



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σύνθεση συμπλόκων στοιχείων μετάπτωσης με υποκαταστάτες
ολιγοπυριδίνες με συζευγμένα αμινοξέα και πεπτίδια. Δέσμευσή τους
σε νουκλεϊκά οξέα και νουκλεολυτική τους δραστηριότητα

Υψηλάντης Κωνσταντίνος
Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σύνθεση συμπλόκων στοιχείων μετάπτωσης με υποκαταστάτες
ολιγοπυριδίνες με συζευγμένα αμινοξέα και πεπτίδια. Δέσμευσή τους
σε νουκλεϊκά οξέα και νουκλεολυτική τους δραστικότητα

Υψηλάντης Κωνσταντίνος
Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 763^Α/ 27-11-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Αχιλλέας Γαρούφης

Μέλη:

Χριστίνα-Άννα Μητσοπούλου

Γεράσιμος Μαλανδρίνος

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 813^Α/ 18-03-2011

Θέμα: «Σύνθεση συμπλόκων στοιχείων μετάπτωσης με υποκαταστάτες ολιγοπυριδίνες με συζευγμένα αμινοξέα και πεπτίδια. Δέσμευσή τους σε νουκλεϊκά οξέα και νουκλεολυτική τους δραστικότητα»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 908^Α/ 15-05-2015

1. Αχιλλέας Γαρούφης, Καθηγητής
2. Χριστίνα-Άννα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια
3. Ιωάννης Πλακατούρας, Καθηγητής
4. Μαρία Λουλούδη, Καθηγήτρια
5. Θεμιστοκλής Καμπανός, Καθηγητής
6. Γεράσιμος Μαλανδρίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής
7. Εμμανουήλ Μάνος, Επίκουρος Καθηγητής

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα 10» στις 11-06-2015

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Λέκκα Μαρία-Ελένη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος

Ελένη Αδαμαντίου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2011-2015 στο εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η ανάθεση του θέματος, η επίβλεψη και η καθοδήγηση έγινε από τον καθηγητή Ανόργανης και Γενικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Αχιλλέα Γαρούφη.

Οι ευχαριστίες μου απευθύνονται πρώτιστα και κυρίως στο Δάσκαλο μου κ. Αχιλλέα Γαρούφη τόσο για την επιστημονική του καθοδήγηση όσο και για την κατανόηση, επιμονή, υπομονή, και ανοχή του απέναντι στις προσωπικές μου ανησυχίες, ανάγκες και δυσκολίες που αντιμετώπισα.

Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους συναδέλφους, φίλους και συγκατόικους μου Αράβια Μαρία, Ασβό Ξενοφώντα και Τσώλη Θεόδωρο, για την επιστημονική και ανθρώπινη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Ακόμη οφείλω να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας Καθηγητή κ. Α. Βλεσσίδα και Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Γκιώκα για την συμμετοχή στο Πρόγραμμα <<ΘΑΛΗΣ>>.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα άλλα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής την Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. Χριστίνα-Άννα Μητσοπούλου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γεράσιμο Μαλανδρίνο του Τμήματος Χημείας του Π.Ι.

Ακόμη θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη του Τομέα Ανόργανης για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση τους.

Αφιερωμένο στον Πατέρα μου
που έφυγε στις 17 Δεκέμβρη 2011

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι:

- Η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός ολιγοπυριδινικών, μη-εναντιομερών συμπλόκων του Ru(II) με κορεσμένη σφαίρα ένταξης και συζευγμένα αμινοξέα ή πεπτίδια.
- Η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός διπυρηνικών-ολιγοπυριδινικών, μη-εναντιομερών συμπλόκων του Ru(II)/Ru(II) με κορεσμένη σφαίρα ένταξης και συζευγμένα πεπτίδια.
- Η μελέτη της αλληλεπίδρασης με DNA εναντιομερών και μη-εναντιομερών μονοπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II) συζευγμένα με αμινοξέα ή πεπτίδια.
- Η μελέτη νουκλεολυτικής δραστηριότητας των διπυρηνικών συμπλόκων και η συσχέτιση με την δομή τους.

Τα παραπάνω αποσκοπούν να συμβάλουν στην διερεύνηση της κυτταροτοξικότητας και του μηχανισμού της, ολιγοπυριδινικών ενώσεων του Ru(II) με κορεσμένη σφαίρα ένταξης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Εισαγωγή	3
1.1.	Μεταλλοπεπτίδια: Στρατηγικές σύνθεσης και εφαρμόφες.....	3
1.2.	Στρατηγικές σύνθεσης.....	4
1.2.1.	Ένταξη του υποκαταστάτη με το συζευγμένο πεπτίδιο ή αμινοξύ στο σύμπλοκο.....	5
1.2.1.1.	Ένταξη του συζευγμένου με πεπτίδιο ή αμινοξύ υποκαταστάτη, στο σύμπλοκο, σε στερεή φάση.....	6
1.2.1.2.	Ένταξη του συζευγμένου με πεπτίδιο ή αμινοξέα υποκαταστάτη στο σύμπλοκο, σε υγρή φάση.....	9
1.2.2.	Σύζευξη πεπτιδίων ή αμινοξέων με το μεταλλικό σύμπλοκο μέσω αμιδικού δεσμού.....	12
1.2.2.1.	Σύζευξη πεπτιδίων ή αμινοξέων με το μεταλλικό σύμπλοκο μέσω αμιδικού δεσμού στην υγρή φάση.....	12
1.2.2.2.	Σύζευξη πεπτιδίων ή αμινοξέων με το μεταλλικό σύμπλοκο μέσω αμιδικού δεσμού σε στερεή φάση.....	20
1.2.3.	Ειδικές περιπτώσεις σύζευξης πεπτιδίων ή αμινοξέων με δεσμό πλην του αμιδικού.....	33
1.3.	Εφαρμογές.....	36
1.3.1.	Μεταφορά ηλεκτρονίου, Electron Transfer(E.T).....	36
1.3.2.	Φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες.....	44
1.3.3.	Βιολογική δράση.....	49
1.3.4.	Άλλες εφαρμογές.....	58
2.	Πειραματικό μέρος.....	63
2.1.	Αντιδραστήρια και φυσικές μετρήσεις.....	65
2.1.1.	Αντιδραστήρια.....	65
2.1.2.	Φυσικές μετρήσεις.....	65
2.1.2.1.	Φασματοσκοπία NMR.....	65
2.1.2.2.	Φασματομετρία μάζας.....	66
2.1.2.3.	Φασματοσκοπία UV-vis.....	67

2.1.2.4.	Κυτταροτοξικά πειράματα.....	67
2.2.	Σύνθεση υποκαταστατών και συμπλόκων.....	69
2.2.1.	Σύνθεση υποκαταστατών.....	69
2.2.1.1.	Σύνθεση της 4'-φαίνυλ-2,2':6',2''-τερπυριδίνης (tptry).....	69
2.2.1.2.	Σύνθεση της 4'-κάρβοξυ-2,2':6',2''-τερπυριδίνης (trpy-COOH).....	69
2.2.1.3.	Σύνθεση της 4'-κάρβοξυ-αίθυλ-εστέρα-2,2':6',2''-τερπυριδίνης (trpy-COOC ₂ H ₅).....	70
2.2.1.4.	Σύνθεση της 2,3,5,6-τέτρα(2-πύριδυλ)πυραζίνη (tppz).....	71
2.2.2.	Σύνθεση συμπλόκων.....	71
2.2.2.1.	Σύνθεση του συμπλόκου Ru(tptry)Cl ₃	71
2.2.2.2.	Σύνθεση του συμπλόκου Ru(tptry-COOH)Cl ₃	72
2.2.2.3.	Σύνθεση του συμπλόκου Ru(tptry-COOC ₂ H ₅)Cl ₃	73
2.2.2.4.	Σύνθεση του συμπλόκου cis-Ru(DMSO) ₄ Cl ₂	73
2.2.2.5.	Σύνθεση του συμπλόκου Ru(tptry)(DMSO)Cl ₂	74
2.2.2.6.	Σύνθεση του συμπλόκου Ru(tptry)(DMSO)Cl ₂	74
2.2.2.7.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(tptry)(tppz)](PF ₆) ₂	75
2.2.2.8.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(tptry)(tppz)](PF ₆) ₂	76
2.2.2.9.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(tptry-COOC ₂ H ₅)(trpy)](PF ₆) ₂	77
2.2.2.10.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(tptry-COOC ₂ H ₅) ₂](PF ₆) ₂	78
2.2.2.11.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(tptry-COOH)(trpy)](PF ₆) ₂	79
2.2.2.12.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(tptry-COOH) ₂](PF ₆) ₂	80
2.2.2.13.	Σύνθεση του συμπλόκου [(tptry)Ru(tppz)Ru(tptry-COOH)](PF ₆) ₄	80
2.2.2.14.	Σύνθεση του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(tptry-COOH)](PF ₆) ₄	82
2.2.2.15.	Σύνθεση του συμπλόκου [(tptry)Ru(tppz)Ru(trpy)](PF ₆) ₄	84
2.2.2.16.	Σύνθεση του συμπλόκου [(tptry)Ru(tppz)Ru(tptry-COOH)](PF ₆) ₄ από υδρόλυση [(tptry)Ru(tppz)Ru(tptry-COOC ₂ H ₄ OH)](PF ₆) ₄	85
2.2.2.17.	Σύνθεση του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(tptry-COOH)](PF ₆) ₄ από υδρόλυση.....	86

2.2.2.18.	Παρατηρήσεις πάνω στην σύνθεση των συμπλόκων [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF ₆) ₄ και [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF ₆) ₄	87
2.3.	Σύνθεση πεπτιδίων και συμπλόκων συζευγμένων με πεπτίδια.....	88
2.3.1.	Σύνθεση πεπτιδίων.....	88
2.3.1.1.	Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου resin-Lys ² -Lys ¹ -Gly ² -Gly ¹ -Fmoc.....	88
2.3.1.2.	Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου resin-Lys ¹ -Gly ³ -Gly ² -Gly ¹ -Fmoc.....	90
2.3.1.3.	Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου resin-Lys ² -Lys ¹ -Ahx -Fmoc.....	90
2.3.1.4.	Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου resin-Lys ¹ -Gly ¹ -Ahx -Fmoc.....	91
2.3.1.5.	Σύνθεση του ακινητοποιημένου αμινοξέος resin-Trp-Fmoc.....	91
2.3.1.6.	Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου resin-Trp-Gly-Fmoc.....	92
2.3.1.7.	Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου resin-Gly-Trp-Fmoc.....	93
2.3.2.	Σύζευξη των συμπλόκων στα πεπτίδια.....	94
2.3.2.1.	Σύνθεση του [(trpy)Ru (tppz)Ru(trpy-CONH-Gly ¹ -Gly ² -Lys ¹ -Lys ² CONH ₂)](PF ₆) ₆	94
2.3.2.2.	Σύνθεση του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly ¹ -Gly ² -Gly ³ -Lys ¹ CONH ₂)](PF ₆) ₅	95
2.3.2.3.	Σύνθεση του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys ¹ -Lys ² CONH ₂)](PF ₆) ₆	96
2.3.2.4.	Σύνθεση του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Gly ¹ -Lys ¹ CONH ₂)](PF ₆) ₅	96
2.3.2.5.	Σύνθεση του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly ¹ -Gly ² -Lys ¹ -Lys ² -NH ₂)](PF ₆) ₆	97
2.3.2.6.	Σύνθεση του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly ¹ -Gly ² -Gly ³ -Lys ¹ CONH ₂)](PF ₆) ₅	98
2.3.2.7.	Σύνθεση του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys ¹ -Lys ² CONH ₂)](PF ₆) ₆	99
2.3.2.8.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(trpy)(trpy-CONH-Gly-Trp-CONH ₂)](PF ₆) ₂	99
2.3.2.9.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(trpy)(trpy-CONH-Trp-CONH ₂)](PF ₆) ₂	101
2.3.2.10.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-Gly-Trp-CONH ₂) ₂](PF ₆) ₂	102
2.3.2.11.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-Trp-Gly-CONH ₂) ₂](PF ₆) ₂	103
2.3.2.12.	Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-Trp-CONH ₂) ₂](PF ₆) ₂	104

3.	Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	107
3.1.	Χαρακτηρισμός συμπλόκων.....	109
3.1.1.	Χαρακτηρισμός των μονοπυρηνικών συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{trpy-COY})_2](\text{PF}_6)_2$ και $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-COY})](\text{PF}_6)_2$ όπου Υ το αμινοξύ τρυπτοφάνη (Trp) και τα διπεπτίδια γλυκίνο-τρυπτοφάνη (Gly-Trp) και τρυπτοφάνο-γλυκίνη (Trp-Gly).....	109
3.1.1.1.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Trp-CONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$	109
3.1.1.2	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Trp-GlyCONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$	112
3.1.1.3.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly-Trp-CONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$	114
3.1.1.4.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-CONH-TrpCONH}_2)](\text{PF}_6)_2$	115
3.1.1.5.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-CONHGly-TrpCONH}_2)](\text{PF}_6)_2$	117
3.1.2	Χαρακτηρισμός των διπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II).....	118
3.1.2.1.	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy})](\text{PF}_6)_4$, $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$ και $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$ και των προδρόμων του.....	120
3.1.2.1.1.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$	120
3.1.2.1.2.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{ptrpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$	122
3.1.2.1.3.	Χαρακτηρισμός του διπυρηνικού συμπλόκου $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy})](\text{PF}_6)_4$	124
3.1.2.1.4.	Χαρακτηρισμός του διπυρηνικού συμπλόκου $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$	127
3.1.2.1.5.	Χαρακτηρισμός του διπυρηνικού συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$	131
3.1.2.1.6.	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](\text{PF}_6)_4$ και $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](\text{PF}_6)_4$	134
3.1.2.2.	Χαρακτηρισμός των συμπλόκων $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COY})](\text{PF}_6)_4$ και $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COY})](\text{PF}_6)_4$ όπου Υ = Gly ¹ -Gly ² -Lys ¹ -Lys ² CONH ₂ , Gly ¹ -Gly ² -Gly ³ -Lys ¹ CONH ₂ , Ahx-Lys ¹ -Lys ² CONH ₂ , Ahx-Lys-GlyCONH ₂	139
3.1.2.2.1.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Lys}^1\text{CONH}_2)](\text{PF}_6)_5$	139

3.1.2.2.2.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly ¹ -Gly ² -Gly ³ -Lys ¹ CONH ₂)](PF ₆) ₅	142
3.1.2.2.3.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly ¹ -Gly ² -Lys ¹ -Lys ² CONH ₂)](PF ₆) ₆	146
3.1.2.2.4.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly ¹ -Gly ² -Lys ¹ -Lys ² CONH ₂)](PF ₆) ₆	148
3.1.2.2.5.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys ¹ -Lys ² CONH ₂)](PF ₆) ₆	151
3.1.2.2.6.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys ¹ -Lys ² CONH ₂)](PF ₆) ₆	154
3.1.2.2.7.	Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Gly-LysCONH ₂)](PF ₆) ₅	157
3.2.	Χαρακτηρισμός του ολιγονουκλεοτίδιου d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	160
3.2.1.	Ανταλλάξιμα πρωτόνια.....	160
3.2.2.	Μη ανταλλάξιμα πρωτόνια.....	166
3.2.2.1.	Πρωτόνια των νουκλεϊκών βάσεων.....	167
3.2.2.2.	Πρωτόνια του σακχάρου.....	168
3.3.	Αλληλεπιδράσεις οπτικά ενεργών συμπλόκων του Ru(II) συζευγμένων με πεπτίδια, με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	174
3.3.1.	Αλληλεπιδράσεις των Λ- συμπλόκων με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	174
3.3.1.1.	Αλληλεπιδράσεις του Λ-1 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	175
3.3.1.2.	Αλληλεπιδράσεις του Λ-2 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	179
3.3.1.3.	Αλληλεπιδράσεις του Λ-3 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	181
3.3.2.	Αλληλεπιδράσεις των Δ- συμπλόκων με το ολιγονουκλεοτίδιο d(3'-CGCGAATTCGCG-5') ₂	185
3.3.2.1.	Αλληλεπιδράσεις του Δ-1 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	185
3.3.2.2.	Αλληλεπιδράσεις του Δ-2 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	190

3.3.2.3.	Αλληλεπιδράσεις του Δ-3 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	192
3.3.3.	Συμπεράσματα από τις αλληλεπιδράσεις των Λ- και Δ- συμπλόκων με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	196
3.4.	Αλληλεπιδράσεις μη-εναντιομερών συμπλόκων του Ru(II) συζευγμένων με αμινοξέα ή πεπτίδια με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	198
3.4.1.	Αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων [Ru(trpy-CONH-TrpCONH ₂) ₂]Cl ₂ (1) και [Ru(trpy)(trpy-CONH-Gly-TrpCONH ₂) ₂]Cl ₂ (2) με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	198
3.4.1.1.	Αλληλεπίδραση του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-TrpCONH ₂) ₂]Cl ₂ (1) με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	198
3.4.1.2.	Αλληλεπίδραση του συμπλόκου [Ru(trpy)(trpy-CONH-Gly-TrpCONH ₂) ₂]Cl ₂ (2) με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	201
3.4.1.3.	Συμπεράσματα από τις αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων (1) και (2) με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3') ₂	203
3.5.	Νουκλεολυτική δραστηριότητα.....	205
3.6.	Κυτταροτοξικότητα.....	213
	Γενικά συμπεράσματα.....	215
	Βιβλιογραφία.....	217
	Παράρτημα.....	225

SUMMARY

The ability of the diastereomeric compounds of the general formula Λ - and Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-COY-4'-Mebpy})]\text{Cl}_2$ ($\text{bpy} = 2,2'$ -bipyridine and $\text{Y} = \text{Gly-Lys}^1\text{-Lys}^2\text{CONH}_2$, $\text{Lys}^1\text{-Gly-Lys}^2\text{CONH}_2$, $\text{Lys}^1\text{-Lys}^2\text{-GlyCONH}_2$) to bind to the oligonucleotide duplex $d(5'\text{-CGCGAATTCGCG-3'})$ was studied with NMR techniques. Complex Λ -2, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-COLys}^1\text{-Gly-Lys}^2\text{CONH}_2, 4'\text{-Mebpy})]\text{Cl}_2$ ($\text{Mebpy} = \text{methyl-2,2'}$ -bipyridine), interacts non-specifically causing changes for both complex and oligonucleotide ^1H NMR signals. Both Λ -1, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-COGly-Lys}^1\text{-Lys}^2\text{CONH}_2, 4'\text{-Mebpy})]\text{Cl}_2$ and Λ -3, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-COLys}^1\text{-Lys}^2\text{-GlyCONH}_2, 4'\text{-Mebpy})]\text{Cl}_2$, were bound to the oligonucleotide through both lysine aliphatic chains, indicating that the side chains of the sequential lysines create a kind of "clamp" to connect the complex with the oligonucleotide. Complex Δ -1, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-COGly-Lys}^1\text{-Lys}^2\text{CONH}_2, 4'\text{-Mebpy})]\text{Cl}_2$, interacts with the oligonucleotide duplex with both lysine side chains in a manner similar to Λ -1. Δ -2, Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-COLys}^1\text{-Gly-Lys}^2\text{CONH}_2, 4'\text{-Mebpy})]\text{Cl}_2$, interacts with the oligonucleotide with the bipyridine ligands. In addition, the formation of a hydrogen bond between the Gly-NH and the carbonyl groups of the oligonucleotide bases was detected. A completely different binding mode was observed for Δ -3 Δ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-COLys}^1\text{-Lys}^2\text{-GlyCONH}_2, 4'\text{-Mebpy})]\text{Cl}_2$, which at a ratio of 1:1 ($[\text{Ru}]/[\text{nucleotide}]$) opens the oligonucleotide strands. In addition, participation of all three peptidic NH of Δ -3 in hydrogen bonds was observed.

Non-diastereomeric homoleptic $[\text{Ru}(\text{trpyCO-TrpCONH}_2)_2]\text{Cl}_2$ (1), $[\text{Ru}(\text{trpyCO-Gly-TrpCONH}_2)_2]\text{Cl}_2$ (2) and the heteroleptic complexes $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpyCO-TrpCONH}_2)]\text{Cl}_2$ (3), $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpyCO-Gly-TrpCONH}_2)]\text{Cl}_2$ (4), where trpyCO-TrpCONH_2 and $\text{trpyCO-Gly-TrpCONH}_2$ are $2,2':6',2''$ -terpyridine-4-carboxylic acid tryptophanamide and $2,2':6',2''$ -terpyridine-4-carboxylic acid-glycyl-tryptophanamide respectively, were synthesized and characterized by various spectroscopic and analytical techniques. The interactions of complexes (1) and (4)

with the oligonucleotide d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ were studied by means of NMR spectroscopy. Both complexes bound very weakly to the oligonucleotide, perturbing slightly the helix from B-form, probably through electrostatic interactions between the positive charge of the complexes and the DNA phosphates. In the case of complex (1), the conjugated tryptophane did not approach the oligonucleotide helix, as in the case of complex (4), the ligand trpy of which was clearly orientated towards the oligonucleotide helix. These observations indicate that the bulky substitute on the ligand trpy reduces the binding affinity of the complexes to DNA, allowing only electrostatic interactions. However, complex (4) shows high cytotoxicity against LMS, MCF-7, U2OS and K562 cancer cell lines, with IC₅₀ values ranging 0.464–0.925 nM, which can be attributed to a non classical mechanism for metal based anticancer agents

Binuclear Ru(II)/Ru(II) complexes of the general formula [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COY)](PF₆)₄ και [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COY)](PF₆)₄ where trpy-COY = 2,2':6',2''-terpyridine-4-carboxylic, trpy = 2,2':6',2''-terpyridine tppz = 2,3,5,6-tetrakis(2-pyridyl)pyrazine, ptrpy = 4-phenyl-2,2':6',2''-terpyridine and Y = Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂, Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂, -Ahx-Lys¹-Lys²CONH₂, were synthesized and characterized. The complexes [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅ and [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅ were studied for their nucleolytic activity. Both complexes showed nucleolytic activity against the dinucleotide guanylyl-cytidine (3'→5'), upon UVA irradiation. Some activity was also observed in the dark.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

PYBOP = (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium

hexafluorophosphate

HCTU = *O*-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium

hexafluorophosphate

DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamine

TFA = Trifluoroacetic acid

HOSu = *N*-Hydroxysuccinimide

DCC = Dicyclohexylcarbodiimide

BOP = (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium

hexafluorophosphate

HOBt = 1-Hydroxybenzotriazole hydrate

NMM = 4-Methylmorpholine

DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridine

DIC = *N,N'*-Diisopropylcarbodiimide,

TIS = triisopropylsilane

TSTU = *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(*N*-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate

CD = *N*-Cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl)carbodiimidemetho-*p*-toluenesulfonate

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΜΕΤΑΛΛΟΠΕΠΤΙΔΙΑ: ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

1.1.1. Εισαγωγή

Με τον όρο μεταλλοπεπτίδια εννοούμε μια ομάδα ενώσεων που ανήκουν στην γενικότερη κατηγορία των μεταλλοβιοπολυμερών. Τα μεταλλοβιοπολυμερή είναι ενώσεις οι οποίες συνδυάζουν τις οπτικές, ηλεκτρικές, μαγνητικές, καταλυτικές και χημικές ιδιότητες των συμπλοκών των μετάλλων, με τις βιολογικές ιδιότητες των βιομορίων. Επιπλέον διαθέτουν την δυνατότητα της υψηλής οργάνωσης της δομής τους, όπως συμβαίνει στις πολυμερείς ενώσεις.

Η σύζευξη των μεταλλικών συμπλόκων με βιομόρια όπως τα πεπτίδια και οι δομικές τους μονάδες τα αμινοξέα, γίνεται με μια μεγάλη ποικιλία δεσμών όπως ο αμιδικός δεσμός (-NH-CO-). Στην παρούσα μελέτη γίνεται ανασκόπηση της πρόσφατης αλλά και της παλαιότερης βιβλιογραφίας σύμπλοκων ενώσεων της ομάδας του λευκοχρύσου με πολύ- και ολιγοπυριδινικούς υποκαταστάτες συζευγμένους με αμινοξέα και πεπτίδια κυρίως μέσω αμιδικού δεσμού. Σύμπλοκες ενώσεις όπου το αμινοξύ ή το πεπτίδιο εντάσσεται απευθείας στο μέταλλο δεν αποτελεί αντικείμενο της παρούσης ανασκόπησης.

Τα τελευταία χρόνια ένας σημαντικός αριθμός ερευνητών στο πεδίο της Βιοανόργανης Χημείας έχει εστιάσει τις ερευνητικές του προσπάθειες στην μελέτη συμπλόκων μετάλλων της ομάδας του λευκοχρύσου με υποκαταστάτες παράγωγα της πυριδίνης που συζευγνύονται με αμινοξέα ή πεπτίδια. Τα σύμπλοκα αυτά, όχι τυχαία, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω της σταθερότητας τους, της δυνατότητας να ρυθμίζονται οι ιδιότητες τους από την φύση του αμινοξέος ή του πεπτιδίου, της καλής εν γένει διαλυτότητας τους, αλλά κυρίως λόγω της ικανότητας τους στη μεταφορά ηλεκτρονίων (electron transfer) από το μεταλλικό κέντρο προς την πεπτιδική αλυσίδα, ως μοντέλα για την μελέτη του φαινομένου της μεταφοράς

ηλεκτρονίων στις πρωτεΐνες. Ακόμη, στην πιο πάνω ιδιότητα τους στηρίζονται και οι όποιες εφαρμογές τους ως καταλύτες, κυτταροτοξικές ενώσεις, αντιδραστήρια απεικόνισης κ.λ.π.

Από όλα τα μέταλλα της ομάδας του Pt τα σύμπλοκα του ρουθηνίου είναι αναμφισβήτητα τα περισσότερο μελετημένα λόγω των μοναδικών φωτοχημικών και φωτοφυσικών ιδιοτήτων τους, της καλής υδατοδιαλυτότητας τους καθώς και της μικρής τοξικότητας που παρουσιάζουν σε βιολογικά συστήματα. Έτσι βρίσκουν πιθανές εφαρμογές κυρίως ως απεικονιστικά αντιδραστήρια και ως κυτταροτοξικές ενώσεις. Ακολουθούν τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου καθώς είναι ευρέως γνώστες οι αντικαρκινικές ιδιότητες αρκετών ενώσεων του. Στην πραγματικότητα το *cis-platin* και τα ανάλογα του είναι τα μόνα σήμερα σε κυκλοφορία αντικαρκινικά φάρμακα. Τα σύμπλοκα του Pt(II) με υποκαταστάτες που συζευγνύονται με πεπτίδια στοχεύουν στην καλύτερη διέλευση των ενώσεων από την κυτταρική μεμβράνη καθώς και σε ισχυρότερες και εκλεκτικότερες αλληλεπιδράσεις με το DNA που αποτελεί τον στόχο των φαρμάκων.

Τέλος ανάλογα σύμπλοκα των μεταλλικών ιόντων Rh(I), Ir(III), Pd(II) και Os(II) μελετούνται συνήθως σπανιότερα κυρίως λόγω των παραπλήσιων φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους με τα πιο πάνω προαναφερθέντα μέταλλα.

Στην συνέχεια θα εξετάσουμε με συστηματικό τρόπο δυο βασικές ενότητες, τις στρατηγικές σύνθεσης και τις εφαρμογές των μεταλλοπεπτιδίων.

1.2. ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Υπάρχουν τρεις τρόποι σύζευξης αμινοξέων ή πεπτιδίων στα μεταλλικά σύμπλοκα.

Ο πρώτος τρόπος δημιουργίας μεταλλοπεπτιδίων αφορά την ένταξη ενός υποκαταστάτη συζευγμένου με πεπτίδιο ή αμινοξύ, ακινητοποιημένου ή σε υγρή φάση.

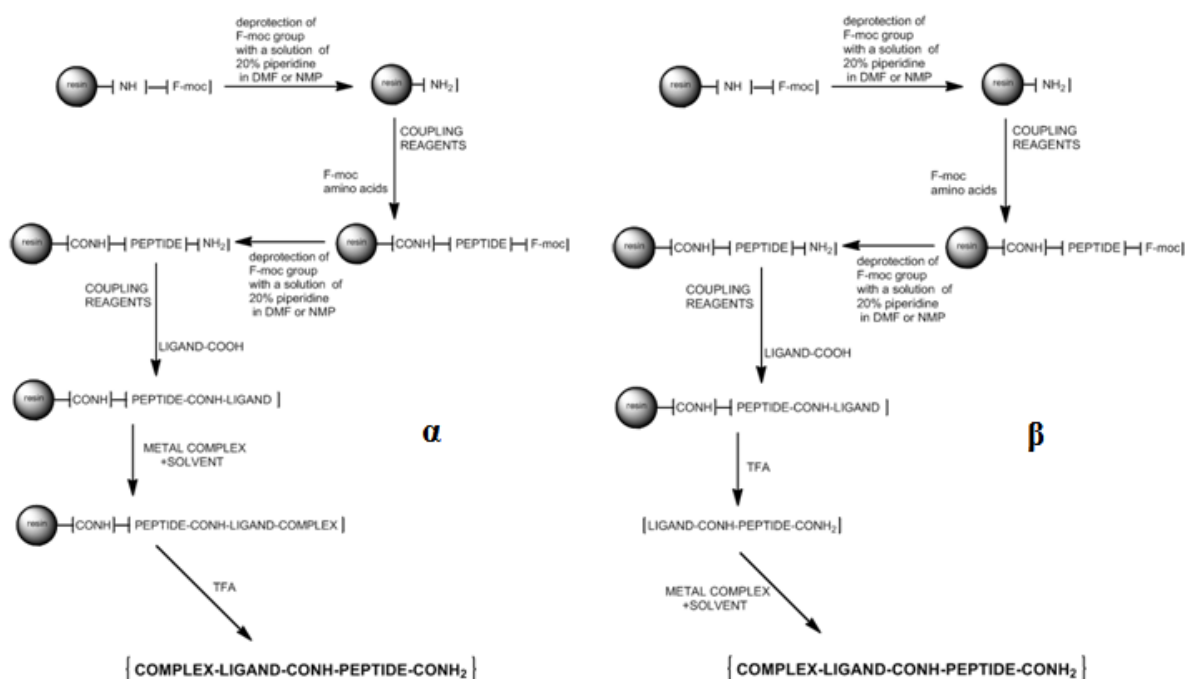
Ο δεύτερος τρόπος πραγματοποιείται με σύζευξη (coupling) του συμπλόκου με το αμινοξύ ή το πεπτίδιο σε υγρή φάση.

Ο τρίτος τρόπος είναι με τη σύζευξη (coupling) του μεταλλικού συμπλόκου στο πεπτίδιο που βρίσκεται ακινητοποιημένο πάνω στην ρητίνη.

Προχωρώντας θα παρατηρήσουμε ότι αν και οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικούς τρόπους σύνθεσης μεταλλοπεπτιδίων, συνήθως καταλήγουν σε ένα τρόπο που ταιριάζει περισσότερο στο προφίλ των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται. Λέγοντας προφίλ των αντιδράσεων εννοούμε τις παραμέτρους εκείνες που έχουν ως συνέπεια τη υψηλή απόδοση, σε συνάρτηση με την καθαρότητα του προϊόντος ή τις διαδικασίες καθαρισμού που απαιτούνται. Αρχικά θα κάνουμε μια αναλυτική παρουσίαση των συνθετικών πορειών που έχουν ακολουθηθεί μέχρι σήμερα, ξεκινώντας από την ένταξη του συζευγμένου με αμινοξέα ή πεπτίδια υποκαταστάτη πάνω στο μεταλλικό σύμπλοκο ή το μεταλλικό ιόν.

1.2.1. Ένταξη του υποκαταστάτη με το συζευγμένο πεπτίδιο ή αμινοξύ στο συμπλόκο.

Η διαδικασία ένταξης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε στερεή φάση (σχ. 1.1) είτε με αντίδραση σε υγρή φάση του συζευγμένου με αμινοξύ ή πεπτίδιο υποκαταστάτη, με το μεταλλικό σύμπλοκο (σχ.1.2)



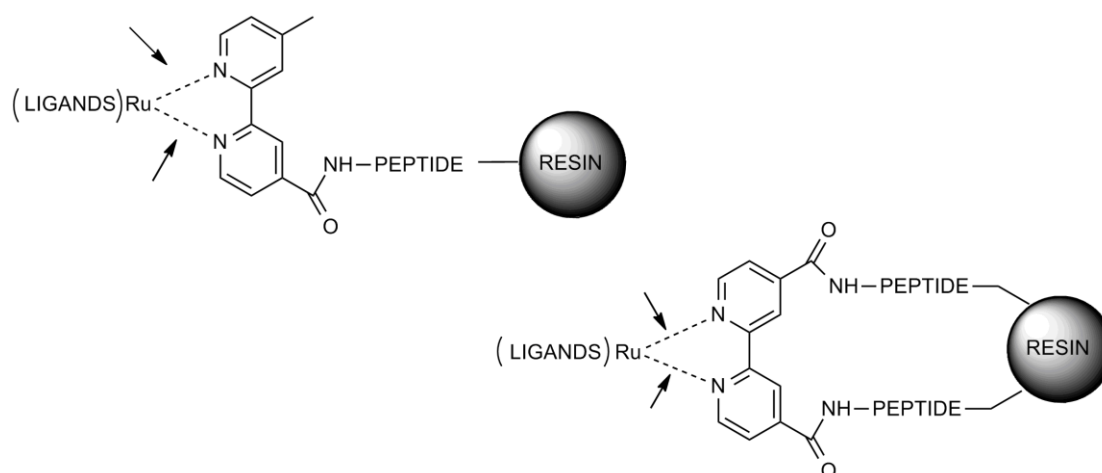
Σχήμα 1.1. (α) Συνθετική πορεία σχηματισμού μεταλλοπεπτιδίου μέσω ένταξης του υποκαταστάτη που φέρει συζευγμένο αμινοξύ ή πεπτίδιο στον μεταλλικό σύμπλοκο σε στερεά φάση.

Σχήμα 1.2. (β) Συνθετική πορεία σχηματισμού μεταλλοπεπτιδίου μέσω ένταξης του υποκαταστάτη που φέρει συζευγμένο αμινοξύ ή πεπτίδιο στο μεταλλικό σύμπλοκο σε υγρή φάση.

1.2.1.1. Ένταξη του συζευγμένου με πεπτίδιο ή αμινοξύ υποκαταστάτη, στο σύμπλοκο, σε στερεή φάση

Το εργαστήριο μας χρησιμοποιεί, στο πλείστο των περιπτώσεων [1-6], την στρατηγική ένταξης του συζευγμένου με αμινοξέα ή πεπτίδια υποκαταστάτη στο σύμπλοκο ο οποίος βρίσκεται ακινητοποιημένος πάνω στην ρητίνη. Κατά την διαδικασία αυτή το πεπτίδιο ή το αμινοξύ που βρίσκεται ακινητοποιημένο στην ρητίνη, συζευγνύεται με τον ολιγοπυριδινικό υποκατάστατη ο οποίος διαθέτει ελεύθερη καρβοξυλομάδα μέσω δημιουργίας αμιδικού δεσμού. Μετά την σύζευξη το ακινητοποιημένο σύστημα πεπτίδιο(αμινοξύ)-υποκαταστάτης

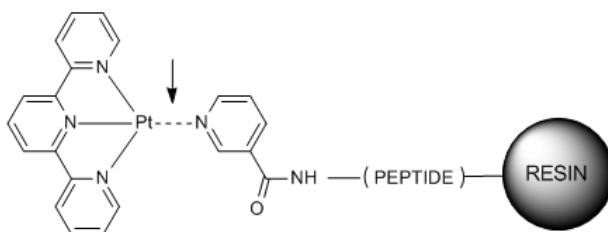
αντιδρά μέσω δεσμών ένταξης με το μεταλλικό κέντρο του συμπλόκου. Τα αντιδραστήρια σύζευξης που χρησιμοποιούνται για την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας είναι το PyBOP ή το HCTU παρουσία DIPEA. Οι διαλύτες ποικίλουν ανάλογα με την διαλυτότητα του συμπλόκου και η απομάκρυνση των F-moc ομάδων γίνεται με ένα διάλυμα πιπεριδίνης 20% σε DMF ή NMP. Το τελικό κόψιμο του συμπλόκου από την ρητίνη γίνεται με διάλυμα TFA/H₂O (95%/5%). Η ίδια διαδικασία σύνθεσης του συμπλόκου [Ru(bpy)₂(4-CO₂H-4'-Mebpy)] συζευγμένο με το διπεπτίδιο προλίνο-ιστιδίνη ακολουθείται και στη συνθετική πορεία του άρθρου [7]. Στις εργασίες [1, 2, 4] ένα πεπτιδικό μόριο συζευγνύεται με τον διδοντικό υποκαταστάτη 4-CO₂H-4'-Mebpy μέσω της μοναδικής καρβοξυλομάδας του, ενώ στις εργασίες [5, 6] ο διδοντικός υποκαταστάτης 4,4'-(CO₂H)₂-bpy διαθέτει δυο καρβοξυλομάδες, οπότε συζευγνύονται δύο μόρια αμινοξέων, ένα σε κάθε καρβοξυλομάδα με τη δημιουργία δύο αμιδικών δεσμών (σχ.1.3)



Σχήμα 1.3. Ένταξη του ακινητοποιημένου πάνω στην ρητινή υποκαταστάτη στο σύμπλοκο.

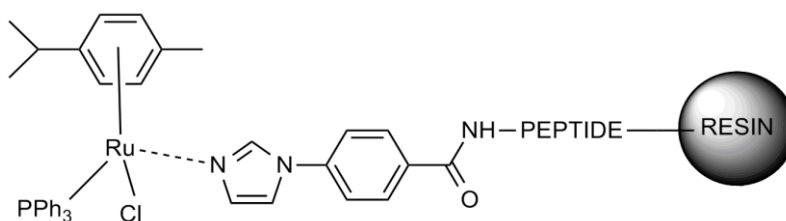
Στα παραπάνω μόρια το ακινητοποιημένο σύστημα υποκαταστάτη-πεπτίδιο εντάσσεται διδοντικά μέσω των δυο πυριδινικών αζώτων στο Ru(II), ενώ στην εργασία [3] το σύστημα υποκαταστάτη-πεπτίδιο εντάσσεται μονοδοντικά, καθώς ο συζευγμένος υποκαταστάτης με το πεπτίδιο διαθέτει ένα μόνο πυριδινικό άζωτο. Στην τελευταία περίπτωση τροποποιήθηκαν ελαφρώς οι

συνθήκες κατά την αντίδραση ένταξης για δύο κυρίως λόγους. Ο πρώτος λόγος σχετίζεται με την αργή κινητική του Pt(II) σε σχέση με τις αντιδράσεις του Ru(II) και ο δεύτερος σχετίζεται με την σταθερότητα του πενταμελούς χηλικού δακτυλίου. Έτσι απαιτήθηκε (α) αύξηση της θερμοκρασίας στους 70 °C και (β) αύξηση του χρόνου της αντίδρασης στις 48 ώρες (σχ. 1.4).



Σχήμα 1.4. Ένταξη του ακινητοποιημένου πάνω στην ρητινή υποκαταστάτη στο σύμπλοκο.

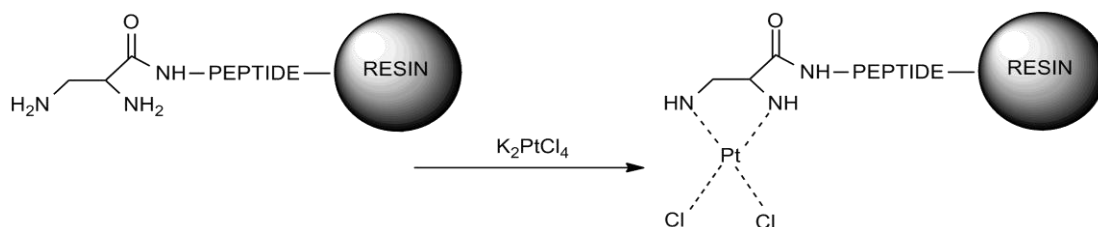
Γενικά, αν και οι αντιδράσεις ένταξης ευνοούνται από την θερμοκρασία και το χηλικό φαινόμενο, η ένταξη μεταλλικών συμπλόκων στη ρητίνη περιορίζεται από τη θερμοκρασία που δεν μπορεί να ξεπερνά τους 70 °C, διότι σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες οι περισσότερες ρητίνες καταστρέφονται. Πρόσφατα η σύνθεση των αντικαρκινικών οργανομεταλλικών συμπλόκων του Ru(II) με αρένια, οδήγησε στην ανάγκη δημιουργίας μεταλλοπεπτιδίων, όπως στην περίπτωση του πιο κάτω συμπλόκου [8], όπου η ένταξη του υποκαταστάτη γίνεται μονοδοντικά από το ημιδαζολικό άζωτο του 4-ημιδαζολ-1-υλ-βενζοϊκού οξέος που συζευγνύεται με πεπτίδιο της οκταετρίδης ακινητοποιημένο στη ρητίνη (σχ. 1.5).



Σχήμα 1.5. Ένταξη του ακινητοποιημένου πάνω στην ρητινή υποκαταστάτη στο σύμπλοκο.

Ανάλογη συνθετική στρατηγική ακολουθείται σε δυο ακόμα δημοσιεύσεις [9, 10], με την ένταξη υποκαταστάτη, ο οποίος δεν διαθέτει δότες άτομα αζώτου

σε αρωματικό δακτύλιο, όπως η αιθυλενοδιαμίνη. Έτσι ένα παράγωγο της αιθυλενοδιαμίνης συζευγμένο με ένα πεπτίδιο μέσω αμιδικού δεσμού εντάσσεται στο σύμπλοκο του λευκόχρυσου $[PtCl_4]^{2-}$ (σχ. 1.6).



Σχήμα 1.6. Ένταξη του ακινητοποιημένου πάνω στην ρητινή υποκαταστάτη στο μεταλλικό ιόν.

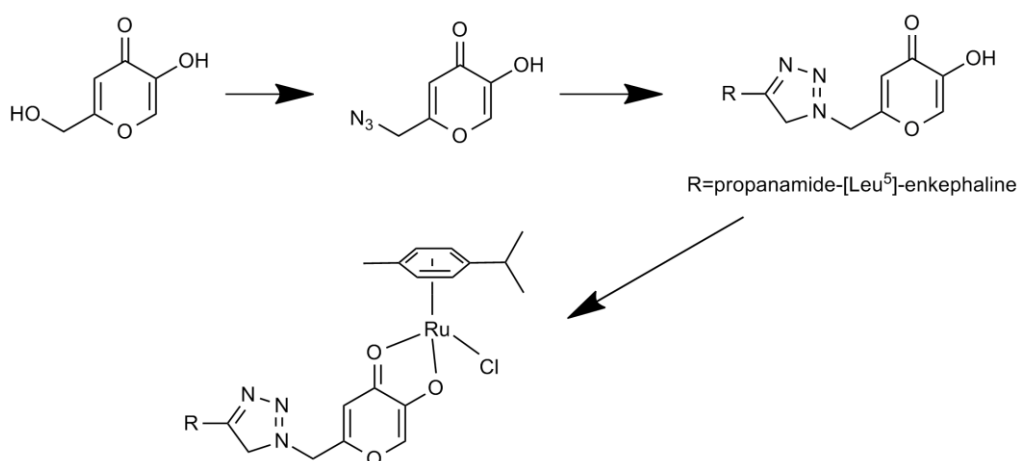
1.2.1.2. Ένταξη του συζευγμένου με πεπτίδια ή αμινοξέα υποκαταστάτη στο σύμπλοκο, σε υγρή φάση.

Οι δυσκολίες που αντιμετωπίζονται στη στερεή φάση, κυρίως ο περιορισμός της θερμοκρασίας, αίρονται εν μέρει με μια άλλη στρατηγική όπου το πεπτίδιο με τον συζευγμένο υποκαταστάτη κόβονται από την ρητίνη και εν συνεχεία αντιδρούν με το μεταλλικό σύμπλοκο ή το μεταλλικό ιόν είτε σε υψηλές γενικά θερμοκρασίες είτε με χρήση μικροκυμάτων [11] σε υγρή φάση.

Ο V. Marchan και οι συνεργάτες του, ασχολήθηκαν και με τους δυο τρόπους σύνθεσης μεταλλοπεπτιδίων [11], δοκιμάζοντας μια σειρά από διαφορετικές συνθήκες, με σκοπό την βελτίωση της απόδοσης της αντίδρασης. Η μονοδοντική ένταξη μέσω του πυριδινικού αζώτου του 4-πυριδίνυλ-οξικού οξέος, το οποίο συζευγνύεται μέσω αμιδικού δεσμού με ένα δικάρβο-ανάλογο της οκτρεοτίδης (οκταπεπτίδιο το οποίο μιμείται την φυσική σωματοστατίνη) ή του τριπεπτιδίου Arg-Gly-Asp, και του συμπλόκου $[(\eta^6-p-cym)Ru(bmp)(H_2O)]^{2+}$ (bmp=2,2'-διπυριμιδίνη) πραγματοποιήθηκε τελικώς σε υγρή φάση αφού κατά την επίδραση του TFA στην ρητίνη, για το κόψιμο του συμπλόκου, το

μονοδοντικά ενταγμένο σύστημα υποκαταστάτη-πεπτιδίου αποδεσμευόταν και αυτό από το μεταλλικό κέντρο του Ru(II).

Πολλές εργασίες αναφέρονται στην απευθείας σύνθεση μεταλλοπεπτιδίων με αντίδραση σε υγρή φάση, μεταξύ του συμπλόκου και του υποκαταστάτη που είναι συζευγμένος με κάποιο πεπτίδιο [12-17]. Η ένταξη μονοδοντικών πυριδινικών υποκαταστατών [13, 17] πραγματοποιείται κατά κανόνα σε υγρή φάση αποφεύγοντας το κόστιμο από την ρητίνη για τους λόγους που προαναφέραμε, ενώ σε άλλες περιπτώσεις (βλ. πίν. Σ1.13, 14, 15 παρ.) χρησιμοποιούνται διδοντικοί πυριδινικοί υποκαταστάτες [12, 14, 16]. Στις δυο από αυτές τις εργασίες [12, 16], το σύμπλοκο *cis*-Ru(bpy)₂Cl₂ αντιδρά με ένα τροποποιημένο διπυριδινικό υποκατάστατη συζευγμένο με αμινοξέα, χηλικά μέσω των δυο πυριδινικών αζώτων, ενώ σε μια ανάλογη περίπτωση [18] ως αρχικό σύμπλοκο χρησιμοποιείται το *cis*-Ru(phen')₂Cl₂ (βλ. πίν. Σ1.17 παρ.). Η υγρή φάση ως συνθετική στρατηγική χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση [14] όπου ένα οργανομεταλλικό σύμπλοκο του Ru(II) του τυπου (η⁶-*p*-cym)Ru(L)Cl (L = 2-(αζίδομέθυλ)-5-ύδροξυ-4H-πυράνιο-4), συζευγνύεται μέσω του L με το τροποποιημένο πεπτίδιο της εγκεφαλίνης [Leu⁵]-εγκεφαλίνη με σκοπό τη δημιουργία ενός μεταλλοπεπτιδίου ικανού να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Η σύνθεση πραγματοποιείται με χημική τροποποίηση της ομάδας του μεθυλοαζιδίου του L από ένα N-τερματικό αλκίνο-παράγωγο του νευροπεπτιδίου της [Leu⁵]-εγκεφαλίνης. Η κυκλοποίηση του αζιδίου γίνεται με τη καταλυτική δράση Cu(I) (σχ. 1.7).



Σχήμα 1.7. Σύνθεση του 2-(αζιδομεθυλ)-5-ύδροξυ-4H-πυράνιο-4) και δημιουργία του μεταλλικού συμπλόκου.

Έτσι η αντίδραση περιλαμβάνει την κυκλοποίηση του αζιδίου και κατόπιν την σύζευξη του πεπτιδίου στον L σε στερεή φάση. Στην συνέχεια το σύστημα L-πεπτίδιο αντιδρά με το σύμπλοκο του Ru(II) σε ξηρή μεθανόλη, δρώντας διδοντικά μέσω των δυο οξυγόνων του δακτυλίου του πυρενίου παράγοντας το τελικό σύμπλοκο (βλ. πίν. Σ1.15 παρ.).

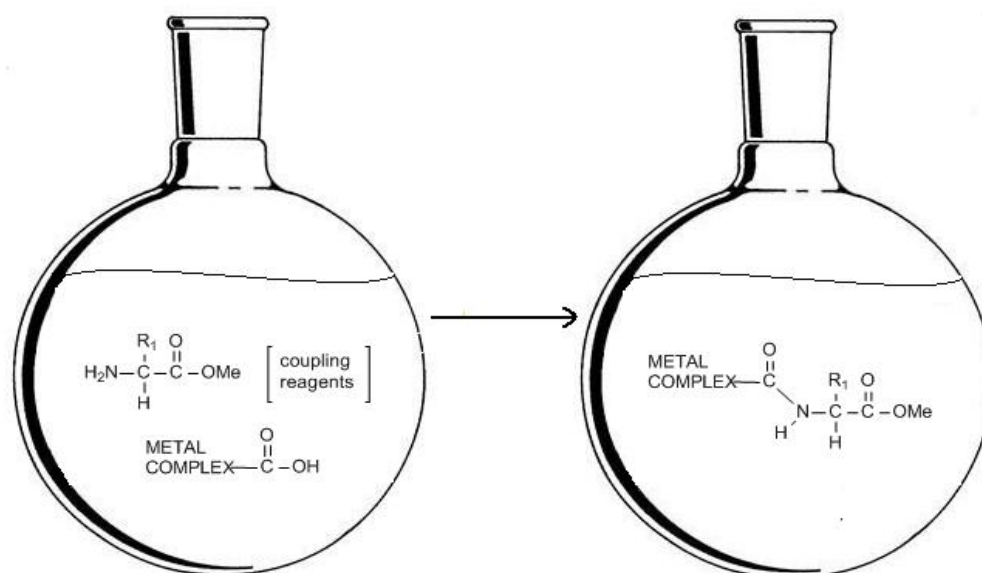
Η στρατηγική της σύνθεσης σε υγρή φάση χρησιμοποιείται και σε περιπτώσεις όπου η σύνθεση σε ρητίνη είναι ανέφικτη λόγω της φύσης του συμπλόκου. Στην εργασία [15] ένα φερροκένιο, όπου τροποποιείται με καρβοξυλομάδα το ένα κυκλοπενταδιένιο, συζευγνύεται μέσω ενός αμιδικού δεσμού με την αλανίνη του διπεπτιδίου Ala-Pro, όπου στο τελικό άκρο της προλίνης υπάρχει μια πυριδίνη. Το σύμπλοκο αυτό, αντιδρά σε αναλογία 4:1 με το $[Pd(MeCN)_4](BF_4)_2$, λαμβάνοντας ένα τετραγωνικό σύμπλοκο του Pd(II) με τέσσερις υποκαταστάτες φερροκενίου, ενταγμένους από το πυριδινικό άζωτο του υποκατάστατη (βλ. πίν. Σ1.16 παρ.). Μια τέτοια περίπτωση καθιστά αδύνατη την ένταξη του συμπλόκου στη ρητίνη, καθώς το τελικό άκρο του υποκατάστατη, δηλαδή το φερροκένιο, δεν διαθέτει θέση πρόσδεσης στην ρητίνη και συνεπώς η σύνθεση σε υγρή φάση αποτελεί μονόδρομο.

1.2.2. Σύζευξη πεπτιδίων ή αμινοξέων με το μεταλλικό σύμπλοκο μέσω αμιδικού δεσμού.

1.2.2.1 Σύζευξη πεπτιδίων ή αμινοξέων με το μεταλλικό σύμπλοκο μέσω αμιδικού δεσμού στην υγρή φάση.

Η σύνθεση πεπτιδίων σε υγρή φάση (σε διάλυμα) ήταν η βάση εκκίνησης και ανάπτυξης της πεπτιδικής σύνθεσης από την επιστημονική κοινότητα και επιπροσθέτως έθεσε το θεωρητικό και πειραματικό υπόβαθρο για την μετάβαση στην μετέπειτα ευρεία χρήση της SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis). Αν και τα τελευταία χρόνια το μεγαλύτερο μέρος της πεπτιδικής σύνθεσης γίνεται πάνω σε μια ρητίνη λόγω της ευκολίας και της υψηλής καθαρότητας των λαμβανόμενων προϊόντων, υπάρχουν περιπτώσεις που προτιμάται η σύνθεση σε υγρή φάση. Οι περιπτώσεις αυτές είναι λίγες και έχουν να κάνουν κυρίως με το κόστος, το μέγεθος της κλίμακας παρασκευής και την συνθετική μεθοδολογία. Η σύνθεση σε υγρή φάση χρησιμοποιείται σήμερα σε βιομηχανική κλίμακα για την σύνθεση μικρών πεπτιδίων (διπεπτιδίων και τριπεπτιδίων) πρωτίστως λόγω του χαμηλού κόστους της (αφού δεν χρειάζεται η χρήση υποστρώματος ρητίνης) και δευτερεύοντος διότι δεν απαιτούνται πολλά στάδια καθαρισμού (κατά την σύζευξη κάθε αμινοξέος στην πεπτιδική αλυσίδα χρειάζεται ένα στάδιο καθαρισμού με κάπου είδους χρωματογραφική τεχνική). Μια επιπλέον δυσκολία που προκύπτει με την σύνθεση υγρής φάσης εμπίπτει στην ανάγκη προστασίας και αποπροστασίας των κάθε φορά αντιδρώντων ώστε να κατευθύνουμε την πεπτιδική σύνθεση στο επιθυμητό προϊόν. Αρχικά για την σύνθεση ενός διπεπτιδίου χρειάζεται να προστατέψουμε το κάρβοξυ-ακρο ενός αμινοξέος με κάποιο είδος εστέρα (μεθυλικό, αλλυλικό κλπ) και το αμινικό ή τα αμινικά τμήματα του άλλου αμινοξέος στο πλείστο των περιπτώσεων με Boc και Fmoc ομάδες. Τα αντιδραστήρια σύζευξης που χρησιμοποιούνται μπορούν να είναι όμοια με αυτά της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση αν και το συνηθέστερα χρησιμοποιημένο αντιδραστήριο για την ενεργοποίηση της

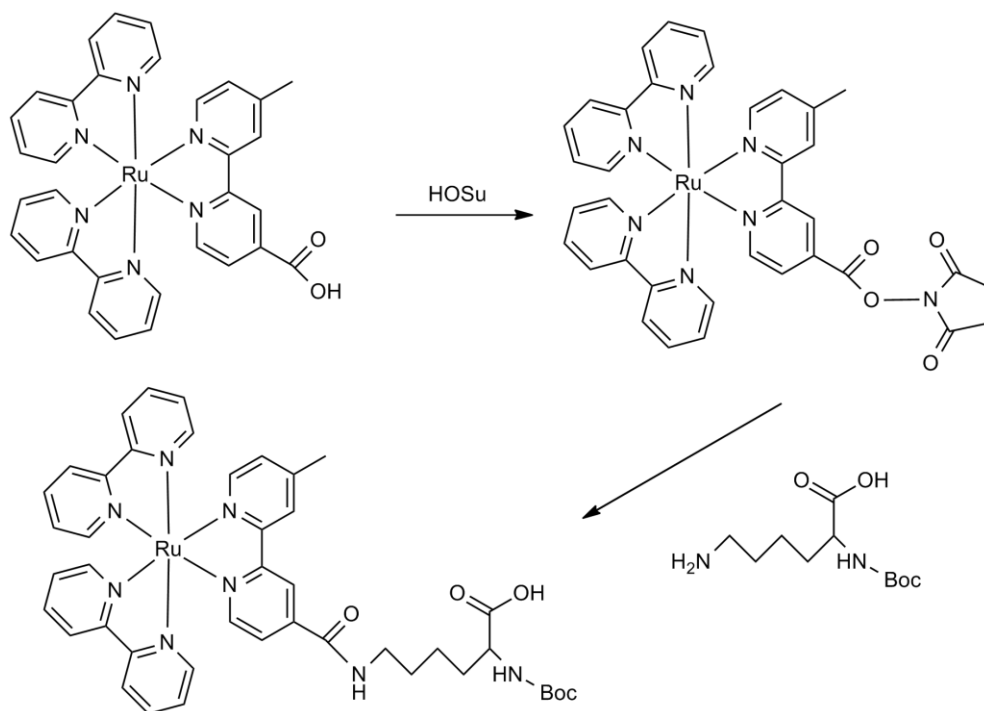
καρβοξυλομάδας είναι το σουκιναμίδιο. Παρόλο τον παροπλισμό της από την αντίστοιχη σε στερεά φάση, η σύνθεση σε διάλυμα παραμένει ως μια εναλλακτική τεχνική ανάπτυξης πεπτιδίων στα χεριά των επιστημόνων και της βιομηχανικής παραγωγής.



Από την δεκαετία του 80 η πεπτιδική σύνθεση πάνω σε μεταλλικά σύμπλοκα, κυρίως του Pt(II) και Pd(II), αναπτύχθηκε με τις πρωτοπόρες δημοσιεύσεις της ομάδας του W. Beck, όπου το αμινοξύ εντάσσεται στο μεταλλικό κέντρο από την αμινομάδα και η πεπτιδική σύνθεση πραγματοποιείται με επιμήκυνση του τελικού καρβοξυ άκρου του [19].

Όμως η πρώτη σύζευξη αμινοξέος πάνω σε μεταλλικό σύμπλοκο με κορεσμένη σφαίρα ένταξης πραγματοποιήθηκε το 1991 από τον B. Peek [20] (σχ. 1.8) Στην εργασία αυτή μία λυσίνη συζευγνύεται με το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)_2$ από την αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας καθώς το έτερο αμινικό άκρο της ήταν προστατευμένο με μια Boc ομάδα. Η σύζευξη γίνεται με αμιδικό δεσμό με τον υποκαταστάτη του συμπλόκου, 4-CO₂H-4'-

Mebpy ο οποίος διαθέτει ελεύθερη καρβοξυλομάδα. Η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας γίνεται με HOSu και DCC (σχ. 1.8).

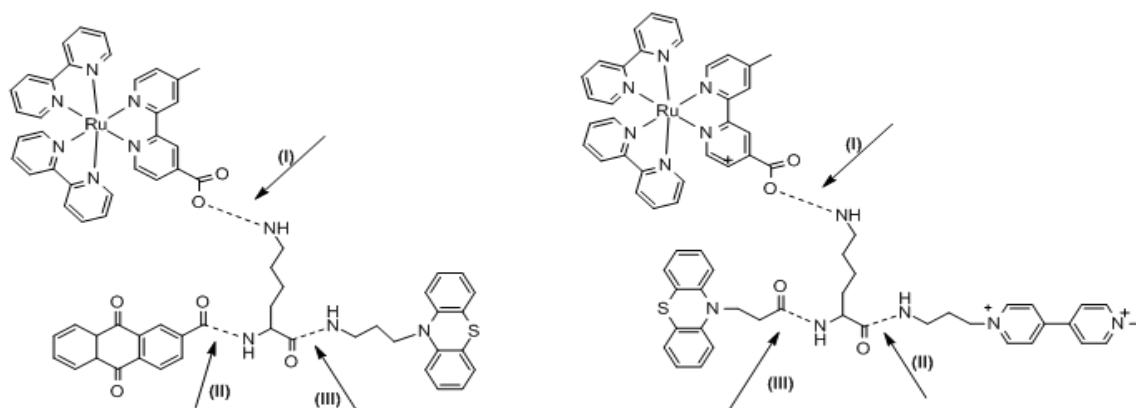


Σχήμα 1.8. Σύνθεση του πρώτου συζευγμένου μεταλλοπεπτιδίου.

Αναλυτικότερα, σε διάλυμα ακετονιτριλίου που περιείχε το αρχικό σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)_2$ προστέθηκε HOSu. Το σύμπλοκο με την ενεργοποιημένη καρβοξυλομάδα, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{Su-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)_2$ απομονώθηκε και προστέθηκε σε ένα διάλυμα προστατευμένης λυσίνης σε DMF για τη δημιουργία του τελικού συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CONH(Lys)(Boc)-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)_2$ με αντιδραστήριο σύζευξης το DCC.

Ένα ανάλογο σύμπλοκο του οσμίου [21] συντέθηκε από την ίδια ερευνητική ομάδα με μικρή τροποποίηση της παραπάνω μεθοδολογίας. Το αρχικό σύμπλοκο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ανάλογο του Ru(II), $[\text{Os}(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)_2$ (βλ πίν. Σ2.2 παρ.) [21] ενώ ως αντιδραστήρια σύζευξης χρησιμοποιήθηκαν τα BOP, HOBT, NMM και το DMAP και η σύζευξη πραγματοποιήθηκε σε ένα στάδιο. Το σύμπλοκο, το αμινοξύ Boc(Lys)OCH₃ και τα αντιδραστήρια σύζευξης εισάγονται ταυτόχρονα στο ίδιο διάλυμα. Εδώ

χρειάστηκε να προστατευτεί με εστεροποίηση η καρβοξυλομάδα της λυσίνης ώστε να μη ενεργοποιηθεί και αυτή μαζί με την καρβοξυλομάδα του μεταλλικού συμπλόκου, καθώς δεν γίνεται απομόνωση του ενεργοποιημένου συμπλόκου. Όπως θα αναλύσουμε στην συνέχεια πολλά εργαστήρια στηρίχτηκαν στον τρόπο σύζευξης σε υγρή φάση αφού ο συγκεκριμένος τρόπος σε αρκετές περιπτώσεις, είναι μονόδρομος λόγω της φύσης του υποκαταστάτη [22, 23]. Σε δύο ακόμη αναφορές του Peek δυο παράγωγα της λυσίνης συζευγνύονται με το σύμπλοκο $[Ru(bpy)_2(4-CO_2H-4'-Me bpy)](PF_6)_2$ μέσω αμιδικού δεσμού με την αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης. Και στην περίπτωση αυτή η σύνθεση στην υγρή φάση αποτελεί μονόδρομο καθώς τόσο η καρβοξυλομάδα όσο και αμινομάδα του Ca της λυσίνης, συνδέονται με τις οργανικές ομάδες παραγώγων της φαινοδιαζίνης μέσω αμιδικών δεσμών. Συνεπώς δεν υπάρχει άλλο ελεύθερο άκρο για να συνδεθεί στην ρητίνη (σχ. 1.9).

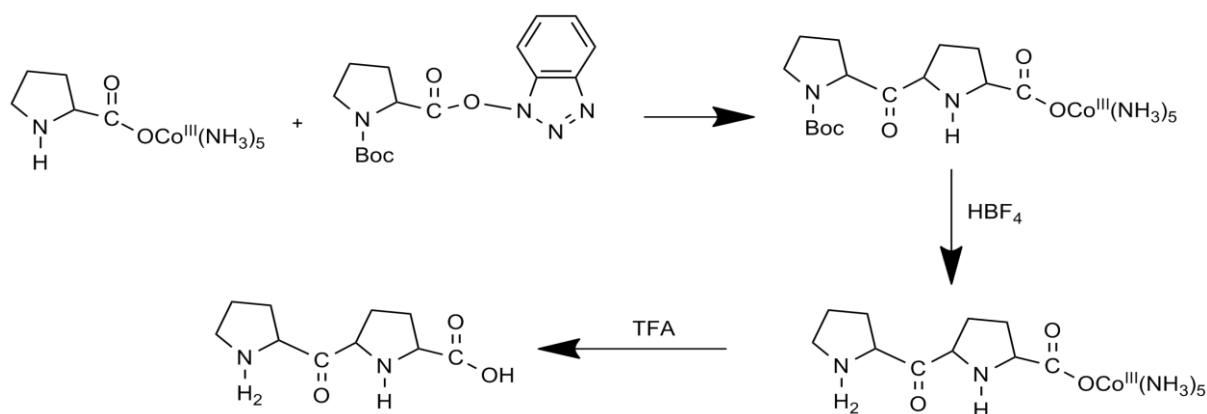


Σχήμα 1.9. Συνθετική πορεία δημιουργίας μεταλλοπεπτιδίων με παράγωγα της φαινοδιαζίνης.

Ένα ανάλογο σύμπλοκο μπορεί να συντεθεί και με μια εναλλακτική πορεία από εκείνη των αναφορών [22, 23], δηλαδή να συζευχθεί η λυσίνη πάνω στην οργανική μονάδα και ύστερα να ακολουθήσει η σύζευξη πάνω στο μεταλλικό σύμπλοκο όπως παρουσιάζεται στην αναφορά [24].

Σε μια άλλη συνθετική πορεία [25] το καρβοξύλιο του συμπλόκου του ρουθηνίου $[Ru(bpy)_2(4-CO_2H-4'-Me bpy)]^{2+}$ ενεργοποιείται με DIC και HOBt σε

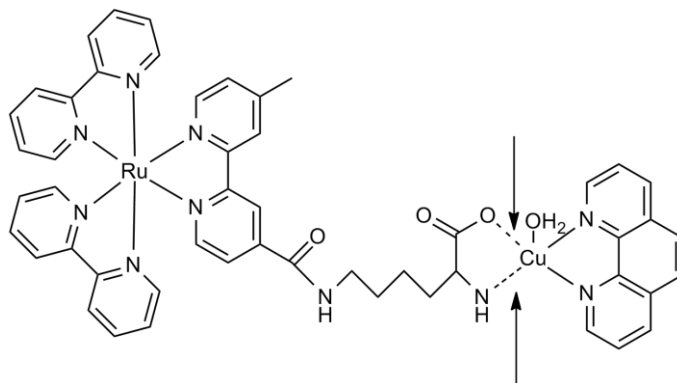
DMF και στην συνέχεια συζευγνύεται με το διπεπτίδιο Pro-Pro, όπου η καρβοξυλομάδα της τελικής προλίνης είναι προστατευόμενη με το σύμπλοκο του κοβαλτίου ($-\text{Co}(\text{NH}_3)_5$). Η προστασία της καρβοξυλομάδας των αμινοξέων στις περισσότερες περιπτώσεις πραγματοποιείται με εστεροποίηση με κάποια μεθυλική, ή εν γένει αλλυλική ομάδα, ή με χρήση άλλων οργανικών ομάδων όπως αναφέρεται αναλυτικά στην εργασία [26]. Στην βιβλιογραφία δεν συναντάται συχνά η προστασία των καρβοξυλομάδων με χρήση ανόργανων συμπλόκων όπως αυτό του κοβαλτίου [25] (σχ. 1.10). Η προστατευτική ομάδα του καρβοξυλίου της προλίνης απομακρύνεται με διάλυμα TFA και στην συνέχεια συζευγνύεται μια 9-άμινο-ακριδίνη με τη δημιουργία αμιδικού δεσμού.



Σχήμα 1.10. Συνθετική πορεία δημιουργίας του διπεπτιδίου προλίνης με προστασία της καρβοξυ ομάδας με το πεντάαμινο σύμπλοκο του κοβαλτίου.

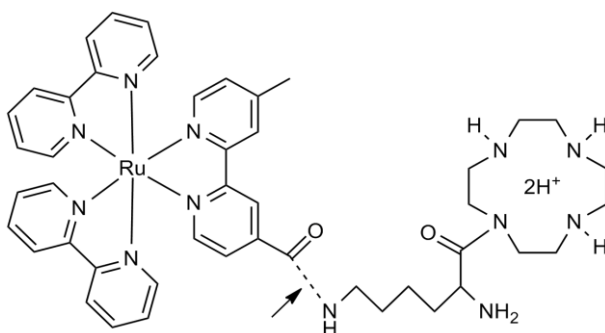
Ο R. Alsfaser οι συνεργάτες του έχουν ασχοληθεί διεξοδικά με την σύνθεση συμπλόκων του ρουθηνίου συζευγμένα με πεπτίδια ή αμινοξέα. Στις περισσότερες εργασίες [24, 27-29] το αρχικό σύμπλοκο που συζευγνύεται με πεπτίδια ή αμινοξέα είναι το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)_2$. Στις εργασίες [27, 28] συντίθενται ένα σύμπλοκο του τύπου $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CONH(Lys)-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)_2$, όπου η ένταξη της λυσίνης γίνεται από την αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας με την ίδια συνθετική πορεία που πρότεινε ο Peek. Στην εργασία [29] το αρχικό σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)_2$ συζευγνύεται για μια ακόμη φορά με μια λυσίνη από την αμινομάδα της

πλευρικής αλυσίδας, πλην όμως στη συνέχεια σχηματίζεται ένα διπυρηνικό ετερομεταλλικό σύμπλοκο Ru(II)-Cu(II) με την χηλική ένταξη στο αμινοξικό άκρο της λυσίνης ενός συμπλόκου του Cu(II) (σχ. 1.11) με φαιναθρολίνη.



Σχήμα 1.11. Δημιουργία διπυρηνικού ετερομεταλλικού συμπλόκου Ru(II)-Cu(II).

Σε αντίθεση με τη συνθετική πορεία που ακολουθείται στην αναφορά [29], στην εργασία [24] η λυσίνη ενώνεται με ένα μακροκυκλικό οργανικό μόριο, παράγωγο του 1,4,7,10-τέτρα-αζο-κυκλοδεκανίου, και εν συνεχεία το σύστημα αυτό ενώνεται μέσω αμιδικού δεσμού με την ενεργοποιημένη καρβοξυλομάδα του μεταλλικού συμπλόκου από την αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης (σχ. 1.12) Η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του συμπλόκου $[Ru(bpy)_2(4-CO_2H-4'-Me bpy)](PF_6)_2$ πραγματοποιείται με HOSu και η σύζευξη με DCC.



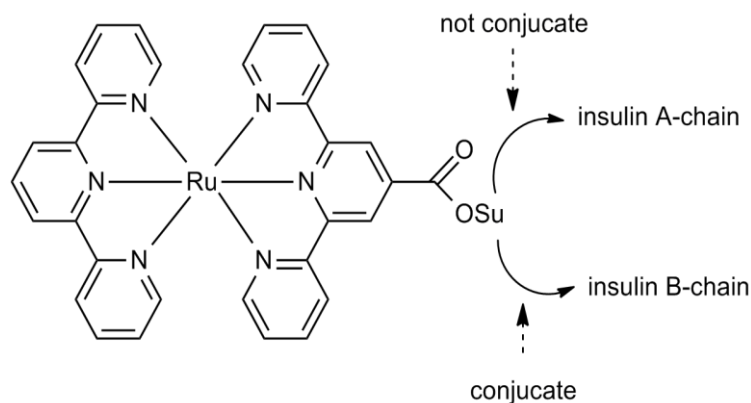
Σχήμα 1.12. Δημιουργία διπυρηνικού ετερομεταλλικού συμπλόκου Ru(II)-Cu(II).

Η T. Keyes και η ομάδα της έχουν συνθέσει και μελετήσει αρκετά μεταλλοπεπτίδια. Συνήθως ο τρόπος σύζευξης που ακολουθείται είναι η

σύζευξη του συμπλόκου πάνω στην ρητίνη, μια διαδικασία που θα αναλύσουμε διεξοδικά σε επόμενη ενότητα. Όμως, σε μια πρόσφατη εργασία της [30] αναφέρει την σύζευξη του πεπτιδίου με το μεταλλικό σύμπλοκο σε υγρή φάση. Τα δυο σύμπλοκα του ρουθηνίου (βλ. πίν. Σ2.10,11 παρ.) που συνθέτονται διαφοροποιούνται ως προς τους συμπληρωματικούς υποκαταστάτες που εξασφαλίζουν τον κορεσμό στην σφαίρα ένταξης του μετάλλου και δεν συζευγνύονται με το πεπτίδιο. Η καρβοξυλομάδα του μεταλλικού συμπλόκου ενεργοποιείται με σουκιναμίδιο, ενώ το DCC χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο σύζευξης.

Στην υγρή φάση με ενεργοποιημένες τις δύο καρβοξυλομάδες του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-}4'\text{-(CO}_2\text{H)}_2\text{bpy})]$ με σουκιναμίδιο, πραγματοποιείται η σύζευξη του οκταπεπτιδίου Cys-His-Ser-Ser-Lys-Leu-Glu-Lys από τον Q1 και τους συνεργάτες του. Ο τελικός διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης επιτυγχάνεται με χρωματογραφικές μεθόδους [31]. Η οξείδωση με διαλύματα $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$, μεταλλοπεπτιδίων του Ru(II), οδηγεί σε αντίστοιχα μεταλλοπεπτίδια του Ru(III). Έτσι το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{pheN})(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ όπου pheN = 1,10-φαινανθρολινο-μαλεΐναμίδιο, συζευγνύεται με μια σειρά πεπτιδίων και στη συνέχεια οξειδώνεται στα αντίστοιχα μεταλλοπεπτίδια του Ru(III) [32].

Την απομόνωση του ενδιάμεσου ενεργοποιημένου συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(4\text{-CO}_2\text{Su-trpy})]$ εκμεταλλεύτηκε μια ομάδα Ιαπώνων ερευνητών για να συνθέσει ένα σύμπλοκο του ρουθηνίου συζευγμένο με ινσουλίνη [33] (σχ. 1.13). Έτσι μετά την ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας το σύμπλοκο προστέθηκε σε ένα μείγμα αλυσίδων A και B ινσουλίνης. Η ινσουλίνη περιέχει A και B αλυσίδες, όπου η A αλυσίδα περιέχει δυο όξινα και καθόλου βασικά αμινοξέα σε αντίθεση με τη B αλυσίδα που περιέχει δυο όξινα και τέσσερα βασικά αμινοξέα συμπεριλαμβανομένης και μιας λυσίνης.



Σχήμα 1.13. Σύζευξη μεταλλικού συμπλόκου με την Β-αλυσίδα της ινσουλίνης

Η ινσουλίνη διαθέτει ελεύθερη αμινομάδα στην πλευρική αλυσίδα της και συνεπώς μπορεί να συζευχθεί με το ενεργοποιημένο σύμπλοκο. Αυτό έχει ως συνέπεια μόνο η Β αλυσίδα της ινσουλίνης να μπορεί να συζευχθεί με το σύμπλοκο του Ru(II), ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί στο δείγμα.

Σε δυο ακόμα εργασίες [34, 35] ο M. Ogawa και οι συνεργάτες του, που έχουν ασχοληθεί εκτενώς με το φαινόμενο μεταφοράς ηλεκτρονίου (E.T), συνέθεσαν τα διπυρηνικά μεταλλοπεπτίδια Ru(II)-Co(III) και Ru(II)-Ru(III), $[(bpy)_2Ru^{II}L-(Pro)_n-Co^{III}(NH_3)_5]^{4+}$ και $[(bpy)_2Ru^{II}L-(Pro)_n-His-Ru^{III}(NH_3)_4]^{4+}$ όπου $L = 4-CO_2H-4'-Mebpy$. Η σύζευξη των συμπλόκων $[Ru(bpy)_2(L)]^{2+}$ στο σύμπλοκο του κοβαλτίου με το πεπτίδιο της προλίνης και του Ru(III) με την ιστιδίνη αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε με χρήση των αντιδραστηρίων σύζευξης DIC και HOBt σε υγρή φάση. Ακόμα μια περίπτωση σύζευξης σε υγρή φάση παρουσιάζεται στην εργασία [36] με ένα τετραγωνικό σύμπλοκο του Pt(II) με ένα παράγωγο της πορφυρίνης που διαθέτει τέσσερις καρβοξυλομάδες, μερικώς ή πλήρως εστεροποιημένες, ανάλογα με το πόσες από αυτές επιθυμούσαν να συζευχθούν με διάφορα αμινοξέα.

1.2.2.2. Σύζευξη πεπτιδίων ή αμινοξέων με το μεταλλικό σύμπλοκο μέσω αμιδικού δεσμού σε στερεή φάση.

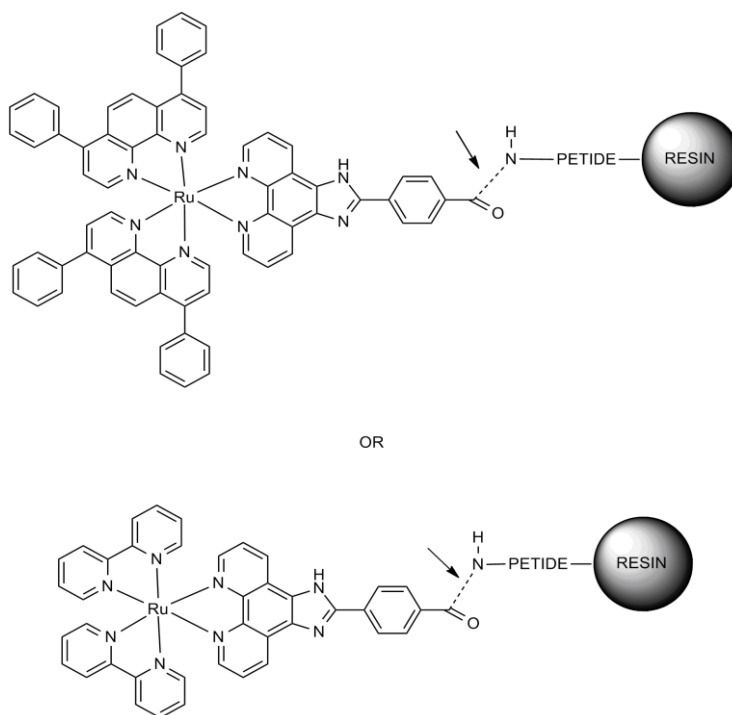
Τα τελευταία χρόνια η σύζευξη του μεταλλικού συμπλόκου πάνω στην ρητίνη, ως συνθετική μέθοδος, κερδίζει όλο και περισσότερο την εύνοια των ερευνητικών ομάδων όπως φαίνεται και από το πλήθος των εργασιών που δημοσιεύονται. Δυο είναι οι κύριοι λόγοι που η μεθοδολογία αυτή πλεονεκτεί σε σχέση με τους προαναφερθέντες τρόπους σύνθεσης μεταλλοπεπτιδίων, δηλαδή έναντι της μεθόδου ένταξης του ήδη συζευγμένου με αμινοξύ ή πεπτίδιο υποκαταστάτη στο σύμπλοκο πάνω στην ρητίνη και έναντι της μεθόδου σύζευξης πεπτιδίων ή αμινοξέων με το μεταλλικό σύμπλοκο σε υγρή φάση. Ο πρώτος λόγος, οφείλεται στην καθαρότητα των προϊόντων που απομονώνονται σε σύγκριση με την υγρή φάση και ο δεύτερος, στις ήπιες συνθήκες που απαιτούνται για να πραγματοποιηθεί η σύζευξη σε σχέση με την ένταξη του συμπλόκου πάνω στην ρητίνη όπου υπάρχει ο περιορισμός της θερμοκρασίας. Η σύζευξη του μεταλλικού συμπλόκου πάνω στην ρητίνη πραγματοποιείται με τα ίδια αντιδραστήρια που πραγματοποιείται και η κοινή πεπτιδική σύνθεση και η θερμοκρασία που απαιτείται δεν χρειάζεται να υπερβαίνει την θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου εντοπίζεται στην μικρή απόδοση, που σπανία ξεπερνά το 20% [37] και η οποία οφείλεται στο θετικό φορτίο των κατιονικών συμπλοκών που απωθούνται από την θετικά φορτισμένη ρητίνη, εμποδίζοντας την προσέγγιση ή σε στερεοχημικές παρεμποδίσεις που προκαλούνται από το μέγεθος του συμπλόκου. Σε αυτού του τύπου την σύζευξη το καρβοξύλιο του μεταλλικού συμπλόκου ενεργοποιείται και το μεταλλικό σύμπλοκο συνδέεται με την ελεύθερη αμινομάδα του αμινοξέος ή του πεπτιδίου, που βρίσκεται ακινητοποιημένο στην ρητίνη, μέσω πεπτιδικού δεσμού.

Στο εμπόριο διατίθενται πολλών ειδών ρητίνες που μπορούν να διαχωριστούν σε δυο βασικές κατηγορίες. Αυτές που διαθέτουν ένα $-NH_2$ τελικό

άκρο που να μπορεί να ενωθεί με το καρβοξύλιο του αμινοξέος ή του συμπλόκου, οι οποίες είναι και οι περισσότερες, και αυτές που διαθέτουν ένα -COOH τελικό άκρο όπου συνδέεται το αμινοξύ ή το μεταλλικό σύμπλοκο όταν διαθέτει ελεύθερη αμινομάδα. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις, η σύζευξη του μεταλλικού συμπλόκου με το πεπτίδιο γίνεται μέσω της καρβοξυλομάδας με την ελεύθερη αμινομάδα του αμινοξέος ή πεπτιδίου.

Η T. Keyes και οι συνεργάτες της, σε αρκετές περιπτώσεις [38-41] προτιμούν το τρόπο σύζευξης του μεταλλικού συμπλόκου πάνω στην ρητίνη. Στην εργασία [40] δυο σύμπλοκα του ρουθηνίου (σχ. 1.14) το $[Ru(bpy)_2PIC]ClO_4$ και το $[Ru(dpp)_2PIC]ClO_4$ όπου $PIC=(4\text{-καρβοξυφαινυλ})\text{ιμιδάζο}[4,5-f][1,10]\text{φαινανθρολίνη}$, συζευγνύονται σε στερεή φάση με ένα εντεκαπεπτίδιο, μέσω της καρβοξυλομάδας του υποκαταστάτη PIC, με την αμινομάδα της τελικής αλανίνης του πεπτιδίου.

Τα αντιδραστήρια σύζευξης που χρησιμοποιήθηκαν είναι το PyBOP το HOBt και το DIPEA. Παρότι ο μέσος χρόνος για την επιμήκυνση της πεπτιδικής



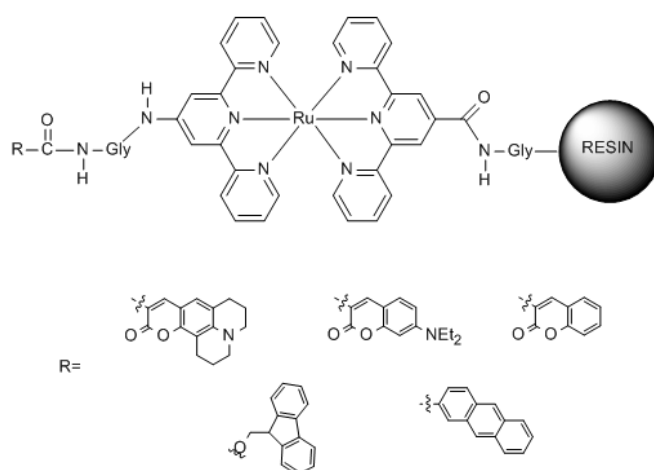
Σχήμα 1.14. Σύζευξη μεταλλικού συμπλόκου στο ακινητοποιημένο πεπτίδιο πάνω στην ρητίνη.

αλυσίδας με χρήση της μεθοδου SPPS είναι περίπου 1,5 h (ανάλογα με το μέγεθος του πεπτιδίου, την δομή του στο χώρο και τις τυχόν στερεοχημικές παρεμποδίσεις που προκύπτουν), η σύζευξη των μεταλλικών συμπλόκων απαιτεί πολύ περισσότερο χρόνο που συνήθως είναι από 12 h έως και 24 h στο πλείστο των περιπτώσεων.

Στις εργασίες [38, 41] συντίθενται δυο μεταλλοπεπτίδια από το ίδιο αρχικό σύμπλοκο του Ru(II) (βλ. πίν. Σ3.3, 4 παρ.). Το σύμπλοκο αυτό συζευγνύεται την μια φορά με ένα πενταπεπτίδιο αργινίνης [Arg]₅ και την δεύτερη φορά με ένα οκταπεπτίδιο αργινίνης [Arg]₈ με την παρεμβολή ενός συνθετικού αμινοξέος, του αμινοεξανοϊκού οξέος, το οποίο διαθέτει μια ανθρακική αλυσίδα πέντε ατόμων άνθρακα όπου στις δύο άκρες της βρίσκονται η καρβοξυλομάδα και η αμινομάδα. Η προσθήκη αυτού του “spacer” αυξάνει την απόσταση του μεταλλικού συμπλόκου από το πεπτίδιο και κατά συνέπεια από τη ρητίνη, αντιμετωπίζοντας προβλήματα προσέγγισης της ετερογενούς αντίδρασης. Τα αντιδραστήρια σύζευξης είναι όμοια με τα παραπάνω όπως συμβαίνει και στην εργασία [39], όπου ένα σύμπλοκο του ρουθηνίου με δύο χηλικούς υποκαταστάτες διπυριδοφαιναζίνης, (dppz), το [Ru(dppz)₂PIC]ClO₄ (βλ. πίν. Σ3.5 παρ.) συζευγνύεται πάνω στην ρητίνη με ένα οκταπεπτίδιο [Arg]₈ πάλι μέσω του αμινοεξανοϊκού. Σε όλες τις παραπάνω συνθετικές πορείες [38, 39, 40, 41] το κόψιμο του συμπλόκου από την της ρητίνη γίνεται με διάλυμα TFA/TIS/θειοανισόλης.

Η K. Heinze και οι συνεργάτες της συνέθεσαν ένα σύμπλοκο Ru(II) με δυο υποκατεστημένες τερπυριδίνες [42]. Το σύμπλοκο [Ru(try-COOH)(try-NH₂)]²⁺ όπου try-COOH= 4'-κάρβοξυ-2,2':6',2''-τερπυριδίνη try-NH₂= 4'-άμινο-2,2':6',2''-τερπυριδίνη συζευγνύεται σε στερεή φάση πάνω σε μια γλυκίνη από την ενεργοποιημένη καρβοξυλομάδα του μεταλλικού συμπλόκου. Εν συνεχεία αφού το σύμπλοκο έχει συνδεθεί πάνω στην γλυκίνη και χωρίς να απομακρυνθεί από την ρητίνη, αφήνεται να αντιδράσει με Fmoc-Gly-Cl, αυτή την φορά από το

άμινο τελικό άκρο του συμπλόκου. Η αντίδραση δημιουργίας πεπτιδικού δεσμού ανάμεσα στο σύμπλοκο και στην Fmoc-Gly-Cl πραγματοποιείται με χρήση μικροκυμάτων σε πυριδίνη και THF. Έπειτα στην αμινομάδα της δεύτερης γλυκίνης, με χρήση PyBOP, συζευγνύονται διάφορα κάρβοξυ-οργανικά μόρια. Το σύμπλοκο με τις δυο γλυκίνες και το συζευγμένο οργανικό μόριο αποκόπτεται από την ρητίνη με χρήση πυκνού TFA(σχ. 1.15).

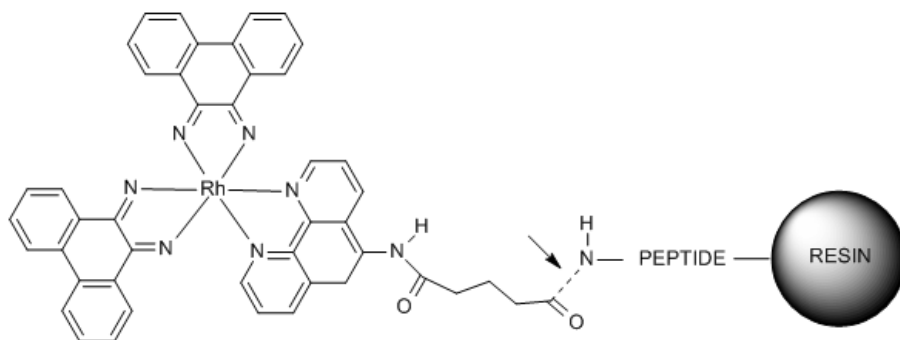


Σχήμα 1.15. Σύνθεση μεταλλικού πεπτιδίου πάνω στην ρητίνη.

Ένα ακόμη εργαστήριο που χρησιμοποιεί τον συγκεκριμένο τύπο σύζευξης του συμπλόκου πάνω στην ρητίνη, είναι το εργαστήριο της J.K Barton που ασχολείται με την σύνθεση και την μελέτη μονοπυρηνικών ή διπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II) και Rh(III) [37, 43-48]. Ένα μονοπυρηνικό σύμπλοκο του ρουθηνίου [37] με τρεις διαφορετικούς χηλικούς διδοντικούς υποκαταστάτες, μια φαιναθρολίνη (phe) μια διπυριδοφαιναζίνη (dppz) και ένα 4-(βουτυρικό οξύ)-4'-μεθυλ-2,2'-διπυριδύλιο (bbpy) (βλ. πίν. Σ3.6 παρ.) συνδέεται με ένα πενταπεπτίδιο από την καρβοξυλομάδα του υποκαταστάτη 4 bbpy, στο αμινικό άκρο της τερματικής αλανίνης του πενταπεπτιδίου (-Ala-Lys-Tyr-Lys-Gly) με την χρήση PyBOP και DIPEA.

Όπως έχουμε αναφέρει, οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες συνθέτουν μεταλλοπεπτίδια με παραπάνω της μιας, συνθετικές μεθοδολογίες,

επιδιώκοντας καλύτερες αποδόσεις και καθαρότητα. Ένα τέτοιο σύμπλοκο του ροδίου, το $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{phen}')]\text{Cl}$ όπου $\text{phen}' = 5\text{-αμινο-1,10-φαινανθρολίνη}$ και $\text{phi} = 9,10\text{-φαινανθρενοκινόνη-διμίνη}$ συντέθηκε με δυο διαφορετικούς τρόπους [43, 44] είτε με σύζευξη του πεπτιδίου στο σύμπλοκο ή με ένταξη του υποκαταστάτη με το συζευγμένο πεπτίδιο στο Ru(II) .



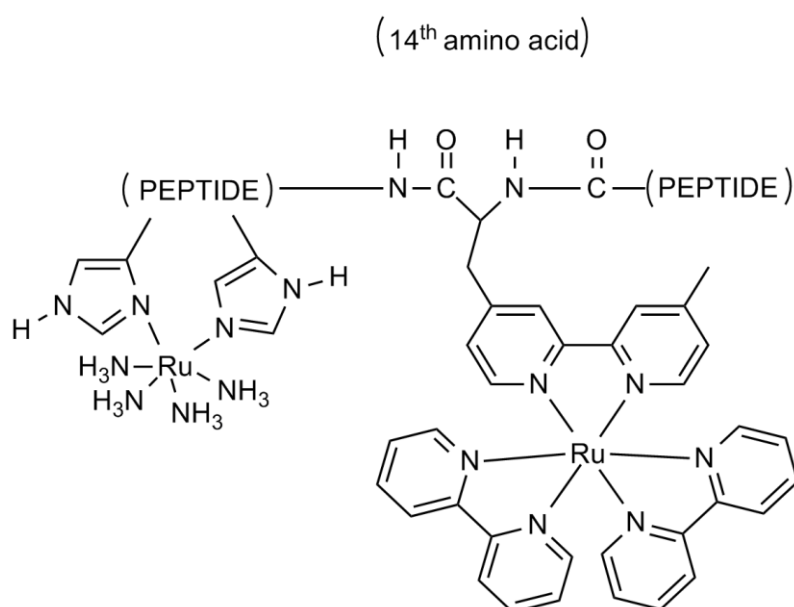
Σχήμα 1.16. Σύζευξη μεταλλικού συμπλόκου του Rh(III) στο ακινητοποιημένο πεπτίδιο πάνω στην ρητίνη.

Το σύμπλοκο αυτό έχει διδοντικά ενταγμένα δυο μόρια phi και ένα μόριο phen' του οποίου η αμινομάδα, στην θέση 5', ενώνεται μέσω ενός αμιδικού δεσμού με το ένα καρβοξύλιο του γλουταρικού οξέος (σχ. 1.16). Η σύζευξη του πεπτιδίου πραγματοποιείται τελικώς μεταξύ της δεύτερης καρβοξυλομάδας του γλουταρικού οξέος και της αμινομάδας του τελικού αμινοξέος του πεπτιδίου. Ανάλογη πορεία χρησιμοποιείται και για το σύμπλοκο του Ru(II) $[(\text{phi})_2\text{RuL}]^{2+}$ [48], όπου L ο χηλικός υποκαταστάτης 4-(βουτυρικό οξύ)-4'-μέθυλ-2,2'-διπυριδύλιο συζευγνύεται με δυο διαφορετικά πεπτίδια. Στην πρώτη περίπτωση συζευγνύεται μέσω αμιδικού δεσμού με την αμινομάδα της Asp του πεπτιδίου P1 ($\text{Asp-Pro-Asp-Glu-Leu-Glu-His-Ala-Ala-Lys-His-Glu-Ala-Ala-Ala-Lys}$) ενώ στη δεύτερη περίπτωση με ένα πεπτίδιο του ενεργού κέντρου της ενδονουκλεάσης Bam . Η σύζευξη γίνεται με PyBOP και DIPEA και τα μεταλλοπεπτίδια κόβονται από την ρητίνη με διάλυμα $\text{TFA/H}_2\text{O/αιθανοδιθειόλης}$.

Σε δυο ακόμη εργασίες [45, 46] συντίθενται σύμπλοκα του Ru(II) και του Rh(III) με συζευγμένα αμινοξέα και πεπτίδια, όπου στην αμινομάδα του τελικού αμινοξέος του πεπτιδίου συζευγνύεται ένα οργανικό μόριο. Στην εργασία [46] η σύνθεση του μεταλλοπεπτιδίου πραγματοποιείται εξ'ολοκλήρου πάνω στην ρητίνη. Το αρχικό σύμπλοκο του ροδίου διαθέτει κορεσμένη σφαίρα ένταξης με τρεις χηλικούς υποκατάστατες (βλ. πίν. Σ.3.9 παρ.), μια 1,10-φαιναφρολίνη (phe) μία 9,10-φαινανθρενοκινόνη-διμίνη (chrysi) και ένα 4-(βουτυρικό οξύ)-4'-μέθυλ-2,2'-διπυριδύλιο στον οποίο πραγματοποιείται η σύζευξη του πεπτιδίου. Το πεπτίδιο αποτελείται από μια λυσίνη και εν συνεχεία οκτώ αμινοξέα αργινίνης. Η σύζευξη του συμπλόκου γίνεται στην αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται, διαφοροποιούνται από προηγούμενες εργασίες και είναι τα HOBt, HOBu και το DIPEA. Το διάλυμα για την αποδέσμευση του μεταλλοπεπτιδίου από την ρητίνη αποτελείται από TFA/TIS/H₂O, όπως στις περισσότερες περιπτώσεις. Με μια παραπλήσια συνθετική πορεία [45] το σύμπλοκο [Ru(phen)(dppz)L] (βλ. πίν. Σ3.10 παρ.) όπου phe = 1,10-φαιναφρολίνη, dppz = μια διπυριδοφαιναζίνη και L = 4-(βουτυρικό οξύ)-4'-μέθυλ-2,2'-διπυριδύλιο, συζευγνύεται πάνω στην ρητίνη από την αμινομάδα της αργινίνης, ενώ ένα μόριο φλουοροσκεΐνης συνδέεται στην αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης. Χρησιμοποιώντας ως αρχικό σύμπλοκο το [Ru(phen)(dppz)(4-BuCO₂H-4'-Mebpy)] (βλ. πίν. Σ3.11 παρ.) η ομάδα της J.K. Barton σε μια ακόμα εργασία [34] συνδέει με αμιδικό δεσμό μια ιστιδίνη από το αμινικό ακρο της, ενώ το αρωματικό άζωτο του ιμιδαζολίου της εντάσσεται στο σύμπλοκο [Ru(NH)₅(H₂O)]³⁺, το οποίο απομακρύνεται από την ρητίνη με διάλυμα TFA/TIS/H₂O.

Ο B. Bowler και οι συνεργάτες του [49, 50] συνθέτουν το ετεροληπτικό τρι-χηλικό σύμπλοκο [Ru(bpy)(CNbpy)]²⁺ (βλ. πίν. Σ3.12 παρ.) (CNbpy = 4-κάρβοξυ,4-άμινο-2,2'-διπυριδύλιο), δημιουργώντας ένα σύμπλοκο που διαθέτει μία αμινομάδα και μία καρβοξυλομάδα. Το σύμπλοκο αυτό, που έχει κορεσμένη την σφαίρα ένταξης του μετάλλου, έχει την δυνατότητα να σχηματίζει

αμιδικούς δεσμούς και από τις δυο πλευρές του. Έτσι μέσω της μεθόδου SPPS παρεμβάλλεται στο μέσον της πεπτιδικής αλληλουχίας ενός πεπτιδίου 22 αμινοξέων. Για λόγους που αφορούν κυρίως την πεπτιδική διαδικασία, το κόψιμο του πεπτιδίου από την ρητίνη πραγματοποιείται με υδροφθρικό οξύ. Σε μία επόμενη εργασία [50] της ίδιας ομάδας, η σύνθεση συνεχίζεται με την ένταξη των ημιδαζολικών αζώτων των δυο ιστιδινών του 22-πεπτιδίου που βρίσκονται στην 17^η και 21^η θέση, αφού πρώτα το πεπτίδιο έχει αποκοπεί από την ρητίνη (σχ. 1.17) στο σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2]^+$.

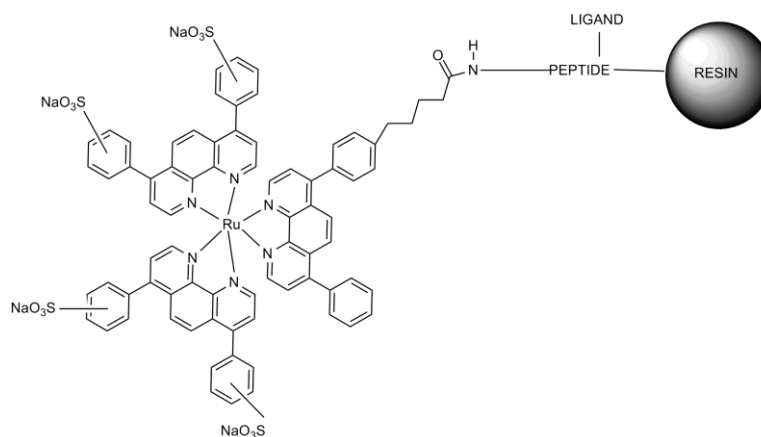


Σχήμα 1.17. Διπυρηνικό σύμπλοκο του Ru(II)/ Ru(III).

Στις αναφορές [51,52] το σύμπλοκο του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})]^{2+}$ (βλ. πίν. Σ3.13, 14 παρ.) συζευγνύεται με ένα επταπεπτίδιο το Arg-Gly-Asn-Ala-His-Glu-Arg [51] και με ένα τριπεπτίδιο Gly-His-Lys [52] με αντιδραστήρια σύζευξης το HOBt και το DCC. Το διάλυμα κοψίματος της ρητίνης είναι 90% TFA. Στην εργασία [53] συντίθενται δυο σύμπλοκα, το $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-4-CO}_2\text{H})]^{2+}$ και το $[\text{Ru}(\text{trpy-4-CO}_2\text{H})_2]^{2+}$ (βλ. πίν. Σ3.15,16 παρ.) τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως αρχικά σύμπλοκα στην σύνθεση μεταλλοπεπτιδίων. Τα σύμπλοκα αυτά δεν

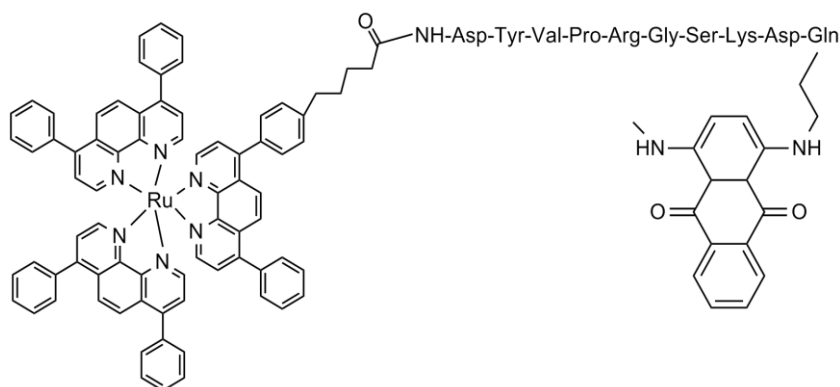
είναι χειρόμορφα λόγω του τριδοντικού υποκατάστατη της τερπυριδίνης και απλοποιούν ως εκ τούτου την οπτική καθαρότητα των τελικών συμπλόκων. Το διπεπτίδιο που συζεύχθηκε ήταν η γλυκίνο-τρυπτοφάνη και το αμινοξύ τρυπτοφάνης. Για το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy}-4\text{-CO}_2\text{H})]^{2+}$ η διαδικασία σύζευξης που ακολουθείται είναι η συνηθισμένη χρησιμοποιώντας PyBOP και DIPEA. Η διαφοροποίηση έρχεται στην σύνθεση του συμπλόκου με τις δυο κάρβοξυ τερπυριδίνες του $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy}-4\text{-CO}_2\text{H})]^{2+}$. Σε όλες αυτού του τύπου τις συνθέσεις, το μεταλλικό σύμπλοκο προστίθεται πάντα σε περίσσεια. Στην συγκεκριμένη σύνθεση λόγω της ανάγκης σύζευξης και των δυο καρβοξυλομάδων το μεταλλικό σύμπλοκο προστίθεται σε έλλειμμα, με 2 φορές περίσσεια ρητίνης ώστε να συζευχτεί και από τις δυο πλευρές σε ένα στάδιο.

Ο W. Bannwarth και οι συνεργάτες του είναι ακόμα μια ερευνητική ομάδα που προτιμά στις περισσότερες συνθέσεις τους την σύζευξη ολοκλήρου του μεταλλικού συμπλόκου πάνω στο πεπτίδιο που βρίσκεται ακινητοποιημένο στη ρητίνη. Στις εργασίες [54-56] ως αρχικό σύμπλοκο χρησιμοποιείται το $[\text{Ru}(\text{bphe})_2(\text{bphe}')]^{2+}$ όπου $\text{bphe} = 4,7\text{-διφαινυλ-1,10-φαιναθρολίνη}$ και $\text{bphe}' = 5\text{-(4-(7-φαινυλ-1,10-φαιναφρολίνη-4-φαινυλ)) πεντανοϊκό οξύ}$ που διαθέτει ένα ελεύθερο καρβοξυλικό άκρο. Στην συνθετική πορεία [55] η καρβοξυλομάδα του συμπλόκου ενεργοποιείται με σουκιναμίδιο και διϊσοπρόπυλαιθυλαμίνη (*i*- Pr_2NEt) όπως στην σύζευξη σε υγρή φάση και στην συνέχεια συζευγνύεται με το οκταπεπτίδιο Tyr-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-Lys-Phe που βρίσκεται ακινητοποιημένο στην ρητίνη (σχ. 1.18). Το σύμπλοκο συζευγνύεται με το τυροσυνικό άκρο του πεπτιδίου, ενώ στο άλλο άκρο του πεπτιδίου υπάρχει μια τροποποιημένη φαινυλαλανίνη με ένα παράγωγο μιας κινολίνης. Στην ίδια εργασία, συντίθεται ένα ακόμα μεταλλοπεπτίδιο με το ίδιο αρχικό σύμπλοκο και το δεκαπεπτίδιο Phe-Tyr-Val-Pro-Arg-Gly-Ser-Lys-Asp-Phe χωρίς καμιά αλλαγή των συνθηκών και των αντιδραστηρίων.



Σχήμα 1.18. Σύζευξη μεταλλικού συμπλόκου του Ru(II) στο ακινητοποιημένο πεπτίδιο πάνω στην ρητίνη.

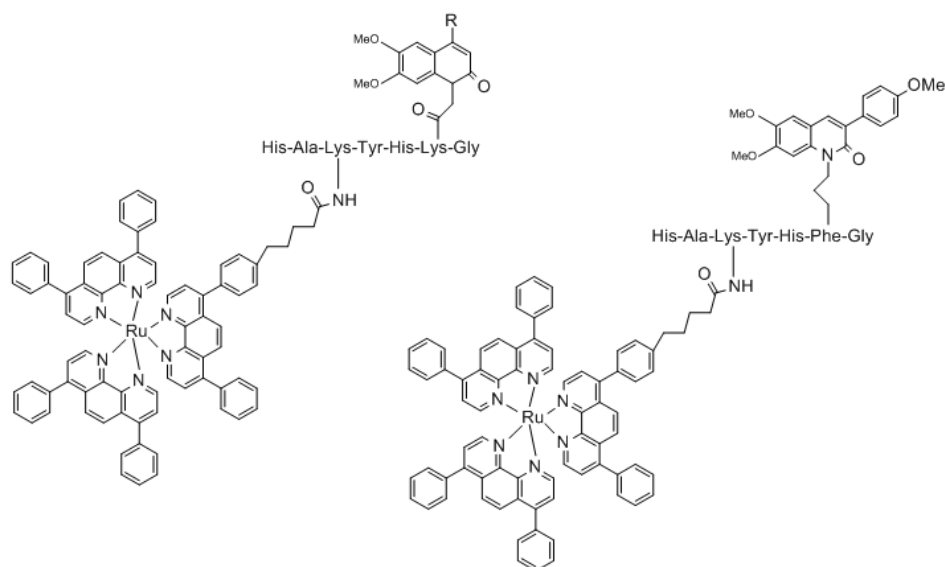
Στην ίδια λογική και η αναφορά [54], όπου πραγματοποιείται σύζευξη του ίδιου συμπλόκου στο δεκαπεπτίδιο της προηγούμενης εργασίας με την διαφοροποίηση να έγκειται στην αντικατάσταση του αρχικού τροποποιημένου αμινοξέος, όπου σε αυτή την περίπτωση περιέχει ένα παράγωγο ανθρακενίου (σχ. 1.19)



Σχήμα 1.19. Σύζευξη μεταλλικού συμπλόκου του Ru(II) καθώς και του παραγώγου της κινολίνης πάνω στο ακινητοποιημένο πεπτίδιο.

Μια ενδιαφέρουσα σύνθεση μεταλλοπεπτιδίων πραγματοποιείται στην εργασία [56] όπου χρησιμοποιούνται δυο συνθετικές πορείες για την παρασκευή του μεταλλοπεπτιδίου, η οποία ξεκινά με την ένταξη του τροποποιημένου

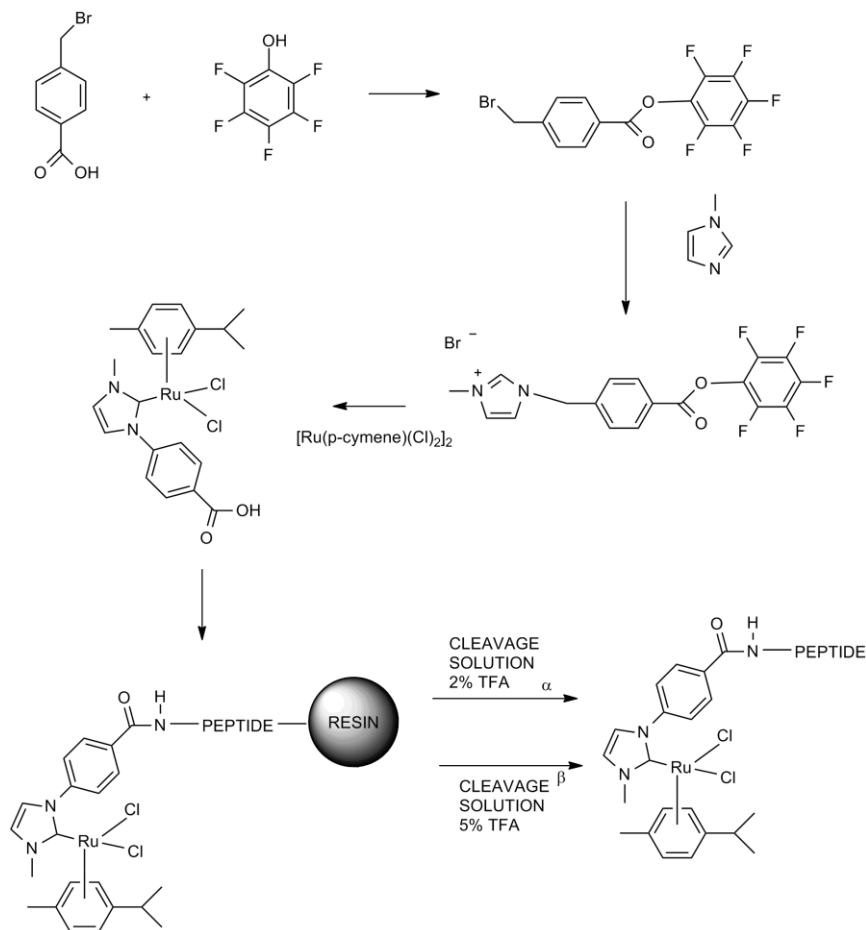
υποκαταστάτη bphe-CONH-Lys στον οποίο είναι συζευγμένη μια λυσίνη από την αμινομάδα της πλευρικής της αλυσίδας, στο σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bphe})_2(\text{OTf})_2]$ όπου bphe = μπαθοφαινανθρολίνη και OTf = τριφλουοροσουλοφονικομεθύλιο. Το σύμπλοκο αυτό συζευγνύεται στη συνέχεια σε δυο διαφορετικά επταπεπτίδια. Στα δυο επταπεπτίδια η συζευγμένη μετά του συμπλόκου λυσίνη εντοπίζεται ως τρίτο αμινοξύ στην πεπτιδική αλυσίδα ενώ η διαφοροποίηση του πεπτιδίου εντοπίζεται στο έκτο αμινοξύ της πεπτιδικής αλληλουχίας, όπου τα αμινοξέα λυσίνη και φαινυλαλανίνη είναι συζευγμένα (σχ. 1.20) με δυο διαφορετικά όξο-κινολινικά παράγωγα.



Σχήμα 1.20. Σύζευγμένα μεταλλικά σύμπλοκα του Ru(II) με όξο-κινολινικά παράγωγα πάνω σε πεπτίδια.

Το εργαστήριο του N. Metzeler-Nolte έχει ασχοληθεί διεξοδικά με την σύζευξη πεπτιδίων πάνω σε οργανομεταλλικά σύμπλοκα κυρίως του Ru(II). Ο τρόπος σύνθεσης των συμπλόκων που χρησιμοποιεί είναι μέσω της σύζευξης του συμπλόκου με το ακινητοποιημένο πεπτίδιο. Στις εργασίες [57-59] τα οργανομεταλλικά σύμπλοκα περιέχουν ένα αρένιο (κουμένιο, κυκλοπενταδιένιο κτλ) τα οποία αποδεσμεύονται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες από το μεταλλικό κέντρο. Έτσι η σύζευξη του πεπτιδίου πάνω στην ρητίνη, λόγω των ηπίων συνθηκών που πραγματοποιείται ενδείκνυται για αυτές τις παρασκευές.

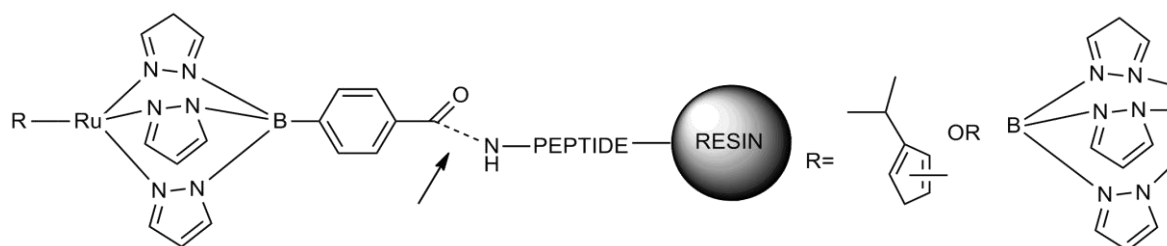
Στην εργασία [57] το σύμπλοκο του ρουθηνίου (η⁶-*p*-cym)RuCl₂(im) (σχ. 1.21) όπου cym = *p*-κουμένιο και im = ιμιδαζολ-2-υλιδένιο συζευγνύεται με το νευροπεπτίδιο της εγκεφαλίνης, με αντιδραστήριο σύζευξης το HOBt.



Σχήμα 1.21. Συνθετική πορεία δημιουργίας μεταλλοπεπτιδίου.

Η διαδικασία κοψίματος του μεταλλοπεπτιδίου από την ρητίνη έγινε με δυο διαφορετικούς τρόπους (α) με διάλυμα TFA σε CH₂Cl₂ 2% v/v για 2 h και επανάληψη της διαδικασίας για άλλες δυο ώρες και, (β) με ένα διάλυμα TFA σε μεθανόλη 5% v/v για 2 h την οποία ακολούθησε ακόμα μια φορά με ένα διάλυμα TFA σε μεθανόλη 10% v/v για 2 h. Τα δυο διαλύματα TFA για την αποδέσμευση του συμπλόκου από την ρητίνη διαφοροποιούνται ως προς την συγκέντρωση του TFA σε σχέση με τα συνήθη διαλύματα που χρησιμοποιούνται για το κόψιμο της ρητίνης είναι δηλαδή πολύ πιο αραιά. Η μικρή συγκέντρωση του TFA (2-10%)

στα δυο πιο πάνω διαλύματα σε σύγκριση με την υψηλή συγκέντρωση (95%) που χρησιμοποιείται συνήθως, οφείλεται σε δυο παράγοντες (α) στη φύση δεσμού του αρενίου με Ru(II) που όπως είπαμε διασπάται σε πολύ όξινες συνθήκες και (β) στον ιμιδαζολικό υποκαταστάτη που εντάσσεται μονοδοντικά στο μέταλλο και ως εκ τούτου είναι εύκολο να αποδεσμευτεί. Σε μια αναφορά [58] της ίδιας ερευνητικής ομάδας συντίθεται το σύμπλοκο του Ru(II) τύπου «sandwich» με υποκαταστάτες ένα κυκλοπενταδιένιο και ένα κυκλοπενταδιένιο που διαθέτει ελεύθερη καρβοξυλομάδα (βλ. πίν. Σ.3.21 παρ.). Η σύζευξη γίνεται από την καρβοξυλομάδα του κυκλοπενταδιενίου με το υβριδικό πεπτίδιο-νουκλεϊκό οξύ PNA (Peptide Nucleic Acid) με αντιδραστήρια σύζευξης τα HATU, HOBt και DIPEA. Ένα ακόμα οργανομεταλλικό σύμπλοκο Ru(II) το $[(iPrCp)Ru(\mu^2\text{-pyrazino})_3(p\text{-B}-(CO_2H)C_6H_4)]^{2+}$ όπου $iPrCp$ = ισοπρόπυλ-κυκλοπενταδιένιο $p\text{-(CO}_2H)C_6H_4$ = p -βόρο-βενζοϊκό οξύ [59] (σχ. 1.22) συζευγνύεται με το νευροπεπτίδιο της εγκεφαλίνης με χρήση TBTU, HOBt και DIPEA. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο τρόπος αποδέσμευσης του συμπλόκου από την ρητίνη όπου χρησιμοποιείται υδατικό διάλυμα NaOH 1M και 1,4-διοξάνιο για 10 min στους 0 °C.

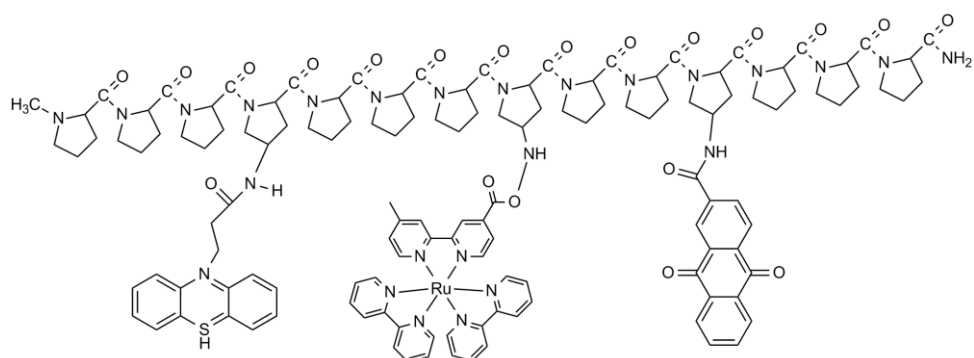


Σχήμα 1.22. Σύζευγμένα μεταλλικά σύμπλοκα του Ru(II) πάνω σε ακινητοποιημένα πεπτίδια.

Το ίδιο μείγμα για την απομάκρυνση από την ρητίνη ενός παρομοίου μεταλλοπεπτιδίου (βλ. πίν. Σ3.23 παρ.) χρησιμοποιείται και στην εργασία [60] με τα ίδια αντιδραστήρια σύζευξης όπως και στην [59]. Σε μια παλαιότερη δημοσίευση [61] από την ίδια ομάδα το κατά κόρον χρησιμοποιούμενο σύμπλοκο $[Ru(bpy)_2(4\text{-CO}_2H\text{-4'-Me}bpy)]^{2+}$ συζευγνύεται με ένα υβριδικό πεπτίδιο-νουκλεϊκό

οξύ (PNA) με αντιδραστήριο σύζευξης HATU παρουσία DIPEA μέσω αμιδικού δεσμού, με την καρβοξυλομάδα του (4-CO₂H-4'-Mebpy).

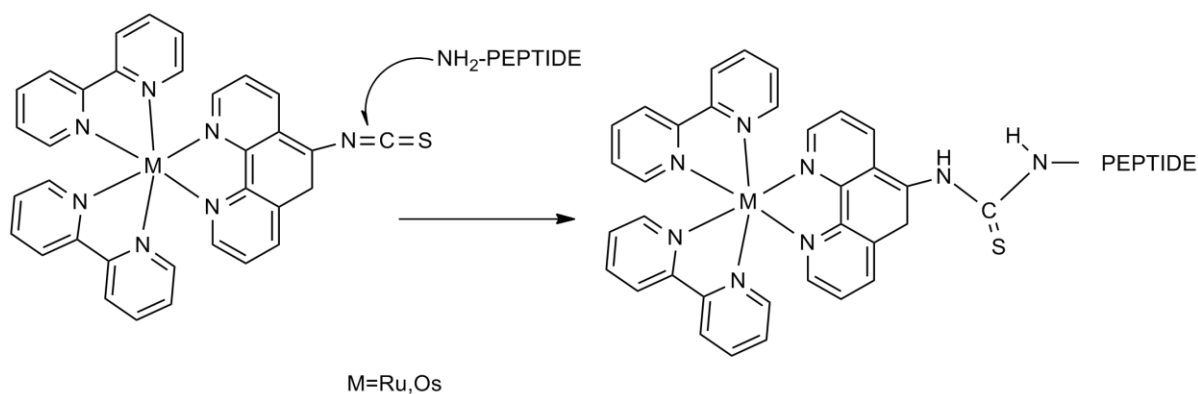
Εκτός από σύμπλοκα του ρουθηνίου, η ομάδα του N. Metzeler-Nolte αναφέρει και μεταλλοπεπτίδια του Pt(IV) [62, 63] όπου η πεπτιδική σύνθεση γίνεται στην ελεύθερη καρβοξυλομάδα του σουκινικού οξέως που είναι ενταγμένο στις αξονικές θέσεις ενός οκταεδρικού συμπλόκου του Pt(IV). Έτσι το σύμπλοκο του Pt(IV), Pt(dach)₂(Suc)₂(ox), όπου dach = 1,2-διάμινοκυκλοεξάνιο, ox = οξαλικό ανιόν και Suc = σουκινικό οξύ [62] (βλ. πίν. Σ3.24 παρ.) συζευγνύεται με το εντεκαπεπτίδιο Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Glu-Arg-Arg-Arg λαμβάνοντας και το μόνοσυζευγμένο και το δίσυζευγμένο μεταλλοπεπτίδιο. Το συζευγμένο με το πεπτίδιο πλέον μεταλλικό σύμπλοκο απομακρύνεται από την ρητίνη με διάλυμα TFA/H₂O/φαινόλη (95/2,5/2,5) (2 h). Όμοια [63] το συμπλόκου Pt(NH₃)₂(Suc)₂Cl₂ συνδέεται με το πεπτίδιο από τη μία μόνο(βλ. πίν. Σ.3.25 παρ.) καρβοξυλομάδα του ενός σουκινικού οξέος καθώς η άλλη είναι προστατευμένη με εστέρα, με δύο διαφορετικά πεπτίδια. Το διάλυμα απομάκρυνσης του συμπλόκου από την ρητίνη είναι TFA/DMF (90/10) με τα αντιδραστήρια σύζευξης στην αναφορά [63] να είναι τα HOBt, TBTU και DIPEA ενώ στην εργασία [62] το CDI. Στην εργασία [64], το σύμπλοκο [Ru(bpy)₂(4-CO₂H-4'-Mebpy)]²⁺ ενώνεται με τη δημιουργία πεπτιδικού δεσμού με μια τροποποιημένη προλίνη η οποία περιέχει μια αμινομάδα στον C3 του πενταμελούς της δακτυλίου (σχ. 1.23). Εν συνεχεία το σύμπλοκο που δημιουργείται διαθέτοντας ελεύθερη την καρβοξυλομάδα και την αμινομάδα της προλίνης παρεμβάλλεται στην πεπτιδική αλυσίδα ως το έβδομο αμινοξύ στην σύνθεση ενός 13-πεπτιδίου. Τα δυο οργανικά μόρια που συνδέονται στην τετάρτη και ενδέκατη θέση της αλληλουχίας του πεπτιδίου είναι 3-(10-*H*-φαινοθειαζίνη-10)προπανοϊκό οξύ, Ptzpn-OH και ανθρακινόνη-2-καρβοξυλικό οξύ αντίστοιχα.



Σχήμα 1.23. Τροποποιημένο προλινικό μεταλλοπεπτίδιο.

1.2.3. Ειδικές περιπτώσεις σύζευξης πεπτιδίων ή αμινοξέων με δεσμό πλην του αμιδικού.

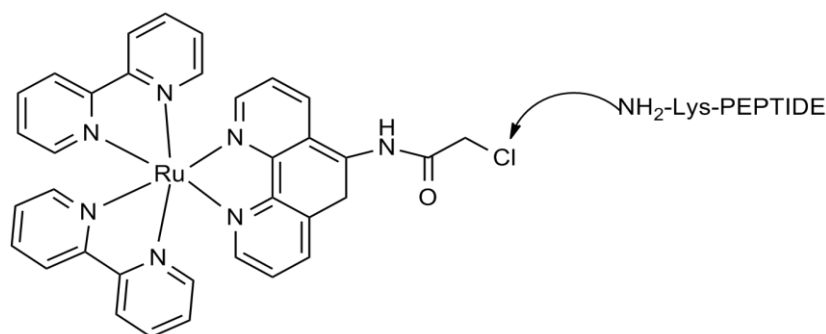
Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις σύνθεσης μεταλλοπεπτιδίων [65-69], όπου η πεπτιδική αλυσίδα συνδέεται με τον ενταγμένο στο μέταλλο υποκαταστάτη με διαφορετικού τύπου δεσμό από το συνηθισμένο πεπτιδικό, που αναλύσαμε και αναφερθήκαμε έως τώρα. Στις εργασίες [66, 68] συντίθεται το σύμπλοκο $[Ru(bpy)_2(phen')]^{2+}$ όπου $phen' = 5$ -ισοθειοκυανοφαιναθρολίνη. Στην πρώτη περίπτωση [66] το πεπτίδιο που έχει αποκοπεί από την ρητίνη διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.1 M, pH = 8) και στην συνέχεια προστίθεται το σύμπλοκο του ρουθηνίου διαλυμένο σε DMF. Η σύζευξη πραγματοποιείται με την δημιουργία δεσμού ανάμεσα στην αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης και του άνθρακα της 5-ισοθειοκυανοφαιναθρολίνης, αφού το πεπτίδιο έχει απομακρυνθεί από την ρητίνη (σχ. 1.24).



Σχήμα 1.24. Σύνδεση του αμινικού άκρου του πεπτιδίου στο ισοθειοκυάνο τμήμα του συμπλόκου.

Στην δεύτερη περίπτωση [68] ως αρχικό σύμπλοκο χρησιμοποιείται το $[\text{Os}(\text{bpy})_2(\text{phen})]^{2+}$ το οποίο αντιδρά με ένα 15-πεπτίδιο με το αμινικό άκρο της 1^{ης} γλυκίνης του 15πεπτιδίου. Η σύζευξη και στις δυο περιπτώσεις γίνεται πάνω στον άνθρακα του ισοθειοκυανίου όπως φαίνεται στο σχήμα δημιουργώντας ένα δεσμό C-N.

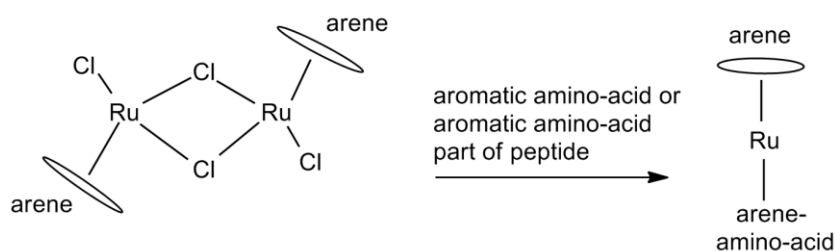
Ο M. Ogawa και οι συνεργάτες του συνέθεσαν [67] ένα μεταλλοπεπτίδιο του Ru(II) με την συνθετική μεθοδολογία της εργασίας [66], με την μόνη διαφορά ότι στην θέση 5 της φαιναθρολίνης η ισοθειοκυάνο-ομάδα αντικαθίσταται τώρα από μια ομάδα χλωροακεταμιδίου (σχ. 1.25).



Σχήμα 1.25. Σύνδεση του αμινικού άκρου του πεπτιδίου στο χλωροακεταμίδιο του συμπλόκου.

Στην θέση αυτή συνδέεται το πεπτίδιο ύστερα από την απομάκρυνση του χλώριου και σύνδεση με την πρώτη λυσίνη του πεπτιδίου μέσω του άμινο άκρου. Σε ακόμα μια εργασία [65] της ίδιας ερευνητικής ομάδας η σύνδεση του πεπτιδίου γίνεται από την σουλφοδρυλική ομάδα της κυστεΐνης του πεπτιδίου.

Ένας διαφορετικός τρόπος σύζευξης του μεταλλικού συμπλόκου με πεπτίδιο, παρουσιάζεται στην εργασία [70], όπου το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CHO-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)_2$ αντιδρά μέσω της αλδεϋδομάδας του διπυριδιλίου με την αμινομάδα της πλευρικής αλυσίδας μιας λυσίνης με σχηματισμό δεσμού -C=N- τύπου βάσης του Schiff. Δημιουργία μεταλλοπεπτιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί και με την αντίδραση οργανομεταλλικών συμπλόκων του Ru(II) τύπου «sandwich» του γενικού τύπου $[(\eta^6\text{-naphthalene})\text{Ru}(\text{Cp})]$ όπου naphthalene = ναφθαλένιο και Cp = κυκλοπενταδιένιο [71] με πεπτίδια όπως η αγγειοτενσίνη II και η λυσοζύμη που περιέχουν αμινοξέα με αρωματικούς δακτυλίους όπως φαινυλαλανίνη και τυροσίνη. Οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιούνται σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν το $(\eta^6\text{-naphthalene})\text{Ru}(\text{cp})$ και το πεπτίδιο ή τα αρωματικά αμινοξέα, με ακτινοβολήση με ορατό φως όπου το ναφθαλένιο αντικαθίσταται από τον αρωματικό δακτύλιο του αμινοξέος. Σε άλλες περιπτώσεις [72, 73] η η^6 -ένταξη του αρωματικού τμήματος του αμινοξέος προκύπτει ύστερα από αντίδραση των αρωματικών τμημάτων των αμινοξέων με διπυρηνικά σύμπλοκα του ρουθηνίου με αρένια όπως στο παρακάτω σχήμα (σχ. 1.26).



Σχήμα 1.26. Δημιουργία μεταλλοπεπτιδίου με η^6 -ένταξη του αρωματικού τμήματος του αμινοξέος ή των πεπτιδίων.

Αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν και με μονομερή σύμπλοκα του ρουθηνίου [74] του τύπου $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{acetone})_3]^+$ ή $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{CH}_3\text{CN})_3]^+$ υπό τις ίδιες συνθήκες.

1.3. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

1.3.1. Μεταφορά ηλεκτρονίου, Electron Transfer(E.T)

Η ιδιότητα των μεταλλοπεπτιδίων να περιγράφουν με καλή προσέγγιση μοντέλα μεταλλοπρωτεϊνών οδήγησε στην χρήση τους για την μελέτη του φαινομένου της μεταφοράς ηλεκτρονίου (electron transfer E.T), που παρατηρείται στα μεταλλοένζυμα. Σε πολλές περιπτώσεις, οι δυνητικές εφαρμογές τους βασίζονται στην ιδιότητα αυτή.

Η E.T. στις αντιδράσεις των μεταλλοπρωτεϊνών αποτελεί ενδιαφέρον φαινόμενο και πολύπλοκο καθώς τα μεταλλικά κέντρα περιβάλλονται από πολυπεπτιδικές αλυσίδες αποκλείοντας μόρια διαλύτη και απομακρύνοντας τα οξειδοαναγωγικά κέντρα. Όμως η ανομοιόμορφη κατανομή του φορτίου στις πρωτεΐνες δημιουργεί ανισότροπες αλληλεπιδράσεις (διαφορετικές προς τις δυο κατευθύνσεις) μεταξύ των οξειδοαναγωγικών ζευγών. Βέβαια στην περίπτωση της ομοιοπολικής ή της ιοντικής σύνδεσης μεταξύ δότη-αποδέκτη ηλεκτρονίου(ων) το πρόβλημα απλοποιείται αλλά δεν μπορεί να περιγράψει το μοντέλο της E.T στις μεταλλοπρωτεΐνες. Οι πολλαπλές πεπτιδικές διαμορφώσεις της αλυσίδας που περιβάλλει το ενεργό μεταλλικό κέντρο, δημιουργούν τις συνθήκες “εισόδου” και κατεύθυνσης της E.T. Οι πεπτιδικές αλυσίδες επίσης ξεχωρίζουν το αναγωγικό και το οξειδωτικό κέντρο, οδηγώντας στο ερώτημα πως είναι δυνατόν η μεταφορά να είναι αποτελεσματική σε απόσταση μεγαλύτερη των 10 Å.

Πολλές τέτοιες εργασίες περιλαμβάνουν μελέτες που σχετίζονται με την κατεύθυνση και τους παράγοντες που επηρεάζουν την E.T, την επαναδιευθέτηση της ενέργειας κατά την E.T στα κέντρα που συμμετέχουν, την συσχέτιση της απόστασης των οξειδοαναγωγικών κέντρων με την αποτελεσματικότητα της μεταφοράς και το είδος των μεταλλικών κέντρων ή τον τρόπο σύζευξης τους με την πολυπεπτιδική αλυσίδα.

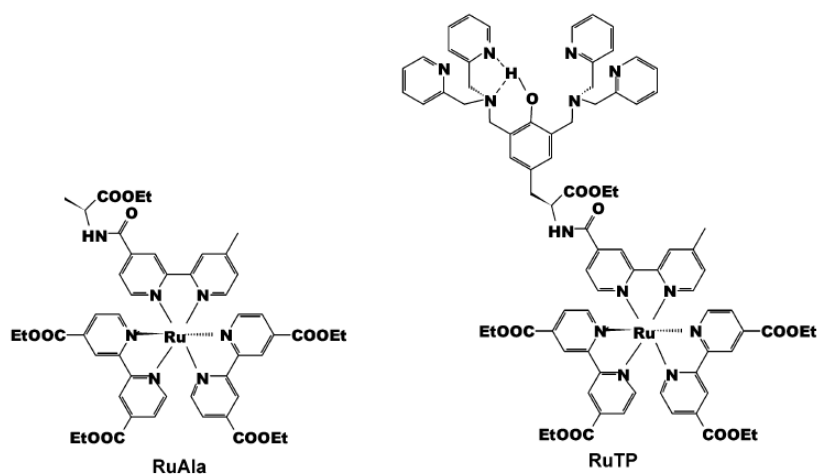
Τα μεταλλοπεπτίδια των στοιχείων της ομάδας του λευκόχρυσου, αλλά κυρίως εκείνα του ρουθηνίου κατέχουν ξεχωριστή θέση στις πιο πάνω μελέτες κυρίως για το φαινόμενο της “φωτοπροκαλούμενης” E.T. Όταν ένα φωτόνιο διεγείρει ένα σύμπλοκο του Ru(II) ένα ηλεκτρόνιο από την θεμελιώδη κατάσταση μπορεί να μεταφερθεί σε ένα τροχιακό υψηλότερης ενεργείας. Αυτή η μετακίνηση σε τροχιακό υψηλότερης ενεργείας αφήνει ένα κενό στη θεμελιώδη κατάσταση, το οποίο καλύπτεται τάχιστα από ένα ηλεκτρόνιο του δότη. Το ηλεκτρόνιο που έχει φωτοδιεγερθεί σε υψηλότερης ενεργείας τροχιακό αποδίδεται στο δέκτη ηλεκτρονίων.

Πολλές ερευνητικές ομάδες μελέτησαν ως αυτοσκοπό την ικανότητα των μεταλλοπεπτιδίων της ομάδας του λευκοχρύσου στην μεταφορά ηλεκτρονίων. Ο M. Ogawa και οι συνεργάτες του μελέτησαν την E.T μεταξύ δυο κέντρων Ru(II) και Ru(III) που συνδέονται με ένα πεπτίδιο [34, 67, 75, 76]. Στην αρχή [67] μελετήθηκε το παραπάνω σύστημα σε σχέση με την φύση του πεπτιδίου. Έτσι το συζευγμένο πεπτίδιο έχει διαμόρφωση διμερούς δομής R-συσπειρωμένης έλικας (coiled coil) ή R-έλικας και οι σχέσεις δότη (ολιγοπυριδινικό σύμπλοκο του Ru(II) και τον δέκτη $\{-\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5\}$ μπορούν να αντιστραφούν ώστε να μελετηθεί η επίδραση του δίπολου της έλικας του πεπτιδίου στο ρυθμό της φωτοεπαγώμενης E.T. Η μεταφορά του ηλεκτρονίου γίνεται πάντα από το Ru(II) στο Ru(III) προς το αρνητικό άκρο του πεπτιδικού δίπολου στην R-έλικα ή προς το θετικό άκρο στην περίπτωση της R-συσπειρωμένης έλικας. Έτσι βρέθηκε ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής για την πρώτη περίπτωση ήταν ιδανικός σε σχέση με την δεύτερη περίπτωση ενώ δεν βρέθηκε κάποιος συσχετισμός της διεύθυνσης με τον ρυθμό της E.T. Σε μια επόμενη αναφορά [34] η ίδια ερευνητική ομάδα σε ένα ανάλογο σύστημα, διαπιστώνει ότι ο ρυθμός E.T σχετίζεται άμεσα με την δομή και την διαμόρφωση του πεπτιδίου. Για πεπτίδια με δευτεροταγή δομή ο τρόπος που συνδέονται ο δότης και ο δέκτης με το πεπτίδια είναι σημαντικός παράγοντας όσον αφορά την εμβέλεια του φαινομένου. Ακόμη σε απόσταση των δυο

μεταλλικών κέντρων της τάξης των 24 Å ο ρυθμός της E.T βρέθηκε να είναι ανάλογος με το ρυθμό τροποποιημένων με μεταλλικά κέντρα πρωτεϊνών[34, 77].

Η μελέτη της E.T στο κυτόχρωμα c (cyt c) μέσω του συμπλόκου Ru(bpy)₂(phen-NH₂)-Cys-(Glu)5-Gly [78] έδειξε ότι ο ρυθμός μειώνεται με την αύξηση του ιξώδους. Ανάλογες μελέτες παρόμοιων μεταλλοπεπτιδίων [65], με το ίδιο αρχικό σύμπλοκο, έδειξαν ότι το φαινόμενο αυτό είναι απόλυτα ενδομοριακό και εξαρτάται και από την συγκέντρωση του cyt c.

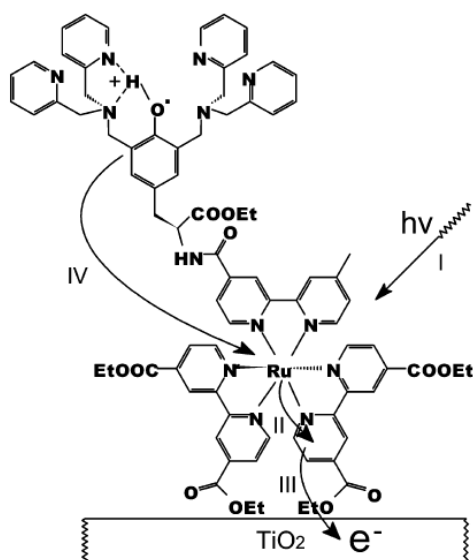
Παρατηρώντας τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά αυτών των συμπλόκων, πολύ γρήγορα η επιστημονική κοινότητα κατανόησε τις εφαρμογές που μπορεί να έχουν στην αποθήκευση και μεταφοράς ενέργειας [22] , Ο B. Akermark και οι συνεργάτες του, συνέθεσαν ένα σύμπλοκο του ρουθενίου [79] με τρεις διπυριδινικούς υποκαταστάτες, συζευγμένο με μια αλανίνη (RuAla). Εν συνεχεία πάνω στην αλανίνη συνδέθηκε ένα μόριο δι-πικολαμίνης σχηματίζοντας το σύμπλοκο RuTP (σχ. 1.27).



Σχήμα 1.27. Μεταλλοπεπτίδια RuAla και RuTP.

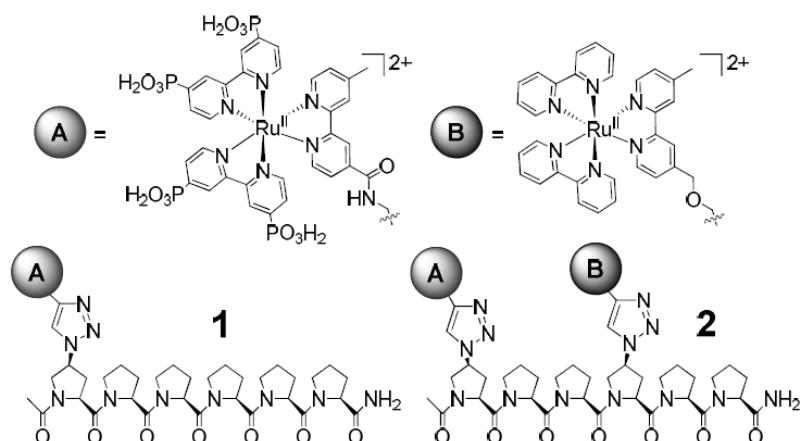
Το σύμπλοκο RuTP μιμείται μερικώς τις αλληλεπιδράσεις στο P₆₈₀ της Tyr_{Lz} και της His₁₉₀ του φωτοσυστήματος P₆₈₀. Όταν το σύμπλοκο συνδέεται με

νανοκρυσταλλικό TiO_2 μέσω ιοντικών δεσμών των αιθυλικών εστέρων των διπυριδιλίων και ακτινοβολείται με φως, συμβαίνει ταχεία ροή ηλεκτρονίων από την MLCT του RuTP στην ζώνη αγωγιμότητας του TiO_2 . Το παραγόμενο Ru(III) ανάγεται από μια ενδομοριακή Ε.Τ της Tyr_z. Η αποτελεσματικότητα του συστήματος αυτού είναι στο 90% της μετακίνησης των θετικών οπών στην επιφάνεια του TiO_2 . (σχ. 1.28).



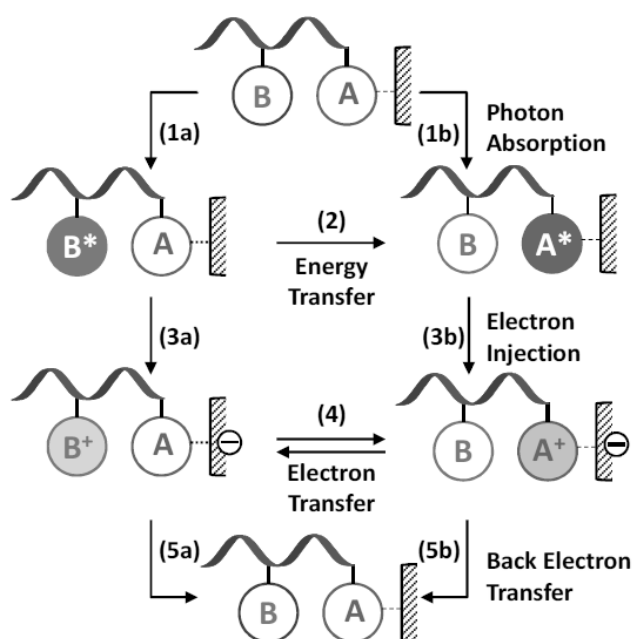
Σχήμα 1.28. Προτεινόμενος μηχανισμός φωτοεπαγόμενης μεταφοράς ηλεκτρονίου στο σύστημα RuTP- TiO_2 .

Μιμούμενοι την αντίδραση του φωτοσυστήματος II, ο Akermarck και οι συνεργάτες τους συνέθεσαν [80] το σύμπλοκο $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_2(4\text{-Me-4'-(CONH-L-tyrosine ethyl ester)-2,2'-bpy})](\text{PF}_6)_2$ για να μελετήσουν την μεταφορά ηλεκτρονίου από το Ru(II) στην τυροσίνη διερευνώντας το ρόλο του P_{680} . Διαπίστωσαν ότι η τυροσινική ρίζα σχηματίζεται από φωτοπροκαλούμενη Ε.Τ. ενώ το σύμπλοκο μιμείται με τον καλύτερο τρόπο τις αντιδράσεις του φωτοσυστήματος P_{680} . Συμβάλλοντας σε εφαρμογές φωτοβολταϊκών συστημάτων που βασίζονται σε φωτοενεργοποιούμενες χρωμοφόρες, οι J. Papanikolas και οι συνεργάτες του μελέτησαν [81] την μεταφορά ενέργειας και ηλεκτρονίων ανάμεσα σε δυο σύμπλοκα του Ru(II) με διπυριδιλία που συζευγνύονται με πολυπρολίνη σε διαμόρφωση Α-έλικας (σχ. 1.29).



Σχήμα 1.29. Δομή μεταλλοπεπτιδίου ολιγοπρολίνης.

Το παραπάνω σύμπλοκο του Ru(II) με διπυριδύλια συνδέθηκε σε κρυσταλλικό οξείδιο του Ti (TiO_2) μέσω ιοντικών δεσμών ενώ το άλλο μεταλλικό κέντρο (B) παρέμενε ελεύθερο. Η μεταφορά ηλεκτρονίου πραγματοποιείται ανάμεσα στα δυο μεταλλικά κέντρα Ru(II). Όμως η ταχύτητα οπισθοροής (back transfer) της E.T. ήταν 20 ns, ιδιαίτερα αργή (σχ. 1.30).

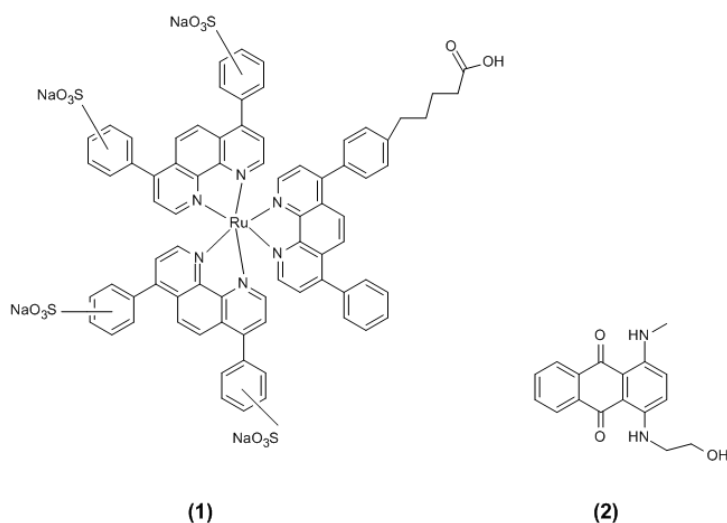


Σχήμα 1.30. Φωτοδιέγερση και μεταφορά ηλεκτρονίου E.T.

Ανάλογη μελέτη [82] ως προς την ρύθμιση μεταφοράς ενέργειας πραγματοποιήθηκε για σύμπλοκα Os(II) και Ru(II) για διάφορα πεπτίδια. Πρόσφατα [83] μελετήθηκε μια ένωση του ρουθηνίου με δυο γλυκίνο-υποκατεστημένες τερπυριδίνες όπου η μία εξ'αυτών ήταν συζευγμένη με μια πολύ-βινυλοτριεθυλαμίνη. Το σύμπλοκο δρούσε ως χρωμοφόρο αλλά και ως υποστηρικτική ομάδα πάνω σε νανοσύρματα ZnO ως δέκτης ηλεκτρονίων. Από τις μετρήσεις που έγιναν βρέθηκε ότι η ένωση με τις δυο τερπυριδίνες έχει μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα σε σύγκριση με οργανικές χρωμοφόρες ή το κλασσικό τρις χηλικό σύμπλοκο του $[Ru(bpy)_3]^{2+}$.

Η βιομημητική κατάλυση αποτελεί μια σημαντική εφαρμογή του φαινομένου μεταφοράς ηλεκτρονίου [84]. Ένα μεγάλο κομμάτι της έρευνας προσανατολίζεται στην εύρεση ενώσεων που θα μπορούσαν να παράγουν υδρογόνο μιμούμενες τις υδρογονάσες. Οι συνεχώς αυξανόμενες ενεργειακές απαιτήσεις καθώς και η ανάγκη για μια πιο «πράσινη» ενέργεια κάνουν ακόμα πιο επιτακτική αυτή την αναζήτηση. Εκατοντάδες είναι τα σύμπλοκα των μετάλλων που μελετώνται για την φωτοκαταλυτική διάσπαση του H_2O με προεξέχοντα εκείνα του ρουθηνίου με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες αλλά σπάνια είναι εκείνα με συζευγμένα πεπτίδια. Το πλέον μελετημένο είναι το κλασσικό σύμπλοκο του ρουθηνίου με τρία διπυριδίλια που αποτέλεσε πρότυπο μοντέλο στην μελέτη της στην φωτοκαταλυτικής οξείδωσης του H_2O σε υδρογόνο και οξυγόνο [16]. Τρις-χηλικά σύμπλοκα του Ru(II) με 2,2'-διπυριδίλια συζευγμένα μέσω L-Asp πεπτιδικών δεσμών και M.V. (methyl-viologen) σχημάτιζαν δυάδες όπου μελετήθηκε ο ρυθμός της E.T από το Ru(II) στο M.V. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε διαχωρισμός φορτίου τύπου $Ru(III)-M.V^{+•}$. Στην συνέχεια μελετήθηκε, ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίου από το Ru(II) στο $M.V^{+}$ και από το $M.V^{+•}$ στο Ru(III) όπου βρέθηκε να έχει διαφορά τρεις τάξεις μεγέθους. Ο συνδυασμός των παραπάνω δυάδων μπορούν να εφαρμοστούν ως σύστημα για την φωτοπροκαλούμενη διεργασία οξείδωσης του H_2O .

Στο άρθρο [64] μελετήθηκε η εξάρτηση της επιτρεπομένης E.T. από το διαλύτη. Ο Meyer και οι συνεργάτες του βρήκαν ότι η σταθερά ταχύτητας της E.T. βρίσκεται στο εύρος $5,2 \times 10^{-6}$ με $7,7 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ στους 22°C και είναι σε άμεση σχέση με το είδος του διαλύτη. Η μελέτη συστημάτων μεταφοράς ενέργειας φθορισμού συντονισμού (FRET) αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την διευκρίνιση των αλληλεπιδράσεων, που εξαρτώνται από την απόσταση των αλληλεπιδρώντων, σε μοριακό επίπεδο. Ο W. Bannwarth και οι συνεργάτες του μελέτησαν δυάδες μεταφοράς ενέργειας με το σύμπλοκο του Ru(II) (σχ. 1.31(α)) ως αποδέκτη FRET και ένα παράγωγο του καρβοστουριλίου ως δότη [85] τα οποία συζευγνύονται με διάφορα πεπτίδια με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη μεταξύ πρωτεϊνών. Πράγματι οι δυάδες αυτές διαθέτουν όλα τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά για την παραπάνω χρήση. Λεπτομερής αναφορά στη σύνθεση και τις φωτοφυσικές ιδιότητες της πιο πάνω δυάδας για διάφορα πεπτίδια δίνεται στην εργασία [55], ενώ δυάδες με διάφορες υποκατεστημένες κινολινόνες δίνονται στην [56]



Σχήμα 1.31. Δότης και αποδέκτης ηλεκτρονίου στο σύστημα FRET.

Δυάδες FRET όπου ο δότης ενέργειας είναι το σύμπλοκο (1) και ο αποδέκτης ένα μη-φθορίζων μόριο παραγώγου της ανθρακινόνης όπως το *Disperse Blue 3* (2) συζεύχθηκαν με διάφορα πεπτίδια και μελετήθηκαν οι

φωτοφυσικές τους ιδιότητες (σχ. 1.31). Τα συστήματα αυτά δεν παράγουν φθορισμό επιπέδου βάσης (background) κατά την διέγερση του δότη και μπορούν να χρησιμεύσουν στη μελέτη φθορισμού βιολογικών συστημάτων τα οποία φωτοδιεγείρονται με $\lambda > 400 \text{ nm}$ [54] .

Η μεταφορά ενέργειας μεταξύ ενός φώτο-ημιαγωγού (QDs) με πυρήνα CdSe-ZnS που συνδέεται μέσω πολυπεπτιδικής αλυσίδας με ένα φωτοδραστικό πολυπυριδινικό σύμπλοκο του Os(II), μελετήθηκε από τους L. Medintz και τους συνεργάτες του [69] και βρέθηκε πως το σύστημα αυτό λειτουργεί ως FRET όπως πολλά ανάλογα, πλην όμως εμφανίζει μακράν ισχυρότερη φασματική επικάλυψη από εκείνη που έχει αναφερθεί για CT (charge transfer) ως κύριος αποσβέστης του μηχανισμού QD (Qvantum Dots).

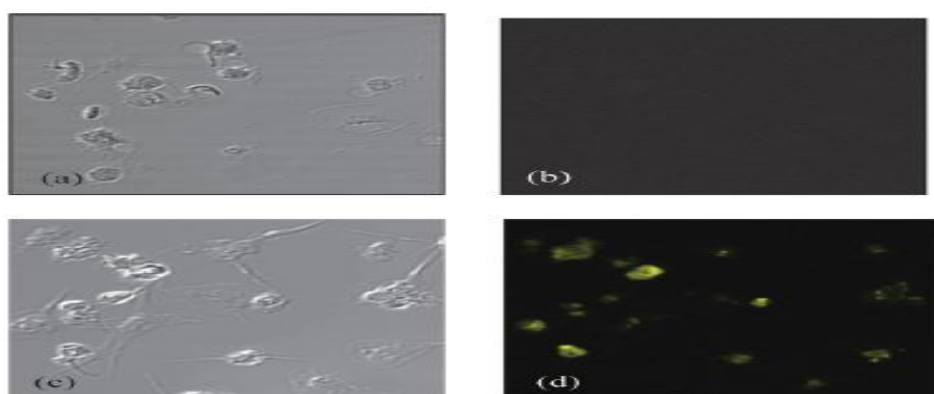
Σε πρόσφατη δημοσίευση χρησιμοποιήθηκε [86] ένα σύμπλοκο του ρουθηνίου με ένα διπυριδίλιο, μια τερπυριδίνη και μια ενταγμένη από το άζωτο του αρωματικού δακτυλίου ιστιδίνη, όπου σε συνεργασία με ένα καταλυτικό κέντρο σιδήρου και ένα δεκαοκταπεπτίδιο μπορούν να παράξουν υδρογόνο έπειτα από την φωτοκαταλυτική διάσπαση του H_2O . Στο άρθρο [70] το σύμπλοκο του ρουθηνίου $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CHO-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)_2$ χρησιμοποιεί την αλδεϋδομάδα ώστε να γίνει η σύνδεση με μια λυσίνη, μέσω συμπύκνωσης βάσης του Schiff, έδειξε φωτοκαταλυτική δραστηριότητα και εκλεκτικότητα στην οξείδωση σουλφίδο-ενώσεων.

1.3.2. Φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες.

Οι φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητες των συμπλόκων των μετάλλων της ομάδας του λευκόχρυσου με ολιγοπυριδίνες, ήταν η κύρια αιτία ανάπτυξης των συζευγμένων με αμινοξέα ή πεπτίδια ενώσεων, αφού διατηρούσαν τις ιδιότητες αυτές και μετά την σύζευξη στο πλείστο των περιπτώσεων. Η κυριότερη προσπάθεια για εφαρμογές των συμπλόκων αυτών έχει να κάνει με την χρήση τους ως σκιαγραφικές ενώσεις ή αντιδραστήρια απεικόνισης. Ο R. Alsfasser και η ομάδα του έκαναν αρκετές έρευνες για να ελέγξουν από το πώς επηρεάζεται ο φθορισμός από μικρές δομικές αλλαγές στα αμινοξέα των συμπλόκων [27], μέχρι την εξάρτηση του φθορισμού των συμπλόκων αυτών από το pH [28]. Έτσι βρέθηκε ότι σε χαμηλό pH (<2), ο χρόνος ζωής της διεγερμένης κατάστασης είναι μικρός. Σε εύρος pH 2-8, οι χρόνοι ζωής εξαρτώνται από το μήκος της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος του συμπλόκου. Σε υψηλά pH (>9), οι χρόνοι ζωής προσεγγίζουν αυτούς του $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ δείχνοντας ότι το αμινοξύ έχει αμελητέα επίδραση στην χρόνο αποδιέγερσης της διεγερμένης κατάστασης του ρουθηνίου.

Η Tia Keyes και οι συνεργάτες της ασχολούνται ευρέως με τα βιοαπεικονιστικά αντιδραστήρια. Κοινός παρανομαστής για τα άρθρα [38, 39] είναι το πεπτίδιο της οκτααργινίνης που είναι γνωστό ότι μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη με μεγάλη ευκολία. Στο άρθρο [40] έγινε σύγκριση στις ιδιότητες φθορισμού μεταξύ του αρχικού συμπλόκου $[Ru(dppz)_2(PIC)]^{2+}$ και του συζευγμένου με οκτααργινίνη $[Ru(dppz)_2(PIC-Arg_8)]^{10+}$. Η οκτα-αργινίνη έχοντας πολύ καλή διαπεραστικότητα από την κυτταρική μεμβράνη, συνεπικουρεί ώστε να περάσει μαζί της και το σύμπλοκο του ρουθηνίου. Έτσι σε πειράματα που έγιναν σε κυταρικές γραμμές *sp2 myeloma* ύστερα από επώαση 48 h, διαπιστώθηκε ότι το συζευγμένο μετά του πεπτιδίου της οκτααργινίνης σύμπλοκο έχει μεγαλύτερη και πιο ομοιόμορφη κατανομή,

αποδίδοντας καλύτερη απεικονιστική ικανότητα χωρίς το σύμπλοκο του ρουθηνίου να χάνει την ικανότητα φθορισμού του. Μελετήθηκαν [38] δύο σύμπλοκα το ένα συζευγμένο με μια οκταργινίνη και το άλλο με πεντααργινίνη ως αντιδραστήρια απεικόνισης. Στην εικόνα 2 φαίνεται ο φθορισμός αιμοπεταλίων που έχουν επώαστεί με $3,5 \times 10^{-5}$ M για 20 min με $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PIC}-[\text{Arg}]_5)]^{7+}$ (b) και με $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PIC}-[\text{Arg}]_8)]^{10+}$ (d). Όπου τα αποτελέσματα δείχνουν πόσο σημαντική είναι η επιλογή του κατάλληλου πεπτιδίου τόσο όσον αφορά την κατανομή και την διέλευση της κυτταρικής μεμβράνης όσο και στην ικανότητα φθορισμού του συμπλόκου. Επίσης έγινε σύγκριση και με το αντίστοιχο αρχικό σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PIC})]^{2+}$ καθώς επίσης συσχετίζεται ο φθορισμός (απεικόνισης) με τον χρόνο επώασης, λαμβάνοντας όμοια αποτελέσματα με την προηγούμενη εργασία όπως φαίνεται στην (εικ. 1.1).

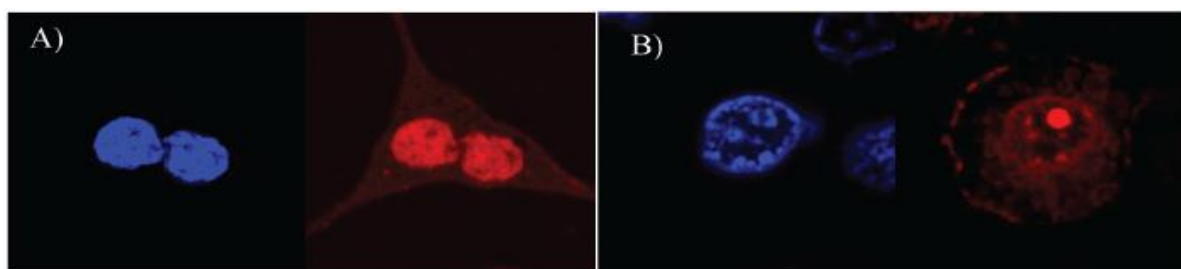


Εικόνα 1.1. Επώαση αιμοπεταλίων με $3,5 \times 10^{-5}$ M για 20 min στο (b) με $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PIC}-[\text{Arg}]_5)]^{7+}$ και (d) με $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PIC}-[\text{Arg}]_8)]^{10+}$, όπου φαίνεται η διαφοροποίηση στην απεικονιστική ικανότητα των δυο συμπλόκων που διαφοροποιούνται ως προς την επιλογή του πεπτιδίου.

Ο ρόλος του ολιγοπυριδινικού υποκατάστατη στον φθορισμό αλλά και στην κυτταροτοξικότητα αυτού του τύπου συμπλόκων μελετήθηκε ιδιαίτερα από την ερευνητική ομάδα της T. Keyes [40]. Η T. Keyes και οι συνεργάτες της σύγκριναν δυο σύμπλοκα με διαφορετικού τύπου ολιγοπυριδινικούς υποκαταστάτες, όπου ο υποκαταστάτης που ήταν συζευγμένος με το πεπτίδιο

καθώς και το πεπτιδίο παρέμειναν τα ίδια και στις δυο μελέτες αλλάζοντας συστηματικά τους άλλους δυο βοηθητικούς υποκαταστάτες του Ru(II).

Η κατανομή των συμπλόκων αυτών στο κύτταρο εξαρτάται όχι μόνο το είδος του πεπτιδίου [38] (μέγεθος, φορτίο, δομή, στερεοχημεία κ.τ.λ) αλλά και πόσο υδρόφοβοι [40] είναι οι ολιγοπυριδινικοί υποκαταστάτες. Έτσι το σύμπλοκο του ρουθηνίου με τα διπυριδίλια που είναι περισσότερο υδρόφιλο από το αντίστοιχο με τις φαίνυλ-υποκατεστημένες φαيناθρολίνες, κατανέμεται σε όλο τον πυρήνα, ενώ το σύμπλοκο με τις υποκατεστημένες φαيناθρολίνες ως το πιο υδρόφοβο συγκεντρώνεται μέσα στο πυρηνίσκο, όπως φαίνεται στην (εικ. 1.2). Τα τέσσερα σύμπλοκα δεν δείχνουν να διαφοροποιούνται ως προς την κυτταροτοξικότητα, που παραμένει χαμηλή και δείχνει ότι η κυτταροτοξικότητα δεν σχετίζεται με την κατανομή των ενώσεων στον πυρήνα.

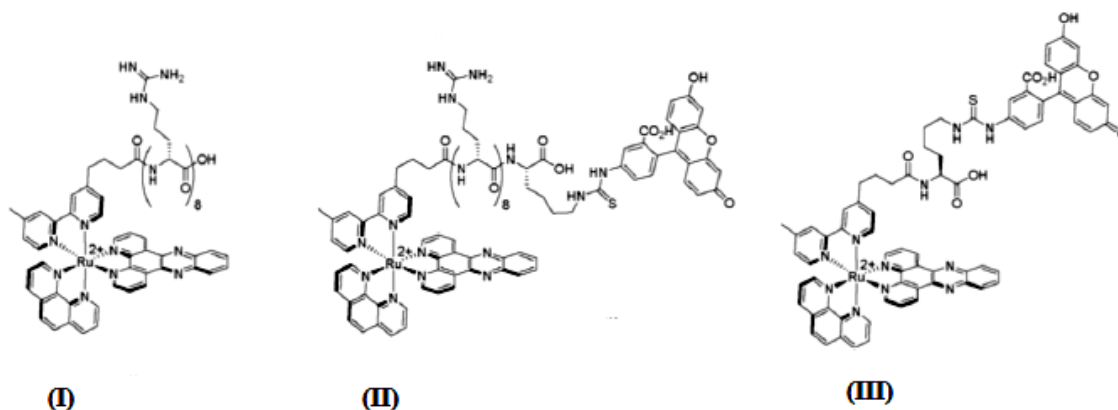


Εικόνα 1.2. Απεικόνιση σε κυτταρικές σειρές CHO όπου στην Α πλευρά έχουν επωαστεί με $[Ru(bpy)_2PIC-bAla-NFkB]^{6+}$ ενώ στη Β με $[Ru(dpp)_2PIC-bAla-NFkB]^{6+}$.

Σε μια ανάλογη έρευνα [30] τα δυο παραπάνω αρχικά σύμπλοκα $[Ru(dpp)_2PIC-OH]^{2+}$ και $[Ru(bpy)_2PIC-OH]^{2+}$ συζεύχθηκαν με το τριπεπτίδιο -Arg-Gly-Asp, ονομαζόμενο (RGD), για την ανίχνευση της ιντεγκρίνης $\alpha_{v}\beta_3$ σε αιμοπετάλια. Οι ιντεγκρίνες είναι βασικοί στόχοι για τη θεραπεία φλεγμονωδών και αγγειακών διαταραχών. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και έδειξαν μια ισχυρή πρόσδεση των συμπλόκων στην ιντεγκρίνη $\alpha_{v}\beta_3$, καθώς και μεγάλους χρόνους φθορισμού, χαρακτηριστικά που τα κάνουν κατάλληλα ως ανιχνευτές

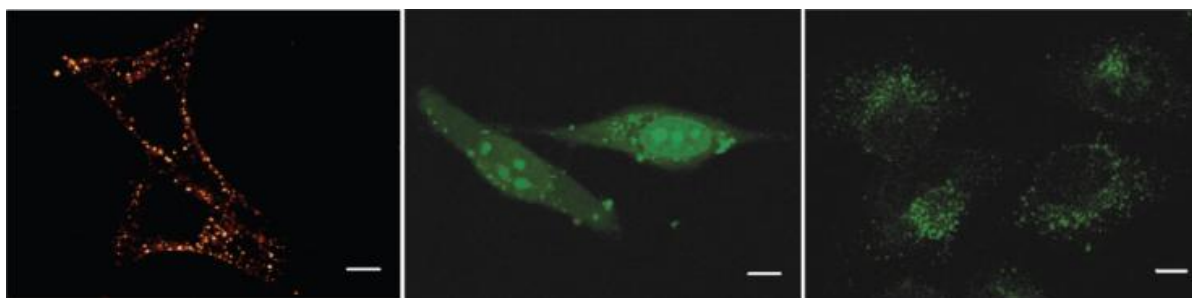
της ιντεγκρίνης απββ₃. Παράλληλα με τις μελέτες της Keyes η ομάδα της J.K Barton χρησιμοποίησε και αυτή το οκταπεπτίδιο της [D-Arg]₈, συζευγμένο με το σύμπλοκο [Ru(phen)(dppz) (4-CO₂H-4'-Mebpy)]²⁺ [45]. Ακόμη συντέθηκε το σύμπλοκο Rh(chrysi)(phen)(bpy)³⁺ όπου chrysi = χρυσενοκινόνη διϊμίνη, phen = 1,10-φαιναθρολίνη και bpy = 4-προπιονικο-4'-μέθυλ-2,2'-διπυριδίνη, συζευγμένο με D-οκτααργινίνη, η οποία συνδέεται με ένα μόριο φλουοροσκεΐνης [46]. Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ του συζευγμένου μεταλλικού συμπλόκου με την D-οκτααργινίνη-φλουοροσκεΐνη και της ελεύθερης D-οκτααργινίνη-φλουοροσκεΐνη σε κυτταρικές σειρές HeLa έδειξαν ότι η ύπαρξη του μεταλλικού συμπλόκου αυξάνει την ικανότητα φθορισμού και συνεπώς την απεικονιστική ικανότητα.

Τα τρία σύμπλοκα του Ru(II) (σχ. 1.32), του πιο κάτω σχήματος [87] μελετήθηκαν για την δυνατότητα τους να προσλαμβάνονται και να κατανέμονται στο εσωτερικό των κυττάρων σε καρκινικές σειρές HeLa.



Σχήμα 1.32. Σύμπλοκα του Ru(II) που μελετήθηκαν για τις κυτταροτοξικές ιδιότητες τους.

Η διάχυση των συμπλόκων δίνεται στην (εικ. 1.3), όπου παρατηρείται ότι το σύμπλοκο (II) του Ru(II) με την D-οκτααργινίνη και την φλουοροσκεΐνη κατανέμεται περισσότερο και με ισχυρότερο φθορισμό από τα υπόλοιπα δύο.



Εικόνα 1.3. Κύτταρα (HeLa) που επωάστηκαν με 5 μ M Ru-D-R8 (I) για 30 min (στην 1^η εικόνα) με 5 μ M Ru-D-R8-fluor (II) για 30 min (στην 2^η εικόνα) και 20 μ M Ru-fluor (III) για 41 h (στην 3^η εικόνα)

Εκλεκτική ανίχνευση του miR-21 στα CBT424 κύτταρα και του miR-31 στα HeLa κύτταρα [66] επιτεύχθηκε με την χρήση της αντίδρασης του Shaudinger όπου η φωτοαναγωγή του αζιδίου της ροδαμίνης σε παράγωγο ανισόλης συνοδεύεται από την αλλαγή του χρώματος από γκρι σε πράσινο. Η φωτοχημική αντίδραση προκαλείται από ένα σύμπλοκο του ρουθηνίου συζευγμένο με PNA όπου η αλληλουχία του νουκλεϊκού τμήματος είναι συμπληρωματική στην αλληλουχία του miR-21 miR-31.

Ανίχνευση [54] πολλαπλών διαφορετικών σημάτων φθορισμού ή σημάτων πολύπλεξης (multiplex signals) μπορούν να αναλυθούν από φθορίζοντες ημιαγωγούς κβαντικών οπών (QDs) CdSe-Zns με την χρήση των συμπλόκων του ρουθηνίου με παράγωγα φαιναθρολίνης συζευγμένα με πεπτίδια. Το φαινόμενο οφείλεται στην επιλεκτική φωτοπροκαλούμενη οξείδωση του κέντρου του Ru(II) από την E.T. του (QDs) μέσω της πεπτιδικής αλυσίδας.

Φαινόμενα φθορισμού και απεικονιστικές ιδιότητες παρουσίασαν και μια σειρά συμπλόκων του Pt(II) με κουπροπορφυρίνες [36] και ολιγαργινίνες όπου ανίχνευαν την παρουσία O₂. Μια ομάδα από σύμπλοκα του Pt(II) με μια καρβοξυλική κουπροπορφυρίνη συζευγμένη με ολιγοαργινίνες και μια χρωστική συντέθηκαν και συγκρίθηκαν οι φωτοφυσικές ιδιότητες τους, η ικανότητα τους

να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη, και οι μηχανισμοί μεταφοράς τους εντός του κυττάρου. Τα σύμπλοκα με τα συζευγμένα πεπτίδια φαίνεται να απορροφούνται στα κύτταρα με μηχανισμούς ενδοκυτταρικής εισόδου, οι οποίοι είναι διαφορετικοί από εκείνους των ανάλογων συμπλόκων με μη συζευγμένα πεπτίδια της ολιγοαργινίνης. Βάση της μελέτης αυτής, το τέτρα-υποκατεστημένο σύμπλοκο PtCP όπου CP = κουπροπορφυρίνη, εμφανίζει να έχει ομοιογενή και πλήρη κατανομή στα κύτταρα και επελέγη για την ανίχνευσης του ενδοκυτταρικού O₂. Έτσι το τελευταίο σύμπλοκο δοκιμάστηκε για την παρακολούθηση της οξυγόνωσης των κυττάρων *in situ* και διάφορων μεταβολικών παραγώγων.

1.3.3. Βιολογική δράση

Η βιολογική δραστηριότητα των μεταλλοπεπτιδίων, που εκφράζεται κυρίως με την κυτταροτοξικότητά τους, σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις των ενώσεων αυτών με τα νουκλεϊκά όξια. Αυτές μπορεί να είναι είτε μέσω δεσμών ένταξης με τις αζωτούχες βάσεις ή με μη-ομοιοπολικού τύπου σύνδεση, μέσω ειδικών επαφών (δεσμοί υδρογόνου, van der Waals, ηλεκτροστατικές) του πεπτιδικού μέρους του συμπλόκου ή των υποκαταστατών με το DNA.

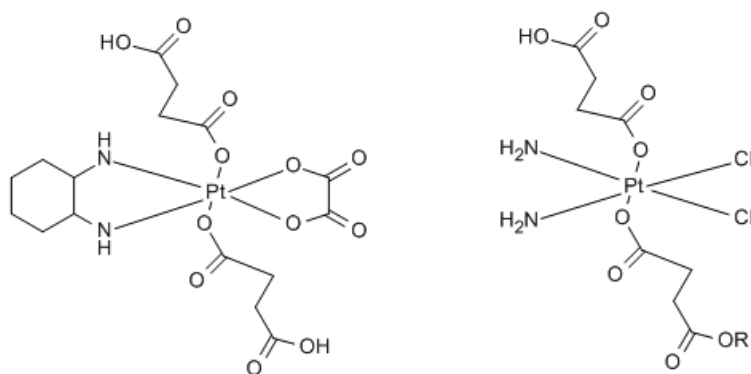
Έτσι ένα μεγάλο μέρος της έρευνας έχει επικεντρωθεί στις αλληλεπιδράσεις τους με το DNA. Σύμπλοκα όπως το [Ru(trpy)(4,4'-(COLysCONH₂)₂bpy)(H₂O)]Cl₄ έδειξε να δεσμεύεται στο DNA με δεσμούς ένταξης προς την κατεύθυνση του κυρίου άξονα προτιμώντας το άζωτο N7 της γουανίνης. Ακόμη, μετά την εκλεκτική δέσμευση του, προκαλεί διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών κατόπιν ακτινοβολίας με UVA. Το [Ru(trpy)(4-CO₂H-4'-Mebpy-Gly-L-His-L-LysCONH₂)Cl]PF₆, έδειξε, ότι προτίμα την γουανίνη και την κυτοσίνη περισσότερο από την θυμίνη και την αδενίνη, κάτι που συμβαίνει ύστερα από την υδρόλυση του ενταγμένου Cl. Επίσης φαίνεται ότι

ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κατιονικού συμπλόκου και των πολυανιονικών αλυσίδων του DNA δρουν επικουρικά στην δέσμευση του [4]. Ένα σύμπλοκο του ρουθηνίου με δυο τερπυριδίνες, που δεν παράγουν οπτικά ενεργό κέντρο το $[Ru(trpy)(trpyCO-Gly-TrpCONH_2)](PF_6)_2$ [2] αν και δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες αλληλεπιδράσεις με το DNA έδειξε ισχυρή κυτταροτοξικότητα στις κυτταρικές σειρές MCF-7, U2OS, K562, με IC_{50} από 0,46 μέχρι 0,92 μM . Συγκριτικά πειράματα μεταξύ ομοίων συμπλόκων του ρουθηνίου [1] συζευγμένα με διαφορετικά αμινοξέα δείχνουν ότι η φύση του συζευγμένου αμινοξέος επηρεάζει τον τρόπο πρόσδεσης των συμπλόκων στο DNA. Η σύγκριση έγινε μεταξύ συμπλόκων του ρουθηνίου συζευγμένα με αρωματικά και μη αμινοξέα και έδειξε ότι το αρωματικό σύστημα της τρυπτοφάνης, προκαλεί σημαντικές διαταραχές στην έλικα του DNA. Αρκετοί ερευνητές ασχολήθηκαν κυρίως με τρις-χηλικά σύμπλοκα του Ru(II) με 2,2'-διπυριδίλιο διαχωρίζοντας την δράση των οπτικά ενεργών ισομερών Λ - και Δ - [2, 51, 52]. Η σύζευξη του τριπεπτιδίου -Gly-His-Lys στην καρβοξυλομάδα του συμπλόκου $[Ru(bpy)_2(4-CO_2H-4'-Me-bpy)](PF_6)$ [52] και ο διαχωρισμός σε Λ - και Δ - ισομερή έδειξε ότι αλληλεπιδρά εναντιοεκλεκτικά με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3'). Έτσι το Δ - ισομερές δεσμεύεται εκλεκτικά από την μεγάλη αύλακα κοντά στο μεσαίο τμήμα της αλληλουχίας -AATT- ενώ τμήμα του πεπτιδίου εκτείνεται δια μέσου της μεγάλης αύλακας από την θυμίνη T8 στην κυτοσίνη C11. Το Λ - ισομερές δεν δεσμεύεται εκλεκτικά αλληλεπιδρώντας περισσότερο ηλεκτροστατικά με τις φωσφορικές ομάδες του ολιγονουκλεοτιδίου. Στο ίδιο αρχικό σύμπλοκο [51] συζεύχθηκε το επταπεπτίδιο -Arg-Gly-Asn-Ala-His-Glu-Arg (τμήμα της ενδονουκλεάσης MunI) και μελετήθηκε ο τρόπος αλληλεπίδρασης του με τα ολιγονουκλεοτίδια d(5'-CGCGATCGCG-3')₂ και d(5'-GCGCTTAAGCGC-3')₂. Στην περίπτωση αυτή τόσο το Λ - όσο και το Δ - ισομερές δεν έδειξαν να έχουν κάποια ειδική δέσμευση στο DNA πιθανόν λόγω του υψηλού βαθμού ελευθερίας του επταπεπτιδίου. Μικρότερα πεπτίδια, όπως τα τριπεπτιδία με μια γλυκίνη σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς συζευγμένα

στα ισομερή Λ^- και Δ^- του $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)$ [2] έδωσε τα σύμπλοκα -Gly-Lys-Lys (1), το -Lys-Gly-Lys (2) και το -Lys-Lys-Gly (3) Λ -1, Λ -2, Λ -3, Δ -1, Δ -2 και Δ -3. Στη συνέχεια μελετήθηκε ο τρόπος αλληλεπίδρασης τους με το ολιγονουκλεοτίδιο $\text{d}(5'\text{-GCGCTTAAGCGC-3'})_2$. Τα αποτελέσματα διαφοροποιήθηκαν σημαντικά, τόσο με την φύση των πεπτιδίων όσο και με το είδος του οπτικού ισομερούς. Έτσι από τα έξι αυτά σύμπλοκα, χαρακτηριστική είναι η διαφορά μεταξύ Δ -1 και Δ -2, όπου το Δ -2 αντιδρά κυρίως μέσω των διπυριδιλίων ενώ στο Δ -1 οι δυο λυσίνες που βρίσκονται μακριά από το μεταλλικό κέντρο λειτουργούν σαν «μέγγενη» για το DNA. Συμπερασματικά, ο τρόπος αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο που εξαρτάται από το είδος και τον αριθμό των αμινοξέων στην πεπτιδική αλυσίδα, την χειρικότητα των μεταλλικών κέντρων, τους βοηθητικούς υποκαταστάστες κ.τ.λ.

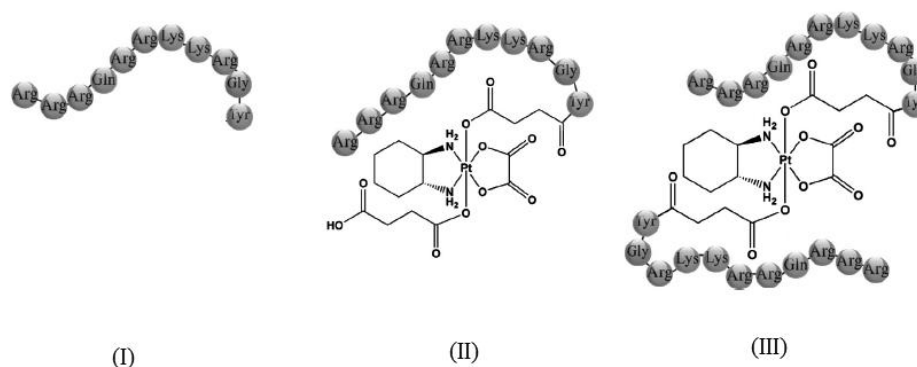
Η εύρεση των κατάλληλων πεπτιδίων ώστε να ρυθμίζονται οι ιδιότητες των συμπλόκων οδήγησε τους ερευνητές να χρησιμοποιήσουν ένα μεγάλο αριθμό αμινοξέων και πεπτιδίων ή ακόμη και τους συνδυασμούς τους με νουκλεϊκά οξέα. Μια τέτοια περίπτωση είναι το PNA [88]. Το PNA είναι ένα πεπτιδικό νουκλεϊκό οξύ που είναι πολύ σταθερό σε βιολογικά συστήματα και κάνει ισχυρές και εκλεκτικές αλληλεπιδράσεις με το DNA και το RNA. Μελέτες έδειξαν ότι το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CO}_2\text{H-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)$ συζευγμένο με PNA όταν συνδέεται στην συμπληρωματική του αλληλουχία στο DNA με τρόπο ανάλογο του ελεύθερου PNA, επιτρέποντας έτσι στο μεταλλικό σύμπλοκο να «μαρκάρει» τις αλληλουχίες αυτές του DNA. Ακόμα μια μελέτη της ομάδας του Nils Nolte με το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{bip-OH})]^{2+}$ -PNA μελετήθηκε με DNA και βρέθηκε να υπάρχει θερμοκρασία τήξης ($53,9 \pm 0,1$) όπου είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται θερμοκρασία τήξης για σύμπλοκο PNA –DNA. Άμεση συνέπεια της σύζευξης με PNA ήταν και η σύζευξη και DNA [89].

Πολλά από τα μεταλλοπεπτίδια που αναφέρθηκαν δοκιμάστηκαν *in-vitro* για την αντικαρκινική τους δράση. Έτσι [53] το σύμπλοκο [Ru(trpy)(trpyCO-Gly-TrpCONH₂)]Cl₂ δοκιμάστηκε έναντι διαφορετικών κυτταρικών καρκινικών σειρών και έδειξε ότι έχει ισχυρή κυτταροτοξική δράση. Σε πρόσφατες μελέτες [62, 63] συντέθηκαν και μελετήθηκαν σύμπλοκα του Pt(IV) με υποκαταστάτες κυκλοεξυλαμίνη ή αμμωνία και συζευγμένα πεπτίδια στους αξονικούς δικαρβοξυλικούς υποκαταστάτες (σχ. 1.33).



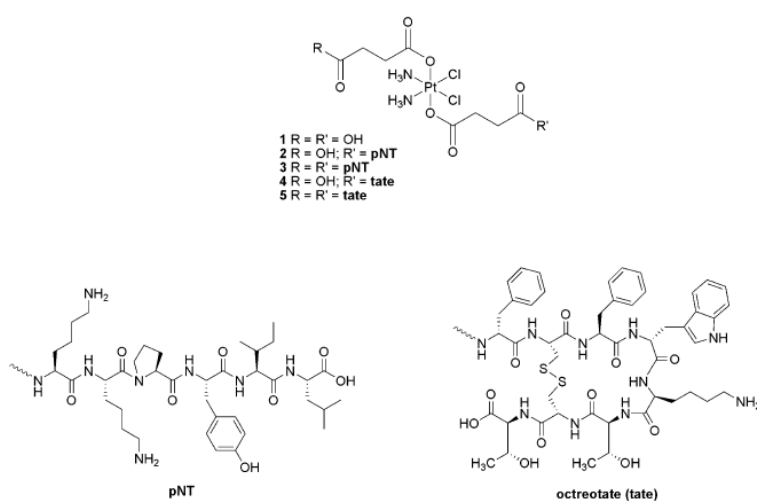
Σχήμα 1.33. Σύμπλοκα του Pt(IV)

Στην πρώτη περίπτωση [63] συντέθηκε ένα σύμπλοκο με δομικές ομοιότητες με τα oxaliplatin και satraplatin και την TAT (Trans-Acting Activator of Transcription), μία πρωτεΐνη του ιού HIV-1 που ανακαλύφθηκε το 1987. Η ελάχιστη περιοχή της πρωτεΐνης που απαιτείται για το πέρασμα από την κυτταρική μεμβράνη προσδιορίστηκε από το 47^ο μέχρι το 57^ο αμινοξύ. Αυτό το μέρος του πεπτιδίου διευκολύνει την ενδοκυτταρική μεταφορά διαφόρων συστημάτων, όπως φάρμακα με περιορισμένη κυτταρική διαπερατότητα, μεγαλύτερα βιομόρια και ακόμη και φορείς όπως λιποσώματα και νανοσωματίδια. Έπισης, βρέθηκε ένα ακόμα σημαντικό πλεονέκτημα της TAT, η οποία μπορεί να ξεπεράσει το κύριο εμπόδιο, τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό [90, 91] στην θεραπεία στον καρκίνο του εγκεφάλου.



Σχήμα 1.34. Σύμπλοκα του Pt(IV) μόνο-συζευγμένα(II) και δι-συζευγμένα(III) με το πεπτιδίο TAT.

Όπως δείχνουν τα κυτταροτοξικά πειράματα σε διάφορες καρκινικές σειρές η τιμή του IC_{50} των συμπλοκών (II),(III) (σχ. 1.34) βρίσκεται στην περιοχή του μM . Ειδικά στην κύτταρική καρκινική σειρά CH1, οι ενώσεις (II), (III) έχουν 39 και 8 φορές αντίστοιχα μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα από τα σύμπλοκα που δεν είναι συζευγμένα με το πεπτιδίο TAT (I). Σε μια ακόμα έρευνα [63] με παρόμοιο σκεπτικό, το μόριο που μεταφερόταν ήταν ένα οκταεδρικό σύμπλοκο του Pt(IV) όπως φαίνεται στο (σχ. 1.35). Η μητρική ένωση συζεύχθηκε με δυο διαφορετικού τύπου πεπτίδια (α) την pNT ψευδονευροτενσίνη (Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) και (β) την οκτρεοτίδη (D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH)



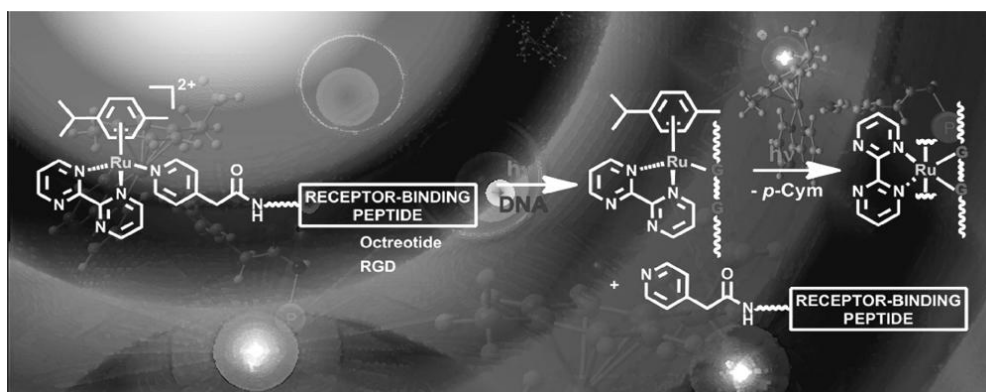
Σχήμα 1.35. Πεπτίδια pNT ψευδονευροτενσίνης (Lys-Lys-Pro-Tyr-Ile-Leu) και της οκτρεοτίδης (D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH) και το συμπλόκου του Pt(IV).

Σε μετρήσεις που έγιναν σε διαφορετικές καρκινικές σειρές οι τιμές IC_{50} των συμπλόκων με τα συζευγμένα πεπτίδια έδειξαν ότι οι ενώσεις 2-4 είναι γενικά καλοί αναστολείς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με την αρχική ένωση του λευκοχρύσου (IV) (1). Τα δύο ελευθερά πεπτίδια (tate και PNT) και η αρχική ένωση (1) εμφανίζουν χαμηλή ή καθόλου βιολογική δράση, ενώ ο συνδυασμός δίνει πάντα χαμηλότερες τιμές IC_{50} . Συμπερασματικά η αξιοσημείωτη αύξηση της κυτταροτοξικότητας από την ένωση (1) στις ενώσεις (2-5) σχετίζεται σχεδόν αποκλειστικά με την παρουσία του συζευγμένου πεπτιδίου στην αξονική θέση. Εκτός από τα σύμπλοκα του Pt(II) συζευγμένα με πεπτίδια [62, 63] σύμπλοκα και του Ru(II) έχουν μελετηθεί για την κυτταροτοξικότητά τους έναντι διαφόρων κυτταρικών καρκινικών σειρών. Σε μια ανάλογη μελέτη [13] με τις προηγούμενες συντέθηκαν σύμπλοκα του Ru(III) με ένα ενταγμένο ισονικοτινικό οξύ (inaH) να συζευγνύεται με ένα μέρος του πεπτιδίου TAT που προαναφέραμε (βλ. πίν. Σ1.11 παρ.). Οι τιμές IC_{50} των συμπλόκων $trans-[Ru(NH_3)_4(inaH)(NO)](BF_4)_3$ $trans-[Ru(NH_3)_4(inaH-TAT48-60)(NO)](BF_4)_3$ με κύτταρα του μελανώματος B16-F10 βρέθηκε να είναι 21 μM και 23 μM αντίστοιχα, πολύ κοντά στο αντικαρκινικό φάρμακο *cis-platin* με τιμή $IC_{50}=33 \mu M$.

Σε πρόσφατη μελέτη [14] του Hartinger και των συνεργατών του συντέθηκε το σύμπλοκο $Ru(\eta^6-cym)(L)Cl$ όπου η^6-cym = p-κουμένιο και L ένα παράγωγο του τριαζολίου συζευγμένο με ένα πεπτίδιο την $[Leu^5]$ -εγκεφαλίνη. Το συζευγμένο σύμπλοκο [29] του $Ru(\eta^6-cym)(L)Cl$ που προκύπτει, έδειξε σημαντική κυτταροτοξική δράση έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς CH1 με $IC_{50} 13(\pm 5) \mu M$ σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη που δεν είναι δραστήσιος.

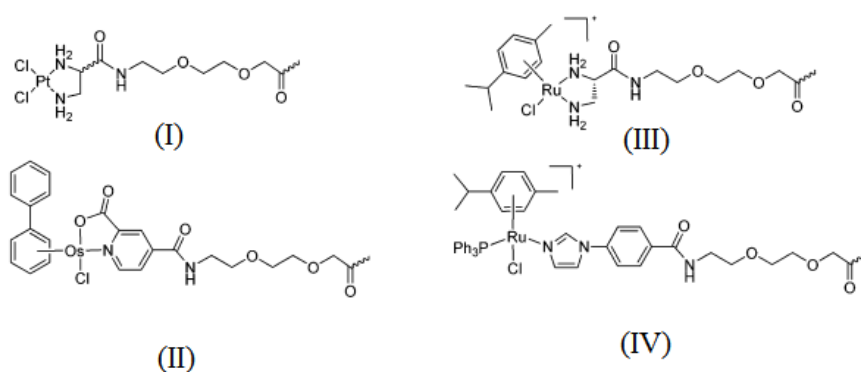
Στις εργασίες [8, 11] ο V. Marchan οι συνεργάτες του συνθέτουν και μελετούν την κυτταροτοξική δράση ανάλογου τύπου σύμπλοκα όπως τα $[(\eta^6-p-cym)Ru(bpm)(L)]^+$ $[(\eta^6-p-cym)RuCl-(imidazole-CO_2H)(PPh_3)]^+$ συζευγμένα με πεπτίδια. Στην εργασία [11] συντέθηκε το σύμπλοκο $[(\eta^6-p-cym)Ru(bpm)(L)]^+$

οπου p-cym = p-κουμένιο, bpm = διπυριμιδίνη και L=2-(4-υλ)οξικό οξύ με συζευγμένο το τριπεπτίδιο Arg-Gly-Asp ονομαζόμενο RGD. Όταν το σύμπλοκο αναμιγνύεται με το DNA και ακτινοβολείται με φως αποδεσμεύεται ο L και το σύμπλοκο δεσμεύεται στην γουανίνη. Στην συνέχεια το αρένιο αποδεσμεύεται και το Ru(II) συνδέεται χηλικά σε δυο γειτονικές βάσεις γουανίνης όπως βλέπουμε στην εικόνα 1.4.



Εικόνα 1.4. Φωτοπροκαλούμενη αποδέσμευση υποκαταστατών και η ένταξη του Ru(II) σε δυο γειτονικές βάσεις γουανίνης.

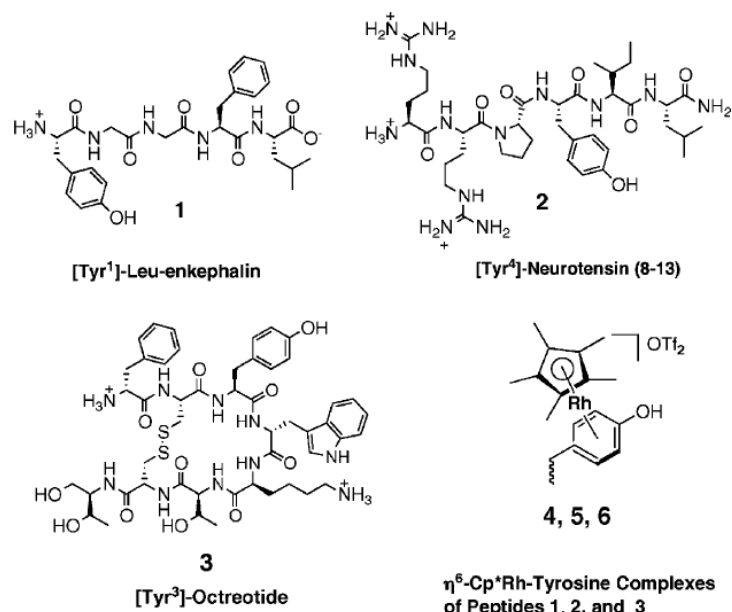
Στην εργασία [8] συντέθηκαν μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν οι τιμές IC₅₀ τεσσάρων σύμπλοκων ενώσεων Ru(II) (σχ. 1.36), με διαφορετικούς υποκαταστάτες αλλά με το ίδιο συζευγμένο πεπτίδιο ένα δικάρβα ανάλογο της οκτρεοτίδης.



Σχήμα 1.36. Σύμπλοκα της ομάδας του Pt όπου μελετούνται για την κυτταροτοξική τους δράση.

Μόνο το σύμπλοκο (IV) επιδεικνύει κυτταροτοξική δραστηριότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν είναι: Πρώτον η απώλεια της κυτταροτοξικής δραστηριότητας των (I), (II), (III) σε σχέση με το αρχικό σύμπλοκο οφείλεται στην σύζευξη του πεπτιδίου όπως φαίνεται και από τις τιμές IC_{50} των αρχικών και των συζευγμένων συμπλόκων. Σε MCF-7 και DU-145 καρκινικές κυτταρικές σειρές, οι τιμές IC_{50} του αρχικού συμπλόκου είναι $IC_{50} = 3.32 \pm 0.54 \mu M$ $IC_{50} = 6.80 \pm 0.99 \mu M$ ενώ αυτά του συζευγμένου με το πεπτίδιο (IV) είναι $IC_{50} = 63,00 \pm 1,53 \mu M$ σε και $IC_{50} = 26,00 \pm 2,00 \mu M$ αντίστοιχα. Δεύτερον, παρά την αλλαγή κάποιων αμινοξέων στην αλληλουχία της δικάρβα-οκτρεοτίδης η συνολική δομή της ουσιαστικά διατηρείται πάνω στο σύμπλοκο. Έτσι η συγγένεια του για τους υποδοχείς της σωματοστατίνης δεν διαταράσσεται κατά την σύζευξη του με το σύμπλοκο. Αυτό επαληθεύεται και από την υψηλότερη συγκέντρωση Ru στα καρκινικά κύτταρα του συζευγμένου συμπλόκου σε σύγκριση με το αρχικό σύμπλοκο, αποδεικνύοντας ότι το πεπτίδιο συνεισφέρει στην μεταφορά του συμπλόκου στο εσωτερικό του κυττάρου. Τρίτον η αρκετά υψηλότερη έκφραση του υποδοχέα ssr_2 στα καρκινικά κύτταρα DU-145 σε σύγκριση με καρκινικά κύτταρα MCF-7 βρίσκεται σε συμφωνία με τις τιμές των IC_{50} του συμπλόκου και στις δυο καρκινικές σειρές.

Σύμπλοκα του ροδίου με υποκαταστάτες πεπτίδια τυροσίνης (η^6 -ενταγμένη) [92] τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες περιπτώσεις (εγκεφαλίνη, νευροτενσίνη και οκτρεοτίδη), μελετήθηκαν σε ότι αφορά την επίδραση του πεπτιδίου σε πιθανή παρεμπόδιση της ανάπτυξης των MCF7 και HT29 καρκινικών κυτταρικών σειρών σε μια προσπάθεια κατανόησης του τρόπου της βιολογικής τους δράσης.

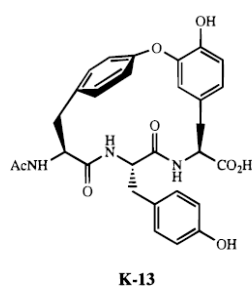


Σχήμα 1.37. Τα ελεύθερα πεπτίδια εγκεφαλίνης (1), νευροτενσίνης (2) και οκτρεοτίδης (3) και τα αντίστοιχα <<sandwich>> σύμπλοκα συζευγμένα με τα τρία παραπάνω πεπτίδια (4, 5, 6).

Τα σύμπλοκα του ροδίου (σχ. 1.37) με την εγκεφαλίνη και την οκτρεοτίδη μελετήθηκαν σε καρκινικές σειρές κυττάρων και συγκρίθηκαν με τα ελεύθερα πεπτίδια και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα σύμπλοκα είχαν τιμές IC₅₀ σχεδόν διπλάσιες από τα αντίστοιχα ελεύθερα πεπτίδια. Το IC₅₀ του συμπλόκου (4) ήταν 4,1 μM στην κυτταρική σειρά MCF7 ενώ το ελεύθερο πεπτίδιο της εγκεφαλίνης είναι 2,8 μM. Στην κυτταρική σειρά HT29 το σύμπλοκο (6) είχε IC₅₀ 5,3 μM κατατι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο πεπτίδιο της οκτρεοτίδης (4,3 μM). Το σύμπλοκο [93] [RuCl₂(Cp⁺-L-PNA)(CO)₂] όπου Cp⁺-L-PNA=τερτ-βούτυλ-N-[2-(N-9-φλουορένυλ-μέθοξυ-καρβόνυλ)αμινομεθυλ]-N-[6-(2-(πύριδιν-2-υλ-)πυριμιδίνη-4-καρβοξάμιδο)εξανο-υλ]γλυκινικό) μπορεί να αποδεσμεύσει CO κατόπιν ακτινοβολήσης του με φως και μελετήθηκε για την παρεμπόδιση της λειτουργίας βιολογικών ενζύμων.

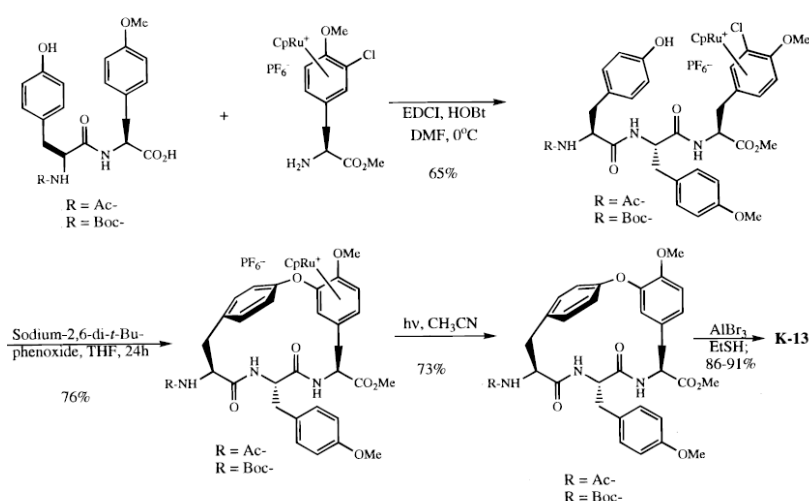
1.3.4. Άλλες εφαρμογές

Ακόμη μια εφαρμογή των συμπλόκων των η⁶ ενταγμένων αμινοξέων στο ρουθίνιο είναι η δυνατότητα που έχουν να δρουν ως ενδιάμεσα, στην σύνθεση κυκλικών πεπτιδίων [94, 95], όπως στην περίπτωση του K-13 [96] (σχ. 1.38) που είναι ένας φυσικός μη-ανταγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου της αγγειοτενσίνης (ACE).



Σχήμα 1.38. Δομή K-13.

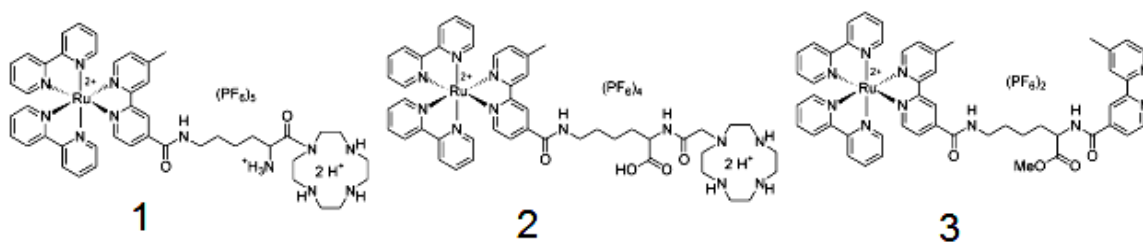
Η συνθετική πορεία των κυκλικών αυτών πεπτιδίων διευκολύνεται μέσω του ενδιάμεσου συμπλόκου του ρουθινίου με το πεπτίδιο, όπως φαίνεται στο σχήμα 1.39. Με αυτού του τύπου την συνθετική πορεία το αιθερικό πεπτίδιο λαμβάνεται σε μεγάλη απόδοση και υψηλή καθαρότητα.



Σχήμα 1.39. Σύνθεση κυκλικών πεπτιδίων.

Η ανίχνευση ενώσεων μέσω συμπλόκων με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες συζευγμένους με πεπτίδια είναι ακόμα μια εφαρμογή των μεταλλοπεπτιδίων. Σύμπλοκα του Ru(II) με κορεσμένη σφαίρα ένταξης με δυο 2,2' διπυριδίλια και ένα 2,2' διπυριδιλιακό υποκαταστάτη τροποποιημένο με ένα ή δυο υδροξυμικά παράγωγα της αλανίνης, μετά από φωτοδιέγερση παράγουν νιτρόξυλ-ρίζες [97]. Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4,4'-(\text{CONH-L})_2\text{-bpy})]^{2+}$ όπου L = υδροξυμικό παράγωγο της αλανίνης χαρακτηρίζεται από ισχυρή προτίμηση να εγκλωβίζει ρίζες σουπεροξειδίου σε κλωβούς που σχηματίζονται μεταξύ του συμπλόκου και των λειτουργικών αυτών ομάδων του τροποποιημένου διπυριδιλιακού υποκαταστάτη και μοριακού οξυγόνου O_2 .

Ο R. Alsfasser και η ομάδα του συνέθεσαν [98] τρία σύμπλοκα του ρουθενίου δυο από τα οποία εμφανίζουν εκλεκτικότητα ως προς την δέσμευση το χαλκού (σχ. 1.40).

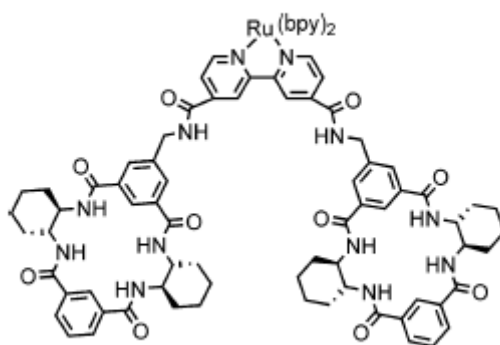


Σχήμα 1.40. Σύμπλοκα του ρουθενίου που μελετούνται ως ανιχνευτές χαλκού.

Το πρώτο σύμπλοκο δεσμεύει το χαλκό, αλλά σε όξινο pH τον αποδεσμεύει. Το δεύτερο σύμπλοκο δεσμεύει εκλεκτικά το χαλκό σε αναλογία 1:1 και είναι σταθερό σε ένα εύρος pH 2-12. Το τρίτο σύμπλοκο αποδεσμεύει το χαλκό κάτω από βασικές συνθήκες, σε pH μεγαλύτερο του 10. Το σύμπλοκο (3) είναι, λόγω της αναστρεψιμότητας σε υψηλό pH, ένα πολύ καλό παράδειγμα υποδοχέα ανίχνευσης χαλκού.

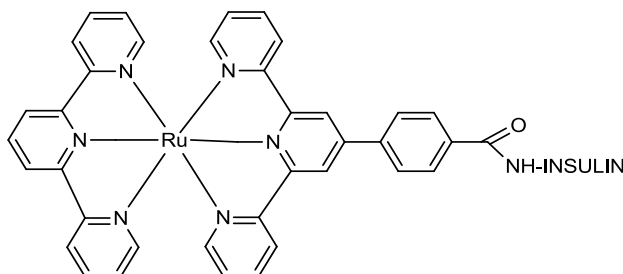
Τρις-χηλικά σύμπλοκα του Ru(II) με τροποποιημένα διπυριδία συντέθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές φωσφορικών ανιόντων H_2PO_4^- [99].

Το σύμπλοκο του Ru(II) του σχήματος 1.41 χρησιμοποιήθηκε για τον στερεοεκλεκτικό διαχωρισμό του πεπτιδίου Ac-Ala-Gly-AlaNH $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ [100].



Σχήμα 1.41. Το τριπεπτίδιο Ac-Ala-Gly-AlaNH $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$, λόγω των D και L μορφών της αλανίνης προσφέρει τέσσερα ισομερή του παραπάνω πεπτιδίου τα DL, DD, LD, LL. Το παραπάνω σύμπλοκο ήταν σε θέση να διαχωρίσει σε υγρή φάση το DD ισόμερες σε σχέση με τα υπόλοιπα τρία ισομερή.

Ενώσεις του Ru(II) μπορούν να χρησιμεύσουν ως ανιχνευτές αλληλουχιών αμινοξέων πρωτεϊνών [33]. Συντέθηκε αρχικά ένα σύμπλοκο ρουθηνίου με μια τερπυριδίνη και μια 4- κάρβοξυ-φαίνυλ-υποκατεστημένη τερπυριδίνη και στην συνέχεια επισημάνθηκε με A και B αλυσίδες ινσουλίνης (σχ. 1.42)



Σχήμα 1.42. Σύμπλοκο του Ru(II) συζευγμένο με ινσουλίνη.

Το παραπάνω σύμπλοκο αφέθηκε να αντιδράσει με πρωτεϊνικά μείγματα μυογλοβίνης, λυσοζύμης και αμπικουτίνης και στη συνέχεια αναλύθηκαν με τεχνικές PMF (Peptide Mass Fingerprint) και PST (Peptide Sequence Tagging). Αυτή η τεχνική εξασφάλιζε ότι με ανάλυση μόνο φασμάτων μάζας, λόγω του χαρακτηριστικού του μοριακού βάρους, μπορούν να ανιχνευτούν συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων που δεσμεύονται πάνω στο σύμπλοκο με την ινσουλίνη.

Το σύμπλοκο [31] $(\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dcbpy}))$ όπου $\text{bpy}=2,2'$ -διπυριδύλιο και $\text{dcbpy}=4,4'$ -(CO_2H)₂-διπυριδίνη συζευγμένο με δυο όμοια οκταπεπτίδια συντέθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως βιοανιχνευτής για την ανίχνευση ενός ειδικού αντιγόνου που υπάρχει στην πρωτεΐνη PSA που εκκρίνεται από τον προστάτη. Ανάλογη χρήση ως ανιχνευτών αντιγόνων θρομβίνης και αντιχολερικών τοξίνων βρίσκουν διλειτουργικά συμπολυμερή του Ru(II) συζευγμένα με λυσίνη και πυρενίο. Τα σύμπλοκα παράγονται με ηλεκτροχημικό τρόπο σε ηλεκτρόδια λευκόχρυσου μέσω πολυμερισμού του πυρενίου [101].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ

2.1.1. Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες CH_3OH , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, CHCl_3 , CH_2Cl_2 , CH_3CN , DMF, DMSO, $\text{C}_2\text{H}_4(\text{OH})_2$, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας 99,9% και δεν χρειάστηκε περαιτέρω καθαρισμός τους. Όμοια τα χημικά αντιδραστήρια 2-ακετυλοπυριδίνη, βενζαλδεΐδη, γλυοξυλικό αιθύλιο, πιπεριδίνη, πυριδίνη, νινυδρίνη, KCN, KOH, NH_4PF_6 , KPF_6 , HPF_6 , LiCl, NaCl, TFA, DIPEA και η 2,2':6',2''-τερπυριδίνη ήταν καθαρότητας 99-99,9% και δεν ακολουθήθηκαν άλλες διαδικασίες καθαρισμού. Τα αμινοξέα L-λυσίνη, γλυκίνη, τρυπτοφάνη και 6-αμινοεξανοϊκό οξύ που χρησιμοποιήθηκαν για την πεπτιδική σύνθεση ήταν προστατευμένα με χρήση Fmoc, Boc ομάδων και οι διαλύτες NMP και DMF ήταν κατάλληλοι για πεπτιδική σύνθεση. Για την στήλη χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε SiO_2 0.015-0.040 mm (230-400) mesh. Το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ αγοράστηκε από την εταιρία Eurogentec και οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών 50-100 mM στους 298 K και σε pH = 7,0. Τα σύμπλοκα Δ - and Δ -[Ru(bpy)₂(4-COY-4'-Mebpy)]Cl₂ όπου Y τα πεπτίδια Gly-Lys-Lys (1) -Lys-Gly-Lys (2) -Lys-Lys-Gly (3) χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα από προηγούμενη μελέτη [2].

2.1.2. Φυσικές μετρήσεις

2.1.2.1. Φασματοσκοπία NMR

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν οι δευτερωμένοι διαλύτες DMSO d₆, CDCl_3 , D₂O και CD_3CN καθαρότητας 99,9%. Τα τρία όργανα που ελήφθησαν τα φάσματα ήταν της Brüker Avance και ήταν τα AV-250 (250 MHz), AV-400 (400,13 MHz), AV-500 (500,13 MHz) του οριζόντιου δικτύου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Όλα τα φάσματα NMR καταγράφηκαν στους 298 K. Όλα τα φάσματα δυο διαστάσεων καταγράφηκαν

με τετραπολική ανίχνευση και στις δυο διαστάσεις χρησιμοποιώντας την μέθοδο TPPI. Τα είδη φασμάτων που καταγράφηκαν ήταν μιας διάστασης ^1H NMR και δυο διαστάσεων COSY, TOCSY, NOESY όπου τα NOESY φάσματα καταγράφηκαν σε χρόνους μίξης 300-400 ms. Η ανάλυση όλων των δεδομένων των φασμάτων έγινε με αποκλειστική χρήση του προγράμματος MNOVA. Όλα τα δείγματα NMR παρασκευαστήκαν με προσθήκη 500 μL του εκάστοτε διαλύτη σε 1-5 mg της ως προς μελέτη ουσίας, ανάλογα με το μοριακό της βάρος.

Η ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου εκτιμήθηκε αρχικά με ζύγιση και στην συνέχεια προσδιορίστηκε βάσει της απορρόφησης του στα 260 nm σύμφωνα με την σχέση $\text{Coligo} = A_{260} / E_{\text{oligo}} \cdot I$ όπου Coligo είναι η συγκέντρωση του ολιγονουκλεοτιδίου σε $\mu\text{g}/\text{mL}$, A_{260} είναι η απορρόφηση στα 260nm και E_{oligo} είναι ο ειδικός συντελεστής μοριακής απορρόφησης σε $(\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}\text{cm}^{-1}$ ίσος με 11400. Τα δείγματα DNA για τις μελέτες διαλυτοποιούνται σε προπαρασκευασθέν διάλυμα που περιέχει 90% ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (100 μM) και 10% D_2O . Η τελική συγκέντρωση του ολιγονουκλεοτιδίου είναι περίπου 1-2 mM. Η κατάλληλη ποσότητα συμπλόκου του Ru(II) ζυγίστηκε σε ζυγό υψηλής ακρίβειας πέντε δεκαδικών ψηφίων διαλύθηκε στο ίδιο διάλυμα με το νουκλεοτίδιο και προστίθεται στο πρώτο διάλυμα.

2.1.2.2. Φασματομετρία μάζας

Τα φάσματα ESI-MS (Electrospray Ionisation mass spectra) καταγράφηκαν σε φασματογράφο μάζας της Agilent Technology LC/MSD trap SL instrument and Thermo Scientific, LTQ Orbitrap XLTM με την διαδικασία της άμεσης έκχυσης στην οργανολογία οριζόντιων δικτύων φασματοσκοπίας μάζας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο διαλύτης CH_3CN που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατάλληλος για χρήση φασμάτων μάζας και τα δείγματα παρασκευάστηκαν με διαλυτοποίηση 1 mg της ως προς ανάλυση ουσίας σε 10 mL CH_3CN . Η ανάλυση όλων των

φασμάτων μάζας πραγματοποιήθηκε με αποκλειστική χρήση του προγράμματος Xcalibur.

2.1.2.3. Φασματοσκοπία UV-vis

Η λήψη των φασμάτων απορρόφησης υπεριώδους-ορατού πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο UV-VIS/SPECORD 205 analytikjena, με κυψελίδες από χαλαζία οπτικής διαδρομής $b = 1\text{ cm}$ και διαλύτες CH_3CN και H_2O υψηλής καθαρότητας για UV.

2.1.2.4. Κυτταροτοξικά πειράματα

Τα κυτταροτοξικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρικές καρκινικές σειρές (α) του λειομυοσαρκώματος (LMS) των ποντικών Wistar (b) του καρκίνου του πνεύμονα MCF-7, (c) του ανθρωπινού οστεοσαρκώματος U2OS και (d) της λευχαιμίας K562. Χρησιμοποιήθηκαν φυσιολογικά κύτταρα (lung fibroblasts) (MRC-5 cells). Όλα τα είδη κυττάρων επώαστηκαν σε πολλαπλά τριβλία (5000 κύτταρα σε $100\text{ }\mu\text{M}$ DMEM για κάθε δίσκο) και εν συνεχεία επώαστηκαν για 24 h στους $37\text{ }^\circ\text{C}$, 95% O_2 and 5% CO_2 . Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα τα μεταλλικά σύμπλοκα προστίθενται σε διάφορες συγκεντρώσεις ώστε να προσδιοριστεί το IC_{50} .

Για την ποσοτική αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δραστηριότητας του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-CONH-Gly-TrpCONH}_2)_2]\text{Cl}_2$, σε νεοπλασματικές και φυσιολογικές κυτταρικές σειρές, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού MTT. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των ζωντανών κυττάρων να προκαλέσουν μείωση του MTT παράγοντα. Το MTT διαλύθηκε σε PBS (2 mg / mL), και διηθήθηκε. Εν συνεχεία μια μικρή ποσότητα αδιάλυτου υλικού απομακρύνθηκε και το διάλυμα στη συνέχεια αποστειρώθηκε. Έπειτα από 48 ώρες επώασης των κυττάρων με το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-CONH-Gly-}$

TrpCONH₂)₂]Cl₂, 50 μ L του διαλύματος MTT προστέθηκαν σε κάθε μικροκυψελίδα πολλαπλών πλακών και επώαστηκαν 3 ώρες υπό τις ίδιες συνθήκες. Μετά απο τις 3 ώρες επώασης, το περιεχόμενο των μικροκυψελίδων απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 200 μ L DMSO. Η οπτική απορρόφηση του περιεχομένου των μικροκυψελίδων μετρήθηκε στα 540 - 570 nm χρησιμοποιώντας φίλτρο των 690 nm. Οι κυτταροτοξικές δοκιμασίες για κάθε κυτταρική σειρά επαναλήφθηκαν επτά φορές.

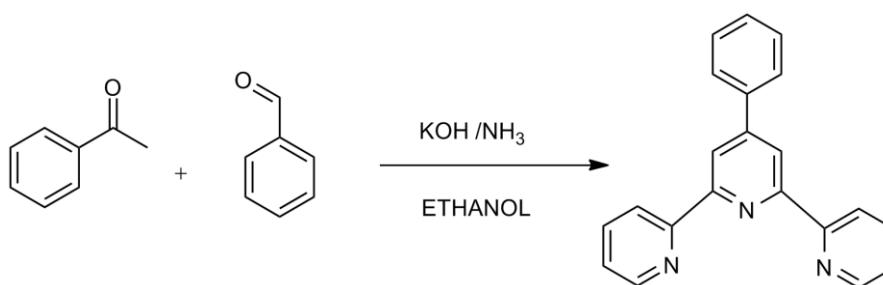
2.2. ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

2.2.1.Σύνθεση υποκαταστατών

2.2.1.1. Σύνθεση της 4'-φαίνυλ-2,2':6',2''-τερπυριδίνης (*ptrpy*).

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις των βιβλιογραφικών μεθόδων [102, 103]

4,84 g (40 mmol) 2-ακετυλοπυριδίνης προστέθηκαν σε ένα διάλυμα που περιείχε 2,12 g (20 mmol) βενζαλδεΐδης και 100 mL αιθανόλης σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 20 min. Στο προκύπτον διάλυμα προστέθηκαν 3,08 g, (40 mmol) υδροξειδίου του καλίου 85% και 58 mL, (50 mmol) πυκνής αμμωνίας 29,3% w/v. και ακολούθησε ανάδευση για 4 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρατηρήθηκε σχηματισμός υποπράσινου ιζήματος. Το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner, και εν συνέχεια έγινε έκπλυση με ψυχρή αιθανόλη. Το τελικό λευκό προϊόν λήφθηκε με ανακρυστάλλωση σε CH₃OH/CHCl₃ (95/5). Απόδοση: 61%, m/z: 309,13 amu

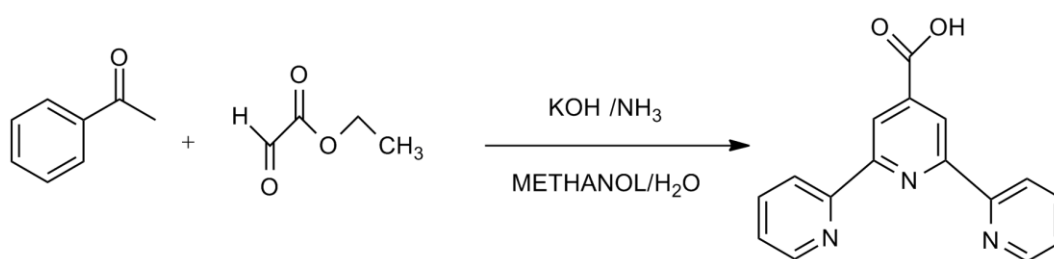


2.2.1.2. Σύνθεση της 4'-κάρβοξυ-2,2':6',2''-τερπυριδίνης (*trpy-COOH*)

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [104]

290 mg (2,4 mmol) 2-ακετυλοπυριδίνης προστέθηκαν σε ένα διάλυμα που περιείχε 0,238 mL (1,2 mmol) γλυοξυλικό αιθύλιο και 100 mL μεθανόλης σε

σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπο ανάδευση για 20 min. Στο προκύπτον διάλυμα προστέθηκαν 7,2 mL (2,4 mmol) 15% κ.β. υδροξειδίου του καλίου και 0,8 mL, (2,4 mmol) πυκνής αμμωνίας 29,3% w/v κ.ο και ακλούθησε ανάδευση για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρατηρήθηκε σχηματισμός ροζ ιζήματος. Το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner, και ακολούθως έγινε έκπλυση με CHCl_3 (4 mL) και ψυχρό διάλυμα $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1 περίπου 4 mL). Το σχηματισθέν ίζημα επαναδιαλύθηκε σε μίγμα $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80/20) με τη βοήθεια συσκευής υπερήχων στους 35 °C και ακολούθως οξινίστηκε με διάλυμα υδροχλωρικού οξέος 0,1 M μέχρι $\text{pH} = 2$ οπότε εμφανίστηκε λευκό ίζημα. Το λευκό ίζημα διηθήθηκε με χρήση πτυχωτού ηθμού, και εν συνέχεια έγινε έκπλυση με ψυχρή αιθανόλη. Απόδοση: 48%, m/z : 277,09 amu

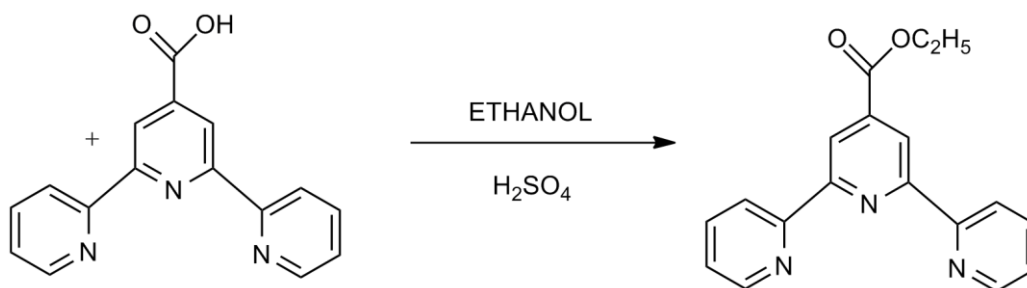


2.2.1.3. Σύνθεση της 4'-κάρβοξυ-αίθυλ-εστέρα-2,2':6',2''-τερπυριδίνης (*try-COOC₂H₅*)

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [104].

310 mg (1,19 mmol) 4'-κάρβοξυ-2,2':6',2''-τερπυριδίνης προστέθηκαν σε ένα διάλυμα που περιείχε 0,2 mL πυκνού θεικού οξέος και 150 mL αιθανόλης σε σφαιρική φιάλη των 250 mL, ακολούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα (reflux) στους 70°C για 24 h. Εν συνέχεια απομακρύνθηκε το μεγαλύτερο μέρος του διαλύτη με χρήση περιστροφικού συμπυκνωτήρα και στο εναπομένον διάλυμα προστέθηκαν 100 mL νερό. Έπειτα το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή

pH = 7 όπου και εμφανίστηκε λευκό ίζημα. Το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner, και εν συνέχεια έγινε έκπλυση με ψυχρή αιθανόλη. Απόδοση: 94%, m/z: 305,12 amu



2.2.1.4. Σύνθεση της 2,3,5,6-τέτρα(2-πύριδυλ)πυραζίνη (trpz)

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [105].

2 g (9.2 mmol) α-πυριδοΐνης και 9 g (114,4 mmol) προστέθηκαν σε μία σφαιρική φιάλη των 250 mL, ακολούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα (reflux) σε ελαιολουτρο στους 180 °C για 6 h. Το σχηματισθέν κίτρινο ίζημα λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner, και ακολούθως έγινε έκπλυση με 10 ml ψυχρής αιθανόλης και 10 ml ψυχρού H₂O. Απόδοση: 62%. m/z: 388,14 amu

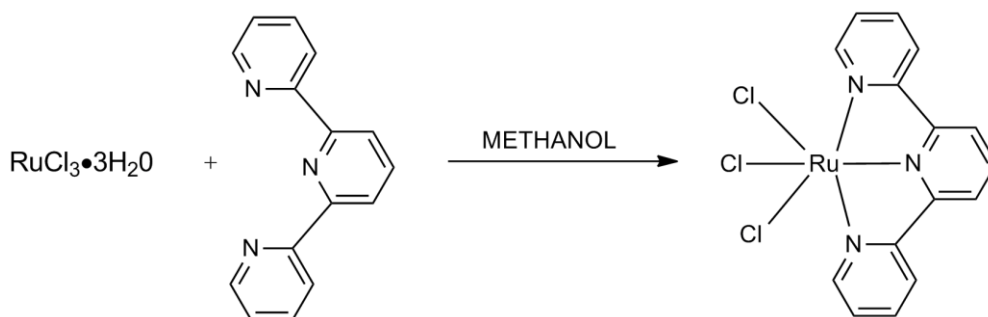


2.2.2. Σύνθεση συμπλόκων

2.2.2.1. Σύνθεση του συμπλόκου Ru(trpy)Cl₃

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [106].

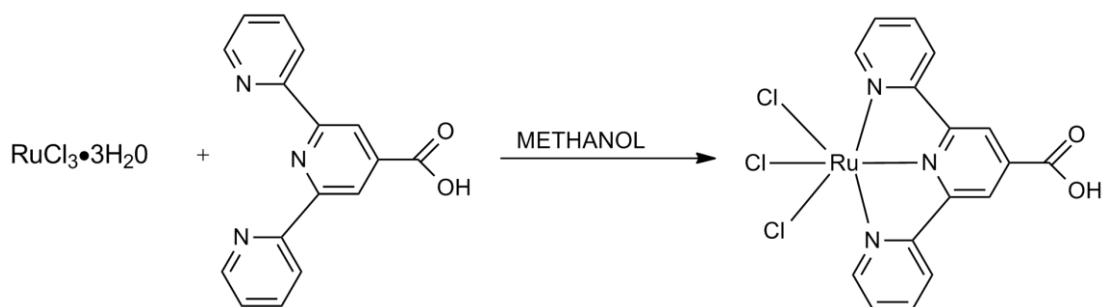
0,3 g (1,14 mmol) $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ προστέθηκαν σε διάλυμα 100 mL μεθανόλης που περιείχε 266 mg (1,14 mmol) 2,2':6',2''-τερπυριδίνης σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 2 h. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρατηρήθηκε σχηματισμός καφέ ιζήματος. Το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner, και στη συνέχεια έγινε έκπλυση με ψυχρή μεθανόλη. Απόδοση: 92%, m/z: 439,91 amu



2.2.2.2. Σύνθεση του συμπλόκου $\text{Ru}(\text{trpy-COOH})\text{Cl}_3$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [106]

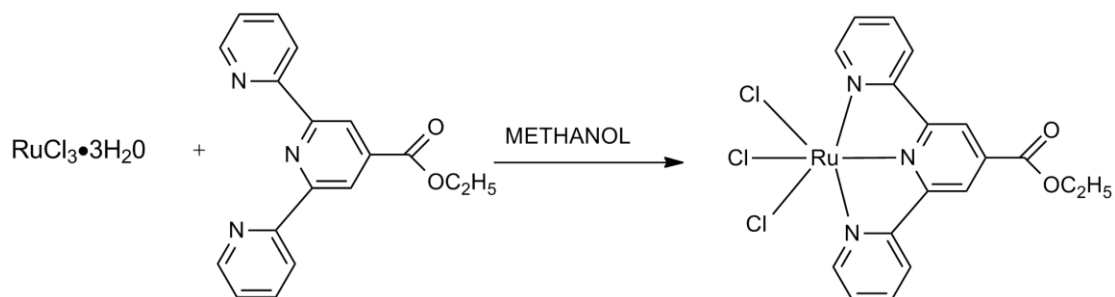
0,3 g (1,14 mmol) $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ προστέθηκαν σε διάλυμα 100 mL μεθανόλης που περιείχε 316 mg (1,14 mmol) 4'-κάρβοξυ-2,2':6',2''-τερπυριδίνης σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 2 h. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρατηρήθηκε σχηματισμός καφέ ιζήματος. Το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner, και στη συνέχεια έγινε έκπλυση με ψυχρή μεθανόλη. Απόδοση: 89%, m/z: 483,90 amu



2.2.2.3. Σύνθεση του συμπλόκου $Ru(trpy-COOC_2H_5)Cl_3$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [106].

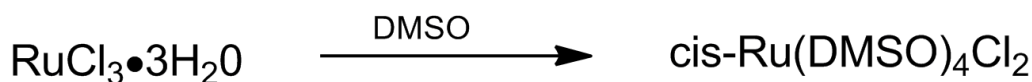
0,3 g (1.14 mmol) $RuCl_3 \cdot 3H_2O$ προστέθηκαν σε διάλυμα 100 mL αιθανόλης που περιείχε 348 mg (1.14 mmol) 4'-κάρβοξυ-αίθυλ-εστέρα-2,2':6',2''-τερπυριδίνης σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 2h. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρατηρήθηκε σχηματισμός καφέ-κόκκινου ιζήματος. Το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner, και στη συνέχεια έγινε έκπλυση με ψυχρή αιθανόλη. Απόδοση: 84%, m/z: 511,93 amu



2.2.2.4. Σύνθεση του συμπλόκου $cis-Ru(DMSO)_4Cl_2$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [107].

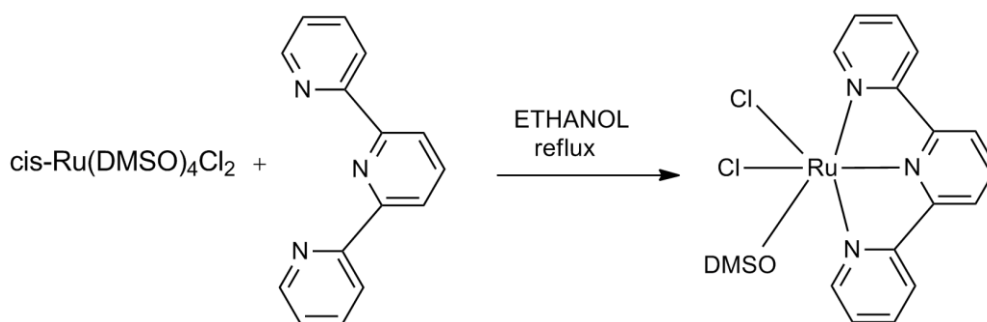
0,9 g (3.43 mmol) $RuCl_3 \cdot 3H_2O$ προστέθηκαν 5 mL dmsο σε ποτήρι ζέσεως και το μείγμα θερμάνθηκε υπό ανάδευση στους 130 °C έως όγκου 1,5-2 mL. Στο εναπομένον διάλυμα προστέθηκαν 30 mL ακετόνης και εμφανίστηκε κίτρινο ίζημα. Το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner, και στη συνέχεια έγινε έκπλυση με ακετόνη και διαιθυλαιθέρα. Απόδοση: 60%.



2.2.2.5. Σύνθεση του συμπλόκου $Ru(trpy)(DMSO)Cl_2$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις των βιβλιογραφικών μεθόδων [106].

0,3 g (0,62 mmol) $[Ru(DMSO)_4Cl_2]$ προστέθηκαν σε διάλυμα 100 mL αιθανόλης που περιείχε 144 mg (0,62 mmol) 2,2':6',2''-τερπυριδίνης σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και ακολούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα (reflux) στους 70 °C. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρατηρήθηκε σχηματισμός κόκκινου ιζήματος. Το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner, και στη συνέχεια έγινε έκπλυση με αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα. Απόδοση: 73%. Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $C_{17}H_{17}Cl_2N_3ORuS$ υπολογίστηκε, C: 42,24, H: 3,54, N: 8,69 βρέθηκε, C: 42,18, H: 3,57, N: 8,75

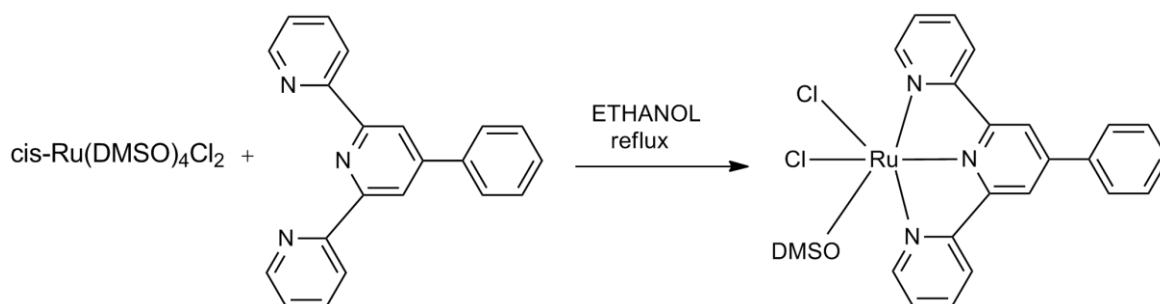


2.2.2.6. Σύνθεση του συμπλόκου $Ru(ptrpy)(DMSO)Cl_2$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [106]

0,3 g (0,62 mmol) $[Ru(DMSO)_4Cl_2]$ προστέθηκαν σε διάλυμα 100 mL αιθανόλης που περιείχε 192 mg (0,62 mmol) 4'-φαίνυλ-2,2':6',2''-τερπυριδίνης σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και ακολούθησε θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα (reflux) στους 70 °C. Μετά το πέρας της διαδικασίας παρατηρήθηκε σχηματισμός κόκκινου ιζήματος. Το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner, και εν συνέχεια έγινε έκπλυση με αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα.

Απόδοση: 73%. Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $C_{23}H_{21}Cl_2N_3ORuS$ υπολογίστηκε, C: 49,38, H: 3,78, N: 7,51 βρέθηκε, C: 49,30, H: 3,80 N: 7,52

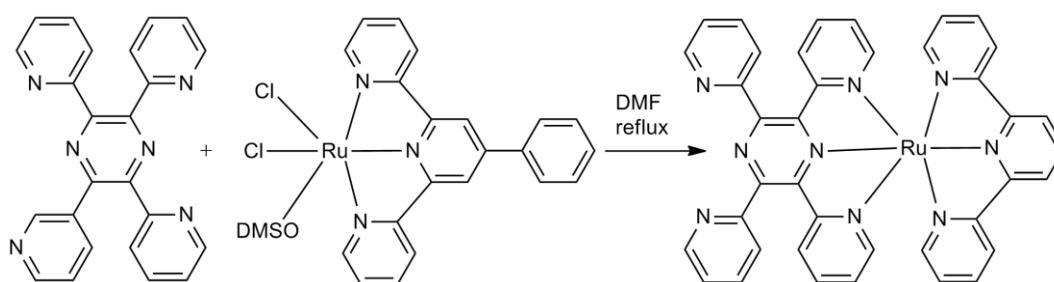


2.2.2.7. Σύνθεση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [104].

Σε τριλάιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL διαλύθηκαν 400 mg (1.03 mmol) tppz σε 80 mL DMF με χρήση κάθετου ψυκτήρα (reflux) στους 120 °C, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθως διαλύθηκαν 242 mg (0.5 mmol) $\text{Ru}(\text{trpy})(\text{DMSO})\text{Cl}_2$ σε 10 mL DMF και προστέθηκαν στάγδην στο μείγμα της σφαιρικής μέσα σε διάστημα 2 h ενώ η θέρμανση συνεχίστηκε για ακόμα 4 h. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε παρουσία αζώτου (bubbling). Εν συνεχεία αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα του διαλύτη υπό κενό λαμβάνοντας ένα πορτοκαλί στερεό το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 150 mL υδατικού διαλύματος κορεσμένου με NH_4PF_6 . Ύστερα από 30 min σχηματίστηκε ένα πορτοκαλί στερεό το οποίο διηθήθηκε σε πτυχωτό ηθμό λαμβάνοντας ένα μείγμα ενώσεων που περιείχε και το επιθυμητό $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{tppz})]\text{Cl}_2$. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη με χρήση χρωματογραφίας σε στήλη σίλικας 200 Mesh ύψους 30 cm και διαμέτρου 4 cm με διαλύτη έκλουσης $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (8/1) κορεσμένο με KNO_3 , ως το δεύτερο έγχρωμο κλάσμα. Αναλυτικά η διαδικασία καθαρισμού με στήλη έχει ως εξής: Αρχικά το μείγμα ενώσεων διαλύθηκε στο διάλυμα έκλουσης (10 mL) όπου η περίσσεια του tppz είναι αδιάλυτη, λαμβάνοντας με χρήση πτυχωτού ηθμού το διήθημα που θα διαχωριστεί στη συνέχεια στην στήλη. Η απομάκρυνση του

ακετονιτριλίου από τα κλάσματα της στήλης με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα μας δίνει ένα υδατικό διάλυμα, στο οποίο το KNO_3 είναι διαλυτό το δε σύμπλοκο αδιάλυτο. Το σύμπλοκο συλλέγεται με φυγοκέντρωση. Ακολουθούν πέντε εκπλύσεις (5 X 10 mL) με ψυχρό νερό για την απομάκρυνση του συνόλου του νιτρικού καλίου. Απόδοση: 54%. Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $\text{C}_{39}\text{H}_{27}\text{F}_{12}\text{N}_9\text{P}_2\text{Ru}$ υπολογίστηκε C: 46,25, H: 2,69, N: 12,45 και βρέθηκε C: 46,30, H: 2,67, N: 12,42

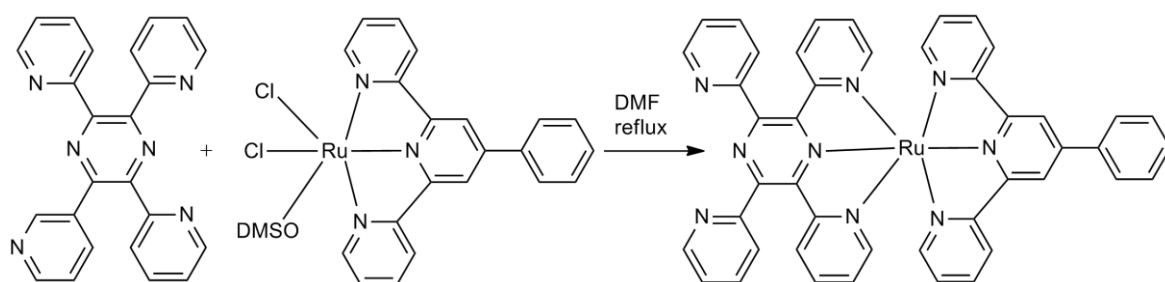


2.2.2.8. Σύνθεση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{ptrpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [104]

Σε τριλάιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL διαλύθηκαν 400 mg (1.03 mmol) tppz σε 80 mL DMF με χρήση κάθετου ψυκτήρα (reflux) στους 120 °C, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθως διαλύθηκαν 277 mg (0.5 mmol) $\text{Ru}(\text{ptrpy})(\text{DMSO})\text{Cl}_2$ σε 10 mL DMF και προστέθηκαν στάγδην στο μείγμα της σφαιρικής μέσα σε διάστημα 2 h ενώ η θέρμανση συνεχίστηκε για ακόμα 4 h. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε παρουσία αζώτου (bubbling). Εν συνεχεία αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα του διαλύτη λαμβάνοντας ένα πορτοκαλί στερεό το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 150 mL κορεσμένου με NH_4PF_6 υδατικού διαλύματος. Ύστερα από 30 min σχηματίστηκε ένα πορτοκαλί στερεό το οποίο διηθήθηκε σε πτυχωτό ηθμό λαμβάνοντας ένα μείγμα ενώσεων που περιείχε και το επιθυμητό $[\text{Ru}(\text{ptrpy})(\text{tppz})]\text{Cl}_2$. Το επιθυμητό προϊόν ελήφθη με χρήση χρωματογραφίας σε στήλη σίλικας 200 Mesh ύψους 30 cm και διαμέτρου 4 cm με

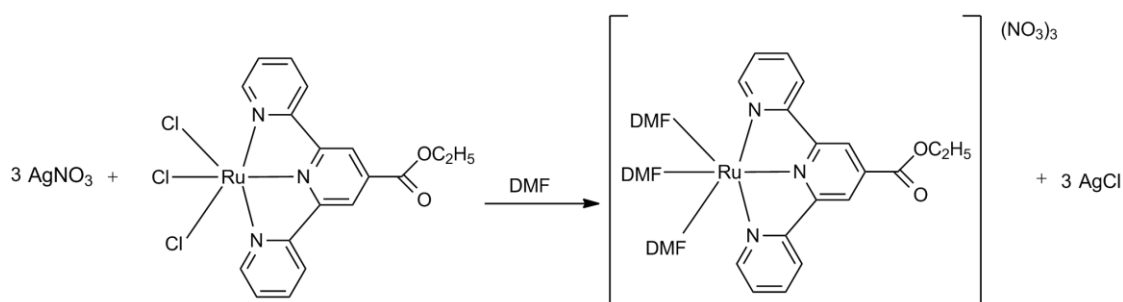
διαλύτη έκλουσης $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (8/1) κορεσμένο με KNO_3 , ως το δεύτερο έγχρωμο κλάσμα. Αναλυτικά η διαδικασία καθαρισμού με στήλη έχει ως εξής. Αρχικά το μείγμα ενώσεων διαλύθηκε στο διάλυμα έκλουσης (10 mL) όπου η περίσσεια του trpz είναι αδιάλυτη, λαμβάνοντας με χρήση πτυχωτού ηθμού το διήθημα που θα διαχωριστεί στη συνέχεια στην στήλη. Η απομάκρυνση του ακετονιτριλίου από τα κλάσματα της στήλης με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα μας δίνει ένα υδατικό διάλυμα, στο οποίο το KNO_3 είναι διαλυτό το δε σύμπλοκο αδιάλυτο. Το σύμπλοκο συλλέγεται με φυγοκέντρηση. Ακλουθούν πέντε εκπλύσεις (5 X 10 mL) με ψυχρό νερό για την απομάκρυνση του συνόλου του νιτρικού καλίου. Απόδοση: 61%. Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $\text{C}_{45}\text{H}_{31}\text{F}_{12}\text{N}_9\text{P}_2\text{Ru}$ υπολογίστηκε C: 49,64, H: 2,87, N: 11,58 και βρέθηκε C: 49,60, H: 2,88, N: 11,59



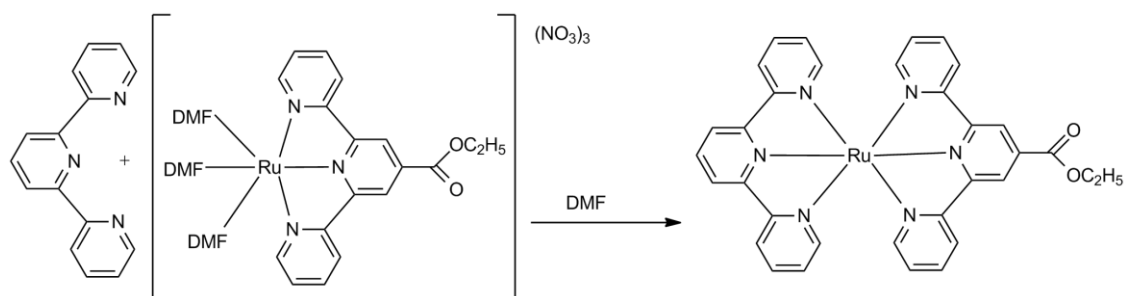
2.2.2.9. Σύνθεση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOC}_2\text{H}_5)(\text{trpy})](\text{PF}_6)_2$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [104].

250 mg (0,48 mmol) $\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOC}_2\text{H}_5)\text{Cl}_3$ προστέθηκαν σε ένα διάλυμα που περιείχε 245 mg (1.44 mmol) νιτρικού αργύρου και 100 mL DMF σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 h σε σκοτεινό μέρος. Υστέρα από το πέρας των 24 ωρών το μείγμα φυγοκεντρήθηκε και απομακρύνθηκε ο AgCl που σχηματίστηκε.



Στο υπερκείμενο διάλυμα που ελήφθη, προστέθηκαν 146 mg (0.48 mmol) 2,2':6',2''-τερπυριδίνης και το μείγμα θερμαίνεται με χρήση κάθετου ψυκτήρα (reflux) στους 120 °C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθως αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα του διαλύτη λαμβάνοντας ένα κόκκινο στερεό το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 150 mL κορεσμένου υδατικού διαλύματος NH_4PF_6 . Ύστερα από 30min σχηματίστηκε ένα κόκκινο στερεό το οποίο διηθήθηκε σε πτυχωτό ηθμό και εν συνεχεία έγινε έκπλυση με ψυχρή αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα λαμβάνοντας το επιθυμητό $[\text{Ru}(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_5)(\text{trpy})](\text{PF}_6)_2$. Απόδοση: 90%. Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{F}_{12}\text{N}_6\text{O}_2\text{P}_2\text{Ru}$ υπολογίστηκε C: 42,64, H: 2,82, N: 9,04 και βρέθηκε C: 42,70, H: 2,80, N: 9,03

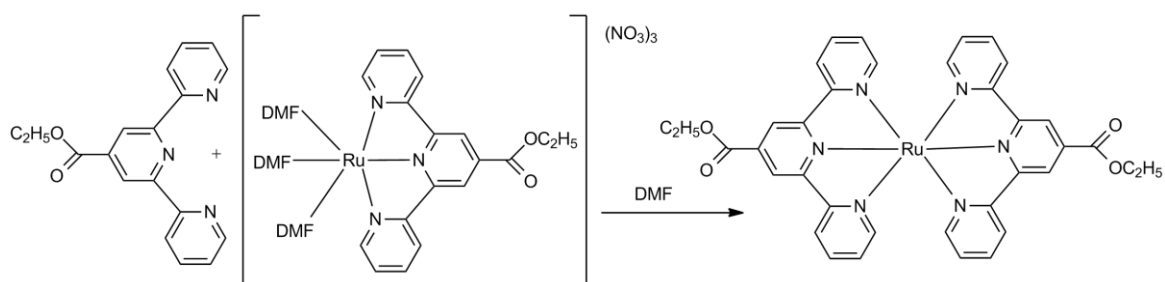


2.2.2.10. Σύνθεση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_5)_2](\text{PF}_6)_2$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [104].

250 mg (0,48mmol) $[\text{Ru}(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_5)(\text{Cl})_3]$ προστέθηκαν σε ένα διάλυμα που περιείχε 245 mg (1.44 mmol) νιτρικού αργύρου και 100 mL DMF σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 h σε σκοτεινό

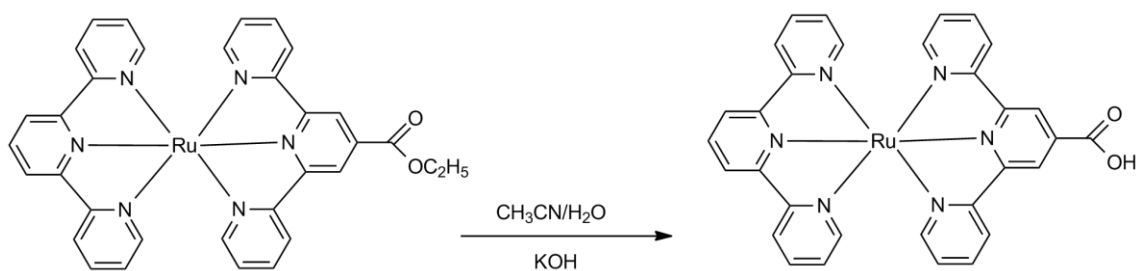
μέρος. Ύστερα από το πέρας των 24 ωρών το μείγμα φυγοκεντρήθηκε και απομακρύνθηκε ο AgCl. Στο υπερκείμενο διάλυμα που ελήφθη προστέθηκαν 112 mg (0.48 mmol) 4'-κάρβοξυ-αίθυλ-εστέρα-2,2':6',2''-τερπυριδίνης με χρήση κάθετου ψυκτήρα (reflux) στους 120 °C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθως αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα του διαλύτη (με χρήση flash evaporator) λαμβάνοντας ένα κόκκινο στερεό το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 150mL κορεσμένου με NH_4PF_6 υδατικού διαλύματος. Ύστερα από 30 min σχηματίστηκε ένα κόκκινο στερεό το οποίο διηθήθηκε σε πτυχωτό ηθμό και εν συνεχεία έγινε έκπλυση με ψυχρή αιθανόλη και διαιθυλαιθέρα λαμβάνοντας το επιθυμητό $[\text{Ru}(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_5)_2](\text{PF}_6)_2$. Απόδοση: 93%. Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{F}_{12}\text{N}_6\text{O}_4\text{P}_2\text{Ru}$ υπολογίστηκε C: 43,17 H: 3,02: N: 8,39 και βρέθηκε C: 43,20 H: 3,00 N: 8,33



2.2.2.11.Σύνθεση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy-COOH})(\text{trpy})](\text{PF}_6)_2$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [104].

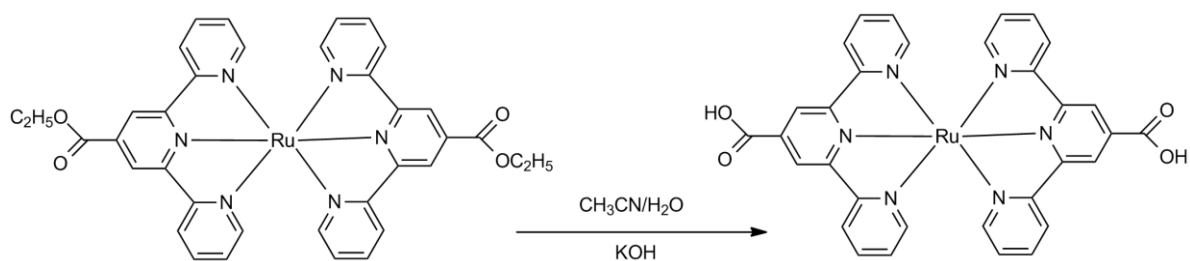
200 mg (0,22 mmol) $[\text{Ru}(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_5)(\text{trpy})](\text{PF}_6)_2$ προστέθηκαν σε ένα διάλυμα που περιείχε 0.5g KOH και 50 mL $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2/1) σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 h. Ακολούθως αφού απομακρύνθηκε το ακετονιτρίλιο το διάλυμα οξινίστηκε μέχρι $\text{pH} = 4$ με 0,1M HPF_6 και καταβυθίστηκε ίζημα όπου λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner και εν συνεχεία έγιναν διαδοχικές εκπλύσεις με ψυχρό νερό. Απόδοση: 96%



2.2.2.12. Σύνθεση του συμπλόκου $[Ru(trpy-COOH)_2](PF_6)_2$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [104]

200 mg (0,19 mmol) $[Ru(trpy-COOC_2H_5)_2](PF_6)_2$ προστέθηκαν σε ένα διάλυμα που περιείχε 0.5g KOH και 50 mL CH_3CN/H_2O (2/1) σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 24 h. Ακολούθως αφού απομακρύνθηκε το ακετονιτρίλιο το διάλυμα οξινίστηκε μέχρι $pH = 4$ με 0,1 M HPF_6 όπου το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner και εν συνεχεία έγιναν διαδοχικές εκπλύσεις με ψυχρό νερό. Απόδοση: 93%



2.2.2.13. Σύνθεση του συμπλόκου $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF_6)_4$

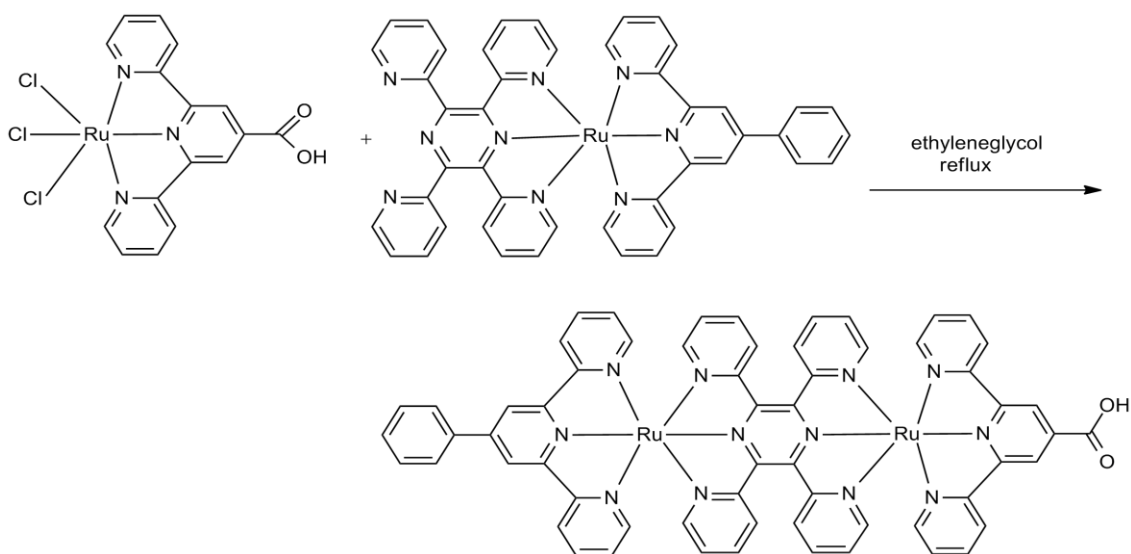
Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [108].

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL παρουσία αζώτου διαλύθηκαν 200 mg (0,19 mmol) $[Ru(ptrpy)(tppz)](PF_6)_2$ σε 80 mL αιθυλενογλυκόλης με θέρμανση στους 180 °C και χρήση κάθετου ψυκτήρα (reflux) υπό συνεχή

ανάδευση. Ακολούθως προστεθήκαν 116 mg (0.24 mmol) $\text{Ru}(\text{trpy-COOH})\text{Cl}_3$ και η θέρμανση συνεχίστηκε για ακόμα 12 h. Εν συνεχεία αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα του διαλύτη λαμβάνοντας ένα μωβ στερεό το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 150 mL κορεσμένου υδατικού διαλύματος NH_4PF_6 . Ύστερα από 30 min σχηματίστηκε ένα μωβ στερεό το οποίο διηθήθηκε σε πτυχωτό ηθμό λαμβάνοντας ένα μείγμα ενώσεων που περιείχε και το επιθυμητό διμερές $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται με τη χρήση χρωματογραφικής στήλης και διαλύτη έκλουσης $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ κορεσμένο με KNO_3 . Εξαιτίας των ιδιοτεροτήτων χρειάστηκε να χρησιμοποιηθεί μια στήλη χρωματογραφίας μεγάλου ύψους 50 cm και διαμέτρου 4 cm και ο συνολικός χρόνος που απαιτείται είναι 24 h ενώ ασκείται συνεχόμενα πίεση στο διάλυμα έκλουσης με χρήση αντλίας. Αρχικά το μείγμα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (8/1) κορεσμένο με KNO_3 . Το πρώτο κλάσμα που ελήφθη μετά από 8 h ταυτοποιήθηκε ως το $\text{Ru}(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_4\text{OH})\text{Cl}_3$, δηλαδή το εστεροποιημένο με αιθυλενογλυκόλη $\text{Ru}(\text{trpy-COOH})\text{Cl}_3$ καθώς πραγματοποιείται και διαδικασία εστεροποίησης παράλληλα με την αντίδραση, ενώ ακολουθεί η έκλυση του μη αντιδράσαντος $[\text{Ru}(\text{ptrpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$. Όλα τα υπόλοιπα προϊόντα παρέμειναν παγιδευμένα στην κορυφή της στήλης. Στη συνέχεια το μείγμα έκλουσης τροποποιήθηκε σε $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (5,5/1) κορεσμένο με KNO_3 και ένα μωβ κλάσμα άρχισε να διαχωρίζεται το οποίο ταυτοποιήθηκε ως το σύμπλοκο με εστεροποιημένη την καρβοξυλομάδα με αιθυλενογλυκόλη, $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](\text{PF}_6)_4$. Εν συνεχεία ακλουθεί ένα κλάσμα μπλε χρώματος το οποίο ταυτοποιείται ως η ένωση $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{RuCl}_3](\text{PF}_6)_2$. Τα εναπομένοντα δυο οξέα είχαν παγιδευτεί στη κορυφή της στήλης. και το διάλυμα έκλουσης τροποποιήθηκε σε $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{HPF}_6$ (8/1/0.1) κορεσμένο με KNO_3 . Στο πρώτο κλάσμα που λήφθηκε ταυτοποιήθηκε το $\text{Ru}(\text{trpy-COOH})\text{Cl}_3$ και εν συνεχεία το επιθυμητό $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$.

Απόδοση: 23%. Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $C_{61}H_{42}F_{24}N_{12}O_2P_4Ru_2$ $[(p\text{trpy})Ru(tppz)Ru(\text{trpy-COOH})](PF_6)_4$ υπολογίστηκε, C: 41,70, H: 2,41, N: 9,57 και βρέθηκε C: 41,70, H: 2,41, N: 9,58

Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $C_{63}H_{46}F_{24}N_{12}O_3P_4Ru_2$ $[(p\text{trpy})Ru(tppz)Ru(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](PF_6)_4$ υπολογίστηκε, C: 42,01 H: 2,57 N: 9,33 και βρέθηκε C: 42,08 H: 2,54 N: 9,30



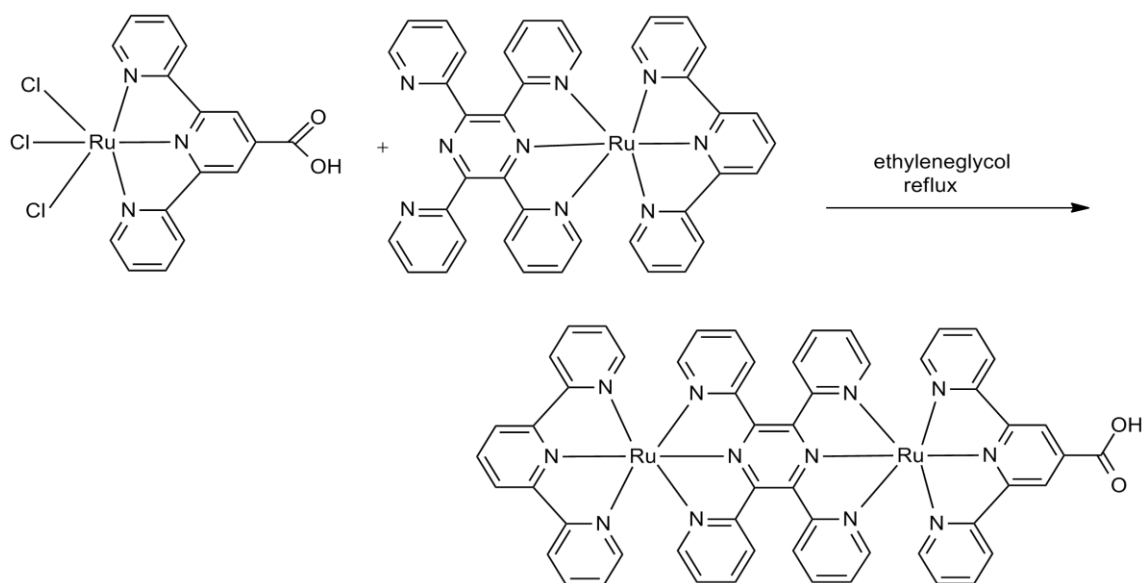
2.2.2.14. Σύνθεση του συμπλόκου $[(\text{trpy})Ru(tppz)Ru(\text{trpy-COOH})](PF_6)_4$

Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [108].

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL παρουσία αζώτου διαλύθηκαν 200 mg (0,19 mmol) $[Ru(\text{trpy})(tppz)](PF_6)_2$ σε 80 mL αιθυλενογλυκόλης στους 180 °C με χρήση κάθετου ψυκτήρα (reflux) υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθως προστεθήκαν 116 mg (0,24 mmol) $Ru(\text{trpy-COOH})Cl_3$ και η θέρμανση συνεχίστηκε για ακόμα 12 h. Εν συνεχεία αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα του διαλύτη λαμβάνοντας ένα μωβ στερεό το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 150 mL υδατικού διαλύματος κορεσμένου με NH_4PF_6 . Ύστερα από 30 min σχηματίστηκε ένα μωβ στερεό το οποίο διηθήθηκε σε πτυχωτό ηθμό

λαμβάνοντας ένα μείγμα ενώσεων που περιείχε και το επιθυμητό $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOH})](\text{PF}_6)_4$. Το τελικό προϊόν ελήφθη με τη χρήση χρωματογραφίας στήλης με διαλύτη έκλουσης $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (8/1) κορεσμένο με KNO_3 . Εξαιτίας των ιδιοτεροτήτων που υπήρχαν χρειάστηκε να χρησιμοποιηθεί μια στήλη χρωματογραφίας μεγάλου ύψους 50 cm και διαμέτρου 4 cm, ο συνολικός χρόνος που απαιτείται είναι 24 h ενώ ασκείται συνεχόμενα πίεση στο διαλύμα έκλουσης με χρήση αντλίας. Αρχικά το μείγμα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ κορεσμένο με KNO_3 (8/1). Τα πρώτα κλάσματα που ελήφθησαν ταυτοποιήθηκαν ως το $\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOC}_2\text{H}_4\text{OH})\text{Cl}_3$, δηλαδή το αρχικό σύμπλοκο $\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOH})\text{Cl}_3$ με εστεροποιημένη την καρβοξυλομάδα του $\text{trpy}-\text{COOH}$ με την μία υδροξυλομάδα της αιθυλενογλυκόλης και ακολουθεί το κλάσμα του μη αντιδράσαντος $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$. Όλα τα υπόλοιπα προϊόντα παρέμειναν παγιδευμένα στην κορυφή της στήλης. Στη συνέχεια το μείγμα των διαλυτών τροποποιήθηκε σε $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (5,5/1), κορεσμένο με KNO_3 και ένα μωβ κλάσμα άρχισε να διαχωρίζεται που ταυτοποιήθηκε ως το $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](\text{PF}_6)_4$. Εν συνεχεία ακολουθεί ένα μπλε κλάσμα το οποίο ταυτοποιείται ως $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{RuCl}_3](\text{PF}_6)_2$. Ακολουθεί αλλαγή στο διάλυμα έκλουσης σε $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{HPF}_6$ (8/1/0.1) κορεσμένο με KNO_3 . Το πρώτο κλάσμα που λήφθηκε ήταν το $\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOH})\text{Cl}_3$ που δεν αντέδρασε και εν συνεχεία το επιθυμητό $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOH})](\text{PF}_6)_4$. Απόδοση: 27%. Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $\text{C}_{55}\text{H}_{38}\text{F}_{24}\text{N}_{12}\text{O}_2\text{P}_4\text{Ru}_2$ $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOH})](\text{PF}_6)_4$ υπολογίστηκε, C: 39,30, H: 2,28, N :10,00 και βρέθηκε C: 39,23, H: 2,30, N :10,02

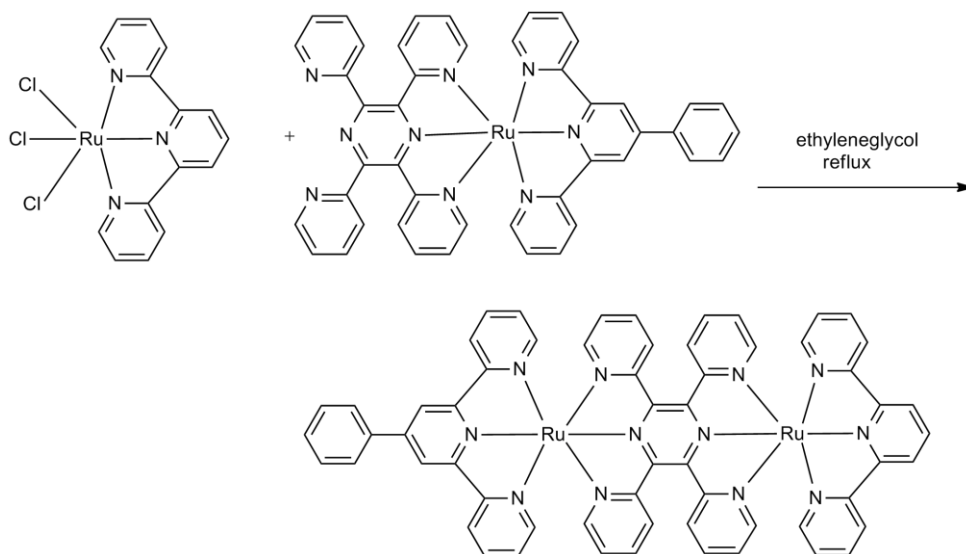
Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $\text{C}_{57}\text{H}_{42}\text{F}_{24}\text{N}_{12}\text{O}_3\text{P}_4\text{Ru}_2$ $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](\text{PF}_6)_4$ υπολογίστηκαν, C: 39,69, H: 2,45, N: 9,74 και βρέθηκαν C: 39,60, H: 2,48, N: 9,76



2.2.2.15. Σύνθεση του συμπλόκου $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy)](PF_6)_4$

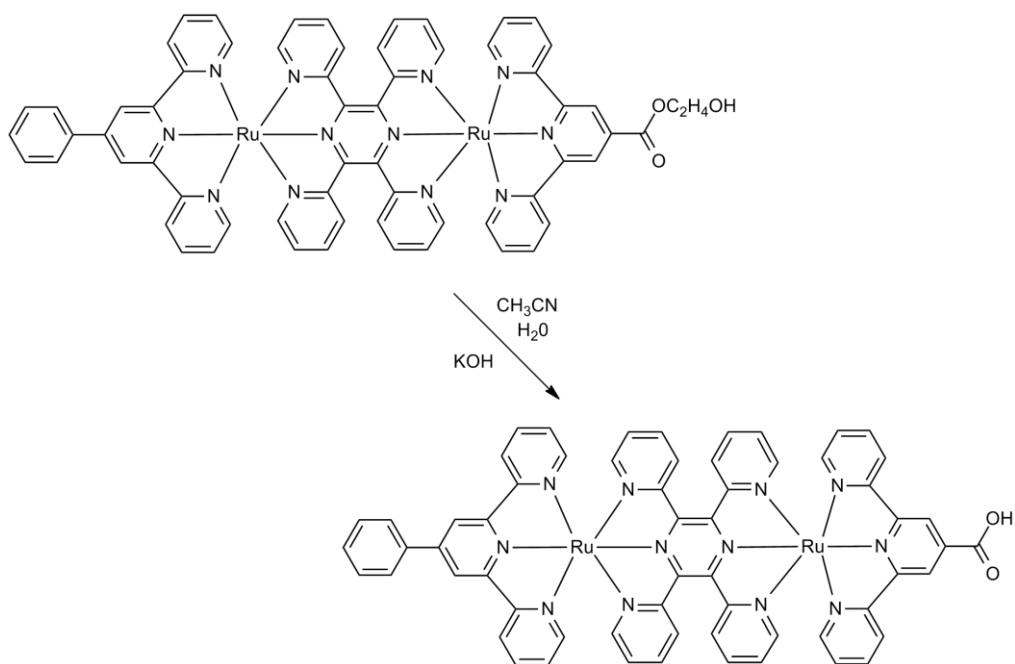
Η σύνθεση έγινε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου [108]

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250 mL παρουσία αζώτου διαλύθηκαν 200 mg (0,19 mmol) $[Ru(ptrpy)(tppz)](PF_6)_2$ σε 80 mL αιθυλενογλυκόλης με θέρμανση στους 180 °C και χρήση κάθετου ψυκτήρα (reflux) υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθως προστεθήκαν 106 mg (0,24 mmol) $Ru(trpy)Cl_3$ και η θέρμανση συνεχίστηκε για ακόμα 12 h. Εν συνεχεία αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα του διαλύτη λαμβάνοντας ένα μωβ στερεό το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 150 mL κορεσμένου υδατικού διαλύματος NH_4PF_6 . Ύστερα από 30 min σχηματίστηκε ένα μωβ στερεό το οποίο διηθήθηκε σε πτυχωτό ηθμό λαμβάνοντας ένα μείγμα ενώσεων που περιείχε και το επιθυμητό διμερές $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy)](PF_6)_4$. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται με τη χρήση χρωματογραφικής στήλης και διαλύτη έκλουσης CH_3CN/H_2O (8/1) κορεσμένο με KNO_3 . Απόδοση: 23%. Στοιχειακή Ανάλυση (%): Για τον τύπο $C_{60}H_{42}F_{24}N_{12}P_4Ru_2$ $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy)](PF_6)_4$ υπολογίστηκε, C: 42,07, H: 2,47, N: 9,81 και βρέθηκε C: 42,10, H: 2,41, N: 9,72



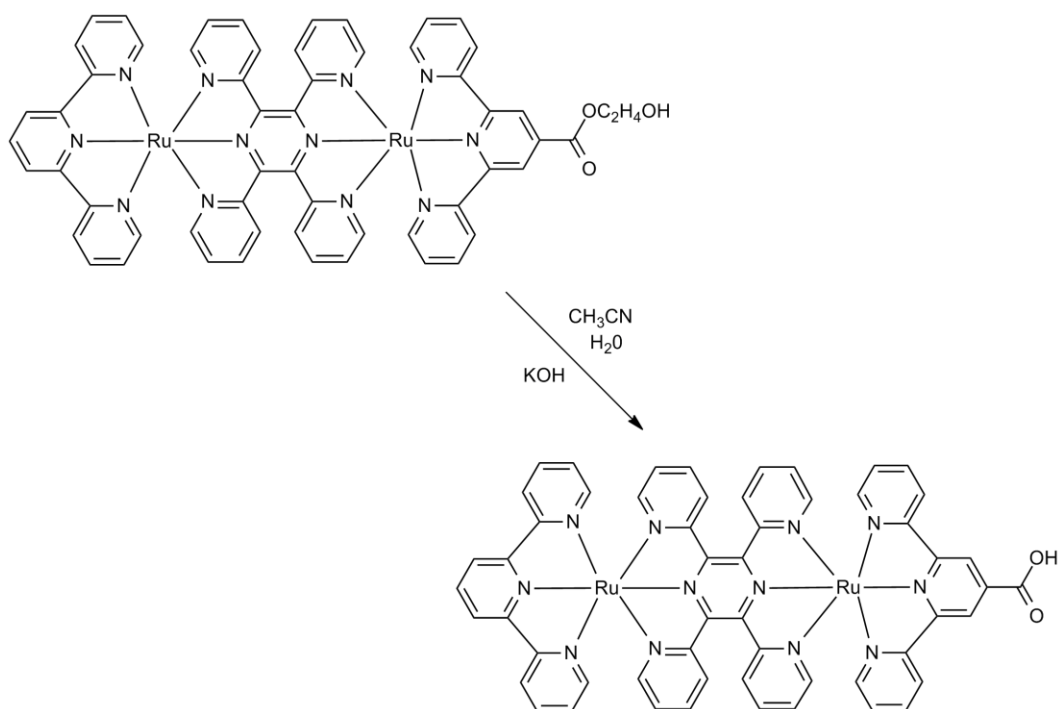
2.2.2.16. Σύνθεση του συμπλόκου $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF_6)_4$ από υδρόλυση $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOC_2H_4OH)](PF_6)_4$

50 mg (0,03mmol) $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOC_2H_4OH)](PF_6)_4$ προστέθηκαν σε ένα διάλυμα που περιείχε 0.5 g KOH και 50 mL CH_3CN/H_2O (2/1) σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 12 h. Ακολούθως αφού απομακρύνθηκε το ακετονιτρίλιο το διάλυμα οξινίσθηκε μέχρι $pH = 4$ με 0.1 M HPF_6 και το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner. Εν συνεχεία έγιναν διαδοχικές εκπλύσεις με ψυχρό νερό. Απόδοση: 90%.



2.2.2.17. Σύνθεση του συμπλόκου $[(trpy)Ru(trpz)Ru(trpy-COOH)](PF_6)_4$ από υδρόλυση $[(trpy)Ru(trpz)Ru(trpy-COOC_2H_4OH)](PF_6)_4$

50 mg (0,03 mmol) $[(trpy)Ru(trpz)Ru(trpy-COOC_2H_4OH)] (PF_6)_4$ προστέθηκαν σε ένα διάλυμα που περιείχε 0.5g KOH και 50 mL CH_3CN/H_2O (2/1) σε σφαιρική φιάλη των 250 mL και το μείγμα αφέθηκε υπό ανάδευση για 12 h. Ακολούθως αφού απομακρύνθηκε το ακετονιτρίλιο (με χρήση flash evaporator) το διάλυμα οξινίστηκε μέχρι $pH = 4$ με 0,1 M HPF_6 και το στερεό λήφθηκε με διήθηση υπό κενό σε συσκευή Buchner. Εν συνεχεία έγιναν διαδοχικές εκπλύσεις με ψυχρό νερό. Απόδοση: 93%.



2.2.2.18. Παρατηρήσεις πάνω στην σύνθεση των συμπλόκων $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$ και $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$

Οι αντιδράσεις των συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{phenylterpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$ και $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$ με $\text{Ru}(\text{trpy-COOH})\text{Cl}_3$ πραγματοποιούνται μόνο στο διαλύτη αιθυλενογλυκόλη από ένα εύρος διαλυτών που δοκιμάστηκαν όπως μεθανόλη, αιθανόλη, ακετονιτρίλιο, DMF, DMSO ή ακόμη και σε μείγματα διαλυτών όπως και $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$. Επίσης αν και το ρουθίνιο εντάσσεται σε τριδοντικούς υποκαταστάτες και τα σύμπλοκα αναμενόταν να είναι σταθερά (από την βιβλιογραφία) η θέρμανση τους σε όλους σχεδόν τους γνωστούς διαλυτές προκαλεί την διάσπαση τους, κάτι που συμβαίνει μόνο στα διπυρηνικά σύμπλοκα και όχι στα αντίστοιχα μονομεταλλικά.

2.3. ΣΥΝΘΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ

2.3.1. Σύνθεση πεπτιδίων

2.3.1.1. Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου *resin-Lys²-Lys¹-Gly²-Gly¹-Fmoc*

100 mg ρητίνης (rink-amide {TentaGel}) υποκατάστασης 0,26 mmol/g εισήχθη στην ειδική υαλίνη συσκευή πεπτιδικής σύνθεσης (vessel) και αφέθηκε να διογκωθεί για 10 min με 5 mL ανύδρου DMF. Ακολούθησαν πέντε εκπλύσεις με 3 ml ανύδρου DMF και εν συνεχεία προστέθηκαν 5 mL διαλύματος πιπεριδίνης 20% σε DMF για την απομάκρυνση της ομάδας προστασίας της ρητίνης (αποπροστασία ρητίνης) για 10 min και η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά. Τρεις εκπλύσεις με 5 mL ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH₂Cl₂ πραγματοποιήθηκαν για την πλήρη απομάκρυνση των κομμένων ομάδων και του διαλύματος πιπεριδίνης. Η αποπροστασία πιστοποιήθηκε με τον χρωματισμό (κόκκινο) της ρητίνης με χρήση test Kaiser. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστεθήκαν 34 mg Fmoc-Lys(Boc) (3x) 38 mg PyBOP (3x) 3 ml DMF και αναδεύτηκαν με χρήση VORTEX για 5 min. Έπειτα το μείγμα των ενώσεων μεταφέρθηκε στο vessel και προστέθηκαν 26 μL DIPEA (6x). Το vessel τοποθετήθηκε στην συσκευή ανάδευσης για 2 h. Μετά το πέρας του χρόνου των δυο ωρών το μείγμα απομακρύνθηκε και ακλούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 mL ανύδρου DMF και τρεις πλύσεις CH₂Cl₂ για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Η σύζευξη του αμινοξέος πιστοποιήθηκε με την μη χρώση της ρητίνης με χρήση test Kaiser. Για την σύζευξη του δευτέρου αμινοξέος αρχικά στην ρητίνη προστέθηκαν 5 mL διαλύματος πιπεριδίνης 20% σε DMF για την απομάκρυνση της ομάδας Fmoc του συζευγμένου πρώτου αμινοξέος στην ρητίνη για 10 λεπτά και η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με 5 mL ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH₂Cl₂ για την πλήρη απομάκρυνση των κομμένων ομάδων Fmoc και της πιπεριδίνης. Η

αποπροστασία (απομάκρυνση Fmoc ομάδας) του συζευγμένου αμινοξέος στην ρητίνη πιστοποιήθηκε με τον χρωματισμό (μπλε) της ρητίνης με test Kaiser. Για την σύζευξη του δεύτερου αμινοξέος εισήχθησαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 34 mg Fmoc-Lys(Boc) (3x) 38 mg PyBOP (3x) 3 mL DMF και αναδεύτηκαν με χρήση VORTEX για 5 min. Έπειτα το περιεχόμενο του δοκιμαστικού μεταφέρθηκε στο vessel και προστεθήκαν ακόμα 26 μ L DIPEA (6x). Το vessel τοποθετήθηκε στην συσκευή ανάδευσης για 2 h. Στο τέλος της διαδικασίας των δυο ωρών το μείγμα απομακρύνθηκε και ακλούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5mL ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Η σύζευξη του δεύτερου αμινοξέος πιστοποιήθηκε με την μη χρώση της ρητίνης με χρήση test Kaiser. Εν συνεχεία για την σύζευξη του τρίτου αμινοξέος στην ρητίνη προστέθηκαν 5 mL διαλύματος πιπεριδίνης 20% σε DMF για την απομάκρυνση της Fmoc του συζευγμένου δεύτερου αμινοξέος στην ρητίνη για 10 λεπτά και η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με 5 mL ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη απομάκρυνση των κομμένων Fmoc ομάδων και της πιπεριδίνης. Η αποπροστασία (απομάκρυνση Fmoc ομάδας) του συζευγμένου αμινοξέος στην ρητίνη πιστοποιήθηκε με τον χρωματισμό (μπλε) της ρητίνης με test Kaiser. Για την σύζευξη του τρίτου αμινοξέος εισήχθησαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 21 mg Fmoc-Gly (3x) 38 mg PyBOP (3x) 3 mL DMF και αναδεύτηκαν με χρήση VORTEX για 5 min. Έπειτα το μείγμα των ενώσεων μεταφέρθηκε στο vessel και προστεθήκαν ακόμα 26 μ L DIPEA (6x). Το vessel τοποθετήθηκε στην συσκευή ανάδευσης για 3 h. Έπειτα από την αναμονή των τριών ωρών το μείγμα απομακρύνθηκε και ακολούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 mL ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Η σύζευξη του τρίτου αμινοξέος πιστοποιήθηκε με τη μη χρώση της ρητίνης με χρήση test Kaiser. Εν συνεχεία για την σύζευξη του τέταρτου αμινοξέος (γλυκίνη) αρχικά στην ρητίνη προστέθηκαν 5 mL του προαναφερθέντος διαλύματος πιπεριδίνης 20% DMF για την απομάκρυνση της Fmoc του συζευγμένου τρίτου αμινοξέος στην ρητίνη για 10 λεπτά και η

διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με 5 mL ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη απομάκρυνση των κομμένων F-moc ομάδων και της πιπεριδίνης. Η αποπροστασία (απομάκρυνση Fmoc ομάδας) του συζευγμένου τρίτου αμινοξέος στην ρητίνη πιστοποιήθηκε με τον χρωματισμό (μπλε) της ρητίνης με test Kaiser. Για την σύζευξη του τέταρτου αμινοξέος εισήχθησαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 21 mg F-moc-Gly (3x), 38 mg PyBOP (3x), 3 mL DMF και αναδεύτηκαν με χρήση VORTEX για 5 min. Έπειτα το μείγμα των ενώσεων μεταφέρθηκε στο vessel και προστεθήκαν 26 μL DIPEA (6x). Το vessel τοποθετήθηκε στην συσκευή ανάδευσης για 3 h. Ύστερα από τις τρεις ώρες το μείγμα απομακρύνθηκε και ακλούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 mL ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Η σύζευξη του τέταρτου αμινοξέος πιστοποιήθηκε με τη μη χρώση της ρητίνης με χρήση test Kaiser. Απόδοση: 80%. m/z: 388.27 amu

2.3.1.2. Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου *resin-Lys¹-Gly³-Gly²-Gly¹-Fmoc*

Το ακινητοποιημένο πάνω στην ρητίνη πεπτίδιο $\text{Lys}^1\text{-Gly}^3\text{-Gly}^2\text{-Gly}^1$ συντίθεται με την ίδια ακριβώς διαδικασία με το πεπτίδιο $\text{Lys}^2\text{-Lys}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^1$ που αναφέραμε αναλυτικά παραπάνω, με μοναδική διαφοροποίηση, ότι η σύζευξη του τρίτου αμινοξέος είναι μια γλυκίνη (η Gly^3) αντί της λυσίνης (η Lys^1) προσαρμόζοντας την απαιτούμενη ποσότητα του αμινοξέος ώστε να βρίσκεται σε περίσσεια 3x (δηλαδή 21 mg γλυκίνης αντί 34 mg λυσίνης)

2.3.1.3. Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου *resin-Lys²-Lys¹-Ahx-Fmoc*

Η διαδικασία σύνθεσης του πεπτιδίου $\text{Lys}^2\text{-Lys}^1\text{-Ahx-F-moc}$ πραγματοποιείται με την μεθοδολογία σύζευξης των παραπάνω πεπτιδίων όπου Ahx είναι ένα τροποποιημένο F-moc-αμινοξύ (6-αμινοεξανοϊκό οξύ) όπου

ακολουθεί την ίδια διαδικασία σύζευξης, όπως τα παραπάνω αμινοξέα προσαρμόζοντας πάλι την προσθήκη της ποσότητας σε αναλογία 3x (δηλαδή 25 mg Ahx αντι 21 mg γλυκίνης ή 38 mg λυσίνης). Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε 100 mg ρητίνης (rink-amide {TentaGel}) υποκατάστασης 0,26 mmol/g στην ειδική υαλίνη συσκευή πεπτιδικής σύνθεσης (vessel).

2.3.1.4. Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου *resin-Lys¹-Gly¹-Ahx-Fmoc*

Το ακινητοποιημένο πάνω στην ρητίνη πεπτίδιο Lys¹-Gly¹-Ahx-F-moc συντίθεται με την ίδια ακριβώς διαδικασία με το πεπτίδιο Lys²-Lys¹-Ahx-F-moc που αναφέραμε αναλυτικά παραπάνω, με μοναδική διαφοροποίηση, ότι η ένταξη του δεύτερου αμινοξέος είναι μια γλυκίνη (η Gly¹) αντί της μιας λυσίνης προσαρμόζοντας την απαιτούμενη ποσότητα του αμινοξέος ώστε να βρίσκεται σε περίσσεια 3x (δηλαδή 25 mg γλυκίνης αντί 38 mg λυσίνης)

2.3.1.5. Σύνθεση του ακινητοποιημένου αμινοξέος *resin-Trp-F-moc*

400 mg ρητίνης (rink-amide {TentaGel}) υποκατάστασης 0,26mmol/g εισήχθη στην ειδική υαλίνη συσκευή πεπτιδικής σύνθεσης (vessel) και αφέθηκε να διογκωθεί για 10min με 5ml ανύδρου DMF. Ακολούθησαν πέντε εκπλύσεις με 3 ml ανύδρου DMF και εν συνεχεία προστέθηκαν 5 ml διαλύματος πιπεριδίνης/DMF 20% για την απομάκρυνση της ομάδας προστασίας της ρητίνης (αποπροστασία ρητίνης) για 10 min και η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά. Τρεις εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH₂Cl₂ πραγματοποιήθηκαν για την πλήρη απομάκρυνση των κομμένων ομάδων και του διαλύματος πιπεριδίνης/DMF 20% . Η αποπροστασία πιστοποιήθηκε με τον χρωματισμό (κόκκινο) της ρητίνης με χρήση test Kaiser. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 136 mg F-moc-Trp(Boc) (3x) 152 mg PyBOP (3x) 3mL DMF και

αναδεύτηκαν με χρήση VORTEX για 5min. Έπειτα το μείγμα των ενώσεων μεταφέρθηκε στο vessel και προστέθηκαν 104 μL DIPEA (6x). Το vessel τοποθετήθηκε στην συσκευή ανάδευσης για 2 h. Μετά το πέρας του χρόνου των δυο ωρών το μείγμα απομακρύνθηκε και ακολούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Η σύζευξη του αμινοξέος πιστοποιήθηκε με την μη χρώση της ρητίνης με χρήση test Kaiser.

2.3.1.6. Σύνθεση του ακινητοποιημένου πεπτιδίου *resin-Trp-Gly-F-moc*

Από τα 400 mg ρητίνης *resin-Trp-F-moc* υποκατάστασης 0,26 mmol/g λαβαμε τα 200 mg ρητίνης που εισήχθη στην ειδική υαλίνη συσκευή πεπτιδικής σύνθεσης (vessel) και αφέθηκε να διογκωθεί για 10min με 5ml ανύδρου DMF. Για την σύζευξη του δευτέρου αμινοξέος αρχικά στην ρητίνη προστέθηκαν 5ml διαλύματος πιπεριδίνης/DMF 20% για την απομάκρυνση της F-moc του συζευγμένου πρώτου αμινοξέος στην ρητίνη για 10 λεπτά και η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις πλύσεις CH_2Cl_2 για την πλήρη απομάκρυνση των κομμένων Fmoc ομάδων και του διαλύματος πιπεριδίνης/dmf 20%. Η αποπροστασία (απομάκρυνση Fmoc ομάδας) του συζευγμένου αμινοξέος στην ρητίνη πιστοποιήθηκε με τον χρωματισμό (μπλε) της ρητίνης με test Kaiser. Για την σύζευξη του δεύτερου αμινοξέος εισήχθησαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 42 mg Fmoc-Gly (3x) 76 mg PyBOP (3x) 3 ml DMF και αναδεύτηκαν με χρήση VORTEX για 5 min. Έπειτα το περιεχόμενο του δοκιμαστικού μεταφέρθηκε στο vessel και προστεθήκαν 52 μL DIPEA (6x) ακόμα. Το vessel τοποθετήθηκε στην συσκευή πεπτιδοσύνθεσης για 2 h. Στο τέλος της διαδικασίας των δυο ωρών το μείγμα απομακρύνθηκε και ακλούθησαν πέντε πλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις

πλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Η σύζευξη του δεύτερου αμινοξέος πιστοποιήθηκε με την μη χρώση της ρητίνης με χρήση test Kaiser.

2.3.1.7. Σύνθεση του πεπτιδίου *resin-Gly-Trp-F-moc*

200 mg ρητίνης (rink-amide {TentaGel}) υποκατάστασης 0,26 mmol/g εισήχθη στην ειδική υαλίνη συσκευή πεπτιδικής σύνθεσης (vessel) και αφέθηκε να διογκωθεί για 10min με 5ml ανύδρου DMF. Ακλουθήσαν πέντε εκπλύσεις με 3 ml ανύδρου DMF και εν συνεχεία προστεθήκαν 5 ml διαλύματος πιπεριδίνης/DMF 20% για την απομάκρυνση της ομάδας προστασίας της ρητίνης (αποπροστασία ρητίνης) για 10min και η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά. Τρεις εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 πραγματοποιήθηκαν για την πλήρη απομάκρυνση των κομμένων ομάδων και του διαλύματος πιπεριδίνης/DMF 20% . Η αποπροστασία πιστοποιήθηκε με τον χρωματισμό (κόκκινο) της ρητίνης με χρήση test Kaiser. Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 42 mg F-moc-Gly (3x), 76 mg PyBOP (3x), 3 ml DMF και αναδεύτηκαν με χρήση VORTEX για 5min. Έπειτα το μείγμα των ενώσεων μεταφέρθηκε στο vessel και προστέθηκαν 52 μL DIPEA (6x). Το vessel τοποθετήθηκε στην συσκευή ανάδευσης για 2 h. Μετά το πέρας του χρόνου των δυο ωρών το μείγμα απομακρύνθηκε και ακολούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Η σύζευξη του αμινοξέος πιστοποιήθηκε με την μη χρώση της ρητίνης με χρήση test Kaiser. Για την σύζευξη του δευτέρου αμινοξέος αρχικά στην ρητίνη προστέθηκαν 5 ml διαλύματος πιπεριδίνης/DMF 20% για την απομάκρυνση της Fmoc του συζευγμένου πρώτου αμινοξέος στην ρητινη για 10 λεπτά και η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για την πλήρη απομάκρυνση των κομμένων Fmoc ομάδων και του διαλύματος πιπεριδίνης/DMF 20%. Η

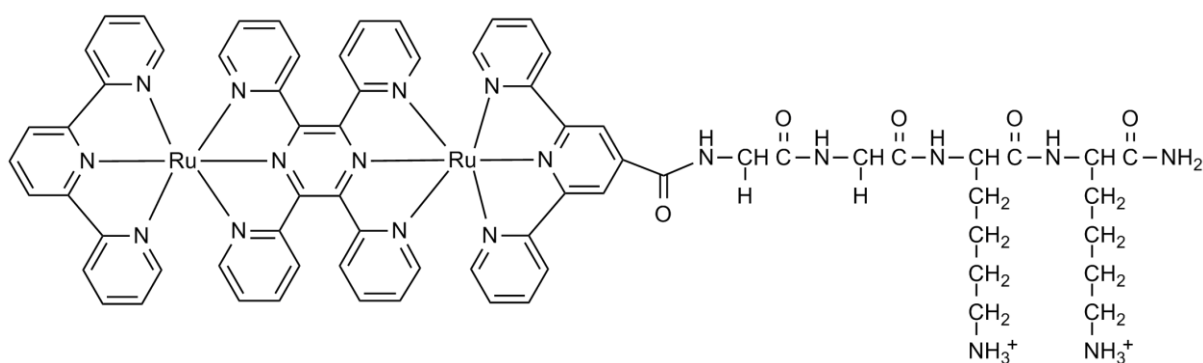
αποπροστασία (απομάκρυνση Fmoc ομάδας) του συζευγμένου αμινοξέος στην ρητίνη πιστοποιήθηκε με τον χρωματισμό (μπλε) της ρητίνης με test Kaiser. Για την σύζευξη του δεύτερου αμινοξέος εισήχθησαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 34 mg Fmoc-Trp(Boc) (3x), 38 mg PyBOP (3x), 3ml DMF και αναδεύτηκαν με χρήση VORTEX για 5 min. Έπειτα το περιεχόμενο του δοκιμαστικού μεταφέρθηκε στο vessel και προστεθήκαν 26 μ L DIPEA (6x). Το vessel τοποθετήθηκε στην συσκευή πεπτιδοσύνθεσης για 2 h. Στο τέλος της διαδικασίας των δυο ωρών το μείγμα απομακρύνθηκε και ακλούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου dmf και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Η σύζευξη του δεύτερου αμινοξέος πιστοποιήθηκε με τη μη χρώση της ρητίνης με χρήση test Kaiser.

2.3.2. Σύζευξη των συμπλόκων στα πεπτίδια

2.3.2.1. Σύνθεση του $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Lys}^1\text{-Lys}^2\text{CONH}_2)](\text{PF}_6)_6$

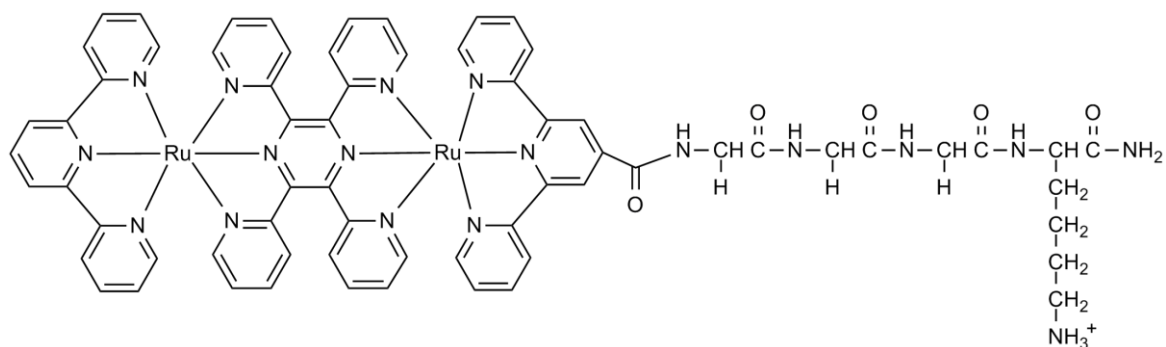
100 mg υποκατεστημένης ρητίνης με το πεπτίδιο $\text{Lys}^1\text{-Lys}^2\text{-Gly}^1\text{-Gly}^2$ (resin- $\text{Lys}^2\text{-Lys}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^1\text{-Fmoc}$) εισήχθη στο vessel και αφέθηκε να διογκωθεί για 10 min με 2 mL ανύδρου DMF. Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 2 mL ανύδρου DMF 38 mg PyBOP (3x) 120 mg $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$ (3x) προστέθηκαν 26 μ L DIPEA (6x) και το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα μεταφέρθηκε στο vessel το οποίο τοποθετήθηκε στην συσκευή ανάδευσης για 24 h. Έπειτα από 24 h το μείγμα απομακρύνθηκε και ακλούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 mL ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης από το μείγμα σύζευξης. Ακολούθως στην ρητίνη προστέθηκε ένα διάλυμα 2 mL TFA/ H_2O (95/5) (διάλυμα για το κόψιμο από την ρητίνη του συζευγμένου στο σύμπλοκο πεπτιδίου) και το vessel επανατοποθετήθηκε στη συσκευή ανάδευσης για 2 h. Τα 2 mL του διαλύματος TFA/ H_2O (95/5) που περιείχαν το σύμπλοκο εισήχθησαν σε σφαιρική φιάλη των 25 mL και με χρήση

του περιστροφικού συμπυκνωτήρα έγινε η απομάκρυνση του διαλύματος οπότε εμφανίστηκε ένα μωβ στερεό. Το στερεό επαναδιαλύθηκε σε 4 mL νερό και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή pH = 5,5 με KOH 0,2 M. Εν συνεχεία στο μείγμα προστέθηκε στάγδην ένα κορεσμένο διάλυμα KPF₆ 2 mL και αφέθηκε σε ηρεμία για 1 h. Έπειτα από το πέρας μιας ώρας εμφανίστηκε ένα μωβ στερεό. Το στερεό φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησαν εκπλύσεις με H₂O (5 x 2 mL) για την απομάκρυνση της εναπομένουσας ποσότητας KPF₆ και των μη συζευγμένων πεπτιδίων και εκπλύσεις με CH₂Cl₂ και διαιθυλαιθέρα (5 x 2 mL) για την απομάκρυνση πιθανών άλλων προσμίξεων. Απόδοση 12%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο C₇₁H₇₁F₃₆N₁₉O₅P₆Ru₂ υπολογίστηκε, C: 36,41, H: 3,06, N: 11,36 και βρέθηκε C: 36,42, H: 3,12, N: 11,54



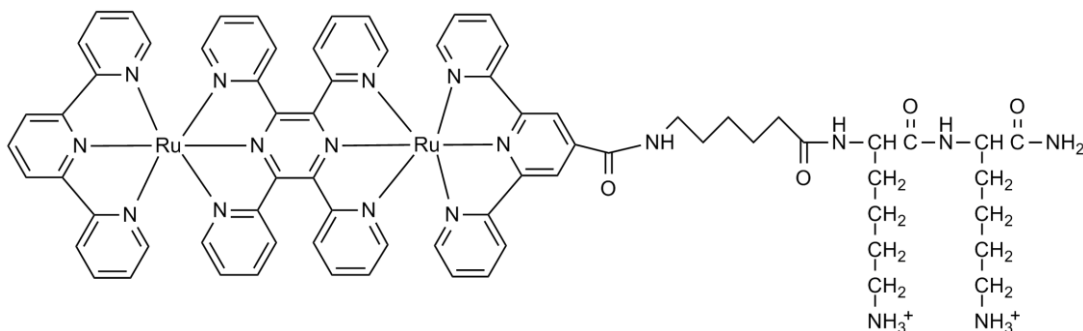
2.3.2.2. Σύνθεση του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅

Η σύνθεση του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₆ πραγματοποιήθηκε με την ίδια διαδικασία σύνθεσης που ακολουθήθηκε για το σύμπλοκο [(trpy)Ru (tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆ Απόδοση 10%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο C₆₇H₆₁F₃₀N₁₈O₅P₅Ru₂ υπολογίστηκε, C: 37,86, H: 2,89, N: 11,86 και βρέθηκε C: 37,82, H: 2,91, N: 11,88



2.3.2.3. Σύνθεση του συμπλόκου $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$

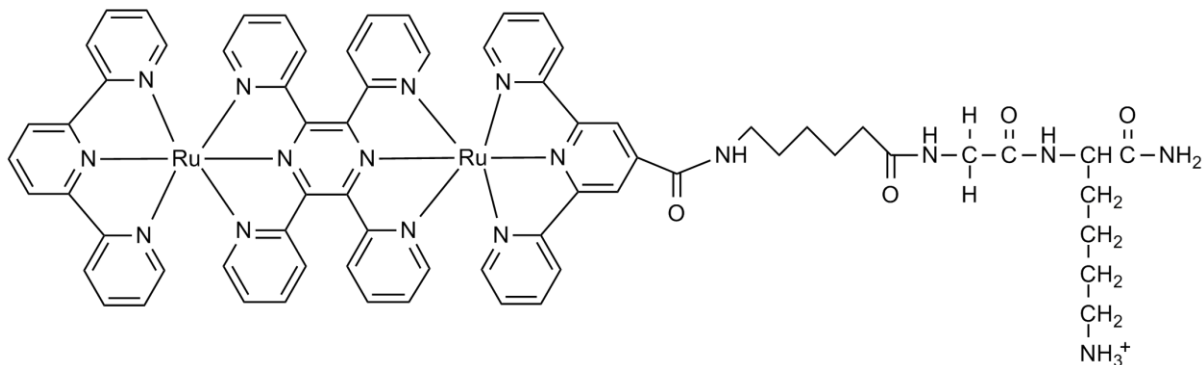
Η σύνθεση του συμπλόκου $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$ πραγματοποιήθηκε με την ίδια διαδικασία σύνθεσης που ακολουθήθηκε για το σύμπλοκο $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly^1-Gly^2-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$ Απόδοση 12%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο $C_{73}H_{74}F_{36}N_{18}O_4P_6Ru_2$ υπολογίστηκε, C: 37,48, H: 3,19, N: 10,78 και βρέθηκε C: 37,48, H: 3,21, N: 10,73



2.3.2.4. Σύνθεση του συμπλόκου $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Gly^1-Lys^1CONH_2)](PF_6)_5$

Η σύνθεση του συμπλόκου $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Gly^1-Lys^1CONH_2)](PF_6)_6$ πραγματοποιήθηκε με την ίδια διαδικασία σύνθεσης που ακολουθήθηκε για το σύμπλοκο $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly^1-Gly^2-Lys^1-$

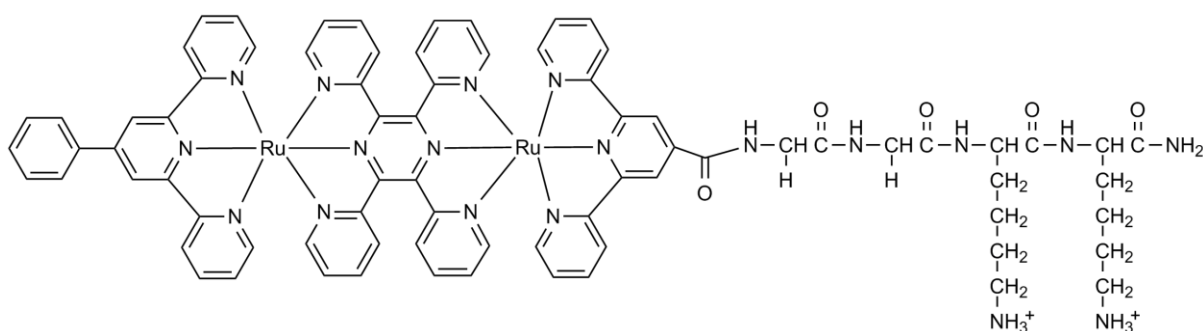
$\text{Lys}^2\text{CONH}_2)](\text{PF}_6)_6$ Απόδοση 8%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο $\text{C}_{69}\text{H}_{66}\text{F}_{30}\text{N}_{17}\text{O}_4\text{P}_5\text{Ru}_2$ υπολογίστηκε, C: 39,03 H: 3,13 N: 11,21 και βρέθηκε C: 39,00 H: 3,16 N: 11,28



2.3.2.5. Σύνθεση του συμπλόκου $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Lys}^1\text{-Lys}^2\text{-NH}_2)](\text{PF}_6)_6$

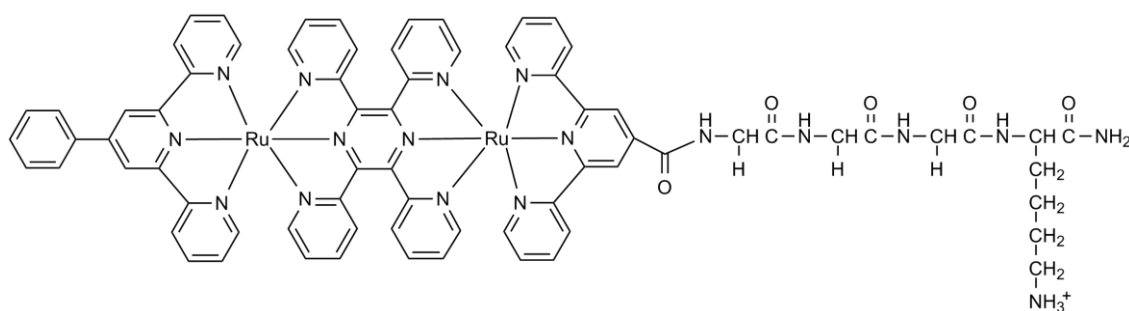
100 mg υποκατεστημένης ρητίνης με το πεπτίδιο Lys-Lys-Gly-Gly (resin-Lys-Lys-Gly-Gly-Fmoc) εισήχθη στο vessel και αφέθηκε να διογκωθεί για 10 min με 2 ml ανύδρου DMF. Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 2 ml ανύδρου DMF 38 mg PyBOP (3x) 126 mg $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{ptrpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$ (3x) προστέθηκαν 26 μL DIPEA (6x) και το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα μεταφέρθηκε στο vessel το οποίο τοποθετήθηκε στην συσκευή πεπτιδοσύνθεσης για 24 h. Έπειτα από 24 h το μείγμα απομακρύνθηκε και ακλούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης από το μείγμα σύζευξης. Ακολούθως στην ρητίνη προστέθηκε ένα διάλυμα 2 mL TFA/ H_2O (95/5) (διάλυμα για το κόψιμο του συζευγμένου στο σύμπλοκο πεπτιδίου από την ρητίνη) και το vessel επανατοποθετήθηκε στη συσκευή πεπτιδοσύνθεσης για 2 h. Τα 2 mL του διαλύματος TFA/ H_2O (95/5) που περιείχαν το σύμπλοκο εισήχθησαν σφαιρική φιάλη των 25 mL ενώ με χρήση flash evaporator έγινε η απομάκρυνση του διαλύτη. Εμφανίστηκε μωβ χρώματος στέρεο το οποίο επαναδιαλύθηκε σε 4 ml

νερό ενώ το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στην τιμή pH = 5,5 με KOH 0,2 M. Εν συνεχεία προστέθηκε στάγδην ένα κορεσμένο διάλυμα KPF_6 2 mL και αφεθηκε εν ηρεμία για 1 h. Έπειτα από το πέρας μιας ώρας εμφανίστηκε ένα μωβ στερεό (επιθυμητό συζευγμένο σύμπλοκο). Το στερεό φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησαν 5 x 2 ml εκπλύσεις με H_2O για την απομάκρυνση της εναπομένουσας ποσότητας KPF_6 και των μη συζευγμένων πεπτιδίων, 5 x 2 mL εκπλύσεις με CH_2Cl_2 και διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση πιθανών άλλων προσμίξεων. Απόδοση 6%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο $\text{C}_{77}\text{H}_{75}\text{F}_{36}\text{N}_{19}\text{O}_5\text{P}_6\text{Ru}_2$ υπολογίστηκε, C: 38,24, H: 3,13, N: 11,00 και βρέθηκε C: 38,19, H: 3,16, N: 11,03



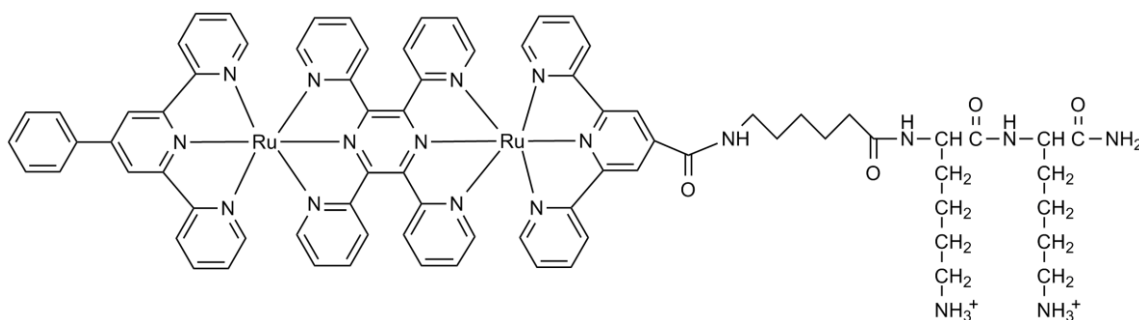
2.3.2.6. Σύνθεση του συμπλόκου $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly^1-Gly^2-Gly^3-Lys^1CONH_2)](PF_6)_5$

Η σύνθεση του συμπλόκου $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly^1-Gly^2-Gly^3-Lys^1CONH_2)](PF_6)_5$ πραγματοποιήθηκε με την ίδια διαδικασία σύνθεσης που ακολουθήθηκε για το σύμπλοκο $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly^1-Gly^2-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$. Απόδοση 11%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο $\text{C}_{73}\text{H}_{65}\text{F}_{30}\text{N}_{18}\text{O}_5\text{P}_5\text{Ru}_2$ υπολογίστηκε, C: 39,83, H: 2,98, N: 11,45 και βρέθηκε C: 39,80, H: 3,00, N: 11,42



2.3.2.7. Σύνθεση του συμπλόκου $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$

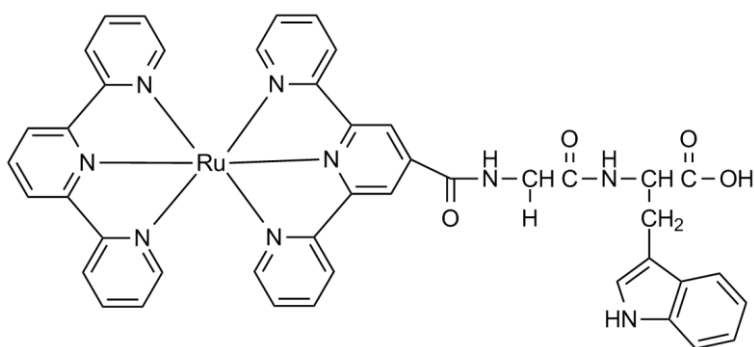
Η σύνθεση του συμπλόκου $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$ πραγματοποιήθηκε με την ίδια διαδικασία σύνθεσης που ακολουθήθηκε για το σύμπλοκο $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly^1-Gly^2-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$ Απόδοση 12%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο $C_{79}H_{80}F_{36}N_{18}O_4P_6Ru_2$ υπολογίστηκε, C: 39,25, H: 3,34, N: 10,43 και βρέθηκε C: 39,23, H: 3,30, N: 10,42



2.3.2.8. Σύνθεση του συμπλόκου $[Ru(trpy)(trpy-CONH-Gly-Trp-CONH_2)](PF_6)_2$

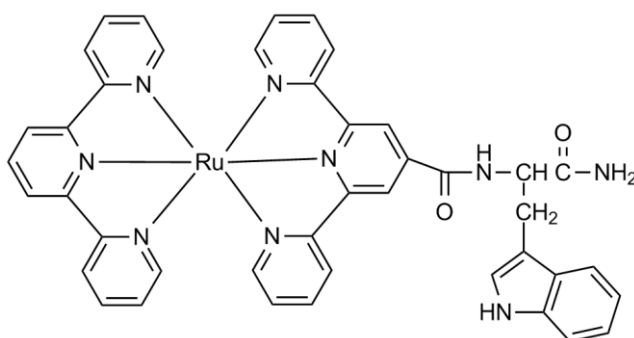
100 mg υποκατεστημένης ρητίνης με το πεπτίδιο Gly-Trp (resin-Trp-Gly-Fmoc) εισήχθη στο vessel και αφέθηκε να διογκωθεί για 10 min με 2 ml ανύδρου DMF. Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 2 ml ανύδρου DMF, 38 mg PyBOP (3x), 64 mg $[Ru(trpy)(trpy-COOH)](PF_6)_2$ (3x) προστέθηκαν 26 μ L DIPEA (6x) και

το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα μεταφέρθηκε στο vessel το οποίο τοποθετήθηκε στην συσκευή ανάδευσης για 24 h. Έπειτα από 24 h το μείγμα απομακρύνθηκε και ακολούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Ακολούθως στην ρητίνη προστέθηκε ένα διάλυμα 2 ml TFA/ H_2O (95/5) και το vessel επανατοποθετήθηκε στη συσκευή ανάδευσης για 2 h. Τα 2 mL του διαλύματος TFA/ H_2O (95/5) που περιείχαν το σύμπλοκο εισήχθησαν σφαιρική φιάλη των 25 mL και με χρήση του flash evaporator έγινε η απομάκρυνση του διαλύτη οπότε εμφανίστηκε ένα κόκκινο στερεό. Το στερεό επαναδιαλύθηκε σε 4 ml νερό και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε μέχρι τιμής pH = 5,5 με KOH 0,2 M. Εν συνεχεία ένα κορεσμένο διάλυμα KPF_6 2 ml προστέθηκε σταγδην στο διάλυμα και αφέθηκε σε ηρεμία για 1 h. Έπειτα από το πέρας μιας ώρας εμφανίστηκε ένα κόκκινο στερεό. Το στερεό φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησαν 5 x 2 mL εκπλύσεις με H_2O για την απομάκρυνση της εναπομένουσας ποσότητας KPF_6 και των μη συζευγμένων πεπτιδίων, 5 x 2 mL εκπλύσεις με CH_2Cl_2 και διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση άλλων πιθανών προσμίξεων. Απόδοση 4%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο $\text{C}_{44}\text{H}_{35}\text{F}_{12}\text{N}_9\text{O}_4\text{P}_2\text{Ru}$ υπολογίστηκε, C:46,16, H: 3,08, N: 11,01 και βρέθηκε C: 46,21, H: 3,10, N: 10,98



2.3.2.9. Σύνθεση του συμπλόκου $[Ru(trpy)(trpy-CONH-Trp-CONH_2)](PF_6)_2$

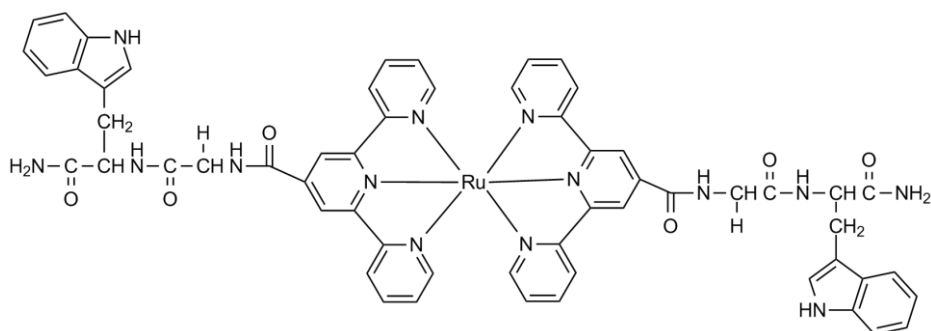
100 mg υποκατεστημένης ρητίνης με το αμινοξύ τρυπτοφάνη (resin-Trp-Fmoc) εισήχθη στο vessel και αφέθηκε να διογκωθεί για 10 min με 2 ml ανύδρου DMF. Τα 100 mg ρητίνης μεταφέρθηκαν σε σφαιρική φιάλη των 25 ml που περιείχε 2ml ανύδρου DMF 38 mg PyBOP (6x) 128 mg $[Ru(trpy)(trpy-COOH)](PF_6)_2$ (6x), ακολούθως προστέθηκαν 26 μ L DIPEA (6x) και το περιεχόμενο αφέθηκε να θερμανθεί στους 50 °C για 24 h. Έπειτα από 24 h το περιεχόμενο της φιάλης μεταφέρθηκε στο vessel. Ακολούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Ακολούθως στην ρητίνη προστέθηκε ένα διάλυμα 2 mL TFA/ H_2O (95/5) (διάλυμα για το κόψιμο από την ρητίνη του συμπλόκου με το συζευγμένο πεπτίδιο) και το vessel επανατοποθετήθηκε στη συσκευή πεπτιδοσύνθεσης για 2 h. Τα 2 ml του διαλύματος TFA/ H_2O (95/5) που περιείχαν το σύμπλοκο εισήχθησαν σφαιρική φιάλη των 25 mL και με τη χρήση του flash evaporator έγινε η απομάκρυνση του διαλύτη οπότε εμφανίστηκε ένα μπορντό στερεό. Το στερεό επαναδιαλύθηκε σε 4 mL νερό και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε μέχρι τιμής pH = 5,5 με KOH 0,2 M. Εν συνεχεία προστέθηκε στάγδην ένα κορεσμένο διάλυμα KPF_6 2 mL και αφεθηκε σε ηρεμία για 1 h. Έπειτα από το πέρας μιας ώρας εμφανίστηκε ένα μπορντό στερεό (επιθυμητό συζευγμένο σύμπλοκο). Το στερεό φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησαν 5 x 2 ml εκπλύσεις με H_2O για την απομάκρυνση της εναπομένουσας ποσότητας KPF_6 και των μη συζευγμένων πεπτιδίων, 5 x 2 mL εκπλύσεις με CH_2Cl_2 και διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση άλλων πιθανών προσμίξεων. Απόδοση 6%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο $C_{42}H_{33}F_{12}N_9O_2P_2Ru$ υπολογίστηκε, C: 46,42, H: 3,06, N: 11,60 και βρέθηκε C: 46,40, H: 3,10, N: 11,57



2.3.2.10. Σύνθεση του συμπλόκου $[Ru(trpy-CONH-Gly-Trp-CONH_2)_2](PF_6)_2$

200 mg υποκατεστημένης ρητίνης με το πεπτίδιο Gly-Trp (resin-Trp-Gly-Fmoc) εισήχθη στο vessel και αφέθηκε να διογκωθεί για 10 min με 2 ml ανύδρου dmf. Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 2 ml ανύδρου DMF 38 mg PyBOP (3x) 10 mg $[Ru(trpy-COOH)_2](PF_6)_2$ (0,5x) προστέθηκαν 26 μ L DIPEA (6x) και το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα μεταφέρθηκε στο vessel το οποίο τοποθετήθηκε στην συσκευή ανάδευσης για 24 h. Έπειτα από 24 h το μείγμα απομακρύνθηκε και ακολούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης από το μείγμα σύζευξης. Ακολούθως στην ρητίνη προστέθηκε ένα διάλυμα 2 ml TFA/ H_2O (95/5) και το vessel επανατοποθετήθηκε στη συσκευή ανάδευσης για 2 h. Τα 2 mL του διαλύματος TFA/ H_2O (95/5) που περιείχαν το σύμπλοκο εισήχθησαν σφαιρική φιάλη των 25ml και με τη χρήση του flash evaporator έγινε η απομάκρυνση του διαλύτη οπότε εμφανίστηκε ένα κόκκινο στερεό. Το στερεό επαναδιαλύθηκε σε 4ml νερό και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε μέχρι τιμής pH = 5,5 με KOH 0,2 M. Εν συνεχεία προστέθηκε στάγδην ένα κορεσμένο διάλυμα KPF_6 2 mL και αφέθηκε σε ηρεμία για 1 h. Έπειτα από το πέρας μιας ώρας εμφανίστηκε ένα κόκκινο στερεό. Το στερεό φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησαν 5 x 2 ml εκπλύσεις με H_2O για την απομάκρυνση της εναπομένουσας ποσότητας KPF_6 και του ελεύθερου πεπτιδίου, 5 x 2 ml εκπλύσεις με CH_2Cl_2 και διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση άλλων πιθανών προσμίξεων. Απόδοση 3%. Στοιχειακή ανάλυση

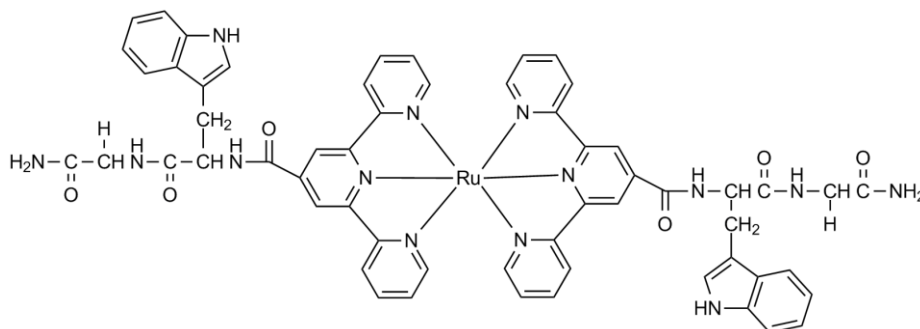
(%): Για τον τύπο $C_{58}H_{50}F_{12}N_{14}O_6P_2Ru$ υπολογίστηκε, C:48,71, H: 3,52, N: 13,71 και βρέθηκε C: 48,69, H: 3,50, N: 13,73



2.3.2.11. Σύνθεση του συμπλόκου $[Ru(trpy-CONH-Trp-Gly-CONH_2)_2](PF_6)_2$

200 mg υποκατεστημένης ρητίνης με το πεπτίδιο Gly-Trp (resin-Trp-Gly-Fmoc) εισήχθη στο vessel και αφέθηκε να διογκωθεί για 10 min με 2 mL ανύδρου DMF. Σε σφαιρική φιάλη των 25 mL που περιείχε 2 mL ανύδρου DMF, 38 mg PyBOP (3x), 10mg $[Ru(trpy-COOH)_2](PF_6)_2$ (0,5x) προστέθηκαν 26 μ L DIPEA (6x) και το περιεχόμενο του vessel και αφέθηκε στους 50 °C για 24 h. Έπειτα από 24 h το μείγμα επεναμεταφέρθηκε στο vessel, απομακρύνθηκε η υγρή φάση και ακλούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 mL ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH_2Cl_2 για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Ακολούθως στην ρητίνη προστέθηκε ένα διάλυμα 2 mL TFA/ H_2O (95/5) και το vessel επανατοποθετήθηκε στη συσκευή αάδευσης για 2 h. Τα 2 mL του διαλύματος TFA/ H_2O (95/5) που περιείχαν το σύμπλοκο εισήχθησαν σφαιρική φιάλη των 25 mL και με χρήση του flash evaporator έγινε η απομάκρυνση του διαλύτη οπότε εμφανίστηκε ένα κόκκινο στερεό. Το στερεό επαναδιαλύθηκε σε 4 mL νερό και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε μέχρι τιμής pH = 5,5 με KOH 0,2 M. Εν συνεχεία προστέθηκε στάγδην ένα κορεσμένο διάλυμα KPF_6 2 mL και αφέθηκε σε ηρεμία για 1 h. Έπειτα από το πέρας μιας ώρας εμφανίστηκε ένα κόκκινο στέρεο (επιθυμητό συζευγμένο σύμπλοκο). Το στερεό φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησαν 5 x 2 mL εκπλύσεις με H_2O για την απομάκρυνση της εναπομένουσας ποσότητας KPF_6

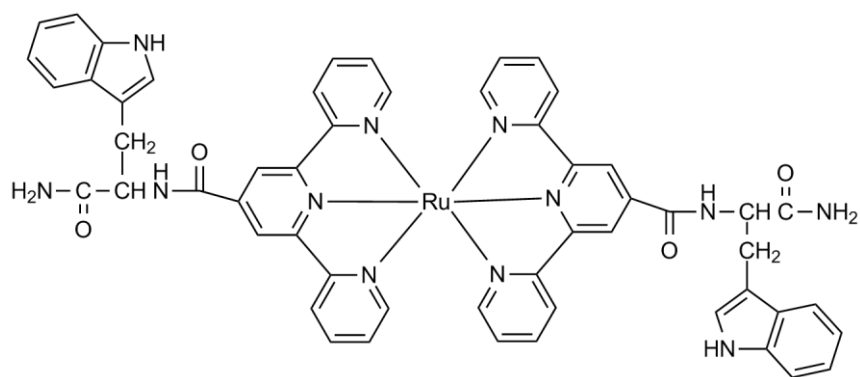
και του ελεύθερου πεπτιδίου, 5 x 2 ml εκπλύσεις με CH₂Cl₂ και διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση άλλων πιθανών προσμίξεων. Απόδοση 5%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο C₅₈H₅₀F₁₂N₁₄O₆P₂Ru υπολογίστηκε, C:48,71, H: 3,52, N: 13,71 και βρέθηκε C: 48,70, H: 3,50, N: 13,74



2.3.2.12. Σύνθεση του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-Trp-CONH₂)₂](PF₆)₂

200 mg υποκατεστημένης ρητίνης με το αμινοξύ τρυπτοφάνη (resin-Trp-Fmoc) εισήχθη στο vessel και αφέθηκε να διογκωθεί για 10 min με 2 mL ανύδρου DMF. Σε σφαιρική φιάλη 25 mL που περιείχε 2 mL ανύδρου DMF 38mg PyBOP (3x), 10 mg [Ru(trpy-COOH)₂](PF₆)₂ (0,5x) προστέθηκαν 26 μL DIPEA (6x) και το περιεχόμενο αφέθηκε να αντιδράσει στους 50 °C για 24 h. Έπειτα από 24 h το μείγμα επαναμεταφέρεται στο vessel όπου απομακρύνθηκε η υγρή φάση και ακλούθησαν πέντε εκπλύσεις με 5 ml ανύδρου DMF και τρεις εκπλύσεις CH₂Cl₂ για τον πλήρη καθαρισμό της ρητίνης. Ακολούθως στην ρητίνη προστέθηκε ένα διάλυμα 2 ml TFA/H₂O (95/5) και το vessel επανατοποθετήθηκε στη συσκευή ανάδευσης για 2 h. Τα 2 mL του διαλύματος TFA/H₂O (95/5) που περιείχαν το σύμπλοκο εισήχθησαν σε σφαιρική φιάλη των 25 mL και με χρήση flash evaporator έγινε η απομάκρυνση του διαλύτη οπότε εμφανίστηκε ένα μπορντό στέρεο. Το στέρεο επαναδιαλύθηκε σε 4 ml νερό και το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε μέχρι τιμής pH = 5,5 με KOH 0,2 M. Εν συνεχεία προστέθηκε στάγδην ένα κορεσμένο διάλυμα KPF₆ 2 mL και αφέθηκε σε ηρεμία για 1 h. Έπειτα από το πέρας μιας ώρας εμφανίστηκε ένα μπορντό στερεό. Το στερεό

φυγοκεντρήθηκε και ακολούθησαν 5 x 2 mL εκπλύσεις με H₂O για την απομάκρυνση της εναπομένουσας ποσότητας KPF₆ και του ελεύθερου πεπτιδίου, 5 x 2 mL εκπλύσεις με CH₂Cl₂ και διαιθυλαιθέρα για την απομάκρυνση άλλων πιθανών προσμίξεων. Απόδοση 4%. Στοιχειακή ανάλυση (%): Για τον τύπο C₅₄H₄₄F₁₂N₁₂O₄P₂Ru υπολογίστηκε, C:49,28, H: 3,37, N: 12,77 και βρέθηκε C: 49,30, H: 3,40, N: 12,74



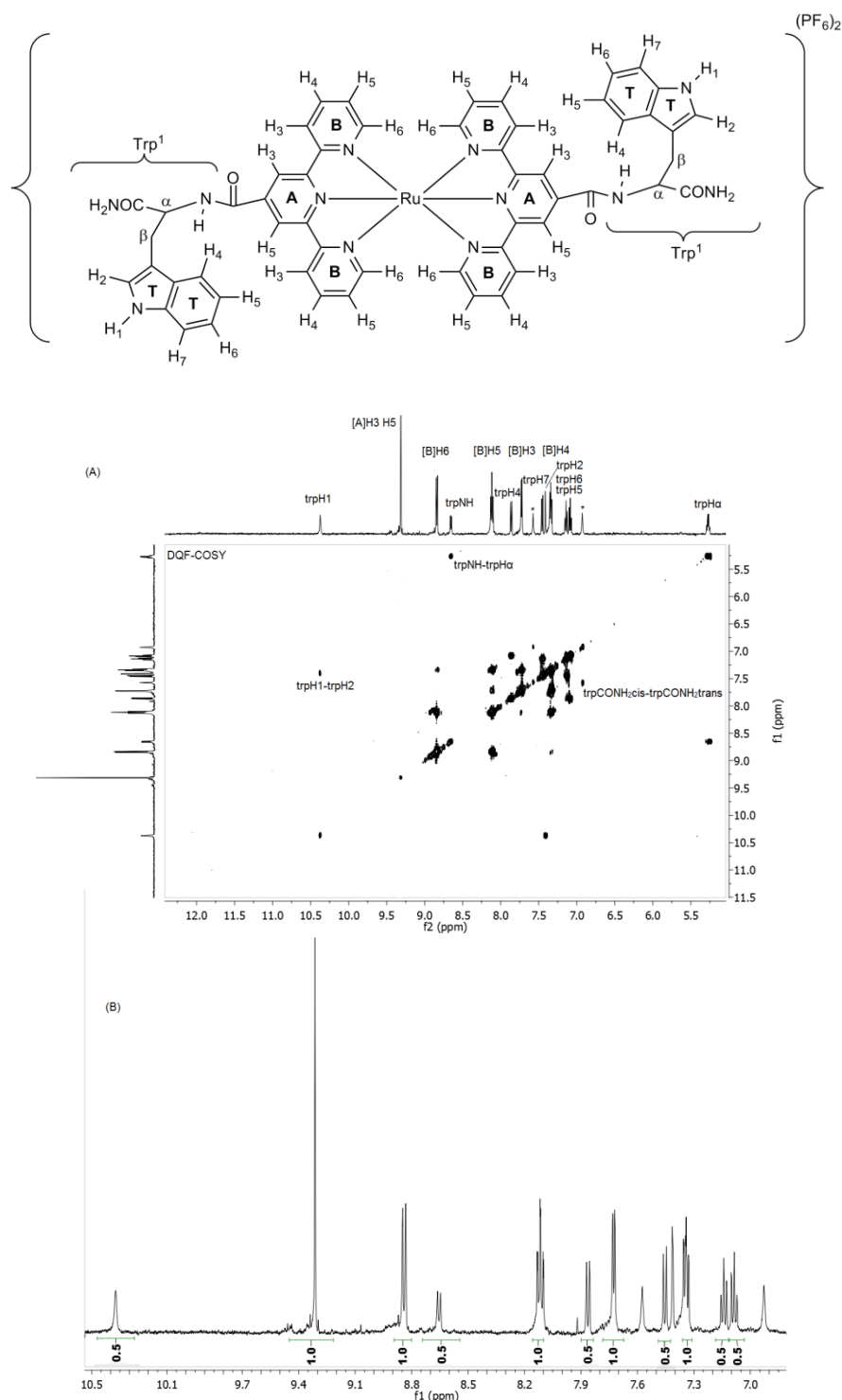
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

3.1.1. Χαρακτηρισμός των μονοπυρηνικών συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{trpy-COY})_2](\text{PF}_6)_2$ και $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-COY})](\text{PF}_6)_2$ όπου Υ το αμινοξύ τρυπτοφάνη (Trp) και τα διπεπτίδια γλυκίνο-τρυπτοφάνη (Gly-Trp) και τρυπτοφάνο-γλυκίνη (Trp-Gly).

3.1.1.1. Χαρακτηρισμός του συμπλοκου $[\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Trp-CONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$

Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{trpy-CONH-TrpCONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$ χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία NMR, HR-ESI-MS και ορατού-υπεριώδους. Το φάσμα ^1H NMR είναι σχετικά απλό, λόγω της συμμετρίας των υποκαταστατών εκατέρωθεν του Ru(II). Η σύζευξη και των δυο μορίων τρυπτοφάνης στο αρχικό σύμπλοκο, $[\text{Ru}(\text{trpy-COOH})_2](\text{PF}_6)_2$ επαληθεύεται τόσο από τα απλά σήματα συντονισμού των δύο καρβοξυ-τερπυριδινών, όσο και από την ολοκλήρωση των κορυφών συντονισμού των πρωτονίων του συμπλόκου, όπου η αναλογία των πρωτονίων των δύο τερπυριδινών, με τα πρωτόνια των δύο μορίων της τρυπτοφάνης είναι 2:1. Στο φάσμα COSY του συμπλόκου παρατηρούνται οι συζεύξεις ^3J μεταξύ των πρωτονίων των τμημάτων των υποκαταστατών δηλαδή της καρβοξυ-πυριδίνης και της τρυπτοφάνης. Για την τελευταία παρατηρούνται οι συζεύξεις ^3J μεταξύ του ίμινο-πρωτονίου του πεπτιδικού δεσμού trpNH και του πρωτονίου του Ca και του τελευταίου με τα πρωτόνια του Cβ. Ακόμη εμφανίζεται η σύζευξη ^3J του σήματος trpH2 με το trpH1. Στη συνέχεια και με βάση το φάσμα TOCSY βρίσκουμε την ^4J του trpH1 με το trpH5 και από εκεί τις υπόλοιπες κορυφές των πρωτονίων του ινδολικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης. Από τον συνδυασμό των φασμάτων TOCSY και COSY, αλλά και με βάση την πολλαπλότητα των κορυφών, αποδίδονται οι κορυφές των αρωματικών δακτυλίων της τερπυριδίνης ξεκινώντας από την απλή κορυφή του [A]H3, H5. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.



Σχήμα 3.1. (A) Τμήμα του φάσματος ^1H NMR DQF COSY @500MHz στα 298 K σε ακετόνη- d_6 του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy-CONH-TrpCONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$ με πλήρη απόδοση των κορυφών. (B) Η αρωματική περιοχή του φάσματος μιας διάστασης ^1H NMR του συμπλόκου με τις ολοκληρώσεις των κορυφών, όπου φαίνεται ο σχετικός λόγος ανάμεσα στα πρωτόνια των υποκαταστατών του συμπλόκου, της τρυπτοφάνης και της καρβοξυ-πυριδίνης.

Πίνακας 3.1. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-TrpCONH₂)₂](PF₆)₂ στους 298 K σε acetone-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiple

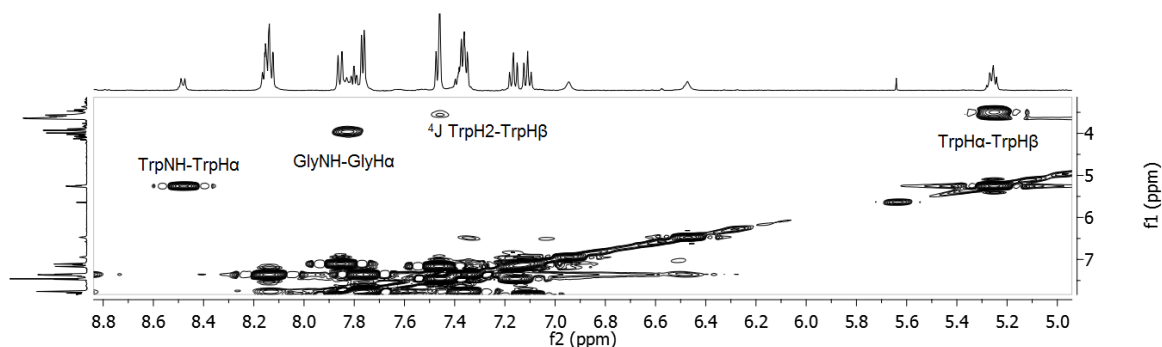
ΠΡΩΤΟΝΙΟ (H _α)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,31	s	4
[B]H3	7,72	d	4
[B]H4	7,34	t	4
[B]H5	8,11	t	4
[B]H6	8,84	d	4
TrpH1	10,38	s	2
TrpH2	7,41	s	2
TrpH4	7,87	d	2
TrpH5	7,08	t	2
TrpH6	7,14	t	2
TrpH7	7,45	d	2
TrpNH	8,66	d	2
TrpH _α	5,27	m	2
TrpH _β	3,43	d	4
CONH ₂ (<i>cis</i>)(<i>trans</i>)	7,58 & 6,93	s	2

Το φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης με ιονισμό Electrospray, HR-ESI-MS του συμπλόκου έδειξε την ύπαρξη διφορτιακού κατιόντος με λόγο $m/z = 512,120$ amu που αντιστοιχεί στο κατιόν με μοριακό τύπο {RuC₅₄N₁₂H₄₂O₄}²⁺ και στο διφορτιακό κατιόν του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-TrpCONH₂)₂]²⁺.

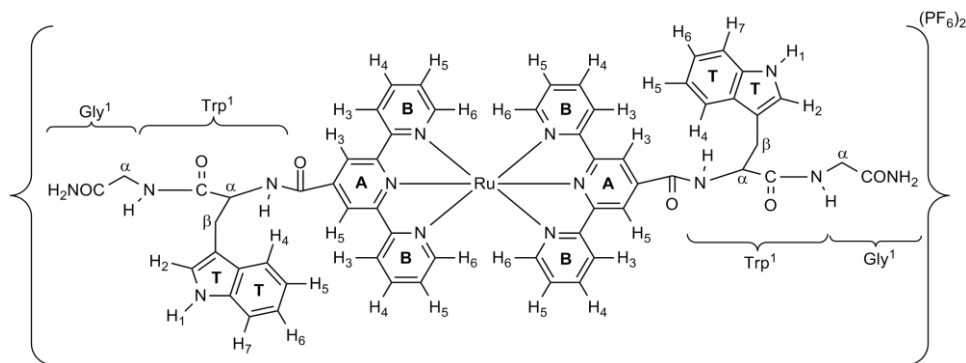
Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH₃CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT dπ(Ru) → π*(L) στα 483 nm με ε = 10340 M⁻¹cm⁻¹ και οι ταινίες π → π* στα 276 nm με ε = 29010 M⁻¹cm⁻¹ και 314 nm με ε = 26410 M⁻¹cm⁻¹ των υποκαταστατών.

3.1.1.2 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[Ru(trpy-CONH-Trp-GlyCONH_2)_2](PF_6)_2$

Παρόμοιο με το φάσμα του προηγούμενου συμπλόκου είναι και το φάσμα 1H NMR του συμπλόκου $[Ru(trpy-CONH-Trp-GlyCONH_2)_2](PF_6)_2$ τόσο ως προς την συμμετρία του μορίου αλλά και ως προς τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των υποκαταστατών. Χαρακτηριστικό είναι η μικρή μετατόπιση του TrpNH και TrpHa καθώς η τρυπτοφάνη παραμένει στην ίδια θέση ενταγμένη πάνω στην καρβοξυ-τερπυριδίνη. Στο φάσμα COSY του συμπλόκου διακρίνονται οι 3J συζεύξεις των πρωτονίων TrpNH - TrpHa (8,49-5,27 ppm) και GlyNH-GlyHa (7.83-3.96 ppm). Τα πρωτόνια των αρωματικών δακτυλίων της τερπυριδίνης και του ινδολικού δακτυλίου της τρυπτοφάνης αποδίδονται με τη βοήθεια και των φασμάτων TOCSY και παρουσιάζονται στο πίνακα που ακολουθεί.



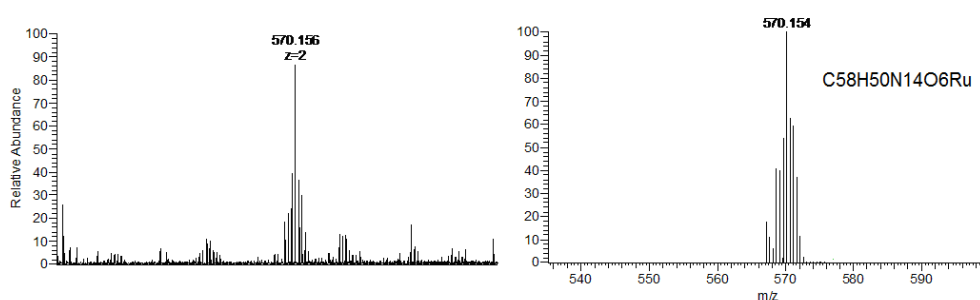
Σχήμα 3.2. Τμήμα του φάσματος 1H NMR DQF COSY @500MHz στα 298 K, σε του συμπλόκου $[Ru(trpy-CONH-Trp-GlyCONH_2)_2](PF_6)_2$ ακετόνη- d_6 .



Πίνακας 3.2. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-Trp-GlyCONH₂)₂](PF₆)₂ στους 298 K σε ακετόνη-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (H _α)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,32	s	4
[B]H3	7,77	d	4
[B]H4	7,36	t	4
[B]H5	8,14	t	4
[B]H6	8,87	d	4
TrpH1	10,29	s	2
TrpH2	7,46	d	2
TrpH4	7,85	d	2
TrpH5	7,11	t	2
TrpH6	7,17	t	2
TrpH7	7,46	d	2
TrpNH	8,48	d	2
TrpH α	5,25	t	2
TrpH β	3,47	d	4
GlyH α	3,96	m	2
GlyNH	7,82	t	2
CONH ₂ (cis)(trans)	6,95 & 7,47	s & s	2

Το φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης με ιονισμό Electrospray, HR-ESI-MS του συμπλόκου έδειξε την ύπαρξη διφορτιακού κατιόντος με λόγο $m/z = 570,156$ amu που αντιστοιχεί στο κατιόν με μοριακό τύπο {RuC₅₈N₁₄H₅₀O₆}²⁺ και στο διφορτιακό κατιόν του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-TrpGlyCONH₂)₂]²⁺.



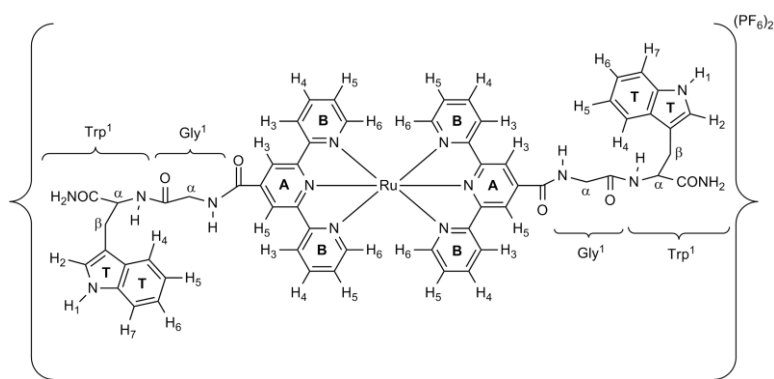
Σχήμα 3.3. Φάσμα μάζας HR-ESI-MS θετικών ιόντων, του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-TrpGlyCONH₂)₂](PF₆)₂ όπου φαίνεται το διφορτιακό κατιόν. Δεξιά δίνεται το θεωρητικά m/z με την ισοτοπική κατανομή και ο μοριακός τύπος που αντιστοιχεί, με ελάχιστη απόκλιση από την πειραματική ακριβή μάζα.

Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH₃CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT d π (Ru) $\rightarrow$ π^* (L) στα 488 nm με

$\epsilon = 8770 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 275 nm με $\epsilon = 21330 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 314 nm με $\epsilon = 20330 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών.

3.1.1.3. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly-Trp-CONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$

Αν και ο μοριακός τύπος του συμπλόκου είναι παρόμοιος με το σύμπλοκο που εξετάσαμε πιο πριν, εν τούτοις η αναστροφή στην αλληλουχία του πεπτιδίου και κατά συνέπεια στη σύζευξη του πεπτιδίου από Trp-GlyCONH₂ σε Gly-TrpCONH₂ επιφέρει σημαντικές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων που εντοπίζονται σχεδόν αποκλειστικά στα πρωτόνια του πεπτιδικού σκελετού. Έτσι το πρωτόνιο του πεπτιδικού δεσμού TrpNH δίνει ένα σήμα συντονισμού στα 7,66 ppm. Η τιμή αυτή είναι μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή της Trp όταν βρίσκεται απευθείας συζευγμένη στο καρβοξύλιο της ενταγμένης trpy, κατά -0.8 ppm, επιτρέποντας μας να γενικεύσουμε, πως η μετατόπιση ενός αμιδικού πρωτονίου κατά την απευθείας σύζευξη σε καρβοξύλιο αρωματικού δακτυλίου, σε σύγκριση με την μετατόπιση κατά τον κλασσικό πεπτιδικό δεσμό, γίνεται σε χαμηλότερα πεδία και, στην περίπτωση της τρυπτοφάνης κατά περίπου 0,8 ppm. Ο κανόνας αυτός φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση της Gly, με μικρότερη όμως μετατόπιση, όπου το αμιδικό της πρωτόνιο μετατοπίζεται επίσης σε χαμηλότερα πεδία κατά 0,3 ppm. Οι χημικές μετατοπίσεις του συνόλου των πρωτονίων του συμπλόκου παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.



Πίνακας 3.3. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-Gly-TrpCONH₂)₂](PF₆)₂ στους 298 K σε ακετόνη-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

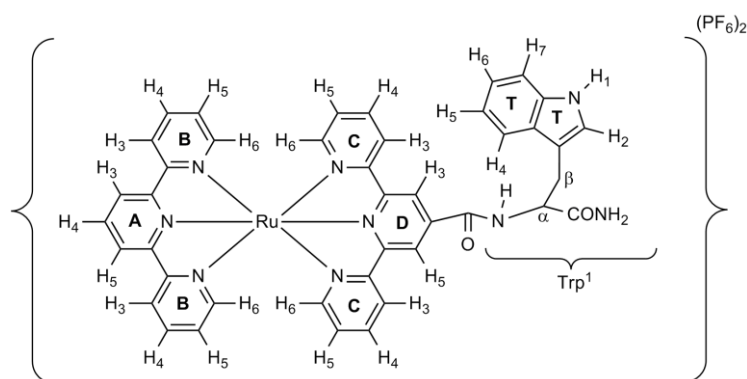
ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,56	s	4
[B]H3	7,79	m	4
[B]H4	7,33	m	4
[B]H5	8,09	m	4
[B]H6	9,00	d	4
TrpH1	10,12	s	2
TrpH2	7,30	m	2
TrpH4	7,72	m	2
TrpH5	7,01	m	2
TrpH6	6,98	m	2
TrpH7	7,31	m	2
TrpNH	7,66	m	2
TrpH α	4,80	t	2
TrpH β	3,28	d	4
GlyH α	4,28	m	2
GlyNH	8,08	m	2
CONH2(<i>cis</i>)(<i>trans</i>)	n.o		

Το φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης με ιονισμό Electrospray, HR-ESI-MS του συμπλόκου έδειξε την ύπαρξη ενός διαφορτικού κατιόντος με λόγο $m/z = 570,160$ amu που αντιστοιχεί στο κατιόν με μοριακό τύπο {RuC₅₈N₁₄H₅₀O₆}²⁺ όπως και στο προηγούμενο σύμπλοκο. Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH₃CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{L})$ στα 489 nm με $\epsilon = 8310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 276 nm με $\epsilon = 20130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 315 nm με $\epsilon = 18820 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών.

3.1.1.4. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [Ru(trpy)(trpy-CONH-TrpCONH₂)](PF₆)₂

Το σύμπλοκο [Ru(trpy)(trpy-CONH-Trp-CONH₂)](PF₆)₂ διαφοροποιείται αρκετά σε σχέση με τα προηγούμενα σύμπλοκα λόγω κυρίως της έλλειψης συμμετρίας. Έτσι στο κέντρο του Ru(II) υπάρχουν ενταγμένοι δύο διαφορετικοί υποκαταστάτες, μια τερπυριδίνη συζευγμένη μέσω αμιδικού δεσμού με μία τρυπτοφάνη και μια ενταγμένη καρβοξυ-τερπυριδίνη. Το φάσμα ¹H NMR

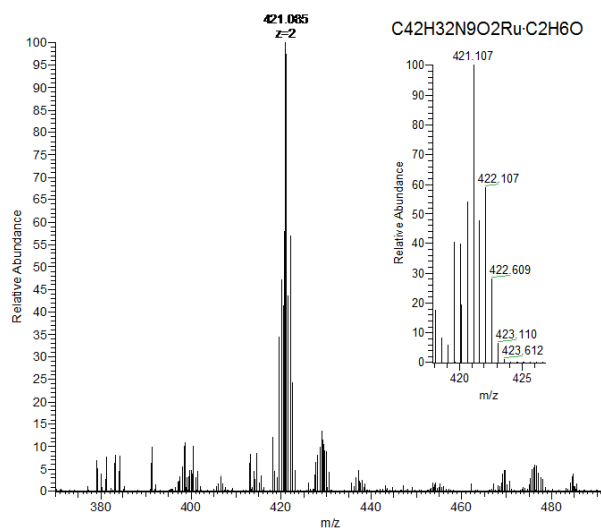
γίνεται περισσότερο πολύπλοκο από τα σύμπλοκα που εξετάσαμε έως εδώ, εμφανίζοντας ξεχωριστά σήματα συντονισμού για τα πρωτόνια και των δύο υποκαταστατών. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων των δύο υποκαταστατών διαφέρουν ελαφρώς από εκείνες των αρχικών συμπλόκων, όπως για παράδειγμα οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων της τρυπτοφάνης NH και Ha στα 8,45-5,14 ppm, παρουσιάζουν μικρές μετατοπίσεις από εκείνες των αναλόγων συμπλόκων $[\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Trp-GlyCONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$ και $[\text{Ru}(\text{trpy-CONH-TrpCONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$, που είναι αντίστοιχα, 8,48-5,25 και 8,66-5,27 ppm.



Πίνακας 3.4. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-CONH-Gly-TrpCONH}_2)](\text{PF}_6)_2$ στους 298 K σε ακετόνη- d_6 . d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	8,97	m	2
[A]H4	8,62	m	1
[B]H3	7,71	m	2
[B]H4	7,31	m	2
[B]H5	8,07	m	2
[B]H6	9,13	d	2
[C]H3	7,72	m	2
[C]H4	7,32	m	2
[C]H5	8,07	m	2
[C]H6	9,13	d	2
[D]H3, [D]H5	9,43	s	2
TrpH1	10,24	m	1
TrpH2	7,30	m	1
TrpH4	7,89	m	1
TrpH5	7,13	m	1
TrpH6	7,14	m	1
TrpH7	7,42	m	1
TrpNH	8.45	m	1
TrpHα	5,14	m	1
TrpHβ	3,59	m	2
CONH ₂ (cis)(trans)	n.o		

Το φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης με ιονισμό Electrospray, HR-ESI-MS του συμπλόκου έδειξε την ύπαρξη ενός διφορτιακού κατιόντος με λόγο $m/z = 421,085$ amu που αντιστοιχεί στο κατιόν με μοριακό τύπο $\{RuC_{42}N_9H_{32}O_2-CH_3CH_2OH\}^{2+}$ δηλαδή το κατιονικό σύμπλοκο επιδιαλυτωμένο με ένα μόριο αιθανόλης.



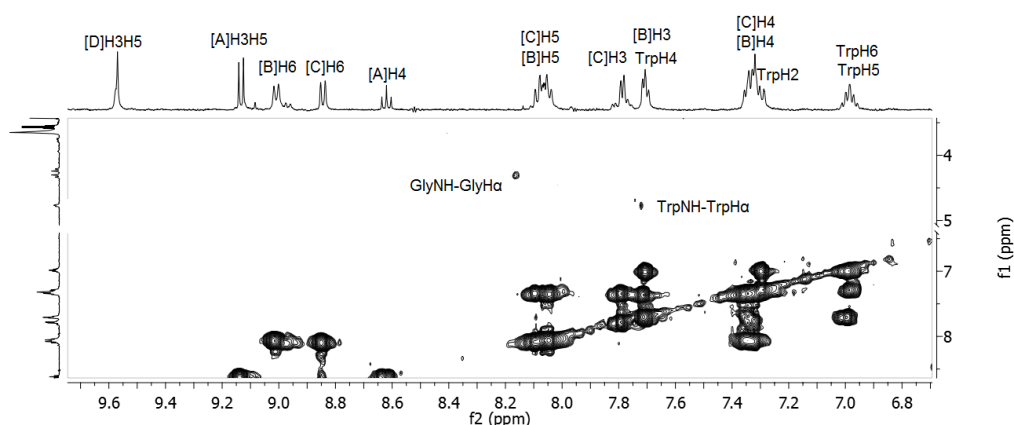
Σχήμα 3.4. Φάσμα μάζας HR-ESI-MS θετικών ιόντων, του συμπλόκου $[Ru(trpy)(trpy-CONH-Gly-TrpCONH_2)_2](PF_6)_2$ όπου φαίνεται το διφορτιακό κατιόν. Δεξιά δίνεται το θεωρητικό m/z με την ισοτοπική κατανομή και ο μοριακός τύπος που αντιστοιχεί, με ελάχιστη απόκλιση από την πειραματική ακριβή μάζα.

Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH_3CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT $d\pi(Ru) \rightarrow \pi^*(L)$ στα 488 nm με $\epsilon = 11020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 278 nm με $\epsilon = 28520 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 315 nm με $\epsilon = 25240 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών.

3.1.1.5. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[Ru(trpy)(trpy-CONHGly-TrpCONH_2)](PF_6)_2$

Το σύμπλοκο αυτό συντέθηκε ως ανάλογο του συμπλόκου με τα δύο συζευγμένα πεπτίδια Gly-Trp, και δεν είναι συμμετρικό όπως το ανάλογό του.

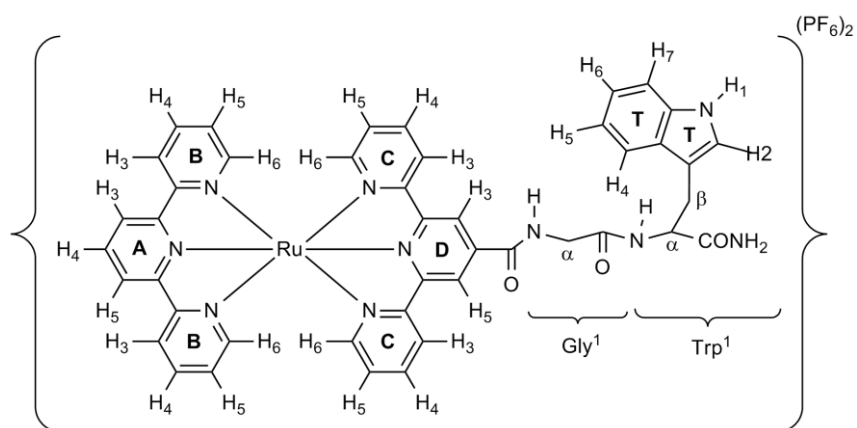
Ως εκ τούτου στο φάσμα ^1H NMR του εμφανίζονται κορυφές και από τους δύο υποκαταστάτες. Η απόδοση των κορυφών έγινε με τη βοήθεια των φασμάτων TOCSY και COSY. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ομοιότητα με το ανάλογο συμμετρικό σύμπλοκο ως προς τις τιμές των πρωτονίων του πεπτιδικού σκελετού, $\text{TrpNH-TrpH}\alpha$ και $\text{GlyNH-GlyH}\alpha$ που είναι 7,68-4,78 ppm και 8,17-4,26 ppm αντίστοιχα, ενώ στο $[\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly-TrpCONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$ είναι 7,66-4,80 ppm και 8,08-4,28 ppm.



Σχήμα 3.5. Τμήμα του φάσματος ^1H NMR DQF COSY @500MHz στα 298 K του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-CONH-Gly-TrpCONH}_2)](\text{PF}_6)_2$ σε ακετόνη- d_6 .

Το φάσμα μάζας υψηλής ανάλυσης με ιονισμό Electrospray, HR-ESI-MS του συμπλόκου έδειξε την ύπαρξη ενός διφορτιακού κατιόντος με λόγο $m/z = 570,160$ amu που αντιστοιχεί στο κατιόν με μοριακό τύπο $\{\text{RuC}_{58}\text{N}_{14}\text{H}_{50}\text{O}_6\}^{2+}$.

Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH_3CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{L})$ στα 488 nm με $\epsilon = 11330 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 275 nm με $\epsilon = 31290 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 313 nm με $\epsilon = 29930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών.



Πίνακας 3.5. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-CONH-Gly-TrpCONH}_2)_2](\text{PF}_6)_2$ στους 298 Κ σε ακετόνη- d_6 . d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

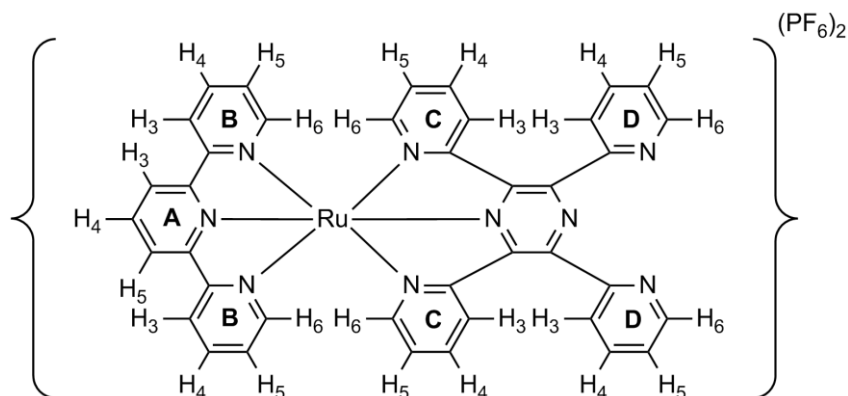
ΠΡΩΤΟΝΙΟ (HX)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ(ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,13	d	2
[A]H4	8,62	t	1
[B]H3	7,71	m	2
[B]H4	7,32	m	2
[B]H5	8,07	m	2
[B]H6	9,02	d	2
[C]H3	7,79	d	2
[C]H4	7,32	m	2
[C]H5	8,07	m	2
[C]H6	8,85	d	2
[D]H3,[D]H5	9,57	s	2
TrpH1	10,39	-	1
TrpH2	7,28	m	1
TrpH4	7,69	m	1
TrpH5	7,00	m	1
TrpH6	6,98	m	1
TrpH7	7,26	m	1
TrpH α	4,78	m	1
TrpH β	3,28	m	2
TrpNH	7,68	m	1
GlyH α	8,17	m	2
GlyNH	4,26	d	1
CONH ₂ (cis)(trans)	n.o		

3.1.2 Χαρακτηρισμός των διπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II)

3.1.2.1 Χαρακτηρισμός των συμπλόκων [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy)](PF₆)₄, [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄ και [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄ και των πρόδρομων τους.

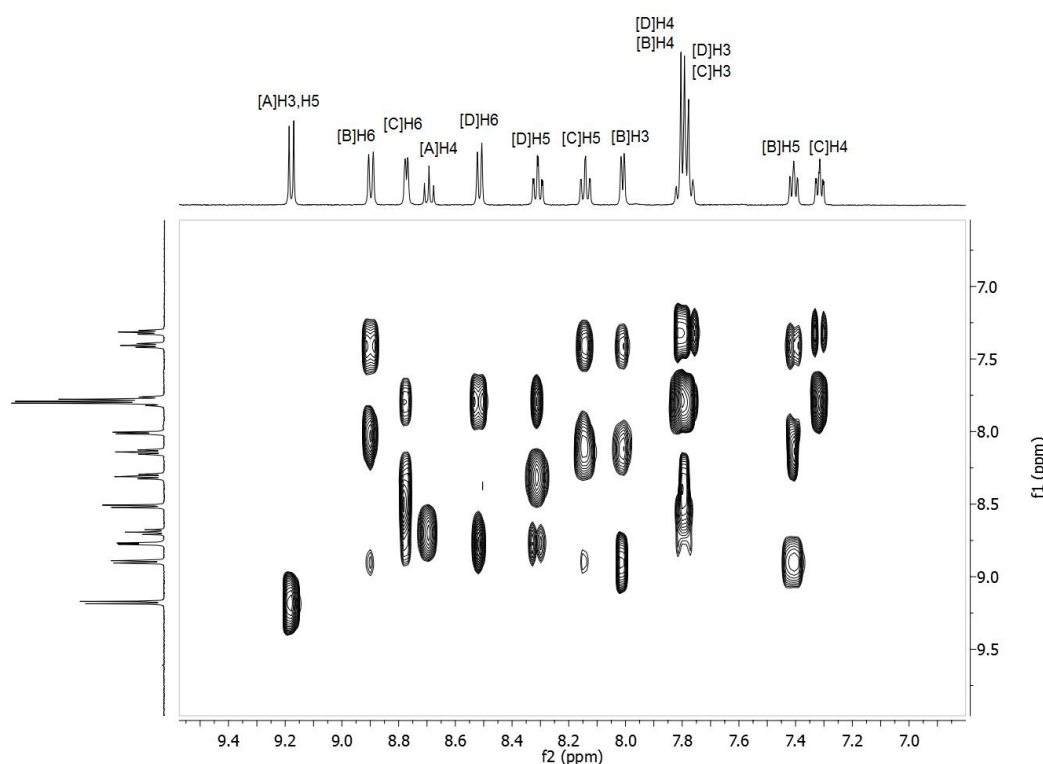
3.1.2.1.1 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [Ru(trpy)(tppz)](PF₆)₂

Από την ανάλυση των φασμάτων ¹H-NMR μιας και δύο διαστάσεων, COSY και TOCSY που λήφθηκαν σε dms_o-d₆, παρατηρούμε μετατοπίσεις των πρωτονίων του υποκαταστάτη tppz κατά την ένταξη στο αρχικό σύμπλοκο Ru(trpy)Cl₃.



Τα πρωτόνια των δακτυλίων [C] H₆ που βρίσκονται πλησίον του ενταγμένου αζώτου του tppz, αποπροστατεύονται και μετακινούνται προς υψηλότερα πεδία περίπου κατά 0,4 ppm, στα 8,78 ppm, δίνοντας μια διπλή κορυφή, υποδεικνύοντας έτσι την ένταξη του υποκαταστάτη στον μεταλλικό σύμπλοκο. Τα άλλα πρωτόνια των δύο δακτυλίων [C] H₅, H₄ και H₃ μετατοπίζονται είτε προς υψηλότερα ή χαμηλότερα πεδία, σε συμφωνία με τις μετατοπίσεις των δι-υποκατεστημένων τερπυριδινών κατά την ένταξη τους στο ρουθίνιο [109-112]. Από το φάσμα TOCSY του συμπλόκου φαίνονται όλα τα συστήματα spin των πυριδινικών δακτυλίων [A], [B], [C], [D]. Το πρωτόνιο H₄ του [A] είναι το μόνο σήμα στο φάσμα μιας διάστασης που δίνει ολοκλήρωση ενός πρωτονίου, και έχει μία ισχυρή crosspeak στο COSY (³J) με τα πρωτόνια [A]H₃ και [A]H₅. Η

συμμετρία του μορίου επιβεβαιώνεται από τις ολοκληρώσεις των πρωτονίων όπου το πρωτόνιο [A]H4, το οποίο βρίσκεται πάνω στο άξονα συμμετρίας, έχει λόγο 1:2 σε σχέση με τα υπόλοιπα πρωτόνια των πυριδινικών δακτυλίων που βρίσκονται εκατέρωθεν του άξονα συμμετρίας. Θεωρώντας ότι κατά την ένταξη του tppz στο Ru(trpy)Cl₃ τα πρωτόνια των δακτυλίων [B] του ενταγμένου trpy δεν αναμένεται να έχουν σημαντικές μετατοπίσεις, από το φάσμα TOCSY ως σύστημα spin [B] αποδίδεται εκείνο με τις μικρότερες μετατοπίσεις. Τέλος από τα εναπομένοντα δύο συστήματα spin [C] και [D] εκείνο που έχει την διπλή κορυφή στα χαμηλότερα πεδία αποδίδεται στο [C]H6 που βρίσκεται κοντά στη θέση ένταξης του Ru(II). Στο φάσμα TOCSY που ακολουθεί αποδίδονται όλες οι κορυφές των πρωτονίων του συμπλόκου.



Σχήμα 3.6. Τμήμα από το φάσμα TOCSY (75 ms) @500 MHz στους 298 K, του συμπλόκου [Ru(trpy)(tppz)](PF₆)₂ σε ακετόνη-d₆

Πίνακας 3.6. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$ στους 298 K σε ακετόνη- d_6 . d = doublet, t = triplet, m = multiplet

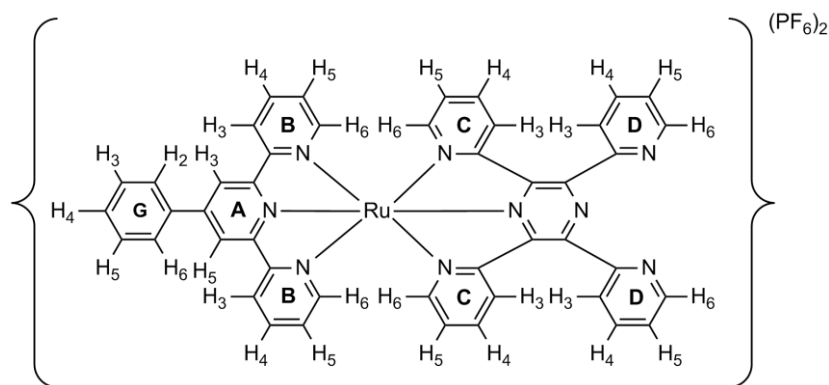
ΠΡΩΤΟΝΙΟ (H α)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,19	d	2
[A]H4	8,69	t	1
[B]H3	8,01	d	2
[B]H4	7,41	t	2
[B]H5	8,14	t	2
[B]H6	8,91	d	2
[C]H3	8,52	d	2
[C]H4	8,31	t	2
[C]H5	7,80	m	2
[C]H6	8,78	d	2
[D]H3	7,80	m	2
[D]H4	7,80	m	2
[D]H5	7,31	t	2
[D]H6	7,80	m	2

Η ανάλυση του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$ σε φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης με ιονισμό Electrospray, High Resolution ESI-MS, έδειξε την ύπαρξη ενός μονοφορτιακού κατιόντος με λόγο $m/z = 722,13$ amu και ενός διφορτιακού με λόγο $m/z = 361,57$ amu που αντιστοιχούν στους μοριακούς τύπους $\{\text{RuC}_{39}\text{N}_9\text{H}_{27}\text{-H}^+\}^+$ και $\{\text{RuC}_{39}\text{N}_9\text{H}_{27}\}^{2+}$. Οι τύποι αυτοί μπορούν να αντιστοιχηθούν στα ιόντα $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{tppz})\text{-H}^+]^+$ και $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{tppz})]^{2+}$. Να αναφέρουμε εδώ ότι το σύμπλεγμα των κορυφών που παρατηρήσαμε έχει την χαρακτηριστική ισοτοπική κατανομή των κορυφών που αντιστοιχούν θεωρητικά στον προτεινόμενο μοριακό τύπο.

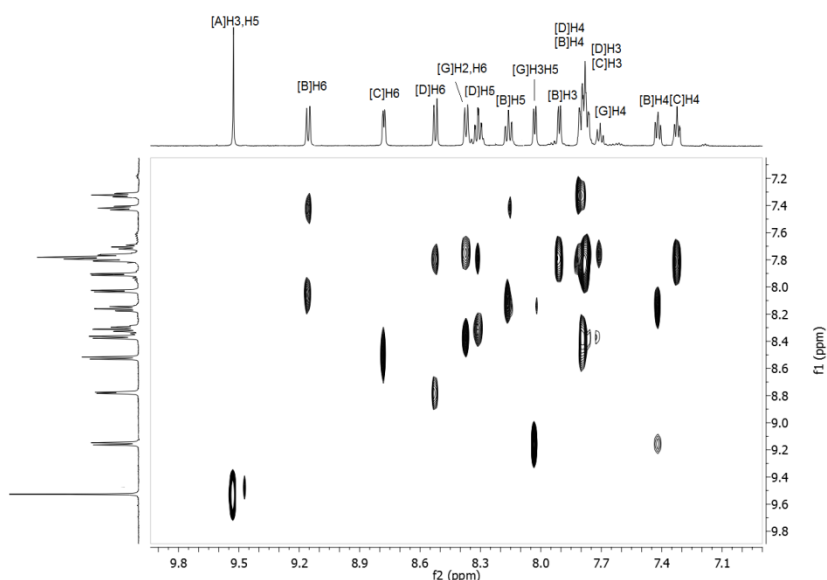
3.1.2.1.2. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{ptrpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$

Στο σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{ptrpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$ τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του tppz δεν διαφοροποιούνται ιδιαίτερα σε σχέση με αυτά του συμπλόκου $\text{Ru}[(\text{trpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$ που αναλύσαμε παραπάνω δίνοντας παρόμοιες τιμές όπως φαίνεται στον πίνακα 3.7. Η διαφοροποίηση έγκειται στα σήματα των πρωτονίων της φαινυλ-τερπυριδίνης (ptrpy) όπου το [A]H3 και [A]H5 (λόγω συμμετρίας) δίνουν μια χαρακτηριστική απλή κορυφή με

ολοκλήρωση δύο πρωτονίων στα 9,53 ppm, η οποία δεν συσχετίζεται με καμία άλλη τόσο στο φάσμα φάσματα COSY όσο και TOCSY. Η απόδοση των ταινιών έγινε όπως στη περίπτωση του συμπλόκου 3.1.2.1.1.



Λόγω της συμμετρίας του μορίου το μοναδικό πρωτόνιο που έχει λόγο ολοκλήρωσης 1:2 σε σχέση με τα υπόλοιπα πρωτόνια του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{ptrpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$ είναι το $[\text{G}]\text{H}_4$ που δίνει ένα σήμα συντονισμού στα 7,71 ppm σε πολύ υψηλότερα πεδία (περίπου -1 ppm) σε σχέση με το αντίστοιχο πρωτόνιο $[\text{A}]\text{H}_4$ (8,69 ppm) του $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι ανήκει σε φαινολικό δακτύλιο και όχι σε πυριδινικό δακτύλιο.



Σχήμα 3.7. Τμήμα από το φάσμα TOCSY (75 ms) @500 MHz στους 298 K, του συμπλόκου $[\text{Ru}(\text{ptrpy})(\text{tppz})](\text{PF}_6)_2$ σε ακετόνη- d_6 .

Πίνακας 3.7. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [Ru(ptrpy)(tppz)](PF₆)₂ στους 298 K σε ακετόνη-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (H _α)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3,[A]H5	9,53	s	2
[B]H3	8,04	d	2
[B]H4	7,42	t	2
[B]H5	8,16	t	2
[B]H6	9,16	d	2
[C]H3	8,52	d	2
[C]H4	8,31	t	2
[C]H5	7,79	m	2
[C]H6	8,78	d	2
[D]H3	7,79	m	2
[D]H4	7,79	m	2
[D]H5	7,32	t	2
[D]H6	7,91	d	2
[G]H2,GH6	8,36	d	2
[G]H3,GH5	7,79	m	2
[G]H4	7,71	t	1

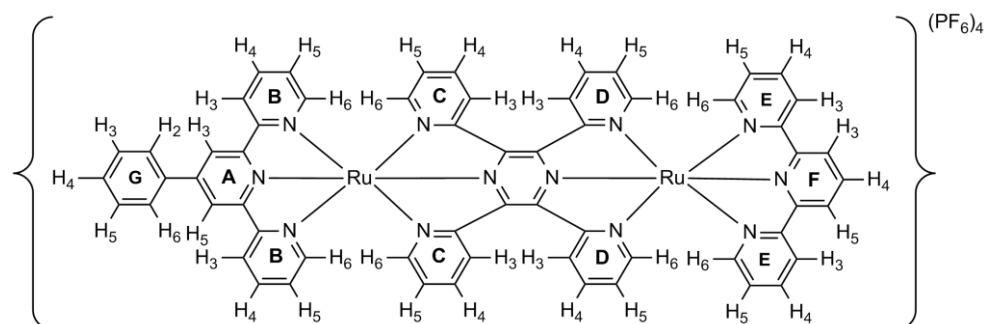
Το σύμπλοκο [Ru(ptrpy)(tppz)](PF₆)₂ αναλύθηκε σε φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης με ιονισμό Electrospray, HR-ESI-MS, έδειξε την ύπαρξη ενός διαφορτικού κατιόντος με λόγο $m/z = 399,59$ amu που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο {RuC₄₅H₃₁N₉}²⁺ και μπορεί να αντιστοιχηθεί στο ιόν [Ru(ptrpy)(tppz)]²⁺. Το σύμπλεγμα των κορυφών που παρατηρείται έχει την χαρακτηριστική ισοτοπική κατανομή των κορυφών που αντιστοιχούν θεωρητικά στον προτεινόμενο μοριακό τύπο.

3.1.2.1.3. Χαρακτηρισμός του διπυρηνικού συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy)](PF₆)₄

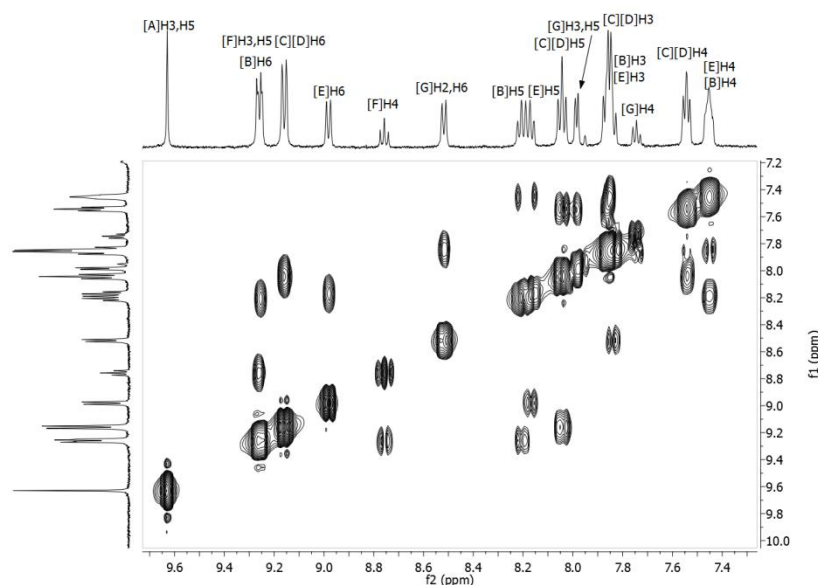
Στο διπυρηνικό σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy)](PF₆)₄ τα πρωτόνια των δακτυλίων [C] και [D] του tpnz που βρίσκονται στο μέσον του συμπλόκου συντονίζονται σχεδόν σε ίδιες τιμές ppm όπως φαίνεται στον πίνακα 3.8.

Αυτό συμβαίνει παρότι το σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(tpnz)Ru(trpy)](PF₆)₄ δεν έχει απόλυτη συμμετρία ως προς τον κάθετο άξονα, καθώς υπάρχει ένας φαινολικός δακτύλιος [G] στο ένα άκρο του, ενώ στο άλλο το πρωτόνιο [F]H4. Τα δυο

μεταλλικά κέντρα εκατέρωθεν του trpz είναι αυτά που επηρεάζουν κυρίως τις τιμές συντονισμού των πρωτονίων των δακτυλίων [C] και [D] του trpz, ενώ η επίδραση των δύο διαφορετικών τερφυριδινών φαίνεται να επηρεάζει τα ελάχιστα συγκεκριμένα πρωτόνια.



Σε ένα όργανο NMR μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας (>500 MHz), πιθανότητα θα εμφανιζόταν οι μικρές διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις που υπάρχουν λόγω της έλλειψης συμμετρίας, όπως παρατηρούνται στην περίπτωση των πρωτονίων [C]H3 και [D]H3 όπου εμφανίζονται ως μια πολλαπλή κορυφή στο φάσμα μια διάστασης, με διακριτές όμως crosspeaks στα φάσματα δυο διαστάσεων.



Σχήμα 3.8. Τμήμα από το φάσμα COSY @500 MHz στους 298 K, του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy)](PF₆)₄ σε dmsd-d₆.

Πίνακας 3.8. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy)](PF₆)₄ στους 298 K σε dms₂-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (H _x)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,63	s	2
[B]H3	7,86	d	2
[B]H4	7,45	m	2
[B]H5	8.17-8,19	m	2
[B]H6	9,26	d	2
[C]H3	7-85-7,98	m	2
[C]H4	7,54	t	2
[C]H5	8,04	t	2
[C]H6	9,16	d	2
[D]H3	7,85-7,98	m	2
[D]H4	7,54	t	2
[D]H5	8,04	t	2
[D]H6	9,16	d	2
[E]H3	7,86	d	2
[E]H4	7,45	m	2
[E]H5	8,19	m	2
[E]H6	8,98	d	2
[G]H2, [G]H6	8,52	m	2
[G]H3, [G]H5	7,84	t	2
[G]H4	7,75	t	1
[F]H3, [F]H5	9,27	m	2
[F]H4	8,76	t	1

Τα πρωτόνια των υποκαταστατών ptrpy και trpy έχοντας ενταγμένο απευθείας το ένα μεταλλικό κέντρο δίνουν αναμενόμενες χημικές μετατοπίσεις. Τα πρωτόνια [B]H6, [E]H6 των ptrpy και trpy αντίστοιχα, που βρίσκονται πλησίον των πυριδινικών αζώτων, δίνουν σήματα συντονισμού στα 9,26 και 8,98 ppm αντίστοιχα, μετατοπισμένα σε χαμηλότερα πεδία εξαιτίας της ένταξης των δύο μεταλλικών κέντρων του ρουθηνίου. Η συμμετρία του μορίου επιβεβαιώνεται από τις ολοκληρώσεις των πρωτονίων, όπου τα πρωτόνια [G]H₄ και [F]H₄ που βρίσκεται πάνω στο άξονα συμμετρίας έχουν λόγο 1:2 σε σχέση με τα υπόλοιπα πρωτόνια των πυριδινικών δακτυλίων που βρίσκονται εκατέρωθεν του άξονα συμμετρίας.

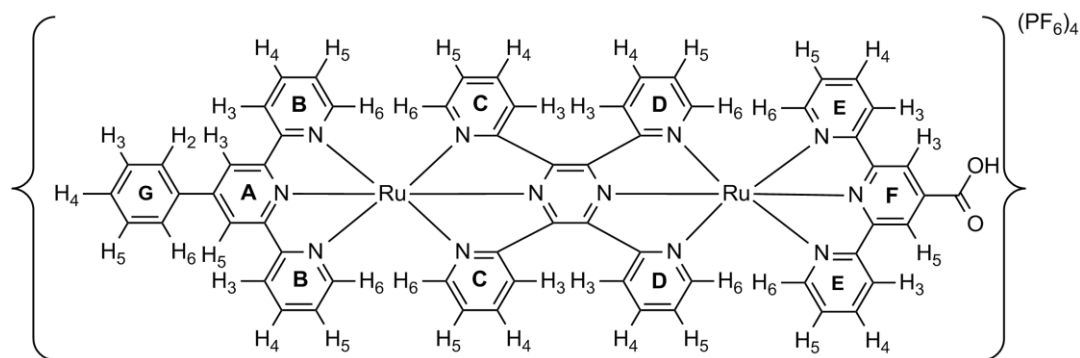
Το διπυρηνικό σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy)](PF₆)₄ αναλύθηκε σε φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης με ιονισμό Electrospray, HR-ESI-MS, έδειξε την ύπαρξη μονο- δι- τρι- και τετραφορτιακών κατιόντων με λόγους *m/z* = 523,69 και 475,37 και 427,05 και 284,04 amu που αντιστοιχούν στους μοριακούς

τύπους $\{\text{Ru}_2\text{C}_{60}\text{N}_{12}\text{H}_{42}\text{P}_3\text{F}_{18}\}^+$, $\{\text{Ru}_2\text{C}_{60}\text{N}_{12}\text{H}_{42}\text{P}_2\text{F}_{12}\}^{2+}$, $\{\text{Ru}_2\text{C}_{60}\text{N}_{12}\text{H}_{42}\text{PF}_6\}^{3+}$, $\{\text{Ru}_2\text{C}_{60}\text{N}_{12}\text{H}_{42}\}^{4+}$ αντίστοιχα. Τα παραπάνω ιόντα μπορούν να αντιστοιχηθούν στον μοριακό τύπο του συμπλόκου με σταδιακή αποδέσμευση των αντισταθμιστικών ιόντων. Το σύμπλεγμα των κορυφών που παρατηρείται έχει την χαρακτηριστική ισοτοπική κατανομή των κορυφών που αντιστοιχούν θεωρητικά στον προτεινόμενο μοριακό τύπο.

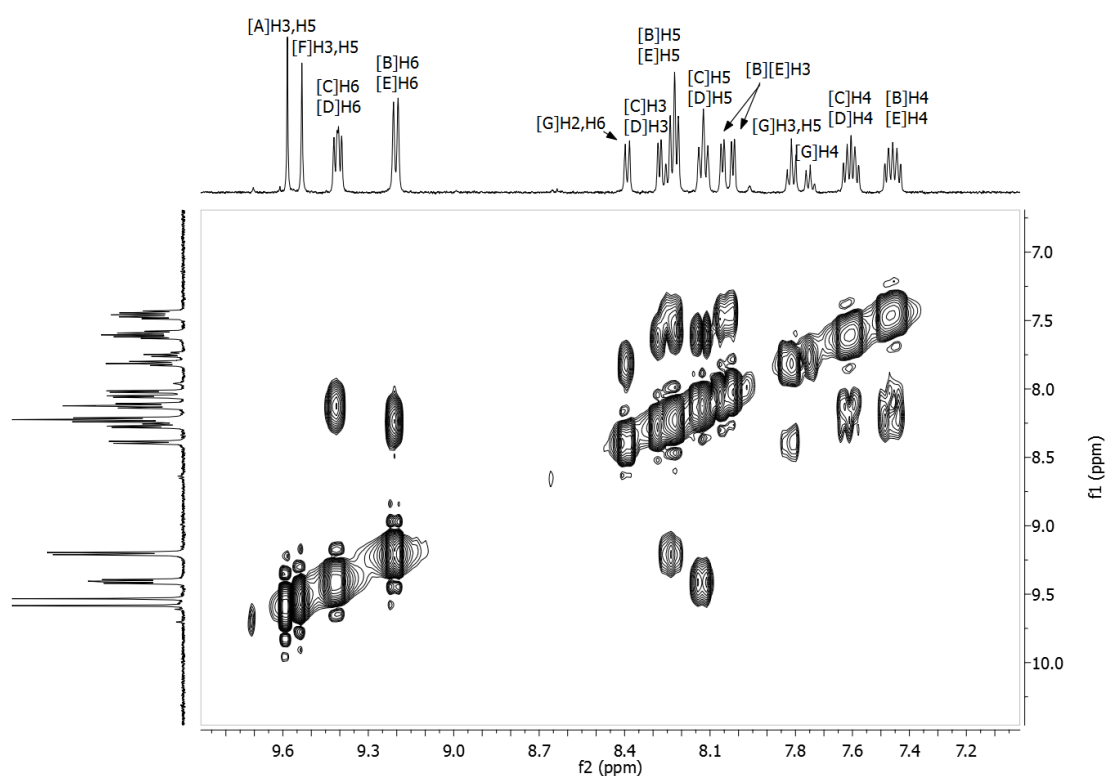
Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH_3CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{L})$ στα 552 nm με $\epsilon = 42010 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 298 nm με $\epsilon = 73020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 375 nm με $\epsilon = 32000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών tppz, trpy και ptrpy.

3.1.2.1.4. Χαρακτηρισμός του διπυρηνικού συμπλόκου $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOH})](\text{PF}_6)_4$

Το φάσμα του συμπλόκου $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOH})](\text{PF}_6)_4$ λήφθηκε σε διαλύτη ακετόνη- d_6 . Τα πρωτόνια των δακτυλίων [C] και [D] του tppz που βρίσκονται στο μέσο του συμπλόκου, δίνουν σήματα συντονισμού σε πολύ κοντινές τιμές στην κλίμακα ppm, όπως και στην περίπτωση του συμπλόκου $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy})](\text{PF}_6)_4$. Έτσι επαληθεύεται ο ισχυρισμός ότι τα δυο μεταλλικά κέντρα του ρουθηνίου είναι αυτά που παίζουν τον κύριο ρόλο στις τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του tppz.



Τα πρωτόνια των υποκατάστατων ptrpy και trpy-COOH διαφοροποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα πρωτόνια του trpz. Χαρακτηριστικές είναι οι δυο απλές κορυφές των πρωτονίων, [A]H3 και [A]H5 του ptrpy που εμφανίζεται στα 9,58 ppm (κοντά στην τιμή που εμφανίζεται στο σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(trpz)Ru(trpy)](PF₆)₄, δηλαδή στα 9,63 ppm) και των πρωτονίων [F]H3 και [F]H5, που ανήκουν στον δακτύλιο [F] με την υποκατάσταση της καρβοξυλομάδας, που εμφανίζεται στα 9,53 ppm. Οι κορυφές αυτές δεν εμφανίζουν ³J σύζευξη με κανένα άλλο πρωτόνιο, στο φάσμα COSY του συμπλόκου.



Σχήμα 3.9. Τμήμα από το φάσμα COSY @500 MHz στους 298 K, σε ακετόνη-d₆ του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(trpz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄

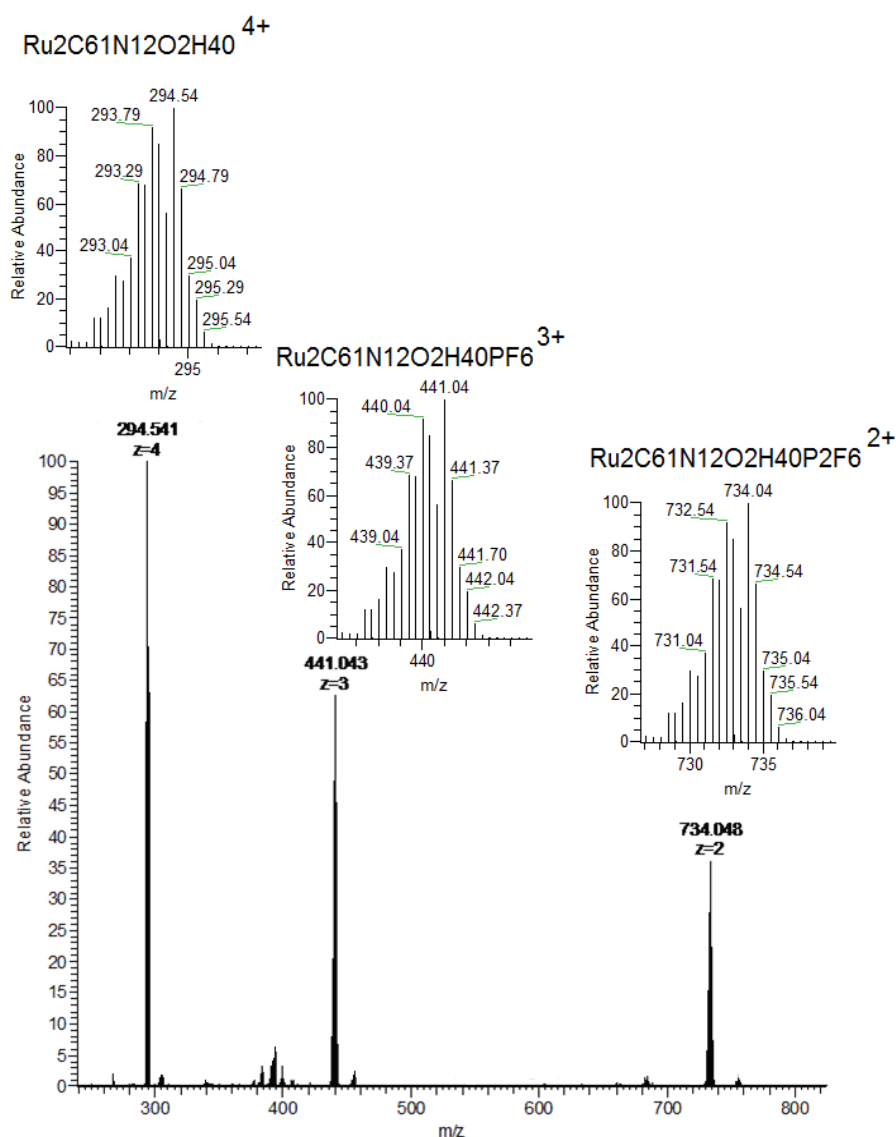
Τα πρωτόνια του [B]H6, [C]H6, [D]H6, [E]H6 που βρίσκονται δίπλα στα άτομα αζώτου που εντάσσονται στα δυο μεταλλικά κέντρα, είναι αυτά που αποπροστατεύονται περισσότερο, υποδηλώνοντας την ένταξη των μετάλλων στα άτομα αζώτου των πυριδινικών υποκαταστατών.

Πίνακας 3.9. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄ στους 298 K σε ακετόνη-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,58	s	2
[B]H3	8,02-8,05	d	2
[B]H4	7,46	m	2
[B]H5	8,27	m	2
[B]H6	9,21	d	2
[C]H3	8,22	m	2
[C]H4	7,60	m	2
[C]H5	8,12	m	2
[C]H6	9,40	m	2
[D]H3	8,22	m	2
[D]H4	7,60	m	2
[D]H5	8,12	m	2
[D]H6	9,40	m	2
[E]H3	8,02-8,05	d	2
[E]H4	7,46	m	2
[E]H5	8,27	m	2
[E]H6	9,21	d	2
[G]H2, [G]H6	8,40	d	2
[G]H3, [G]H5	7,81	t	2
[G]H4	7,75	t	1
[F]H3, [F]H5	9,53	s	2

Το σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄ αναλύθηκε σε φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης με ιονισμό Electrospray, HR-ESI-MS και έδειξε την ύπαρξη δι- τρι- και τετραφορτιακών κατιόντων με λόγους $m/z = 734,048$ και $441,043$ και $294,541$ amu που αντιστοιχούν στους μοριακούς τύπους {Ru₂C₆₁N₁₂H₄₀P₂F₁₂}²⁺, {Ru₂C₆₁N₁₂H₄₀PF₆}³⁺ και {Ru₂C₆₁N₁₂H₄₀}⁴⁺ αντίστοιχα. Η ύπαρξη κατιόντος φορτίου 4+ χωρίς αντισταθμιστικά ανιόντα PF₆⁻ σημαίνει ότι το φορτίο του συμπλόκου είναι 4+, δηλαδή [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)]⁴⁺. Κατά την απλούστερη κατανομή του φορτίου στα μεταλλικά κέντρα ρουθηνίου και θεωρώντας ότι από την διαδικασία παρασκευής του συμπλόκου η καρβοξυλομάδα είναι πρωτονιωμένη, θα πρέπει τα άτομα ρουθηνίου να βρίσκονται σε οξειδωτική κατάσταση +2 το καθένα. Τα ιόντα που ανιχνεύθηκαν μπορούν να αντιστοιχηθούν στον προτεινόμενο τύπο του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄ μετά από σταδιακή αποδέσμευση των αντισταθμιστικών ιόντων PF₆⁻. Το σύμπλεγμα των κορυφών που παρατηρείται

έχει την χαρακτηριστική ισοτοπική κατανομή των κορυφών που αντιστοιχούν θεωρητικά στον προτεινόμενο μοριακό τύπο.

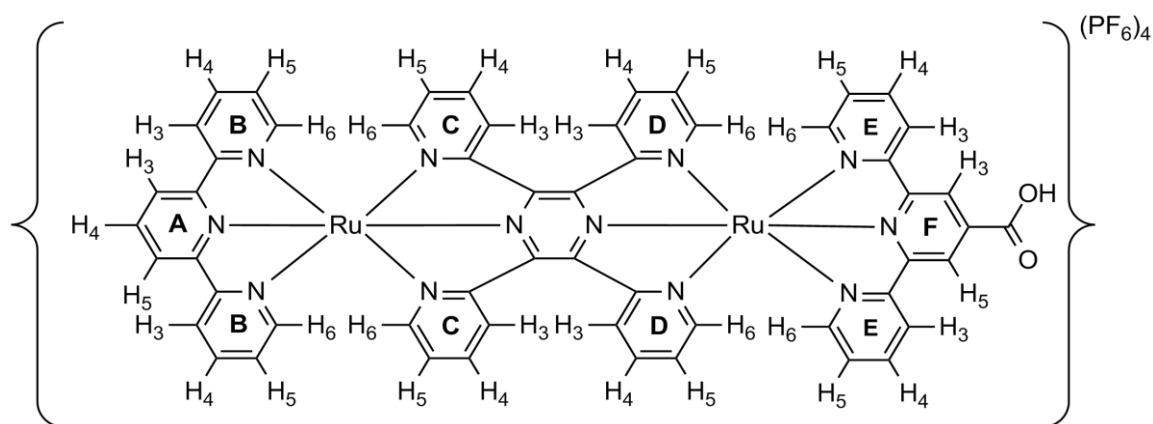


Σχήμα 3.10. Φάσμα μάζας HR-ESI-MS θετικών ιόντων, του συμπλόκου $[(\text{ptprpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOH})](\text{PF}_6)_4$ όπου φαίνονται τα διαδοχικά πολυφορτιακά κατιόντα που σχηματίζονται. Ένθετα δίνονται τα θεωρητικά m/z με τις ισοτοπικές κατανομές και οι μοριακοί τύποι που τους αντιστοιχούν, με ελάχιστες αποκλίσεις από την πειραματική ακριβή μάζα.

Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH_3CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{L})$ στα 552 nm με $\epsilon = 40820 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 295 nm με $\epsilon = 72110 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 377 nm με $\epsilon = 30430 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών tppz , trpy και ptprpy .

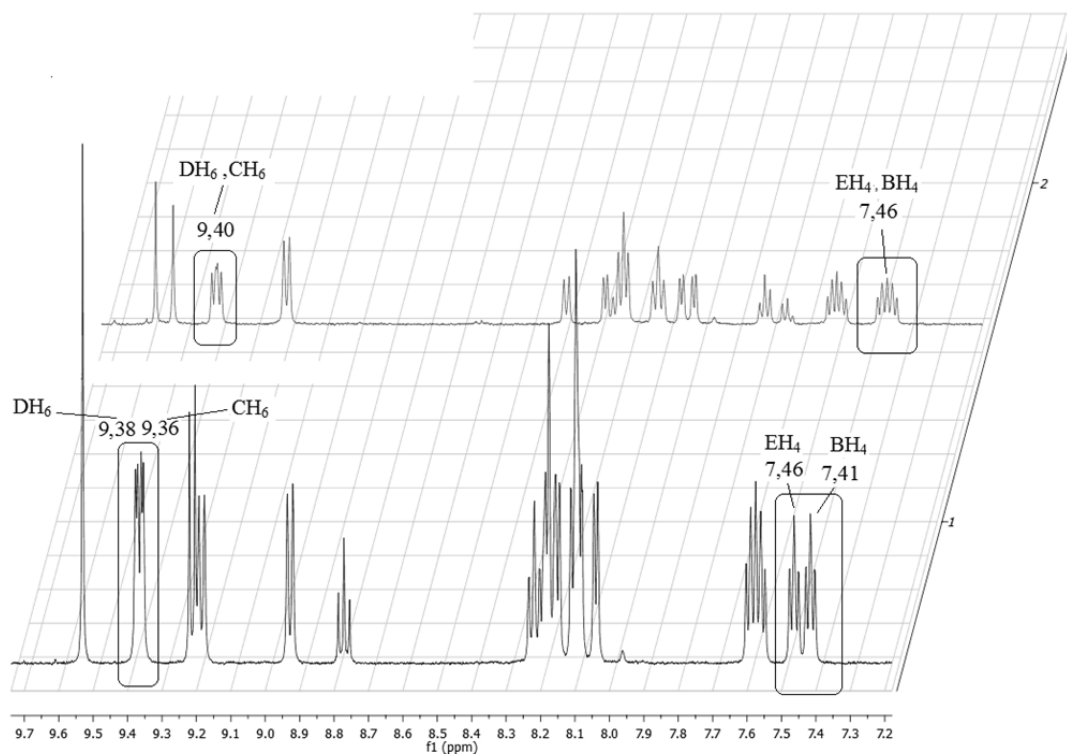
3.1.2.1.5. Χαρακτηρισμός του διπυρηνικού συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄

Το φάσμα ¹H NMR του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₅ λήφθηκε σε διαλύτη ακετόνη-d₆. Το σύμπλοκο [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₅ διαφοροποιείται από το σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₅ ως προς την φαινυλομάδα που πλέον δεν υπάρχει στο ένα άκρο του συμπλόκου δίνοντας ένα σχετικά απλούστερο φάσμα.



Συγκρίνοντας το σύμπλοκο [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄ με το σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄, παρατηρούμε ότι το τμήμα που βρίσκεται κοντά στο άκρο με την καρβοξυλομάδα δεν έχει διαφοροποιήσεις ως προς τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η απλή κορυφή που οφείλεται στα πρωτόνια [F]H₃, [F]H₅ και βρίσκεται στα 9,53 ppm, δίνοντας ακριβώς το ίδιο σήμα με αυτό των αντίστοιχων πρωτονίων του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄. Μεγάλη είναι η διαφοροποίηση στις τιμές συντονισμού των πρωτονίων [B]H₆ και [E]H₆ που βρίσκονται στα 8,93 ppm και 9,19 ppm αντίστοιχα και μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με τα αντίστοιχα [B]H₆ και [E]H₆ του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₅ τα οποία συντονίζονται στα 9,21 ppm. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στην επίδραση που προκαλεί ο φαινολικός δακτύλιος του ptrpy σε σχέση με το trpy ο οποίος στην θέση του φαινολικού

δακτυλίου έχει ένα πρωτόνιο. Όπως φαίνεται και στο σχήμα που ακολουθεί η υποκατάσταση της θέσης 4' της τερφυριδίνης με φαινολικό δακτύλιο, μας επιτρέπει να δούμε τις διαφορές που επάγει στα πρωτόνια των δακτυλίων [C], [D] και [E], [B]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα πρωτόνια [E]H4 και [B]H4 όπου η πολλαπλή κορυφή στην πρώτη περίπτωση γίνεται ξεκάθαρα δυο τριπλές με 0,05 ppm διαφορά μεταξύ τους, καθώς και των πρωτονίων [D]H6 και [C]H6 όπου οι δυο διπλές κορυφές των διακρίνονται πλέον ευκρινώς. Η απόδοση των σημάτων συντονισμού του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄ έγινε με την βοήθεια των φασμάτων TOCSY και COSY και παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί.



Σχήμα 3.11. Μέρος του φάσματος ¹H NMR των συμπλόκων [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄ και [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄ όπου φαίνεται η επίδραση της υποκατάστασης του φαινολικού δακτυλίου στην θέση 4' της τερφυριδίνης στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των συμπλόκων.

Πίνακας 3.10. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₄ στους 298 Κ σε ακετόνη-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,22	d	2
[A]H4	8,77	t	1
[B]H3	8,04	m	2
[B]H4	7,41	t	2
[B]H5	8,17	m	2
[B]H6	8,93	d	2
[C]H3	8,17	m	2
[C]H4	7,57	m	2
[C]H5	8,10	t	2
[C]H6	9,36-9,38	d	2
[D]H3	8,17	m	2
[D]H4	7,57	m	2
[D]H5	8,10	t	2
[D]H6	9,36-9,38	d	2
[E]H3	8,17	m	2
[E]H4	7,46	t	2
[E]H5	8,22	m	2
[E]H6	9,19	d	2
[F]H3,[F]H5	9,53	s	2

Το σύμπλοκο [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpyCOOH)](PF₆)₄ αναλύθηκε σε φασματομέτρο μάζας υψηλής ανάλυσης με ιονισμό Electrospray, HR-ESI-MS, έδειξε την ύπαρξη δι- τρι- και τετραφορτιακών κατιόντων όπως στην περίπτωση του προηγούμενου συμπλόκου με λόγους $m/z = 696,53$ και $416,03$ και $275,78$ amu που αντιστοιχούν στους μοριακούς τύπους {Ru₂C₅₅N₁₂H₃₇O₂P₂F₁₂}²⁺, {Ru₂C₅₅N₁₂H₃₇O₂PF₆}³⁺, {Ru₂C₅₅N₁₂H₃₇O₂}⁴⁺ αντίστοιχα. Τα παραπάνω ιόντα μπορούν να αντιστοιχηθούν στον τύπο του συμπλόκου με σταδιακή αποδέσμευση των αντισταθμιστικών ιόντων. Το σύμπλεγμα των κορυφών που παρατηρείται έχει την χαρακτηριστική ισοτοπική κατανομή των κορυφών που αντιστοιχούν θεωρητικά στον προτεινόμενο μοριακό τύπο.

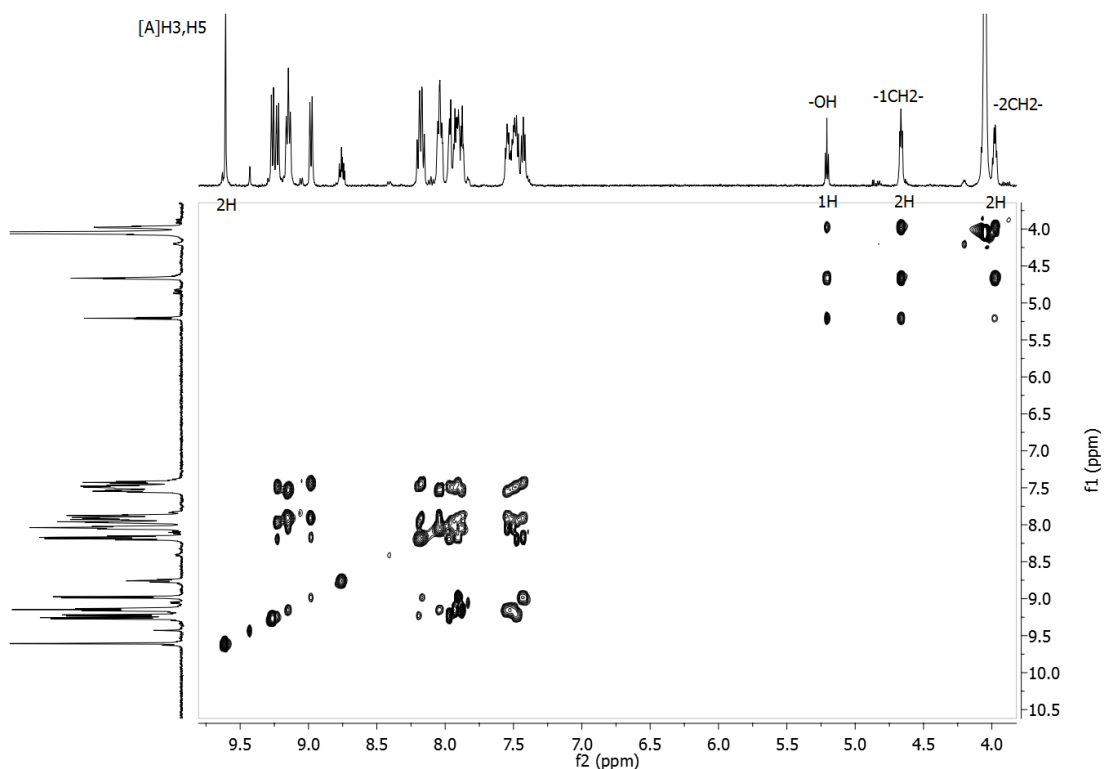
Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH₃CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT dπ(Ru) → π*(L) στα 550 nm με

$\varepsilon = 50620 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 300 nm με $\varepsilon = 84500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 375 nm με $\varepsilon = 42310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών tppz, trpy και ptrpy.

3.1.2.1.6. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](\text{PF}_6)_4$ και $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](\text{PF}_6)_4$

Όπως αναφέραμε στην σύνθεση των διπυρηνικών συμπλόκων, τα διπυρηνικά καρβοξυ- σύμπλοκα $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOH})](\text{PF}_6)_4$ και $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOH})](\text{PF}_6)_4$ προέκυπταν μετά από την υδρόλυση των αντίστοιχων συμπλόκων που είχαν εστεροποιηθεί με αιθυλενογλυκόλη, δηλαδή μετά από υδρόλυση των $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](\text{PF}_6)_4$ και $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](\text{PF}_6)_4$ αντίστοιχα. Όπως προαναφέραμε αυτό συνέβαινε λόγω της αυτο-εστεροποίησης εξαιτίας της χρήσης του διαλύτη αιθυλενογλυκόλης και της ύπαρξης των καρβοξυ ομάδων στα σύμπλοκα. Τα φάσματα NMR των συμπλόκων αυτών λήφθηκαν σε διαλύτη dmsd- d_6 . Οι διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων μεταξύ των καρβοξυ και των εστεροποιημένων συμπλόκων δεν μπορούν να εντοπιστούν εξαιτίας της χρήσης διαφορετικού διαλύτη καθώς για τα εστεροποιημένα παράγωγα χρησιμοποιήθηκε dmsd- d_6 όπου ήταν διαλυτά, ενώ στα αντίστοιχα καρβοξυ παράγωγα ακετόνη- d_6 . Τα σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν πλήρως με φάσματα COSY και TOCSY. Το γεγονός ότι η καρβοξυλομάδα της τερπυριδίνης είναι εστεροποιημένη με την μία υδροξυλομάδα της αιθυλενογλυκόλης προκύπτει από τους παρακάτω λόγους: (α) Τα σήματα συντονισμού των ομάδων $-\text{CH}_2-$ της αιθυλενογλυκόλης βρίσκονται μετατοπισμένα σε χαμηλότερα πεδία από ότι στην ελεύθερη αιθυλενογλυκόλη στον ίδιο διαλύτη κατά 0,21 και 0,96 ppm (β) Η συμμετρία του μορίου της αιθυλενογλυκόλης έχει χαθεί, δίνοντας ξεχωριστά σήματα συντονισμού για κάθε είδος πρωτονίου του μορίου της. Εμφανίζει έτσι τρεις διαφορετικές κορυφές, με την αναμενόμενη πολλαπλότητα, για τα τρία

είδη πρωτονίων που μπορούν να αποδοθούν στο τμήμα του μορίου $\text{OH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, ενώ συμφωνούν παράλληλα οι σχετικές ολοκληρώσεις. (γ) Το πρωτόνιο της μίας υδροξυλομάδας έχει χαθεί από το φάσμα δείχνοντας ότι το μόριο συμμετέχει σε εστερικό δεσμό με τη μια καρβοξυλομάδα.

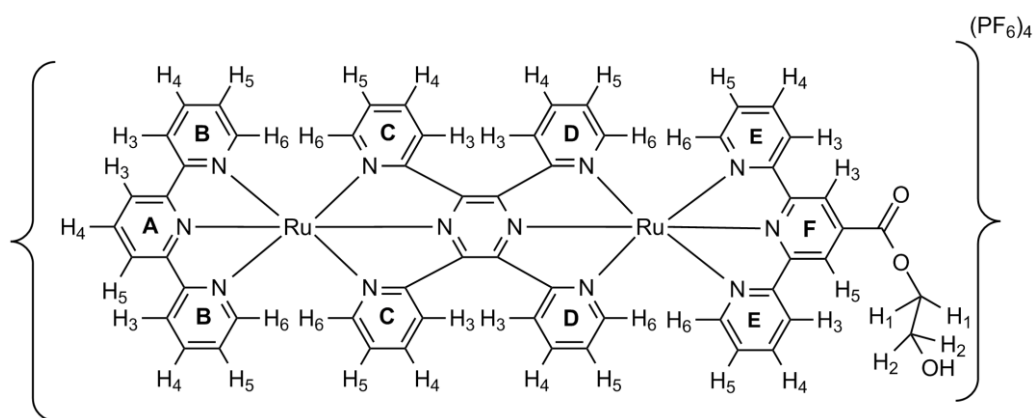


Σχήμα 3.12. Τμήμα από το φάσμα COSY @500 MHz στους 298 K, του συμπλόκου $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-COOC}_2\text{H}_4\text{OH})](\text{PF}_6)_4$ σε dmsO-d_6 .

Η ομάδα -2CH_2- της αιθυλενογλυκόλης δίνει ένα σήμα συντονισμού για τα δύο πρωτόνια της στην ίδια τιμή ppm και για τα δυο σύμπλοκα στα 3,98 ppm, ενώ τα πρωτόνια της ομάδα -1CH_2- που βρίσκεται κοντά στην θέση εστεροποίησης συντονίζονται σε χαμηλότερα πεδία, στα 4,66 ppm. Μικρή διαφορά εντοπίζεται στην τιμή αυτού του συντονισμού, εξαρτώμενη από το είδος του συμπλόκου. Τέλος το ελεύθερο υδροξύλιο εμφανίζεται στα 5,21 ppm και στις δύο περιπτώσεις. Στους πίνακες που ακολουθούν δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των δύο συμπλόκων, όπως αποδόθηκαν με τη βοήθεια των φασμάτων δύο διαστάσεων COSY και TOCSY των συμπλόκων

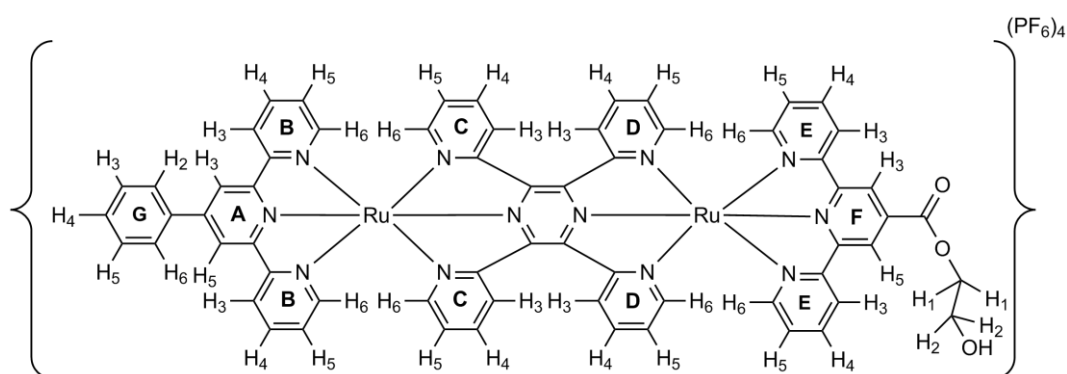
Πίνακας 3.11. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOC₂H₄OH)](PF₆)₄ στους 298 K σε dmsο-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H4	8,76	t	1
[A]H3, [A]H5	9,27	d	2
[B]H3	7,91	m	2
[B]H4	7,43	m	2
[B]H5	8,17	m	2
[B]H6	8,98	d	2
[C]H3	7,91	d	2
[C]H4	7,54	t	2
[C]H5	8,04	m	2
[C]H6	9,15	m	2
[D]H3	7,91	d	2
[D]H4	7,54	t	2
[D]H5	8,04	m	2
[D]H6	9,15	m	2
[E]H3	7,96	m	2
[E]H4	7,49	m	2
[E]H5	8,19	m	2
[E]H6	9,23	d	2
[F]H3, [F]H5	9,31	s	2
Ethyleneglycol-1CH ₂ -	4,66	q	2
Ethyleneglycol -2CH ₂ -	3,98	t	2
Ethyleneglycol -OH-	5,22	t	1



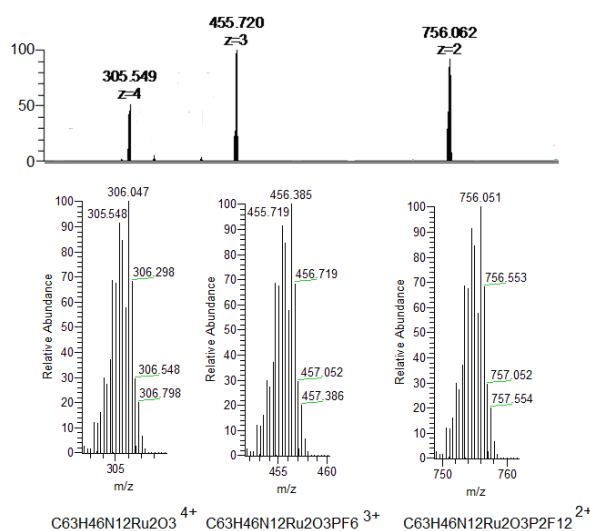
Πίνακας 3.12. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOC₂H₄OH)](PF₆)₄ στους 298 K σε dmsο-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (H _x)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H ₃ , [A]H ₅	9,63	s	2
[B]H ₃	7,44	m	2
[B]H ₄	7,92	m	2
[B]H ₅	8,20	m	2
[B]H ₆	9,25	d	2
[C]H ₃	7,99	m	2
[C]H ₄	7,49	m	2
[C]H ₅	8,05	m	2
[C]H ₆	9,16	m	2
[D]H ₃	7,99	m	2
[D]H ₄	7,49	m	2
[D]H ₅	8,05	m	2
[D]H ₆	9,16	m	2
[E]H ₃	7,92	m	2
[E]H ₄	7,55	m	2
[E]H ₅	8,20	m	2
[E]H ₆	9,23	d	2
[G]H ₂ , [G]H ₆	8,52	d	2
[G]H ₃ , [G]H ₅	7,84	t	2
[G]H ₄	7,74	t	1
[F]H ₃ , [F]H ₅	9,61	s	2
Ethlyneglycol-CH ₁ -	4,67	t	2
Ethlyneglycol-CH ₂ -	3,98	q	2
Ethlyneglycol-OH-	5,22	t	1



Στα φάσματα μάζας των συμπλόκων [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOC₂H₄OH)](PF₆)₄ και [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOC₂H₄OH)](PF₆)₄ παρατηρούνται κορυφές σε λόγους m/z που μπορούν να αποδοθούν σε πολυφορτιακά κατιόντα των συμπλόκων. Έτσι, για το σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOC₂H₄OH)](PF₆)₄

παρατηρούνται οι κορυφές σε λόγο $m/z = 305,549$, $455,720$ και $756,062$ που αντιστοιχούν σε διαδοχικές αποσπάσεις PF_6^- από το σύμπλοκο. Όμοια για το σύμπλοκο $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOC_2H_4OH)](PF_6)_4$ παρατηρούνται δύο κυρίως κορυφές σε λόγο $m/z = 286,542$ και $392,719$ amu που αποδίδονται στο τετραφορτιακό και τριφορτιακό κατιόν του συμπλόκου αντίστοιχα.



Σχήμα 3.13. Φάσμα μάζας HR-ESI-MS θετικών ιόντων, του συμπλόκου $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOC_2H_4OH)](PF_6)_4$ όπου φαίνονται τα διαδοχικά πολυφορτιακά κατιόντα που σχηματίζονται. Ένθετα δίνονται τα θεωρητικά m/z με τις ισοτοπικές κατανομές και οι μοριακοί τύποι που τους αντιστοιχούν, με ελάχιστες αποκλίσεις από την πειραματική ακριβή μάζα.

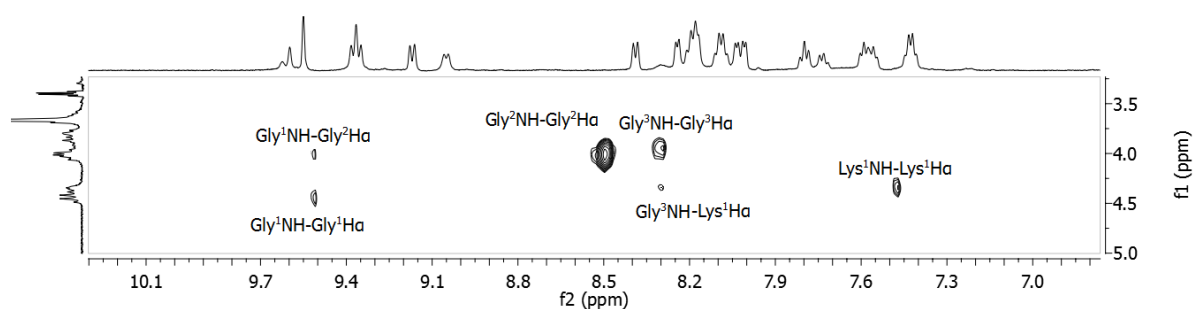
3.1.2.2. Χαρακτηρισμός των συμπλόκων [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COY)](PF₆)₄ και [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COY)](PF₆)₄ όπου Υ = Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂, Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂, Ahx-Lys¹-Lys²CONH₂, Ahx-Lys-GlyCONH₂

Κατά την σύζευξη των πεπτιδίων στα δυο διπυρηνικά σύμπλοκα δεν παρατηρούνται σημαντικές μετατοπίσεις στα αρωματικά πρωτόνια των συμπλόκων στα φάσματα ¹H NMR. Μικρές διαφορές παρατηρούνται μόνο στα πρωτόνια του κάρβοξυ υποκαταστάτη όπου γίνεται η σύζευξη του πεπτιδίου. Μεγαλύτερες αλλαγές παρατηρούνται στα πρωτόνια του πεπτιδίου.

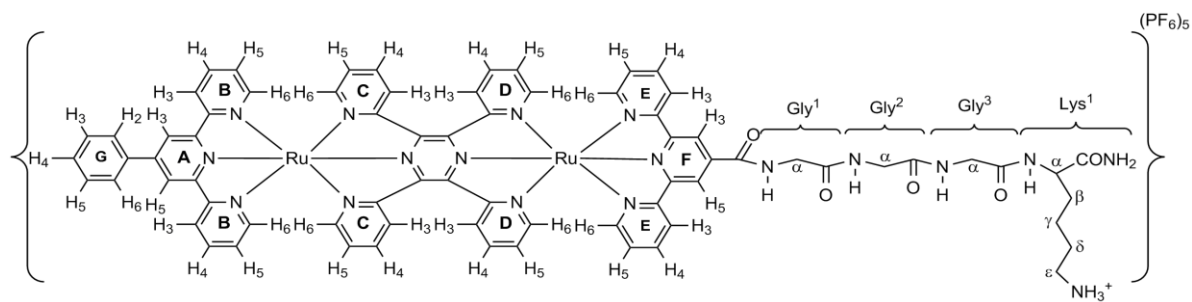
3.1.2.2.1. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅

Η σύζευξη του πεπτιδίου Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂ στο μεταλλικό σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-COOH)](PF₆)₅ διαπιστώθηκε και με τη χρήση φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Έτσι στα φάσματα TOCSY του συμπλόκου εμφανίζονται οι crosspeaks μεταξύ των πεπτιδικών πρωτονίων N-H του πεπτιδίου, και με το υπόλοιπο σύστημα spin των αρωματικών πρωτονίων του δακτυλίου που φέρει την καρβοξυλομάδα, του συμπλόκου. Στο συγκεκριμένο σύμπλοκο η σύζευξη του πεπτιδίου Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂ από την πλευρά της Gly¹ στην καρβοξυλομάδα της τερπυριδίνης και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [2,4], μετατοπίζει το πρωτόνιο του <<πεπτιδικού>> δεσμού Gly¹NH σε χαμηλότερα πεδία. Έτσι η crosspeak 9,51-4,45 ppm αποδίδεται σε ³J σύζευξη Gly¹NH -Gly¹Ha. Στη συνέχεια παρατηρείται μια ασθενής ⁴J σύζευξη 8,49 -4,45 ppm που αποδίδεται στη συσχέτιση Gly¹Ha-Gly²NH και στη συνέχεια μια ³J σύζευξη Gly²NH -Gly²Ha στα 8,49 -4,01 ppm. Η επόμενη Gly³ δίνει μια ισχυρής έντασης ³J crosspeak στα 8,30-3,93 ppm που αποδίδεται στη Gly³NH -Gly³Ha και το Ha της μια ασθενή ⁴J σύζευξη με το Lys¹NH. Τέλος η ³J σύζευξη Lys¹NH- Lys¹Ha εμφανίζεται στα 7,47-4,35 ppm. Με

αφετηρία το H_α της Lys^1 γίνεται η πλήρης απόδοση των πρωτονίων της λυσίνης, όπως φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα. Δύο μικρής έντασης κορυφές στα 7,23 και 6,37 αποδίδονται στα δύο αμιδικά πρωτόνια της τερματικής λυσίνης, που βρίσκονται σε θέσεις *cis*- και *trans*- ως προς το καρβονυλικό οξυγόνο. Τα αρωματικά πρωτόνια των υποκαταστατών του υπολοίπου μέρους του συμπλόκου αποδίδονται με τους τρόπους που παρουσιάσαμε προηγουμένως και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 3.13.



Σχήμα 3.14. Τμήμα από το φάσμα TOCSY (75 ms) @500 MHz στους 298 K, του συμπλόκου [(ptpry)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅ σε ακετόνη-d₆.

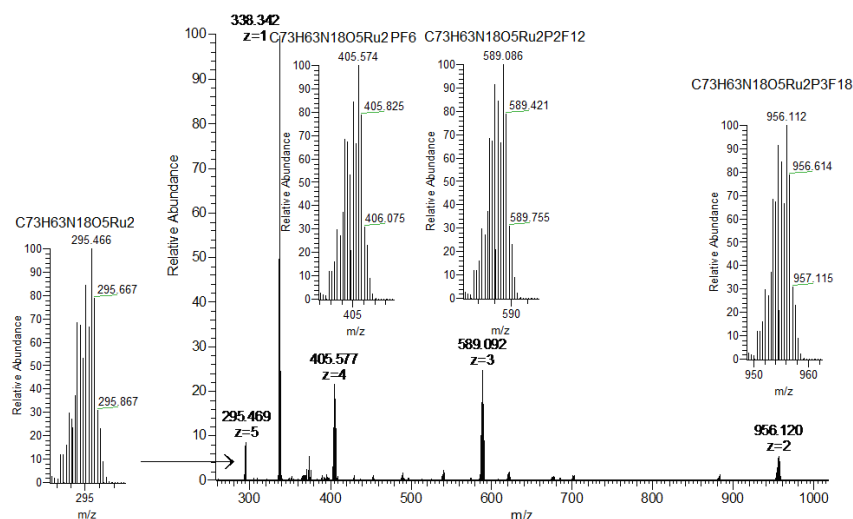


Πίνακας 3.13. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅ στους 298 K σε ακετόνη-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H ₃ , [A]H ₅	9,55	s	2
[B]H ₃	8,04	d	2
[B]H ₄	7,43	m	2
[B]H ₅	8,18	m	2
[B]H ₆	9,05	d	2
[C]H ₃	8,20-8,24	d	2
[C]H ₄	7,57	m	2
[C]H ₅	8,09	m	2
[C]H ₆	9,37	m	2
[D]H ₃	8,20-8,24	d	2
[D]H ₄	7,57	m	2
[D]H ₅	8,09	m	2
[D]H ₆	9,37	m	2
[E]H ₃	8,01	d	2
[E]H ₄	7,43	m	2
[E]H ₅	8,18	m	2
[E]H ₆	9,17	d	2
[G]H ₂ , [G]H ₆	8,39	d	2
[G]H ₃ , [G]H ₅	7,80	t	2
[G]H ₄	7,73	t	1
[F]H ₃ , [F]H ₅	9,60	s	2
Gly ¹ NH	9,51	m	1
Gly ¹ H _α	4,45	m	2
Gly ² NH	8,49	m	1
Gly ² H _α	4,01	m	2
Gly ³ NH	8,30	m	1
Gly ³ H _α	3,93	m	2
Lys ¹ NH	7,47	m	1
Lys ¹ H _α	4,35	m	1
Lys ¹ H _β	1,87	m	2
Lys ¹ H _γ	1,53	m	2
Lys ¹ H _δ	1,82	m	2
Lys ¹ H _ε	3,22	m	2
Lys ¹ NH ₃	n.o		
Lys ¹ CONH ₂ (<i>cis</i>)(<i>trans</i>)	7,23 & 6,37	s	2

Στο φάσμα μάζας του συμπλόκου παρατηρούνται κορυφές σε λόγους m/z που μπορούν να αποδοθούν σε πολυφορτιακά κατιόντα. Έτσι παρατηρούνται οι κορυφές σε λόγο m/z = 295,469, 405,577, 589,092 και 956,120 amu που αντιστοιχούν σε διαδοχικές αποσπάσεις PF₆⁻ από το σύμπλοκο. Εκτός από την αναμφισβήτητη σύζευξη του πεπτιδίου στην καρβοξυλομάδα της τερπυριδίνης του διπυρηνικού συμπλόκου, ενδιαφέρον είναι και το γεγονός ότι ανιχνεύεται πενταφορτιακό ιόν που σημαίνει ότι αν δεν έχουμε οξείδωση του ενός μεταλλικού κέντρου, πράγμα όμως που θα διαφοροποιούσε δραματικά τις τιμές των χημικών μετατοπίσεων

και τη συμμετρία στον υποκαταστάτη *trpz*, τότε η τερματική αμινομάδα της λυσίνης είναι πρωτονιωμένη. Η κορυφή στα 338.342 φορτίου +1 μπορεί να αποδοθεί σε οργανικό μόριο που είτε παραβρίσκεται στο διάλυμα ως πρόσμιξη είτε δημιουργείται στην αέρια φάση.



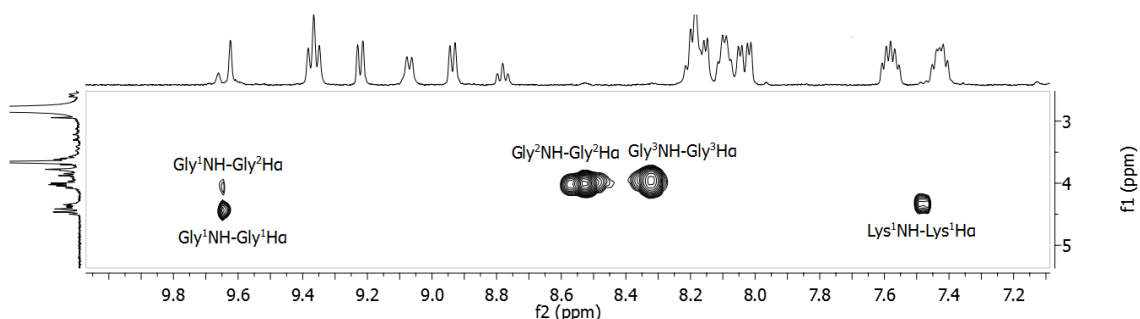
Σχήμα 3.15. Φάσμα μάζας HR-ESI-MS θετικών ιόντων, του συμπλόκου [(*ptpry*)Ru(*trpz*)Ru(*trpy*-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅ όπου φαίνονται τα διαδοχικά πολυφορτιακά κατιόντα που σχηματίζονται. Ένθετα δίνονται τα θεωρητικά *m/z* με τις ισοτοπικές κατανομές και οι μοριακοί τύποι που τους αντιστοιχούν, με ελάχιστες αποκλίσεις από την πειραματική ακριβή μάζα.

Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH₃CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{L})$ στα 550 nm με $\epsilon = 43320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 296 nm με $\epsilon = 72110 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 300 nm με $\epsilon = 30400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών *trpz*, *trpy* και *ptpry*.

3.1.2.2.2. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(*trpy*)Ru(*trpz*)Ru(*trpy*-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅

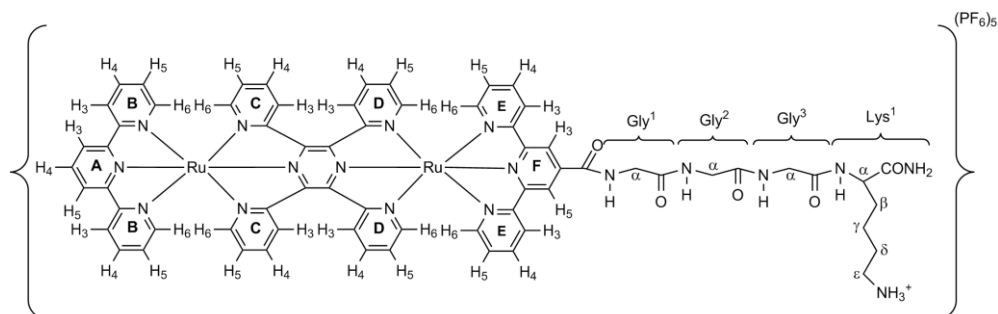
Στο φάσμα ¹H NMR του συμπλόκου αυτού παρατηρούμε παρόμοιες με το προηγούμενο σύμπλοκο τιμές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων που

ανήκουν στο πεπτιδικό σκελετό και ειδικότερα όσο απομακρυνόμαστε από το σημείο σύζευξης της Gly¹ με το μεταλλικό σύμπλοκο τόσο η διαφορά αυτή μειώνεται. Το πρωτόνιο Gly¹NH δίνει ένα σήμα συντονισμού στα 9,64 ppm, μετατοπισμένο σε χαμηλότερα πεδία κατά +0,12 ppm από ότι στο αντίστοιχο σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅ και σε αντίθεση με τα υπόλοιπα πρωτόνια του πεπτιδικού σκελετού που παρουσιάζουν πολύ μικρότερες διαφορές. Κατά τη μελέτη των φασμάτων TOCSY και COSY του συμπλόκου, παρατηρείται μια ³J crosspeak στα 9,64-4,44 ppm η οποία αποδίδεται στη σύζευξη των πρωτονίων Gly¹NH -Gly¹Ha. Στη συνέχεια όπως και στο φάσμα του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅, παρατηρείται μια ασθενής ⁴J σύζευξη στα 8,52 -4,44 ppm που αποδίδεται στη συσχέτιση των πρωτονίων Gly¹Ha-Gly²NH και στη συνέχεια μια ³J σύζευξη Gly²NH -Gly²Ha στα 8,49 -4,00 ppm. Η επόμενη Gly³ δίνει μια ισχυρής έντασης ³J crosspeak στα 8,32-4,05 ppm που αποδίδεται στη Gly³NH -Gly³Ha. Τέλος η ³J σύζευξη Lys¹NH- Lys¹Ha εμφανίζεται ως crosspeak στα 7,47-4,36 ppm. Από το σήμα συντονισμού του πρωτονίου Ha της Lys¹ ξεκινά η πλήρης απόδοση των πρωτονίων της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης, όπως φαίνεται στο πιο κάτω σχήμα. Οι δύο μικρής έντασης κορυφές στα 7,12 και 6,40 αποδίδονται στα δύο αμιδικά πρωτόνια της τερματικής λυσίνης, που βρίσκονται σε θέσεις *cis*- και *trans*- ως προς το καρβονυλικό οξυγόνο.



Σχήμα 3.16. Τμήμα από το φάσμα TOCSY (75 ms) @500 MHz στους 298 K, του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅ σε ακετόνη-d₆.

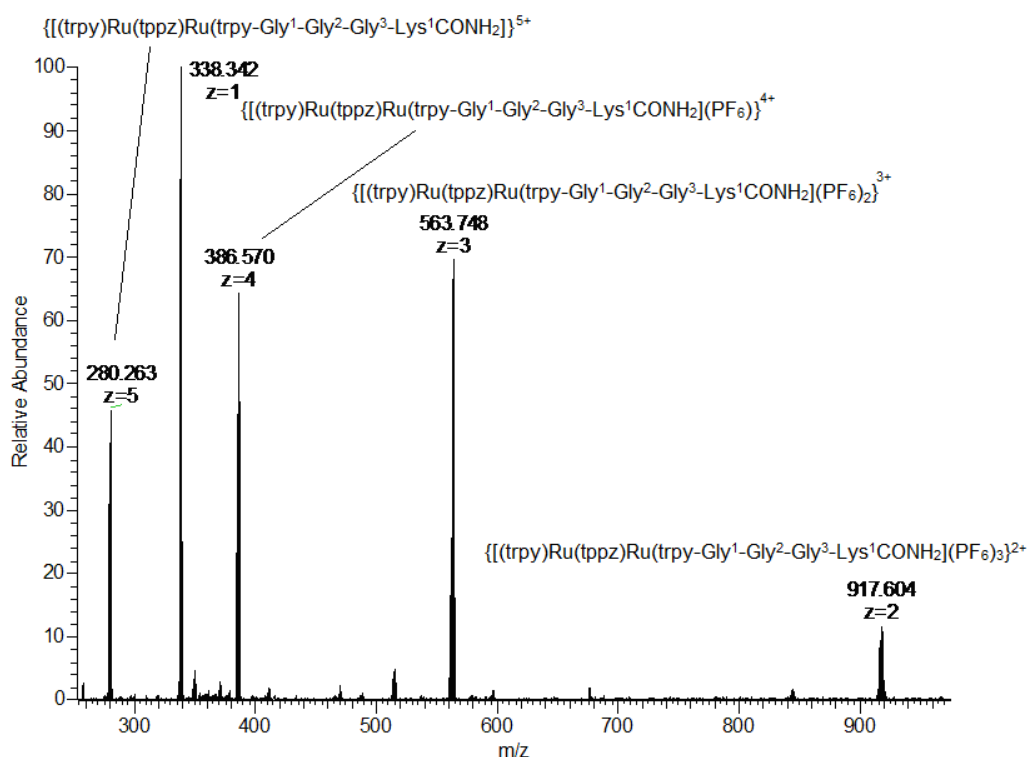
Τα αποτελέσματα της απόδοσης των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων του συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Lys}^1\text{CONH}_2)](\text{PF}_6)_5$ συνοψίζονται στον πίνακα 3.14.



Πίνακας 3.14. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Lys}^1\text{CONH}_2)](\text{PF}_6)_5$ στους 298 Κ σε ακετόνη- d_6 . d = doublet, t = triplet, m = multiplet

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,21	d	2
[A]H4	8,78	t	1
[B]H3	8,01-8,05	d	2
[B]H4	7,42	m	2
[B]H5	8,15-8,21	m	2
[B]H6	8,93	d	2
[C]H3	8,15	m	2
[C]H4	7,58	t	2
[C]H5	8,09	m	2
[C]H6	9,35	m	2
[D]H3	8,15	m	2
[D]H4	7,58	t	2
[D]H5	8,09	m	2
[D]H6	9,37	m	2
[E]H3	8,01-8,05	d	2
[E]H4	7,42	m	2
[E]H5	8,15-8,21	m	2
[E]H6	9,07	d	2
[F]H3, [F]H5	9,62	s	2
Gly¹NH	9,64	m	1
Gly¹Hα	4,44	m	2
Gly²NH	8,52	m	1
Gly²Hα	4,00	m	2
Gly³NH	8,32	m	1
Gly³Hα	4,05	m	2
Lys¹NH	7,47	m	1
Lys¹Hα	4,36	m	1
Lys¹Hβ	1,87	m	2
Lys¹Hγ	1,55	m	2
Lys¹Hδ	1,81	m	2
Lys¹Hε	3,23	m	2
Lys¹NH₃	n.o		
CONH₂(cis)(trans)	6,40 & 7,12	s & s	2

Στο φάσμα μάζας του συμπλόκου παρατηρούνται κορυφές σε λόγους m/z που μπορούν να αποδοθούν σε πολυφορτιακά κατιόντα. Έτσι παρατηρούνται οι κορυφές που αντιστοιχούν σε διαδοχικές αποσπάσεις ανιόντων PF_6^- από το σύμπλοκο. Το γεγονός ότι ανιχνεύεται πενταφορτιακό ιόν σημαίνει ότι η τερματική αμινομάδα της λυσίνης είναι πρωτονιωμένη.

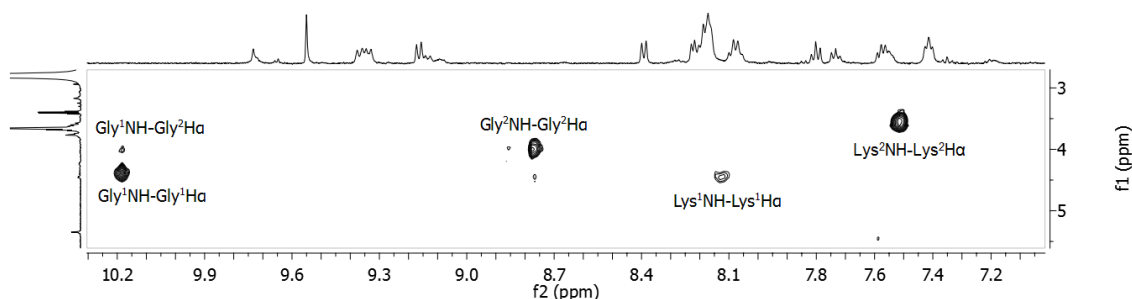


Σχήμα 3.17. Φάσμα μάζας HR-ESI-MS θετικών ιόντων, του συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Lys}^1\text{CONH}_2)](\text{PF}_6)_5$ όπου φαίνονται τα διαδοχικά πολυφορτιακά κατιόντα που σχηματίζονται.

Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH_3CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{L})$ στα 551 nm με $\epsilon = 51100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 301 nm με $\epsilon = 82150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 376 nm με $\epsilon = 43510 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών tppz , trpy και ptrpy .

3.1.2.2.3. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆

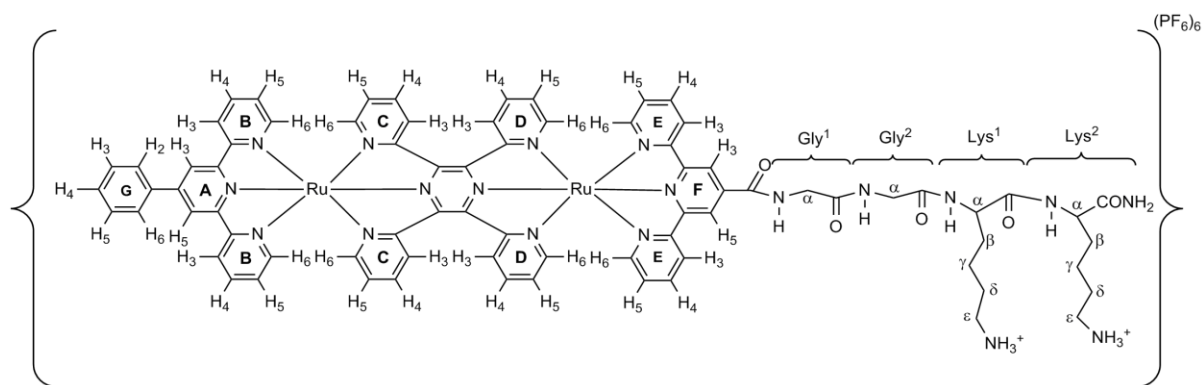
Τοποθετώντας μια λυσίνη στη θέση της τρίτης στη σειρά γλυκίνης στην πεπτιδική αλυσίδα του συμπλόκου, παρατηρούμε σημαντικές αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων του πεπτιδικού σκελετού προς χαμηλότερα πεδία (κυρίως των πρωτονίων NH). Αυτή η μετατόπιση των σημάτων οφείλεται κυρίως στο φορτίο που προσφέρει η επιπλέον λυσίνη [113]. Η σύνδεση του Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂ στο σύμπλοκο από την πλευρά της Gly¹ μετατοπίζει το πρωτόνιο Gly¹NH σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με το προηγούμενο σύμπλοκο [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)](PF₆)₅, στα 10,18 ppm, δηλαδή κατά +0,7 ppm. Τα υπόλοιπα πρωτόνια των πεπτιδικών δεσμών Gly²NH, Lys¹NH και Lys²NH δίνουν σήματα συντονισμού στα 8,75, 8,12 και 7,51 ppm αντίστοιχα. Στο σχήμα που ακολουθεί δίνεται το φάσμα TOCSY του συμπλόκου όπου εμφανίζονται οι crosspeaks μεταξύ των πρωτονίων του πεπτιδικού σκελετού. Από το Ha της Lys¹ ταυτοποιούμε τα υπόλοιπα πρωτόνια της πεπτιδικής της αλυσίδας. Αν και το πεπτιδικό Lys²NH δίνει ένα ισχυρό crosspeak με το Lys²Ha (7,51-3,52) το υπόλοιπο τμήμα της αλειφατικής πλευρικής αλυσίδας δεν ταυτοποιήθηκε πιθανότητα λόγω της θέσης του σε μη αναγνώσιμες περιοχές του φάσματος δηλαδή κοντά στο σήμα των πρωτονίων του διαλύτη (ακετόνη).



Σχήμα 3.18. Τμήμα από το φάσμα TOCSY (75 ms) @500 MHz στους 298 K, του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆ σε ακετόνη-d₆.

Στο φάσμα μάζας του συμπλόκου παρατηρούνται κορυφές σε λόγους m/z που μπορούν να αποδοθούν σε πολυφορτιακά κατιόντα. Έτσι παρατηρούνται οι κορυφές που αντιστοιχούν σε διαδοχικές αποσπάσεις ανιόντων PF_6^- από το σύμπλοκο με κυριώτερη εκείνη σε λόγο $m/z = 613,450$ amu η οποία αντιστοιχεί στο τριφορτιακό ιόν $[(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Lys}^1\text{-Lys}^2\text{CONH}_2)]^{3+}$ που δείχνει ότι και οι δύο Lys είναι πρωτονιωμένες στην τερματική τους αμινομάδα.

Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH_3CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT $d\pi(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{L})$ στα 550 nm με $\epsilon = 42110 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 296 nm με $\epsilon = 70120 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 378 nm με $\epsilon = 30150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών tppz, trpy και ptrpy.



Πίνακας 3.15. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆ στους 298 K σε acetone-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,55	s	2
[B]H3	8,18-8,22	m	2
[B]H4	7,42	m	2
[B]H5	8,18-8,22	m	2
[B]H6	9,15	d	2
[C]H3	8,18-8,22	m	2
[C]H4	7,58	m	2
[C]H5	8,09	m	2
[C]H6	9,35	m	2
[D]H3	8,18-8,22	d	2
[D]H4	7,58	m	2
[D]H5	8,09	m	2
[D]H6	9,35	m	2
[E]H3	8,18-8,22	m	2
[E]H4	7,42	m	2
[E]H5	8,18-8,22	m	2
[E]H6	9,15	d	2
[G]H2, [G]H6	8,39	d	2
[G]H3, [G]H5	7,79	t	2
[G]H4	7,74	t	1
[F]H3, [F]H5	9,73	s	2
Gly ¹ NH	10,18	m	1
Gly ¹ Hα	4,35	m	2
Gly ² NH	8,75	m	1
Gly ² Hα	3,95	m	2
Lys ¹ NH	8,12	m	1
Lys ¹ Hα	4,41	m	1
Lys ¹ Hβ	1,85	m	2
Lys ¹ Hγ	1,56	m	2
Lys ¹ Hδ	1,85	m	2
Lys ¹ Hε	3,52	m	2
Lys ¹ NH ₃	n.o		
Lys ² NH	7,51	m	2
Lys ² Hα	3,52	m	2
Lys ² Hβ	n.o		
Lys ² Hγ	n.o		
Lys ² Hδ	n.o		
Lys ² Hε	n.o		
Lys ² NH ₃	n.o		
CONH ₂ (cis)(trans)	7,20 & 6,48	s	2

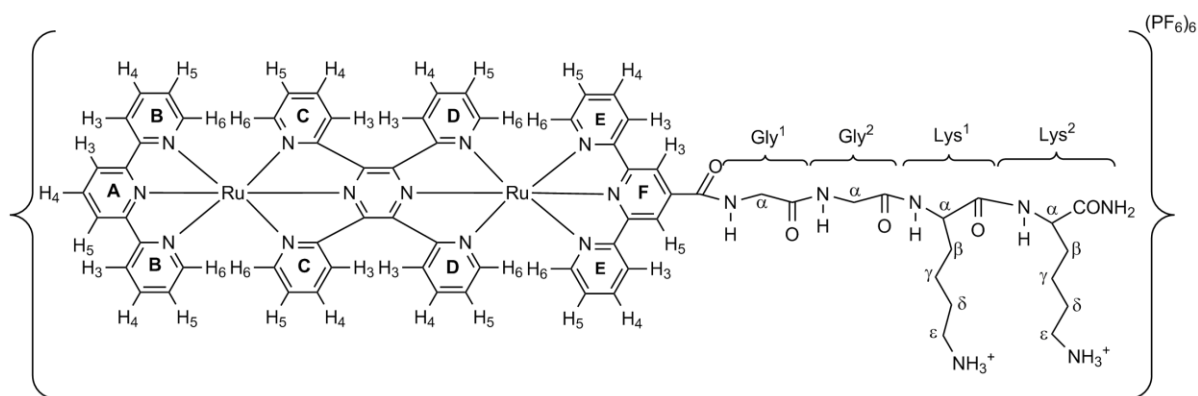
3.1.2.2.4. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆

Στο φάσμα ¹H NMR του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆ και πιο συγκεκριμένα για τα πρωτόνια του πεπτιδικού σκελετού, δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες αλλαγές στις χημικές

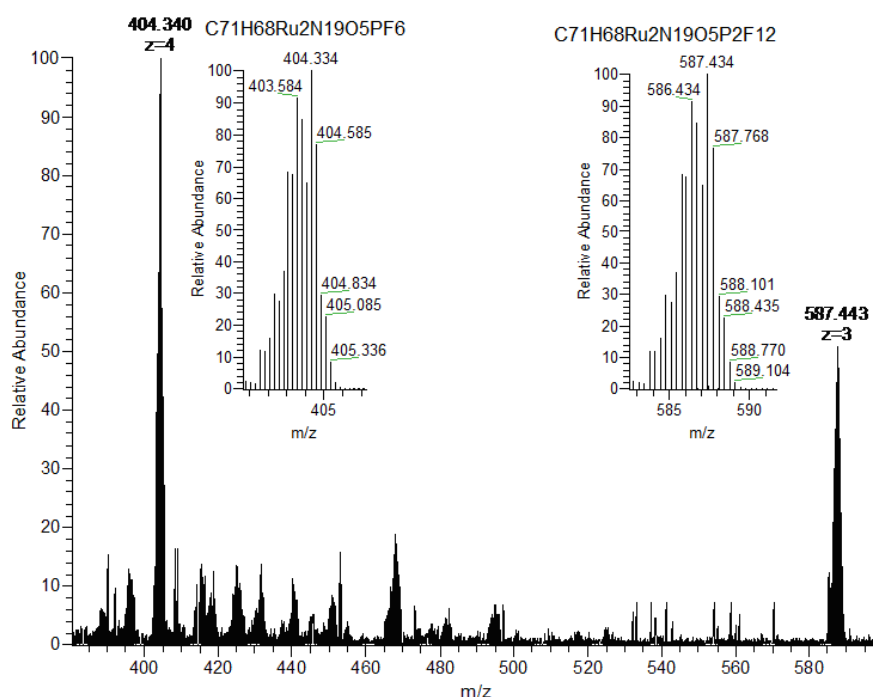
μετατοπίσεις τους από το αντίστοιχο σύμπλοκο που εξετάσαμε προηγουμένως. Έτσι το πρωτόνιο Gly¹NH δίνει μία ασθενή crosspeak με το Gly¹H α στα 10,18-4,50 ppm, σχεδόν ίδια με αυτή του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆. Η ανάλυση για τα επόμενα πρωτόνια έγινε με βάση τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για τα σύμπλοκα που προηγήθηκαν και παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 3.16. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆ στους 298 K σε ακετόνη-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H ₃ , [A]H ₅	9,20	d	2
[A]H ₄	8,75	t	1
[B]H ₃	8,06-8,18	m	2
[B]H ₄	7,40	m	2
[B]H ₅	8,06-8,18	m	2
[B]H ₆	8,92	m	2
[C]H ₃	8,06-8,18	m	2
[C]H ₄	7,40	m	2
[C]H ₅	8,06-8,18	m	2
[C]H ₆	9,35	m	2
[D]H ₃	8,06-8,18	d	2
[D]H ₄	7,40	m	2
[D]H ₅	8,06-8,18	m	2
[D]H ₆	9,35	m	2
[E]H ₃	8,06-8,18	m	2
[E]H ₄	7,40	m	2
[E]H ₅	8,06-8,18	m	2
[E]H ₆	8,92	d	2
[F]H ₃ , [F]H ₅	9,72	s	2
Gly ¹ NH	10,18	m	2
Gly ¹ H α	4,50	m	2
Gly ² NH	n.o		
Gly ² H α	n.o		
Lys ¹ NH	n.o		
Lys ¹ H α	4,28	m	2
Lys ¹ H β	1,85	m	2
Lys ¹ H γ	1,52	m	2
Lys ¹ H δ	1,79	m	2
Lys ¹ H ϵ	3,17	m	2
Lys ¹ NH ₃	n.o		
Lys ¹ H α	3,75	m	2
Lys ¹ H β	1,84	m	2
Lys ¹ H γ	1,53	m	2
Lys ¹ H δ	1,78	m	2
Lys ¹ H ϵ	3,14	m	2
Lys ¹ NH ₃	n.o		
CONH ₂ (cis)(trans)	n.o		



Στο φάσμα μάζας του συμπλόκου παρατηρούνται κορυφές σε λόγους m/z που μπορούν να αποδοθούν σε πολυφορτιακά κατιόντα. Έτσι παρατηρούνται οι κορυφές σε λόγο $m/z = 404,340$ και $587,434$ amu που αντιστοιχούν σε διαδοχικές αποσπάσεις PF_6^- από το σύμπλοκο όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.

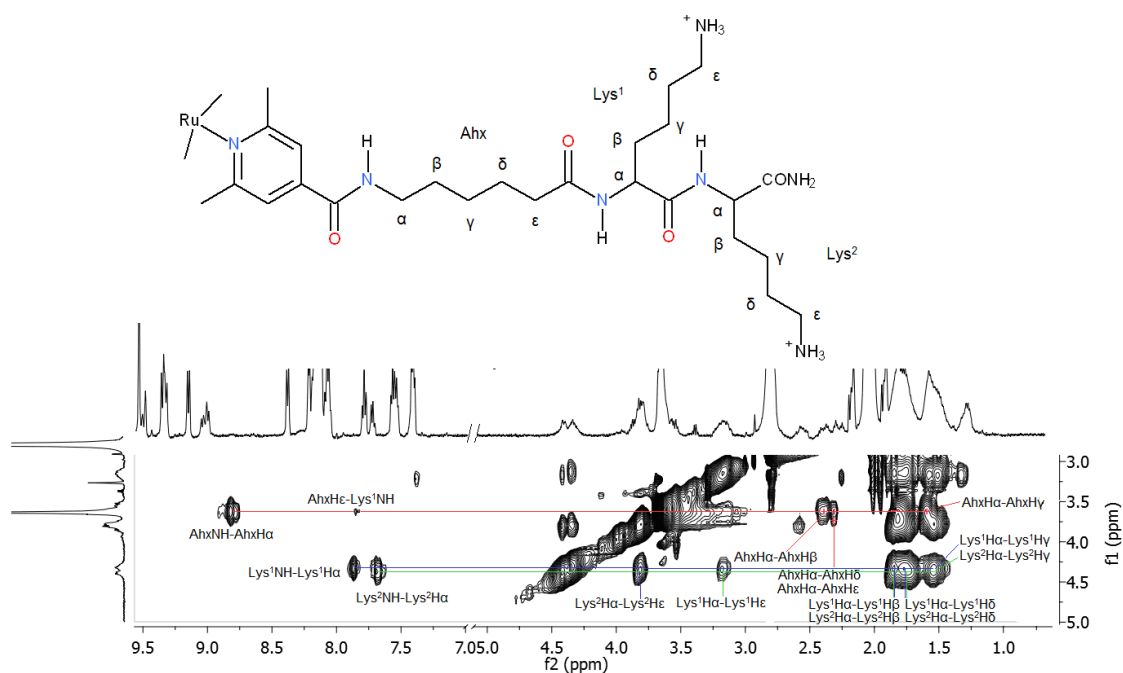


Σχήμα 3.19. Φάσμα μάζας HR-ESI-MS θετικών ιόντων, του συμπλόκου $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly^1-Gly^2-Lys^1-Lys^2-CONH_2)](PF_6)_5$ όπου φαίνονται τα διαδοχικά πολυφορτιακά κατιόντα που σχηματίζονται. Ένθετα δίνονται τα θεωρητικά m/z με τις ισοτοπικές κατανομές και οι μοριακοί τύποι που τους αντιστοιχούν, με ελάχιστες αποκλίσεις από την πειραματική ακριβή μάζα.

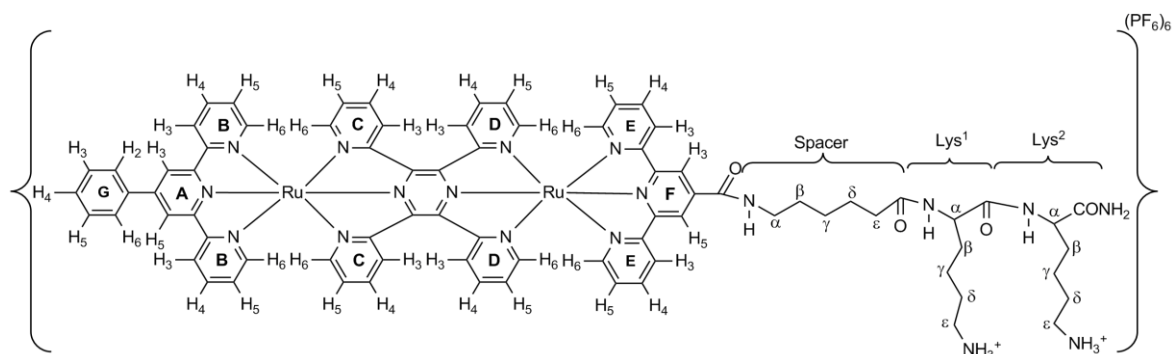
Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH₃CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT dπ(Ru) → π*(L) στα 549 nm με ε = 52400 M⁻¹cm⁻¹ και οι ταινίες π → π* στα 295 nm με ε = 79530 M⁻¹cm⁻¹ και 378 nm με ε = 39530 M⁻¹cm⁻¹ των υποκαταστατών tppz, trpy και ptrpy.

3.1.2.2.5. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆

Στα σύμπλοκα που ακολουθούν και με σκοπό να απομακρυνθεί από τη ρητίνη το σημείο όπου συνδέεται το σύμπλοκο στο πεπτίδιο, χρησιμοποιήσαμε στην αρχή της πεπτιδικής αλυσίδας ένα μη φυσικό αμινοξύ όπως το 6-άμινο-εξανοϊκό (Ahx). Έτσι το αμινοξύ που συζευγνύεται στο σύμπλοκο δεν είναι η γλυκίνη αλλά το 6-άμινο-εξανοϊκό οξύ, γνωστό για τον ρόλο του σε ανάλογες συνθέσεις [38, 39] που ονομάζεται και 'spacer'. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα σύμπλοκα όπου στον Ca είχαμε καρβοξυλομάδα και αμινομάδα (περίπτωση γλυκίνης) στο Ahx έχουμε μόνο μία αμινομάδα, οπότε το πρωτόνιο AhxNH συντονίζεται σε υψηλότερα πεδία από τα αντίστοιχα -NH της γλυκίνης και συγκεκριμένα στα 8,82 ppm. Στο φάσμα TOCSY του συμπλόκου φαίνονται οι crosspeaks των πρωτονίων των πεπτιδικών -NH με το πρωτόνιο Hα και στη συνέχεια του Hα με τα υπόλοιπα πρωτόνια των ανθρακικών αλυσίδων του Ahx της Lys¹ και Lys². Η ταυτοποίηση των crosspeaks με σύζευξη ³J γίνεται με τη βοήθεια του φάσματος COSY. Έτσι το πρωτόνιο AhxNH δίνει μία σύζευξη ³J με το AhxHα (8,82-3,65 ppm) και εν συνεχεία το AhxHα με τα υπόλοιπα πρωτόνια της αλειφατικής του αλυσίδας. Το τελευταίο πρωτόνιο του AhxHe δίνει ένα ασθενές ⁴J σήμα με το Lys¹NH από όπου ξεκινά και η απόδοση των πρωτονίων των πλευρικών αλυσίδων των λυσινών. Οι χημικές μετατοπίσεις του συνόλου των πρωτονίων του συμπλόκου παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.



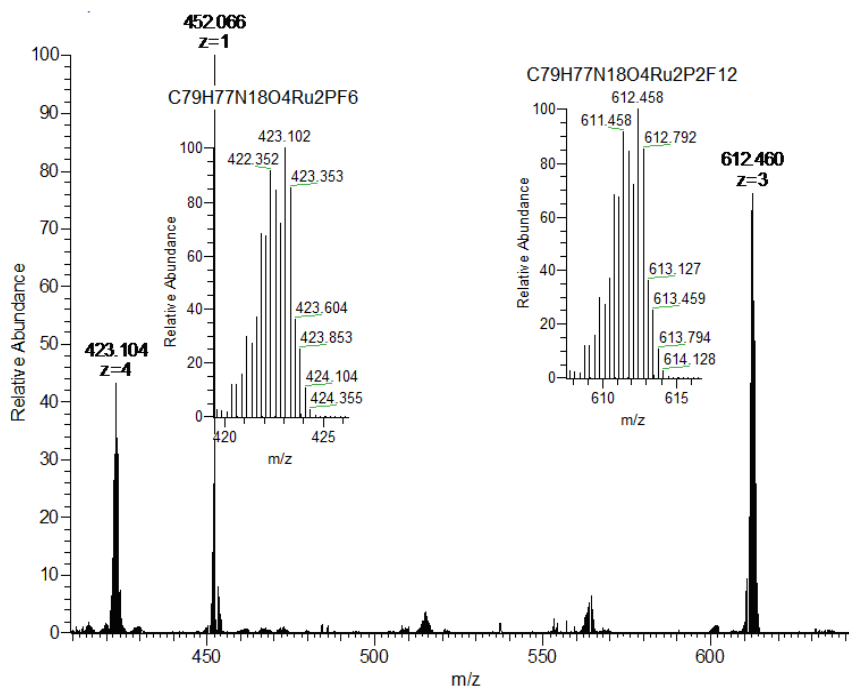
Σχήμα 3.20. Τμήμα από το φάσμα TOCSY (75 ms) @500 MHz στους 298 K, του συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy}-\text{CONH}-\text{Ahx}-\text{Lys}^1-\text{Lys}^2\text{CONH}_2)](\text{PF}_6)_6$ σε ακετόνη- d_6 .



Πίνακας 3.17. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆ στους 298 Κ σε ακετόνη-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,49	d	2
[B]H3	8,15	m	2
[B]H4	7,42	m	2
[B]H5	8,18	m	2
[B]H6	9,16	d	2
[C]H3	8,19-8,22	m	2
[C]H4	7,57	m	2
[C]H5	8,08	m	2
[C]H6	9,35	m	2
[D]H3	8,19-8,22	m	2
[D]H4	7,57	m	2
[D]H5	8,08	m	2
[D]H6	9,35	m	2
[E]H3	8,15	m	2
[E]H4	7,42	m	2
[E]H5	8,18	m	2
[E]H6	9,01	d	2
[F]H3, [F]H5	9,54	s	2
[G]H2, [G]H6	8,39	d	2
[G]H3, [G]H5	7,79	t	2
[G]H4	7,74	t	1
Ahx NH	8,82	m	1
AhxH α	3,65	m	2
AhxH β	2,39	m	1
AhxH γ	1,79	m	2
AhxH δ	2,40	m	1
AhxH ϵ	3,63	m	2
Lys ¹ NH	7,87	m	1
Lys ¹ H α	4,37	m	1
Lys ¹ H β	1,82	m	2
Lys ¹ H γ	1,54	m	2
Lys ¹ H δ	1,77	m	2
Lys ¹ H ϵ	3,17	m	2
Lys ¹ NH ₃	6,30-7,30		
Lys ² NH	7,68	m	1
Lys ² H α	4,41	m	1
Lys ² H β	1,78	m	2
Lys ² H γ	1,54	m	2
Lys ² H δ	1,78	m	2
Lys ² H ϵ	3,76	m	2
Lys ² NH ₃	6,30-7,30		
CONH ₂ (<i>cis</i>)(<i>trans</i>)	6,30-7,30		

Στο φάσμα μάζας του συμπλόκου παρατηρούνται κορυφές σε λόγους *m/z* που μπορούν να αποδοθούν σε πολυφορτιακά κατιόντα. Έτσι παρατηρούνται οι κορυφές σε λόγο *m/z* = 423,104 και 612,460 amu που αντιστοιχούν σε διαδοχικές αποσπάσεις PF₆⁻ από το σύμπλοκο όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.



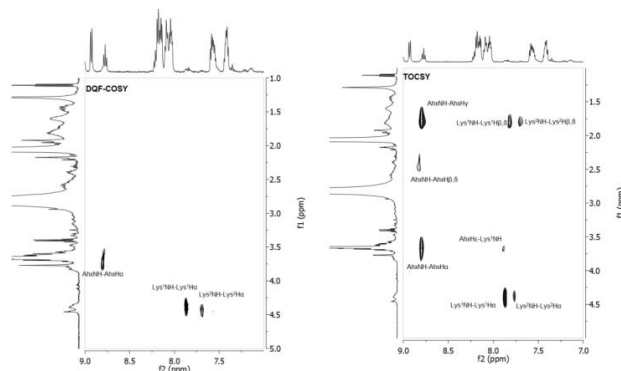
Σχήμα 3.21. Φάσμα μάζας HR-ESI-MS θετικών ιόντων, του συμπλόκου $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$ όπου φαίνονται τα διαδοχικά πολυφορτιακά κατιόντα που σχηματίζονται. Ένθετα δίνονται τα θεωρητικά m/z με τις ισοτοπικές κατανομές και οι μοριακοί τύποι που τους αντιστοιχούν, με ελάχιστες αποκλίσεις από την πειραματική ακριβή μάζα.

Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH_3CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT $d\pi(Ru) \rightarrow \pi^*(L)$ στα 551 nm με $\epsilon = 43100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 297 nm με $\epsilon = 71150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 376 nm με $\epsilon = 29510 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών $tppz$, $trpy$ και $ptrpy$.

3.1.2.2.6. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$

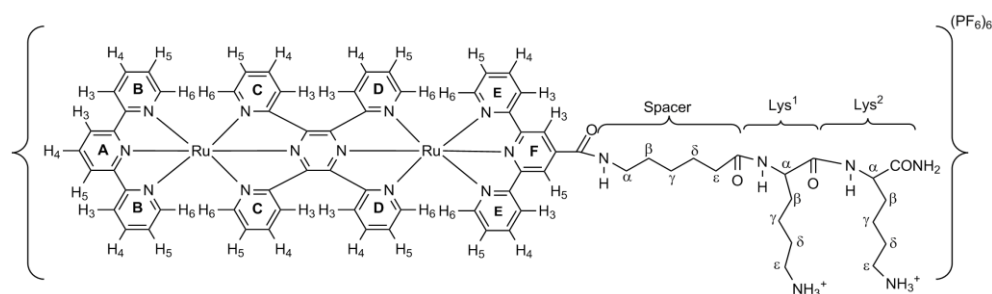
Το φάσμα 1H NMR του συμπλόκου $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$ παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες ως προς τις τιμές των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων του πεπτιδικού σκελετού, αλλά και των πλευρικών αλυσιδών, σε σχέση με το σύμπλοκο $[(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys^1-Lys^2CONH_2)](PF_6)_6$. Τα πρωτόνια των αρωματικών δακτυλίων

συντονίζονται στις ίδιες περίπου τιμές με εκείνα των αναλόγων συμπλόκων που εξετάστηκαν. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις όλων των πρωτονίων του συμπλόκου.



Σχήμα 3.22. Τμήματα από τα φάσματα COSY και TOCSY (75 ms) @500 MHz στους 298 K, σε ακετόνη-d₆ του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys¹-Lys²CONH₂)] (PF₆)₆ όπου φαίνονται οι ³J και ³J, ⁴J και ⁵J των αλειφατικών πρωτονίων.

Στο φάσμα μάζας του συμπλόκου παρατηρούνται κορυφές σε λόγους *m/z* που μπορούν να αποδοθούν σε πολυφορτιακά κατιόντα. Έτσι παρατηρούνται δύο κορυφές σε λόγο *m/z* = 404,100 και 440,593 amu που ταυτοποιούνται και οι δύο ως τετραφορτιακά ιόντα. Η πρώτη αποδίδεται στον τύπο {C₇₃H₇₂N₁₈O₄Ru₂PF₆}⁴⁺ με *m/z* = 404,094 amu και η δεύτερη στον τύπο {C₇₃H₇₃N₁₈O₄Ru₂P₂F₁₂}⁴⁺ με *m/z* = 440,587 amu που μπορούν να αποδοθούν στους μοριακούς τύπους του συμπλόκου, με πρωτονιωμένη μόνον τη μία λυσίνη ο πρώτος και με τις δύο λυσίνες ο δεύτερος. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και για το τριφορτιακό ιόν με δύο πάλι κορυφές σε λόγο *m/z* = 587,122 amu και *m/z* = 635, 779 amu που αποδίδονται στα τριπλά φορτισμένα κατιόντα {C₇₃H₇₃N₁₈O₄Ru₂P₂F₁₂}³⁺ (587,450 amu) και {C₇₃H₇₃N₁₈O₄Ru₂P₃F₁₈}³⁺ (635,772 amu).



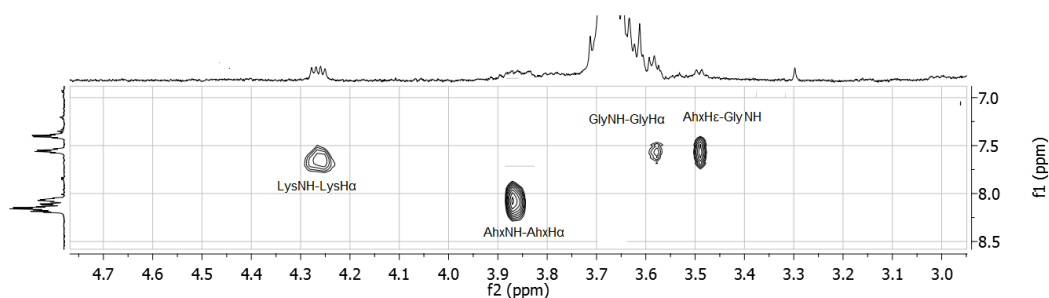
Πίνακας 3.18. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Lys¹-Lys²CONH₂)](PF₆)₆ στους 298 K σε ακετόνη-d₆. d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (HX)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H3, [A]H5	9,22	d	2
[A]H4	8,78	t	1
[B]H3	8,04	m	2
[B]H4	7,42	m	2
[B]H5	8,17	m	2
[B]H6	8,93	d	2
[C]H3	8,14	m	2
[C]H4	7,57	m	2
[C]H5	8,08	m	2
[C]H6	9,36	m	2
[D]H3	8,14	m	2
[D]H4	7,57	m	2
[D]H5	8,08	m	2
[D]H6	9,36	m	2
[E]H3	8,04	m	2
[E]H4	7,42	m	2
[E]H5	8,17	m	2
[E]H6	9,02	d	2
[F]H3, [F]H5	9,50	s	2
AhxNH	8,80	m	1
AhxH α	3,72	m	2
AhxH β	2,40	m	1
AhxH γ	1,81	m	2
AhxH δ	2,40	m	1
AhxH ϵ	3,68	m	2
Lys1NH	7,87	m	1
Lys1H α	4,38	m	1
Lys1H β	1,86	m	2
Lys1H γ	1,57	m	2
Lys1H δ	1,75	m	2
Lys1H ϵ	3,10-3,19	m	2
Lys1NH3			
Lys2NH	7,70	m	1
Lys2H α	4,44	m	1
Lys2H β	1,86	m	2
Lys2H γ	1,57	m	2
Lys2H δ	1,75	m	2
Lys2H ϵ	3,10-3,19	m	2
Lys2NH3			
CONH2(<i>cis</i>)(<i>trans</i>)	6,39-7,14		

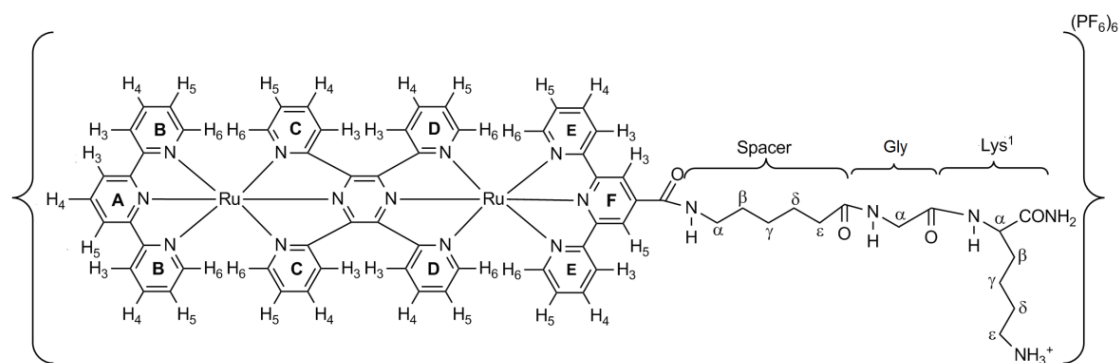
Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH₃CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT d π (Ru) $\rightarrow$ π^* (L) στα 550 nm με $\epsilon = 53010 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 300 nm με $\epsilon = 85130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 376 nm με $\epsilon = 41500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών tppz, trpy και p.

3.1.2.2.7. Χαρακτηρισμός του συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Ahx-Gly-LysCONH}_2)](\text{PF}_6)_5$

Θέλοντας να μελετήσουμε την επίδραση του θετικού φορτίου που φέρει το ακινητοποιημένο πεπτίδιο πάνω στη ρητίνη, κατά τη σύζευξη με το διπυρηνικό σύμπλοκο που έχει φορτίο 4+, η οποία πραγματοποιείται σε μια σταθερή απόσταση που προσδιορίζεται από το Ahx και διατηρώντας τους τρεις πεπτιδικούς δεσμούς, αλλάξαμε την Lys¹ του προηγούμενου συμπλόκου με μια γλυκίνη και συνθέσαμε το σύμπλοκο $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Ahx-Gly-LysCONH}_2)](\text{PF}_6)_5$. Η σύζευξη της πεπτιδικής αλληλουχίας μέσω του Ahx στο διπυρηνικό σύμπλοκο φαίνεται από το σήμα συντονισμού του πρωτονίου AhxNH στα 8,07 ppm. Το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται σημαντικά μετατοπισμένο σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με το AhxNH -0,73 του $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Ahx-Lys}^1\text{-Lys}^2\text{CONH}_2)](\text{PF}_6)_6$. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στην απουσία της λυσίνης που έχει αντικατασταθεί με γλυκίνη, και ενδεχομένως σε αλληλεπιδράσεις της πλευρικής αλειφατικής αλυσίδας της ή/και στο συνολικό φορτίο του συμπλόκου. Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται το φάσμα TOCSY του συμπλόκου όπου φαίνεται το σύστημα σύζευξης των πρωτονίων του πεπτιδικού σκελετού.



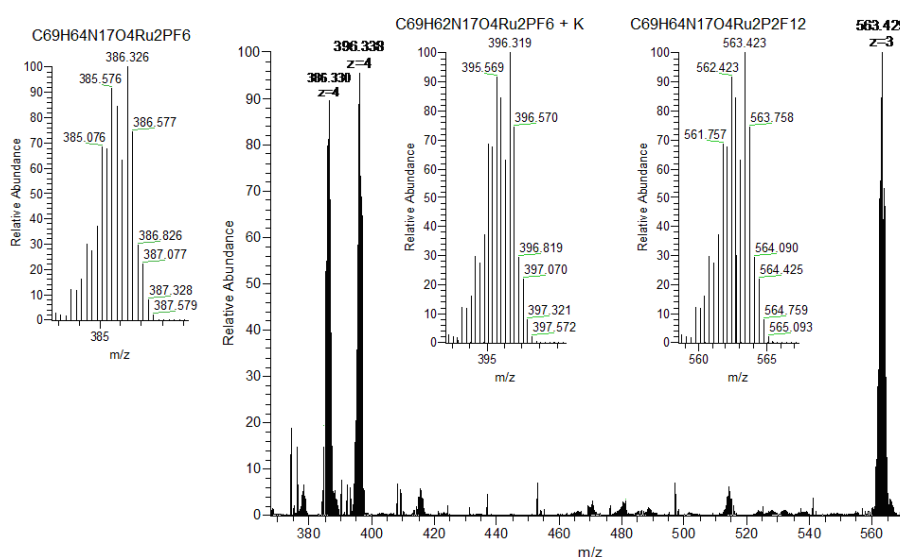
Σχήμα 3.23. Τμήμα από το φάσμα TOCSY (75 ms) @500 MHz στους 298 K του συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Ahx-Lys}^1\text{-Lys}^2\text{CONH}_2)](\text{PF}_6)_6$ σε ακετόνη-d₆.



Πίνακας 3.19. Χημικές μετατοπίσεις σε ppm των πρωτονίων του συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Ahx-Gly-Lys}^1\text{CONH}_2)](\text{PF}_6)_6$ στους 298 Κ σε ακετόνη- d_6 . d = doublet, t = triplet, m = multiplet.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (Hx)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ (ppm)	ΠΟΛΛΑΠΛΟΤΗΤΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΡΩΤΟΝΙΩΝ
[A]H ₃ , [A]H ₅	9,22	d	2
[A]H ₄	8,75	t	1
[B]H ₃	8,07	m	2
[B]H ₄	7,40	m	2
[B]H ₅	8,15	m	2
[B]H ₆	8,91	d	2
[C]H ₃	8,15	m	2
[C]H ₄	7,56	m	2
[C]H ₅	8,07	m	2
[C]H ₆	9,34	m	2
[D]H ₃	8,15	m	2
[D]H ₄	7,56	m	2
[D]H ₅	8,07	m	2
[D]H ₆	9,34	m	2
[E]H ₃	8,07	m	2
[E]H ₄	7,40	m	2
[E]H ₅	8,15	m	2
[E]H ₆	9,08	d	2
[F]H ₃ , [F]H ₅	9,57	s	2
AhxNH	8,07	m	1
AhxH α	3,84	m	2
AhxH β	2,40	m	1
AhxH γ	1,62	m	2
AhxH δ	2,40	m	1
AhxH ϵ	3,64	m	2
Gly ¹ NH	7,57	m	1
Gly ¹ H α	3,53	m	2
Lys ¹ NH	7,65	m	1
Lys ¹ H α	4,27	m	1
Lys ¹ H β	1,80	m	2
Lys ¹ H γ	1,61	m	2
Lys ¹ H δ	1,80	m	2
Lys ¹ H ϵ	3,42	m	2
Lys ¹ NH ₃	6,30-7,30		
CONH ₂ (<i>cis</i>)(<i>trans</i>)	6,30-7,30		

Στο φάσμα μάζας του συμπλόκου παρατηρούνται κορυφές σε λόγους m/z που μπορούν να αποδοθούν σε πολυφορτιακά κατιόντα. Έτσι παρατηρούνται οι κορυφές σε λόγο $m/z = 386,330$ και $563,429$ amu που αντιστοιχούν σε διαδοχικές αποσπάσεις PF_6^- από το σύμπλοκο όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί. Μία ακόμη κορυφή σε λόγο $m/z = 396,338$ amu μπορεί να αποδοθεί σε τριφορτιακό κατιόν στο οποίο έχει αντικατασταθεί ένα H^+ με K^+ .



Σχήμα 3.24. Φάσμα μάζας HR-ESI-MS θετικών ιόντων, του συμπλόκου $[(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Ahx-Gly-Lys^1CONH_2)](PF_6)_5$ όπου φαίνονται τα διαδοχικά πολυφορτιακά κατιόντα που σχηματίζονται. Ένθετα δίνονται τα θεωρητικά m/z με τις ισοτοπικές κατανομές και οι μοριακοί τύποι που τους αντιστοιχούν, με ελάχιστες αποκλίσεις από την πειραματική ακριβή μάζα.

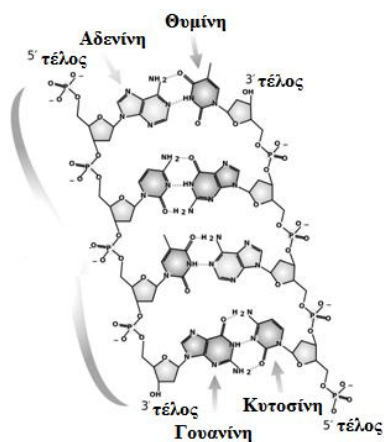
Στο φάσμα ορατού υπεριώδους του συμπλόκου σε διαλύτη CH_3CN παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές ταινίες MLCT $d\pi(Ru) \rightarrow \pi^*(L)$ στα 550 nm με $\epsilon = 50010 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και οι ταινίες $\pi \rightarrow \pi^*$ στα 301 nm με $\epsilon = 86000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και 376 nm με $\epsilon = 41310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ των υποκαταστατών $tppz$, $trpy$ και $pttrpy$.

3.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂

Σε αυτή την ενότητα θα εξηγηθεί το φάσμα ¹H NMR και θα αποδοθούν οι κορυφές συντονισμού του ολιγινουκλεοτιδίου d(C₁G₂C₃G₄A₅A₆T₇T₈C₉G₁₀C₁₁G₁₂). Ο διαλυτής που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη του φάσματος ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH = 7.0 90% H₂O-10% D₂O. Η σύσταση του διαλύτη λήψης 90% H₂O-10% D₂O είναι τέτοια ώστε να βοηθήσει να αποδοθούν και τα σήματα συντονισμού των ανταλλάξιμων πρωτονίων του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ μαζί με εκείνα των ανταλλάξιμων πρωτονίων.

3.2.1. Ανταλλάξιμα πρωτόνια

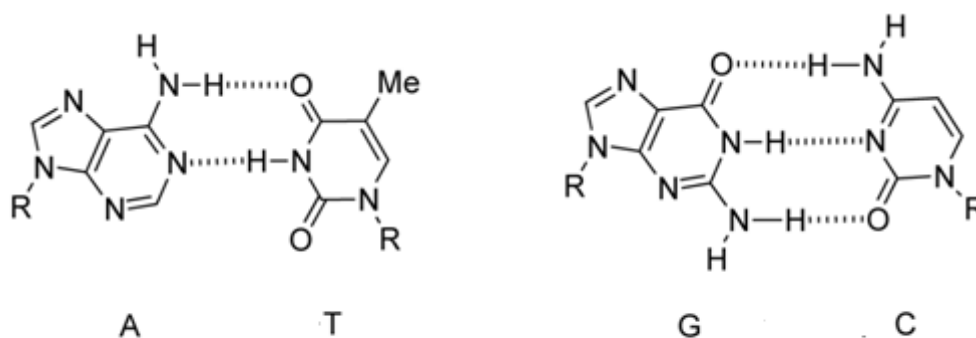
Τα ανταλλάξιμα πρωτόνια του ολογονουκλεοτιδίου, όπως φαίνεται και στο σχήμα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, (i) τα ιμινο- ή αμινο- που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις (hydrogen bonding), (ii) σε αυτά που δεν συμμετέχουν (non hydrogen bonding) και (iii) στα πρωτόνια των υδροξυλίων των σακχάρων των βάσεων της αλληλουχίας του κάθε κλώνου.



Σχήμα 3.25. Δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις C-G και A-T κατά την κατεύθυνση 3'-5' και 5'-3'.

Η απόδοση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων βασίζεται στα φάσματα ^1H NMR δυο διαστάσεων COSY και NOESY σε χρόνους t_m από 300 έως 450 ms. Τα φάσματα NOESY του ολιγονουκλεοτιδίου μας δίνουν περισσότερες πληροφορίες για όλες της αλληλεπιδράσεις των πρωτονίων μέσω χώρου μικρότερες των $4\text{\AA}$.

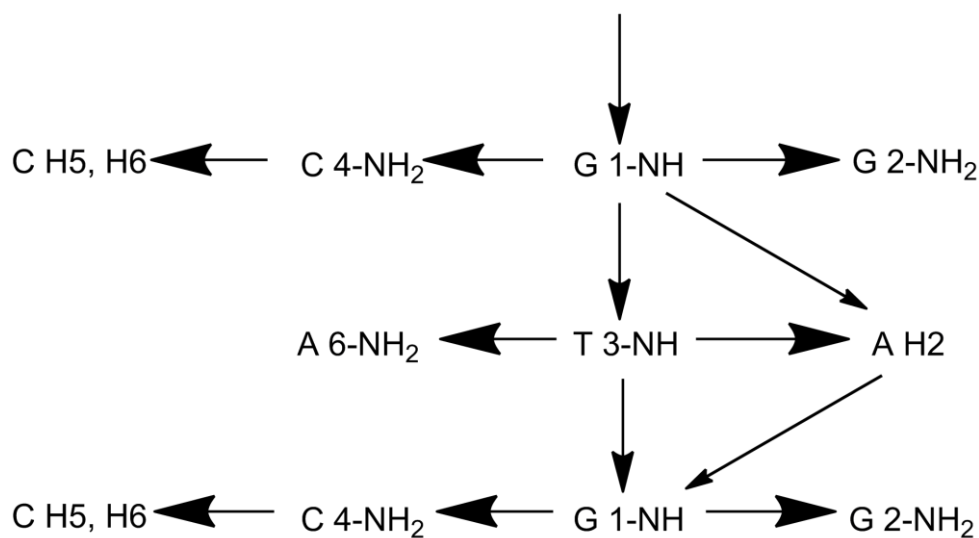
Τα ανταλλάξιμα με τον διαλύτη πρωτόνια που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις είναι τα ίμινο- πρωτόνια των βάσεων G-N1H και TN3H και τα πρωτόνια των εξωκυκλικών αμινομάδων GN2H, CN4H και AN6H που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις αντίστοιχες καρβονυλομάδες CO2, GO6 και TO4.



Σχήμα 3.26. Δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στις βάσεις C-G και A-T.

Ξεκινώντας με τα ίμινο πρωτόνια που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου (εμφανίζονται στα πλέον χαμηλότερα πεδία), και ανήκουν στα ζεύγη των δυο απέναντι βάσεων κυτοσίνη-γούνινη και αδερίνη-θυμίνη, εμφανίζονται πέντε σήματα συντονισμού όπως φαίνεται το φάσμα ^1H NMR την περιοχή 12-14 ppm. Τα ζεύγη των βάσεων C1-G12 C12-G1 στα άκρα του δίκλωνου DNA δεν σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου ή τα πρωτόνια τους ανταλλάσσονται από D και ως εκ τούτου δεν δίνουν σήματα συντονισμού στην περιοχή 12-14 ppm. Έχουν προταθεί δυο τρόποι απόδοσης των σημάτων συντονισμού. Ο πρώτος παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα [114-118] για τα ίμινο και άμινο πρωτόνια

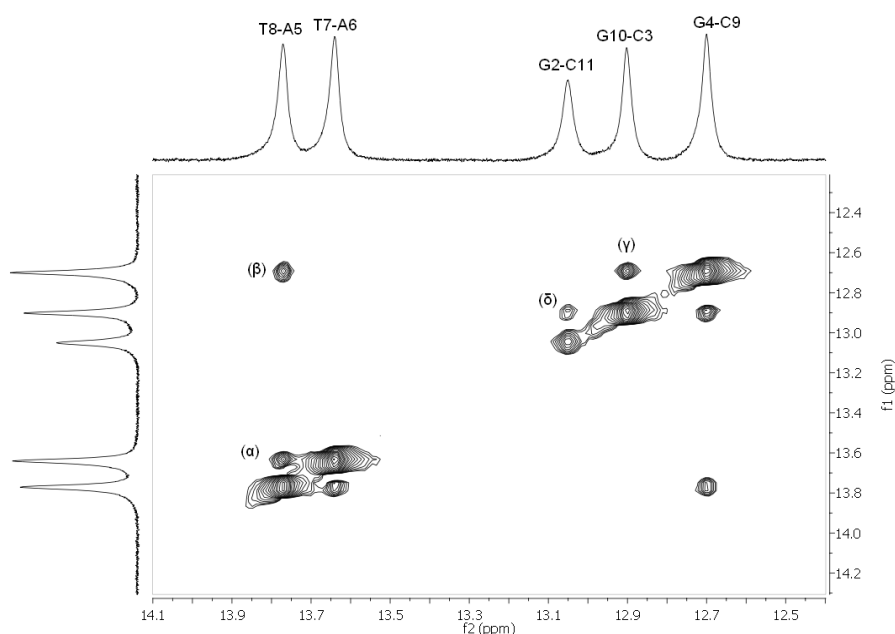
των βάσεων δηλαδή όλων των ανταλλαξίμων πρωτονίων με το διαλύτη, στηριζόμενος στις αποστάσεις που είναι με μικρότερες από 4,3 Å.



Σχήμα 3.27. NOE αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα πρωτόνια των βάσεων ενός ολιγονουκλεοτιδίου που βρίσκεται σε δομή έλικας Β-τύπου.

Αυτός ο τρόπος απόδοσης των πρωτονίων βασίζεται στην παρατήρηση των σημάτων NOE των ίμινο πρωτονίων των γειτονικών ζευγών βάσεων στην αλληλουχία. Έτσι, για το ζεύγος AT υπάρχει ένα επιπλέον NOE με το H2 της αδερίνης. Συνολικά τα NOE σήματα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του είδους της κάθε βάσης και αποτελούν έναν τρόπο απόδοσης των σημάτων των ίμινο πρωτονίων σε περίπτωση που αυτά δεν διακρίνονται. Ο δεύτερος τρόπος απόδοσης βασίζεται στην απόδοση των πρωτονίων της αμινομάδας κυτοσίνης που έχει ισχυρά NOE με τα πρωτόνια της H6 και H5. Έξαλλου τα δυο πρωτόνια της αμινομάδας εμφανίζονται σε διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις, επειδή το ένα συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου ενώ το άλλο όχι με αποτέλεσμα να δίνουν ένα ισχυρό σήμα NOE μεταξύ τους. Αυτό το σήμα δεν εμφανίζεται στην τερματική κυτοσίνη της αλληλουχίας αφού η όπως προαναφέραμε αυτή είτε δεν συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου, ή ανταλλάσσονται τα πρωτόνια της, με τον διαλύτη. Στο παρακάτω σχήμα δίνεται

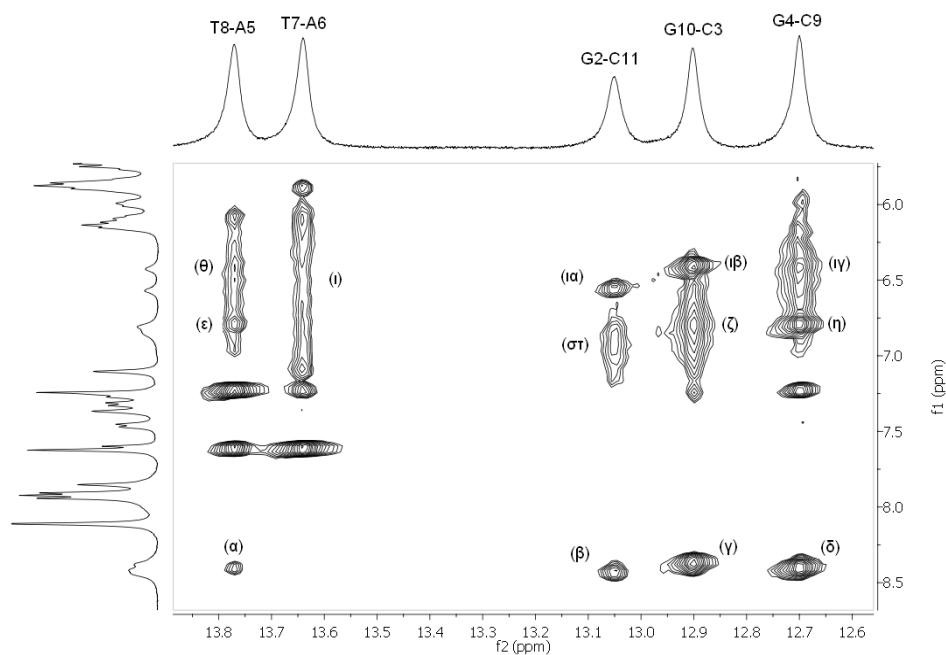
ένα τμήμα από το φάσμα NOESY του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ όπου στα φάσματα μιας διάστασης φαίνονται οι κορυφές των πρωτονίων που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου καθώς και οι NOE cross-peaks οι οποίες σχηματίζονται μεταξύ τους. Θεωρώντας ότι το μοναδικό ίμινο πρωτόνιο που δίνει **μία μόνο** NOE cross-peak είναι το T7N3H, καθώς η T7 βρίσκεται στο συμμετρικό κέντρο της διπλής έλικας (A6-T7 και απέναντι T7-A6) μπορούμε να αποδώσουμε τους υπόλοιπους συντονισμούς με βάση τις NOE cross-peaks ως εξής: (α) μεταξύ του ίμινο πρωτονίου της T7 (T7-A6) και της T8 (T8-A5) (β) του ίμινο πρωτονίου της T8 (T8-A5) και της G4 (C9-G4), (γ) του ίμινο πρωτονίου της G4 (C9-G4) και του ίμινο πρωτονίου της G10 (G10-C3) και (δ) G10 (G10-C3) και του ίμινο πρωτονίου της G2 (C11-G2).



Σχήμα 3.28. Τμήμα του φάσματος NOESY ($t_m = 350$ ms @ 500 MHz, 298 K, H₂O-D₂O 9:1, 100 mM ρυθμιστικό φωσφορικών pH = 7.0) του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂.

Με βάση τα πιο πάνω, προχωρούμε στη συνέχεια στην απόδοση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων των εξωκυκλικών αμινομάδων των βάσεων της κυτοσίνης CN3H, της γουανίνης GN2H και της αδενίνης AN6H. Τα πρωτόνια αυτά εμφανίζουν τα σήματά τους σε παρόμοια πεδία συντονισμού και θα αποδοθούν μόνο εκείνα των ζευγών G2-C11, G3-C10, G4-C9 που ανήκουν στις

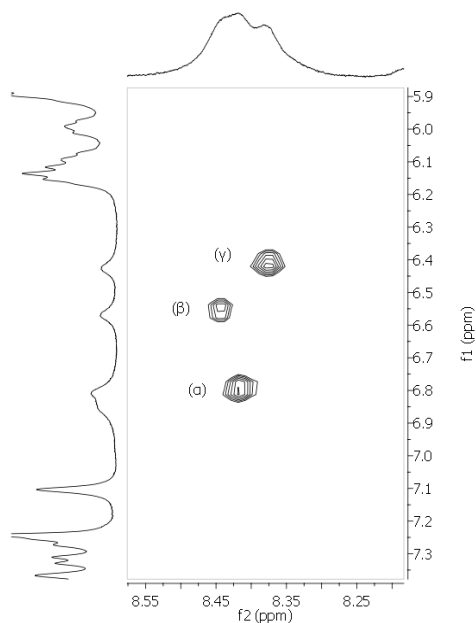
αντίστοιχες βάσεις της γουανίνης ή αδενίνης. Γενικά τα πρωτόνια των αμινομάδων των βάσεων που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου βρίσκονται σε χαμηλότερα πεδία (8,2- 8,6 ppm) από εκείνα που δεν συμμετέχουν (6-7 ppm). Στο πιο κάτω τμήμα του φάσματος NOESY του ολιγονουκλεοτιδίου διακρίνονται οι NOE cross-peaks που συσχετίζουν τα ήδη αποδομένα ίμινο πρωτόνια των βάσεων με τα αμινο πρωτόνια με βάση και το σχήμα 3.27. Έτσι διακρίνουμε τις NOE cross-peaks: (α) T8N3H $\rightarrow$ A5N6H_b, (β) G2N1H $\rightarrow$ G2N2H_b ή C11N4H_b (γ) G10N1H $\rightarrow$ G10N2H_b ή C3N4H_b, (δ) G2N1H $\rightarrow$ G2N2H_b ή C11N4H_b, (ε) G4N1H $\rightarrow$ G4N2H_b ή C9N4H_b, (ς) T8N3H $\rightarrow$ G4N2H_{nb}, (στ) G2N1H $\rightarrow$ C11N4H_{nb} (ζ) G10N1H $\rightarrow$ C3N4H_{nb}, (η) G4N1H $\rightarrow$ G9N2H_{nb}, (θ) T8N3H $\rightarrow$ G4N2H_{nb}, (ι) T7N3H $\rightarrow$ A5/A6N6H_{nb}, (ια) G2N1H $\rightarrow$ G2N2H_{nb} (ιβ) G10N1H $\rightarrow$ G2N2H_{nb}, (ιγ) G4N1H $\rightarrow$ C9N4H_{nb}.



Σχήμα 3.29. Τμήμα του φάσματος NOESY (t_m = 350 ms @ 500 MHz, 298 K, H₂O-D₂O 9:1, 100 mM ρυθμιστικό φωσφορικών pH = 7.0) του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂.

Για να συμπληρωθεί η απόδοση των ανταλλάξιμων ίμινο και αμινο πρωτονίων μπορούμε να επιβεβαιώσουμε όλα τα πιο πάνω με τις NOE cross-

peaks που εμφανίζονται μεταξύ των H_b και H_{nb} των αμινομάδων των βάσεων όπως φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 3.30. Τμήμα του φάσματος NOESY ($t_m = 350$ ms @ 500 MHz, 298 K, H_2O-D_2O 9:1, 100 mM ρυθμιστικό φωσφορικών pH = 7.0) του $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$. (α) $G4N2H_b \rightarrow G4N2H_{nb}$ (β) $G10N2H_b \rightarrow G10N2H_{nb}$, (γ) $G2N2H_b \rightarrow G2N2H_{nb}$.

Συνοψίζοντας, οι χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων άμινο και ίμινο πρωτονίων παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο παρακάτω πίνακα

Πίνακας 3.20. Απόδοση των ανταλλάξιμων πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ @500 MHz, 298 K, H_2O-D_2O 9:1, 100 mM ρυθμιστικό φωσφορικών, pH = 7.0. n.o. = not observed.

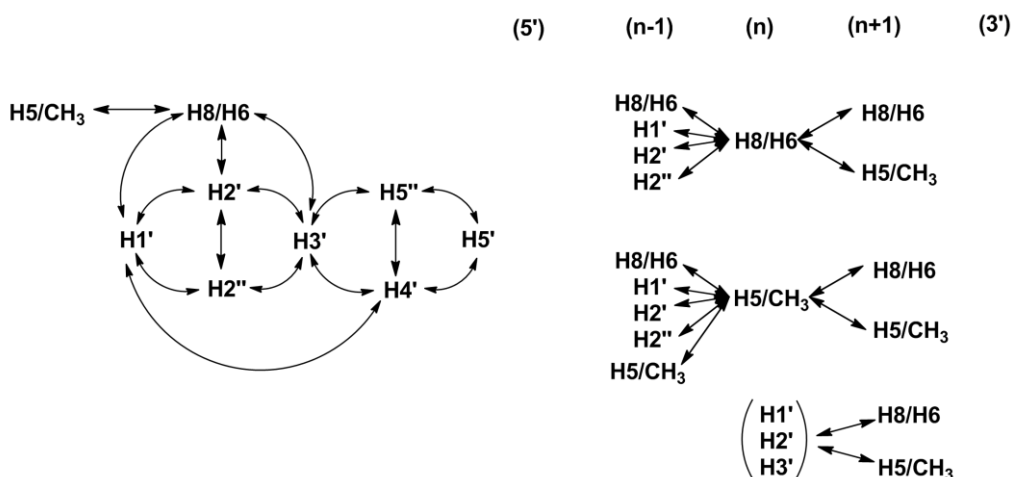
	NH	NH _{nb}	NH _b
G2	13,02	6,55	8,37
C3	-	6,81	n.o.
G4	12,68	6,80	8,40
A5/A6	-	n.o.	8,39
T7	13,65	-	-
T8	13,78	-	-
C9	-	6,47	n.o.
G10	12,88	6,42	8,41
C11	-	6,90	n.o.

Στα ανταλλάξιμα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου συγκαταλέγονται ακόμη και τα πρωτόνια των υδροξυλίων του σακχάρου της θέσης 4' καθώς τα τερματικά ελεύθερα 5' και 3', τα οποία βρίσκονται όμως πολύ κοντά ή μέσα στην κορυφή του νερού και είναι δύσκολο να διακριθούν.

3.2.2. Μη ανταλλάξιμα πρωτόνια

Με τον όρο μη ανταλλάξιμα πρωτόνια εννοούμε τα αρωματικά πρωτόνια των δακτυλίων των βάσεων GH8, AH8 και AH2, CH5 και CH6, TH6, τα πρωτόνια της μεθυλομάδας της T, T-CH₃, και τα πρωτόνια του σακχάρου H1', H2', H2'', H3', H4', H5' και H5''.

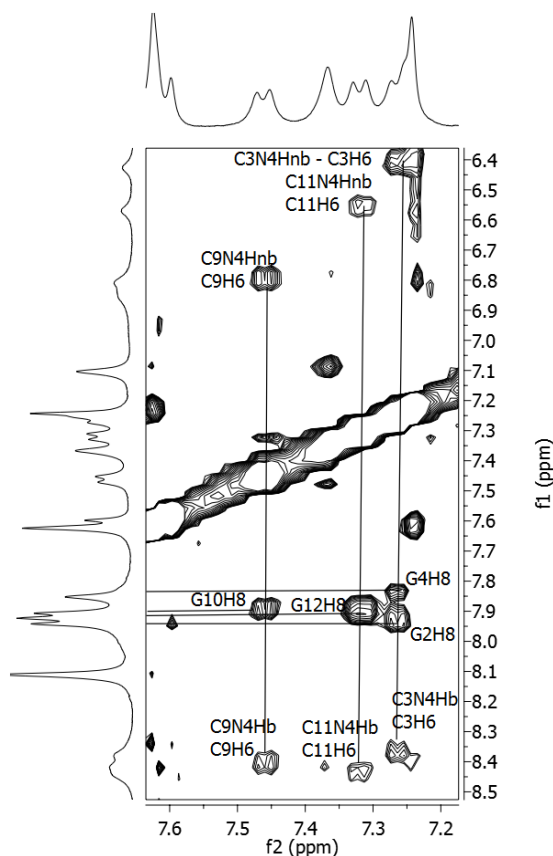
Λόγω της διαμόρφωσης του ολιγονουκλεοτιδίου στο χώρο σε μορφή έλικας Β-τύπου τα περισσότερα πρωτόνια εμφανίζουν σήματα NOE με γειτονικά τους στα φάσματα NOESY. Σήμερα έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι για την απόδοση των μη ανταλλαξίμων πρωτονίων σύμφωνα με την εκάστοτε αλληλουχία με τη χρήση του φάσματος NOESY οι οποίες δεν διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ τους [119-123]. Η απόδοση των σημάτων συντονισμού πραγματοποιείται με χρήση του φάσματος NOESY σύμφωνα με το σχήμα που παρουσιάζεται και αναλύεται παρακάτω. Σκόπιμο θα ήταν για την απόλυτη ταυτοποίηση των πρωτονίων να γίνει και χρήση του φάσματος TOCSY του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂, όπως θα δούμε στη συνέχεια.



Σχήμα 3.31. Διαγραμματική απεικόνιση των σημάτων NOE σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο που υιοθετεί την διαμόρφωση έλικας B-τύπου.

3.2.2.1. Πρωτόνια των νουκλεϊκών βάσεων

Πριν όμως προχωρήσουμε στην απόδοση των πρωτονίων των σακχάρων θα ήταν σκόπιμο να αποδοθούν τα αρωματικά πρωτόνια των βάσεων της αλληλουχίας. Η σύνδεση των πρωτονίων αυτών γίνεται ξεκινώντας από τα ανταλλάξιμα πρωτόνια. Έτσι με βάση και το σχήμα 3.27 το πρωτόνιο T8N3H δίνει NOE crosspeak με το απέναντι A5H2 και το T7N3H δίνει NOE crosspeak με το απέναντι A6H2. Ακόμη τα πρωτόνια $C9N4Hb \rightarrow C9H6$, $C11N4Hb \rightarrow C11H6$ και $C3N4Hb \rightarrow C3H6$, ενώ τα πρωτόνια H6 των κυτοσινών δίνουν NOE crosspeaks με τα μη εμπλεκόμενα σε δεσμούς υδρογόνου CN4Hnb. Στη συνέχεια τα πρωτόνια CH6 δίνουν NOE crosspeaks με τα GH8 της επόμενης γουανίνης, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.31 Με ανάλογο τρόπο προσδιορίζονται τα πρωτόνια AH8 και TH6.

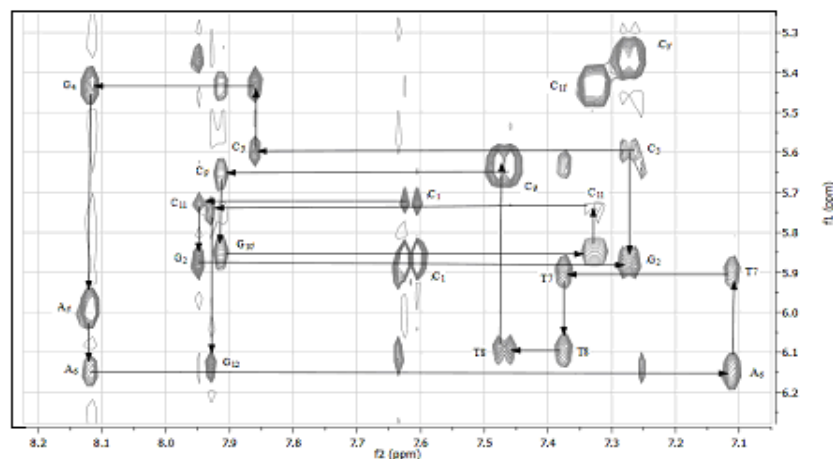


Σχήμα 3.32. Τμήμα του φάσματος NOESY ($t_m = 350$ ms @ 500 MHz, 298 K, H_2O-D_2O 9:1, 100 mM ρυθμιστικό φωσφορικών pH = 7.0) του $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ με απόδοση NOE crosspeaks ανάμεσα σε ανταλλάξιμα και αρωματικά πρωτόνια των βάσεων της αλληλουχίας.

3.2.2.2. Πρωτόνια του σακχάρου

Για να αποδώσουμε τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων των σακχάρων των βάσεων της αλληλουχίας χρησιμοποιούμε την εξής μεθοδολογία. Θεωρούμε ότι σε κάθε δεξιόστροφη έλικα Β-τύπου τα H8 των πουρινών (γουανίνης ή αδενίνης) ή τα H6 των πυριμιδινών (θυμίνης ή κυτοσίνης) θα βρίσκονται πλησίον του H1' του δικού της σακχάρου (n) και του H1' του προηγούμενου σακχάρου (n-1), αριθμώντας πάντα με κατεύθυνση από το 5' άκρο προς το 3' άκρο της αλληλουχίας του ολιγονουκλεοτιδίου (σχ. 3.31). Επίσης τα πρωτόνια H8 ή H6 των νουκλεϊκών βάσεων θα είναι κοντά στο H2'' του προηγούμενου (n-1) σακχάρου, το οποίο με τη σειρά του θα βρίσκεται

πλησίον του H1' του επόμενου σακχάρου (n+1). Στη συνέχεια γίνεται ταυτοποίηση των παραπάνω πρωτονίων μέσω των NOE crosspeaks των H6/H8 (n) με το H2'' (n-1), παρέχοντας την επιβεβαίωση για την απόδοση πρωτονίων που έγινε μέσω των NOE crosspeaks με τα πρωτόνια (n-1) H1'.

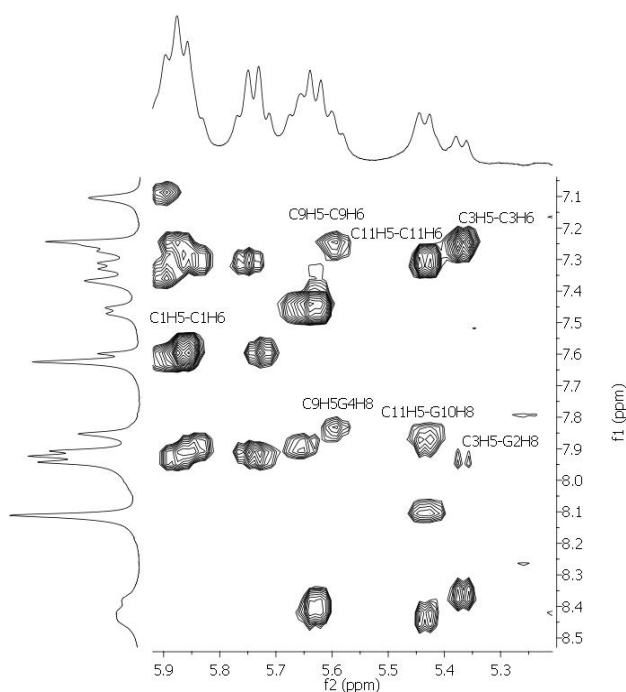


Σχήμα 3.33. περιοχή του φάσματος NOESY όπου φαίνονται οι NOE crosspeaks των πρωτονίων H8/H6 και των περιοχής H1'.

Όταν υπάρχουν πολλά και αλληλοεπικαλυπτόμενα σήματα NOE στην περιοχή του φάσματος όπου γίνεται ο προσδιορισμός των πρωτονίων H1', μπορεί να χρησιμοποιηθεί το H2'' ως μια εναλλακτική μέθοδος προσδιορισμού της αλληλουχίας. Πολλές φορές αναλόγως της αλληλουχίας του κάθε νουκλεοτιδίου εμφανίζονται και άλλα σήματα που επαληθεύουν την θέση του κάθε πρωτονίου αλλά δεν μπορούν να συμπεριληφθούν σε μια γενική μέθοδο ταυτοποίησης και πλήρους χαρακτηρισμού της αλληλουχίας.

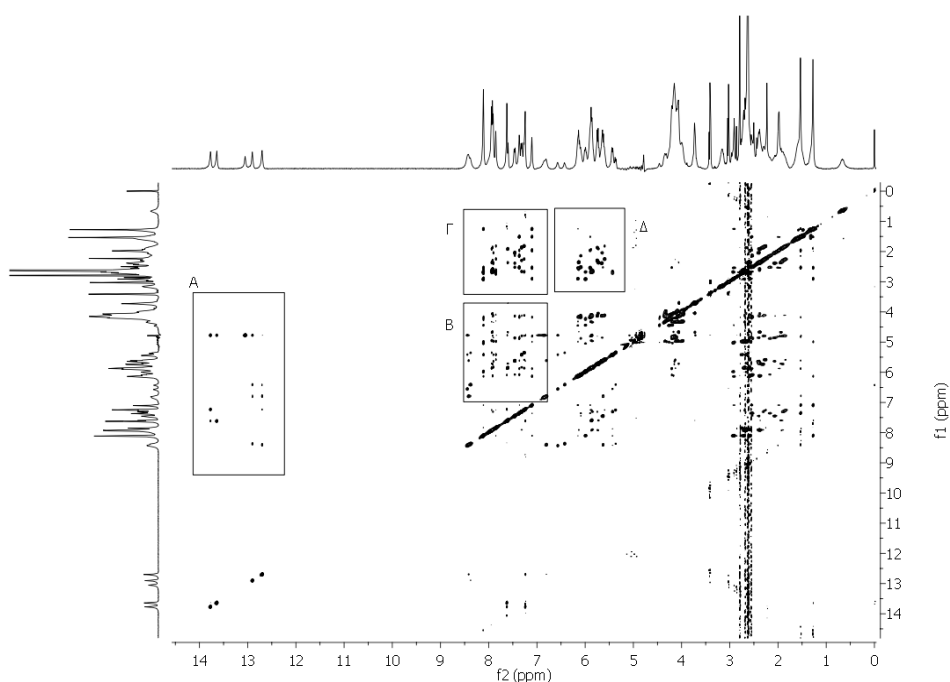
Άλλα σήματα NOE που παρατηρούνται είναι αυτά μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων γειτονικών βάσεων. Ξεκινώντας από τις πυριμιδίνες, το H5 της βάσης της κυτοσίνης (n) δίνει NOE σήμα με το H6/H8 της (n-1) προηγούμενης βάση (σχ. 3.31). Στην περίπτωση της θυμίνης η συγκριμένη crosspeak είναι με την μεθυλομάδα που βρίσκεται στον C5. Όπως φαίνεται και από στο σχήμα 3.34 παρατηρούνται NOE σήματα μεταξύ του H1' (n) και του

(n+1) H5 μιας κυτοσίνης, ή με το (n+1) CH₃ της θυμίνης. Οι αποστάσεις μεταξύ των πρωτονίων όπως παρουσιάζονται μέσα από μοριακά μοντέλα προβλέπουν ότι απόσταση μεταξύ των πρωτονίων H8 γειτονικών πουρινών είναι πολύ μεγάλη για να δώσει κάποια NOE crosspeak. Σε όλες τις αλληλουχίες που περιέχουν διαδοχικές βάσεις αδενίνης όπως στο ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ παρατηρείται μια NOE crosspeak μεταξύ των πρωτονίων H2 των αδενινών.



Σχήμα 3.34. Τμήμα του φάσματος NOESY ($t_m = 350$ ms @ 500 MHz, 298 K, H₂O-D₂O 9:1, 100 mM ρυθμιστικό φωσφορικών pH = 7.0) του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ με απόδοση των NOE crosspeaks ανάμεσα στα αρωματικά πρωτόνια κυτοσινών κα γουανινών.

Συνοψίζοντας, από ένα φάσμα NOESY ενός ολιγονουκλεοτιδίου διπλής έλικας μπορούμε να αποδώσουμε σε σημαντικό βαθμό τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του όπως περιγράψαμε πιο πάνω.



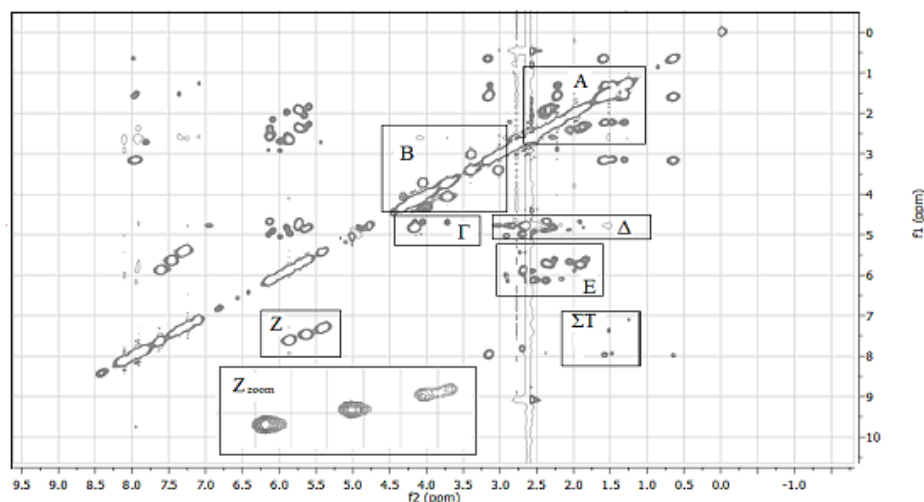
Σχήμα 3.35. Το πλήρες φάσματος NOESY ($t_m = 350$ ms @ 500 MHz, 298 K, H_2O-D_2O 9:1, 100 mM ρυθμιστικό φωσφορικών pH = 7.0) του $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ με τις περιοχές ενδιαφέροντος Α-Δ. (Α) NOE crosspeaks μεταξύ των ιμινο και άμινο πρωτονίων, (Β) NOE crosspeaks μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων των βάσεων και του $H1'$, (Γ) NOE crosspeaks μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων των βάσεων και των $H2'$ και $H2''$ και (Δ) NOE crosspeaks μεταξύ των πρωτονίων $H1'$ και των $H2'$ και $H2''$.

Στο σχήμα 3.35 εμφανίζονται οι τέσσερις βασικές περιοχές του φάσματος που εξετάζουμε. Η εκκίνηση απόδοσης των σημάτων NOE και κατά επέκταση η ταυτοποίηση των πρωτονίων, (εκτός της μεθόδου με τα ανταλλάξιμα πρωτόνια της περιοχής 12-14 ppm που συζητήσαμε) μπορούν να αποτελέσουν και οι μεθυλομάδες των δυο θυμινών όπου στην περίπτωση του $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ εμφανίζονται 1,26 και 1,51 ppm.

Επίσης από το φάσμα TOCSY υπάρχει ένα ασθενές, αλλά επαρκές σήμα για την συσχέτιση της μεθυλομάδας στα 1,26 ppm με το $H6$ στα 7,09 και της μεθυλομάδας στα 1,51 ppm με το $H6$ στα 7,35. Η απόδοση των πρωτονίων της θυμίνης $TH6$ και της δικιάς της μεθυλομάδας, βασίζεται στο γεγονός ότι η μεθυλομάδα της $T8$ δίνει δύο NOE σήματα, με το $H6$ και των δυο θυμινών, ενώ η

μεθυλομάδα της T7 δίνει ένα NOE σήμα με το δικό της H6 και ένα με το αρωματικό πρωτόνιο A6H8 στα 8,09 ppm. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να αποτελέσει το σημείο εκκίνησης για την απόδοση των κορυφών όλου του φάσματος.

Στο φάσμα TOCSY του ολιγονουκλεοτιδίου που φαίνεται στο σχήμα 3.36, διακρίνουμε τις διαφορετικές περιοχές στις οποίες αντιστοιχούν οι διαφορετικές συζεύξεις πρωτονίων 3J , 4J κ.λπ. Τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του σακχάρου φαίνονται καθαρά να σχηματίζουν τις δικές τους ομάδες σε συγκεκριμένες περιοχές (Α, Β, Γ και Δ). Τα πρωτόνια H1' συζευγνύονται με τα H2' και τα H2'' όπως φαίνεται στην περιοχή (Ε) και η διάκρισή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με την βοήθεια και του φάσματος NOESY, λόγω των διαφορών στις αποστάσεις μεταξύ των πρωτονίων H2' ή H2'' με το H1' και το H3'. Έτσι κάθε πρωτόνιο H3' συζευγνύεται με το αντίστοιχο H4' όπως φαίνεται στην περιοχή (Γ) το οποίο συζευγνύεται με το αντίστοιχο H5' και H5'' όπως φαίνεται στην περιοχή (Β). Οι ασθενούς έντασης crosspeaks που παρατηρούνται στην περιοχή (ΣΤ) προέρχονται από την σύζευξη μεταξύ των μεθυλομάδων και των πρωτονίων H6 των δυο T7 και T8. Ακόμη, τα μόνα αρωματικά πρωτόνια που δίνουν crosspeaks είναι τα H5 και τα H6 των τεσσάρων κυτοσινών όπως φαίνεται στην περιοχή (Ζ) του φάσματος. Το φάσμα TOCSY, συνεπώς μας βοηθάει να επιβεβαιώσουμε ή να συμπληρώσουμε την απόδοση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων που πραγματοποιήθηκε με βάση το φάσμα NOESY του ολιγονουκλεοτιδίου.



Σχήμα 3.36. Το πλήρες φάσματος TOCSY ($t_m = 80$ ms @500 MHz, 298 K, H_2O-D_2O 9:1, 100 mM ρυθμιστικό φωσφορικών pH = 7.0) του $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ με τις περιοχές ενδιαφέροντος A-Z. Οι περιοχές Α έως Ζ αντιστοιχούν στις crosspeaks των εξής πρωτονίων (Α) $H2'-H2''$ (Β) $H4'-H5'$, $H4'-H5''$, $H5'-H5''$ (Γ) $H3'-H4'$ (Δ) $H2'-H3'$, $H2''-H3'$ (Ε) $H1'-H2'$, $H1'-H2''$ (Ζ) $H5-H6$ (ΣΤ) CH_3-H6 της θυμίνης.

Υστερα από τις διαδικασίες ταυτοποίησης των πρωτονίων του $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ με τις μεθόδους που αναλύσαμε παραπάνω με τη χρήση των διαφορετικών τεχνικών πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προκύπτει ο παρακάτω πίνακας χημικών μετατοπίσεων.

Πίνακας 3.21. Απόδοση των μη ανταλλαξίμων πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ @500 MHz, 298 K, H_2O-D_2O 9:1, 100 mM ρυθμιστικό φωσφορικών, pH = 7.0.

Βάση	H8/H6	H5/H2/ T-CH ₃	H1'	H2'	H2''	H3'	H4'	H5'-H5''
C1	7.60	5.88	5.72	1.94	2.39	4.68	4.04	3,68-3,71
G2	7.92		5.88	2.61	2.68	4.95	4.32	3,96-4,07
C3	7.25	5.35	5.58	1.82	2.26	4.79	4.11	4,11-4,15
G4	7.83		5.41	2.63	2.75	4.97	4.30	3,97-4,06
A5	8.09	7.21	5.97	2.67	2.90	5.04	4.44	4,15-4,18
A6	8.09	7.60	6.13	2.59	2.90	4.99	4.45	4,23-4,25
T7	7.09	1.26	5.88	1.94	2.53	4.80	4.18	4,16
T8	7.35	1.51	6.08	2.15	2.53	4.88	4.19	4,09
C9	7.44	5.60	5.65	2.04	2.40	4.85	4.13	4,09-4,17
G10	7.89		5.82	2.62	2.67	4.97	4.35	4,03-4,11
C11	7.31	5.42	5.72	1.87	2.30	4.80	4.14	4,09-4,18
G12	7.92		6.13	2.36	2.62	4.66	4.15	4,03

3.3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΟΠΤΙΚΑ ΕΝΕΡΓΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ Ru(II) ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΩΝ ΜΕ ΠΕΠΤΙΔΙΑ, ΜΕ ΤΟ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟ d(5'- CGCGAATTCGCG-3')₂

Προτού μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων που συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν στο κεφάλαιο 3.1 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂, μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις αναλόγων διαστερεοϊσομερών συμπλόκων Δ- and Λ-[Ru(bpy)₂(4-COY-4'-Mebpy)]Cl₂ (Y = Gly-Lys¹-Lys²CONH₂, Lys¹-Gly-Lys²CONH₂, Lys¹-Lys²-GlyCONH₂ όπου Λ-1 [Ru(bpy)₂(4-COGly-Lys¹-Lys²CONH₂),4'-Mebpy)]Cl₂, Λ-2 [Ru(bpy)₂(4-COLys¹-Gly-Lys²CONH₂),4'-Mebpy)]Cl₂, Λ-3 [Ru(bpy)₂(4-COLys¹-Lys²-Gly-CONH₂),4'-Mebpy)]Cl₂ και Δ-1 [Ru(bpy)₂(4-COGly-Lys¹-Lys²CONH₂),4'-Mebpy)]Cl₂, Δ-2 [Ru(bpy)₂(4-COLys¹-Gly-Lys²CONH₂),4'-Mebpy)]Cl₂, Δ-3 [Ru(bpy)₂(4-COLys¹-Lys²-Gly-CONH₂),4'-Mebpy)]Cl₂ με το ίδιο ολιγονουκλεοτίδιο. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων αυτών με την διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου βασίστηκε σε τεχνικές NMR.

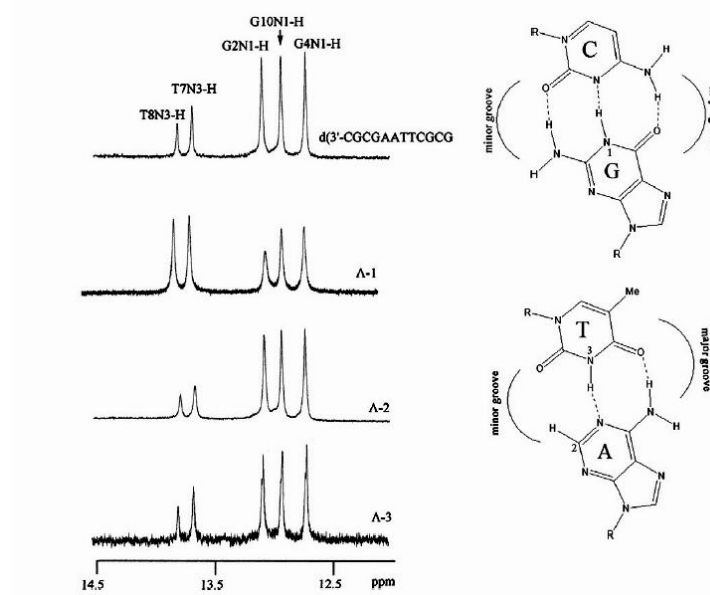
3.3.1 Αλληλεπιδράσεις των Λ- συμπλόκων με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂

Τα φάσματα ¹H NMR των δειγμάτων που μελετήθηκαν περιέχουν το ολιγονουκλεοτίδιο και τα Λ- σύμπλοκα σε μοριακές αναλογίες συμπλόκου : νουκλεοτίδιο 0,5: 1 και 1: 1 και δείχνουν μόνο ένα σύνολο σημάτων συντονισμών σε όλες τις περιπτώσεις, υποδεικνύοντας ότι το σύστημα μας βρίσκεται σε γρήγορη κινητική στην κλίμακα χρόνου του NMR στους 298 K, μεταξύ των ελεύθερων μορφών του συμπλόκου και του ολιγονουκλεοτιδίου και εκείνου που αλληλεπιδρά με το ολιγονουκλεοτίδιο.

3.3.1.1. Αλληλεπιδράσεις του Λ-1 με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$

Η τιτλοδότηση του ολιγονουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο Λ-1, ακολουθείται από αλλαγές στα σήματα ^1H NMR τόσο του ολιγονουκλεοτιδίου όσο και του συμπλόκου. Όλα τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων των δύο νουκλεοτιδίων της διπλής έλικας εμφανίζονται απλά, μια κατάσταση που υποδεικνύει ότι η συμμετρία της διπλής έλικας δεν έχει υποστεί αλλαγές. Ύστερα από την τιτλοδότηση του ολιγονουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο Λ-1 και σε λόγο 1:1, παρουσιάστηκαν μικρές μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία για το πρωτόνιο N3-H της θυμίνης T8 και της T7 κατά 0.03 και 0.04 ppm αντίστοιχα. Μεγαλύτερες μετατοπίσεις παρατηρούνται για τα πρωτόνια που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου Watson-Crick, αλλά και αυτών που δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, N4-H των βάσεων C3 και C9, σε ένα εύρος τιμών 0,01 - 0,09 ppm.

Στην περιοχή των ίμινο πρωτονίων του φάσματος τα σήματα των πρωτονίων N1-H των G2, G4 και G10 παρουσιάζουν μείωση της έντασης τους σε σχέση με τα N3-H των T8 και T7 γεγονός που μπορεί να ερμηνευθεί ως μείωση της «ποσότητας» των δεσμών υδρογόνων μεταξύ του ζεύγους των βάσεων CG όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί.



Σχήμα 3.37. Φάσμα ^1H NMR της ιμίνου περιοχής των ανταλλάξιμων πρωτονίων (12 έως 14,5 ppm) του ελευθέρου ολιγονουκλεοτιδίου και του ολιγονουκλεοτιδίου με τα σύμπλοκα Δ -1, Δ -2 και Δ -3, σε αναλογία συμπλόκου:νουκλεοτιδίου 1:1 στα 500 MHz σε διαλύτη $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών στους 298 K και συγκέντρωση ολιγονουκλεοτιδίου 1 mM. Στη δεξιά πλευρά απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου Watson-Crick μεταξύ των ζευγών βάσεων CG και AT.

Δεδομένου ότι τα ίμινο πρωτόνια βρίσκονται τοποθετημένα στο εσωτερικό τμήμα της έλικας θα πρέπει μάλλον να αποκλειστεί η ταχεία ανταλλαγή τους με το διαλύτη που θα είχε ως αποτέλεσμα απώλεια μέρους του σήματος συντονισμού τους. Γενικά, η διάσπαση των δεσμών υδρογόνου του ζεύγους βάσεων συνήθως συνοδεύεται με την απώλεια της συσσώρευσης των αρωματικών βάσεων, προκαλώντας μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία των αρωματικών πρωτονίων τους. Έτσι παρατηρήθηκαν σημαντικές μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία κατά $\Delta\delta = 0,03 - 0,09$ ppm, για τα πρωτόνια H8/H6 των βάσεων G και C, καθώς και για τα H2 βάσεων A5 και A6, κατά περίπου 0.05 ppm, που δείχνει μια μερική απώλεια της συσσώρευσης μεταξύ των βάσεων. Επίσης, παρατηρούνται μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία, κατά μέσο όρο περίπου 0,03 ppm, για τα πρωτόνια H1' των σακχάρων, με εξαίρεση τα H1' των C1 και G12, που έτσι και αλλιώς δεν συμμετείχαν στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, για τα

οποία παρατηρείται μια μετατόπιση σε υψηλότερα πεδία της τάξεως των 0,02 ppm όπως φαίνεται στον πίνακα 3.22. Ακόμα κι αν οι παρατηρούμενες μεταβολές είναι μικρές, η μεταβολή μετατόπισης σε μεικτού προσήμου υποδηλώνει μια αλλαγή από *anti* σε *syn* προσανατολισμό του σακχάρου στις βάσεις C1 και G12 [124]. Αυτή η θέση υποστηρίζεται περαιτέρω και από τη μείωση του όγκου της NOE crosspeak μεταξύ του αρωματικού πρωτονίου της βάσης και του δικό της H1'[125]. Αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων που βρίσκονται είτε στη μείζονα αύλακα (H2' του σακχάρου και των H8/H6) είτε στη ελάσσονα αύλακα (του σακχάρου H1', H2'' και των A5 ή A6H2), αποτελούν αξιόπιστους δείκτες για τη διερεύνηση του τρόπου δέσμευσης του συμπλόκου στο ολιγονουκλεοτίδιο. Στην περίπτωση του συμπλόκου Λ-1 η μετατόπιση των πρωτονίων που βρίσκονται τόσο στη μείζονα, όσο και στην ελάσσονα αύλακα της έλικας, ενισχύει την υπόθεση ότι το Λ-1 αλληλεπιδρά μη ειδικώς με το ολιγονουκλεοτίδιο, με αποτέλεσμα όμως την χαλαρότερη συγκράτηση των δύο κλώνων.

Πίνακας 3.22. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ ύστερα την προσθήκη του συμπλόκου Λ-1, σε αναλογία 1: 1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH =7.0), στους 298 K, σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο υπό τις ίδιες συνθήκες.

	H8/H6	H5/H2/ T-CH ₃	H1'	H2'	H2''	N3H/N1H	NH ₂ (b)	NH ₂ (nb)
C1	7.64 (+0.04)	5.88 (+0.00)	5.70 (-0.02)	1.92(-0.02)	2.38 (-0.01)			
G2	7.96 (+0.04)		5.87 (-0.01)	2.64 (+0.03)	2.69 (+0.01)	13.04(+0.02)		
C3	7.34 (+0.09)	5.45 (+0.10)	5.58 (+0.02)	1.86 (+0.04)	2.28 (+0.02)		8.40(-0.01)	6.48(+0.06)
G4	7.89 (+0.06)		5.44 (+0.03)	2.67 (+0.04)	2.75 (0.00)	12.71 (-0.03)		
A5	8.13 (+0.04)	7.26 (+0.05)	6.00 (+0.03)	2.57 (-0.02)	2.95 (+0.05)			
A6	8.13 (+0.04)	7.66 (+0.06)	6.16 (+0.03)	2.71 (+0.04)	2.93(+0.03)			
T7	7.12 (+0.03)	1.28 (+0.02)	5.91 (+0.03)	1.99 (+0.05)	2.56 (+0.03)	13.68(+0.03)		
T8	7.39 (+0.04)	1.54 (+0.03)	6.11 (+0.03)	2.18 (+0.03)	2.58 (+0.05)	13.82(+0.04)		
C9	7.47 (+0.03)	5.65(+0.05)	5.67 (+0.02)	2.07 (+0.03)	2.41 (+0.01)		8.43(+0.03)	6.86(+0.06)
G10	7.93 (+0.04)		5.86 (+0.04)	2.60 (+0.02)	2.68 (+0.01)	12.91(0.00)		
C11	7.33 (+0.01)	5.39(-0.03)	5.75 (+0.03)	1.88 (+0.01)	2.32 (+0.02)		8.46(+0.09)	6.63(+0.08)
G12	7.98 (+0.06)		6.11(-0.02)	2.37 (+0.01)	2.61 (+0.01)			

Από την άλλη πλευρά η μετατόπιση των σημάτων των πρωτονίων του συμπλόκου Λ-1 κατά την τιτλοδότηση του $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ σε ένα εύρος Δδ 0.01- 0.11 ppm, υποδεικνύει μία μάλλον ασθενή αλληλεπίδραση με το ολιγονουκλεοτίδιο. Ενώ τα σήματα των αρωματικών πρωτονίων του bry, μετατοπίζονται οριακά 0,01 με 0,02 ppm, τα σήματα των πλευρικών αλειφατικών αλυσίδων των συζευγμένων Lys^1 και Lys^2 έχουν μια σημαντικότερη μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία. Η τιμή του Δδ αυξάνεται σχεδόν σταδιακά κατά μήκος της πλευρικής αλυσίδας της Lys^1 και της Lys^2 , με την υψηλότερη τιμή να παρατηρείται στο Ηε της Lys^1 (Δδ = 0,11 ppm) (πίν. 3.23). Οι παραπάνω παρατηρήσεις θα μπορούσαν να ερμηνευτούν στη βάση της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης των θετικά φορτισμένων τελικών άκρων των αμινομάδων της πλευρικής αλυσίδας λυσίνης με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του ολιγονουκλεοτιδίου, με τέτοιο προσανατολισμό, ώστε το σύμπλοκο ρουθηνίου-bry να βρίσκεται στραμμένο προς την αντίθετη πλευρά σε σχέση με την έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου.

Πίνακας 3.23. Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις 1H NMR (500 MHz) των πρωτονίων του συμπλόκου Λ-1 ύστερα από την προσθήκη του $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$, σε αναλογία 1:1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,0) στους 298 K σε H_2O/D_2O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο σύμπλοκο υπό τις ίδιες συνθήκες.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ Λ-1	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ	ΠΡΩΤΟΝΙΟ Λ-1	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ
bpyH3/H3'	8.53 (-0.02)	Lys ¹ Hα	4.81 (+0.03)
bpyH4/H4'	8.06 (-0.01)	Lys ¹ Hβ	1.86 (+0.07)
bpyH5/H5'	7.39 (-0.01)	Lys ¹ Hγ	1.49 (+0.07)
bpyH6/H6'	7.79 (-0.01)	Lys ¹ Hδ	1.72 (+0.08)
Mebpy-CH ₃	2.55 (+0.00)	Lys ¹ Hε	3.03 (+0.11)
MebpyH3	8.47 (-0.00)	Lys ² Hα	4.33 (+0.05)
MebpyH5	7.29 (+0.02)	Lys ² Hβ	1.87 (+0.09)
MebpyH6	7.62 (+0.01)	Lys ² Hγ	1.51 (+0.09)
MebpyH3'	8.83 (+0.00)	Lys ² Hδ	1.74 (+0.07)
MebpyH5'	7.60 (0.00)	Lys ² Hε	3.04 (+0.08)
MebpyH6'	7.99 (-0.00)	Lys ¹ NH	n.o.
GlyHα	3.96 (-0.02)	Lys ² NH	8.47 (+0.10)
		GlyNH	8.37 (-0.03)

Λίγες και ασθενείς σε ένταση διαμοριακές NOE crosspeaks παρατηρούνται μεταξύ των πρωτονίων της πλευρικής αλειφατικής αλυσίδας της Lys¹ και των πρωτονίων του νουκλεοτιδίου που βρίσκονται εντοπισμένες στην ελάσσονα αύλακα της έλικας (πίν. 3.23.). Πιο συγκεκριμένα εμφανίζονται στο φάσμα NOESY διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ του H β της Lys¹ και των πρωτονίων που δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου των εξωκυκλικών αμινομάδων -NH₂ της C11 και της C3, καθώς και του ίμινο πρωτονίου N1H της G10, η οποία είναι συμπληρωματική προς την C3. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν crosspeaks μεταξύ του H γ της Lys¹ με το H1' της G4 και της G2 (συμπληρωματική προς C11 και C9 αντίστοιχα). Αυτές οι παρατηρήσεις επιβεβαιώνουν την υπόθεση ότι το σύμπλοκο Λ-1 αλληλεπιδρά στα άκρα της αλληλουχίας μέσω της πλευρικής αλυσίδας της λυσίνης.

3.3.1.2. Αλληλεπιδράσεις του Λ-2 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂

Η προσθήκη στοιχειομετρικής ποσότητας του συμπλόκου Λ-2 στο ολιγονουκλεοτίδιο μας δίνει μικρές μετατοπίσεις στα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του. Τα N1-H των G2, G4, G10 και τα N3-H των T8, T7 με Δδ μετατοπίζονται κατά 0,01- 0,04 ppm (σχ. 3.37). Παρόμοιες αλλαγές παρατηρήθηκαν στις χημικές μετατοπίσεις για τα πρωτόνια N4-H (b και nb) των C3 και C9. Ωστόσο, τα N4-H (b και nb) των C11 και G2 και το G2N1-H, έχουν μετατοπιστεί σε χαμηλότερα πεδία κατά περίπου 0,09, 0,06 και 0,04 ppm, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι η έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου πιθανώς να διαταράσσεται από την έλικα Β-τύπου. Για τα μη ανταλλάξιμα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές, μια κατάσταση που πιθανώς να δηλώνει μια μη-ειδική δέσμευση του Λ-2 με το

ολιγονουκλεοτίδιο. Η μετατόπιση η οποία παρατηρήθηκε στα πρωτόνια H6 των C11 και C3 προς υψηλότερα πεδία κατά 0,05 και προς χαμηλότερα κατά 0,06 ppm αντίστοιχα, στηρίζει περισσότερο την υπόθεση μεταβολής στη δομή της έλικας κοντά στα άκρα της αλληλουχίας. Αναλυτικά οι μετατοπίσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 3.24. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ ύστερα την προσθήκη του συμπλόκου Λ-2, σε αναλογία 1: 1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH =7.0), στους 298 K, σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο υπό τις ίδιες συνθήκες.

	H8/H6	H5/H2/ T-CH ₃	H1'	H2'	H2''	N3H/N1H	NH ₂ (b)	NH ₂ (nb)
C1	7.62 (+0.02)	5.90 (+0.02)	5.72 (0.00)	1.93(-0.01)	2.39 (+0.00)			
G2	7.94 (+0.02)		5.86 (-0.02)	2.60 (-0.01)	2.68 (+0.00)	13.06(+0.04)		
C3	7.32 (+0.06)	5.39 (+0.04)	5.59 (+0.03)	1.84 (+0.02)	2.26 (+0.00)		8.39(-0.02)	6.46(+0.04)
G4	7.85 (+0.02)		5.44 (+0.03)	2.63 (+0.00)	2.74 (-0.01)	12.70(+0.02)		
A5	8.12 (+0.03)	7.24 (+0.03)	5.97 (0.00)	2.57 (-0.02)	2.89 (-0.01)			
A6	8.12 (+0.03)	7.62 (+0.02)	6.13 (0.00)	2.68 (+0.01)	2.91(+0.01)			
T7	7.11 (+0.02)	1.29 (+0.03)	5.86 (-0.02)	1.97 (+0.03)	2.54 (+0.01)	13.64 (-0.01)		
T8	7.37 (+0.02)	1.54 (+0.03)	6.09 (+0.01)	2.14 (-0.01)	2.51 (-0.02)	13.77 (-0.01)		
C9	7.46 (+0.02)	5.64(+0.04)	5.62 (-0.03)	2.02 (-0.02)	2.38 (-0.02)		8.42(-0.02)	6.84(+0.04)
G10	7.91 (+0.02)		5.83 (+0.01)	2.60 (-0.02)	2.67 (+0.00)	12.88 (-0.03)		
C11	7.26 (-0.05)	5.44(+0.02)	5.74 (+0.02)	1.88 (+0.01)	2.30 (+0.00)		8.46(+0.09)	6.61(+0.06)
G12	7.96 (+0.04)		6.11(-0.02)	2.34 (+0.02)	2.60 (-0.02)			

Μετατοπίσεις με μεικτό πρόσημο σε χαμηλότερα και σε υψηλότερα πεδία των αρωματικών πρωτονίων του Λ-2 παρατηρήθηκαν κατά την αλληλεπίδραση του με το ολιγονουκλεοτίδιο. Ειδικότερα σε αναλογία 1:1 τα πρωτόνια του hpy και του Mebpy μετατοπίζονται οριακά (Δδ = 0,01-0,04 ppm), δείχνοντας ότι αυτό το τμήμα του συμπλόκου δεν συμμετέχει πρακτικά στην αλληλεπίδραση με το ολιγονουκλεοτίδιο. Μικρές μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία παρατηρούνται για τον πεπτιδικό σκελετό του συμπλόκου, καθώς και για τα περισσότερα από τα πρωτόνια των αλειφατικών πλευρικών αλυσίδων των δύο λυσινών. Είναι αξιοσημείωτο ότι οι μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία αυξάνονται κοντά στο

He που βρίσκεται πλησίον της αμινομάδας της πλευρικής αλυσίδας της Lys¹ ($\Delta\delta = 0,07$ ppm) και της Lys² ($\Delta\delta = 0,06$ ppm) (πίν. 3.25). Έτσι φαίνεται ότι η θετικά φορτισμένες αμινομάδες αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις φωσφορικές ομάδες του ολιγονουκλεοτιδίου, πιθανώς μεταξύ των βάσεων C9 και G10. Γενικά, οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις όπως οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι αδύναμες και δεν δίνουν σήματα NOE. Μόνο μία, αδύναμης έντασης crosspeak, εμφανίζεται μεταξύ του He της Lys¹ και του H2 της A6.

Πίνακας 3.25. Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR (500 MHz) των πρωτονίων του συμπλόκου Λ-2 ύστερα από την προσθήκη του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂, σε αναλογία 1:1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,0) στους 298 K σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο σύμπλοκο υπό τις ίδιες συνθήκες.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ Λ-2	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ	ΠΡΩΤΟΝΙΟ Λ-2	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ
bpyH3/H3'	8.51 (-0.04)	Lys ¹ Hα	4.51 (+0.02)
bpyH4/H4'	8.04 (-0.02)	Lys ¹ Hβ	1.94 (+0.03)
bpyH5/H5'	7.38 (-0.01)	Lys ¹ Hγ	1.52 (+0.03)
bpyH6/H6'	7.75 (-0.01)	Lys ¹ Hδ	1.72 (+0.03)
Mebpy-CH ₃	2.53 (+0.03)	Lys ¹ Hε	3.03 (+0.07)
MebpyH3	8.47 (-0.01)	Lys ² Hα	4.29 (+0.03)
MebpyH5	7.28 (+0.01)	Lys ² Hβ	1.81 (+0.03)
MebpyH6	7.68 (+0.01)	Lys ² Hγ	1.36 (+0.04)
MebpyH3'	8.83 (+0.01)	Lys ² Hδ	1.58 (+0.02)
MebpyH5'	7.60 (-0.02)	Lys ² Hε	2.92 (+0.06)
MebpyH6'	7.98 (-0.02)	Lys ¹ NH	n.o
GlyHα	4.00 (+0.06)	Lys ² NH	8.33 (+0.03)
		GlyNH	n.o

3.3.1.3. Αλληλεπιδράσεις του Λ-3 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂

Κατά την τιτλοδότηση του ολιγονουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο Λ-3, παρατηρούνται χημικές μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία κατά 0.06 ppm των σημάτων των ιμινο πρωτονίων, των βάσεων G2 και G4. Αντίθετα, παρατηρήθηκαν ασήμαντου μεγέθους μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία για

τα ίμινο πρωτόνια των βάσεων T8 και T7. Στην αναλογία ολιγονουκλεοτιδίου συμπλόκου 1:1 τα σήματα των πρωτονίων N1-H των βάσεων G2, G4 και G10 εμφανίζουν διπλές κορυφές ($\Delta\delta = 6-7$ Hz), ενώ η κορυφές των σημάτων N3-H των θυμίνων T7 και T8 παρουσιάζουν διαπλάτυνση του σήματος τους κατά 6-7 Hz (σχ. 3.37). Επιπλέον, τα σήματα των πρωτονίων που δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου (N4-H) των βάσεων C3, C9 και C11 μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία ($\Delta\delta = 0,05-0,07$ ppm) (πίν. 3.26). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι το πρωτόνιο N4-H της C11 που συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου μετατοπίζεται επίσης σε χαμηλότερα πεδία κατά περίπου 0,1 ppm. Συμπερασματικά η σχάση των σημάτων των πρωτονίων N1-H των γουανινών, σε συνδιασμό με τις μετατοπίσεις των πρωτονίων N4-H των κυτιδινών, δείχνουν σημαντική αλλαγή στη δομή της έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου [126, 127]. Συνήθως, οι μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία των ίμινο πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου σχετίζονται με μόρια που συνδέονται στις αύλακες της διπλής έλικας [128, 129]. Η διερεύνηση των αλλαγών στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου τα οποία βρίσκονται στην μικρή αύλακα του DNA (H1', H2'' και A5 ή A6H2), δείχνει ότι μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία περισσότερο εκείνα που ανήκουν στις βάσεις G και C παρά στις βάσεις A και T. Πιο συγκεκριμένα το πρωτόνιο H1' των κυτοσινών C1, C3 και C11 μετατοπίζεται περίπου 0,05 ppm, και το πρωτόνιο C11H2'' μετατοπίζεται κατά 0,06 ppm προς χαμηλότερα πεδία. Μικρότερες αλλαγές της τάξης των 0,02 ppm περίπου παρατηρούνται για H2' πρωτόνια των ίδιων βάσεων, που βρίσκονται στην μεγάλη αύλακα του ολιγονουκλεοτιδίου. Τα περισσότερα σήματα των αρωματικών πρωτονίων H8/H6 μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία, υποδεικνύοντας μια μερική απώλεια της συσώρευσης των αρωματικών δακτυλίων των βάσεων. Ωστόσο, εξαίρεση αποτελεί το σήμα του πρωτονίου H6 της C11, το οποίο μετατοπίζεται κατά 0,05 ppm προς υψηλότερα πεδία, δείχνοντας μία αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας πάνω από το αρωματικό

σύστημα της βάσης. Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.26 που ακολουθεί.

Πίνακας 3.26. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ ύστερα την προσθήκη του συμπλόκου Λ-3, σε αναλογία 1: 1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH =7.0), στους 298 K, σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο υπό τις ίδιες συνθήκες.

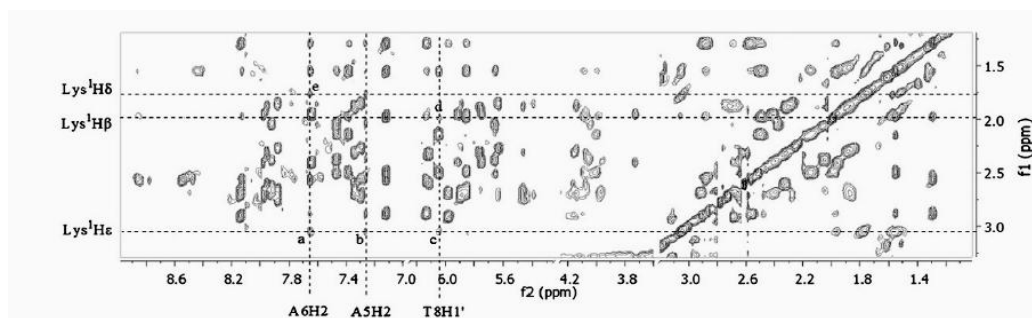
	H8/H6	H5/H2/ T-CH ₃	H1'	H2'	H2''	N3H/N1H	NH ₂ (b)	NH ₂ (nb)
C1	7.64 (+0.04)	5.94 (+0.06)	5.77 (+0.05)	1.91(+0.03)	2.39 (+0.00)			
G2	7.95 (+0.03)		5.91 (+0.03)	2.60 (-0.01)	2.66 (+0.02)	13.08 (+0.06)		
C3	7.29 (+0.04)	5.38 (+0.03)	5.60 (+0.04)	1.82 (+0.00)	2.24 (+0.02)		8.41(+0.00)	6.47(+0.05)
G4	7.87 (+0.04)			2.63 (+0.00)	2.71 (-0.04)	12.74 (+0.06)		
A5	8.13 (+0.02)	7.25 (+0.04)	5.97 (+0.00)	2.61 (+0.02)	2.89 (-0.01)			
A6	8.13 (+0.02)	7.63 (+0.03)	6.11(+0.02)	2.69 (+0.02)	2.91(+0.01)			
T7	7.11 (+0.02)	1.28 (+0.02)	5.89 (+0.01)	1.97 (+0.03)	2.49 (-0.04)	13.64 (-0.01)		
T8	7.38 (+0.03)	1.54 (+0.03)	6.04 (+0.02)	2.14 (-0.01)	2.50 (-0.03)	13.76 (-0.02)		
C9	7.45 (+0.01)	5.63(+0.03)	5.66 (+0.01)	2.03 (-0.01)	2.41 (+0.01)		8.44(+0.04)	6.87(+0.07)
G10	7.91 (+0.02)		5.84 (+0.02)	2.60 (-0.02)	2.68 (+0.01)	12.91 (+0.00)		
C11	7.26 (-0.05)	5.45(+0.03)	5.77 (+0.05)	1.91(+0.04)	2.36 (+0.06)		8.47(+0.10)	6.61(+0.06)
G12	7.96 (+0.05)		6.11(+0.02)	2.34 (+0.02)	2.59 (-0.03)			

Σημαντικές είναι και οι μεταβολές που παρατηρούνται στα πρωτόνια του συμπλόκου Λ-3. Όλα τα σήματα των πρωτονίων του συμπλόκου Λ-3 μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία. Ειδικότερα, τα αρωματικά πρωτόνια που βρίσκονται στις δυο bry δείχνουν να επηρεάζονται λιγότερο με Δδ από 0,01 μέχρι 0,05 σε σχέση με εκείνα Me-bry όπου παρουσιάζουν μεγαλύτερες μετατοπίσεις (Δδ = 0,09 - 0,14 ppm). Τα σήματα των πρωτονίων του πεπτιδίου μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία, με υψηλότερες τιμές Δδ περίπου 0.10 ppm να παρατηρούνται για τα αλειφατικά πρωτόνια της πλευρικής αλυσίδας των δύο καταλοίπων λυσίνης. Συνδυάζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι το σύμπλοκο Λ-3 αλληλεπιδρά με την έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου μέσω του Mebry και των αλειφατικών πλευρικών αλυσίδων των δύο λυσινών (πίν. 3.27).

Πίνακας 3.27. Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR (500 MHz) των πρωτονίων του συμπλόκου Λ-3 ύστερα από την προσθήκη του $\text{d}(5'\text{-CGCGAATTCGCG-3}')_2$, σε αναλογία 1:1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,0) στους 298 K σε $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο σύμπλοκο υπό τις ίδιες συνθήκες.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ Λ-3	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ	ΠΡΩΤΟΝΙΟ Λ-3	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ
bpyH3/H3'	8.52 (+0.03)	Lys¹Hα	4.48 (+0.01)
bpyH4/H4'	8.05 (+0.04)	Lys¹Hβ	1.96 (+0.09)
bpyH5/H5'	7.38 (+0.05)	Lys¹Hγ	1.57 (+0.12)
bpyH6/H6'	7.73 (+0.00)	Lys¹Hδ	1.78 (+0.12)
Mebpy-CH₃	2.57 (+0.09)	Lys¹Hϵ	3.06 (+0.12)
MebpyH3	8.54 (+0.14)	Lys²Hα	4.35 (+0.05)
MebpyH5	7.33 (+0.11)	Lys²Hβ	1.88 (+0.11)
MebpyH6	7.69 (+0.11)	Lys²Hγ	1.52 (+0.11)
MebpyH3'	8.87 (+0.13)	Lys²Hδ	1.75 (+0.10)
MebpyH5'	7.69 (+0.11)	Lys²Hϵ	3.04 (+0.10)
MebpyH6'	8.02 (+0.12)	Lys¹NH	8.88 (+0.04)
GlyHα	3.78 ()	Lys²NH	n.o.
		GlyNH	8.14 (+0.03)

Επίσης παρατηρήθηκαν διαμοριακές NOE crosspeaks μεταξύ πλευρικής αλειφατικής αλυσίδας της Lys¹ και των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου που βρίσκονται στην ελάσσονα άυλακα, όπως τα πρωτόνια T8H1', A6 και A5H2 (σχ. 3.38). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την υπόθεση, ότι οι αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις οφείλονται στην αλληλεπίδραση του συμπλόκου Λ-3 με την μικρή άυλακα του ολιγονουκλεοτιδίου.



Σχήμα 3.38. Μέρος του NOESY φάσματος του συμπλόκου Λ-3 με το ολιγονουκλεοτίδιο $\text{d}(5'\text{-CGCGAATTCGCG-3}')_2$ (500 MHz, 298 K, 50 mM φωσφορικά, $\text{H}_2\text{O} / \text{D}_2\text{O}$ 9/1), που δείχνει τα crosspeaks μεταξύ των πρωτονίων της αλειφατικής πλευρικής αλυσίδας της Lys¹ και των πρωτονίων της μικρής άυλακας του ολιγονουκλεοτιδίου (a) Lys¹H ϵ -A6H2 (b) Lys¹H ϵ -A5H2 (c) Lys¹H ϵ -T8H1' (d) Lys¹H β -T8H1' (e) Lys¹H δ -A5H2.

Πίνακας 3.28. Διαμοριακές NOE (500 ΜΗζ) crosspeaks μεταξύ των πρωτονίων των συμπλόκων Δ-1, Δ-2, Δ-3 και των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ σε H₂O/D₂O 9/1, σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM φωσφορικών στους 298 K και αναλογία 1:1.

Complex	NOE cross peak	Complex	NOE cross peak
Δ-1	Lys ¹ Hβ-C11NH ₂ (n.b.)	Δ-1	Lys ¹ Hγ-G4H1'
	Lys ¹ Hβ-C3NH ₂ (n.b.)		
	Lys ¹ Hβ-G10N1H		
	Lys ² Hβ-A6H ₂		
	Lys ¹ Hγ-G4H1'		
	Lys ¹ Hγ-G2H1'		
	Lys ² Hε-A5H ₂		
	Lys ² Hε-A6H ₂		
	Lys ² Hε-T7N3H		
	Lys ¹ Hε-A6H ₂		
Δ-2		Δ-2	Lys ¹ Hγ-G4H1'
			Lys ¹ Hγ-T8 H1'
Δ-3	Lys ¹ Hβ-T8H1'	Δ-3	
	Lys ¹ Hε-T8H1'		
	Lys ¹ Hε-A5H ₂		
	Lys ² Hε-A5H ₂		
	Lys ¹ Hε-A6H ₂		
	Lys ¹ Hδ-A6H ₂		

3.3.2 Αλληλεπιδράσεις των Δ- συμπλόκων με το ολιγονουκλεοτίδιο d(3'-CGCGAATTCGCG-5')₂

3.3.2.1. Αλληλεπιδράσεις του Δ-1 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂

Η τιτλοδότηση του ολιγονουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο Δ-1 επηρεάζει τα σήματα συντονισμού ¹H NMR τόσο του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ όσο και το του συμπλόκου. Στην περιοχή των ίμινο πρωτονίων του φάσματος, παρατηρήθηκαν σημαντικές μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία για τα N3-H των T8 και T7 με Δδ = 0,05 και 0,08 ppm αντιστοίχως. Παρόμοιες μετατοπίσεις προς χαμηλότερα πεδία παρατηρούνται για τα πρωτόνια των εξωκυκλικών αμινομάδων N4-H των κυτοσινών C3, C9 και C11 (Δδ = 0,09, 0,06 και 0,06 ppm, αντιστοίχως) τα οποία δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου. Επιπλέον, το πρωτόνιο N4-H της C11 που συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου μετατοπίζεται σε χαμηλότερα πεδία κατά 0.07 ppm. Τα σήματα των πρωτονίων που βρίσκονται

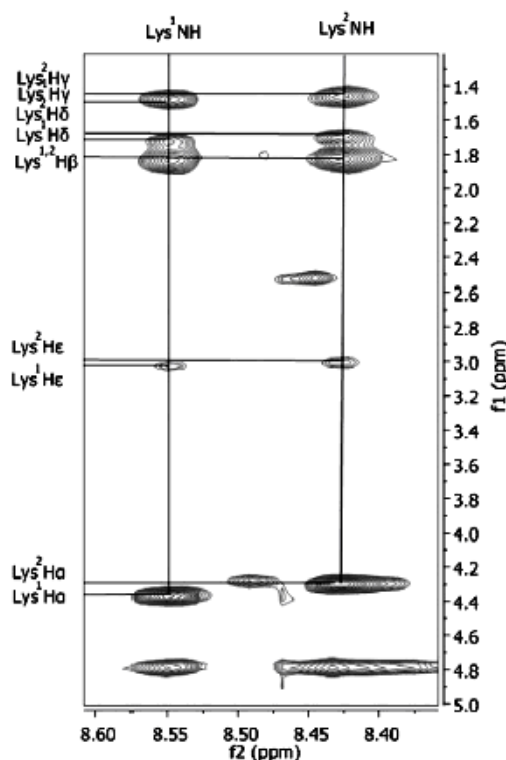
είτε στη μικρή είτε στη μεγάλη αύλακα της έλικας μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία στην κλίμακα από 0,01 έως 0,09 ppm, με τις υψηλότερες τιμές να παρατηρούνται για τα πρωτόνια που βρίσκονται στο κέντρο της αλληλουχίας. Καθώς οι τιμές των μετατοπίσεων αυτών είναι αναλόγου μεγέθους τόσο για την κύρια όσο και για τη δευτερεύουσα αύλακα δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για το σημείο της έλικας με το οποίο αλληλεπιδρά το σύμπλοκο.

Πίνακας 3.29. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGC-3')₂ ύστερα την προσθήκη του συμπλόκου Δ-1, σε αναλογία 1: 1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH =7.0), στους 298 K, σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο υπό τις ίδιες συνθήκες.

	H8/H6	H5/H2/ T-CH ₃	H1'	H2'	H2''	N3H/N1H	NH ₂ (b)	NH ₂ (nb)
C1	7.63 (+0.03)	5.89 (+0.01)	5.70 (-0.02)	1.91(-0.03)	2.39 (+0.00)			
G2	7.96 (+0.04)		5.85 (-0.03)	2.65 (+0.04)	2.66 (-0.02)	13.06 (+0.04)		
C3	7.30 (+0.05)	5.38 (+0.03)	5.55 (-0.01)	1.83 (+0.01)	2.26 (+0.00)		8.38(-0.03)	6.51(+0.09)
G4	7.90 (+0.07)			2.67 (+0.04)	2.77 (+0.02)	12.68 (+0.00)		
A5	8.16 (+0.07)	7.16 (-0.05)	5.99 (+0.02)	2.57 (-0.02)	2.94 (+0.04)			
A6	8.16 (+0.07)	7.63 (+0.03)	6.16(+0.03)	2.76 (+0.09)	2.95(+0.05)			
T7	7.17 (+0.08)	1.27 (+0.01)	5.89 (+0.01)	2.02 (+0.08)	2.58 (+0.05)	13.70 (+0.05)		
T8	7.41 (+0.06)	1.54 (+0.03)	6.11 (+0.03)	2.18 (+0.03)		13.86 (+0.08)		
C9	7.47 (+0.03)	5.65(+0.05)	5.70 (+0.05)	2.06 (+0.02)	2.42 (+0.02)		8.40(+0.00)	6.86(+0.06)
G10	7.93 (+0.04)		5.83 (+0.01)	2.65 (+0.03)	2.66 (-0.01)	12.90 (-0.01)		
C11	7.34 (+0.03)	5.45(+0.03)	5.72 (+0.00)	1.91(+0.04)	2.37 (+0.07)		8.45(+0.07)	6.61(+0.06)
G12	7.95 (+0.03)		6.12(-0.01)	2.35 (-0.01)	2.60 (-0.02)			

Κατά την διάρκεια της τιτλοδότησης του συμπλόκου Δ-1 με το ολιγονουκλεοτίδιο, τα πρωτόνια του συμπλόκου Δ-1 μετατοπίζονται σε ένα εύρος τιμών από 0,01 έως 0,13 ppm, δείχνοντας μία ασθενή μάλλον αλληλεπίδραση μεταξύ του συμπλόκου και της διπλής έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου. Τα σήματα των αρωματικών πρωτονίων του bry μετατοπίζονται σε υψηλότερα πεδία από 0,01 εως 0,05 ppm, ενώ η πλειοψηφία των σημάτων του συζευγμένου πεπτιδίου μετατοπίζεται σε χαμηλότερα πεδία. Τα πρωτόνια Gly-CH_α, καθώς και πλευρικές αλειφατικές αλυσίδες των Lys¹ και

Lys² μετατοπίζονται σημαντικά σε χαμηλότερα πεδία κατά 0,07 ppm περίπου, με τις τιμές Δδ να αυξάνονται σταδιακά κατά μήκος πλευρικών αλυσίδων από τα Lys¹He και Lys²He (πίν. 3.30) (σχ. 3.39).



Σχήμα 3.39. Τμήμα του φάσματος ¹H-¹H TOCSY του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ και του συμπλόκου Δ-1 σε αναλογία 1:1 (500 MHz, ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM φωσφορικών στους 298 K, H₂O / D₂O 9/1) που δείχνει το σύστημα spin συζεύξεων της Lys¹-Lys².

Οι παραπάνω παρατηρήσεις μας δείχνουν ότι οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες των δύο πλευρικών αλυσίδων των λυσινών αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του ολιγονουκλεοτιδίου. Επιπλέον, παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές προς υψηλότερα πεδία για τους υποκατάστατες bγ, δείχνοντας ότι ενδεχομένως να συμβάλλουν στον τρόπο που αλληλεπιδρά το σύμπλοκο με το ολιγονουκλεοτίδιο. Μόνο μία διαμοριακή NOE crosspeak, ασθενούς έντασης, παρατηρείται μεταξύ του πρωτονίου Lys¹Hγ και του H1' της G4, που βρίσκεται

στην ελάσσονα αύλακα της έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου, (πίν. 3.28) επιβεβαιώνοντας μη ειδική πρόσδεση του Δ-1 στο ολιγονουκλεοτίδιο.

Πίνακας 3.30. Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR (500 MHz) των πρωτονίων του συμπλόκου Δ-1 ύστερα από την προσθήκη του $\text{d}(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')$, σε αναλογία 1:1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,0) στους 298 K σε $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο σύμπλοκο υπό τις ίδιες συνθήκες.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ Δ-1	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ	ΠΡΩΤΟΝΙΟ Δ-1	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ
bpyH3/H3'	8.49 (-0.05)	Lys ¹ H α	4.37 (+0.08)
bpyH4/H4'	8.02 (-0.02)	Lys ¹ H β	1.84 (-0.05)
bpyH5/H5'	7.36 (-0.01)	Lys ¹ H γ	1.48 (+0.02)
bpyH6/H6'	7.77 (-0.01)	Lys ¹ H δ	1.73 (+0.06)
Mebpy-CH ₃	2.52 (-0.01)	Lys ¹ H ϵ	3.03 (+0.09)
MebpyH3	8.45 (-0.05)	Lys ² H α	4.30 (+0.05)
MebpyH5	7.27 (+0.00)	Lys ² H β	1.83 (+0.06)
MebpyH6	7.60 (-0.03)	Lys ² H γ	1.47 (+0.13)
MebpyH3'	8.81 (-0.04)	Lys ² H δ	1.70 (+0.09)
MebpyH5'	7.65 (+0.02)	Lys ² H ϵ	3.01 (+0.13)
MebpyH6'	7.97 (-0.02)	Lys ¹ NH	8.55 (+0.03)
GlyH α	4.21 (+0.06)	Lys ² NH	8.43 (+0.03)
		GlyNH	9.27 (-0.02)

Η τιτλοδότηση του ολιγονουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο Δ-2 ακολουθείται από σημαντικές μεταβολές των σημάτων ^1H NMR τόσο για το ολιγονουκλεοτίδιο όσο και για το σύμπλοκο Δ-2. Στην ίμινο περιοχή του φάσματος παρατηρήθηκαν μετατοπίσεις σε υψηλότερα πεδία των πρωτονίων N3-H των θυμινών T8 και T7 ($\Delta\delta = 0,07$ και $0,12$ ppm, αντίστοιχα), υποδεικνύοντας αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στα πρωτόνια N3-H των θυμινών που μπορεί να οφείλεται σε επιμήκυνση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις A και τις T. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, τα πρωτόνια N4-H των C3, C9 και C11 που δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία κατά περίπου $\Delta\delta = 0,08$, $0,10$ και $0,09$ ppm αντίστοιχα, (πίν. 3.31). Λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος και το πρόσημο των μετατοπίσεων και, θεωρώντας ότι τα πρωτόνια που δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου βρίσκονται εξωτερικά της έλικας, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα πρωτόνια αυτά μπορεί να εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου με το σύμπλοκο Δ-2 [130].

Από την άλλη πλευρά, τα σήματα των πρωτονίων των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου H8/H6, μετατοπίζονται σε χαμηλότερα πεδία με ένα εύρος από 0,01 μέχρι 0,07 ppm, με την υψηλότερη τιμή να παρατηρείται για τα H8 των G4, A5 και A6, υποδεικνύοντας μία εξασθένιση της συσώρευσης μεταξύ των βάσεων που βρίσκονται στο κεντρικό τμήμα του ολιγονουκλεοτιδίου. Τα σήματα των πρωτονίων που βρίσκονται στην μικρή αύλακα της έλικας (H1', H2'' και A5 ή A6H2) μετατοπίζονται σε υψηλότερα αλλά και χαμηλότερα πεδία. Ωστόσο, τα σήματα των πρωτονίων A5H2, T8H1' και T8H2'' παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες μετατοπίσεις σε υψηλότερα πεδία μεταξύ των πρωτονίων της μικρής αύλακας (0,08, 0,09 και 0,09 ppm, αντίστοιχα) παρουσιάζοντας αύξηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας κοντά στο ζεύγος βάσεων A5T8. Μετατοπίσεις μεικτού πρόσημου παρατηρήθηκαν επίσης και για τα πρωτόνια, H2' της μεγάλης αύλακας, υποδεικνύοντας μία σημαντική αλλαγή στην δομή της έλικας. Αξιοσημείωτη είναι η μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία του πρωτονίου A5H2' κατά 0,09 ppm που ακολουθείται μια από μετατόπιση σε υψηλότερα πεδία κατά 0,10 ppm του γειτονικού πρωτονίου, A6H2'. Ακόμη, σημαντικές είναι οι μεταβολές των σημάτων των πρωτονίων του σακχάρου, που σημαίνει, μία μετατροπή από *anti* σε *syn* προσανατολισμό του υπολοίπου τμήματος των σακχάρων των A5 και A6. Η αλλαγή αυτή στο προσανατολισμό του σακχάρου συνεπάγεται σημαντικές αλλαγές στην διαμόρφωση της έλικας B-τύπου του ολιγονουκλεοτιδίου [124].

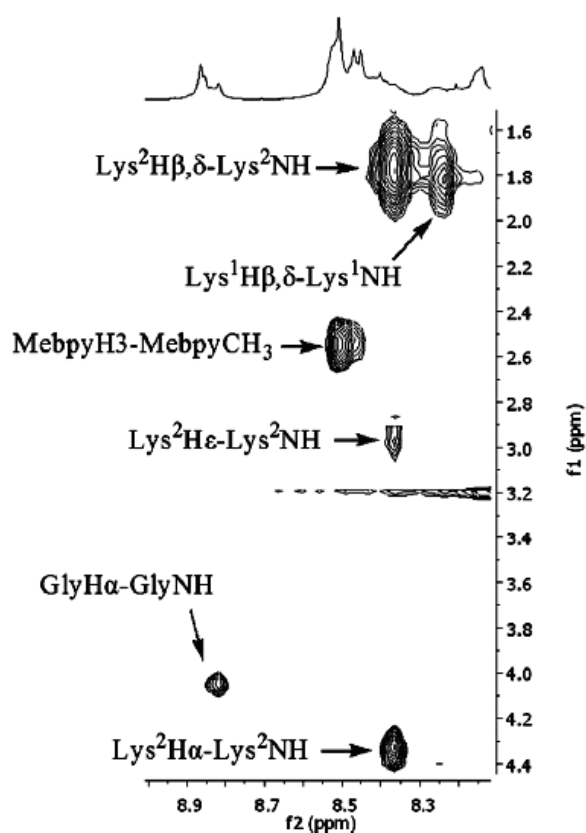
Πίνακας 3.31. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂, ύστερα την προσθήκη του συμπλόκου Δ-2, σε αναλογία 1: 1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH =7.0), στους 298 K, σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο υπό τις ίδιες συνθήκες.

	H8/H6	H5/H2/ T-CH ₃	H1'	H2'	H2''	N3H/N1H	NH ₂ (b)	NH ₂ (nb)
C1	7.62 (+0.02)	5.90 (+0.02)	5.71 (-0.01)	1.90(-0.04)	2.40 (+0.01)			
G2	7.96 (+0.04)		5.86 (-0.02)	2.70 (+0.09)	2.71 (+0.03)	13.06 (+0.04)		
C3	7.28 (+0.03)	5.41 (+0.06)	5.63 (+0.07)	1.85 (+0.03)	2.27 (+0.01)		8.41(-0.00)	6.50(+0.08)
G4	7.90 (+0.07)		5.46 (+0.05)	2.67 (+0.04)	2.74 (+0.01)	12.73 (+0.05)		
A5	8.16 (+0.07)	7.13 (-0.08)	5.95 (-0.02)	2.68 (+0.09)	2.90 (+0.00)			
A6	8.15 (+0.06)	7.63 (+0.03)	6.12(-0.01)	2.57 (-0.10)	2.88(-0.02)			
T7	7.13 (+0.04)	1.31 (+0.05)	5.82 (-0.06)	1.96 (+0.02)	2.44 (-0.09)	13.58 (-0.07)		
T8	7.36 (+0.01)	1.56 (+0.05)	5.99 (-0.09)	2.10 (-0.05)	2.44 (-0.09)	13.66 (-0.12)		
C9	7.45 (+0.01)	5.66(+0.06)	5.64 (-0.01)	2.04 (+0.00)	2.36(-0.04)		8.44(+0.04)	6.90(+0.10)
G10	7.90 (+0.01)		5.84 (+0.02)	2.65 (+0.03)	2.66 (-0.01)	12.93 (+0.02)		
C11	7.33 (+0.02)	5.46(+0.04)	5.71 (-0.01)	1.91(+0.04)	2.27 (-0.03)		8.47(+0.10)	6.64(+0.09)
G12	7.96 (+0.04)		6.02(-0.11)	2.23 (-0.13)	2.56 (-0.06)			

3.3.2.2. Αλληλεπιδράσεις του Δ-2 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂

Κατά την τιτλοδότηση του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂, τα σήματα των πρωτονίων του συμπλόκου Δ-2 μετατοπίζονται δείχνοντας ότι το σύμπλοκο Δ-2 αλληλεπιδρά με την διπλή έλικα. Τα σήματα των πρωτονίων του bry μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία (Δδ = 0.03- 0.09 ppm), με το σήματα των πρωτονίων H3/H3' να μετατοπίζονται περίπου κατά 0,09 ppm (πίν. 3.32). Οι τιμές αυτές είναι σύμφωνες με παρόμοιες τιμές που παρατηρήθηκαν για τα μόρια που αλληλεπιδρούν με τις αύλακες του DNA [131]. Περνώντας τώρα στα σήματα των πρωτονίων του συζευγμένου πεπτιδίου, παρατηρούμε ότι τα περισσότερα μετατοπίζονται ελαφρώς προς χαμηλότερα πεδία κατά περίπου 0,03 ppm, με εξαίρεση τα πρωτόνια των Gly- CHα και Gly-NH το οποία μετατοπίζονται πολύ περισσότερο προς χαμηλότερα πεδία κατά 0,19 και 0,74 ppm, αντιστοίχως (σχ. 3.40). Μια τέτοια μεγάλη μεταβολή στην μετατόπιση των πρωτονίων σε χαμηλότερα πεδία παρατηρείται μόνο σε

περιπτώσεις όπου ένα πεπτιδικό πρωτόνιο NH εμπλέκεται σε δεσμό υδρογόνου με μια ομάδα καρβονυλίου [42, 132]. Ακόμα κι αν ένας τέτοιου τύπου δεσμός υδρογόνου αναμένεται να φέρει πιο κοντά στο ολιγονουκλεοτίδιο το σύμπλοκο Δ-2, μόνο λίγες διαμοριακές NOE crosspeaks εμφανίζονται μεταξύ του πρωτονίου της Lys¹Hγ και του H1' της G4 καθώς και με το H1' της T8, δείχνοντας είτε διάχυση των σημάτων NOE λόγω των διάφορων και πολλών συναφών τρόπων δέσμευσης είτε γρήγορη ισορροπία ανάμεσα στις δεσμευμένη μορφή και την ελεύθερη .



Σχήμα 3.40. Αλειφατική-αρωματική περιοχή του φάσματος ¹H-¹H TOCSY (στα 500MHz, σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM φωσφορικών στους 298 K και, H₂O/D₂O 9/1) του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ και του συμπλόκου Δ-2, σε αναλογία 1:1, που δείχνει τις crosspeaks μεταξύ του πρωτονίου Gly-NH και του πρωτονίου GlyHa (8,81 και 4,06 ppm), και των Lys²NH-Lys²Hα (8,36 και 4,32 ppm), Lys²NH-Lys²Hε (8,36 και 2,99 ppm) και Lys²NH-Lys²Hβ, (8,36 και 1,88 / 1,74 ppm)

Πίνακας 3.32. Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR (500 MHz) των πρωτονίων του συμπλόκου Δ-2 ύστερα από την προσθήκη του $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$, σε αναλογία 1:1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,0) στους 298 K σε $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο σύμπλοκο υπό τις ίδιες συνθήκες.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ Δ-2	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ	ΠΡΩΤΟΝΙΟ Δ-2	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ
bpyH3/H3'	8.47 (-0.09)	Lys¹Hα	4.52 (-0.04)
bpyH4/H4'	8.02 (-0.06)	Lys¹Hβ	1.98 (-0.00)
bpyH5/H5'	7.36 (-0.05)	Lys¹Hγ	1.57 (+0.02)
bpyH6/H6'	7.75 (-0.06)	Lys¹Hδ	1.76 (+0.00)
Mebpy-CH₃	2.54 (-0.03)	Lys¹Hϵ	3.04 (-0.00)
MebpyH3	8.50 (-0.01)	Lys²Hα	4.32 (+0.00)
MebpyH5	7.37 (+0.07)	Lys²Hβ	1.88 (+0.04)
MebpyH6	7.78 (+0.09)	Lys²Hγ	1.43 (+0.01)
MebpyH3'	8.85 (-0.00)	Lys²Hδ	1.74 (+0.09)
MebpyH5'	7.77 (+0.10)	Lys²Hϵ	2.99 (+0.02)
MebpyH6'	7.99 (-0.04)	Lys¹NH	n.o
GlyHα	4.06 (+0.19)	Lys²NH	8.36 (-0.02)
		GlyNH	8.81 (+0.74)

3.3.2.3. Αλληλεπιδράσεις του Δ-3 με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$

Οι αλλαγές που προκαλούνται στην ίμινο περιοχή του φάσματος ^1H NMR του $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$, ύστερα από την προσθήκη του συμπλόκου Δ-3, ήταν τελείως διαφορετικές από εκείνες που παρατηρήθηκαν στα σύμπλοκα που μελετήσαμε πριν. Σε αναλογία $r = 0.25$ τα σήματα των ίμινο πρωτονίων μειώθηκαν σε ένταση και διαπλατύνθηκαν, ενώ σε αναλογία 1: 1 τα σήματα εξαφανίστηκαν τελείως, αποκλείοντας τον προσδιορισμό των χημικών μετατοπίσεών τους. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν ισχυρές διασταυρούμενες κορυφές ανταλλαγής με τον διαλύτη στο φάσμα NOE του μίγματος. Στον Πίνακα 3.33 παρουσιάζονται όλες οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις του ολιγονουκλεοτιδίου, σε αναλογία $r = 0.25$. Έτσι στην αναλογία $r = 0.25$ στην ίμινο περιοχή, παρατηρήθηκαν μετατοπίσεις σε υψηλότερα πεδία για τα πρωτόνια N3-H των T8 και T7 ($\Delta\delta = 0,07$ και $0,08$ ppm αντίστοιχα), δείχνοντας μια μείωση

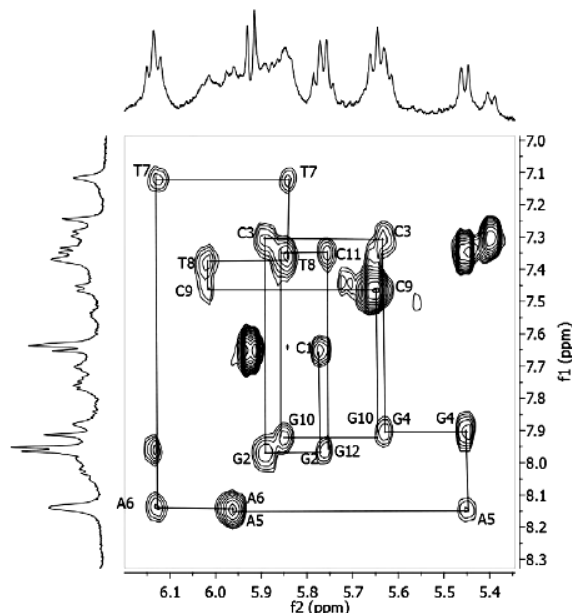
στο ποσοστό συμμετοχής τους στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των ζευγών βάσεων. Επιπλέον, οι εντάσεις των ενδομοριακών NOE μεταξύ της ανταλλάξιμων πρωτονίων μειώνονται, υποδεικνύοντας ότι οι δυο ολιγονουκλεοτιδικοί κλώνοι αρχίζουν να ανοίγουν. Ωστόσο, το άνοιγμα των κλώνων δεν επεκτείνεται κατά μήκος της έλικας, αλλά εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα της διπλής έλικας.

Πίνακας 3.33. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ ύστερα την προσθήκη του συμπλόκου Δ-3, σε αναλογία 1: 0,25 σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH =7.0), στους 298 K, σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο υπό τις ίδιες συνθήκες.

	H8/H6	H5/H2/ T-CH ₃	H1'	H2'	H2''	N3H/N1H	NH ₂ (b)	NH ₂ (nb)
C1	7.66 (+0.06)	5.93 (+0.05)	5.78 (+0.06)	1.96 (+0.02)	2.42 (+0.03)			
G2	7.96 (+0.04)		5.89 (+0.01)	2.69 (+0.08)	2.70 (+0.02)	13.06 (+0.04)		
C3	7.30 (+0.05)	5.40 (+0.05)	5.64 (+0.08)	1.86 (+0.04)	2.28 (+0.02)		8.39(-0.02)	6.47(+0.05)
G4	7.91 (+0.08)		5.45 (+0.04)	2.65 (+0.02)	2.73 (-0.02)	12.72 (+0.04)		
A5	8.14 (+0.05)	7.24 (+0.03)	5.97 (0.00)	2.70 (+0.11)	2.90 (+0.00)			
A6	8.14 (+0.05)	7.65 (+0.01)	6.14(+0.01)	2.62 (-0.05)	2.88(-0.02)			
T7	7.12 (+0.03)	1.30 (+0.04)	5.85 (-0.03)	1.97 (+0.03)	2.47 (-0.06)	13.58 (-0.07)		
T8	7.37 (+0.02)	1.58 (+0.07)	6.03 (-0.05)	2.13 (-0.02)	2.48 (-0.05)	13.70 (-0.08)		
C9	7.47 (+0.03)	5.66(+0.06)	5.64 (-0.01)	2.05 (+0.01)	2.37(-0.03)		8.44(+0.04)	6.86(+0.06)
G10	7.92 (+0.03)		5.85 (+0.03)	2.65 (+0.03)	2.66 (-0.01)	12.91 (+0.00)		
C11	7.35 (+0.04)	5.45(+0.03)	5.76 (+0.04)	1.90 (+0.03)	2.34 (+0.04)		8.46(+0.11)	6.59(+0.04)
G12	7.95 (+0.03)		6.14(+0.01)	2.34 (-0.02)	2.60 (-0.02)			

Επιπλέον, τα σήματα των πρωτονίων των βάσεων μετατοπίζονται προς χαμηλότερα πεδία περίπου κατά 0,05 ppm υποδεικνύοντας μείωση των αλληλεπιδράσεων συσώρευσης, εξαιτίας της διάσπασης των δεσμών υδρογόνου των απέναντι βάσεων. Τα σήματα των πρωτονίων (H1', H2'' και A5 ή A6H2) που βρίσκονται στην μικρή αύλακα του ολιγονουκλεοτιδίου έχουν μετατοπιστεί προς υψηλότερα πεδία (Δδ = 0.01-0.06) αλλά και προς χαμηλότερα πεδία (Δδ = 0.01-0.08), ενώ το σύνολο σχεδόν των πρωτονίων της μεγάλης αύλακας H2' μετατοπίστηκε σε χαμηλότερα πεδία σε ένα εύρος Δδ από 0.01 μέχρι 0.08 ppm. Παρά την διατάραξη της δομής της έλικας στην αναλογία 0,25

στο φάσμα NOESY, το ολιγονουκλεοτίδιο φαίνεται να διατηρεί την διπλή ελικοειδή μορφή του, πιθανώς λόγω μιας γρήγορης ισορροπίας μεταξύ της ανοικτής και κλειστής μορφής (σχ. 3.41).



Σχήμα 3.41. Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY (στα 500MHz, σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM φωσφορικών στους 298 K και, H₂O/D₂O 9/1) του συμπλόκου Δ-3 και ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂, που δείχνει την διαδοχική σύνδεση των βάσεων της αλληλουχίας με τις απέναντι τους σε δομή διπλής έλικας.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι αλλαγές αυτές εμφανίζονται σε αναλογία $r = 0,25$, θα πρέπει να θεωρηθεί, ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά πιο δραστικά με το ολιγονουκλεοτίδιο σε σχέση με τα προηγούμενα πέντε σύμπλοκα που μελετήθηκαν. Όταν η αναλογία γίνεται $r = 0,5$, τα σήματα των ίμινο πρωτονίων των ζευγών βάσεων AT εξαφανίζονται τελείως. Ενώ σε αναλογία 1:1 εξαφανίζονται εντελώς και τα σήματα των βάσεων G και C. Είναι γνωστό στη βιβλιογραφία ότι οι δεσμοί των ζευγών βάσεων των AT ανοίγουν ευκολότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ζεύγη βάσεων GC κατά την διαδικασία ανοίγματος της διπλής έλικας του DNA [54] από ένζυμα όπως η DNA ελικάση. Από την άλλη πλευρά, τα σήματα των πρωτονίων του συμπλόκου Δ-3 μετατοπίζονται κατά τη διάρκεια της τιτλοδότησης του και στην αναλογία $r = 1$, όπου τα

περισσότερα από τα σήματα των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου είναι διαπλατυσμένα, ενώ παρατηρείται μια αξιοσημείωτη μετατόπιση σε χαμηλότερα πεδία της τάξης των 0.50 ppm για τα ίμινο πρωτόνια των τριών πεπτιδικών δεσμών. Επιπλέον, μια επίσης αξιοσημείωτη μετατόπιση σε χαμηλότερα πεδία ($\Delta\delta = 0,19$ ppm) παρατηρείται για το GlyH α . Τα σήματα των αρωματικών πρωτονίων των bpy μετατοπίζονται ελαφρώς προς υψηλότερα πεδία ($\Delta\delta = 0,00 - 0,03$ ppm), ενώ τα σήματα του υποκαταστάτη Mebpy μετατοπίζεται προς χαμηλότερα πεδία, δείχνοντας μικρή συμμετοχή αυτού του τμήματος του συμπλόκου στην αλληλεπίδραση με το ολιγονουκλεοτίδιο. Τα περισσότερα από τα σήματα των αλειφατικών πρωτονίου των πλευρικών αλυσίδων των συζευγμένων λυσίνων μετατοπίζεται σε χαμηλότερα πεδία εκτός των πρωτονίων Lys¹H β και Lys²H β που μετατοπίστηκαν κατά -0,16 και 0,15 ppm, αντίστοιχα. Αντίθετα, τα τρία αμιδικά πρωτόνια (Lys¹NH, Lys²NH, GlyNH) μετατοπίστηκαν δραματικά προς χαμηλότερα πεδία περίπου κατά 0,5 ppm, δείχνοντας τη συμμετοχή και των τριών αμιδικών πρωτονίων σε δεσμούς υδρογόνου με το ολιγονουκλεοτίδιο (πίν. 3.34).

Πίνακας 3.34. Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR (500 MHz) των πρωτονίων του συμπλόκου Δ-3 ύστερα από την προσθήκη του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂, σε αναλογία 1:1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,0) στους 298 K σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο σύμπλοκο υπό τις ίδιες συνθήκες.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ Δ-3	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ	ΠΡΩΤΟΝΙΟ Δ-3	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ
bpyH3/H3'	8.56 (-0.01)	Lys ¹ H α	4.54 (-0.03)
bpyH4/H4'	8.10 (-0.00)	Lys ¹ H β	1.80 (-0.16)
bpyH5/H5'	7.39 (-0.03)	Lys ¹ H γ	1.60 (+0.05)
bpyH6/H6'	7.82 (+0.02)	Lys ¹ H δ	1.80 (+0.03)
Mebpy-CH ₃	2.54 (-0.05)	Lys ¹ H ϵ	3.07 (+0.03)
MebpyH3	8.49 (-0.02)	Lys ² H α	4.39 (+0.02)
MebpyH5	7.41 (+0.09)	Lys ² H β	1.92 (+0.15)
MebpyH6	7.80 (+0.13)	Lys ² H γ	1.54 (-0.04)
MebpyH3'	8.84 (+0.05)	Lys ² H δ	1.78 (+0.01)
MebpyH5'	7.70 (+0.03)	Lys ² H ϵ	3.09 (+0.12)
MebpyH6'	8.03 (-0.00)	Lys ¹ NH	9.29 (+0.49)
GlyH α	3.99 (+0.19)	Lys ² NH	8.90 (+0.51)
		GlyNH	8.67 (+0.54)

3.3.3 Συμπεράσματα από τις αλληλεπιδράσεις των Λ- και Δ- συμπλόκων με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂.

Οι αντιδράσεις των συμπλόκων Λ-1, Λ-2 και Λ-3 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ προκαλούν διαφορετικές αλλαγές τόσο στις χημικές μετατοπίσεις του ολιγονουκλεοτιδίου όσο και στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των συμπλόκων. Αυτό δείχνει ότι τα σύμπλοκα αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο σε κάθε περίπτωση. Θεωρώντας ότι η μόνη διαφορά μεταξύ των συμπλόκων του Λ-τύπου είναι η αλληλουχία των αμινοξέων στο συζευγμένο τριπεπτίδιο, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι οι παρατηρούμενες διαφορές προκύπτουν από το πεπτιδικό τμήμα των συμπλόκων. Ειδικότερα, το σύμπλοκο Λ-2 ([Ru(bpy)₂(4-COLys¹-Gly-Lys²CONH₂),4'-Mebpy)]Cl₂) αλληλεπιδρά μη ειδικώς με αποτέλεσμα να προκαλούνται τυχαίες οριακές αλλαγές τόσο για τα πρωτόνια του συμπλόκου όσο και για τα σήματα των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου. Στα σύμπλοκα Λ-1 ([Ru(bpy)₂(4-COGly-Lys¹-Lys²CONH₂),4'-Mebpy)]Cl₂) και Λ-3 ([Ru(bpy)₂(4-COLys¹-Lys²-Gly-CONH₂),4'-Mebpy)]Cl₂) η συνεχόμενη αλληλουχία Lys¹-Lys² δεν διαταράσσεται από το αμινοξύ Gly και η διαφορά τους προσδιορίζεται ως προς την απόσταση μεταξύ του μεταλλικού κέντρου του ρουθηνίου και του τμήματος -Lys¹-Lys². Έτσι στο σύμπλοκο Λ-1 το διπεπτίδιο Lys¹-Lys² βρίσκεται περισσότερο κοντά στο μεταλλικό κέντρο του ρουθηνίου, ενώ στο Λ-3 βρίσκεται μια γλυκίνη «μακρύτερα». Και τα δυο σύμπλοκα δεσμεύονται στο ολιγονουκλεοτίδιο μέσω των πλευρικών αλειφατικών αλυσίδων των λυσίνων, υποδεικνύοντας ότι οι πλευρικές αλυσίδες των διαδοχικών λυσινών δημιουργούν ένα είδος "δαγκάνας" ώστε να συνδεθεί το σύμπλοκο με το ολιγονουκλεοτίδιο. Επιπλέον, στην περίπτωση του συμπλόκου Λ-3 η αλληλεπίδραση του τμήματος Lys¹-Lys² η οποία συζευγνύεται απευθείας με τον υποκαταστάτη Mebpy, αναγκάζει το σύμπλοκο σε μια επιπλέον αλληλεπίδραση με την διπλή έλικα ολιγονουκλεοτιδίου.

Γενικά, τα σύμπλοκα του Δ τύπου αλληλεπιδρούν με τη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου με ένα διαφορετικό τρόπο από ό, τι τα αντίστοιχα Λ-σύμπλοκα επιβεβαιώνοντας την αρχή ότι οι Δ-τύπου τρις-χηλικές ενώσεις δεσμεύονται ισχυρότερα στην διπλή έλικα του DNA από τις αντίστοιχες Λ-. Ωστόσο, αυτό δεν είναι εμφανές για το σύμπλοκο Δ-1 στο οποίο εμφανίζεται να αλληλεπιδρά με τη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου μέσω των δύο πλευρικών αλυσίδων των λυσινών με παρόμοιο τρόπο όπως στο σύμπλοκο Λ-1. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό προκύπτει από τη γεωμετρία του συμπλόκου Δ-1, όπου η αλληλουχία του πεπτιδικού τμήματος -Lys¹Lys² βρίσκεται μακρύτερα από το μεταλλικό κέντρο και πιθανόν το φαινόμενο της "δαγκάνας" προτιμάται έναντι χειρικότητας. Οι μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία, οι οποίες παρατηρήθηκαν για τα πρωτόνια του bry του συμπλόκου Δ-2, δείχνουν ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το ολιγονουκλεοτίδιο μέσω των υποκαταστατών bry. Αυτή η περίπτωση είναι αντίθετη από αυτή του Δ-1, όπου η αλληλουχία Lys¹Lys² διαταράσσεται από την παρεμβολή μιας γλυκίνης και έτσι η λειτουργία της "δαγκάνας" φαίνεται να ακυρώνεται. Επιπλέον, παρατηρείται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του πρωτονίου Gly-NH και των καρβονυλικών ομάδων των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου που μπορεί να είναι υπεύθυνος για την εξασθένιση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων A-T του ολιγονουκλεοτιδίου. Η σύνδεση του συμπλόκου Δ-3 είναι εντελώς διαφορετική από εκείνη του συμπλόκου Λ-3, και σε αντίστοιχη αναλογία με το Λ-3, (1:1) προκαλεί πλήρες άνοιγμα των ολιγονουκλεοτιδικών κλώνων, ενώ τα τρία πεπτιδικά NH σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις βάσεις του ολιγονουκλεοτιδίου.

3.4. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΗ-ENANTIΟΜΕΡΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ Ru(II) ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΩΝ ΜΕ ΑΜΙΝΟΞΕΑ Ή ΠΕΠΤΙΔΙΑ, ΜΕ ΤΟ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟ d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂.

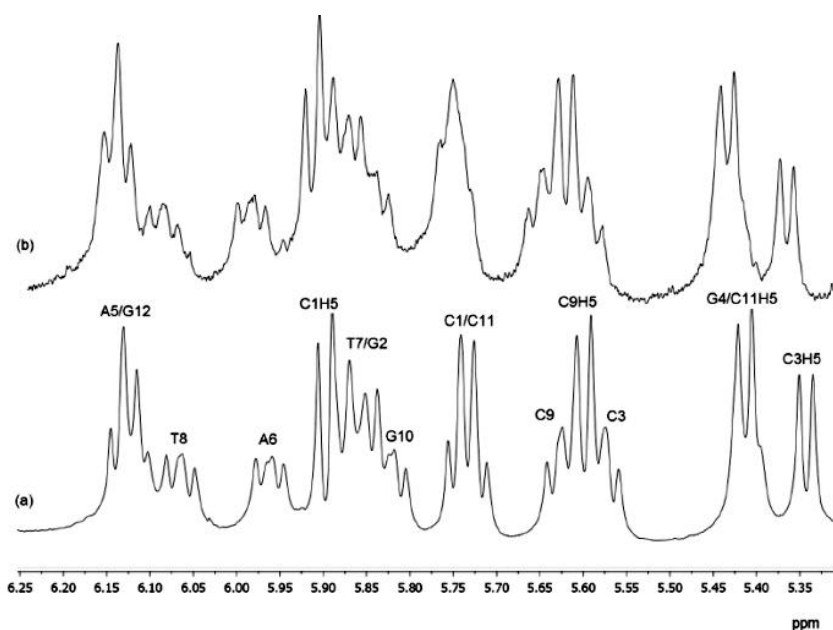
3.4.1. Αλληλεπίδρασεις των συμπλόκων [Ru(trpy-CONH-TrpCONH₂)₂]Cl₂ (**1**) και [Ru(trpy)(trpy-CONH-Gly-TrpCONH₂)₂]Cl₂ (**2**) με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂.

3.4.1.1. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου [Ru(trpy-CONH-TrpCONH₂)₂]Cl₂ (**1**) με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂

Τα φάσματα ¹H NMR των δειγμάτων που περιέχουν το ολιγονουκλεοτίδιο και το σύμπλοκο (**1**) σε αναλογίες από 0,5:1 και 1:1 παρουσιάζουν μόνο ένα σύνολο συντονισμών, υποδεικνύοντας είτε μια κινητική γρήγορης ανταλλαγής (στη χρονική κλίμακα του NMR στους 298 K) μεταξύ κάποιας δεσμευμένης μορφής και, του συστήματος ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου - ελεύθερου μεταλλικού συμπλόκου, είτε την απουσία αλληλεπιδράσεων μεταξύ του συμπλόκου και της διπλής έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου.

Οι τιμές των κορυφών συντονισμού των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου, καθώς και του συμπλόκου (**1**), δεν παρουσιάζουν αξιόλογες μετατοπίσεις και στις δύο αναλογίες 0,5:1 και 1:1, υποδεικνύοντας μια πολύ ασθενή αλληλεπίδραση του συμπλόκου (**1**), με την διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου. Έτσι, παρατηρήθηκαν μετατοπίσεις μεικτού προσήμου, προς υψηλότερα και χαμηλότερα πεδία σε ένα εύρος 0,01-0,03 ppm (πίν. 3.35 και 3.36) για την πλειονότητα των σημάτων του ολιγονουκλεοτιδίου αλλά και του συμπλόκου, οι οποίες θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μια μικρή διαταραχή της διπλής έλικας από την μορφή B-τύπου. Μια τέτοια διαταραχή της έλικας πιθανώς να προκαλείται από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του θετικού φορτίου του συμπλόκου (**1**) και των φωσφορικών ομάδων του ολιγονουκλεοτιδίου [133]. Ένας καλός δείκτης για τις μεταβολές που μπορεί να

υφίσταται η διπλή έλικα του (5'-CGCGAATTCGCG-3')₂, είναι οι μετατοπίσεις του πρωτονίου του σακχάρου H1' των νουκλεϊκών βάσεων, κατά την προσθήκη του συμπλόκου (1). Σημειωτέον ότι στην περιοχή αυτή (5 - 6 ppm) δεν υπάρχουν σήματα συντονισμού των πρωτονίων του συμπλόκου. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.42 τα σήματα συντονισμών των πρωτονίων H1' των βάσεων δεν μετατοπίζονται πρακτικά, με εξαίρεση τα σήματα των πρωτονίων H1' των βάσεων C1, C11, G12 και G10, υποδεικνύοντας ότι η διαταραχή της έλικας εντοπίζεται στα άκρα της αλληλουχίας. Η πλήρης απουσία διαμοριακών σημάτων NOE μεταξύ του συμπλόκου (1) και του ολιγονουκλεοτιδίου ενισχύει την άποψη πως πρόκειται για μια ασθενέστατη μη-ειδική αλληλεπίδραση.



Σχήμα 3.42 Η περιοχή H1' του σακχάρου του φάσματος ¹H NMR (500 MHz, 298 K, 50 mM σε διάλυμα φωσφορικών (pH 7.0) (α) ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ και (β) μετά την προσθήκη του συμπλόκου (1) σε αναλογία 1: 1.

Πίνακας 3.35. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGATCGCG-3')₂ ύστερα την προσθήκη του συμπλόκου (1), σε αναλογία 1: 1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH =7.0), στους 298 K, σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο υπό τις ίδιες συνθήκες.

	H8/H6	H5/H2/ T-CH ₃	H1'	H2'	H2''	N3H/N1H	NH ₂ (b)	NH ₂ (nb)
C1	7.62(+0.02)	5.91(+0.03)	5.75 (+0.03)	1.90(-0.04)	2.38(-0.01)			
G2	7.93(+0.01)		5.88	2.63 (+0.02)	2.67 (-0.01)	13.05(+0.03)		
C3	7.26(+0.01)	5.36(+0.01)	5.61 (+0.03)	1.82	2.28(+0.02)		8.39(-0.02)	6.42
G4	7.85(+0.02)		5.42 (+0.01)	2.63	2.75	12.68		
A5	8.11(+0.02)	7.23 (+0.02)	5.99 (+0.01)	2.67	2.94 (+0.04)			
A6	8.11(+0.02)	7.66 (+0.00)	6.15 (+0.02)	2.55(-0.04)	2.94(+0.04)			
T7	7.09	1.26	5.88	1.98 (+0.04)	2.53	13.63(-0.02)		
T8	7.36(+0.01)	1.53 (+0.02)	6.08	2.17 (+0.02)	2.53	13.76 (-0.02)		
C9	7.49(+0.00)	5.61(+0.00)	5.64(-0.01)	2.03 (-0.01)	2.41 (+0.01)		8.40	6.79(-0.01)
G10	7.91(+0.02)		5.79 (+0.00)	2.58 (-0.04)	2.68 (+0.01)	12.90 (-0.01)		
C11	7.32(+0.01)	5.47 (+0.01)	5.75 (+0.04)	1.86 (-0.01)	2.32 (+0.02)		8.37	6.57(+0.02)
G12	7.95(+0.03)		6.08(-0.02)	2.36	2.62			

Σε ότι αφορά τις μετατοπίσεις των πρωτονίων του συμπλόκου δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές, όπως αναμένεται, υποδεικνύοντας ότι το σύμπλοκο βρίσκεται μακριά από το ολιγονουκλεοτίδιο, αλληλεπιδρώντας ενδεχομένως ασθενώς.

Πίνακας 3.36. Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR (500 MHz) των πρωτονίων του συμπλόκου (1) ύστερα από την προσθήκη του d(5'-CGCGATCGCG-3')₂, σε αναλογία 1:1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,0) στους 298 K σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο σύμπλοκο υπό τις ίδιες συνθήκες.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ
trpCO ₂ H -H6H6'	8.43 (-0.01)
trpCO ₂ H -H5H5'	8.00 (+0.02)
trpCO ₂ H -H4H4'	7.23
trpCO ₂ H -H3H3'	7.34
trpCO ₂ H -H3''H5''	8.71
TrpH1	10.35 (-0.01)
TrpH2	7.51 (+0.01)
TrpH4	7.84 (-0.01)
TrpH5H6	7.14
TrpH7	7.57 (-0.01)
TrpCH _α	5.21 (-0.01)
TrpCH _β	3.68
TrpCH _β	3.58
Trp-NH	7.45

3.4.1.2. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου $[Ru(trpy)(trpy-CONH-Gly-TrpCONH_2)_2]Cl_2$ (**2**) με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(5'-CGCGAATTTCGCG-3')$ ₂

Όπως και στην περίπτωση του συμπλόκου (**1**), τα φάσματα ¹H NMR των δειγμάτων που περιέχουν το ολιγονουκλεοτίδιο και το σύμπλοκο (**2**) σε αναλογίες 0,5:1 και 1:1 δείχνουν μόνο ένα σετ σημάτων συντονισμού. Οι αλλαγές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του συμπλόκου βρίσκεται σε ένα εύρος 0,02-0,05 ppm, υποδεικνύοντας με περισσότερη βεβαιότητα σε σχέση με το σύμπλοκο (**1**), μια ασθενή αλληλεπίδραση με κινητική ταχείας ανταλλαγής με το ολιγονουκλεοτίδιο. Ύστερα από την προσθήκη του συμπλόκου (**2**) τόσο σε αναλογία 0,5:1 όσο και σε αναλογία 1:1, οι κορυφές συντονισμού των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου μετατοπίζονται επίσης σε ένα εύρος 0,01 έως 0,07 ppm, υποδεικνύοντας ότι σύμπλοκο (**2**) αλληλεπιδρά με το ολιγονουκλεοτίδιο με έναν τρόπο παρόμοιο με το σύμπλοκο (**1**). Οι πίνακες 3.37 και 3.38 παρουσιάζουν τις αλλαγές χημικών μετατοπίσεων για το ολιγονουκλεοτίδιο και για το σύμπλοκο (**2**). Ωστόσο, οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο σύμπλοκο (**2**) εντοπίζονται περισσότερο στον υποκαταστάτη trpy παρά στον υποκατεστημένο με το πεπτίδιο trpyCO-Gly-TrpCONH₂ ή ακόμη και στον ινδολικό δακτύλιο της τρυπτοφάνης. Ο αρωματικός αυτός δακτύλιος θα μπορούσε να παρεμβληθεί ανάμεσα στις βάσεις του ολιγονουκλεοτιδίου, επιφέροντας σημαντικές αλλαγές τόσο στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του όσο και του ολιγονουκλεοτιδίου.

Λαμβάνοντας υπόψη μας την ογκώδη πεπτιδική υποκατάσταση στην μία πλευρά του συμπλόκου, θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι λαμβάνει χώρα μια ασθενής αλληλεπίδραση μεταξύ του αρωματικού τμήματος της μη-υποκατεστημένης trpy και της διπλής έλικας του $d(5'-CGCGAATTTCGCG-3')$ ₂.

Πίνακας 3.37. Χαρακτηριστικές απορροφήσεις των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ ύστερα την προσθήκη του συμπλόκου (2), σε αναλογία 1: 1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH =7.0), στους 298 K, σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο υπό τις ίδιες συνθήκες.

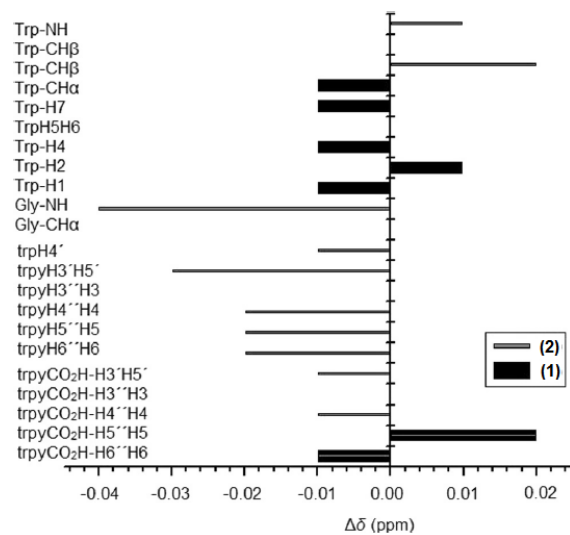
	H8/H6	H5/H2/ T-CH ₃	H1'	H2'	H2''	N3H/N1H	NH ₂ (b)	NH ₂ (nb)
C1	7.63(+0.03)	5.91 (+0.03)	5.74 (+0.02)	1.87 (-0.07)	2.33(-0.06)			
G2	7.93(+0.01)		5.87 (-0.01)	2.67 (+0.00)	2.67(+0.00)	13.05(+0.03)		
C3	7.25	5.36 (+0.01)	5.58	1.81 (-0.01)	2.22 (-0.04)		8.42(+0.01)	6.42
G4	7.83		5.41	2.64 (-0.01)	2.73 (-0.02)	12.68		
A5	8.09	7.23 (+0.02)	5.98(+0.01)	2.65(-0.02)	2.89 (-0.01)			
A6	8.09	7.61 (+0.01)	6.13	2.55 (-0.04)	2.89(-0.01)			
T7	7.08 (-0.01)	1.25 (-0.01)	5.87 (-0.01)	1.93(-0.01)	2.54(+0.01)	13.63 (-0.02)		
T8	7.35	1.51	6.08	2.12 (-0.03)	2.51 (-0.02)	13.75 (-0.03)		
C9	7.45(+0.01)	5.61(+0.01)	5.64 (-0.01)	2.05 (+0.01)	2.38 (-0.02)		8.41(+0.01)	6.80
G10	7.89(+0.01)		5.83 (+0.01)	2.60 (+0.00)	2.68(+0.00)	12.89 (-0.02)		
C11	7.31	5.43(+0.01)	5.74 (+0.02)	1.87 (+0.00)	2.31(+0.01)		8.37	6.58(+0.03)
G12	7.92		6.13	2.33 (-0.03)	2.59 (-0.03)			

Πίνακας 3.38. Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR (500 MHz) των πρωτονίων του συμπλόκου (2) ύστερα από την προσθήκη του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂, σε αναλογία 1:1, σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (pH 7,0) στους 298 K σε H₂O/D₂O 9/1. Οι τιμές σε παρένθεση δηλώνουν τις μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία(-) ή προς χαμηλότερα πεδία (+) σε σχέση με το ελεύθερο σύμπλοκο υπό τις ίδιες συνθήκες.

ΠΡΩΤΟΝΙΟ (2)	ΧΗΜΙΚΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ
trpyCO ₂ H -H6H6'	8.55 (-0.01)
trpyCO ₂ H -H5H5'	7.92 (+0.02)
trpyCO ₂ H -H4H4'	7.16 (-0.01)
trpyCO ₂ H -H3H3'	n.o
trpyCO ₂ H -H3''H5''	9.17 (-0.01)
trpyH6H6'	8.62 (-0.02)
trpyH5H5'	7.98 (-0.02)
trpyH4H4'	7.22 (-0.02)
trpyH3H3'	n.o
trpyH3''H5''	9.05 (-0.03)
trpyH4''	9.12 (-0.01)
GlyCH _α	4.24
GlyNH	8.65 (-0.04)
TrpH1	n.o
TrpH2	7.56
TrpH4	7.89
TrpH5H6	7.23
TrpH7	7.50
TrpCH _α	n.o
TrpCH _β	3.20 (+0.02)
TrpCH _β	n.o
Trp-NH	7.44 (+0.01)

3.4.1.3. Συμπεράσματα από τις αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων (1) και (2) με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$

Το σχήμα 3.43 παρουσιάζει τις διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των συμπλόκων (1) και (2) κατά την μη-ειδική αλληλεπίδραση τους με την διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου, όπου διαπιστώσαμε ότι διαταράσσεται ελαφρώς η μορφή Β-τύπου της έλικας. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί κυρίως σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του θετικού φορτίου των συμπλοκών και των φωσφορικών ομάδων του DNA. Στην περίπτωση του συμπλόκου (1), η συζευγμένη τρυπτοφάνη δεν προσεγγίζει την διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου και έτσι, δεν παρατηρείται κάποια αλληλεπίδραση, όπως σαφώς υποδικνύεται από το φάσμα NOE των μειγμάτων που περιέχουν το σύμπλοκο (1) και το ολιγονουκλεοτίδιο. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του συμπλόκου (2), το οποίο προσανατολίζει το μη υποκατεστημένο trpy προς την διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου. Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι η ογκώδης υποκατάσταση στον υποκαταστάτη trpy μειώνει τη δεσμευτική συγγένεια των συμπλόκων αυτών στο DNA αποτρέποντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις τους με αυτό. Ακόμη η έλλειψη χειρικού κέντρου στο οκταεδρικό σύμπλοκο Λ- ή Δ-, φαίνεται να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα κατά την δέσμευση του συμπλόκου με το DNA.

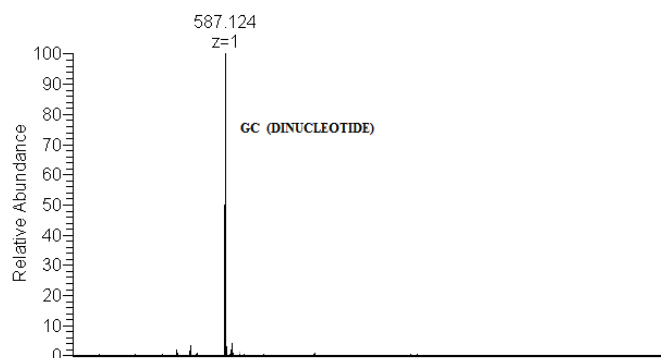


Σχήμα 3.43. Διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις (ppm) των πρωτονίων των συμπλόκων (1) και (2) που προκαλούνται ύστερα από την προσθήκη τους στο ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGATCGCG-3')₂ σε αναλογία 1: 1

3.5. ΝΟΥΚΛΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

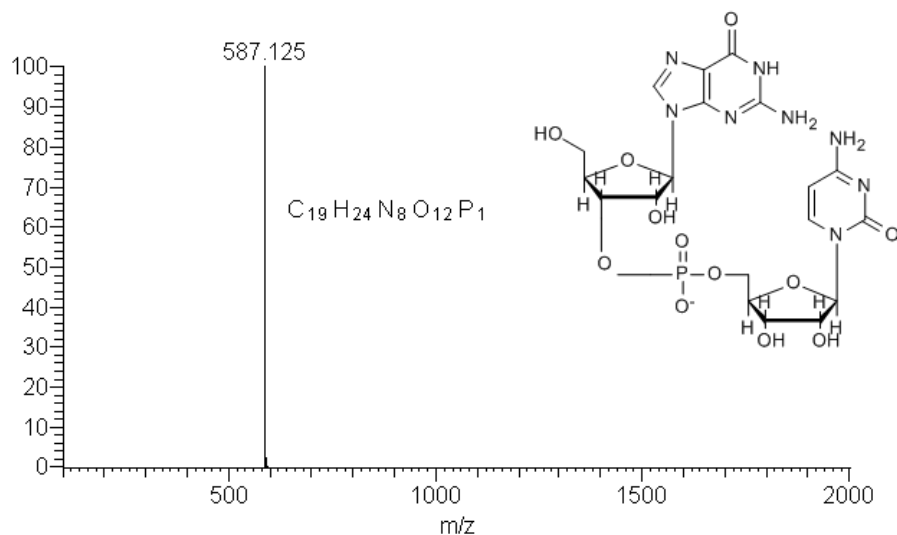
Η νουκλεολυτική δραστικότητα των διπυρηνικών συμπλόκων $(\text{ptrpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly-Gly-Gly-LysCONH}_2)](\text{Cl})_5$ και $(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly-Gly-Gly-LysCONH}_2)](\text{Cl})_5$ ως προς το δινουκλεοτίδιο $\text{d}(5'\text{-GC-}3')$ μελετήθηκαν με φασματοσκοπία μάζας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ποιοτική ανάλυση και μελέτη της νουκλεολυτικής δραστικότητας πραγματοποιήθηκε με χρήση φασματογράφου μάζας ενώ η ακτινοβολή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με χρήση ακτινοβολίας UV για χρονικά διαστήματα ενός και δέκα λεπτών σε μήκος κύματος 254 nm. Η όλη πειραματική διαδικασία στηρίχτηκε σε προσέγγιση ανάλογη με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης όπου το DNA ακτινοβολείται παρουσία και απουσία μεταλλικών συμπλόκων και τα θραύσματα αναλύονται περαιτέρω. Ακολουρώντας αυτή τη λογική τα θραύσματα και πιο συγκεκριμένα τα ανιονικά παρατηρούνται μελέτη με φασματοσκοπία μάζας. Τα φάσματα λήφθηκαν στην αρνητική περιοχή του MS, όπου γίνεται η ανίχνευση πολυανιονικών τμημάτων νουκλεϊκών οξέων. Το δινουκλεοτίδιο $\text{d}(5'\text{-GC-}3')$ που χρησιμοποιήθηκε ήταν το μονοαμμωνιακό άλας για την αποφυγή της αντικατάστασης ιόντων H^+ με Na^+

Αρχικά το δινουκλεοτίδιο διαλύθηκε σε H_2O και χωρίς να υποστεί καμιά άλλη επεξεργασία λήφθηκε το φάσμα μάζας που παρατίθεται στο σχήμα 3.44



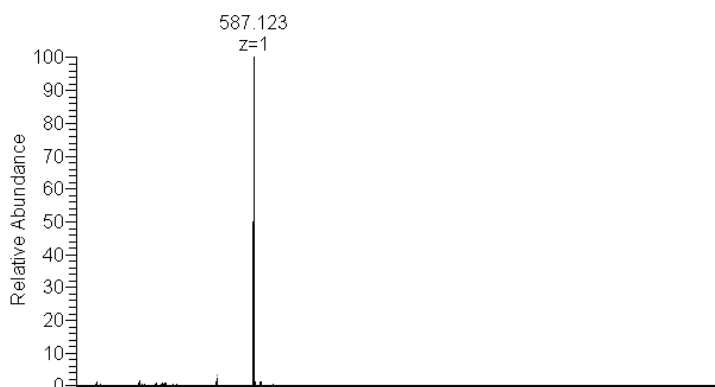
Σχήμα 3.44. Φάσμα μάζας του δινουκλεοτιδίου $\text{d}(5'\text{-GC-}3')$.

Στο φάσμα μάζας εμφανίζεται μια κορυφή στα 587,124 που είναι το μονοφορτιακό ιόν του δινουκλεοτιδίου με μοριακό τύπο $C_{19}H_{24}N_8O_{12}P_1$ όπως φαίνεται στο σχήμα 3.45. της θεωρητικής ισοτοπικής κατανομής που ταυτίζεται πλήρως με το ληφθέν φάσμα.



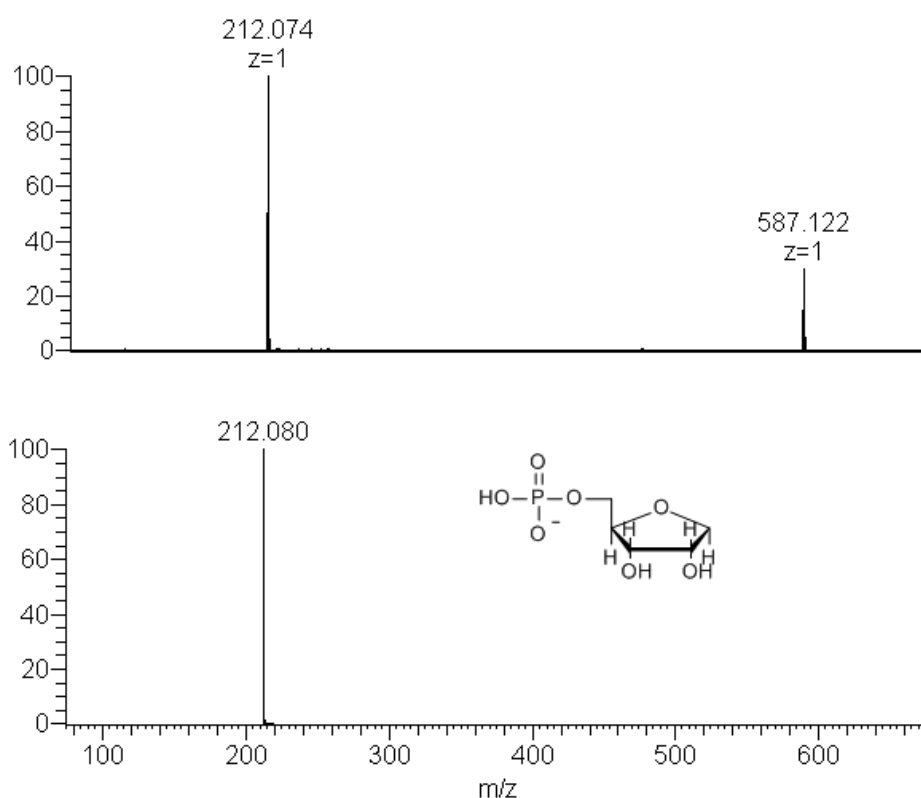
Σχήμα 3.45. Θεωρητικό φάσμα μάζας του δινουκλεοτιδίου γουανίδυλ-κυτοσίνης $C_{19}H_{24}N_8O_{12}P_1$.

Εν συνεχεία η αρχική ποσότητα χωρίστηκε σε τρία δείγματα. Το πρώτο δείγμα (Α) ακτινοβολήθηκε για 1 min και ύστερα λήφθηκε το φάσμα μάζας. όπως φαίνεται και στο φάσμα μάζας δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στο δινουκλεοτίδιο αφού δεν παράγεται κάποιο καινούργιο ιόν.



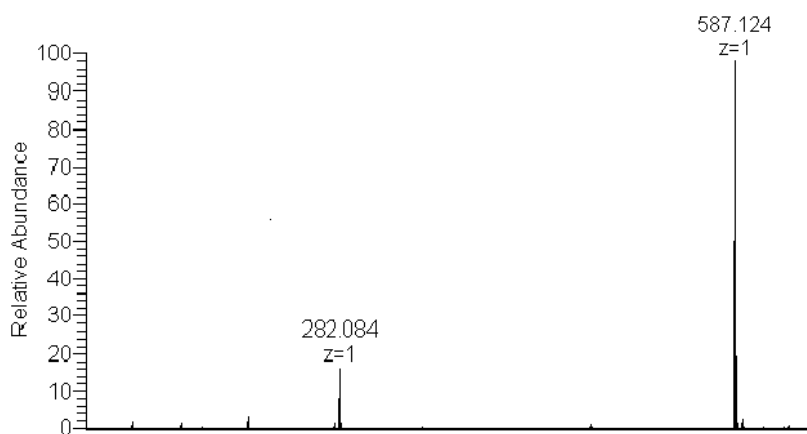
Σχήμα 3.46. Φάσμα μάζας του δινουκλεοτιδίου γουανίδυλ-κυτοσίνης υστερα από 1 min ακτινοβολήσης.

Έπειτα το ίδιο δείγμα ακτινοβολείται για επιπλέον 9 min. Ύστερα από την ακτινοβολήση συνολικής διάρκειας 10 min το φάσμα μάζας που λαμβάνουμε εμφανίζει μια καινούργια κορυφή στα 212,074 (σχ. 3.47(α)). Η κορυφή αυτή μπορεί να αποδοθεί σε αρνητικό ιόν που αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο $C_5O_7P_1H_9$, δηλαδή πιθανότατα στο μοριακό ιόν ενός σακχάρου ενωμένου με μια φωσφορική ομάδα. Κατά τη διάσπαση αυτή άλλα θραύσματα που περιέχουν και τις νουκλεϊκές βάσεις, πιθανόν να εμφανίζονται στη θετική περιοχή του φάσματος. Ο μηχανισμός της διάσπασης αυτής σύμφωνα με την βιβλιογραφία προχωράει μέσω μηχανισμού παραγωγής ριζών $HO\cdot$ κατά την έκθεση του δείγματος σε ακτινοβολία UV προσβάλλοντας τον φωσφοροδιεστερικό δεσμό [134-137]



Σχήμα 3.47. (α) Φάσμα μάζας του δινουκλεοτιδίου γουανίδυλ-κυτοσίνης ύστερα από 10 min ακτινοβολήσης (β) Θεωρητικό φάσμα μάζας του ανιόντος $C_5O_7H_9P_1$ (ενός σακχάρου με μια φωσφορική ομάδα). Σημειωτέον ότι ο χρόνος της ακτινοβολήσης (10 min) προκαλεί μερική διάσπαση του d(5'-GC-3'), αφού η κορυφή του αρχικού ιόντος υπάρχει ακόμη στο διάλυμα.

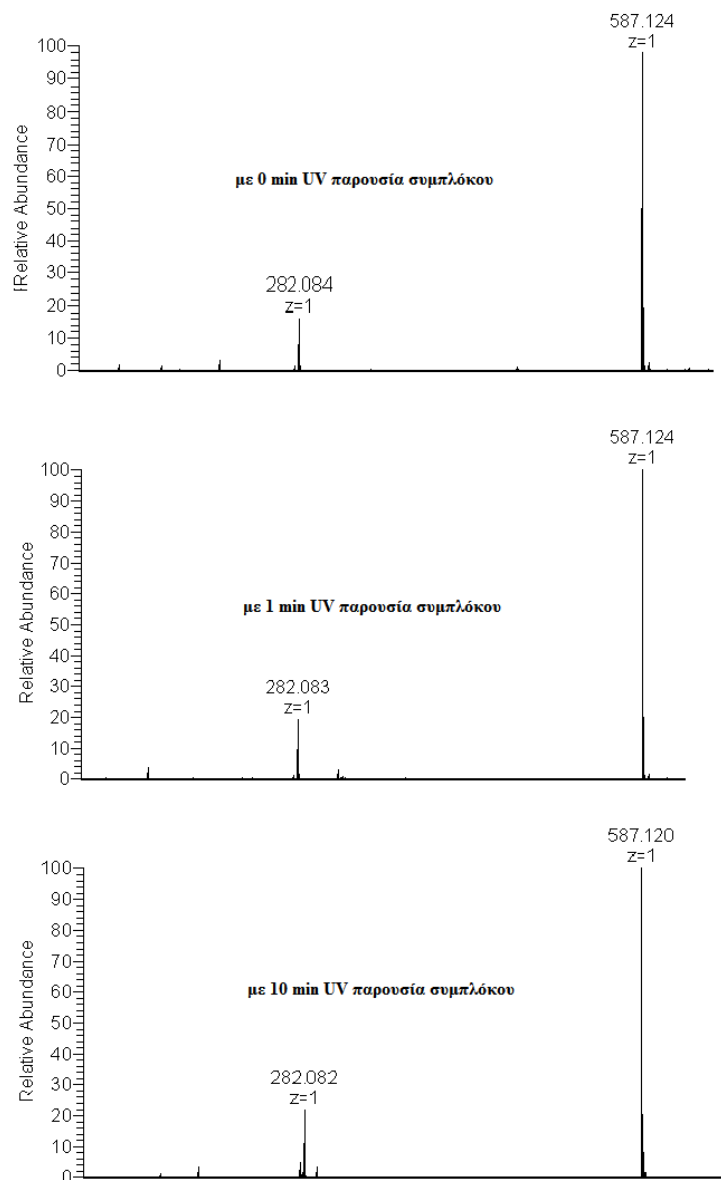
Στο δεύτερο δείγμα που περιέχει το δινουκλεοτίδιο προστέθηκε ισομοριακή ποσότητα του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)]Cl₅ και το δείγμα αφέθηκε για 24 ώρες σε θερμοκρασία 25 °C στο σκοτάδι. Ύστερα από το πέρας των 24 h και χωρίς άλλη επεξεργασία, λήφθηκε το φάσμα μάζας του δείγματος.



Σχήμα 3.48. Φάσμα μάζας του δινουκλεοτιδίου γουανίδυλ-κυτοσίνης παρουσία ισομοριακής ποσότητας του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)]Cl₅ χωρίς ακτινοβολήση.

Το μονοφορτιακό ιόν που εμφανίζεται στα 282,084 και αντιστοιχεί στο μοριακό τύπο C₁₀H₁₂N₅O₅, δηλαδή σε ανιόν μιας γουανοσίνης όπως φαίνεται και από την θεωρητική τιμή της (282,083) . Το σύμπλοκο (ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly-Gly-Gly-LysCONH₂)]Cl₅ όπως φαίνεται από το φάσμα μάζας, παρουσιάζει νουκλεολυτική δραστικότητα έναντι του δινουκλεοτιδίου διασπώντας τον φωσφοροδιεστερικό δεσμό στη θέση 3' του σακχάρου, απουσία φωτός.

Στη συνέχεια το ίδιο δείγμα ακτινοβολήθηκε για ένα λεπτό και λήφθηκε το φάσμα (σχ. 3.49 (β)). Όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.49 (β)) η κατά ένα λεπτό επιπλέον ακτινοβολήση δεν μεταβάλλει πρακτικά το φάσμα.

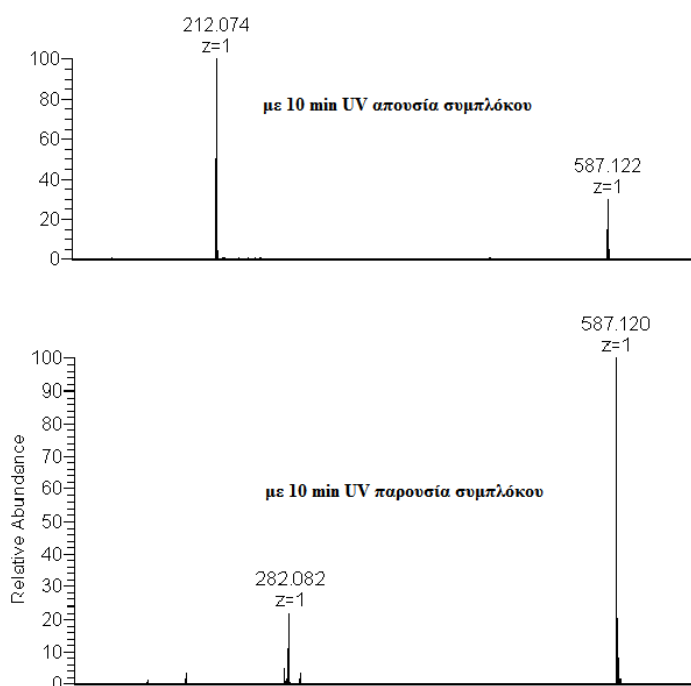


Σχήμα 3.49. Σύγκριση φασμάτων του δινουκλεοτιδίου γουανίδυλ-κυτοσίνης παρουσία ισομοριακής ποσότητας του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)]Cl₅ υστέρα από 0 (α), 1 (β) 10 (γ) min ακτινοβολήσης.

Έπειτα το ίδιο δείγμα ακτινοβολείται για επιπλέον 9 min (σχ. 3.49 (γ)) και το φάσμα μάζας που λαμβάνουμε εμφανίζει κυρίως μόνο ένα ανιόν στα 282,082 (σχ. 3.49 (γ)). Είναι το ίδιο ανιόν που παρατηρείται όταν το δείγμα δεν ακτινοβολείται καθόλου και όταν ακτινοβολείται για 1 min. Όπως προαναφέρθηκε η κορυφή αυτή αντιστοιχεί σε ανιόν της γουανοσίνης. Δηλαδή, η νουκλεολυτική δραστηριότητα του συμπλόκου εκδηλώνεται απουσία φωτός και

χωρίς να σχετίζεται άμεσα με την ακτινοβολήση με UV στους χρόνους που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Ενδιαφέρον είναι ότι η ακτινοβολήση του δείγματος με το δινουκλεοτίδιο απουσία συμπλόκου για 10 min οδηγεί σε διαφορετικά θραύσματα από εκείνα παρουσία του συμπλόκου στις ίδιες συνθήκες.

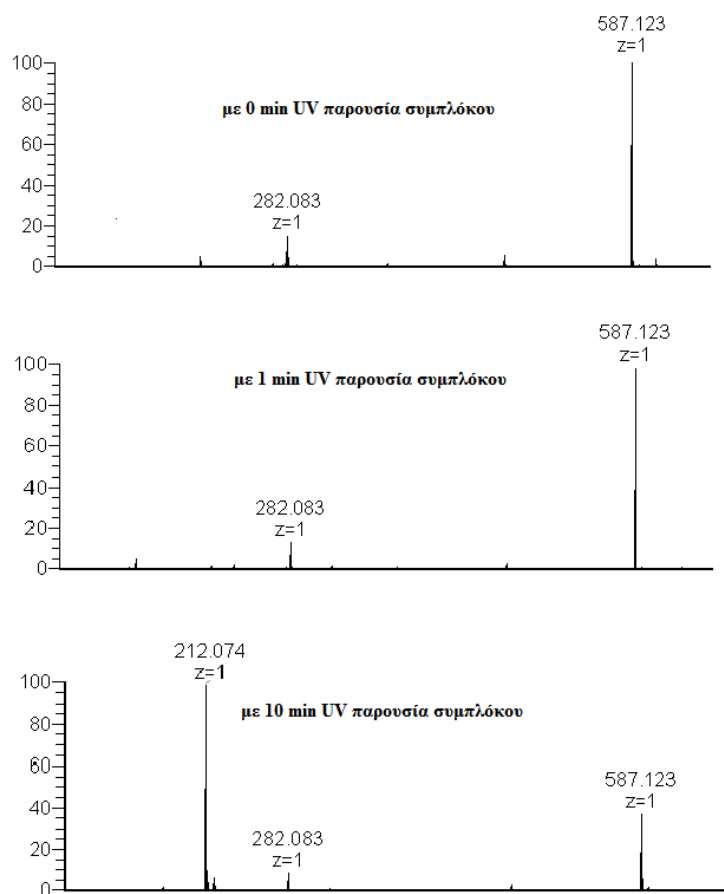
Ακόμη, ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η ακτινοβολήση για δέκα λεπτά δεν δημιουργεί το θραύσμα στα 212,075 (σάκχαρο με μια φωσφορική ομάδα) ενώ υπάρχει ποσότητα από το δινουκλεοτίδιο (σχ. 3.50). Εναλλακτικά μπορεί να δημιουργείται αλλά να καταστρέφεται από την παρουσία του συμπλόκου.



Σχήμα 3.50. Σύγκριση φασμάτων του δινουκλεοτιδίου γουανίδυλ-κυτοσίνης απουσία συμπλόκου για 10 min ακτινοβολήσης και παρουσία ισομοριακής ποσότητας του συμπλόκου [(ptrpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)]Cl₅ για 10 min ακτινοβολήσης.

Θέλοντας να διαπιστώσουμε την επίδραση του επίπεδου αρωματικού συστήματος της trpy σε σύγκριση με την ptrpy, μελετήσαμε τη νουκλεολυτική δραστικότητα του αναλόγου συμπλόκου [(trpy)Ru(tppz)Ru(trpy-CONH-Gly¹-Gly²-Gly³-Lys¹CONH₂)]Cl₅. Έτσι στο τρίτο δείγμα (Γ) που περιέχει το

δινουκλεοτίδιο προστέθηκε ισομοριακή ποσότητα του συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Lys}^1\text{CONH}_2)]\text{Cl}_5$ και το δείγμα αφέθηκε για 24 ώρες στο σκοτάδι. Ύστερα από το πέρας των 24 h, χωρίς άλλη επεξεργασία, λήφθηκε το φάσμα μάζας του δείγματος (σχ. 3.51(α)). Η παρουσία του συμπλόκου στο διάλυμα με το δινουκλεοτίδιο μετά από 24 ώρες δείχνει να παράγει το ίδιο ανιόν όπως στο προηγούμενο σύμπλοκο που μελετήσαμε στα 282.083, αλλά με χαμηλότερη ένταση. Εν συνεχεία το ίδιο δείγμα ακτινοβολείται για ένα λεπτό και λαμβάνεται το φάσμα (σχ. 3.51.(β)), όπου φαίνεται ότι και ύστερα από την ακτινοβολήση του δείγματος για ένα λεπτό δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αλλαγή.



Σχήμα 3.51. Σύγκριση φασμάτων του δινουκλεοτιδίου γουανίδυλ-κυτοσίνης παρουσία ισομοριακής ποσότητας του συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly}^1\text{-Gly}^2\text{-Gly}^3\text{-Lys}^1\text{CONH}_2)]\text{Cl}_5$ για 0(α), 1(β) 10(γ) min ακτινοβολήσης.

Έπειτα το παραπάνω δείγμα ακτινοβολείται για επιπλέον 9 λεπτά (συνολικά 10 λεπτά ακτινοβολήσης) και λαμβάνεται το φάσμα (σχ. 3.51(γ)), όπου παρατηρείται μονοφορτιακό ανιόν στα 212,074 που αντιστοιχεί στο ανιόν ενός σακχάρου με μια φωσφορική ομάδα. Είναι το ίδιο ανιόν που παρατηρείται κατά την ακτινοβολήση του δινουκλεοτιδίου απουσία συμπλόκου. Συνεπώς η παρουσία του συμπλόκου $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly-Gly-Gly-LysCONH}_2)]\text{Cl}_5$ «επιτρέπει» τη δημιουργία του εν λόγω ανιόντος από το δινουκλεοτίδιο που συνυπάρχει στο διάλυμα και δεν το διασπά περαιτέρω όπως πιθανόν συμβαίνει στη περίπτωση του $[(\text{trpy})\text{Ru}(\text{tppz})\text{Ru}(\text{trpy-CONH-Gly-Gly-Gly-LysCONH}_2)]\text{Cl}_5$.

Συμπερασματικά τα διπυρηνικά σύμπλοκα που μελετήσαμε εμφανίζουν νουκλεολυτική δραστηριότητα που εξαρτάται από το είδος των υποκαταστάτη και ενδεχομένως από την πεπτιδική αλληλουχία. Η λεπτομερειακή μελέτη των συστημάτων αυτών μπορεί να οδηγήσει στην διερεύνηση του μηχανισμού τους, της πιθανής εκλεκτικότητας τους, και της εφαρμογής τους ως χημικές νουκλεάσες που δεν αποτελεί αντικείμενο της παρούσης διατριβής.

3.6. ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Ο έλεγχος της βιωσιμότητας όλων των τύπων των κυττάρων (νεοπλασματικών και φυσιολογικών κυττάρων) πραγματοποιήθηκε σε 96 μικροκυψελίδες, με χωρητικότητα 200 μL ανα κυψελίδα. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι: (α) του λειομυοσαρκώματος (LMS) των ποντικών Wistar, που προέρχεται από ένα στερεό όγκο που διαγνώσκεται ιστολογικά ως λειομυοσάρκωμα, και λαμβάνεται με καρκινογένεση με χρήση 3,4-βενζοπυρενίου σε αρουραίους τυπου Wistar [138-141] (β) MCF -7 καρκίνου του μαστού, (γ) U2OS του ανθρώπινου οστεοσαρκώματος (δ) K562, της ανθρώπινης λευχαιμίας, και (ε) σε φυσιολογικούς ινοβλάστες του ανθρώπινου εμβρυϊκού πνεύμονα (MRC-5 κύτταρα) από την American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) .

Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpyCO-Gly-TrpCONH}_2)]\text{Cl}_2$ δείχνει σημαντική κυτταροτοξικότητα έναντι διαφόρων κυτταρικών σειρών στο εύρος του nM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα παρακάτω.

	LMS	MCF-7	U2OS	K562	MRC-5
σύμπλοκο	0.68 $\pm$ 0.01	0.92 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.01	0.60 $\pm$ 0.02
cis-platin	15.0 $\pm$ 0.8	28.1 $\pm$ 1.5	12.1 $\pm$ 3	18.1 $\pm$ 2	9.0 $\pm$ 1

Πίνακας 3.39. Τιμές IC_{50} του συμπλοκου $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpy-CONH-Gly-TrpCONH}_2)_2]\text{Cl}_2$ στις παραπάνω κυτταρικές σειρές έναντι της αντίστοιχης του cis-platin.

Παρόμοιες τιμές IC_{50} παρατηρήθηκαν για διλειτουργικά σύμπλοκα του ρουθενίου όπως cis-(Cl,Cl)- $[\text{RuCl}_2(\text{trpy})(\text{NO})]\text{Cl}$ [142], με IC_{50} =0,49 μM και α- $[\text{RuCl}_2(\text{azpy})]\text{Cl}$ (ampy είναι 2-φαίνυλ-αζο-πυριδίνη) [143], με IC_{50} = 0,85 μM για τις κυτταρικές σειρές A2780 του ανθρώπινου καρκίνου των ωοθηκών. Συμπερασματικά, το σύμπλοκο είναι εξαιρετικά τοξικό για τα νεοπλασματικές κυτταρικές σειρές ενώ είναι λιγότερο τοξικό για τους φυσιολογικούς πνευμονικούς ινοβλάστες MRC-5. Ωστόσο, οι διαφορές στην κυτταροτοξική

δραστικότητα έναντι νεοπλασματικών και φυσιολογικών κυτταρικών τύπων είναι περιορισμένη και τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν μικρή εκλεκτικότητα. Όμως το γεγονός ότι το σύμπλοκο που μελετήθηκε έχει κορεσμένη σφαίρα ένταξης του μετάλλου, και δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά ισχυρά με το DNA μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα πως ο κυτταροτοξικός μηχανισμός δράσης του, είναι σαφώς διαφορετικός από το κλασσικό του *cis-platin* ή αναλόγων metal based drugs.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Τα εναντιομερή σύμπλοκα που μελετηθήκαν δεσμεύονται στο DNA με διαφορετικό τρόπο : τα Λ- περισσότερο μη-ειδικά με ηλεκτροστατική δέσμευση, ενώ τα Δ- δεσμεύονται ισχυρότερα. Το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{-CONH-Lys-Lys-Gly-CONH}_2\text{-H-4'-Mebpy})](\text{PF}_6)$ (Δ-3) κατά την δέσμευση του, μέσω δεσμών υδρογόνου από τον πεπτιδικό σκελετό, προκαλεί τοπικό ξετύλιγμα στη διπλή έλικα, λειτουργώντας ως τεχνητή ελικάση.
- Τα μη-εναντιομερή σύμπλοκα που μελετήθηκαν αλληλεπιδρούν ασθενώς με το DNA χωρίς να προκαλούν σημαντικές αλλαγές στη δομή του. Εν τούτοις, το σύμπλοκο $[\text{Ru}(\text{trpy})(\text{trpyCO-Gly-TrpCONH}_2)_2]\text{Cl}_2$ βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικό υποδεικνύοντας ένα διαφορετικό μηχανισμό δράσης από εκείνον του *cis-platin* και των αναλόγων του.
- Τα διπυρηνικά σύμπλοκα που συντέθηκαν, εμφανίζουν νουκλεολυτική δραστηριότητα απουσία φωτός αλλά και κατόπιν ακτινοβολήσης με UV (254 nm) η οποία εξαρτάται από τη φύση των υποκαταστατών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Konstantina Karidi, Jan Reedijk, Nick Hadjiliadis, Achilleas Garoufis *Journal of Inorganic Biochemistry* **2007** 101 1483–1491
2. Konstantina Karidi, Konstantinos Ypsilantis, Athanasios Papakyriakou, Achilleas Garoufis *Journal of Bioorganic Chemistry* **2013** 127 13–23
3. Rodanthi Kaskafetou, Manolis J. Manos, Achilleas Garoufis *Inorganic Chemistry Communications* **2013** 35 176–180
4. Konstantina Karidi, Achilleas Garoufis, Nick Hadjiliadis and Jan Reedijk *Dalton Trans* **2005** 728–734
5. Katelitsa Triantafillidi, Konstantina Karidi, Jaroslav Malina and Achilleas Garoufis *Dalton Trans* 2009, 6403–6415
6. Katelitsa Triantafillidi, Konstantina Karidi, Olga Novakova, Jaroslav Malina and Achilleas Garoufis *Dalton Trans* **2011** 40 472–483
7. B. Fan, D. L. Fontenot, R. W. Larsen, M. C. Simpson, J. A. Shelnutt, R. Falcon, L. Martinez, S. Niu, S. Zhang, T. Niemczyk, and M. R. Ondrias *Inorg. Chem.* **1997** 36 3839–3846
8. Flavia Barragán, Dolores Carrion-Salip, Irene Gómez-Pinto, Alejandro González-Cantó, Peter J. Sadler, Rafael de Llorens, Virtudes Moreno, Carlos González, Anna Massaguer, and Vicente Marchán *Bioconjugate Chem.* **2012** 23 1838–1855
9. James P. Parker, Marc Devocelle, and Celine J. Marmion *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2013** 639 (8-9) 1628–1635
10. Marc S Robillard A. Rob P.M Valentijn, Niko J Meeuwennord, Gijs A. Van der Marel, Jacques H. Van Boom and Jean ReegiJk *Angew. Chem. Int. Ed* **2000** 39 No 17 3096–3099
11. Flavia Barrag_an, Paula L_opez-Senín, Luca Salassa, Soledad Betanzos-Lara, Abraha Habtemariam, Virtudes Moreno, Peter J. Sadler, and Vicente Marchan J. *Am. Chem. Soc.* **2011** 133 14098–14108
12. Yoshimi Shiina , Shigero Oishi , Hitoshi Ishida *Tetrahedron Letters* 2012 53 1249–1252
13. Leonardo Elias Figueiredo, Eduardo Maffud Cilli, Roberto Augusto Silva Molina, Enilza Maria Espreafico, Elia Tfouni *Inorganic Chemistry Communications* **2013** 28 60–63
14. Samuel M. Meier, Maria Novak, Wolfgang Kandioller, Michael A. Jakupec, Vladimir B. Arion, Nils Metzler-Nolte, Bernhard K. Keppler, and Christian G. Hartinger *Chem. Eur. J.* **2013** 19 9297 – 9307
15. Toshiyuki Moriuchi, Takashi Fujiwara and Toshikazu Hirao *Dalton Trans* **2009** 4286–4288
16. Makoto Ogawa, Bijitha Balan, Gopalakrishnan Ajayakumar, Shigeyuki Masaoka, Heinz-Bernhard Kraatz, Masayasu Muramatsu, Syoji Ito, Yutaka Nagasawa, Hiroshi Miyasaka and Ken Sakai *Dalton Trans.*, **2010** 39 4421–4434

17. Jessica Lemke, Nils Metzler-Nolte *Journal of Organometallic Chemistry* **2011** 696 1018-1022
18. Mathilde Villien, Stephanie Deroo, Etienne Gicquel, Eric Defrancq, Cecile Moucheron, Andree Kirsch-De Mesmaeker and Pascal Dumy *Tetrahedron* **2007** 63 11299–11306
19. Wolfgang Beck *Pure&Appl. Chem.* **1988** Vol. 60 No. 8 1357-1362,
20. Brian M. Peek, Gleen T. Ross, Stephen W. Edwards, Gerald J. Meyer, Thomas J. Meyer and Bruce W. Erickson *Int.. J. Peptide Protein Res.* **1991** 38 114-123
21. Dewey G. McCafferty, Barney M. Bishop, Craig G. Wall, Solon G. Hughes, Sandra L Meeclenberg, Thomas J, Meyer and Bruce W. Erickson *Tetrahedron* **1995** Vol 51 No.4 1093-1106
22. Sandra L. Mecklenburg, Brian M. Peek, Jon R. Schoonover, Dewey C. McCafferty, Craig G. Wall, Bruce W. Erickson, and Thomas J. Meyer *J. Am. Chem. Soc.* **1993** 115 5479-5495
23. Sandra L. Mecklenburg, Dewey C. McCafferty, Jon R. Schoonover, Brian M. Peek, Bruce W. Erickson, and Thomas J. Meyer *Inorg. Chem.* **1994** 33 2974-2983
24. Bernd Geißer Burkhard König and Ralf Alsfasser *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001** Vol. 33 No. 13 1543-1549
25. Idalina M.M. de Carvalho, I'caro de Sousa Moreira, Marcelo H. Gehlen *Polyhedron* **2005** 24 65–73
26. Albert Isidro-Llobet, Mercedes Alvarez, and Fernando Albericio *Chem. Rev.* **2009** 109 2455–2504
27. Bernd Geißer, Thomas Skrivanek, Ute Zimmermann, Derk J. Stufkens and Ralf Alsfasser *Eur. J. Inorg. Chem.* **2001**, 439-448
28. Bernd Geisser, Adrian Ponce, and Ralf Alsfasser *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 2030-2037
29. Bernd Geißer and Ralf Alsfasser *Eur. J. Inorg. Chem.* **1998**, 957-963
30. Kellie Adamson, Ciaran Dolan, Niamh Moran, Robert J. Forster, and Tia E. Keyes *Bioconjugate Chem.*, **2014** 25 (5) 928–944
31. Honglan Qi, ChenWang, XiaoyingQiu, QiangGao, ChengxiaoZhang *Talanta* **2012** 100 162–167
32. Amy M. Scott, W. Russ Algar, Michael H. Stewart, Scott A. Trammell, Juan B. Blanco-Canosa, Philip E. Dawson, Jeffrey R. Deschamps, Ramasis Goswami, Eunkeu Oh, Alan L. Huston and Igor L. Medintz *J. Phys. Chem.* **2014** 118 9239–9250
33. Akihiro Ito, Taka-aki Okamura, Ken Masui, Maki Kaneko, Ryoji Masui, Kojiro Ake, Seiki Kuramitsu, Minoru Yamaguchi, Hiroki Kuyama, Eiji Ando, Shigemi Norioka, Takashi Nakazawa, Susumu Tsunasawa, Hitoshi Yamamoto and Norikazu Ueyama *Analyst*, **2007** 132 358–364

34. Stephan S. Isied, Icaro Moreiraapptt, Michael Y. Ogawaa, Asbed Vassilian, Bente Arbo and Ji Surf J. Photochem Photobiol A.Chem. **1994** 82 203-210
35. Michael Y. Ogawa, James F. Wishart, Zuyung Young, John R. MiUer and Stephan S. Isie J. Phys. Chem. **1993** 97 11456-1 1463
36. Ruslan I. Dmitriev, Honorata M. Ropiak, Gelii V. Ponomarev, Dmitri V. Yashunsky and Dmitri B. Papkovsky Bioconjugate Chem. 2011 22 2507–2518
37. Kimberly D. Copeland, Alexis M. K. Lueras, Eric D. A. Stemp and Jacqueline K. Barton *Biochemistry* **2002** 41 12785-12797
38. Ute Neugebauer, Yann Pellegrin, Marc Devocelle,c Robert J. Forster, William Signac, Niamh Morand and Tia E. Keyes Chem. Commun. **2008** 5307–5309
39. Lynda Cosgrave, Marc Devocelle, Robert J. Forsterb and Tia E. Keyes Chem. Commun., 2010, 46, 103–105
40. Lorraine Blackmore, Roisin Moriarty, Ciaran Dolan, Kellie Adamson, Robert J. Forster,a Marc Devocelle and Tia E. Keyes *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 2658-2660
41. Ute Neugebauer Lynda Cosgrave , Yann Pellegrin , Marc Devocelle, Robert J. Forster , Tia E. Keyes Proc. of SPIE Vol. 8427 84270C-2
42. Katja Heinze and Klaus Hempel Chem. Eur. J. **2009** 15 1346 – 1358
43. Curtis A. Hastings and Jacqueline K. Barton *Biochemistry* **1999** Vol. 38, No. 31 10043
44. Niranjana Y.Sardesai, Kaspar Zimmermann, and Jacqueline K.Barton J. Am. Chem. Soc. **1994** 116, 7502-7508
45. Cindy A. Puckett, Jacqueline K. Barton *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010** 18 3564–3569
46. Jens Brunner and Jacqueline K. Barton *Biochemistry* **2006** 45 12295-12302
47. Katherine E. Augustyn, E. D. A. Stemp, and Jacqueline K. Barton *Inorganic Chemistry*, **2007** Vol. 46, No. 22 9337
48. Kimberly D. Copeland, Marilena P. Fitzsimons, Robert P. Houser, and Jacqueline K. Barton *Biochemistry* **2002**, 41, 343-356
49. Kenneth J. Kise, Jr. and Bruce E. Bowler *Inorganic Chemistry* **2002** Vol. 41, No. 2 379
50. Kenneth J. Kise, Jr. and Bruce E. Bowler *Inorganic Chemistry* **2003** Vol. 42, No. 12 3891
51. Alexandra Myari, Nick Hadjiliadis , Achilleas Garoufis *Journal of Inorganic Biochemistry* **2005** 99 616–626
52. Alexandra Myari, Nick Hadjiliadis and Achilleas Garoufis *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 1427-1439
53. Konstantinos Ypsilantis, Spyridon Karkabounas, Elena Georgiou, Ioannis Zelovitis,

54. Rolf A. Kramer, Eva K. Kainmuller, Roman Flehr, Michael U. Kumkeb and Willi Bannwarth *Org. Biomol. Chem.*, **2008** 6 2355–2360
55. K. Kainmuller and Willi Bannwarth *Helvetica Chimica Acta* **2006** Vol. 89 3056–3070
56. Rolf A. Kramer, Roman Flehr, Myriam Lay, Michael U. Kumke, and Willi Bannwarth *Helvetica Chimica Acta* – **2009** Vol. 92 1933–1943
57. Jessica Lemke and Nils Metzler-Nolte *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008** 3359–3366
58. Annika Gross, Nina Hüskén, Julia Schur, Łukasz Raszeja, Ingo Ott and Nils Metzler-Nolte *Bioconjugate Chem.* **2012** 23 1764–1774
59. Johannes Zagermann, Matthew C. Kuchta, Klaus Merz, Nils Metzler-Nolte *Journal of Organometallic Chemistry* **2009** 694 862–867
60. Johannes Zagermann, Mariusz Molon and Nils Metzler-Nolte *Dalton Trans.* **2011** 40 1011
61. Jeroen C. Verheijen, Gijs A. van der Marel, Jacques H. van Boom, and Nils Metzler-Nolte *Bioconjugate Chem.*, **2000** Vol. 11 No. 6 741–743
62. Sergey Abramkin, Seied M. Valiahdí, Michael A. Jakupiec, Markus Galanski, Nils Metzler-Nolte and Bernhard K. Keppler *Dalton Trans.* **2012** 41 3001
63. Luca Gaviglio, Annika Gross, Nils Metzler-Nolte and Mauro Ravera *Metallomics* **2012**, 4 260–266
64. Durwin R. Striplin, Steven Y. Reece, Dewey G. McCafferty, Craig G. Wall, Duane A. Friesen, Bruce W. Erickson and Thomas J. Meyer *J. Am. Chem. Soc.* **2004** 126 5282–5291
65. Liu Liu, Jing Hong, and Michael Y. Ogawa *J. Am. Chem. Soc.* **2004** 126 50–51
66. Kalyan K. Sadhu and Nicolas Winssinger *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 8182 – 8189
67. Anna Fedorova, Anita Chaudhari, and Michael Y. Ogawa *J. Am. Chem. Soc.* **2003** 125 357–362
68. Michael H. Stewart, Alan L. Huston, Amy M. Scott, Alexander L. Efros, Joseph S. Melinger, Kelly Boeneman Gemmill, Scott A. Trammell, Juan B. Blanco-Canosa, Philip E. Dawson, and Igor L. Medintz *ACS NANO* Vol. 6 No. 6 5330–5347 2012
69. Igor L. Medintz, Dorothy Farrell, Kimihiro Susumu, Scott A. Trammell, Jeffrey R. Deschamps, Florence M. Brunel, Philip E. Dawson and Hedi Mattoussi *Anal. Chem.* **2009** 81 4831–4839
70. Min Zheng, Zaicheng Sun, Zhigang Xie, and Xiabin Jing *Chem. Asian J.* **2013** 8 2807–2812
71. Dmitry S. Perekalin, Eduard E. Karslyan, Pavel V. Petrovskii, Yulia V. Nelyubina Konstantin A. Lyssenko, Alexey S. Kononikhin, Eugene N. Nikolaev, and Alexander R. Kudinov *Chem. Eur. J.* **2010** 16 8466 – 8470

72. Ralf Stodt, Susan Gencaslan, Iris M. Müller and William S. Sheldrick *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003** 1873-1882
73. W.S. Sheldrick and A. Gleichmann *Journal of Organometallic Chemistry*, **1994** 470 183-187
74. Jens M. Wolff and William S. Sheldrick *Chem. Ber. Recueil* **1997** 130 981-988
75. Anna Y. Kornilova, James F. Wishart, Wenzhong Xiao, Robin C. Lasey, Anna Fedorova, Yeon-Kyun Shin, and Michael Y. Ogawa *J. Am. Chem. Soc.* **2000** 122 7999-8006
76. Anna Fedorova and Michael Y. Ogawa *Bioconjugate Chem.* **2002** 13 150-154
77. Rouba Abdel Malak, Zhinong Gao, James F. Wishart and Stephan S. Isied *J. Am. Chem. Soc.* **2004** 126 13888-13889
78. Robin C. Lasey, Liu Liu, Ling Zang, and Michael Y. Ogawa *Biochemistry* **2003** Vol. 42 No. 13 3905
79. Jingxi Pan, Yunhua Xu, Gabor Benkol, Yashar Feyziyev, Stenbjörn Styring, Licheng Sun, Björn Akermark, Tomas Polivka, and Villy Sundström *J. Phys. Chem. B* **2004** 108 12904-12910
80. Ann Magnuson, Helena Berglund, Peter Korall, Leif Hammarström, Björn Akermark, Stenbjörn Styring and Licheng Sun *J. Am. Chem. Soc.* **1997** 119 10720-10725
81. Da Ma, Stephanie E. Bettis, Kenneth Hanson, Maria Minakova, Leila Alibabaei, William Fondrie, Derek M. Ryan, Garegin A. Papoian, Thomas J. Meyer, Marcey L. Waters, and John M. Papanikolas *J. Am. Chem. Soc.* **2013** 135 (14) 5250–5253
82. Dale J. Wilger, Stephanie E. Bettis, Christopher K. Materese, Maria Minakova, Garegin A. Papoian, John M. Papanikolas, and Marcey L. Waters *Inorg. Chem.* **2012** 51 (21) 11324–11338
83. Lisa zur Borg, Anna L. Domanski, Aaron Breivogel, Mareike Burger, Rudiger Berger, Katja Heinze and Rudolf Zentel *J. Mater. Chem. C*, **2013** 1 1223–1230
84. Julio Píera and Jan-E. Bäckvall *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008** 47 3506–3523
85. Eva Katharina Kainmüller, Eulalia Pinyol Olle and Willi Bannwarth *Chem. Commun.* **2005** 5459–5461
86. Yohei Sano, Akira Onoda, Takashi Hayashi *Journal of Inorganic Biochemistry* (**2012**) 108 159–162
87. Cindy A. Puckett and Jacqueline K. Barton *J. Am. Chem. Soc.* **2009** 131 8738–8739
88. Peter E. Nielsen and Michael Egholm *Current Issues Molec. Biol.* **1999** 1(2) 89-104
89. Ramin Hamzavi, Thomas Happ, Katharina Weitershaus, Nils Metzler-Nolte *Journal of Organometallic Chemistry* **2004** 689 4745–4750
90. Hilary Brooks, Bernard Lebleu, Eric Vives *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005** 57 559–577

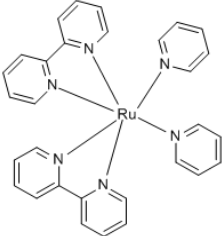
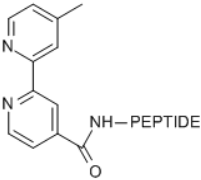
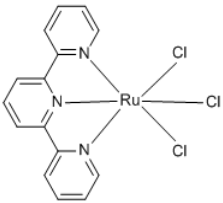
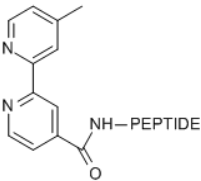
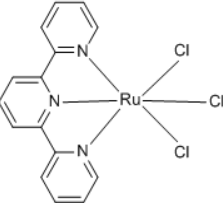
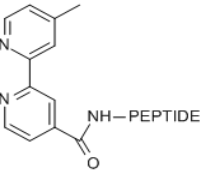
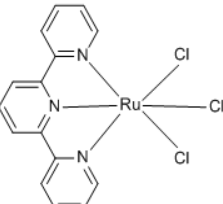
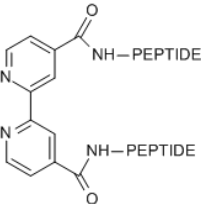
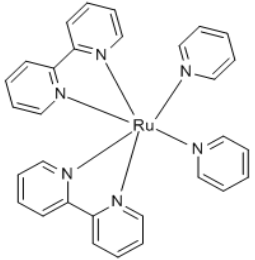
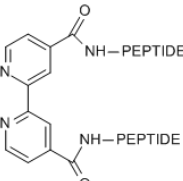
91. Vladimir P. Torchilin *Peptide Science* Vol. 90 No. 10 604-610
92. H. Bauke Albada, Florian Wieberneit, Ingrid Dijkgraaf, Jessica H. Harvey, Jennifer L. Whistler, Raphael Stoll, Nils Metzler-Nolte, and Richard H. Fish *J. Am. Chem. Soc.* **2012** 134 (25) 10321–10324
93. Caroline Bischof, Tanmaya Joshi, Aakanksha Dimri, Leone Spiccia and Ulrich Schatzschneider *Inorg. Chem.* **2013** 52 9297–9308
94. James W. Janetka and Daniel H. Rich *J. Am. Chem. Soc.* **1997** 119 6488-6495
95. Roland Kramer *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996** 35 No.11 1197-1199
96. Yasuzawa, Kunikatsu Shirahata and Hiroshi Sano *THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS* Vol. XL No.4 455-458
97. Eylon Yavin, Lev Weiner, Rina Arad-Yellin and Abraham Shanzer *J. Phys. Chem. A* **2004** 108 9274-9282
98. Bernd Geißer, Ralf Alsfasser *Inorganica Chimica Acta* **2003** 348 179-186
99. Hitoshi Ishida Yoshihisa Inoue *Biopolymers (Peptide Science)*, 2000 Vol. 55 469–478
100. Kuei-Hua Chang, Jen-Hai Liao, Chao-Tsen Chen, Barun K. Mehta, Pi-Tai Chou and Jim-Min Fang *J. Org. Chem.* **2005** 70 2026-2032
101. Yao Wenjuan, AlanLeGoff, NicolasSpinelli, MichaelHolzinger, Guo-WangDiao, Dan Shan, EricDefrancq, SergeCosnier *Biosensors and Bioelectronics* **2013** 42 556–562
102. JianhusWang, Garry S. Hanan *SYNLETT* **2005** No. 8 1251-1254
103. Long-Xuan Zhao, Tae Sung Kim, Soo-Hyun Ahn, Tae-Hyung Kim, Eun-kyung Kim, aWon-Jea Cho, Heesung Choi, Chong-Soon Lee, Jung-Ae Kim, Tae Cheon Jeong, Ching-jer Chang and Eung-Seok Lee *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001** 11 2659–2662
104. Arta Stublla and Pierre G. Potvin *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010** 3040–3050
105. Luminita Marilena Toma , Donatella Armentano, Giovanni De Munno ,Jorunn Sletten, Francesc Lloret, Miguel Julve *Polyhedron* **2007** 26 5263–5270
106. Tarighi S. Abbasi *A JSUT* **2007** 33 (2) 19-21
107. B.R. James, E Ochiai G.L. Rempel *Inorg. Nucl. Chem. Letters* **1971** Vol 7 781-784
108. Sipke H. Wadman, Remco W. A. Havenith, Frantisek Hartl, Martin Lutz, Anthony L. Spek, Gerard P. M. van Klink, and Gerard van Koten *Inorg. Chem.* **2009** 48 5685–5696
109. Kevin Barthelmes, Joachim Kübel, Andreas Winter, Maria Wächtler, Christian Friebe Benjamin Dietzek and Ulrich S. Schubert *Inorg. Chem.* **2015** 54 (7) 3159–3171
110. Janis Veliks, Olivier Blacque, and Jay S. Siegel *Inorg. Chem.* **2014** 53 12122–12126

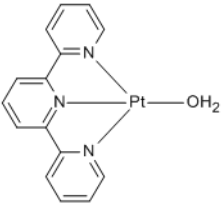
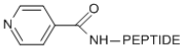
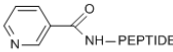
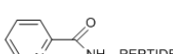
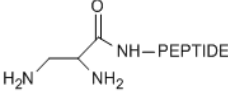
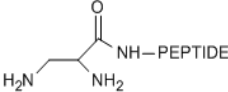
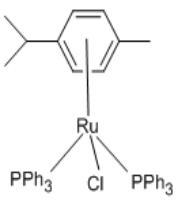
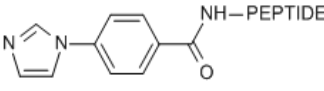
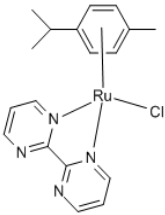
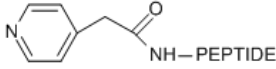
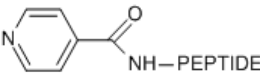
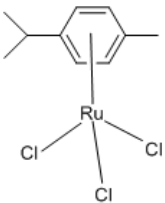
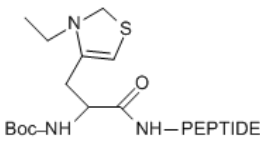
111. Alexander M. Breul , Joachim Kübel , Bernhard Häupler , Christian Friebe , Martin D. Hager , Andreas Winter , Benjamin Dietzek , Ulrich S. Schubert *Macromol. Rapid Commun.* **2014** 35 747–751
112. Pau Farr_s, Somnath Maji, Jordi Benet-Buchholz, and Antoni Llobet *Chem. Eur. J.* **2013** 19 7162 – 7172
113. S. J. Abraham, T. Kobayashi ,J. Solaro,V. Gaponenko *J Biomol NMR* **2009** 43 239–246
114. M . A. Weiss, D. J. Patel, R. T. Sauer, M. Kaplus *P roc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** 130-134
115. R. P. Boelens, M. Scheek, K. Diikstra, R. Kaptein *J. Magn. Reson* **1985** 62 378-286
116. S. H. Chou, D. R. Hare, D. E. Wemmer, B. R. Reid *Biochemistry* **1983** 22 3037-3041
117. A. M. Gronenborn, G. M. Clore, M. Brunori, B. Giardina, G. Falcioni, M. F. Perutz *J. Mol. Biol.* **1984** 178 731-742
118. E. L. Ulrich, E. M. M. John, G. R. Gough, M. J. Brunden, P.T. Gilham, W. M. Westler, J. L. Markley *Biochemistry* **1983** 22 4362-4365
119. S. Neidle *DNA structure and recognition* Oxford University Press Inc., New York **1994**
120. F. Aboulela, G. Varani, G. T. Walker, I. Tinoco *Nucleic Acids Res.* **1988** 16 3559-3572
121. R. A. G. Friedman, G.S. Manning *Biopolymers* **1984** 23 2671-2714
122. C. Bailly, J. B. Chaires, *Bioconjugate Chem.* **1998** 9 513-515
123. R. Lavery, K. Zakrzewska, B. Pulman *J. Biomol. Str. Dyn* **1986** 3 1155-1170
124. B. Mao, B.E. Hingerty, S. Broyde, D.J. Patel, *Biochemistry* **1998** 37 81–94
125. N. Korolev, A.P. Lyubartsev, A. Laaksonen, L. Nordenski, *Biophys. J.* **2002** 82 2860–2875
126. J.A. Parkinson, J. Barber, K.T. Douglas, J. Rosamond, D. Sharples, *Biochemistry* **1990** 29 10181–10190
127. P. Penalver, F. Marcelo, J. Jimenez-Barbero, C. Vicent, *Chem.-Eur. J.* **2011** 17 4561–4570.
128. J. Feigon, W.A. Denny, W. Leupin, D.R. Kearns, *J. Med. Chem.* **1984** 27 450–465.
129. J. Precechtelova, P. Novak, M.L. Munzarova, M. Kaupp, V. Sklenar, *J. Am. Chem. Soc.* **2010** 132 17139–17148
130. R. Cerdan, D. Collin, F.o. Lenouvel, B. Felenbok, E. Guittet, *FEBS Lett.* **1997** 408 235–240
131. W.D. Wilson, Y. Li, J.M. Veal, in: L.H. Hurley (Ed.), *Advances in DNA Sequence Specific Agents* **1992** vol. 1 JAI Press
132. M.P. Bhate, J.C. Woodard, M.A. Mehta, *J. Am. Chem. Soc.* **2009** 131 9579–9589.

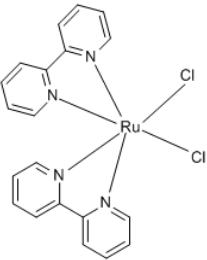
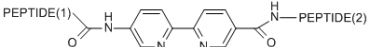
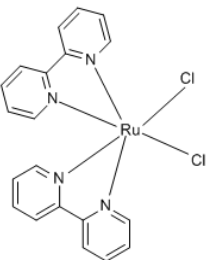
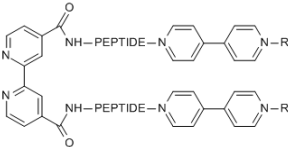
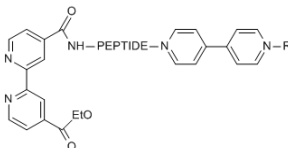
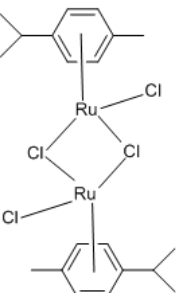
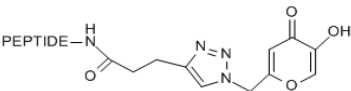
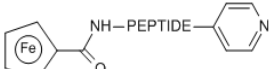
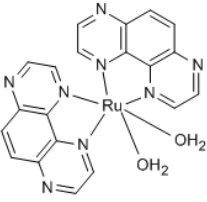
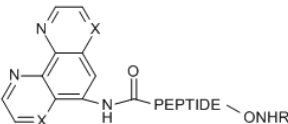
133. L. Strekowski, D.B. Harden, R.L. Wydra, K.D. Stewart, W.D. Wilson, J. Mol. Recogn. **1989** 2 158
134. Amira F. El-Yazbi , Glen R. Loppnow Trends in Analytical Chemistry **2014** 61 83–91
135. Ernst S. Henle and Stuart Linn J. Biol. Chem.. **1997** Vol. 272 No. 31, 19095–19098,
136. Rajesh P. Rastogi, Richa, Ashok Kumar, Madhu B. Tyagi, and Rajeshwar P. Sinha 2010 *Volume 2010* Article ID 592980
137. M. S. Cooke, M. D. Evans, M. Dizdaroglou and J. Lunec **2003** Vol. 17 1195-1214
138. S. Karkabounas, K. Havelas, O.K. Kostoula, P. Vezyraki, A. Avdikos, J. Binolis, G. Hatziavazis, A. Metsios, I. Verginadis, A. Evangelou, Hell. J. Nucl. Med. **2006** 9 167.
139. A. Avdikos, S. Karkabounas, A. Metsios, O. Kostoula, K. Havelas, J. Binolis, I. Verginadis, G. Hatziaivazis, I. Simos, A. Evangelou, Hell. J. Nucl. Med. 2007 10 95.
140. M.N. Xanthopoulou, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, N. Kourkoumelis, E.R. Milaeva, Y.A. Gracheva, V.Y. Tyurin, I. Verginadis, S. Karkabounas, M. Baril, I.S. Butler, Russ. Chem. **2007** B 56 767
141. S. Zartilas, S.K. Hadjikakou, N. Hadjiliadis, N. Kourkoumelis, L. Kyros, M. Kubicki, M. Baril, I.S. Butler, S. Karkabounas, J. Balzarini, Inorg. Chim. Acta **2009** 362 1003.
142. K. Karidi, A. Garoufis, A. Tsipis, N. Hadjiliadis, H. den Dulk, J. Reedijk, Dalton Trans. **2005** 1176.
143. A.C.G. Hotze, M. Bacac, A.H. Velders, B.A.J. Jansen, H. Kooijman, A.L. Spek, J.G. Haasnoot, J. Reedijk, J. Med. Chem. **2003** 46 1743.

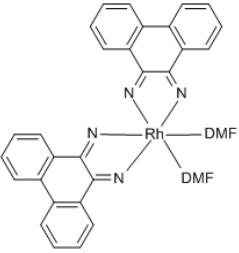
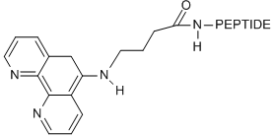
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Σ1

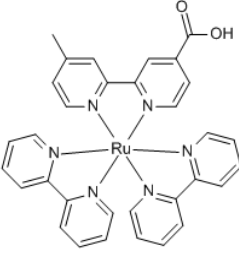
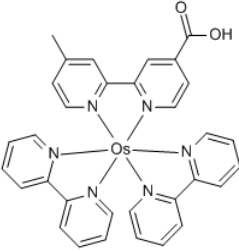
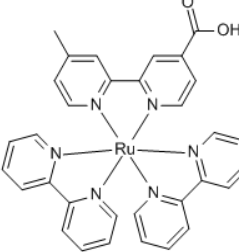
	Μεταλλικό σύμπλοκο ή ιόν	Συζευγμένος υποκαταστάτης	Πεπτίδιο ή αμινοξύ	Αναφορά
1			-Gly-Lys-Lys, -Lys-Gly-Lys, -Lys-Lys-Gly,	2
2			-Ala -Trp	1
3			-Gly-His-Lys	4
4			-Lys	6
5			-Ala, -Lys, -His, -Tyr,	5

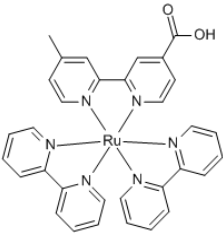
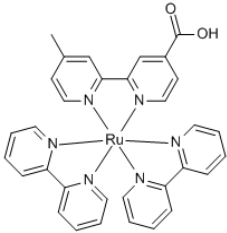
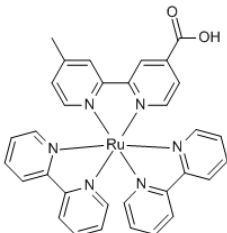
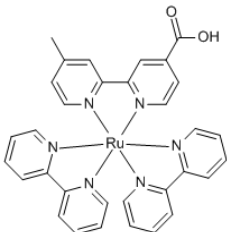
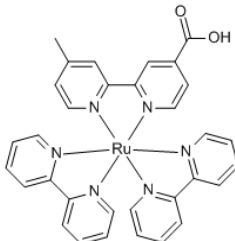
6		1)  2)  3) 	-Lys-Lys	3
7	K_2PtCl_4		18Peptide	9
8	K_2PtCl_4		-Gly-Arg	10
9			octeotide	8
10			-Arg-Gly-Asp octeotide	11
11	trans-[RuCl(NH ₃) ₄ (SO ₂)]Cl		Tat48-60	13
12			-Leu, -Leu-Phe	17

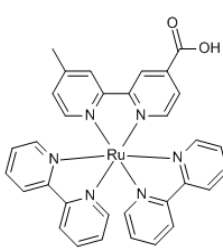
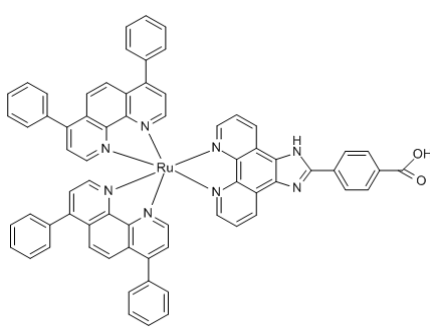
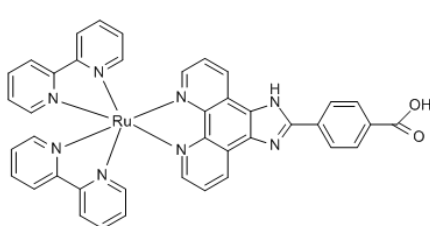
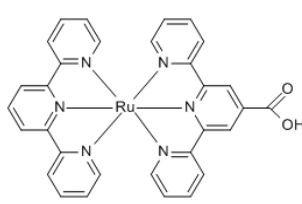
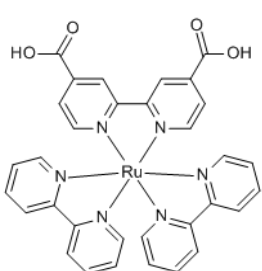
13			Ala-Leu- -Val-Tyr-Gly	12
14		1)  2) 	-Asp, -Asp-Asp	16
15			-[Leu ⁵]-enkephalin	14
16	$[\text{Pd}(\text{MeCN})_4](\text{BF}_4)_4$		-Ala-Pro-	15
17			-Gly-	18

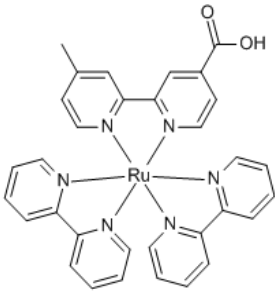
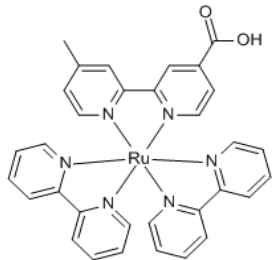
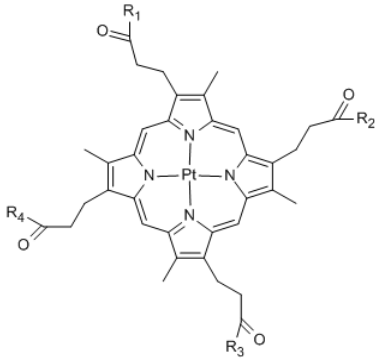
18			-18Peptide	43,44
----	---	---	------------	-------

Πίνακας Σ2

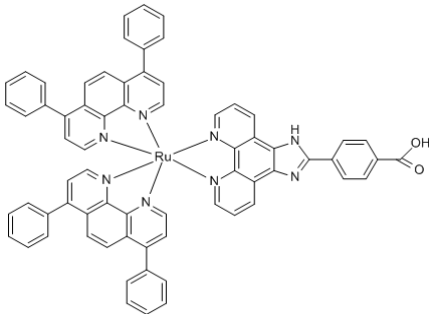
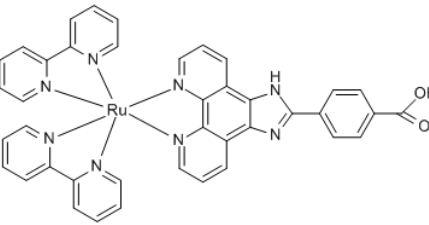
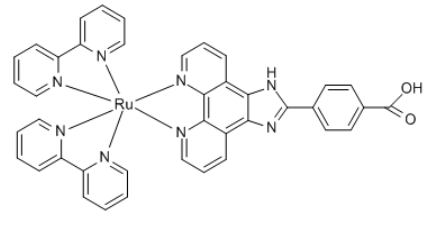
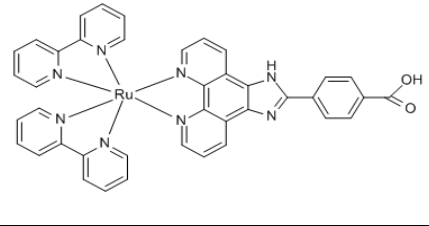
	Μεταλλικό σύμπλοκο	Πεπτίδιο ή αμινοξύ	Αντιδραστήρια σύζευξης	Αναφορά
1		-Lys	HOSu DCC	20
2		-Lys	BOP HOBt NMM DMAP	21
3		-Lys-	PYBOP NMM	22

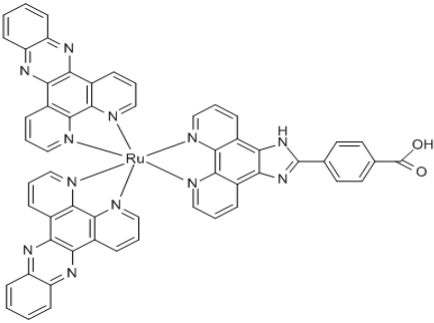
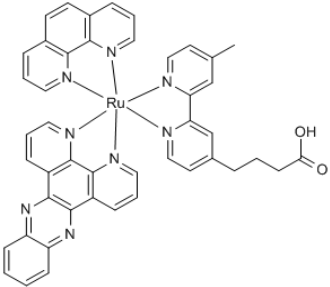
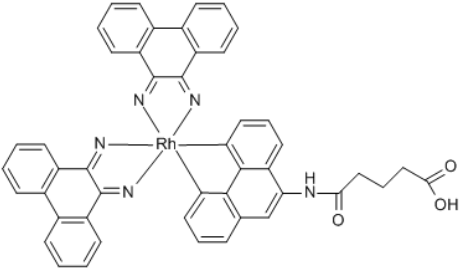
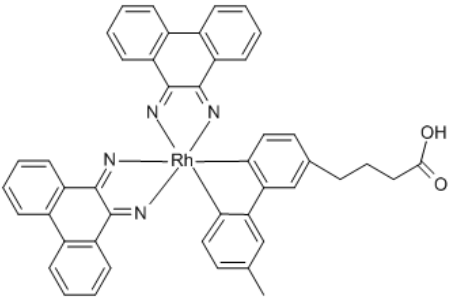
4		-Lys-	PYBOP NMM	23
5		-Pro-Pro-	DIC HOBt NMM	25
6		-Lys	HOSu DCC	27
7		-Lys	HOSu DCC	28
8		-Lys-	HOSu DCC	29

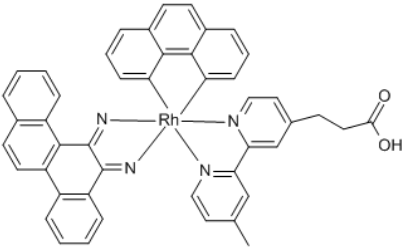
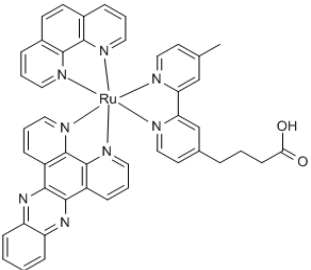
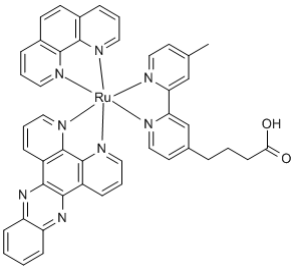
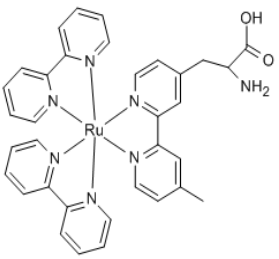
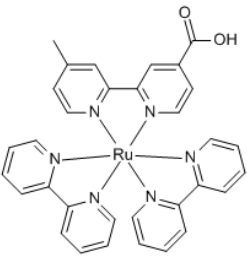
9		-Lys-	HOSu DCC	24
10		-Gly-Ahx-Arg- Gly-Asp-Ser	HOSu DCC	30
11		-Gly-Ahx-Arg- Gly-Asp-Ser	HOSu DCC	30
12		B-chain of insulin	HOSu WSCD	33
13		-8peptide	HOSu DCC PBS	31

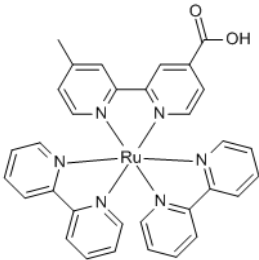
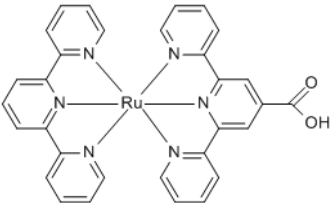
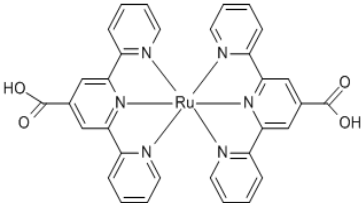
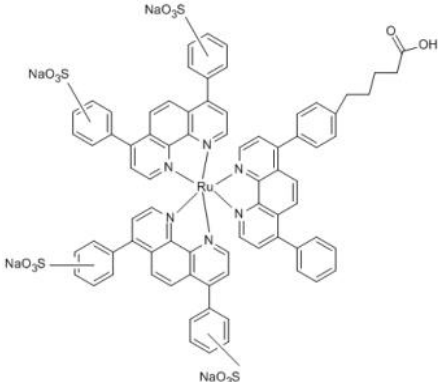
14		-(pro) _n -	DIC HOBt	34
15		-(pro) _n -	DIC HOBt	35
16		-Arg, -Ala, -Ser, -Gly, -peptides	MI Et ₃ N	36

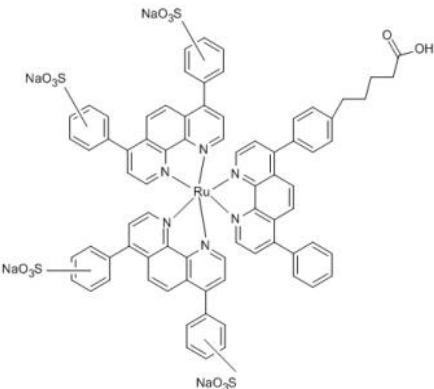
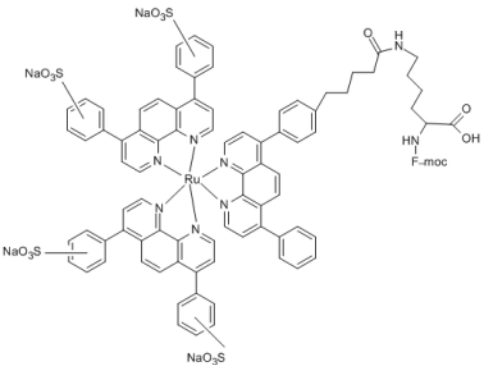
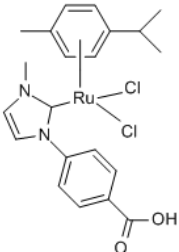
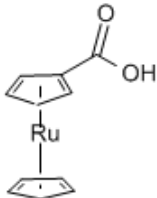
Πίνακας Σ3

	Μεταλλικό σύμπλοκο	Πεπτίδιο ή αμινοξύ	Αντιδραστήρια σύζευξης	Αναφορά
1		-Ala-10peptide	PyBOP HOBt DIPEA	40
2		-Ala-10peptide	PyBOP HOBt DIPEA	40
3		-Ahx-(Arg) ₅	PyBOP HOBt DIPEA	41,38
4		-Ahx-(Arg) ₈	PyBOP HOBt DIPEA	41,38

5		-Ahx-(Arg) ₈	PyBOP HOBt DIPEA	39
6		-Ala-Lys-Tyr- Lys-Gly	PyBOP DIPEA	37
7		-13peptide	PyBOP DIPEA	43,44
8		-P1,-Bam	PyBOP DIPEA	48

9		-Lys-(Arg) ₈ -	HOBt HOBU DIPEA	46
10		-(Arg) ₅ -Lys-	PyBOP DIPEA	45
11		-His-	PyBOP DIPEA	47
12		-22peptide	HATU	49,50
13		-7peptide	HOBt DCC	51

14		-Gly-His-Lys	HOBt DCC	52
15		-Trp, -Gly-Trp	PyBOP DIPEA	53
16		-Trp, -Gly-Trp	PyBOP DIPEA	53
17		-8peptide, -10peptide	TSTU i-Pr ₂ NEt	55

18		10peptide	TBTU i-Pr ₂ NEt	54
19		7peptide, 7peptide	TBTU i-Pr ₂ NEt	56
20		-enkephalin	HOBt	57
21		PNA	HOBt HATU DIPEA	58

22		-enkephalin	HOBt TBTU DIPEA	59
23		-enkephalin	HOBt TBTU DIPEA	60
24		TAT	CDI	62
25		pNt, octreotate	HOBt TBTU DIPEA	63
26		13peptide	HOBt BOP NMM	64

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Konstantinos Ypsilantis, Spyridon Karkabounas, Elena Georgiou, Ioannis Zelovitis, Journal of Bioorganic Chemistry **2013** 127 13–23
Synthesis, characterization and interactions with the oligonucleotide d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ of bis(terpyridine)ruthenium(II)–peptide conjugates
2. Konstantina Karidi, Konstantinos Ypsilantis, Athanasios Papakyriakou, Achilleas Garoufis Journal of Bioorganic Chemistry **2013** 127 13–23
Synthesis and characterization of ruthenium(II)–oligopyridine–peptide conjugates. Interactions of the diastereomers Δ - and Λ -[Ru(bpy)₂(4-COY-4'-Mebpy)]Cl₂ (Y = Gly-Lys¹-Lys²CONH₂, Lys¹-Gly-Lys²CONH₂, Lys¹-Lys²-GlyCONH₂) with the oligonucleotide d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂
3. Konstantinos Ypsilantis, Emmanouil Manos, John Plakatouras, Achilleas Garoufis
Synthesis, characterization and interactions with the oligonucleotide d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ of binuclear Ru(II)/Ru(II) complexes *in preparation*
4. Konstantinos Ypsilantis, Achilleas Garoufis
Synthetic strategies and applications of Platinum group metals with oligopyridine–peptide conjugates. *in preparation*

ΕΝΑ ΑΛΗΘΙΝΟ ΠΑΡΑΜΥΘΙ

ΗΤΑΝ ΚΑΠΟΤΕ ΕΝΑΣ ΓΛΥΚΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΑΜΑ ΑΥΣΤΗΡΟΣ ΚΥΡΙΟΣ

ΔΕΝ ΗΤΑΝ ΨΗΛΟΣ, ΑΛΛΑ ΗΤΑΝ ΜΕΓΑΛΟΣΩΜΟΣ
ΚΑΙ ΠΟΛΥ ΠΟΛΥ ΔΥΝΑΤΟΣ...

ΚΑΝΕΝΑΣ ΔΕΝ ΓΝΩΡΙΖΕ ΓΙΑΤΙ...

ΟΛΟΙ ΝΟΜΙΖΑΝ ΟΤΙ ΓΕΝΝΗΘΗΚΕ 52 ΧΡΟΝΩΝ.

ΜΟΝΟ Η ΜΑΜΑ ΤΟΥ Ο ΜΠΑΜΠΑΣ
ΤΟΥ ΚΑΙ Ο ΜΕΓΑΛΟΣ ΤΟΥ ΑΔΕΡΦΟΣ ΤΟΝ ΕΙΧΑΝ ΔΕΙ ΜΩΡΟ

Ο ΓΛΥΚΟΣ ΑΥΣΤΗΡΟΣ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΣ ΚΥΡΙΟΣ ΕΙΧΕ ΔΥΟ
ΜΙΚΡΑ ΠΑΙΔΑΚΙΑ, ΕΝΑ ΞΑΝΘΟ ΑΓΟΡΑΚΙ ΤΟ ΝΤΙΝΑΚΟ ΚΑΙ ΕΝΑ ΑΣΧΗΜΟ
ΚΟΡΙΤΣΑΚΙ ΜΕ ΑΡΑΙΑ ΔΟΝΤΙΑ ΠΟΥ ΕΚΛΑΙΓΕ ΣΥΝΕΧΕΙΑ ΤΟ ΟΛΓΑΚΙ

ΕΚΤΟΣ ΑΠΟ ΤΑ
ΜΙΚΡΑ ΠΑΙΔΑΚΙΑ ΤΟΥ, Ο ΓΛΥΚΟΣ ΑΥΣΤΗΡΟΣ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΣ ΚΥΡΙΟΣ ΕΙΧΕ
ΑΚΟΜΗ ΜΙΑ ΑΓΑΠΗ...

ΤΟΥ ΑΡΕΣΕ ΝΑ ΚΑΠΝΙΖΕΙ...

ΑΝ ΚΑΙ ΟΠΩΣ ΕΛΕΓΕ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ, ΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΔΕΝ ΚΑΝΕΙ ΚΑΛΟ.

ΤΟΝ ΓΛΥΚΟ ΑΥΣΤΗΡΟ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟ ΚΥΡΙΟ
ΤΟΝ ΕΛΕΓΑΝ ΣΤΑΜΑΤΗ ΑΛΛΑ ΟΣΟΙ ΤΟΝ ΑΓΑΠΟΥΣΑΝ ΤΟΝ ΦΩΝΑΖΑΝ
ΜΑΚΗ.

ΟΤΑΝ Ο ΓΛΥΚΟΣ ΑΥΣΤΗΡΟΣ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΣ ΚΥΡΙΟΣ
ΚΟΙΤΟΥΣΕ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΚΑΙ ΚΑΠΝΙΖΕ

ΕΛΑΜΠΕ ΤΟ ΠΡΟΣΩΠΟ ΤΟΥ, ΣΑΝ ΦΑΝΑΡΑΚΙ ΤΟΥ ΠΑΣΧΑ

ΠΑΝΤΑ, ΚΑΘΕ ΣΤΙΓΜΗ, ΚΑΘΕ ΦΟΡΑ

ΤΑ ΧΡΟΝΙΑ ΟΜΩΣ ΠΕΡΑΣΑΝ

Ο ΜΙΚΡΟΣ ΝΤΙΝΑΚΟΣ
ΜΕΓΑΛΩΣΕ... ΠΕΡΑΣΕ ΣΤΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ... ΚΑΙ ΕΦΥΓΕ ΓΙΑ ΕΝΑ
ΜΑΚΡΙΝΟ ΧΩΡΙΟ.

Ο ΓΛΥΚΟΣ ΑΥΣΤΗΡΟΣ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΣ
ΚΥΡΙΟΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ-Ε ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΑΥΣΤΗΡΟΣ... ΑΛΛΑ ΚΑΝΕΙΣ ΔΕΝ
ΚΑΤΑΛΑΒΕ ΓΙΑΤΙ. ΓΙΑΤΙ;

ΤΟ ΑΣΧΗΜΟ ΚΟΡΙΤΣΑΚΙ ΜΕ ΤΑ ΑΡΑΙΑ ΔΟΝΤΙΑ ΠΟΥ ΕΚΛΑΙΓΕ
ΣΥΝΕΧΕΙΑ, ΕΙΧΕ ΜΕΓΑΛΩΣΕΙ ΚΑΙ ΕΙΧΕ ΓΙΝΕΙ ΜΙΑ ΟΜΟΡΦΗ ΚΟΠΕΛΑ. Η
ΟΜΟΡΦΗ ΠΡΙΓΚΙΠΙΣΣΑ, ΤΟΥ ΜΠΑΜΠΙΑ ΤΗΣ, ΠΕΡΑΣΕ ΚΑΙ ΑΥΤΗ ΣΤΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΑΙ ΕΦΥΓΕ ΓΙΑ ΕΝΑ ΜΑΚΡΙΝΟ ΝΗΣΙ...

ΤΟΤΕ,
Ο ΓΛΥΚΟΣ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΣ ΚΥΡΙΟΣ ΕΧΑΣΕ ΤΗΝ ΔΥΝΑΜΗ ΤΟΥ ΚΑΙ ΕΜΕΙΝΕ
ΜΟΝΟ ΓΛΥΚΟΣ

ΑΛΛΑ ΚΑΝΕΙΣ ΔΕΝ ΚΑΤΑΛΑΒΕ ΓΙΑΤΙ. ΓΙΑΤΙ;
ΤΑ ΜΕΓΑΛΑ ΤΟΥ ΠΑΙΔΙΑ ΚΑΤΑΛΑΒΑΝ ΟΤΙ Ο ΜΠΑΜΠΙΑΣ ΤΟΥΣ ΔΕΝ ΗΤΑΝ
ΠΟΤΕ ΑΥΣΤΗΡΟΣ ΚΑΙ ΔΕΝ ΗΤΑΝ ΚΑΘΟΛΟΥ ΔΥΝΑΤΟΣ ΑΛΛΑ ΗΤΑΝ
ΦΟΒΙΣΜΕΝΟΣ ΚΑΙ ΑΔΥΝΑΜΟΣ...

ΑΛΛΑ ΗΤΑΝ ΤΟΣΟ ΓΛΥΚΟΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΤΑ ΕΝΟΙΑΖΕ
ΤΑ ΧΡΙΣΤΟΥΓΕΝΝΑ, ΤΟ ΠΑΣΧΑ ΚΑΙ ΤΑ ΚΑΛΟΚΑΙΡΙΑ, ΟΤΑΝ ΤΑ ΜΕΓΑΛΑ
ΠΛΕΟΝ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΓΥΡΙΖΑΝ ΣΠΙΤΙ, ΕΒΛΕΠΑΝ ΤΟ ΚΥΡΙΟ ΣΤΑΜΑΤΗ ΝΑ
ΓΙΝΕΤΑΙ ΤΟ ΠΑΙΔΙ ΠΟΥ ΔΕΝ ΕΙΧΕ ΔΕΙ ΠΟΤΕ ΚΑΝΕΝΑΣ ΕΚΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ
ΜΑΜΑ ΤΟΥ, ΤΟΝ ΜΠΑΜΠΙΑ ΤΟΥ ΚΑΙ ΤΟΝ ΜΕΓΑΛΟ ΤΟΥ ΑΔΕΡΦΟ.

Ο ΓΛΥΚΟΣ ΚΥΡΙΟΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΕΚΑΝΕ ΟΛΑ ΤΑ
ΧΑΤΙΡΙΑ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ...

ΟΙ ΠΙΟ ΕΥΤΥΧΙΣΜΕΝΕΣ ΣΤΙΓΜΕΣ ΤΟΥ,
ΗΤΑΝ ΟΤΑΝ ΚΑΘΟΝΤΟΥΣΑΝ ΟΛΟΙ ΓΥΡΩ ΑΠΟ ΤΟ ΤΡΑΠΕΖΙ.

ΜΕΤΑ ΤΟ
ΦΑΓΗΤΟ ΑΝΑΒΕ ΤΟ ΑΓΑΠΗΜΕΝΟ ΤΟΥ ΤΡΙΑΚΟΣΤΟ ΤΣΙΓΑΡΟ ΚΑΙ ΕΛΕΓΕ
ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΟΤΙ ΘΑ ΣΤΑΜΑΤΗΣΕΙ ΝΑ ΚΑΠΝΙΖΕΙ ΓΙΑΤΙ ΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΔΕΝ
ΚΑΝΕΙ ΚΑΛΟ.

ΟΤΑΝ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ ΚΥΡΙΟΥ ΣΤΑΜΑΤΗ
ΕΦΕΥΓΑΝ ΓΙΑ ΤΑ ΜΑΚΡΙΝΑ ΤΟΥΣ ΜΕΡΗ,

ΔΑΚΡΥΖΕ ΠΑΝΤΑ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΜΕΝΕ ΜΟΝΟ ΤΗΝ ΣΤΙΓΜΗ ΠΟΥ ΘΑ ΞΑΝΑΓΥΡΙΖΑΝ ΠΙΣΩ...

ΑΝ ΚΑΙ ΒΑΘΕΙΑ ΜΕΣΑ ΤΟΥ ΗΞΕΡΕ...

ΟΤΙ ΔΕΝ ΘΑ ΞΑΝΑΓΥΡΙΖΑΝ ΚΟΝΤΑ ΤΟΥ...
ΟΤΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΑ ΣΚΕΠΑΖΕΙ ΚΑΘΕ ΒΡΑΔΥ

ΟΤΙ ΟΣΟ ΚΑΙ ΝΑ ΠΕΡΙΜΕΝΕΙ ΣΤΟ
ΜΠΑΛΚΟΝΙ ΤΟ ΒΡΑΔΥ

ΟΣΑ ΤΣΙΓΑΡΑ ΚΑΙ ΝΑ ΚΑΝΕΙ ΤΑ ΜΕΓΑΛΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ
ΘΑ ΓΥΡΙΖΑΝ ΜΟΝΟ ΤΑ ΧΡΙΣΤΟΥΓΕΝΝΑ, ΤΟ ΠΑΣΧΑ ΚΑΙ ΛΙΓΟ ΤΟ
ΚΑΛΟΚΑΙΡΙ.

ΜΙΑ ΒΡΟΧΕΡΗ ΜΕΡΑ
Ο ΓΛΥΚΟΣ ΚΥΡΙΟΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΑΡΡΩΣΤΗΣΕ,
ΓΙΑΤΙ ΟΠΩΣ ΕΛΕΓΕ...

ΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΔΕΝ ΚΑΝΕΙ ΚΑΛΟ

Ο ΓΙΑΤΡΟΣ ΤΟΥ ΕΙΠΕ ΟΤΙ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΣΤΑΜΑΤΗΣΕΙ
ΝΑ ΚΑΠΝΙΖΕΙ ΓΙΑΤΙ ΑΛΛΙΩΣ ΔΕΝ ΘΑ ΞΑΝΑΕΒΛΕΠΕ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ.

ΧΩΡΙΣ ΝΑ ΤΟ ΣΚΕΦΤΕΙ, ΕΚΟΨΕ ΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ
ΚΑΙ ΤΩΡΑ ΑΓΑΠΟΥΣΕ ΜΟΝΟ ΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΤΟΥ.

ΚΑΠΟΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΝΟΣ ΔΕΚΕΜΒΡΗ

Ο ΜΕΓΑΛΟΣ ΤΟΥ ΓΙΟΣ ΗΤΑΝ ΤΟΣΟ
ΕΥΤΥΧΙΣΜΕΝΟΣ ... ΤΑ ΕΙΧΕ ΟΛΑ...

ΠΗΡΕ ΕΝΑ ΧΑΡΤΑΚΙ ΚΑΙ ΕΓΡΑΨΕ ΟΤΙ
ΕΙΝΑΙ Η ΠΙΟ ΕΥΤΥΧΙΣΜΕΝΗ ΜΕΡΑ ΣΤΗΝ ΖΩΗ ΤΟΥ...

ΤΟ ΒΡΑΔΥ ΕΚΕΙΝΗΣ ΤΗΣ
ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ Ο ΜΕΓΑΛΟΣ ΤΟΥ ΓΙΟΣ ΒΓΗΚΕ ΜΕ ΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΠΟΥ
ΑΓΑΠΟΥΣΕ ΚΑΙ ΤΟ ΠΡΩΙ ΑΡΓΗΣΕ ΝΑ ΞΥΠΝΗΣΕΙ.

ΤΟ ΑΠΟΓΕΥΜΑ ΤΟΥ ΣΑΒΒΑΤΟΥ
Ο ΝΤΙΝΑΚΟΣ ΕΠΑΙΡΝΕ ΤΟ ΓΛΥΚΟ ΚΥΡΙΟ ΣΤΑΜΑΤΗ ΤΗΛΕΦΩΝΟ... ΟΠΩΣ
ΚΑΘΕ ΜΕΡΑ...

Ο ΓΛΥΚΟΣ ΚΥΡΙΟΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ
ΔΕΝ ΑΠΑΝΤΟΥΣΕ ΣΤΟ ΤΗΛΕΦΩΝΟ...

ΚΑΙ ΔΕΝ ΑΠΑΝΤΗΣΕ ΠΟΤΕ...

ΑΥΤΟΣ Ο ΠΟΛΥ ΓΛΥΚΟΣ ΚΥΡΙΟΣ ΕΙΝΑΙ Ο ΜΠΑΜΠΑΣ
ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΟΝ ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΠΟΥ ΜΑΣ ΧΑΡΙΣΕ ΤΙΣ ΑΔΥΝΑΜΙΕΣ ΤΟΥ ΚΑΙ
ΜΑΣ ΕΔΕΙΞΕ ΤΟΥΣ ΦΟΒΟΥΣ ΤΟΥ.