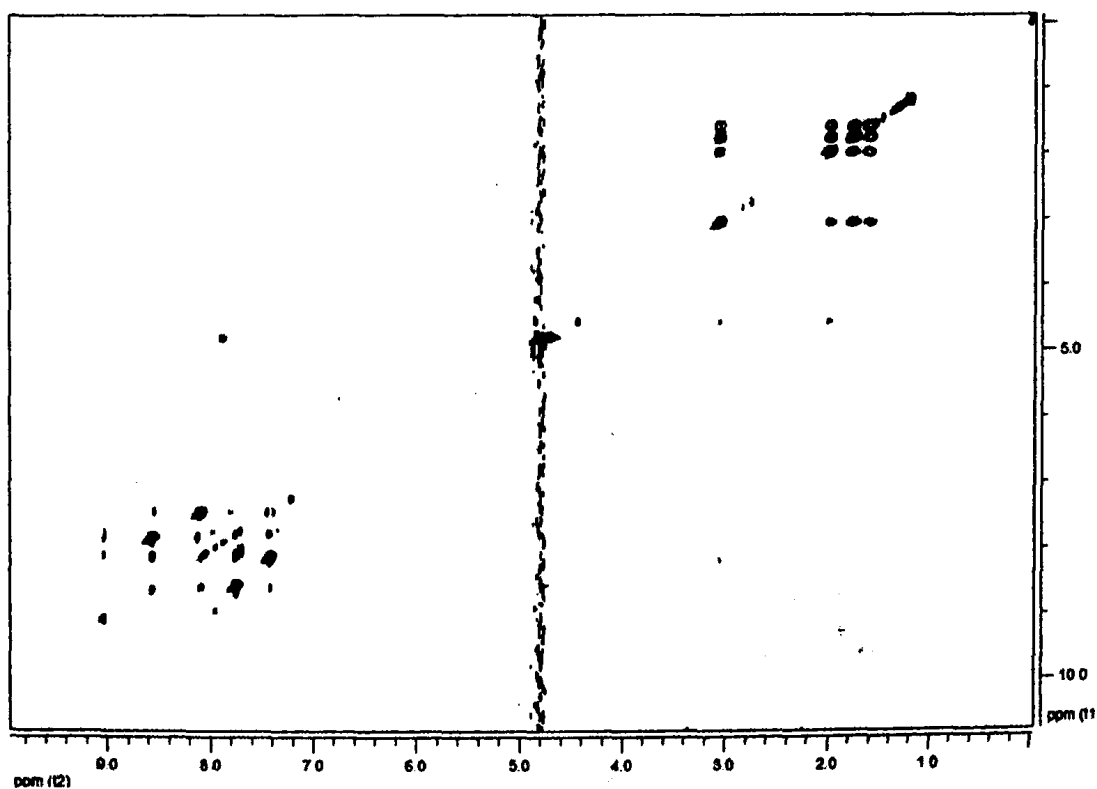
Σχήμα 4. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου Λ1 σε D_2O .



Σχήμα 5. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Λ1 σε D_2O .

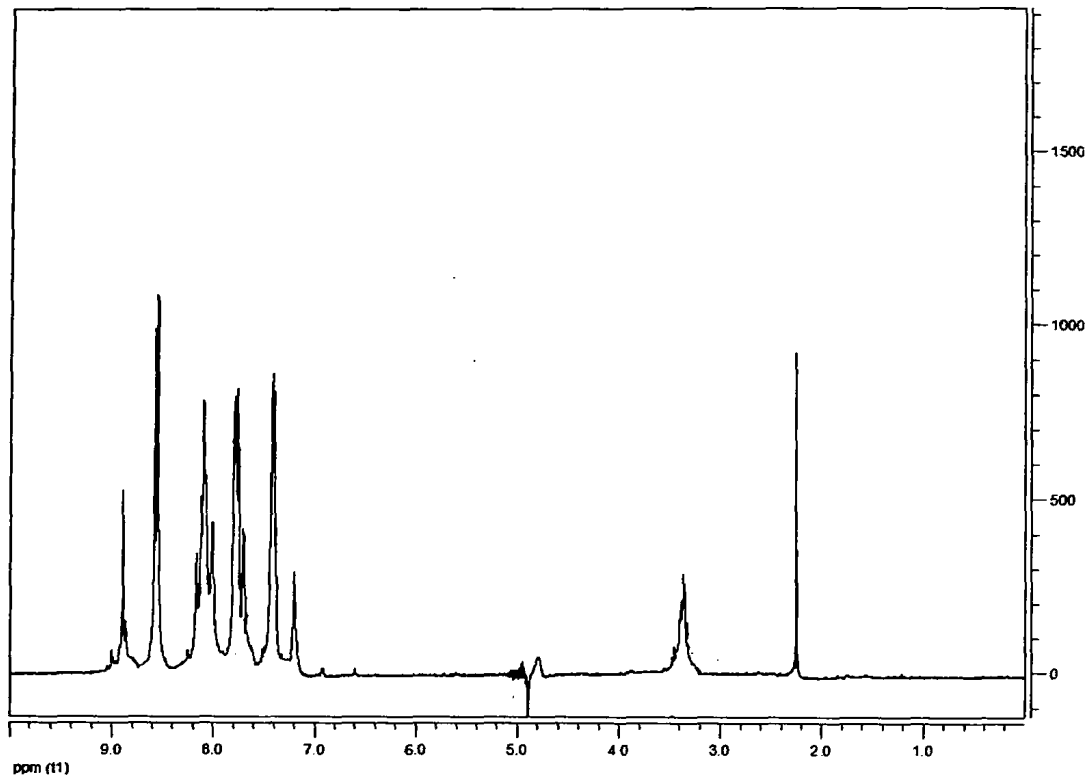


Σχήμα 6. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου Δ1 σε D_2O .

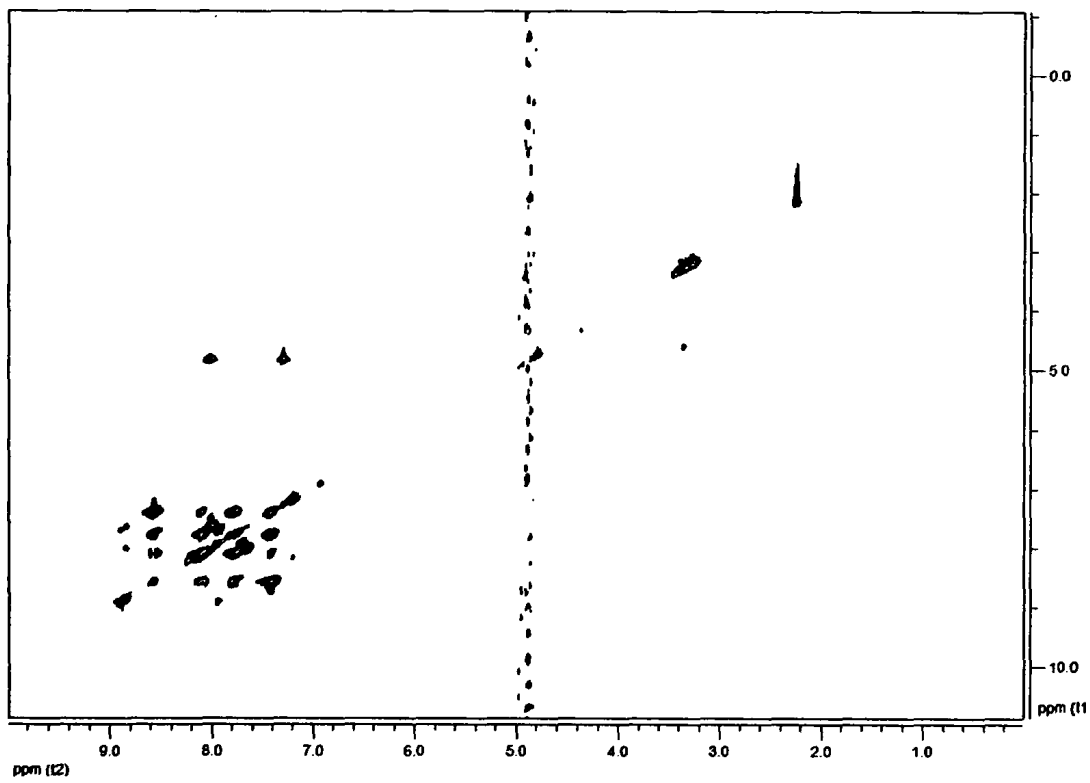


Σχήμα 7. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Δ1 σε D_2O .

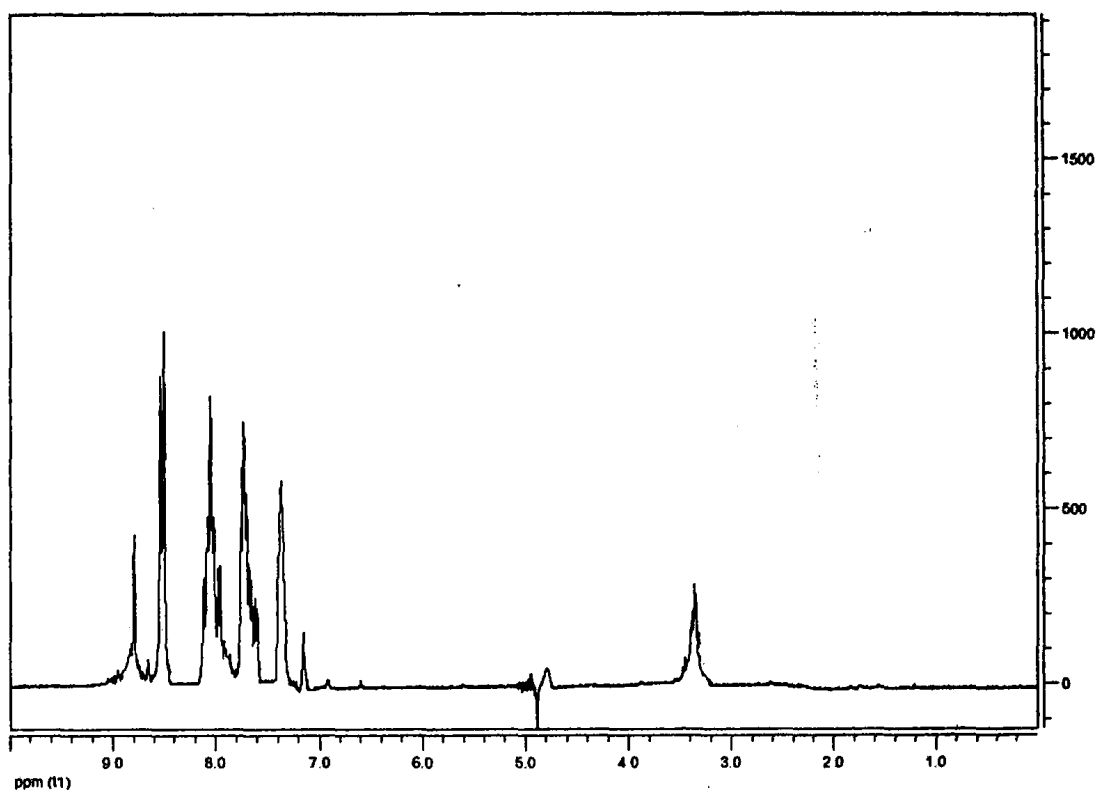




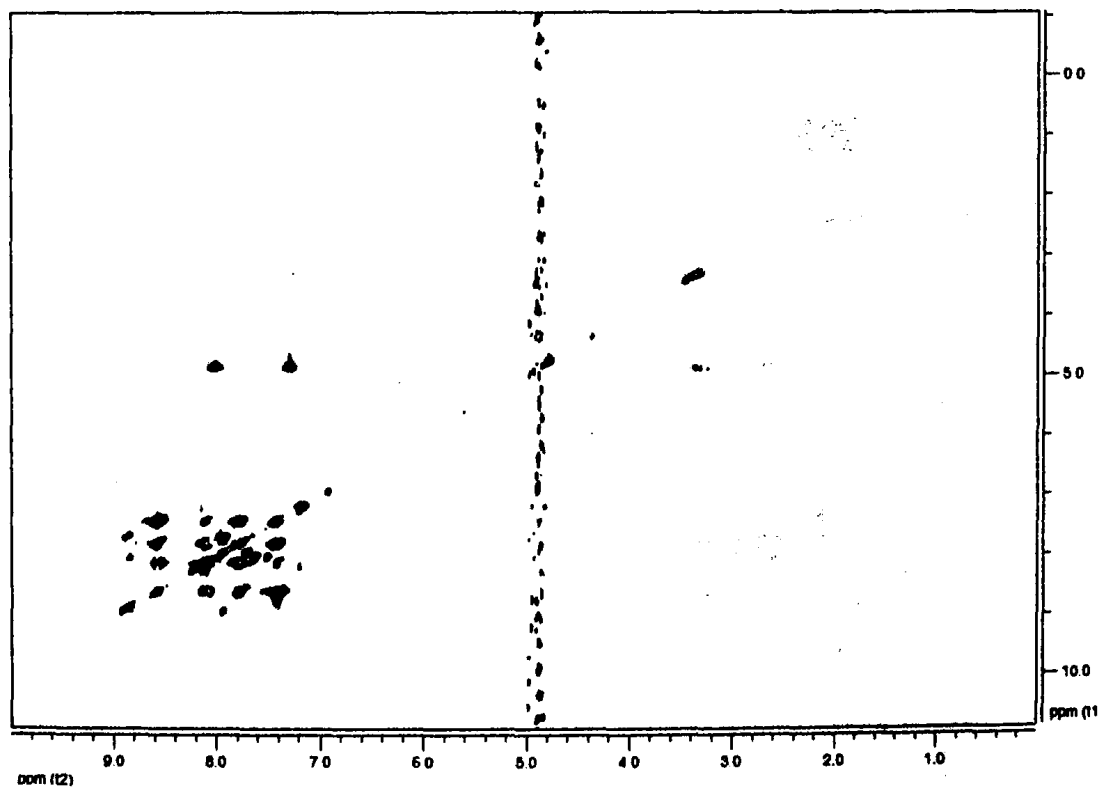
Σχήμα 8. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου Δ2 σε D_2O .



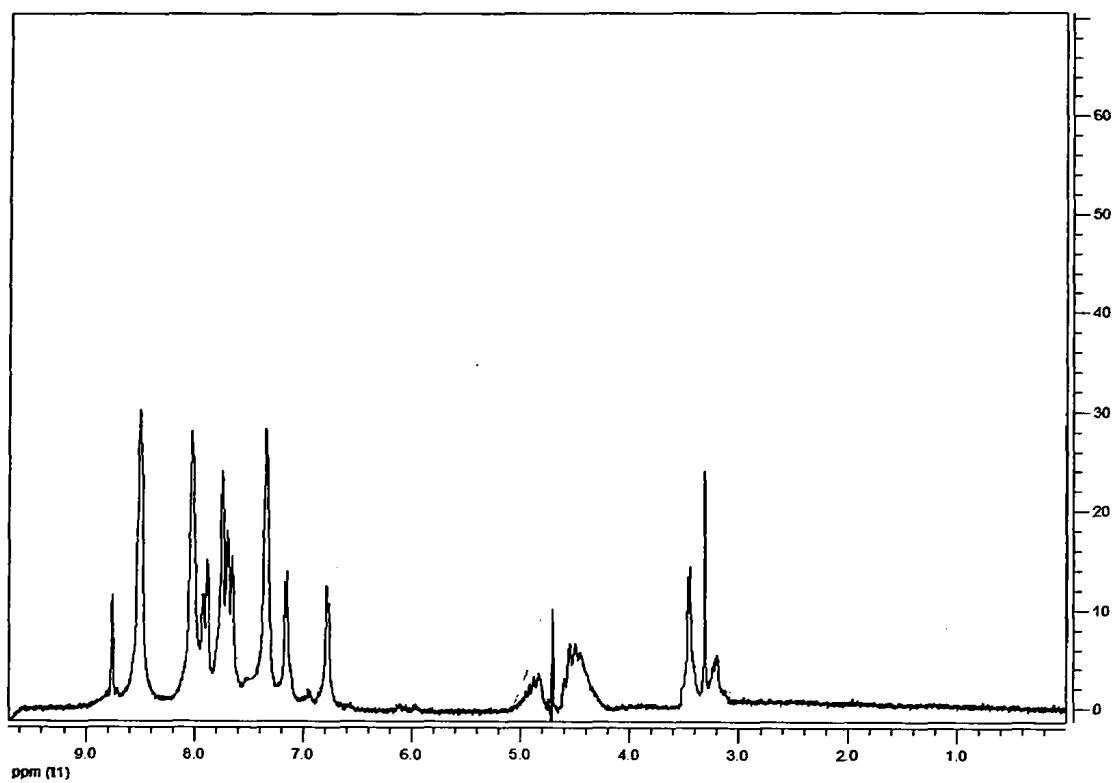
Σχήμα 9. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Δ2 σε D_2O .



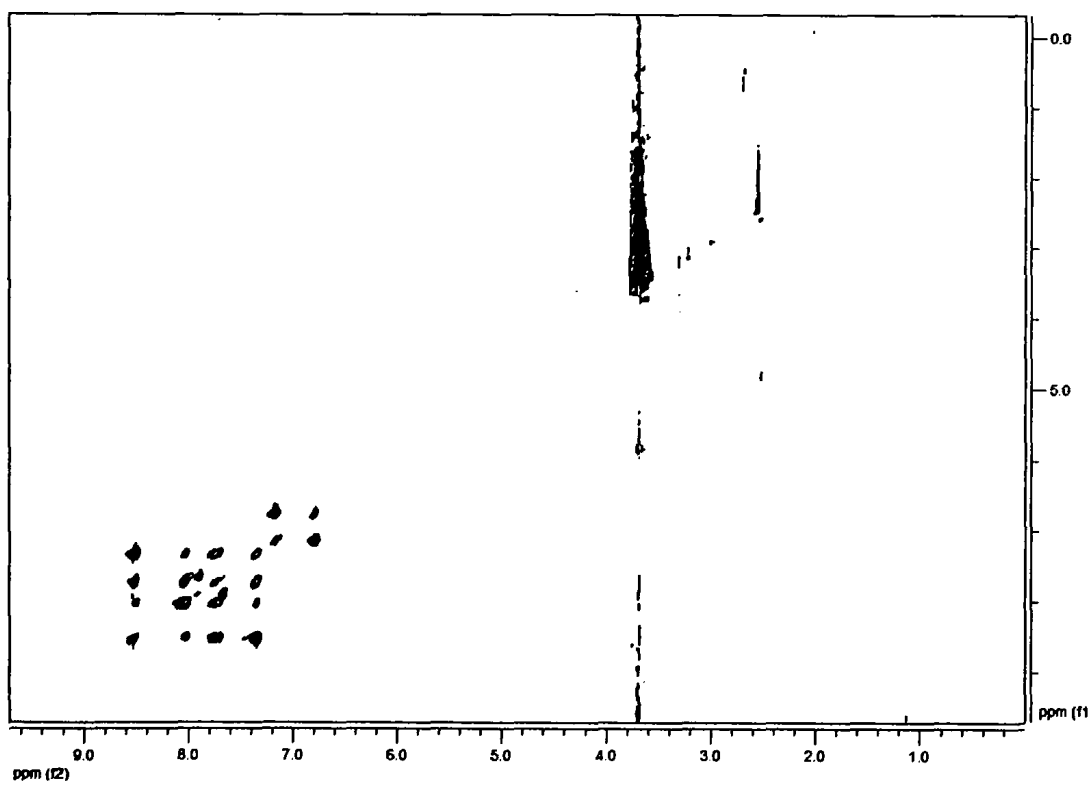
Σχήμα 10. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου Λ2 σε D_2O .



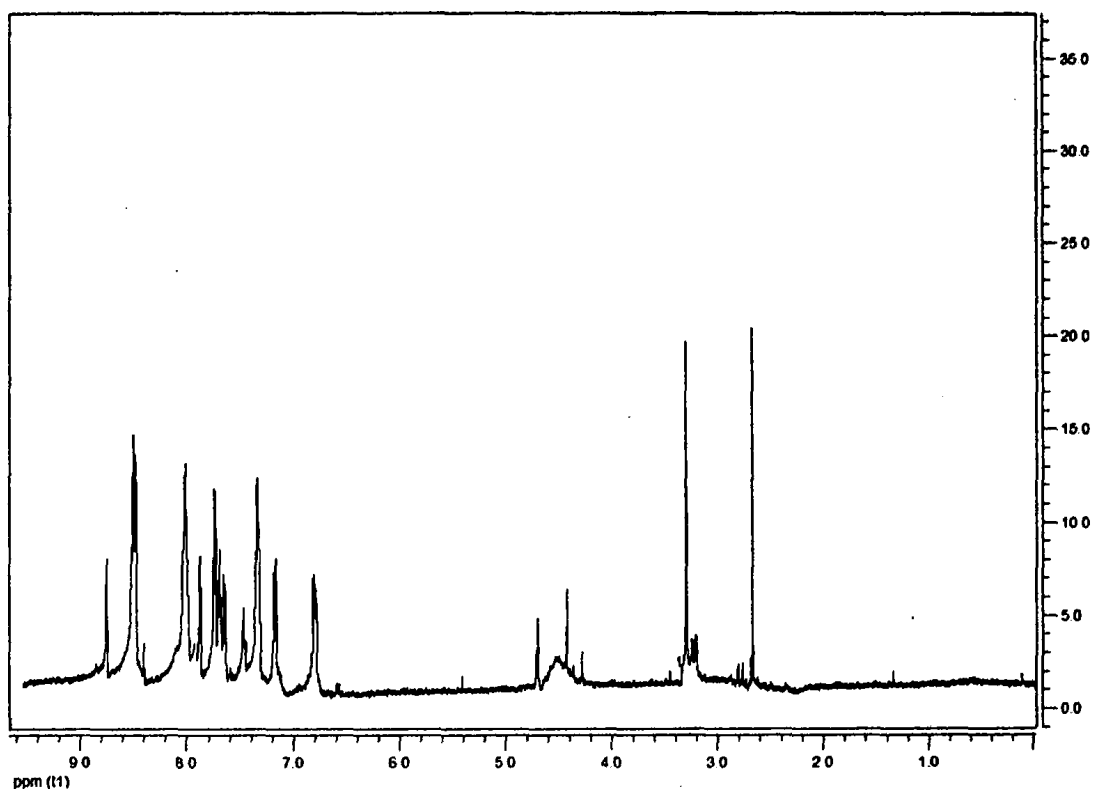
Σχήμα 11. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Λ2 σε D_2O .



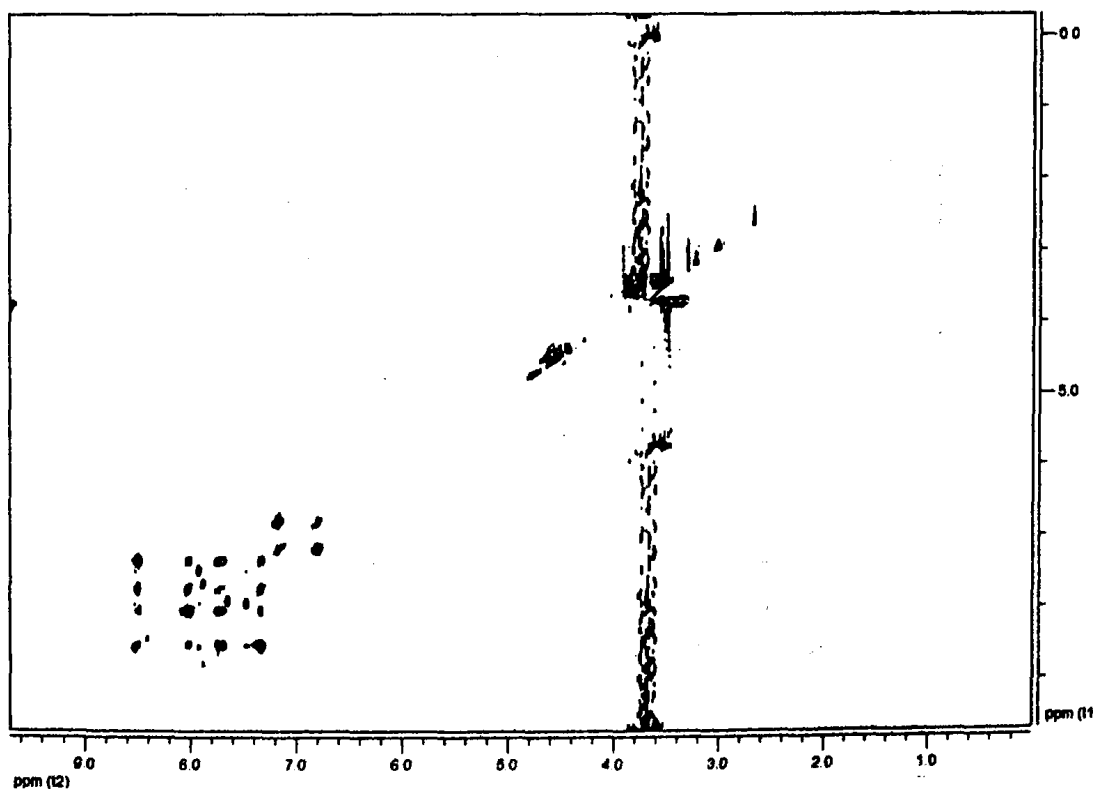
Σχήμα 12. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου Λ3 σε D_2O .



Σχήμα 13. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Λ3 σε D_2O .

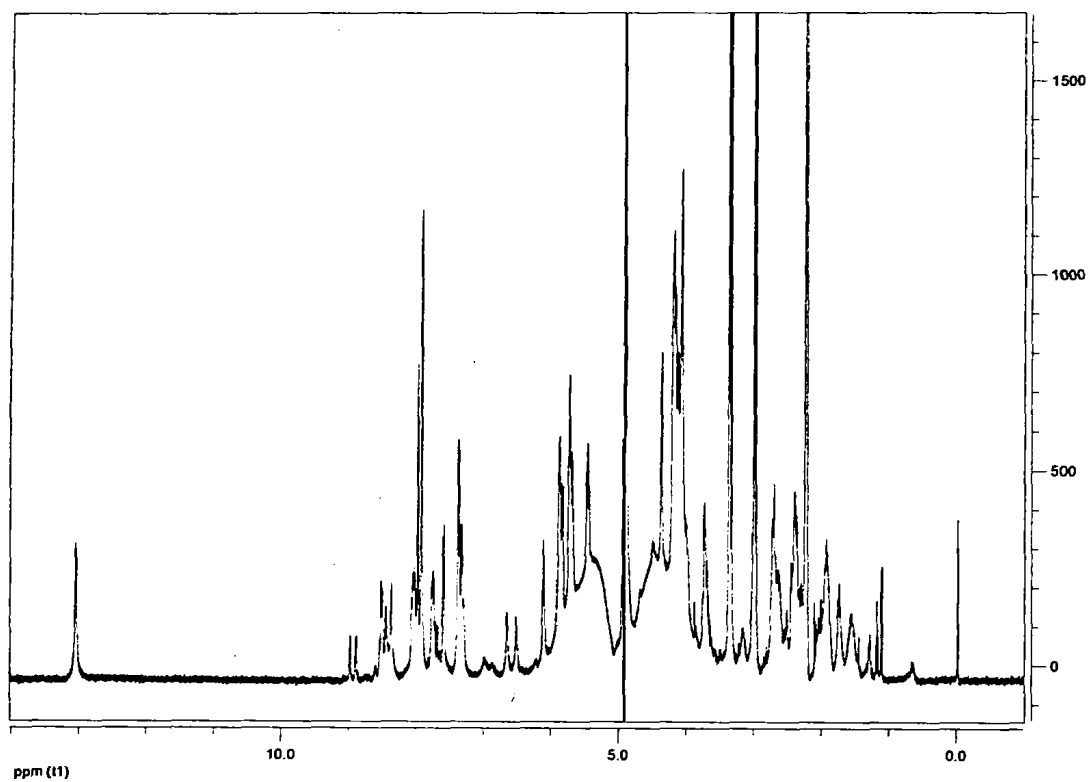


Σχήμα 14. Φάσμα 1D ^1H NMR του συμπλόκου Δ3 σε D_2O .

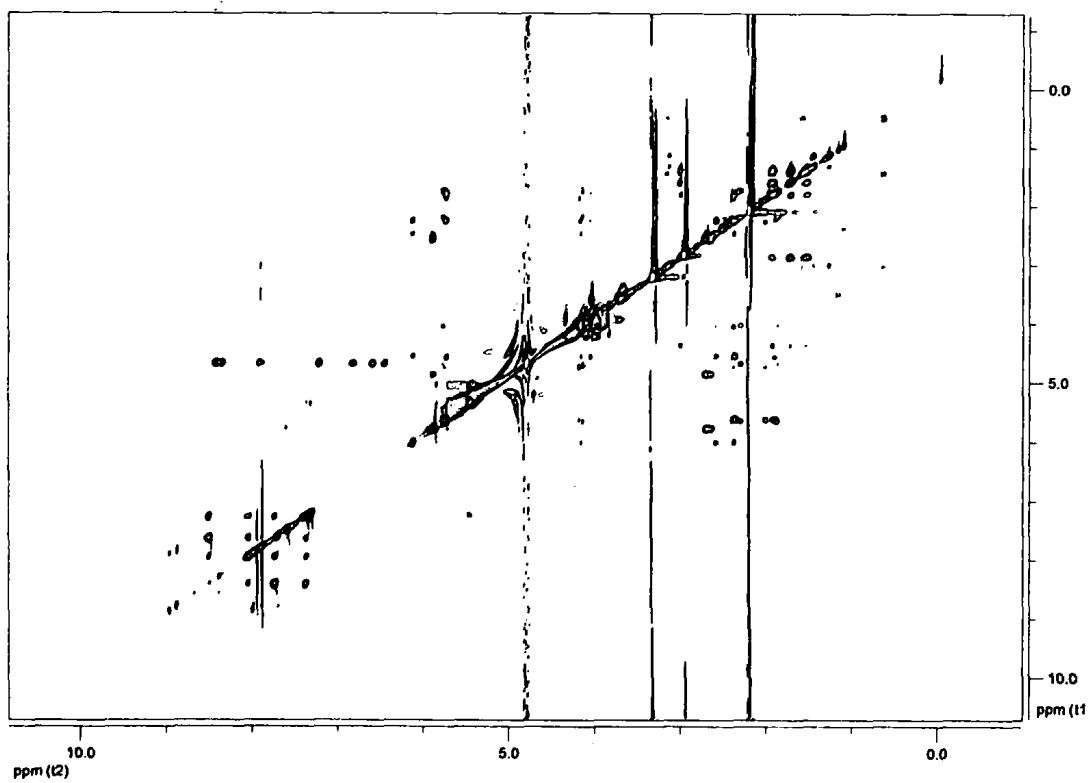


Σχήμα 15. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Δ3 σε D_2O .

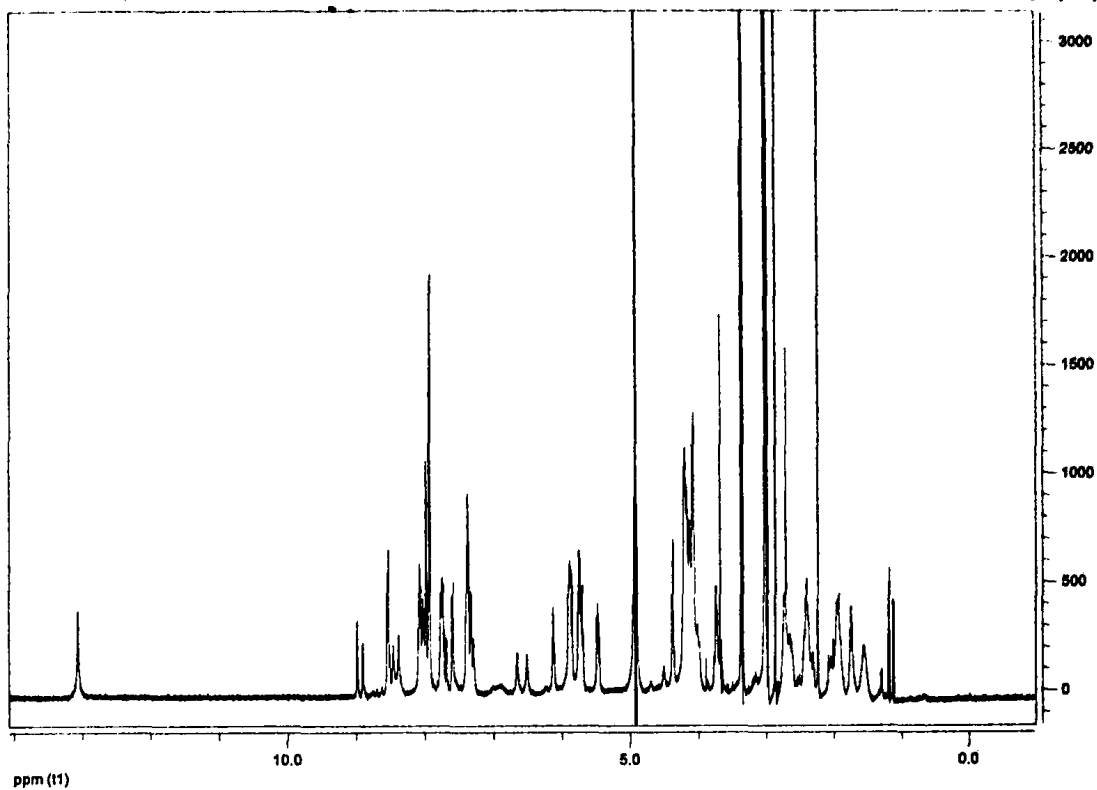




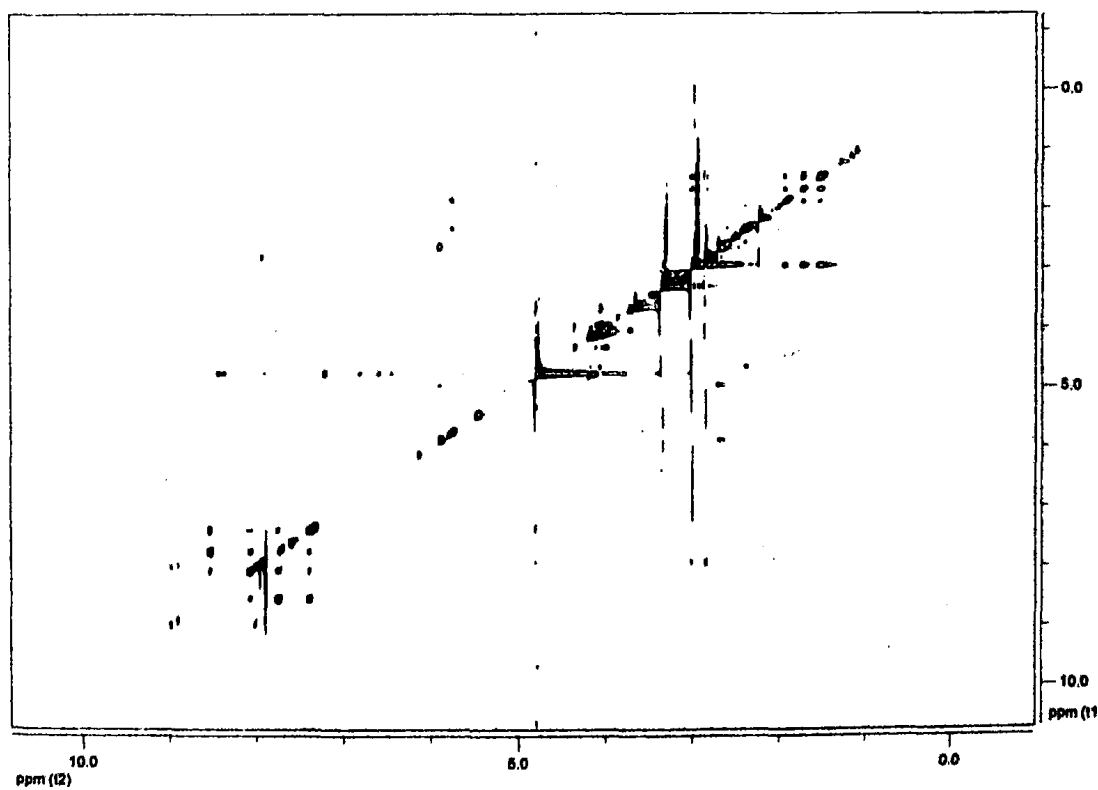
Σχήμα 16. Φάσμα ^1H NMR του συμπλόκου Δ1 με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(\text{CGCGCG})_2$.



Σχήμα 17. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου Δ1 με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(\text{CGCGCG})_2$.

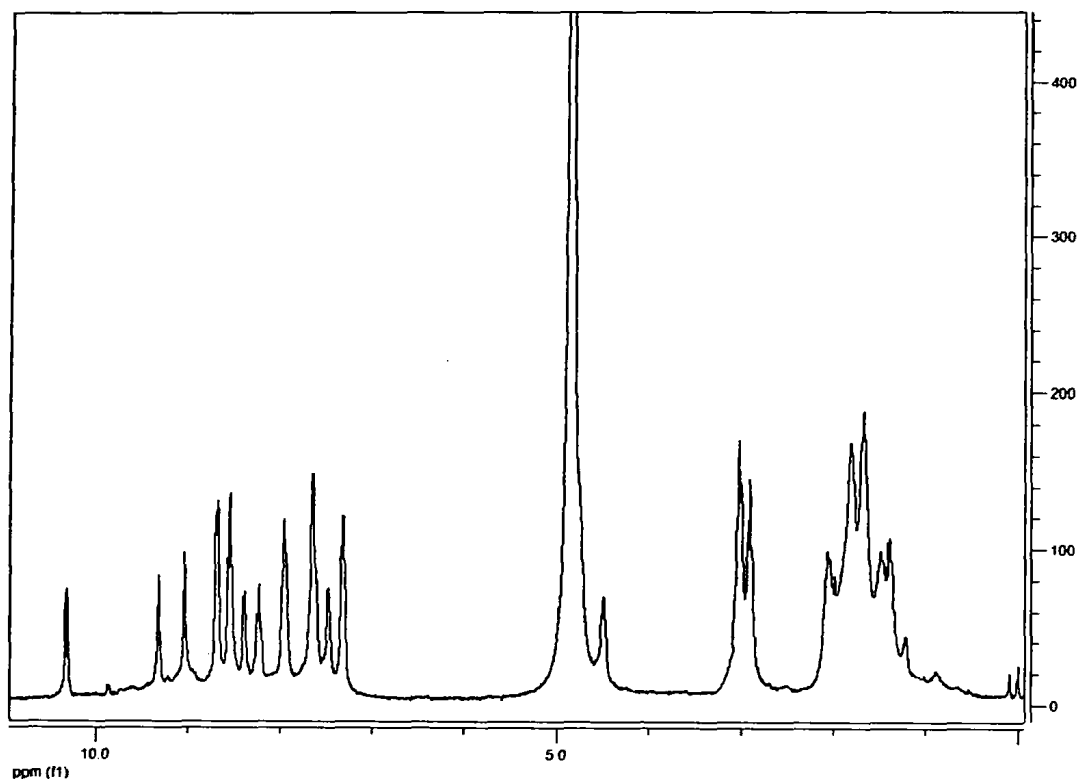


Σχήμα 18. Φάσμα ^1H NMR του συμπλόκου $\Lambda 1$ με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(\text{CGCGCG})_2$.

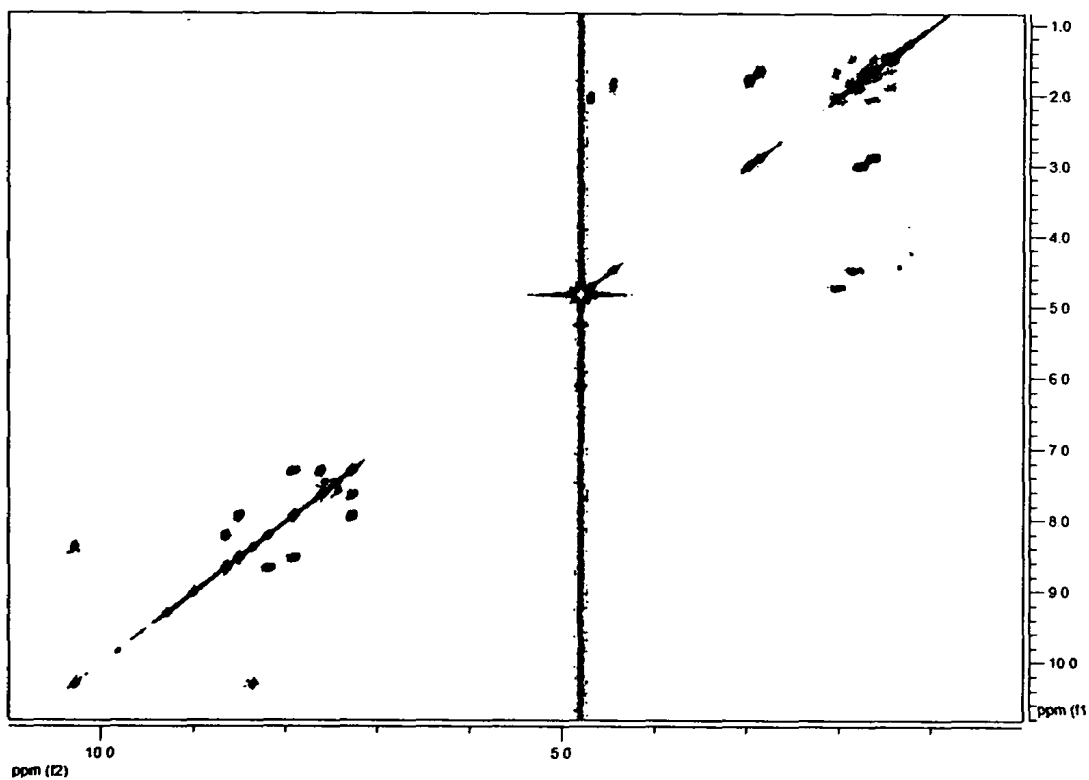


Σχήμα 19. Φάσμα TOCSY του συμπλόκου $\Lambda 1$ με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(\text{CGCGCG})_2$.

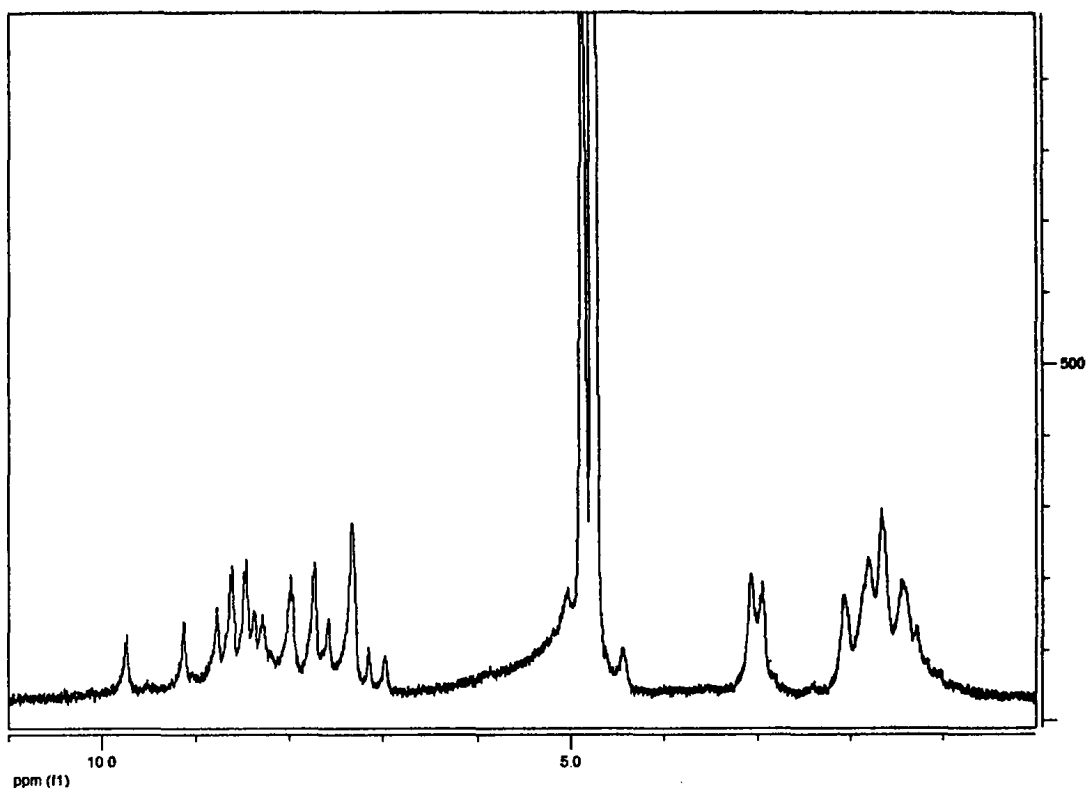




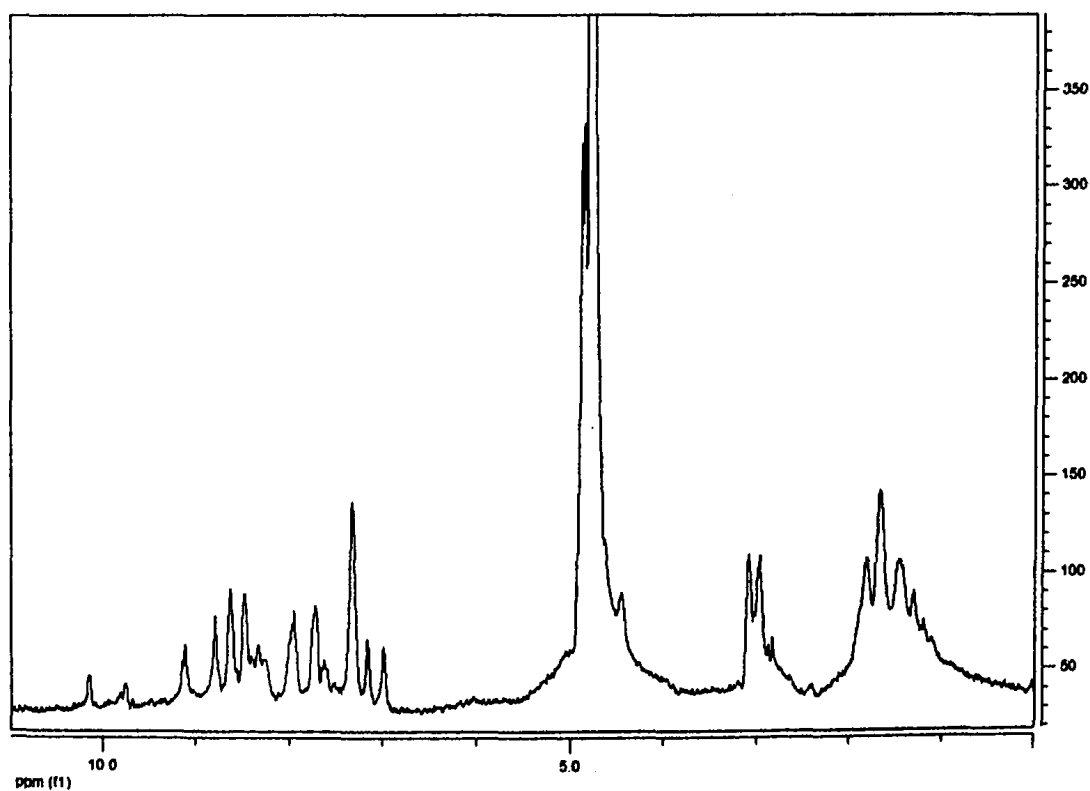
Σχήμα 20. Φάσμα ^1H NMR του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]^{3+}$ σε MeOD.



Σχήμα 21. Φάσμα COSY του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]^{3+}$ σε MeOD.



Σχήμα 22. Φάσμα ^1H NMR του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]^{3+}$ σε D_2O after 24h.



Σχήμα 23. Φάσμα ^1H NMR του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{terpy})(4,4'\text{-COLysCONH}_2)_2\text{bpy}]\text{Cl}]^{3+}$ σε D_2O σε 0h.