

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διπυρηνικά σύμπλοκα του Ru(II) τύπου διπλού "piano stool": συσχέτιση της σύνδεσής τους στο DNA με την κυτταροτοξική τους δραστικότητα.



Γεωργακοπούλου Χριστίνα

Χημικός

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

IΩANNINA 2022

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Σχολή Θετικών Επιστημών-Τμήμα Χημείας Γεωργακοπούλου Χριστίνα, Χημικός Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπων Καθηγητής: Αχιλλέας Γαρούφης Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής: Ιωάννης Πλακατούρας, Γεράσιμος Μαλανδρίνος Ιωάννινα 2022



UNIVERSITY OF IOANNINA SCIENCE FACULTY CHEMISTRY DEPARTMENT

Binuclear Ru(II) double "piano stool" type complexes: correlation of their DNA binding with their cytotoxic activity.



Georgakopoulou Christina

Chemist

MASTER CERTIFICATE

IOANNINA 2022

## Πρόλογος

Η εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας για την απόκτηση Διπλώματος Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης του Τμήματος Χημείας, πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τη χρονική περίοδο Οκτώβριος 2020 – Οκτώβριος 2022. Η ανάθεση του θέματος, η επίβλεψη και η καθοδήγηση έγινε από τον καθηγητή Ανόργανης Χημείας κ. Αχιλλέα Γαρούφη.

Πρωτίστως αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Αχιλλέα Γαρούφη όχι μόνο για την εμπιστοσύνη και την επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και για τη γενικότερη στήριξη, βοήθεια και κατανόηση που επέδειξε κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου έρευνας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τους μεταδιδάκτορες του εργαστηρίου Δρ. Θεόδωρο Τσώλη και Δρ. Κωνσταντίνο Υψηλάντη για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν και τις γνώσεις που με βοήθησαν να αποκομίσω, καθώς και τους διδακτορικούς ερευνητές και συνεργάτες μου στο εργαστήριο Αντωνία Γαρυπίδου, Ευαγγελία Σιφναίου και Θώμο Δημήτριο για τις συμβουλές, αλλά και για την άψογη και ευχάριστη συνεργασία μας. Επιπλέον θα ήθελα να πω ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του τομέα Ανόργανης Χημείας για το εξαιρετικό κλίμα και τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Δε θα μπορούσα να μην εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στο Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την παροχή πρόσβασης στις εγκαταστάσεις, την ερευνητική ομάδα του κ. Καλαμπούνια του τομέα της Φυσικοχημείας για τις θεωρητικές μελέτες molecular docking, καθώς και την ερευνητική ομάδα της κ. Μαγκλάρα από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις κυτταροτοξικές μελέτες.

Νιώθω τέλος την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια και τους φίλους μου για τη στήριξη που μου παρείχαν με κάθε δυνατό τρόπο, υλικό και ηθικό, έτσι ώστε να καταφέρω να ολοκληρώσω τη μεταπτυχιακή μου διατριβή.

## Περιεχόμενα

Πρόλογος	- 4 -		
Σκοπός	- 9 -		
Περίληψη	- 10 -		
Abstract	- 11 -		
Κεφάλαιο 1: Ι	Εισαγωγή 12 -		
1.1 Δομή το	ou DNA 12 -		
1.1.1.	Γενικές πληροφορίες 12 -		
1.1.2.	Αζωτούχες βάσεις 13 -		
1.1.3.	Σάκχαρο 14 -		
1.1.4.	Διαμορφώσεις syn και anti του γλυκοζιτικού δεσμού		
1.1.5.	Το μοντέλο της διπλής έλικας 16 -		
1.1.6.	Άλλες διαμορφώσεις του DNA, -A,-B,-Z DNA 18 -		
1.2. Είδη α	λληλεπίδρασης των νουκλεϊκών οξέων με μικρά μόρια		
1.2.1 Γενικά 21			
1.2.2. Oµ	ιοιοπολικές αλληλεπιδράσεις 21 -		
1.2.3. M	η ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις 22 -		
1.3. Αντικα	ρκινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου 29 -		
1.3.1 Γεν	νικά 29 -		
1.3.2. Σύ	μπλοκα του ρουθηνίου με αρένια 31 -		
<b>1.3.3</b> . Δι	μεταλλικά αντικαρκινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου		
1.4 Χρήση σύμπλοκω	φασματοσκοπίας NMR στη μελέτη αλληλεπίδρασης νουκλεϊκών οξέων- ν ενώσεων		
1.5 Χρήση σύμπλοκω	φασματοσκοπίας φθορισμού στη μελέτη αλληλεπίδρασης νουκλεϊκών οξέων- ν ενώσεων		
Κεφάλαιο 2: Ι	Πειραματικό Μέρος 46 -		
2.1. Αντιδρ	αστήρια και ενώσεις 46 -		
2.2. Οργαν	ολογία 46 -		
2.3 Μέθοδ	οι 47 -		
2.4. Υπολογ	γισμός σταθερών πρόσδεσης και θερμοδυναμικών μεγεθών		
Κεφάλαιο 3: /	Αποτελέσματα- Συζήτηση 50 -		
3.1 Χαρακτ	ηρισμός ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-GCGCAATTCGCG-3')₂ 50 -		
3.1.1. Ал	τόδοση μη ανταλλάξιμων πρωτονίων 50 -		
3.1.2 Απ	όδοση ανταλλάξιμων πρωτονίων 55 -		
3.2 Μελέτr CGCGAATT	ן αλληλεπιδράσεων NMR των συμπλόκων με την αλληλουχία DNA d(5'- CGCG-3')2 58 -		

3.2.1. Μελέτη αλληλεπιδράσεων NMR του συμπλόκου {[(η <sup>6</sup> -cym)Ru(phen)]₂(BL-1)}Cl₄ με την αλληλουχία DNA d(5΄-CGCGAATTCGCG-3΄)₂
3.2.2. Μελέτη αλληλεπιδράσεων NMR του συμπλόκου (5)Cl₄ με την αλληλουχία DNA d(5'-CGCGAATTCGCG-3')2 65 -
3.2.3. Μελέτη αλληλεπιδράσεων NMR του συμπλόκου (6)Cl₄ με την αλληλουχία DNA d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ 71 -
3.2.4. Μελέτη αλληλεπιδράσεων NMR του μονοπυρηνικού συμπλόκου [(η <sup>6</sup> - cym)Ru(phen)(py)]Cl₂ ( <b>7</b> )Cl₂ με την αλληλουχία DNA d(5΄-CGCGAATTCGCG-3΄)₂ 76 -
3.5. Μελέτες απόσβεσης φθορισμού των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συμπλόκων ( <b>4</b> )Cl₄, ( <b>5</b> )Cl₄, ( <b>6</b> )Cl₄ και του μονοπυρηνικού ( <b>7</b> )Cl₂ με την αλληλουχία DNA d(5΄- CGCGAATTCGCG-3΄)₂78 -
3.6.Μελέτες Molecular docking 81 -
3.7. Κυτταροτοξικές μελέτες 82 -
Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα 84 -
Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία 86 -
Κεφάλαιο 6: Παράρτημα 89 -

## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του DNA και μιας σειράς διπυρηνικών συμπλόκων του ρουθηνίου (ΙΙ) με αρένια, [ $\eta^{6}$ arene-Ru(II)]. Η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα σύμπλοκα με γενικό τύπο { $[(\eta^6-cym)Ru(L)]_2(\mu-BL)$ }Cl<sub>4</sub>, cym = p-κουμένιο, L = 2,2'-διπυριδίνη (bpy) ή 1,10φαινανθρολίνη (phen), BL = 4,4'-διπυριδίνη (BL-1), 1,2-δις(4-πυριδιλ-)αιθάνιο (BL-2) 1,3-δις(4-πυριδιλ-)προπάνιο (BL-3) και το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'και CGCGAATTCGCG-3')2 είχε ως στόχο τον προσδιορισμό του τύπου πρόσδεσης στο DNA και κατ' επέκταση την αξιολόγηση των συμπλόκων στην πρόκληση μεταβολών στη δομή της διπλής έλικας. Ο χαρακτηρισμός του τύπου πρόσδεσης, μέσω φασματοσκοπίας Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (NMR), καθώς και της σταθεράς πρόσδεσης, μέσω μελετών φθορισμού συμβάλλουν σε συνδυασμό με κυτταροτοξικές μελέτες στην αξιολόγηση της αντικαρκινικής δραστικότητας των παραπάνω συμπλόκων και τη συσχέτιση του τύπου πρόσδεσής τους στο DNA με αυτή.

## Περίληψη

Το αυτοσυμπληρωματικό ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, γνωστό και ως δωδεκαμερές Dickerson χαρακτηρίστηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR μίας και δύο διαστάσεων και κατόπιν χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μιας σειράς διπυρηνικών συμπλόκων του τύπου  $\eta^{6}$ arene-Ru(II) με το DNA . Τα σύμπλοκα που χρησιμοποιήθηκαν έχουν τον γενικό τύπο {[( $\eta^{6}$ -cym)Ru(L)]<sub>2</sub>( $\mu$ -BL)}Cl<sub>4</sub>, cym = p-κουμένιο, L = 2,2'-διπυριδίνη (bpy) ή 1,10φαινανθρολίνη (phen), BL = 4,4'-διπυριδίνη (BL-1), 1,2-δις(4-πυριδίλ-)αιθάνιο (BL-2) και 1,3-δις(4-πυριδιλ-)προπάνιο (BL-3). Τα σύμπλοκα που φέρουν φαινανθρολίνη, δηλαδή τα {[( $\eta^{6}$ -cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>( $\mu$ -BL-i)}Cl<sub>4</sub> , [i = 1, 2, 3 ή (4)Cl<sub>4</sub>, (5)Cl<sub>4</sub> και (6)Cl<sub>4</sub> αντίστοιχα] χρησιμοποιήθηκαν για να εξεταστεί ο τύπος πρόσδεσής του με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> μέσω τιτλοδοτήσεων με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR, καθώς και φθορισμού.

Με βάση τις μελέτες NMR το σύμπλοκο (**4**)Cl<sub>4</sub> φαίνεται να αλληλεπιδρά συνδυαστικά μέσω παρεμβολής και πρόσδεσης στις αύλακες της διπλής έλικας, ενώ τα (**5**)Cl<sub>4</sub> και (**6**)Cl<sub>4</sub> να προσδένονται αποκλειστικά στις αύλακες . Από τις μετρήσεις φθορισμού προκύπτει ότι το σύμπλοκο (**4**)Cl<sub>4</sub> προσδένεται ισχυρά στο DNA με σταθερά πρόσδεσης K<sub>b</sub> = 12.133 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>, ενώ τα (**5**)Cl<sub>4</sub> και (**6**)Cl<sub>4</sub> ασθενέστερα (K<sub>b</sub> = 2.333 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> και K<sub>b</sub>= 3.336 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> αντίστοιχα).

Για λόγους σύγκρισης εξετάστηκε επίσης η αλληλεπίδραση της ίδιας αλληλουχίας DNA με το αντίστοιχο μονοπυρηνικό σύμπλοκο  $[(\eta^{6} - cym)Ru(phen)(py)]^{2+}$  (7)Cl<sub>2</sub>. Τα αποτελέσματα του NMR, αλλά και του φθορισμού υπέδειξαν ασθενή σύνδεση, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση για συμμετοχή και των δύο πυρήνων των διμεταλλικών συμπλόκων στην αλληλεπίδραση.

Τα στοιχεία από τις φασματοσκοπικές μελέτες πλαισιώθηκαν από μοντέλα molecular docking για επαλήθευση του είδους πρόσδεσης, καθώς και από κυτταροτοξικές μελέτες που έδειξαν ικανοποιητική αποτελεσματικότητα των διπυρηνικών συμπλόκων (**5**)Cl<sub>4</sub> και (**6**)Cl<sub>4</sub> ενάντια στις καρκινικές σειρές A2780 και A2780 res.

## Abstract

The self-complementary oligonucleotide d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, also known as the Dickerson dodecamer was characterized using one- and two-dimensional NMR spectroscopy. This DNA fragment was then used in order to study the interactions of a series of binuclear complexes of the general type  $\eta^6$ -arene-Ru(II) with DNA. The complexes used have the general formula {[( $\eta^6$ -cym)Ru(L)]\_2( $\mu$ -BL)}Cl<sub>4</sub>, where cym = p-cymene, L = 2,2'-bipyridine (bpy) or 1,10-phenanthroline (phen), BL = 4,4'-bipyridine (BL-1), 1,2-bis(4-pyridyl)ethane (BL-2) and 1,3-bis(4-pyridyl)propane (BL-3). The phenanthroline-bearing complexes, namely {[( $\eta^6$ -cym)Ru(phen)]2( $\mu$ -BL-i)}Cl4 (i = 1, 2, 3 or (4)Cl<sub>4</sub>, (5)Cl<sub>4</sub> and (6)Cl<sub>4</sub> respectively) were used in order to examine their binding mode with the oligonucleotide d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> through titrations, by using NMR spectroscopy and fluorescence techniques as well.

Based on the NMR results, (4)Cl<sub>4</sub> binds to the DNA strongly through both intercalation and groove binding, while (5)Cl<sub>4</sub> and (6)Cl<sub>4</sub> are groove binders. It is also shown through fluorescence, that (4)Cl<sub>4</sub> binds stronger to the oligonucleotide (K<sub>b</sub>= 12.133 ×10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>), than (5)Cl<sub>4</sub> and (6)Cl<sub>4</sub> (K<sub>b</sub> = 2.333 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> and K<sub>b</sub> = 3.336 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> correspondingly).

Comparison with the mononuclear complex  $[(\eta^6-cym)Ru(phen)(py)]^{2+}$ , (7)Cl<sub>2</sub> (results both from NMR and fluorescence studies) revealed that this complex binds to the d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> weakly. This result complies with the hypothesis that during the binuclear complexes' interaction with the DNA both ruthenium moieties participate in the binding.

Results from the spectroscopic techniques regarding the binding modes where also supported by molecular docking models. Lastly cytotoxic studies of the complexes (4)Cl<sub>4</sub>, (5)Cl<sub>4</sub> and (6)Cl<sub>4</sub> revealed significant anticancer activity for complexes (5)Cl<sub>4</sub> and (6)Cl<sub>4</sub> against the A2780 and A2780 res. cancer cell lines.

## Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

### 1.1 Δομή του DNA

#### 1.1.1. Γενικές πληροφορίες

Το DNA (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ) είναι ένα μακρύ γραμμικό πολυμερές. Μαζί με το RNA ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεϊκών οξέων και μεταφέρουν πληροφορίες σε μορφή τέτοια, που να μπορούν να μεταβιβάζονται από τη μια γενιά στην επόμενη. Τα μακρομόρια αυτά αποτελούνται από μεγάλο αριθμό νουκλεοτιδίων (δομικές μονάδες) συνδεδεμένων μεταξύ τους, καθένα από τα οποία αποτελείται από ένα σάκχαρο, μια φωσφορική ομάδα και μια νουκλεϊκή βάση. Τα σάκχαρα συνδέονται με τις φωσφορικές ομάδες και σχηματίζουν έναν κορμό, ο οποίος έχει δομικό ρόλο, ενώ η αλληλουχία των βάσεων κατά μήκος της αλυσίδας ενός νουκλεϊκού οξέος είναι ο φορέας των γενετικών πληροφοριών. Το μόριο του DNA έχει τη μορφή διπλής έλικας, μιας ελικοειδούς δομής αποτελούμενης από δύο συμπληρωματικές αλυσίδες νουκλεϊκών οξέων. Κατά την αντιγραφή του DNA, κάθε αλυσίδα λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση της άλλης αλυσίδας [1].

Το DNA έχει ιδανική κατασκευή για το ρόλο του ως φορέας γενετικών πληροφοριών, λόγω της δομής και της σταθερότητάς του. Είναι ένα γραμμικό πολυμερές δομημένο από παρόμοιες μονάδες, συνδεδεμένες η μία στην άκρη της άλλης. Κάθε μονάδα του πολυμερούς είναι ένα νουκλεοτίδιο. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από τρία συστατικά : ένα σάκχαρο, μια φωσφορική μονάδα και μία από τις τέσσερις βάσεις (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη)[1].

Τα νουκλεοτίδια, δομικά συστατικά των νουκλεϊκών οξέων και των πρόδρομων ενώσεών διαδραματίζουν πολλούς επιπλέον ρόλους σε ολόκληρο το κύτταρο. Νουκλεοζίτης ονομάζεται η μονάδα που αποτελείται από μία βάση συνδεδεμένη σε ένα σάκχαρο. Στην περίπτωση του DNA, το σάκχαρο είναι η δεοξυριβόζη ενώ για το σχηματισμό του, το N9 μιας πουρίνης ή το N1 μιας πυριμιδίνης συνδέεται με το C1΄του σακχάρου μέσω ενός N-γλυκοζιτικού δεσμού. Η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου και από την πλευρά του 5'-OH της δεοξυριβόζης. Ένας νουκλεοζίτης συνδεδεμένος με μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες μέσω ενός διεστερικού δεσμού στις θέσεις 3' ή 5'του σακχάρου σχηματίζει ένα νουκλεοτίδιο. Τα επαναλαμβανόμενα 3' $\rightarrow$ 5' νουκλεοτίδια



Εικόνα 1. Δομή φωσφορικού σκελετού του DNA, αποτελούμενου από διαδοχικές μονάδες νουκλεοτιδίων. [10]

Τα τέσσερα νουκλεοτίδια, που αποτελούν τις δομικές μονάδες του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος συμβολίζονται χάριν συντομίας ως Α, Τ, G, C, λόγω της αντίστοιχης βάσης που αυτά φέρουν στο σκελετό τους [1].

#### 1.1.2. Αζωτούχες βάσεις

Ενώ ο κορμός του DNA είναι σταθερός, οι βάσεις των μονομερών διαφέρουν μεταξύ τους. Η αζωτούχος βάση του μπορεί να αποτελεί παράγωγο πουρίνης ή πυριμιδίνης. Οι πουρίνες στο DNA είναι οι αδενίνη (adenine, A) και η γουανίνη (guanine, G), ενώ οι πυριμιδίνες οι θυμίνη (thymine, T) και η κυτοσίνη (cytosine, C), οι δομές των οποίων παρουσιάζονται στην *Εικόνα 2*. [23].

Δύο νουκλεοτίδια που βρίσκονται σε αντιπαραβαλλόμενες θέσεις των αλυσίδων του DNA συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου και ονομάζονται συμπληρωματικό ζεύγος βάσεων (base pair, b.p.). Κατά Watson-Crick, η αδενίνη (A) σχηματίζει συμπληρωματικό ζεύγος με τη θυμίνη (T) με δημιουργία δύο δεσμών υρδογόνου, και η γυανίνη (G) με την κυτοσίνη (C) στο DNA, με τη δημιουργία τριών δεσμών υδρογόνου[24]. Οι πουρίνες βρίσκονται σε αντιπαραβαλλόμενες θέσεις προς τις πυριμιδίνες και συνδέονται με αυτές με δεσμό υδρογόνου. Αλληλεπίδραση μεταξύ δύο πυριμιδινών γενικά δεν ευνοείται λόγω της σχετικά μεγάλης απόστασης των χαρακτηριστικών ομάδων προς σχηματισμό των δεσμών υρδογόνου, ενώ ζεύγος δύο πουρινών πάλι δεν ευνοείται λόγω της μικρής απόστασης που θα είχε ως αποτέλεσμα την «άπωση» μεταξύ τους. Επίσης τα ζεύγη G-T και A-C κατά κανόνα δε είναι συμβατά, λόγω της αναντιστοιχίας της δομής μεταξύ δοτών και δεκτών που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου εκτός των περιπτώσεων Hoogsten pairing κ.λπ..[1,25].



Εικόνα 2. Οι αζωτούχες βάσεις του DNA, αδενίνη (adenine, A) και γουανίνη (guanine, G), παράγωγα των πουρινών και θυμίνη (thymine, T), κυτοσίνη (cytosine, C) και ουρακίλη (uracil U στο RNA) παράγωγα των πυριμιδινών

Το DNA που περιέχει σε μεγάλο βαθμό ζεύγη C-G είναι πιο σταθερό από το DNA με μικρότερο ποσοστό ζευγών C-G. Βέβαια οι δεσμοί υδρογόνου δεν προσφέρουν από μόνοι τους σημαντική σταθεροποίηση στη δομή του DNA. Η σταθεροποίηση της δευτεροταγούς δομής του DNA οφείλεται κυρίως στις π-π αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων των νουκλεοβάσεων [1].

#### 1.1.3. Σάκχαρο

Το σάκχαρο στο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ είναι η δεοξυριβόζη. Το πρόθεμα δεοξυ- προσδιορίζει ότι το 2'- άτομο άνθρακα του σακχάρου δεν διαθέτει το άτομο οξυγόνου που βρίσκεται συνδεδεμένο στο 2'- άτομο της ριβόζης. Επισημαίνεται ότι τα άτομα άνθρακα του σακχάρου χαρακτηρίζονται με τονισμένους αριθμούς, προκειμένου να είναι διακριτά από τα άτομα άνθρακα των βάσεων. Τα σάκχαρα στα νουκλεϊκά οξέα συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Συγκεκριμένα η υδρξυλομάδα 5' (5'-OH) της μονάδας σακχάρου ενός νουκλεοτιδίου έχει εστεροποιηθεί με μία φωσφορική ομάδα, και αυτή με τη σειρά της συνδέεται στην υδροξυλική ομάδα 3' του γειτονικού σακχάρου. Η αλυσίδα των σακχάρων που συνδέονται μεταξύ τους με φωσφοδιεστερικούς ονομάζεται σκελετός του νουκλεϊκού οξέος [1].

Ο πενταμελής δακτύλιος της δεοξυριβόζης στο DNA δεν είναι επίπεδος από τη φύση του. Η ακριβής διαμόρφωση του δακτυλίου της δεοξυριβόζης μπορεί να προσδιοριστεί πλήρως βάσει των πέντε εσωτερικών ενδοκυκλικών γωνιών στρέψης. Μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και φασματοσκοπίας NMR, έχει βρεθεί ένας μεγάλος αριθμός διαμορφώσεων. Όταν ένα άτομο του δακτυλίου βρίσκεται εκτός του επιπέδου των υπολοίπων τεσσάρων, τότε η διαμόρφωση του σακχάρου έχει τη μορφή «φακέλου». Είναι επίσης σύνηθες δύο άτομα του δακτυλίου να αποκλίνουν από το επίπεδο των υπολοίπων τριών και να βρίσκονται στη μία ή την άλλη πλευρά του επιπέδου[1,2]. Γενικά, το ένα από τα δύο άτομα αποκλίνει περισσότερο από το άλλο. Αν η μεγαλύτερη απόκλιση γίνεται από την ίδια πλευρά με τη βάση και το δεσμό C4'-C5', τότε το άτομο ορίζεται ως endo, ενώ όταν γίνεται από την αντίθετη το άτομο ορίζεται ως endo, ενώ όταν γίνεται από την αντίθετη το άτομο ορίζεται ως endo, ενώ όταν γίνεται από την αλληλομετατροπής μεταξύ των διαμορφώσεων (*Εικόνα 3*). Πιο συγκεκριμένα για την αλληλομετατροπή μεταξύ των C2' endo και C3' endo η απαιτούμενη ενέργεια κυμαίνεται μεταξύ 8-12kJ/mol.



Εικόνα 3. Αλληλομετατροπή μεταξύ των διαμορφώσεων C3' endo (αριστερά) και C2' endo (δεξιά) του δακτυλίου της δεοξυριβόζης. [26]

Η αναλογία των πληθυσμών των διαμορφώσεων εξαρτάται από το είδος της βάσης με την οποία συνδέεται το σάκχαρο. Οι πουρίνες τείνουν να ευνοούν την C2' endo διαμόρφωση, ενώ οι πυριμιδίνες την C3' endo. Η διαμόρφωση του σακχάρου αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη μετέπειτα διαμόρφωση ενός όλιγο- ή πολύνουκλεοτιδίου [2,26]. Καθώς οι μεταβολές στη διαμόρφωσή του σακχάρου αλλάζουν τον προσανατολισμό των υποκαταστατών στις θέσεις C1', C3' και C4', οδηγούν σε σημαντικές μεταβολές στη διαμόρφωση του σκελετού και επομένως της συνολικής δομής [2].

#### 1.1.4. Διαμορφώσεις syn και anti του γλυκοζιτικού δεσμού

Ο γλυκοζιτικός δεσμός, είναι απλός δεσμός ο οποίος συνδέει τον 1'-άνθρακα του σακχάρου, της δεοξυριβόζης με μία βάση. Για τις πουρίνες είναι ο δεσμός C1'-N9, ενώ για τις πυριμιδίνες ο C1'-N1. Η γωνία στρέψης χ γύρω από το γλυκοζιτικό δεσμό μπορεί να πάρει μεγάλο εύρος τιμών, όμως με βάση τόσο τη θεωρία, όσο και τα πειραματικά δεδομένα έχουν βρεθεί δύο διαμορφώσεις χαμηλής ενέργειας, οι syn και anti. Η διαμόρφωση anti έχει την C1-N1 πρόσοψη των πουρινών και την C2-N3 των πυριμιδινών απομακρυσμένη από τον δακτύλιο του σακχάρου, έτσι ώστε τα υδρογόνα που συνδέονται με τον άνθρακα C8 των πουρινών και C6 των πυριμιδινών να βρίσκονται πάνω από τον δακτύλιο του σακχάρου. Έτσι οι δεσμοί υδρογόνου Watson-Crick των βάσεων κατευθύνονται μακριά από το δακτύλιο του σακχάρου. Οι προσανατολισμοί αυτοί αντιστρέφονται στη διαμόρφωση syn, όπου οι δεσμοί υδρογόνου στρέφονται προς το σάκχαρο και πιο συγκεκριμένα στο άτομο Ο5' [2].



Εικόνα 4. Διαμορφώσεις syn και anti της πουρίνης δεόξυαδενοσίνης (αριστερά) και της πυριμιδίνης δεοξυκυτιδίνης (δεξιά).

Στερικά οι προτιμώμενες γωνίες του γλυκοζιτικού δεσμού είναι -120°<χ<180° για την anti και 0°<χ<90° για τη syn διαμόρφωση. Οι τιμές της χ την περιοχή των -90° περιγράφονται και ως «υψηλή anti» διαμόρφωση [2].

#### 1.1.5. Το μοντέλο της διπλής έλικας

Η ικανότητα των νουκλεϊκών οξέων να σχηματίζουν εξειδικευμένα ζεύγη βάσεων ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια μελετών που είχαν στόχο τον καθορισμό της τρισδιάστατης δομής του DNA. Ο Maurice Wilkins και η Rosaline Franklin «φωτογράφησαν» ίνες DNA με τη μέθοδο περίθλασης ακτίνων Χ. Τα χαρακτηριστικά των σχημάτων περίθλασης υποδηλώνουν ότι το DNA αποτελείται από δύο αλυσίδες που περιελίσσονται σε μια κανονική δομή έλικας. Το 1953 οι James Watson και Francis Crick, βασιζόμενοι σε αυτά και σε άλλα αποτελέσματα κατέληξαν σε ένα δομικό μοντέλο για το B-DNA συμβατό με τα περιθλασιογράμματα που αποτέλεσε πηγή αξιοσημείωτων γνώσεων για τις λειτουργικές ιδιότητες των νουκλεϊκών οξέων[24]. Τα στοιχεία του μοντέλου Watson-Crick για το B-DNA που προέκυψαν από τα περιθλασιογράμματα είναι τα εξής:

- Δύο ελικοειδείς πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες ελίσσονται γύρω από έναν κοινό άξονα και έχουν δεξιόστροφη φορά. Οι αλυσίδες είναι αντιπαράλληλες, δηλαδή έχουν αντίθετη κατεύθυνση 3'→5'.
- Τα σάκχαρα και οι φωσφορικές ομάδες βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος και οι βάσεις πουρινών και πυριμιδινών στο εσωτερικό της έλικας.
- 3. Οι βάσεις είναι σχεδόν κάθετες στον άξονα της έλικας και οι γειτονικές βάσεις απέχουν μεταξύ τους 3,4 Å. Η ελικοειδής δομή επαναλαμβάνεται κάθε 34 Å (βήμα έλικας) με 10,4 βάσεις περίπου για κάθε στροφή της

έλικας. Κάθε βάση έχει στραφεί κατά σχεδόν 36° σε σχέση με την προηγούμενη (360° ανά πλήρη στροφή/ 10,4 βάσεις ανα στροφή)

4. Η διάμετρος της έλικας είναι περίπου 20 Å



Εικόνα 5. Απεικόνιση της εξιόστροφης διπλής έλικας του DNA(αριστερά) και κάτοψή της (δεξιά). Σημειώνονται η απόσταση μεταξύ των ζευγών βάσεων (0.34 nm ή 3.4Å) και το μήκος βήματος της έλικας (3.4 nm ή 34.0Å) [12]

Οι βάσεις στο εσωτερικό της έλικας στοιβάζονται ουσιαστικά η μία πάνω στην άλλη. Το στοίβαγμα των ζευγών βάσεων (stacking) συμβάλλει στη σταθερότητα της διπλής έλικας κατά δύο τρόπους. Οι υδρόφοβες βάσεις συγκεντρώνονται στο εσωτερικό της έλικας, μακριά από το περιβάλλον ύδωρ, ενώ οι πιο πολικές επιφάνειες εκτίθενται στο ύδωρ. Έτσι, η υδροφοβικότητα οδηγεί στη συσσώρευση των βάσεων, της μίας πάνω στην άλλη που έλκονται μέσω δυνάμεων van der Waals, συνεισφέροντας στη σταθεροποίηση της έλικας. Η ενέργεια που συνδέεται με μία αλληλεπίδραση van der Waals είναι πολύ μικρή, κατά κανόνα από 2 έως 4 kJ/mol (ή 0,5-1 kcal/mol). Ακόμη οι π-π αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων που ευνοείται από τις στερεοδιατάξεις των σακχάρων συνεισφέρει ουσιαστικά στη σταθερότητα της δομής (*Εικόνα 6*)[1].



Εικόνα 6. Αλληλεπίδραση stacking ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων Α-Τ και Τ-Α του ολιγονουκλεοτιδίου d(CCATTAATGG)<sub>2.</sub> [12]

Η διαμόρφωση του σακχάρου του σκελετού έχει C2'-endo διαμόρφωση και υψηλούς *anti* γλυκοζιτικός δεσμούς.

Καθώς οι αλυσίδες του DNA περιστρέφονται η μια γύρω από την άλλη κατά μήκος της έλικας, τα κενά των σακχάρων δημιουργούν κοιλότητες στην επιφάνεια του σκελετού, οι οποίες ονομάζονται αύλακες (grooves). Η ασυμμετρία των βάσεων οδηγεί στο σχηματισμό δύο διαφορετικών τύπων αύλακας στην επιφάνεια της διπλής έλικας: της κύριας ή μεγάλης αύλακας (major groove) που για το B-DNA έχει πλάτος 22 Å, είναι ευρεία και σχετικά ρηχή και της μικρής ή δευτερεύουσας αύλακας (minor groove) με πλάτος 12 Å (*Εικόνα 7*).

Το πλάτος της δευτερεύουσας αύλακας μεταβάλλεται ευκολότερα και είναι στενότερο στις περιοχές που είναι πλουσιότερο σε ζεύγη αδενίνης-θυμίνης από ότι σε αυτές που υπερτερούν σε γουανίνη-κυτοσίνη. Τα άκρα των βάσεων στην κύρια αύλακα είναι πιο προσιτά προς αλληλεπίδραση με άλλα μόρια σε σχέση με τις αντίστοιχες βάσεις της δευτερεύουσας αύλακας λόγω στενότητας.

#### 1.1.6. Άλλες διαμορφώσεις του DNA, -A,-B,-Z DNA

Το DNA μπορεί να υπάρχει σε πολλές διαμορφώσεις, πέραν του μοντέλου της διπλής έλικας B- τύπου που περιέγραψαν οι Watson και Crick. Οι διαμορφώσεις A, B και Z- είναι οι πιο γνωστές δομές του DNA, ενώ παράλληλα είναι οι μόνες που έχουν παρατηρηθεί στους ζωντανούς οργανισμούς. Συνήθως τυχαίες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων σχηματίζουν μόνο τις διαμορφώσεις A-DNA και B-DNA [4]. Οι διαφορές που παρουσιάζουν στη διαμόρφωση τα A, B και Z-DNA είναι κυρίως αποτέλεσμα της διαμόρφωσης του δακτυλίου της δεοξυριβόζης, η οποία καθορίζει τη μορφή της έλικας, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Πιο συγκεκριμένα τα Aκαι B-DNA είναι δεξιόστροφα, ενώ το Z-DNA είναι αριστερόστροφο (*Εικόνα 8*) [4,22]. Η απόσταση μεταξύ συνεχόμενων ζευγών βάσεων και ο βαθμός περιστροφής της έλικας ανά παράγοντα προκύπτουν από τις μετατροπές του δακτυλίου του σακχάρου από τη διαμόρφωση C3'-endo στη C2'-endo[5].



Εικόνα 7. Α. Σκελετός του DNA, όπου διακρίνεται ο σχηματισμός της μεγάλης και της μικρής αύλακας. Β.Η μεγάλη και η μικρή αύλακα όπως διαμορφώνονται στα ζεύγη βάσεων Α-Τ και G-C του DNA. [23]

Οι εξωτερικές συνθήκες, όπως η αλληλουχία των ζευγών βάσεων, η σχετική υγρασία, η συγκέντρωση των αλάτων, τα μόρια που αλληλεπιδρούν μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, ένταξης, παρεμβολής ή πρόσδεσης στις αύλακες επιδρούν είτε συνεργιστικά, είτε ανεξάρτητα στη διαμόρφωση του δακτυλίου του σακχάρου στο επίπεδο και εν τέλει τη συνολική διαμόρφωση της αλληλουχίας[6,7].



Εικόνα 8. Από τα αριστερά προς τα δεξιά οι τρεις βασικές διαμορφώσεις του DNA: B-, A- και Z-. Επισημαίνονται η μικρή αύλακα (m) και η μεγάλη αύλακα (M) και στις τρεις αλυσίδες που αντιστοιχούν στις διαφορετικές μορφές του DNA. [3]

Μεταξύ των τριών παραπάνω διαμορφώσεων η B- είναι η πιο κοινή με βάση τις συνθήκες ιοντικής ισχύος που επικρατούν στα κύτταρα. Η B-μορφή του DNA, περιγράφηκε αναλυτικά στην προηγούμενη παράγραφο, όπου παρουσιάστηκε το μοντέλο της διπλής έλικας. Οι άλλες δύο διαμορφώσεις διαφέρουν ως προς τη γεωμετρία και τις διαστάσεις.

Το A -DNA ανακαλύφθηκε από μελέτες περίθλασης ακτίνων-Χ σε λιγότερο ενυδατωμένες ίνες DNA. Το A, όπως και το B είναι μια δεξιόστροφη διπλή έλικα αποτελούμενη από αντιπαράλληλες αλυσίδες, οι οποίες συγκρατούνται μέσω δεσμών υδρογόνου τύπου Watson-Crick μεταξύ των ζευγών βάσεων. Η έλικα με διαμόρφωση A είναι βραχύτερη και πλατύτερη σε σχέση με τη B και τα ζεύγη βάσεων έχουν κεκλιμένη και όχι κάθετη διάταξη ως προς τον άξονα της έλικας. Στην A διαμόρφωση το άτομο C3' του σακχάρου κείται εκτός του επιπέδου που σχηματίζουν τα υπόλοιπα τέσσερα άτομα του δακτυλίου, επομένως διαθέτει διαμόρφωση C3'endo.

Η τρίτη βασική διαμόρφωση DNA, η Z ανακαλύφθηκε από τον Alexander Rich με τη μελέτη της δομής του ολιγονουκλεοτιδίου CGCGCG σε διάλυμα με πολύ μεγάλη συγκέντρωση άλατος. Συνιστά μια δίκλωνη δομή αντιπαράλληλων κλώνων συγκρατούμενων μέσω δεσμών τύπου Watson-Crick. Ωστόσο σε αντίθεση με τις A και B, η έλικα Z είναι αριστερόστροφη. Επίσης οι φωσφορικές ομάδες του σκελετού ήταν διατεταγμένες σε μορφή ζιγκ-ζαγκ κι έτσι η διαμόρφωση αυτή πήρε την ονομασία Z-DNA.

Στον Πίνακα 1. παρουσιάζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των τριών βασικών διαμορφώσεων του DNA.

Τύπος έλικας					
	А	В	Z		
Σχήμα	Παχύ	Ενδιάμεσο	Λεπτό		
Άνοδος κατά μήκος της έλικας	2,3 Å	3,4 Å	3 <i>,</i> 8 Å		
ανά ζεύγος βάσεων					
Διάμετρος έλικας	25 <i>,</i> 5 Å	22 Å	18,4 Å		
Φορά έλικας	Δεξιόστροφη	Δεξιόστροφη	Αριστερόστροφη		
Γλυκοζιτικός δεσμός	anti	anti	anti, syn		
Ζεύγη βάσεων ανά στροφή	11	10,4	12		
έλικας					
Μήκος βήματος έλικας	25 <i>,</i> 3Å	34,0Å	45,6Å		
Κλίση ζευγών βάσεων από την	19°	1°	9°		
κάθετο προς τον άξονα της					
έλικας					

Πίνακας 1. Γεωμετρικά χαρακτηριστικά των Α-,Β- και Ζ- διαμορφώσεων του DNA.

Στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί αρκετές ακόμα διαμορφώσεις και δομικές μορφές των νουκλεϊκών οξέων. Για τη δημιουργία αυτών των εναλλακτικών δομών απαιτείται η ύπαρξη συγκεκριμένων αλληλουχιών και καθορισμένης συμμετρίας. Οι εναλλακτικές αυτές δομές είναι πιθανό να οδηγήσουν μοτίβα, όπως φουρκέτας (hairpin), σταυροειδή (cruciform), ενδομοριακής τριπλέτας (intramolecular triplexe), DNA με ολισθημένο κλώνο (slipped-strand DNA), DNA με παράλληλους κλώνους (parallel-stranded DNA), δομές αζευγάρωτου DNA (unpaired DNA structures) και DNA τετράκλωνου πλέγματος (G-quadruplex DNA). Αυτές οι ξεχωριστές διαμορφώσεις DNA μπορούν, όπως και οι δομές A, B, Z DNA να αποτελέσουν διακριτούς στόχους πρόσδεσης για μικρά μόρια, τροποποιώντας τη λειτουργία του DNA [3].

## 1.2. Είδη αλληλεπίδρασης των νουκλεϊκών οξέων με μικρά μόρια

#### **1.2.1** Γενικά

Μικρά μόρια δεσμεύονται στο DNA αντιστρεπτά ή μόνιμα, με την τελευταία περίπτωση να περιλαμβάνει συνήθως το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Οι δεσμοί ένταξης αν και στη φύση τους ομοιοπολικοί είναι σαφώς μικρότερης ενέργειας, μολαταύτα θα εξετάζονται ως ομοιοπολικοί (covalent). Παραδείγματα μόνιμων δεσμεύσεων αποτελούν τόσο ισχυρές τοξικές ουσίες, όσο και φάρμακα κατά των καρκινικών όγκων π.χ. cisplatin [27,28]. Η αναστρέψιμη δέσμευση στα νουκλεϊκά οξέα περιλαμβάνει μη- ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις συνήθως ηλεκτροστατικής φύσης, τόσο μέσω της μικρής, όσο και μέσω της μεγάλης αύλακας [8].

Οι αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις κατέχουν κεντρικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία των νουκλεϊκών οξέων. Τα νουκλεϊκά οξέα αλληλεπιδρούν αντιστρεπτά με ένα ευρύ φάσμα χημικών ειδών που περιλαμβάνει το νερό, μεταλλοϊόντα και τα σύμπλοκά τους, μικρά οργανικά μόρια και πρωτεΐνες. Αρχικά οι πολύπλοκες διαμορφώσεις των νουκλεϊκών οξέων οφείλουν την ύπαρξη, αλλά και τη σταθεροποίησή τους στις αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις με το νερό, μεταλλικά ίόντα ή/ και διάφορα οργανικά κατιόντα[8]. Επίσης φάρμακα που αλληλεπιδρούν αντιστρεπτέα δίαφορων τύπων καρκίνου, στην ανάπτυξη φαρμάκων ενάντια σε ιούς και παρασιτικές ασθένειες. Φυσικά αντιβιοτικά, όπως η αδριαμυκίνη, καθώς και συνθετικά φάρμακα, όπως η αμσακρίνη, τα οποία αλληλεπιδρούν με το DNA, χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική θεραπεία πολλών νεοπλαστικών ασθενειών[28]. Η επιθυμία διαλεύκανσης των μηχανισμών δράσης τέτοιου τύπου για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων των νουκλεϊκών σξέων ακόμα πιο αποτελεσματικών υπήρξε κίνητρο για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων των νουκλεϊκών οξέων των νουκλεϊκών οπήρζε κίνητρο

#### 1.2.2. Ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

Μικρά μόρια μπορούν να συνδέονται ομοιοπολικά με τη διπλή έλικα του DNA. Οι κυριότερες κατηγορίες ομοιοπολικών αντιδράσεων μεταξύ μικρών μορίων και νουκλεϊκών οξέων συνοπτικά είναι οι εξής:

- i. Υδρόλυση νουκλεϊκών οξέων
- ii. Αναγωγή των νουκλεοτιδίων

- iii. Οξείδωση νουκλεοτιδίων
- iv. Αντιδράσεις με πυρηνόφιλα
- ν. Αντιδράσεις με ηλεκρονιόφιλα
- vi. Αντιδράσεις με μεταβολικά ενεργά καρκινογόνα μόρια
- vii. Αντιδράσεις με αντικαρκινικά φάρμακα

Στην τελευταία περίπτωση των ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με αντικαρκινικά φάρμακα, εκτός των αλκυλιωτικών ενώσεων, τα σύμπλοκα του λευκοχρύσου αντικαθιστούν κάποιον από τους ευκίνητους υποκαταστάτες από μία βάση του DNA, όπως π.χ. την γουανίνη συνδεόμενα μέσω του N7. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γνωστό φάρμακο *cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], cisplatin,* το οποίο αφού αποβάλλει δύο ανιόντα CI εντάσσεται σε δύο γουανίνες ως [*Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>* προκαλώντας κάμψη 26° στον κύριο άξονα του DNA, οδηγώντας τελικά σε κυτταρική απόπτωση [8].

#### 1.2.3. Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις

Στην περίπτωση των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνεται η παρεμβολή (intercalation) που συνήθως πραγματοποιείται με τη μερική ή πλήρη εισχώρηση αρωματικών δακτυλίων μεταξύ των βάσεων του DNA, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και η δέσμευση στην εξωτερική πλευρά της έλικας του DNA μέσω της μεγάλης (κύριας) ή της μικρής (δευτερεύουσας) αύλακας [8].

Τα κινητικά αδρανή κατιονικά σύμπλοκα με κορεσμένη σφαίρα ένταξης μπορούν να δεσμευτούν στο DNA αναπτύσσοντας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τη φωσφορική ομάδα. Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων της υδρόφοβης επίδρασης, των δεσμών Van der Waals, των π-π αλληλεπιδράσεων και των δεσμών υδρογόνου εντροπικά είναι ευνοϊκές[8]. Πιο αναλυτικά τα τρία βασικά μοντέλα αντιστρεπτής αλληλεπίδρασης του DNA με άλλα μόρια παρουσιάζονται παρακάτω:

# 1.2.3.1. Εξωτερική δέσμευση με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (external electrostatic binding)

Το 1968, οι Eichhorn και Shin ανέφεραν την ικανότητα των μεταλλικών ιόντων να αλληλεπιδρούν με το DNA και πρότειναν δύο βασικούς τρόπους δέσμευσης: την εξωτερική σύνδεση με τον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό σκελετό του DNA και τις αλληλεπιδράσεις με τις ομάδες δότες ηλεκτρονίων των βάσεων (ένταξη). Θα πρέπει να σημειωθεί πως όταν γίνεται αναφορά σε «μεταλλικό ιόν», εννοείται πως το ιόν σχεδόν σίγουρα διαθέτει τουλάχιστον μια σφαίρα επιδιαλύτωσης καθιστώντας το έτσι μια μεγαλύτερη οντότητα [9]. Η περίπτωση της εξωτερικής αλληλεπίδραση είναι κυρίως ηλεκτροστατική με τη φωσφορική ομάδα. Γενικά έχει παρατηρηθεί πως επειδή οι φωσφορικές ομάδες φορτίζουν αρνητικά το εξωτερικό περιβάλλον του DNA, η ηλεκτροστατική δέσμευση του κατιόντος είναι ηλεκτροστατικής φύσης και εξαρτάται από τις ιοντικές δυνάμεις (Coulomb) που αναπτύσσονται μεταξύ των αντίθετων φορτίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενώσεων που αλληλεπιδρούν με το DNA με εξωτερική ηλεκτροστατική δέσμευση είναι το σύμπλοκο  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$  καθώς και διάφορα κατιόντα όπως το Mg<sup>2</sup> [10].

#### 1.2.3.2. Δέσμευση στις αύλακες (groove binding)

Το μοντέλο συναρμογής στις αύλακες περιλαμβάνει δύο στάδια. Αρχικά λαμβάνει χώρα υδρόφοβη μετακίνηση του μορίου από το διάλυμα προς την έλικα και στη συνέχεια αναπτύσσονται μη ομοιοπολικές μοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμοί υδρογόνου κ.λπ. με χαρακτηριστικές ομάδες των νουκλεϊκών βάσεων και δεσμοί van der Waals με τα υδρόφοβα τοιχώματα της αύλακας. Μ' αυτόν τον τρόπο προσεγγίζουν τις αύλακες της διπλής έλικας του DNA και μετά έρχονται σε επαφή με αυτή μέσω δεσμών van der Waals [10].

Συνήθως οι ενώσεις που προσδένονται στη μικρή διαθέτουν σημαντική περιστροφική ελευθερία. Τέτοιες ενώσεις μπορούν με κατάλληλη στρέψη να «χωρέσουν» στην μικρή αύλακα απομακρύνοντας από αυτή το νερό. Δεδομένης της κατάλληλης στρέψης, ένα μόριο μπορεί να ταιριάξει στη μικρή αύλακα και να σχηματίσει δεσμούς Van der Waals με τα τοιχώματα της αύλακας. Η περαιτέρω εξειδίκευση στην πρόσδεση προκύπτει από επαφή μεταξύ του δεσμευμένου μορίου και των άκρων των ζευγών βάσεων στη «βάση»( floor) της αύλακας [8].

Τα ζεύγη Α-Τ μπορούν να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου με τα στο καρβονυλικό C-2 οξυγόνο της Τ ή στο N-3 άζωτο της Α. Παρότι υπάρχουν παρόμοιες ομάδες στις βάσεις G και C, η αμινομάδα της G επιφέρει στερική παρεμπόδιση στη δημιουργία δεσμού υδρογόνου στο N-3 της G και στο καρβονύλιο C-2 της C (Εικόνα 9.). Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της αμινομάδας της G και του καρβονυλικού οξυγόνου της C, στο ζέυγος βάσεων G- C βρίσκεται στη μικρή αύλακα και παρεμποδίζει στερικά την εισχώρηση μορίων σε περιοχές πλούσιες σε G- C. Επομένως, οι αρωματικοί δακτύλιοι πολλών μορίων που προσδένονται στη μικρή αύλακα δημιουργούν στενές αλληλεπιδράσεις με τα Α-Η2 πρωτόνια της μικρής αύλακας του DNA και έτσι δεν υπάρχει χώρος για τον προστιθέμενο στερικό όγκο της ομάδας G-NH2 στο ζεύγος βάσεων G-C. Ο Pullman και οι συνεργάτες του έχουν αποδείξει ότι το αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό είναι υψηλότερο στις περιοχές της μικρής αύλακας που είναι πλόυσιες σε Α-Τ, απ' ότι σε αυτές σε G-C και αυτό ενισχύει την ειδική σύνδεση των κατιόντων στην περιοχή Α-Τ. Προκειμένου να ενισχυθεί η ειδική πρόσδεση στις περιοχές G-C είναι δυνατό να σχεδιαστούν μόρια τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου με την αμινομάδα GNH2 [8].



Εικόνα 9. Απεικόνιση της μικρής αύλακας σε B- DNA όπου επισημαίνονται τα μόρια νερού στο εσωτερικό της αύλακας. [3]

Τα μόρια που συνδέονται στις αύλακες του DNA έχουν τη δυνατότητα, σε αντίθεση με τα μόρια παρεμβολείς (intercalators), να εκτείνονται κατά μήκος πολλών ζευγών βάσεων στην αύλακα και να αναγνωρίζουν με υψηλή εξειδίκευση συγκεκριμένες αλληλουχίες των νουκλεϊκών οξέων. Η νετροψίνη και η ντισταμυσίνη αποτελούν δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα ενώσεων που συνδέονται με τη μικρή αύλακα [8]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μορίου που συνδέεται στη μικρή αύλακα αποτελεί επίσης το Hoechst 33258 (*Εικόνα 10*). Το Hoechst 33258 σταθεροποιείται στο μόριο του DNA μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals με τα τοιχώματα και τη βάση της αύλακας, καθώς και μέσω δεσμών υδρογόνου με την κοίλη εσωτερική επιφάνεια του μορίου που συμπληρώνει την κυρτή επιφάνεια της βάσης της μικρής αύλακας του DNA. Τέτοια μόρια όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως προτιμούν αλληλουχίες πλούσιες σε A-T στις οποίες η αύλακα έχει μεγαλύτερο αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό κατά Pullman και μικρότερη στερική παρεμπόδιση [8,10].



Εικόνα 10. Δομή του Hoechst 33258, κλασικού μορίου- προσδέτη της μικρής αύλακας

Τα μόρια που δεσμεύονται στη μικρή αύλακα του DNA έχουν μικρή επίδραση στη δομή του DNA όπως διαπιστώθηκε από τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωμισμού (CD) [10,11].

#### 1.2.3.3. Παρεμβολή (intercalation)

#### *i.* Κλασικό μοντέλο παρεμβολής

Στις αρχές του 1960 ο Lerman πραγματοποίησε φυσικές μελέτες για τις αλληλεπιδράσεις του DNA με επίπεδα αρωματικά κατιόντα, και κατέληξε σε έναν τρόπο πρόσδεσης των επίπεδων αρωματικών ενώσεων με το DNA με μια διαδικασία που ονόμασε παρεμβολή (intercalation). Αυτού του είδους η πρόσδεση εμφανίζεται σε μεγάλο αριθμό πολυκυκλικών αρωματικών κατιόντων [13].

Η διαδικασία παρεμβολής ξεκινά με τη μεταφορά του παρεμβαλλόμενου μορίου από ένα υδατικό περιβάλλον στον υδρόφοβο χώρο μεταξύ δύο γειτονικών ζευγών βάσεων DNA. Αυτή η διαδικασία ευνοείται θερμοδυναμικά λόγω της θετικής συνεισφοράς της εντροπίας διάσπασης του οργανωμένου πλέγματος των μορίων του νερού γύρω από το μόριο προσδέτη. Έτσι η διπλή έλικα ξετυλίγεται μερικώς, και οδηγεί σε παραμορφώσεις του φωσφορικού σκελετού και αλλαγές στη γωνία περιστροφής μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων. Πιο συγκεκριμένα σαν αποτέλεσμα της περιστροφής γύρω από τους δεσμούς του σκελετού του DNA, η δημιουργία σημείου παρεμβολής οδηγεί στο διαχωρισμό των ζευγών βάσεων με ταυτόχρονη επιμήκυνση της διπλής έλικας και μείωση της στροφής της έλικας στο σημείο αυτό (αποελίκωση/ξετύλιγμα – unwinding) (Εικόνα 10.)[14]. Στο κλασικό μοντέλο της παρεμβολής, η έλικα επιμηκύνεται κατά 3.4 Å, όσο είναι και το πάχος των τυπικών αρωματικών δακτυλίων, ούτως ώστε να δημιουργηθεί κατάλληλος χώρος για τον εισερχόμενο υποκαταστάτη. Πρακτικά η επιμήκυνση είναι μικρότερη των 3.4 Å, εξαιτίας επιδράσεων όπως η κάμψη της έλικας στο σημείο παρεμβολής. Η κανονική περιέλιξη του DNA B- μορφής είναι 36° για 10 ζεύγη βάσεων και στροφή 360°. Επομένως για να προσαρμοστεί η ένωση στην περιοχή παρεμβολής, είναι απαραίτητο να εμφανιστεί μείωση αυτής της περιστροφής. Η διπλή έλικα λοιπόν ξετυλίγεται στο σημείο δημιουργίας συμπλόκου παρεμβολής και η συνήθης περιστροφή των 36° μειώνεται, σαν αποτέλεσμα της παρεμβολής. Το ποσοστό της αποελίκωσης του DNA ποικίλει ανάλογα με τη δομή της ένωσης παρεμβολέα, την αλληλουχία του DNA και κατά συνέπεια τη γεωμετρία του συμπλόκου DNAπαρεμβολέα που σχηματίζεται [8,13].

Αφού το παρεμβαλλόμενο μόριο τοποθετηθεί μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA, η σταθερότητα του συμπλόκου DNA-παρεμβολέα ενισχύεται μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων van der Waals και των π-αλληλεπιδράσεων (π-stacking), των απωστικών δυνάμεων Coulomb μεταξύ των φωσφορικών ομάδων του DNA που σχετίζονται με την αυξημένη απόσταση μεταξύ των βάσεων λόγω του ξετυλίγματος της έλικας, των ιοντικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις θετικά φορτισμένες ομάδες του υποκαταστάτη και τις φωσφορικές ομάδες του DNA, καθώς και των δεσμών υδρογόνου [8].



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση αποελίκωσης του DNA από ένα μόριο παρεμβολέα (intercalating agent) [15].

Σε αντίθεση με τα μόρια που προσδένονται στη μικρή και τη μεγάλη αύλακα, οι παρεμβολείς του DNA (*π.χ.* ethidium bromide) έχουν επίπεδες ετεροαρωματικές δομές, συχνά με εκτεταμένα π- συστήματα, ώστε να διευκολύνουν την εισχώρηση στο σκελετό του DNA και κατ' επέκταση τους δεσμους van der Waals μεταξύ των ζευγών W.C.. Η παρουσία εκτεταμένου αρωματικού υποκαταστάτη ευνοεί συνήθως την παρεμβολή, ενώ σε λιγότερο εκτεταμένα αρωματικά συστήματα η παρεμβολή μπορεί να παρεμποδιστεί λόγω της σύγκρουσης των υπόλοιπων υποκαταστατών με το φωσφοδιεστερικό σκελετό, με αποτέλεσμα να συμβαίνει μόνο μερική παρεμβολή, π.χ. [*Ru(phen)*]<sup>2+</sup>. Συνήθεις οργανικούς παρεμβολείς αποτελούν οι φαινανθρολίνες, φαινανθριδίνες, ακριδίνες, ανθρακινόνες, ανθρακένια και ελλειπτικίνες [12].

Οι περισσότεροι παρεμβολείς είτε είναι θετικά φορτισμένοι είτε περιέχουν βασικές ομάδες που μπορούν να πρωτονιωθούν υπό φυσιολογικές συνθήκες. Γενικά, τα κατιονικά είδη είναι πιο αποτελεσματικοί παρεμβολείς DNA επειδή αλληλεπιδρούν καλύτερα με τον αρνητικά φορτισμένο φωσφορικό σκελετό του DNA στα αρχικά στάδια και επίσης επειδή η παρεμβολή απελευθερώνει αντισταθμιστικά ιόντα που σχετίζονται με την ομάδα φωσφορικών αλάτων[15]. Καθώς η διπλή έλικα ξετυλίγεται, η απόσταση μεταξύ των φωσφορικών ομάδων αυξάνεται με αποτέλεσμα τη μείωση της πυκνότητας του εντοπισμένου φορτίου. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η απελευθέρωση των συσσωρευμένων αντισταθμιστικών φορτίων, π.χ. Na<sup>+</sup>. Οι κατιονικές ουσίες παρεμβολής προκαλούν επιπρόσθετη απελευθέρωση αντιστατθμιστικών φορτίων, μέσω μιας πολυηλεκτρολυτικής διαδικασίας. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί σημαντική κινητήρια δύναμη για την παρεμβολή, δεδομένου ότι μειώνει τις απωστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φορτισμένων αντισταθμιστικών ανιόντων που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση[15,16]



Εικόνα 11. Α: παρεμβολή του συμπλόκου Δ-α-[Rh{(R,R)-Me2trien}phi]3+ στο 5'-d(GTGCAAC)2-3' με πρόσθετη σταθεροποίηση με δεσμούς Η από βοηθητικό υποκαταστάτη, οι μαύρες γραμμές υποδεικνύουν τους δεσμούς υδρογόνου, Β: Παρεμβολή του Λ-[Ru(phen)2(dppz)]2+ στο d(CCGGTACCGG)2. [12]

Οι παρεμβολείς DNA είναι λιγότερο επιλεκτικοί ως προς την αλληλουχία από τους παράγοντες πρόσδεσης στη μικρή αύλακας, και σε αντίθεση με αυτούς, δείχνουν μεγαλύτερη προτίμηση για τις περιοχές G-C. Αυτή η εκλεκτικότητα προκύπτει κυρίως λόγω υδρόφοβων ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες οφείλονται στους υποκαταστάτες που συνδέονται στις μεγάλες ή μικρές αύλακες[8].

Η παρεμβολή DNA διέπεται επίσης από την αρχή αποκλεισμού του πλησιέστερου γείτονα, σύμφωνα με την οποία δύο γειτονικές θέσεις σε κάθε σημείο παρεμβολής παραμένουν κενές. Το φαινόμενο αυτό είναι αποτέλεσμα αρνητικής συνέργειας, όπου η δέσμευση σε μια θέση προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή που παρεμποδίζει τη σύνδεση με το γειτονικό ζεύγος βάσεων [14].

Γενικά η παρεμβολή ενός μορίου στο DNA είναι μόνο το πρώτο βήμα σε μια σειρά γεγονότων που τελικά επιφέρουν περαιτέρω βιολογικά αποτελέσματα. Οι δομικές αλλαγές που προκαλούνται στο DNA με παρεμβολή οδηγούν σε μεταβολές στην αναγνώριση και λειτουργία πρωτεϊνών που σχετίζονται με το DNA, όπως οι πολυμεράσες, οι μεταγραφικοί παράγοντες, τα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA και πιο συγκεκριμένα οι τοποϊσομεράσες. Η αναστολή των διαδικασιών μεταγραφής και επιδιόρθωσης του DNA οδηγεί στον αποπτωτικό θάνατο του κυττάρου[15,18].

#### ii. Παρεμβολή με εξειδίκευση ως προς την αλληλουχία του DNA

Υπάρχουν δέκα συνδυασμοί δινουκλεοτιδίων που σχηματίζουν διαφορετικές δεξιόστροφες, αντιπαράλληλες θέσεις παρεμβολής για απλά μόρια παρεμβολείς. Οι δέκα αυτοί συνδυασμοί, γραμμένοι με φορά 5' $\rightarrow$ 3' είναι: AT-TA, AA-TT, TA-TA, AC-GT, CA-TG, GC-GC, GG-CC, CG-CG, GA-TC και AG-CT. Για μόρια παρεμβολείς με υποκαταστάτες που αλληλεπιδρούν με ζεύγη βάσεων πέραν του σημείου της παρεμβολής ή που προκαλούν παραμόρφωση σε αλληλουχίες γειτονικές του σημείου πρόσδεσης, ο αριθμός των εξειδικευμένων θέσεων πρόσδεσης είναι ακόμα

μεγαλύτερος. Οι περισσότεροι απλοί παρεμβολείς είτε δεν παρουσιάζουν προτίμηση στη δέσμευση είτε εμφανίζουν μικρή προτίμηση στο ζεύγος βάσεων G-C, σε αντίθεση με την προτίμηση στο ζεύγος A-T που εμφανίζουν τα μόρια που προσδένονται εξωτερικά της έλικας. Έχει προταθεί ότι η γενική προτίμηση των μορίων παρεμβολέων στο ζεύγος G-C οφείλεται στη μεγαλύτερη διπολική ροπή του ζεύγους G-C σε σχέση με του A-T και ως εκ τούτου στην ικανότητα των ζευγών βάσεων G-C να προκαλούν πόλωση στο σύστημα του δακτυλίου του μορίου- παρεμβολέα. Έχουν συντεθεί βέβαια και μόρια- παρεμβολείς με προτίμηση στο ζεύγος βάσεων A-T, όμως σε αυτά η συνολική δυνατότητα εξειδικευμένης πρόσδεσης δεν εξαρτάται μόνο από τις αλληλεπιδράσεις διπόλου, αλλά και από τις αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμού υδρογόνου, το μέγεθος, το βαθμό εφυδάτωσης και το ηλεκτροστατικό δυναμικό των αυλάκων που αλληλεπιδρούν μέσω των υποκαταστατών του μορίου που παρεμβάλλεται[8].

#### **iii.** Δι-παρεμβολείς

Οι δι-παρεμβολείς απέκτησαν ερευνητικό ενδιαφέρον, μετά την ανακάλυψη της εχινομυκίνης στη Γερμανία το 1957, η οποία παράγεται από τον Streptomyces echinatus και μπορεί να δρα σαν διπυρηνικός υποκαταστάτης. Σήμερα, είναι γνωστά πέντε παράγωγα εχινομυκίνης. Υπάρχουν ακόμα αρκετοί δι-παρεμβολείς φυσικής προέλευσης με αντικαρκινική δράση. Αποτελούν βιοδραστικές ενώσεις ακτινομυκητάλης με θαλάσσια και χερσαία προέλευση που αντιδρούν με την έλικα του DNA [17].

Εστιάζοντας στους συνθετικούς δι-παρεμβολέις, το ενδιαφέρον για αυτούς προήλθε από την ενδεχόμενη βελτίωση της πρόσδεσης έναντι των μονομερών. Επίσης η αύξηση του μεγέθους και των θέσεων πρόσδεσης του υποκαταστάτη θα μπορούσε να επιφέρει αυξημένη εκλεκτικότητα στην πρόσδεση σε καθορισμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Το εθίδιο και η ακριδίνη, δύο από τα κυριότερα φθορίζοντα μόρια παρεμβολείς έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση όμο- και έτερο- διμερών, τα οποία δρουν ως δι-παρεμβολείς [18]

Παρά το γεγονός ότι οι δι-παρεμβολείς αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο με το οποίο σχετικά μικρά μόρια μπορούν να αλληλεπιδρούν με το DNA και να τροποποιούν τη δομή του, δεν είναι ακόμα εντελώς κατανοητές οι ακριβείς δομικές προϋποθέσεις ώστε αυτοί να εμφανίζουν καλή αντικαρκινική δράση [19-20].

Οι δι-παρεμβολείς κυρίως σχηματίζουν αντιστρεπτούς διακλωνικούς και ενδοκλωνικούς δεσμούς με το DNA, με παρεμβολή της κάθε μιας μονάδας υποκαταστάτη που μπορεί να προκαλέσει παρεμβολή ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων. Ο γεφυρωτικός υποκαταστάτης συνήθως βρίσκεται στη μικρή αύλακα κατά την αλληλεπίδραση αυτή. Στις σύμπλοκες ενώσεις η συγγένεια πρόσδεσης στο DNA για τους περισσότερους διπυρηνικούς παρεμβολείς των μετάλλων μετάπτωσης είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των μονοπυρηνικών αναλόγων τους, λόγω του αυξημένου φορτίου και της αρωματικής επιφάνειας. Η υψηλότερη αυτή συγγένεια μπορεί να οδηγήσει και σε αυξημένη κυτταροτοξικότητα. Η τροποποίηση των υποκαταστατών παρεμβολής, καθώς και των συνδετών μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αυξημένη εκλεκτικότητα έναντι αλληλουχιών του DNA. Για παράδειγμα διπυρηνικά σύμπλοκα του λευκοχρύσου που δρουν μέσω παρεμβολής και περιέχουν τερπυριδίνη (terpy) εμφανίζουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης στο δίκλωνο μόριο του DNA, πιθανή κυτταροτοξικότητα ενάντια σε ποικίλες καρκινικές σειρές και την ικανότητα αναστολής ενζύμων που χρησιμεύουν στη λειτουργία των καρκινικών κυττάρων. Ένας ακόμα αποτελεσματικός υποκαταστάτης διπυρηνικής παρεμβολής είναι οι ακριδίνες, τα διπυρηνικά σύμπλοκα των οποίων επιτυγχάνουν κυτταροτοξικότητα με συγκεντρώσεις της τάξης των nM. Οι ενώσεις αυτές με πρόσδεση στο B-DNA έχουν την ικανότητα να επάγουν το σχηματισμό δεσμών υρδογόνου μεταξύ του N7 μιας πουρίνης (δέκτης) και του C6 μιας αμινομάδας (δότης) μιας πυριμιδίνης, να ξετυλίγουν την έλικα κατά 44° και να αυξάνουν τη θερμική της σταθερότητα [21].



Εικόνα 12. Αναπαράσταση δι-παρεμβολής του συμπλόκου [Pt(ACRAMTU)<sub>2</sub>(en)]<sup>4+</sup> στην αλληλουχία DNA d(GCTATAGC)<sub>2</sub>. [21]

#### 1.3. Αντικαρκινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου

#### 1.3.1 Γενικά

Η συνθετική χημεία του ρουθηνίου είναι αρκετά αναπτυγμένη, ιδιαίτερα με υποκαταστάτες αμίνες και παρέχει πολλές γνωστές προσεγγίσεις για νέα μεταλλοφάρμακα. Εξαιτίας της ισχυρής σταθεροποίησης του πεδίου των υποκαταστατών (ligand-field stabilization), οι πιο κοινές οξειδωτικές βαθμίδες σε υδατικά διαλύματα είναι Ru(II), Ru(III) και Ru(IV) καταστάσεις αρκετά αδρανείς στην αντικατάσταση των υποκαταστατών. Στις τρεις αυτές οξειδωτικές καταστάσεις το μέταλλο είναι συνήθως εξαϋποκατεστημένο με οκταεδρική γεωμετρία. Όπως και ο λευκόχρυσος, έτσι και το ρουθήνιο παρουσιάζει μια υψηλή εκλεκτικότητα για άτομα δότες αζώτου και θείου [29, 30, 31] Εξαιτίας της οκταεδρικής δομής των συμπλόκων του Ru(II) και Ru(III), σε αντίθεση με την επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία των συμπλόκων του Pt(II), τα αντικαρκινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου δρουν πιθανόν με διαφορετικό τρόπο από το cisplatin, το οποίο προκαλεί κάμψη του DNA σχηματίζοντας σταυροδεσμούς με τις γειτονικές γουανίνες [32, 33]. Σύμφωνα με την θεωρία ενεργοποίησης με αναγωγή, τα σύμπλοκα του Ru(III) μπορούν να θεωρηθούν ως πρόδρομα φάρμακα, τα οποία ενεργοποιούνται με αναγωγή in vivo για να ενταχθούν πιο γρήγορα στα βιομόρια [34,35,36]. Δεδομένου ότι οι όγκοι χρησιμοποιούν πιο γρήγορα οξυγόνο και άλλα θρεπτικά συστατικά, υπάρχει συνήθως χαμηλότερη περιεκτικότητα σε Ο<sub>2</sub> (υποξία) στα καρκινικά κύτταρα [37,38]. Επίσης το pH στα καρκινικά κύτταρα είναι χαμηλότερο από ότι στα υγιή, λόγω αυξημένων παραγώγων γλυκόλυσης. Εξαιτίας αυτών των μεταβολικών διαφορών που υπάρχουν μεταξύ των καρκινικών και των υγιών κυττάρων, τα σχετικά ηλεκτροχημικά δυναμικά στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων είναι γενικά χαμηλότερα απ' ότι στον περιβάλλοντα κανονικό ιστό, και ιδίως στο κέντρο του όγκου. Αυτές οι διαφορές ευνοούν την παραγωγή Ru(II) σε σχέση με το Ru(III) στους όγκους, με συνέπεια να υπάρχει μεγαλύτερη αναλογία [Ru(II)]/ [Ru(III)] σε σύγκριση με τον υγιή ιστό. Η αναγωγή του Ru(III) σε Ru(II) μπορεί να συμβεί μέσω πρωτεϊνών όπως η γλουταθειόνη (GSH) [39].

Μια από τις πρώτες σύμπλοκες ενώσεις του ρουθηνίου με αντικαρκινική δράση ήταν η τριμεταλλική ένωση ruthenium red. Το σύμπλοκο αυτό περιείχε δύο μεταλλικά κέντρα ρουθηνίου με οξειδωτική κατάσταση +4 και ένα ακόμα με οξειδωτική κατάσταση +3. Το συγκεκριμένο σύμπλοκο είχε βρεθεί να προσδένεται στην προστατευτική μεμβράνη από πολυσακχαρίτη των καρκινικών αλλά και υγειών κυττάρων[40,41]. Άλλα δύο σύμπλοκα που συντέθηκαν με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως αντικαρκινικά φάρμακα ήταν τα fac-[RuCl<sub>3</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] και cis-[RuCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>], τα οποία απορρίφθηκαν εξαιτίας κακής διαλυτότητας σε υδατικά μέσα [42].

Δύο ακόμα σύμπλοκα του ρουθηνίου που συνδέονται με το DNA και να εμφανίζουν σημαντική αντικαρκινική δράση είναι *cis* και *trans* του [RuCl<sub>2</sub>(DMSO)<sub>4</sub>]. Τα σύμπλοκα αυτά που έχουν καλύτερη διαλυτότητα στο νερό, βρέθηκαν να προσδένονται με το N7 της γουανίνης και να εμφανίζουν λιγότερες παρενέργειες in vivo [43]. Επίσης ενδιαφέρον προκαλεί ότι το *trans* σύμπλοκο βρέθηκε να έχει καλύτερη αντιμεταστατική δραστικότητα, με την ένωση να παρουσιάζει διαφορετικό μηχανισμό δράσης από εκείνον του cisplatin [44]. Επίσης αντικαρκινική δράση παρουσιάζουν τα σύμπλοκια του ρουθηνίου με ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες και γενικό τύπο: *trans-[RuCl4(L)<sub>2</sub>]* (όπου L = ιμιδαζόλιο ή ινδαζόλιο με κωδικές ονομασίες (*KP418*) και (*KP1019*) αντίστοιχα} [44]. Παράλληλα δύο σύμπλοκα του Ru(III) με DMSO, το *Na{trans-[RuCl4(dmso)(Him)]*} (όπου Him = ιμιδαζόλιο και με κωδικό όνομα NAMI) και το σύμπλοκο [H₂Im][trans-RuCl₄(dmso)(Him)], γνωστό και ως NAMI-A, εμφανίζουν σημαντική αντιμεταστατική δραστικότητα. Το NAMI-A και το KP1019 είναι τα πιο ελπιδοφόρα σύμπλοκα του ρουθηνίου από τα προαναφερθέντα, καθώς είναι λιγότερο τοξικά και έχουν ήπιες παρενέργειες [45]. Τα εν λόγω σύμπλοκα του ρουθηνίου (III) θεωρείται ότι είναι αδρανή έως ότου ενεργοποιηθούν με αναγωγή σε υπεροξικά καρκινικά κύτταρα. Καθένα από τα παραπάνω σύμπλοκα, είναι ικανό για ομοιοπολική δέσμευση με το DNA, με τους συνολικούς μηχανισμούς τους να διαφέρουν. Το NAMI-A παρεμβαίνει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, αποτρέποντας περαιτέρω μετάσταση του όγκου, ενώ το KP1019 προκαλεί άμεση κυτταρική απόπτωση μέσω του μιτοχονδριακού μονοπατιού απόπτωσης και του σχηματισμού δραστικών ριζών οξυγόνου.



Εικόνα 13. Από αριστερά προς τα δεξιά οι δομές των συμπλόκων cis-[RuCl<sub>2</sub>(NH3)<sub>4</sub>], NAMI-A και KP1019,

#### 1.3.2. Σύμπλοκα του ρουθηνίου με αρένια

Η κυτταροτοξική δράση των οργανομεταλλικών συμπλοκών Ru(II) με αρένια έχει ερευνηθεί εκτεταμένα, καθώς εμφανίζουν καλή υδατοδιαλυτότητα με τα αρένια να συνδέονται σταθερά στο μέταλλο του ρουθηνίου [46]. Τα σύμπλοκα αυτά έχουν γενικό τύπο [(η<sup>6</sup>- arene)Ru(X)(Y)(Z)]<sup>n+</sup> {όπου X και Y είναι είτε μονοδοτικοί υποκαταστάτες είτε χηλικοί (X-Y) και Z μια μονοδοντική αποχωρούσα ομάδα} και χαρακτηριστική γεωμετρία "piano-stool" [47-50]. Τα σύμπλοκα του Ru(II) με αρένια, δίνουν προϊόντα προσθήκης με τις νουκλεοβάσεις του DNA [49]. Όσον αφορά στον τρόπο δράσης τους φαίνεται πως το DNA είναι ο κύριος στόχος [48]. Πιστεύεται ότι η υδρόλυση του δεσμού Ru-Z (ιδίως εάν η αποχωρούσα ομάδα είναι χλώριο) εμποδίζεται σε μεγάλο βαθμό, έξω από την κυτταρική μεμβράνη, όπου οι συγκεντρώσεις ιόντων χλωρίου είναι υψηλές (100 mM), σε αντίθεση με το κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα του κυττάρου όπου οι συγκεντρώσεις ιόντων χλωρίου είναι 4 mM, αντίστοιχα). Ετσι, τα σύμπλοκα αυτά

βρίσκονται κυρίως στην ύδατο ή υδροξο μορφή τους στο εσωτερικό του κυττάρου, που τους επιτρέπει να συνδέονται με το DNA και να σχηματίζουν μονολειτουργικά προϊόντα προσθήκης με το N7 της γουανίνης σε αντίθεση με τα γνωστά διλειτουργικά προϊόντα προσθήκης που σχηματίζει το cisplatin, υποδεικνύοντας έτσι έναν διαφορετικό μηχανισμό παρεμπόδισης του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων [48].

Για τα οργανομεταλλικά σύμπλοκα  $[(\eta^{6}-arene)Ru (X)(Y)(Z)]^{n+}$ , έχει βρεθεί επίσης ότι το αρένιο σταθεροποιεί το ρουθήνιο στην οξείδωτική κατάσταση +2. Σύμπλοκα του Ru(II) με αρένια με εκτεταμένοα αρωματικά συστήματα, όπως το διφαινύλιο (bip) ή το τετραϋδροανθρακένιο (tha), μπορούν να αυξήσουν την υδροφοβικότητα του συμπλόκου και να βοηθήσουν την διέλευση του κατά μήκος των κυτταρικών μεμβρανών. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η κυτταροτοξική δράση των συμπλοκών Ru(II) με αρένια αυξάνεται καθώς αυξάνει η έκταση του αρωματικού συστήματος του αρενίου. Κυτταροτοξικές μελέτες συμπλόκων του Ru(II) με διάφορα αρενία και αιθυλενοδιαμίνη (en) έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών (A2780) έδειξαν ότι, οι τιμές του IC<sub>50</sub> μειώνονται με την εξής σειρά: βενζόλιο (bz, 17μM) > πάρα-κουμένιο (*p*-cym, 10 μM) > διφαινύλιο (bip, 5 μM) > διυδροανθρακένιο (dha, 2 μM) > τετραυδροανθρακένιο (tha, 0.5 μM) γεγονός που συνάδει με την αύξησης της υδροφοβικότητας των αρενίων και κατά επέκταση των συμπλόκων [48-51].



Εικόνα 14. Γενική δομή των ενώσεων ρουθηνίου(ΙΙ) με αρένια που απεικονίζει τους τρόπους με τους οποίους το κεντρικό δομικό μοτίβο μπορεί να τροποποιηθεί για να τροποποιήσει τις φαρμακολογικές του ιδιότητες. Τα Χ, Υ και Ζ μπορούν να είναι μονο-, δις ή τρι- δοντικοί υποκαταστάτες.

Η αυξημένη κυτταροτοξική δραστικότητα αυτών των συμπλόκων μπορεί να προκύπτει και από την ικανότητα των αρενίων να παρεμβάλλονται στο DNA, δημιουργώντας έτσι μέτριας ισχύος αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε σημαντική παραμόρφωση της δομής του DNA. Ενδομοριακή π-π αλληλεπίδραση μεταξύ αρενίου-νουκλεοβάσης έχει επίσης παρατηρηθεί και στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου  $[(\eta^6-bip)Ru(en)(9-EtG-N_7)](PF_6)_2$  [51]. Τα σύμπλοκα της παραπάνω μορφής παρουσιάζουν σημαντική δραστικότητα καθώς είναι ικανά να αλληλεπιδρούν με δύο διαφορετικούς τρόπους με το DNA. Η θεωρητική προσέγγιση δείχνει ότι μπορούν να αυξηθούν οι αλληλεπιδράσεις με το DNA, με συγκρίσιμο τρόπο όπως εκείνος του cisplatin. Το σύμπλοκο  $[(\eta^6 - cym)Ru(NH_3)_2CI]^+$  εμφανίζει τιμή IC<sub>50</sub> 500 φορές μικρότερη από εκείνη του cisplatin κάτω από τις ίδιες συνθήκες, παρά την φαινομενική ομοιότητα του με το φάρμακο του λευκόχρυσου [52,53]. Η αντικατάσταση τουλάχιστον μιας αμμωνίας (-NH3) από ένα ογκώδη υποκαταστάτη, συνήθως μια φωσφίνη ή μια ετεροκυκλική αμίνη, όπως μια πυριδίνη έχει δώσει ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, το σύμπλοκο [(η<sup>6</sup>cym) $Ru(P-pta)Cl_2$ ] (RAPTA-C), όπου το pta είναι το 1,3,5-τριαζα-7-φωσφα-τρικυκλο-[3,3,1,1] δεκάνιο, το οποίο ενώ εμφανίζει χαμηλή δραστικότητα in vitro, έδειξε να είναι δραστικό in vivo, όπου αναστέλλει την μετάσταση του καρκίνου των πνευμόνων σε ποντικούς [54]. Στο σύμπλοκο αυτό το βήμα ενεργοποίησης του κυτταροτοξικού μηχανισμού φαίνεται να είναι η υδρόλυση, η οποία συνοδεύεται από ενδοκλωνικό δεσμό με δύο γειτονικές βάσεις γουανίνης (1,2-GG). Αυτό προκαλεί ενα τοπικό «τύλιγμα» του δίκλωνου DNA που πιθανόν επάγει κυτταρική απόπτωση [55].



Εικόνα 15. Δομή του συμπλόκου [Ru(η<sup>6</sup>-pcymene)Cl<sub>2</sub>(PTA)] ή RAPTA-C

Τα σύμπλοκα του τύπου [(η<sup>6</sup>-arene)Ru(L)(Z)]<sup>n+</sup>, όπου L είναι ένας διδοντικός χηλικός υποκαταστάτης, φαίνεται να πλεονεκτούν και ως προς την αντικαρκινική δραστικότητα τους αλλά και ως προς την σταθερότητα τους σε υδατικό διάλυμα σε σύγκριση με τα προαναφέρθεντα σύμπλοκα του τύπου [(η<sup>6</sup>-arene)Ru(X)(Y)(Z)]<sup>n+</sup> [52]. Γενικά, τα σύμπλοκα που περιέχουν χηλικούς υποκαταστάτες δείχνουν να είναι πιο δραστικά από τα αντίστοιχα που περιέχουν μονοδοντικούς υποκαστάτες. Αρκετές μελέτες έχουν γίνει σε οτι αφορά στην δραστικότητα των συμπλόκων με διαφορετικά άτομα-δότες του χηλικού υποκαταστάτη. Στην περίπτωση που, αντικαταστήσουμε την αιθυλενοδιαμίνη (en) με το ανιόν της ακετυλοακετόνης (acac) τότε παρατηρείτε αύξηση της ταχύτητας και του ποσοστού της υδρόλυσης του συμπλόκου [56]. Είναι επίσης γνωστό ότι ο χηλικός υποκαταστάτης καθορίζει το ποσοστό της σύνδεσης του συμπλόκου με νουκλεοβάσεις του DNA και μεταβάλει την εκλεκτικότητα των συμπλόκων. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό πιστεύεται ότι σχετίζεται άμεσα με την ικανότητα των συμπλόκων αυτών να αναστέλλουν *in vitro* την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Έχει παρατηρηθεί ότι, όταν ο χηλικός υποκαταστάτης μπορεί να δημιουργήσει δεσμούς υδρογόνου, όπως η ακετυλακετόνη (acac) ή η αιθυλενοδιαμίνη (en) η δέσμευση του στο DNA γίνεται ισχυρότερη. Στην περίπτωση της ακετυλακετόνης η συνολική ικανότητα δέσμευσης του συμπλόκου φαίνεται να είναι μεγαλύτερη με τις βάσεις της αδενίνης (A), σε σχέση με τις βάσεις της γουανίνης (G). Σε αντίθεση στην περίπτωση με την αιθυλενοδιαμίνη (en), υπάρχει μεγαλύτερη



Εικόνα 16. Αλληλεπίδραση του [(η6-cym)Ru(acac)(9-ΕΤΑ-Ν7)]<sup>+</sup> με την αδενίνη. Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ του Ο της ακετυλοακετόνης και του N6H της αδενίνης απεικονίζεται με διακεκομμένη γραμμή [80].

Τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι οι Ν-Η ομάδες της αιθυλενοδιαμίνης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην σταθεροποίηση των προϊόντων προσθήκης με τις βάσεις της γουανίνης μέσω δεσμού υδρογόνου, όπως ακριβώς το άτομο οξυγόνου στην ακετυλακετόνη, όπου μπορεί να σχηματίζει ευνοϊκούς δεσμούς υδρογόνου με την αμινομάδα (-NH2) του άνθρακα C6 της αδενίνης. Ανάλογου τύπου δεσμοί-Η πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στην αναγνώριση του DNA από το cisplatin [55]. Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι, η δραστικότητα των συμπλόκων με αρένια, τα οποία φέρουν έναν Ν,Ν' χηλικό υποκαταστάτη σχετίζεται άμεσα με την δομή του υποκαταστάτη. Σύμπλοκα που περιέχουν αιθυλενοδιαμίνη (en) παρουσιάζουν υψηλότερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση σύμπλοκα φέρουν με που

τετραμεθυλοαιθυλοδιαμίνη (TMEDA) ως χηλικό υποκαταστάτη, που δείχνουν να είναι ανενεργά [56].

Γενικά, παρατηρείται υψηλότερη κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων του Ru(II), όταν η αιθυλενοδιαμίνη αντικαθίσταται από αρωματικές αμίνες όπως το 1,2διαμινοβενζόλιο (dab) [29]. Οι τιμές IC<sub>50</sub> για μια σειρά συμπλόκων τέτοιου τύπου κυμαίνεται σε ένα εύρος 7 έως 32 μΜ. Περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι σύμπλοκα που δεν φέρουν αμίνο N,N'-χηλικούς υποκαταστάτες, άλλες αρωματικές διιμίνες, όπως το 2,2'-διπυριδίλιο (bpy), δεν παρουσιάζουν κυτταροτοξική δράση στις καρκινικές κυτταρικές σειρές A2780. Από την άλλη πλευρά τα αντίστοιχα σύμπλοκα με 1,10φαινανθρολίνη (phen) και βαθοφαινανθρολίνη (bphen) παρουσίασαν αξιοσημείωτη κυτταροτοξικότητα στις ίδιες κυτταρικές σειρές (A2780). Αυτά τα στοιχεία δείχνουν τον σημαντικό ρόλο που παίζει ο χηλικός υποκαταστάτης [56].

Η αποχωρούσα ομάδα (Ζ), η οποία συνήθως είναι ένα αλογόνο, παίζει σημαντικό ρόλο στην δραστικότητα των συμπλόκων του Ru(II) με αρένια, δεδομένου ότι με την απελευθέρωσή της από το μεταλλικό κέντρο διατίθεται μια κενή θέση για την ένταξη ενός βιομορίου. Αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η υποκατάσταση χλωρίου, ως αποχωρούσα ομάδα, από άλλα αλογόνα όπως το ιώδιο, φάνηκε να έχει μικρή επίδραση στην κυτταροτοξικότητα. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες έχουν αναφέρει τη συσχέτιση μεταξύ της ταχύτητας υδρόλυσης και της κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων του Ru(II) με αρένια και χηλικούς υποκαταστάτες [57]. Τα πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η μεγάλη ταχύτητα υδρόλυσης και κατά συνέπεια η μεγάλη δραστικότητα, συνήθως οδηγεί σε χαμηλή κυτταροτοξικότητα. Ομοίως πολύ αργή υδρόλυση οδηγεί σε χημική αδράνεια και χαμηλή κυτταροτοξικότητα. Επίσης παρατηρήθηκε ότι, όταν η αποχωρούσα ομάδα δεν είναι αλογόνο αλλά ένα θειοφαινύλιο τα αποτελέσματα αντιστρέφονται [47]. Η ένωση με το θειοφαινύλιο βρέθηκε να είναι δραστική, παρά την απουσία υδρόλυσης, εμφανίζοντας μια τιμή ΙC<sub>50</sub> της τάξης των 23 μΜ σε καρκινικά κύτταρα Α2780. Ο μηχανισμός δράσης, που προτάθηκε, περιλαμβάνει την πιθανή οξείδωση της θειολικής ομάδας σε σουλφονική και την μετέπειτα υδρόλυση της [47,58]. Μια άλλη μελέτη από την ερευνητική ομάδα του X. Wang ανέφερε ότι το σύμπλοκο του Ru(II) με p-κουμένιο, το οποίο φέρει ως λειτουργικές ομάδες καρβοβοράνια και φερροκένιο, επιφέρει σημαντική απόπτωση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ΗCC827 με εύρος συγκέντρωσης από 5 - 100 μΜ και τιμές IC<sub>50</sub> που κυμαίνονται από 19,6 ± 5,3 μM [59].

#### 1.3.3. Διμεταλλικά αντικαρκινικά σύμπλοκα του ρουθηνίου

Εκτός από τα μονοπυρηνικά σύμπλοκα του ρουθηνίου, έχουν μελετηθεί και αρκετά πολυπυρηνικά σύμπλοκα, τα οποία σε πολλές περιπτώσεις βρέθηκαν να

παρουσιάζουν καλύτερη αντικαρκινική δράση. Αρκετά από αυτά έχει συντεθεί και μελετηθεί ως προς τις αλληλεπιδράσεις τους με το DNA [60].

Παράδειγμα αποτελούν τα διπυρηνικά, σύμπλοκα του ρουθηνίου, τα οποία έχουν ως βάση την γνωστή μονοπυρηνική ένωση NAMI-A [69]. Τα σύμπλοκα αυτά είναι τα: [Na]<sub>2</sub>[{trans-RuCl<sub>4</sub>(Me<sub>2</sub>SO-S)}<sub>2</sub>(μ-L)] και [{mer-RuCl<sub>3</sub>(Me<sub>2</sub>SO-S)(Me<sub>2</sub>SO-O)}<sub>2</sub>(μ-L)], όπου L είναι ετεροκυκλικός Ν-δότης γεφυρωτικός υποκαταστάτης [70]. Η σφαίρα ένταξης του Ru(III) στο διμεταλλικό σύμπλοκο [Na]<sub>2</sub>[{trans-RuCl<sub>4</sub>(Me<sub>2</sub>SO-S)}<sub>2</sub>(μ-L)] είναι ίδια με αυτή της μονοπυρηνικής ένωσης NAMI-A (τέσσερα trans χλώρια, ένα διμεθυλσουλφοξείδιο και ένα ετεροκυκλικό Ν-δότη υποκαταστάτη). Τα εν λόγω σύμπλοκα διαφέρουν από το NAMI-A στο χρόνο που χρειάζονται για να παρουσιάσουν δραστικότητα όμοια με αυτό. Επιπλέον σε in vivo μελέτες έδειξαν να επηρεάζουν ελάχιστα τους πρωταρχικούς όγκους, όμως μειώνουν έως και 95% τους μεταστατικούς όγκους Τα αποτελέσματα από *in vivo* δοκιμές με καρκίνωμα τύπου McA (καρκινικά ηπατικά κύτταρα ποντικού) έδειξαν ότι ήταν τόσο αποτελεσματικά, σε ότι αφορά την μείωση της αυθόρμητης μετάστασης, όσο και το NAMI-A [61].



Εικόνα 17. Δομές των διπυρηνικών αναλόγων των ΝΑΜΙ-Α [Na]<sub>2</sub>[{trans-RuCl<sub>4</sub>(Me<sub>2</sub>SO-S)}<sub>2</sub>(μ-L)] και [{mer-RuCl<sub>3</sub>(Me<sub>2</sub>SO-S)(Me<sub>2</sub>SO-O)}<sub>2</sub>(μ-L)] [80].

Μια ακόμα διμεταλλική ένωση του ρουθηνίου με αντικαρκινικό ενδιαφέρον είναι η  $[Ru_2(bispyridylimine)_3]^{4+}$ . Το παραπάνω είναι ένα φθορίζον σύμπλοκο, το οποίο, όπως αποδείχθηκε, αλληλεπιδρά με την μεγάλη αύλακα του DNA με μη ομοιοπολικό τρόπο. Μετά από ακτινοβόληση με UV ακτινοβολία προκαλεί σπάσιμο στις αλυσίδες του DNA [62]. Το αντίστοιχο μονομερές σύμπλοκο βρέθηκε να είναι λιγότερο κυτταροτοξικό σε ορισμένες περιπτώσεις καρκινικών κυττάρων [63]. Ακόμη, βρέθηκε ότι τα εναντιομερή του τελευταίου συμπλόκου παρουσιάζουν διαφορές στην εκλελτικότητά τους ως προς τη δέσμευσή τους στις αζωτούχες βάσεις του DNA, με το ΔΔ εναντιομερές να προσδένεται εκλεκτικά σε ζεύγη γουανίνης - κυτοσίνης, ενώ το ΛΛ εναντιομερές να προτιμά ζεύγη αδενίνης – θυμίνη [64].

Τα σύμπλοκα με γεφυρωτικούς υποκαταστάτες πυραζίνη (pyz) και 4,4'διπυριδίλιο (4,4'-bpy), [Na]<sub>2</sub>[{RuCl<sub>4</sub>(dmso-S)}<sub>2</sub>(μ-4,4'bpy)] και το [Na][RuCl<sub>4</sub>(dmso-S)(μ-pyz)RuCl<sub>3</sub>(dmso-O)(dmso-S)], εμφανίζουν επίσης δραστικότητα σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα [65]. Διαπιστώθηκε ακόμα ότι ο μακρύς και ο εύκαμπτος γεφυρωτικός υποκαταστάτης - μερκαπτοαίθυλο αίθερας - επηρεάζει το βαθμό δέσμευσης του συμπλόκου στο DNA και κατά συνέπεια την κυτταροτοξικότητα του.

Μια ακόμα κατηγορία διμεταλλικών συμπλόκων του ρουθηνίου με κυτταροτοξικές ιδιότητες είναι τα διπυρηνικά σύμπλοκα του Ru(II) με υποκαταστάτες ολιγοπυριδίνες. Σύμπλοκα με κορεσμένη σφαίρα ένταξης όπως τα διπυρηνικά σύμπλοκα του Ru(II), [(bpy)<sub>2</sub>Ru{Mebpy(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>bpyMe}Ru(bpy)<sub>2</sub>]<sup>4+</sup> με (n = 5,7) συντέθηκαν και μελέτήθηκε η ικανότητα δέσμευσης τους στο DNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι συνδέονται στο DNA μέσω της δευτερεύουσας αύλακας και με ηλεκτροστατικές δυνάμεις, λόγω του φορτίου τους, ενώ επάγουν τη φωτοξειδωτική διάσπαση των φωσφοροδιεστερικών δεσμών που οδηγεί σε κυτταρική απόπτωση [67].



Εικόνα 18. Γενική δομή των συμπλόκων [(bpy)<sub>2</sub>Ru{Mebpy(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>bpyMe}Ru(bpy)<sub>2</sub>]<sup>4+</sup> Cl]Cl<sub>2</sub> για n=5-7 [80].

Άλλη μια ομάδα διμεταλλικών συμπλόκων του ρουθηνίου με κυτταροτοξικές ιδιότητες φαίνεται στην *Εικόνα 19* είναι τα σύμπλοκα όπου στο μεταλλικό κέντρο ρουθηνίου είναι ενταγμένοι 2 υποκαταστάτες διπυριδίνης και ένας υποκαταστάτης χλωρίου, ενώ τα μεταλλικά κέντρα γεφυρώνονται μεταξύ τους από διαμίνες με διαφορετικό μήκος ανθρακικής αλυσίδας κάθε φορά. Η σύνδεσή τους στο DNA γίνεται μέσω της αντικατάστασης του υποκαταστάτη χλωρίου από τις αζωτούχες βάσεις θυμίνης και γουανίνης. Πιο συγκεκριμένα, η ένταξη της γουανίνης γίνεται μέσω του N7 αυτής, ενώ η θυμίνη εντάσσεται μέσω του N3. Επιπλέον, τα πειράματα έχουν αποδείξει ότι πολύ σημαντικό ρόλο στις τοποεκλεκτικές άλληλεπιδράσεις των συμπλόκων με τις αζωτούχες βάσεις του DNA παίζουν οι δεσμοί υδρογόνου και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Σχετικά με την επίδραση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας του γεφυρωτικού υποκαταστάτη βρέθηκε ότι όσο μεγαλύτερο είναι αυτό, τόσο πιο ισχυροί δεσμοί σχηματίζονται μεταξύ του συμπλόκου και του
DNA. Τα σύμπλοκα αυτά είναι χειρόμορφα και υιοθετούν τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις, ΛΛ, ΔΔ και ΛΔ. Από τα ισομερή αυτά, το ΛΛ εμφανίζει τη μεγαλύτερη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA, ενώ ακόμη και στο ΛΔ ισομερές το Λ κομμάτι του αλληλεπιδρά ισχυρότερα με το DNA. Έτσι, πρώτα προσδένεται το "Λ" κομμάτι του μορίου στις γουανίνες του DNA και στη συνέχεια ακολουθεί και το "Δ" κομμάτι. Ο σχηματισμός προϊόντων προσθήκης των συμπλόκων αυτών με το DNA έχει επιπτώσεις στη διαμόρφωσή του. Τις μεγαλύτερες παραμορφώσεις στο DNA βρέθηκε ότι προκαλεί το σύμπλοκο με ανθρακική αλυσίδα του γεφυρωτικού υποκαταστάτη αποτελούμενη από 12 άνθρακες [68].



Εικόνα 19. Διπυρηνικά σύμπλοκα του ρουθηνίου με διπυριδίνες και γεφυρωτικους υποκαταστάτες διαμίνες για n=4-8 και 12

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και για πολυπυριδινικά διμεταλλικά σύμπλοκα του ρουθηνίου, τα οποία έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν με το DNA μεσω παρεμβολής [71, 72-74]. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία λίγα μόνο παραδείγματα που αφορούν οργανομεταλλικούς δι-παρεμβολείς και περιορίζονται κυρίως σε σύμπλοκα αρενίων [75]. Δέσμευση μέσω δι-παρεμβολής έχει παρατηρηθεί στην περίπτωση του διπυρηνικού συμπλόκου  ${(η^6-bip)RuCl]_2BL^*}^2$  (bip = biphenyl BL<sup>×</sup> = Et(H)NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>). Η δι-πυρηνική παρεμβολή συνοδεύεται από διακλωνικές διασταυρώσεις παρόμοιας αποτελεσματικότητα με εκείνες του cisplatin [76].

Η ομάδα του Sheldrick έχει μελετήσει τη δέσμευση συμπλόκων διπυρηνικών οργανοϊριδίων του τύπου [{( $\eta^5$ - $C_5Me_5$ )Ir(L]<sub>2</sub>( $\mu$ - $BL^y$ )]<sup>+</sup> (L =υποκαταστάτης παρεμβολής, π.χ. διπυριδο[2,3-a:2 ',3'-c] φαιναζίνη και BL<sup>y</sup> = ένας γεφυρωτικός υποκαταστάτης διπυριδίνης) στο DNA. Τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η απόσταση, που ρυθμίζεται από τον γεφυρωτικό υποκαταστάτη BLy, παίζει καθοριστικό ρόλο τον τρόπο σύνδεσης του DNA με το σύμπλοκο. Έχει παρατηρηθεί δέσμευση μέσω απλής παρεμβολής για απόσταση 13,1 - 13,3 Å και μέσω δι-παρεμβολής για απόσταστατών dppz [77]. Δέσμευση μέσω δι-παρεμβολής φαίνεται να λαμβάνει χώρα επίσης μεταξύ του

συμπλόκου  $[{(η^5-C_5Me_5)Ir(dppz)}_2(4,4'-bpy)]^{4+}$  (4,4'-bpy = 4,4'-διπυριδίνη) και του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGTAGGCC-3')[78].



Εικόνα 20.Γενική δομή κατιονικών συμπλόκων διιριδίου. [77]

## 1.4 Χρήση φασματοσκοπίας NMR στη μελέτη αλληλεπίδρασης νουκλεϊκών οξέων- σύμπλοκων ενώσεων

Από το 1978 ο μαγνητικός πυρηνικός συντονισμός NMR, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη μελέτη της δομής των νουκλεϊκών οξέων σε διάλυμα. Η τεχνική αυτή έχει αποτελέσει χρήσιμη εναλλακτική και έχει λειτουργήσει συμπληρωματικά στην περίθλαση ακτίνων Χ. Στη φασματοσκοπία NMR των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιούνται οι πυρήνες <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N και <sup>13</sup>P. Από αυτούς το υδρογόνο (<sup>1</sup>H πρωτόνιο) είναι ο πιο σημαντικός λόγω της υψηλής ευαισθησίας του στο NMR, αλλά και την φυσική αφθονία του [8]. Το πρώτο βήμα σε κάθε μελέτη NMR είναι η απόδοση των χημικών μετατοπίσεων κάθε ξεχωριστού πυρήνα, το οποίο αποτελεί συνήθως και το καθοριστικό βήμα της διαδικασίας. Γενικά στα φάσματα δύο διαστάσεων η διαγώνιος αντιστοιχεί σε ένα συμβατικό φάσμα μίας διάστασης, ενώ οι διασταυρούμενες κορυφές (cross-peaks) που βρίσκονται εκτός της διαγώνιου παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις συνδέσεις μεταξύ των χημικών μετατοπίσεων των φασμάτων μίας διάστασης. Υπάρχουν τρεις συνδέσεις τέτοιο τύπου

- οι συνδέσεις μέσω δεσμού, οι οποίες συνδέουν πυρήνες που διαχωρίζονται από δύο έως τέσσερις δεσμούς (COSY: correlation spectroscopy)
- οι συνδέσεις μέσω χώρου, (NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) μεταξύ πυρήνων οι οποίοι απέχουν στο χώρο λιγότερο από 5 Å και
- iii. οι συνδέσεις ανταλλαγής, οι οποίες περιλαμβάνουν τον ίδιο πυρήνα σε δύο διαφορετικά περιβάλλοντα, τυπικά ενός υποκαταστάτη με γρήγορη κινητική εναλλαγής μεταξύ των καταστάσεων ελεύθερου διαλύματος και πρόσδεσης στον πυρήνα [8].

Στα νουκλεϊκά οξέα, τα πρωτόνια εκείνα που μπορούν εύκολα να ανταλλάσσονται με τα πρωτόνια του διαλύτη, συνήθως D2O, σε υδατικά μέσα χαρακτηρίζονται ως ευκίνητα ή ανταλλάξιμα. Λόγω της ύπαρξης των ανταλλάξιμων πρωτονίων τα φάσματα <sup>1</sup>Η NMR των νουκλεϊκών οξέων απλοποιούνται με τη χρήση D<sub>2</sub>O αντί H<sub>2</sub>O με δύο τρόπους. Πρώτον το σήμα του διαλύτη H<sub>2</sub>O (περίπου 4,8 ppm) αντικαθίσταται από ένα πολύ ασθενέστερο, που αντιστοιχεί στα υπολειπόμενα πρωτόνια του D<sub>2</sub>O (HOD). Δεύτερον οι κορυφές των σημάτων των ανταλλάξιμων πρωτονίων εξαφανίζονται και κατ' επέκταση και οι συζεύξεις spin-spin που αντιστοιχούν σε αυτά, ενώ παραμένουν αυτές των μη ανταλλάξιμων. Η παρατήρηση των ανταλλάξιμων πρωτονίων στο φάσμα <sup>1</sup>Η NMR είναι δυνατή όταν η ανταλλαγή τους με το διαλύτη είναι αργή σε κλίμακα χρόνου NMR. Με τη συνήθη οργανολογία NMR που χρησιμοποιείται για τις μελέτες των βιοπολυμερών ο εντοπισμός τους στο φάσμα είναι πιθανός όταν η σταθερά ανταλλαγής (k<sub>intr</sub>) είναι μικρότερη από περίπου  $10^3 \text{ min}^{-1}$ .

Ωστόσο τα περισσότερα φάσματα νουκλεϊκών οξέων λαμβάνονται σε διαλύτη H<sub>2</sub>O που περιέχει σε μικρότερη αναλογία D<sub>2</sub>O, ώστε να επιτυγχάνεται το lock του οργάνου, όπου παρατηρούνται όλα ανταλλάξιμα (ίμινο-, άμινο- και υδροξύλια) και μη ανταλλάξιμα πρωτόνια των βάσεων του DNA και του σακχάρου (αυτά που είναι συνδεδεμένα με άνθρακα). Οι χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων πρωτονίων παρέχουν πληροφορίες σχετικές με τους δεσμούς υδρογόνου Watson-Crick (W.-C.) μεταξύ των δύο αλυσίδων της έλικας DNA.

Μετά από σειρές πειραμάτων NMR με συνθετικά δεόξυ- ολιγονουκλεοτίδια γνωστών αλληλουχιών υπολογίστηκε το εύρος τιμών των οι χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε απλή και διπλή έλικα DNA. Οι τιμές παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

δ (ppm)	Σχόλια
1,8-3,0	H2',H2'' στο DNA
3,7-4,5	H4',H5'' και H5'' στο DNA
4,4-5,2	Η3΄ στο DNA
5,3-6,3	
1,2-1,6	CH3 της Τ
5,3-6,0	Η5 της C
7,1-7,6	Η6 των C και Τ
7,3-8,4	Η8 των Α και G και Η2 της Α
6,6-9,0	ΝΗ2 των Α, C και G
10-15	ΝΗ του δακτυλίου των G και Τ
	δ (ppm) 1,8-3,0 3,7-4,5 4,4-5,2 5,3-6,3 1,2-1,6 5,3-6,0 7,1-7,6 7,3-8,4 6,6-9,0 10-15

Πίνακας 2. Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων απλής και διπλής έλικας DNA.

Τα ανταλλάξιμα πρωτόνια σημαίνονται με \*

Βασικό ρόλο στην απόδοση των πρωτονίων αλλά και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ενός μορίου DNA με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR κατέχουν τα πειράματα 2D NMR και κυρίως τα πειράματα <sup>1</sup>Η COSY και <sup>1</sup>Η NOESY NMR, ο ρόλος των οποίων στη διαδικασία προσδιορισμού παρουσιάζεται παρακάτω.

i. Μελέτη νουκλεϊκών οξέων με <sup>1</sup>Η COSY NMR

Το COSY είναι το πείραμα που χρησιμοποιείται για τη μελέτη βαθμιδωτών συζεύξεων spin-spin. Το φάσμα COSY αποτελεί μια χαρτογράφηση του συνόλου του δικτύου των βαθμιδωτών συνδέσεων σε μια δομή μακρομορίου [8]. Η απεικόνιση του φάσματος COSY για παράδειγμα του ολιγονουκλεοτιδίου d(CGCGAATTCGCG)₂ που παρουσιάζεται παρακάτω μας επιτρέπει τον προσδιορισμό των εξής συνδέσεων:



Εικόνα 21. Φάσμα <sup>1</sup>Η COSY της αλληλουχίας DNA d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (0,002 M διπλή έλικα, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,01M, D<sub>2</sub>O, ρΗ 7,0, 37 °C, 500MHz). Στην περιοχή του φάσματος δεξιά της διαγωνίου διακρίνονται οι περιοχές a-f που περιέχουν cross peacks μεταξύ διαφορετικών ειδών πρωτονίων [83].

Οι περιοχές αυτές είναι παρόμοιες για τα περισσότερα ολιγονουκλεοτίδια, ωστόσο ο αριθμός των cross peacks μεταβάλλεται εξαιτίας των βάσεων της εκάστοτε αλληλουχίας. Συγκεκριμένα μάλιστα οι περιοχές f -g τροποποιούνται και ελέγχονται από τις υπάρχουσες πυριμιδίνες [2,83].

### ii. Μελέτη νουκλεϊκών οξέων με <sup>1</sup>Η NOESY NMR

Οι περισσότερες πληροφορίες για τη δομή ενός ολιγονουκλεοτιδίου προέρχονται από την ανάλυση των διαπυρηνικών αλληλεπιδράσεων μέσω χώρου του φάσματος NOESY. Η ένταση των σημάτων NOESY είναι αντιστρόφως ανάλογη με την έκτη δύναμη της απόστασης μεταξύ δύο πυρήνων πρωτονίου. Έτσι, οι εντάσεις NOE κατατάσσονται σε ισχυρές, ενδιάμεσες και ασθενείς για εύρη αποστάσεων 1,8-2,5 Å, 2,5-3,5 Å και 3,5-5 Å αντίστοιχα [8,83].

Το φάσμα NOESY μιας διπλής έλικας DNA ολιγονουκλεοτιδίου σε διάλυμα D<sub>2</sub>O (μόνο τα μη ανταλλάξιμα πρωτόνια) γενικά χωρίζεται σε 21 περιοχές που περιέχουν cross-peacks μεταξύ διαφορετικών ειδών πρωτονίων. Για παράδειγμα η περιοχή a. περιέχει cross peacks που συνδέουν τα H2 ή H8 μιας πουρίνης ή τα H6 μιας πυριμιδίνης με τις μεθυλομάδες της Τ. Τα είδη των πρωτονίων που συνδέονται στις υπόλοιπες περιοχές υποδεικνύονται στους άξονες του ακόλουθου φάσματος [83].



Εικόνα 22. <sup>1</sup>Η NOESY της αλληλουχίας DNA d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (0,002 M διπλή έλικα, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,01M, D<sub>2</sub>O, pD 7,0, 37 °C, 500MHz). Στην περιοχή του φάσματος αριστερά της διαγωνίου διακρίνονται οι περιοχές α-ν που περιέχουν cross peacks μεταξύ διαφορετικών ειδών πρωτονίων, τα οποία επισημαίνονται επάνω και στα αριστερά του φάσματος [83].

Σε φάσμα <sup>1</sup>Η NOESY που έχει ληφθεί σε διαλύτη νερό αναμένονται περισσότερες cross peacks στις περιοχές ( $ω_1$ =10-15 ppm,  $ω_2$ =10-15 ppm) για σήματα NOE μεταξύ διαφορετικών ιμινο- πρωτονίων που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, ( $ω_1$ =6,5-9,5 ppm,  $ω_2$ =10-15 ppm) για σήματα NOE μεταξύ διαφορετικών ιμινο- και άμινο- πρωτονίων, ( $ω_1$ =6,5-9,5 ppm,  $ω_2$ =6,5-9,5 ppm) για σήματα NOE μεταξύ διαφορετικών άμινο- πρωτονίων και( $ω_1$ =0-8,5 ppm,  $ω_2$ =6,5-15 ppm) για σήματα NOE που συνδέουν ανταλλάξιμα και μη ανταλλάξιμα πρωτόνια [83].

# 1.5 Χρήση φασματοσκοπίας φθορισμού στη μελέτη αλληλεπίδρασης νουκλεϊκών οξέων- σύμπλοκων ενώσεων

i. Μελέτη αλληλεπίδρασης μέσω ανταγωνιστικού φθορισμού

Οι φασματοσκοπικές και ηλεκτροχημικές μετρήσεις, οι μετρήσεις ιξώδους και η περίθλαση ακτίνων-Χ είναι μερικές από τις κυριότερες μεθόδους που χρησιμοποιούνται στις μελέτες πρόσδεσης DNA με άλλα μόρια. Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της φασματοσκοπίας UV-ορατού και της φασματοσκοπίας φθορισμού, είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες. [84, 85] Μεταξύ αυτών ο φθορισμός αποτελεί μια από τις πιο ευαίσθητες και αποτελεσματικές μεθόδους για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ του DNA και διαφόρων τύπων μορίων-προσδετών. Λόγω του αδύναμου φθορισμού του DNA έχουν χρησιμοποιηθεί ορισμένοι φθορίζοντες ανιχνευτές, τα χαρακτηριστικά φθορισμού των οποίων ποικίλλουν ανάλογα με την αλληλεπίδρασή τους με το DNA. Πιο συγκεκριμένα οι εντάσεις εκπομπής φθορισμού ορισμένων ανιχνευτών ενισχύονται κατά τη σύνδεση με το DNA, ενώ οι εντάσεις φθορισμού ορισμένων άλλων ανιχνευτών μειώνονται. Η εκπομπή φθορισμού παρεμβαλλόμενων μορίων όπως το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr), το πορτοκαλί ακριδίνης (AO), το πορτοκαλί της θειαζόλης (TOTO) ενισχύεται όταν συνδέονται με το DNA. [86, 87]

Το βρωμιούχο αιθίδιο (3,8-διαμινο-5-αιθυλ-6-φαινυλ φαινανθρίδιο βρωμίδιο, EtBr) είναι μια επίπεδη κατιονική χρωστική, η οποία μπορεί να δρα ως μεταλλαξιογόνος παράγοντας, λόγω της ικανότητάς της να αναστέλλει τη σύνθεση του DNA, τη γονιδιακή μεταγραφή και μετάφραση μέσω της δέσμευσης του σε αυτό [8]. Αλληλεπιδρά ισχυρά με τη διπλή έλικα του DNA, με εισαγωγή του δακτυλίου του φαινανθριδίου μεταξύ γειτονικών ζευγών βάσεων [91, 92]. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ του θετικά φορτισμένου μορίου EtBr και των ανιονικών φωσφορικών ομάδων του DNA οδηγεί το EB ανάμεσα στις βάσεις και στη δημιουργία π-αλληλεπιδράσεων (π- stacking) με τις νουκλεοβάσεις [93]. Το EtBr χρησιμοποιείται ευρέως ως ευαίσθητος ανιχνευτής φθορισμού για το DNA, καθώς εκπέμπει υψηλό φθορισμό όταν συνδέεται με αυτό. Το ελεύθερο μόριο EtBr εμφανίζει μειωμένη ένταση εκπομπής σε ρυθμιστικό διάλυμα [94]. Έτσι, το EtBr όταν δεσμεύεται στο DNA, εμφανίζει αυξημένη ένταση εκπομπής φθορισμού, λόγω της στερεοχημικής προστασίας που του παρέχουν οι νουκλεοβάσεις (*Εικόνα 23*)[97].

Η παρουσία άλλου μορίου που μπορεί να δεσμευτεί με το DNA μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης εκπομπής του EtBr-DNA, που προκαλείται λόγω ανταγωνισμού για τις θέσεις δέσμευσης στο DNA, καθώς το EtBr δεσμεύεται αντιστρεπτά σε αυτό (*Εικόνα 23*) [95, 96, 97]. Η ικανότητα δέσμευση ενός μορίου στο DNA μπορεί να μετρηθεί με ανταγωνιστικές μελέτες φθορισμού, καθώς αυτές αποτελούν ένα μέτρο της μείωσης της έντασης εκπομπής φθορισμού του συστήματος EtBr-DNA και κατ' επέκταση του τύπου πρόσδεσης σε αυτό.



Εικόνα 23. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ανταγωνιστικής πρόσδεσης μεταλλικού συμπλόκου στο σύμπλεγμα DNA -EtBr. 1. Το EtBr προστίθεται στο DNA.2. Δημιουργείται φθορίζον σύμπλεγμα DNA -EtBr. 3. Το σύμπλοκο εκτοπίζει μερικώς το EtBr και ο φθορισμός μειώνεται [91].

Η απόσβεση του φθορισμού του EtBr-DNA μελετάται μέσω του φάσματος εκπομπής του στο εύρος 530-680 nm με μήκος κύματος διέγερσης 500 nm, μετά την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του εξεταζόμενου μορίου στο DNA, στο οποίο έχει προηγουμένως προστεθεί το EtBr. Η απόσβεση φθορισμού περιγράφεται από την εξίσωση *Stern-Volmer* [109]:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q \tau_0[Q]$$

όπου  $F_0$  και F αντιστοιχούν στις εντάσεις φθορισμού απουσία και παρουσία του εξεταζόμενου μορίου αντίστοιχα. Η  $K_{SV}$  είναι η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer και [Q] η συγκέντρωση της ένωσης. Η κλίση της γραμμικής γραφικής παράστασης  $F_0/F$  συναρτήσει της [Q] δίνει την τιμή της  $K_{SV}$ .



Εικόνα 24. Μείωση εκπομπής φθορισμού με σταδιακά αυξανόμενη συγκέντρωση συμπλόκου. Οι διαφορετικές τιμές της έντασης φθρορισμού αντιστοιχούν σε διαφορετικά F στην εξίσωση Stern-Volmer [94].

Οι τιμές της σταθεράς  $K_{sv}$  τάξης μεγέθους 10<sup>3</sup>  $M^{-1}$  θεωρούνται ενδεικτικές ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ του DNA και του προσδέτη [ 94, 97].

Το EtBr έχει την ικανότητα να συνδέεται και με τη δευτερεύουσα αύλακα του DNA [98]. Σε αυτή την περίπτωση, η εκτόπισή του, προκαλεί μικρότερη μείωση στην ένταση της εκπομπής του συστήματος DNA-EtBr. Μέσω της μεταβολής της έντασης του φθορισμού λοιπόν φανερώνεται ένας τρόπος δέσμευσης που δεν περιλαμβάνει παρεμβολή και πιθανότατα λαμβάνει χώρα μέσω της μικρής αύλακας της έλικας. Πρόσφατα αναφέρθηκε επίσης ότι το EtBr παρεμβάλλεται κυρίως στις τερματικές βάσεις καθώς και στα εσωτερικά ζεύγη του συνθετικού ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> [98].

### *ii. Μελέτη αλληλεπίδρασης μέσω θερμοδυναμικών μεγεθών*

Οι πιθανοί τύποι θερμοδυναμικής αλληλεπίδρασης μεταξύ μικρών μορίων και βιομορίων, όπως το DNA είναι: δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις van der Waals, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση και ομοιοπολικός δεσμός. Ο τύπος της αλληλεπίδρασης μπορεί να προσδιοριστεί μέσω των τιμών των θερμοδυναμικών μεγεθών ΔG, ΔΗ και ΔS του συστήματος. Η εξίσωση van't Hoff χρησιμοποιείται συχνά για να υπολογιστούν αυτές οι θερμοδυναμικές τιμές.

$$lnK = -\frac{\Delta H^{\circ}1}{R} + \frac{\Delta S^{\circ}}{R}$$
 (van't Hoff) [113]

Η ελεύθερη ενέργεια Gibbs υπολογίζεται από την εξίσωση [114]:

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ} = -RTInK$$

Με βάση τα πρόσημα των θερμοδυναμικών παραμέτρων διακρίνονται τέσσερις συνδυασμοί για το χαρακτηρισμό του είδους των δυνάμεων αλληλεπίδρασης μικρών μορίων με τα μόρια στόχους [88, 89].

ΔΗ < 0 ή ΔΗ ≈ 0 και ΔS > 0: ηλεκτροστατικές δυνάμεις ΔΗ < 0 και ΔS < 0: δυνάμεις Van der Waals ή δεσμοί υδρογόνου ΔΗ > 0 και ΔS > 0: υδρόφοβες δυνάμεις ΔΗ < 0 και ΔS ≈0 και ΔS > 0: ιοντικές αλληλεπιδράσεις

# Κεφάλαιο 2: Πειραματικό Μέρος

### 2.1. Αντιδραστήρια και ενώσεις

Το D<sub>2</sub>O καθαρότητας 99.9% το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη φασμάτων NMR αγοράστηκε από την Sigma Aldrich. Το δεοξυνουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> (DNA) αγοράστηκε από την Eurogentec και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης ύψους 120 cm και διαμέτρου 2,5 cm. Ως υλικό πλήρωσης χρησιμοποιήθηκε ο πολυσακχαρίτης Sephadex G-25 και ως μέσο έκλουσης χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό. Το διαλυμα βρωμιούχου εθιδίου (EtBr) 10 mg/mL σε διαλύτη H<sub>2</sub>O, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα φθορισμού αγοράστηκε από την Sigma Aldrich. Τα φωσφορικά άλατα Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O καθαρότητας >98% και NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>· H<sub>2</sub>O καθαρότητας >98% που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος αγοράστηκαν από την ACS.

Τα γνωστά σύμπλοκα (1)Cl<sub>4</sub> - (6)Cl<sub>4</sub> συντέθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία [100] ξεκινώντας από τα αντίστοιχα μονομεταλλικά [Ru(cym)(bpy)Cl][PF6] και [Ru(cym)(phen)Cl][PF6] [101] με προσθήκη των γεφυρωτικών υποκαταστατών BL, 4,4'-διπυριδίνη (BL-1), 1,2-δις(4-πυριδιλ-)εθάνιο, (BL-2) και 1,3-δις(4-πυριδιλ-) προπάνιο (BL-3). Για λόγους σύγκρισης συντέθηκε και το αντίστοιχο μονομεταλλικό σύμπλοκο (**7**)Cl<sub>4</sub> [101].

### 2.2. Οργανολογία

Για τις μετρήσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χρησιμοποιήθηκε το όργανο Bruker Avance 500 με συχνότητα συντονισμού πρωτονίου 500,13 MHz. Η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος TopSpin 4.1.1 (Bruker Analytik GmbH).

Οι μετρήσεις εκπομπής φθορισμού πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση φθορισμομέτρου Jasco FP-8300, εξοπλισμένου με λαμπτήρα ξένου ως πηγή φωτός. Τα φάσματα εκπομπής καταγράφηκαν σε μήκος κύματος 510 – 850 nm με διέγερση στα 480 nm σε κυψελίδα από χαλαζία (quartz cell) διαδρομής b=1 cm. Τα slit widths διέγερσης (excitation) και εκπομπής (emission) διατηρήθηκαν στα 5 nm. Η επεξεργασία των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Spectra Gryph 1,2.

Η λήψη των φασμάτων απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (Uv-Vis) πραγματοποιήθηκε στο φασματοφωτόμετρο UV-VIS/Specord 205, με κυψελίδες από χαλαζία οπτικής διαδρομής b = 1 cm και διαλύτη H<sub>2</sub>O υψηλής καθαρότητας για UV. Η θερμοκρασία λήψης των φασμάτων ήταν 298 K και η περιοχή λήψης τους από 220 έως 900 nm.

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των κυτταρικών σειρών και η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του οργάνου και του λογισμικού IncuCyte Zoom (Essen BioScience, Hertfordshire, United Kingdom)

[103]. Οι τιμές IC<sub>50</sub> του cisplatin και των συμπλόκων υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Graphpad Prism έκδοση 8.01.

### 2.3 Μέθοδοι

Για την παρασκευή όλων των χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων, τόσο στη φασματοσκοπιά NMR, όσο και στο φθορισμό χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διαλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer) συγκέντρωσης 100 mM και pH = 7,0, το οποίο παρασκευάστηκε με την ακόλουθη διαδικασία: σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL προστέθηκαν 200 mL διαλύματος Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O συγκέντρωσης 0,058 M και 200 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O συγκέντρωσης 0,42 M. Η ακριβής τιμή του pH υπολογίστηκε με την βοήθεια ψηφιακού πεχάμετρου και την προσθήκη μικρής ποσότητας HCl ή NaOH. Τέλος προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 mL. Τα φάσματα NMR λήφθηκαν σε διαλύτη H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O (9:1), με το H<sub>2</sub>O να αντιστοιχεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (100 mM pH = 7.0). Για τις μετρήσεις φθορισμού το αρχικό διάλυμα βρωμιούχου εθιδίου (EtBr) 10 mg/mL αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικής συγκέντρωσης 5,2 μM.

Αρχικά υπολογίστηκε η συγκέντρωση του διαλύματος του DNA μέσω φασματοσκοπίας UV. Το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGATCGCG-3')<sub>2</sub> είναι αυτοσυμπληρωματικό και η αρίθμηση των βάσεων του γίνεται ως εξής: d(-5'-C<sub>1</sub>-G<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-G<sub>4</sub>-A<sub>5</sub>-A<sub>6</sub>-T<sub>7</sub>-T<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>-G<sub>10</sub>-C<sub>11</sub>-G<sub>12</sub>-3')<sub>2</sub>. Η ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου υπολογίστηκε αρχικά με ζύγιση και στην συνεχεία προσδιορίστηκε βάση της απορρόφησής του στην περιοχή του υπεριώδους (260 nm), συμφώνα με την σχέση C<sub>oligo</sub> = A<sub>260</sub>/ε<sub>oligo</sub>\*I, όπου C<sub>oligo</sub> είναι η συγκέντρωση του ολιγονουκλεοτιδίου σε μg/mL, A<sub>260</sub> είναι η απορρόφηση στα 260 nm και ε<sub>oligo</sub> είναι ο ειδικός συντελεστής μοριακής απορρόφησης σε M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> και ισούται με 191511 [102]. Η τελική συγκέντρωση του ολιγονουκλεοτιδίου υπολογίστηκε στα 2mM.

### i. NMR-NOESY

Με τη χρήση φασματοσκοπίας Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού 1D <sup>1</sup>H NMR και 2D NOESY NMR εξετάστηκε ο τρόπος δέσμευσης των συμπλόκων {[( $\eta^{6}$ cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>( $\mu$ -BL-1)}Cl<sub>4</sub> [ή (**4**)Cl<sub>4</sub>], [( $\eta^{6}$ -cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>( $\mu$ -BL-2)}Cl<sub>4</sub> [ή (**5**)Cl<sub>4</sub>] και [( $\eta^{6}$ -cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>( $\mu$ -BL-3)}Cl<sub>4</sub> [ή (**6**)Cl<sub>4</sub>] με το ολιγονουκλεοτίδιο DNA d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Για λόγους σύγκρισης η φασματοσκοπική αυτή μελέτη πραγματοποιήθηκε και με το αντίστοιχο μονοπυρηνικό σύμπλοκο [( $\eta^{6}$ cym)Ru(phen)(py)]Cl<sub>2</sub> (**7**)Cl<sub>2</sub>. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Αρχικά καταγράφηκαν και αναλύθηκαν τα φάσματα NMR 1D <sup>1</sup>H και 2D (COSY και NOESY) του ελεύθερου d(5'-CGCGATCGCG-3')<sub>2</sub>, συγκέντρωσης 2mM σε διαλύτη H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O (9:1) σε διάλυμα φωσφορικών αλάτων (100 mM pH = 7.0), στα 500 MHz και θερμοκρασία 298 K. Για τα φάσματα NOE επιλέχθηκε mixing time , t<sub>mix</sub> = 350 ms. Σε όμοιο διαλύτη, αλλά και συνθήκες λήψης καταγράφηκαν τα φάσματα των ελεύθερων συμπλόκων (**4**)Cl<sub>4</sub>, (**5**)Cl<sub>4</sub>, (**6**)Cl<sub>4</sub> και (**7**)Cl<sub>4</sub>.

Ακολούθησε τιτλοδότηση του DNA με διαλύματα των παραπάνω συμπλόκων σε διαλύτη ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (100 mM pH = 7.0). Διάλυμα DNA H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O (9:1) 2mM τιτλοδοτήθηκε σε κάθε μία περίπτωση με το διάλυμα του συμπλόκου έτσι ώστε να επιτευχθεί αρχικά μοριακή αναλογία r = 0,5 και στη συνέχεια r = 1 και r = 2. Αξίζει να σημειωθεί ότι για τα τέσσερα σύμπλοκα (**4**)Cl<sub>4</sub>, (**5**)Cl<sub>4</sub>, (**6**)Cl<sub>4</sub> και (**7**)Cl<sub>4</sub> και σε κάθε μοριακή αναλογία πραγματοποιήθηκε επώαση στους 298 K για 30 λεπτά πριν την καταγραφή του φάσματος. Σε όλες τις τιτλοδοτήσεις καταγράφηκαν τα φάσματα 1D <sup>1</sup>H NMR και 2D NMR COSY και NOESY , με στόχο την απόδοση των χημικών μετατοπίσεων τόσο των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου, όσο και των πρωτονίων του συμπλόκου, και κατ' επέκταση το χαρακτηρισμό του τύπου πρόσδεσής του στη διπλή έλικα.

### ii. Φθορισμός

Ο τύπος πρόσδεσης των συμπλόκων (1)Cl<sub>4</sub> - (6)Cl<sub>4</sub> και (7)Cl<sub>2</sub> με το DNA εξετάστηκε επίσης μέσω πειραμάτων ανταγωνιστικής πρόσδεσης- απόσβεσης φθορισμού σε διαλύματα βρωμιούχου εθιδίου (EtBr). Τα πειράματα απόσβεσης φθορισμού πραγματοποιήθηκαν με τιτλοδοτήσεις διαλυμάτων DNA-EtBr με τη σειρά συμπλόκων (1)Cl<sub>4</sub> - (7)Cl<sub>4</sub>. Αρχικά σε διάλυμα d(5'-CGCGATCGCG-3')<sub>2</sub> συγκέντρωσης 20 μΜ προστέθηκε σταδιακά διάλυμα EtBr συγκέντρωσης 5,2 μΜ μέχρι κορεσμού [89]. Ο κορεσμός του διαλύματος DNA από το διάλυμα EtBr έγινε αντιληπτός μέσω της εκπομπής φθορισμού, η οποία στη συγκέντρωση κορεσμού αποκτά μέγιστη και πρακτικά σταθερή τιμή. Κατόπιν προστέθηκαν διαδοχικές ποσότητες από κάθε διάλυμα συμπλόκου (75 - 750 μL) συγκέντρωσης 1 mM (stock solution) στο κορεσμένο με EtBr διάλυμα DNA. Όλες οι μετρήσεις καταγράφηκαν μετά από χρόνο επώασης 15 λεπτών στους 291, 298 και 310 Κ. Σε κάθε περίπτωση η ένταση του φθορισμού του συστήματος DNA-EtBr μειωνόταν σε διαφορετικό βαθμό με αύξηση της συγκέντρωσης των συμπλόκων. Η μέθοδος υπολογισμού των σταθερών K<sub>SV</sub> και K<sub>b</sub> παρουσιάζονται στην παράγραφο 2.4.

### *iii. Κυτταροτοξικές μελέτες*

Για τη μελέτη της επίδρασης των συμπλόκων (**4**)Cl<sub>4</sub>, (**5**)Cl<sub>4</sub> και (**6**)Cl<sub>4</sub> στην *in vitro* ανάπτυξη κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής σειρές καρκινικών κυττάρων: η MCF7 (αδενοκαρκίνωμα ανθρώπινου μαστού), η NIH-3T3 (εμβρυονικός ινοβλαστής ποντικού), η A2780 (ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου των ωοθηκών) και το ανθεκτικό στο cisplatin ανάλογό της, A2780cis-res. Οι δύο πρώτες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% βόειο εμβρυϊκό ορό και 1% πενικιλλίνη/ στρεπτομυκίνη. Οι άλλες δύο αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI1640 με 10% βόειο εμβρυϊκό ορό και 1% πενικιλλίνη/ στρεπτομυκίνη. Οι άλλες δύο αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI1640 με 10% βόειο εμβρυϊκό στος ειρές επωάστηκαν σε υγρή ατμόσφαιρα παρουσία 5% CO<sub>2</sub> στους 37 °C. Στις παραπάνω καρκινικές σειρές προστείθονταν σταδιακά αυξανόμενες συγκεντρώσεις των τριών συμπλόκων, (**4**)Cl<sub>4</sub>, (**5**)Cl<sub>4</sub> και (**6**)Cl<sub>4</sub>, για 72 ώρες. Στους ίδιους τύπους κυττάρων προστέθηκε και cisplatin ως θετικό control.

### 2.4. Υπολογισμός σταθερών πρόσδεσης και θερμοδυναμικών μεγεθών

Οι τιμές των σταθερών πρόσδεσης και των θερμοδυναμικών μεγεθών υπολογίζονται με την ακόλουθη μεθοδολογία:

Αρχικά υπολογίζεται η απόσβεση φθορισμού (fluorescence quenching property) που περιγράφεται από την εξίσωση Stern-Volmer [109]:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q \tau_0[Q]$$

όπου F<sub>0</sub> και F αντιστοιχούν στις εντάσεις φθορισμού απουσία και παρουσία μορίου αποσβέστη αντίστοιχα. Η K<sub>SV</sub> είναι η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer και [Q] η συγκέντρωση της ένωσης. Η κλίση της γραμμικής γραφικής παράστασης F<sub>0</sub>/F συναρτήσει της [Q] δίνει την τιμή της K<sub>SV</sub>.

Σύμφωνα με την εξίσωση :

### $K_{SV} = k_q \tau_0$

όπου K<sub>q</sub> η βιομοριακή σταθερά απόσβεσης (biomolecular quenching rate constant), τ<sub>0</sub> ο μέσος χρόνος ζωής του μορίου χωρίς αποσβέστη, που ισούται με to 10<sup>-8</sup> s [110], μπορεί να βρεθεί αν ο μηχανισμός απόσβεσης είναι στατικός (σχηματισμός συμπλόκου βασικής κατάστασης μεταξύ ενός αποσβέστη και ενός φθοροφόρου) ή δυναμικός [111].

Ο αριθμός των σημείων πρόσδεσης (n) και η σταθερά πρόσδεσης (K<sub>b</sub>) μεταξύ των συμπλόκων και του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> υπολογίζεται από τη διπλή λογαριθμική εξίσωση[112]:

### $log[(F_O-F)/F] = nlog[Q] + logK_b$

Η γραφική παράσταση log[F<sub>0</sub>-F/F] συναρτήσει του log[Q] είναι ευθεία γραμμή και οι τιμές των n and K<sub>b</sub> μπορούν να υπολογιστούν από την κλίση και τη σταθερή απόσταση από των άξονα των x αντίστοιχα σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες.

Οι θερμοδυναμικές παράμετροι υπολογίζονται από την εξίσωση Van't Hoff [113]:

$$lnK = -\frac{\Delta H^{\circ}}{R}\frac{1}{T} + \frac{\Delta S^{\circ}}{R}$$

όπου Κ η σταθερά πρόσδεσης, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων, και T η θερμοκρασία σε Κ.

Η ελέυθερη ενέργεια Gibbs υπολογίζεται από τη εξίσωση [114]:

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ} = -RTInK$$

# Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα- Συζήτηση

# 3.1 Χαρακτηρισμός ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-GCGCAATTCGCG-3')2

Παρακάτω περιγράφεται η διαδικασία χαρακτηρισμού του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Η απόδοση των σημάτων του πραγματοποιήθηκε με χρήση φασματοσκοπίας NMR (Nuclear Magnetic Resonance), σε H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1), για το χαρακτηρισμό και των ανταλλάξιμων πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου. Συγκεκριμένα λήφθηκε το φάσμα μίας διάστασης <sup>1</sup>H NMR, με χρήση της παλμικής ακολουθίας zgesgp (*Εικόνα S1*)και τα φάσματα δύο διαστάσεων COSY (**CO**rrelated **S**pectroscop**Y**) και NOESY (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**) (*Εικόνες S2 και S3*).

Ο προσδιορισμός των σημάτων της αλληλουχίας d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> εκκινεί με την απόδοση των μη ανταλλάξιμων πρωτονίων που αντιστοιχούν στις βάσεις και τα σάκχαρα.

### 3.1.1. Απόδοση μη ανταλλάξιμων πρωτονίων

Τα σταθερά δίκλωνα μόρια νουκλεϊκών οξέων παρουσιάζουν καθορισμένες μικρές αποστάσεις και διαδρομές εντός των κλώνων (pathways), που μπορούν να αξιοποιηθούν για το χαρακτηρισμό της αλληλουχίας του DNA με βάση τα πειράματα φασματοσκοπίας 2D NOESY [104].

Η πιο συνήθης διαδρομή είναι μέσω της αλληλεπίδρασης του πρωτονίου H6/H8 μιας βάσης με το πρωτόνιο H1' του σακχάρου [105]. Η εγγύτητα του πρωτονίου H1' με τη δική του βάση καθώς και με τα πρωτόνια της επόμενης βάσης του ίδιου κλώνου επιτρέπει μια «μετάβαση» από βάση  $\rightarrow$  σε σάκχαρο  $\rightarrow$  σε βάση. Συγκεκριμένα, στη δεξιόστροφη διπλή έλικα του DNA το πρωτόνιο H1' ενός σακχάρου βρίσκεται κοντά στο πρωτόνιο H8 των πουρινών ή το πρωτόνιο H6 των πυριμιδινών, της δικής του βάσης, καθώς και στο H6/H8 του επόμενου νουκλεοτιδίου (με κατεύθυνση από το 5' προς το 3' άκρο της αλυσίδας) [105].

Με βάση τα παραπάνω ο προσδιορισμός των χημικών μετατοπίσεων για το d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, ακολουθεί τα εξής βήματα:

### 1. Προσδιορισμός των σημάτων των πρωτονίων των κυτοσινών.

Τα σήματα των πρωτονίων H5/H6 των κυτοσινών, βρίσκονται στην αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR (περιοχή 5-8 ppm). Μάλιστα τα σήματα αυτά είναι οι μόνες διπλές κορυφές στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR. Επιπλέον στα φάσμα COSY, τα πρωτόνια H5/H6 της ίδια κυτοσίνης, δίνουν διασταυρούμενη κορυφή, καθώς είναι πρωτόνια που ανήκουν σε γειτονικούς άνθρακες. Οι crosspeaks μεταξύ των H5 και H6 των κυτοσινών φαίνονται στο φάσμα της *Εικόνας 25*. Λόγω της μικρής απόστασης μεταξύ των πρωτονίων H5-H6 (2,46 Å), οι cross peaks αυτές αναγνωρίζονται εύκολα και στο φάσμα NOESY.



Εικόνα 25. Φάσμα COSY του d(5'-GCGCAATTCGCG-3')2. Στο φάσμα διακρίνονται τρεις περιοχές με έντονες διασταυρούμενες κορυφές: α. crosspeaks μεταξύ των H5 και H6 (περίπου 5,5-7,5 ppm), b. crosspeaks μεταξύ των H6 και – CH3 (περίπου 7,5-1 ppm) c. crosspeaks μεταξύ των πρωτονίων του ανθρακικού σκελετού των σακχάρων.

### 2. Προσδιορισμός του 5' άκρου της αλληλουχίας.

Έχοντας εντοπίσει τα πρωτόνια των κυτοσινών, ελέγχουμε στο φάσμα NOESY ποια κορυφή από τα H6 δίνει μόνο μια cross-peak στην περιοχή των H1' των σακχάρων (5-6 ppm). Το H6 αυτό ανήκει στην τερματική βάση C1, που βρίσκεται στο 5' άκρο της αλληλουχίας (Εικόνα 26). Έτσι γίνεται η απόδοση των κορυφών των πρωτονίων H5/H6 της C1 και του H1' του σακχάρου της.

# 3. Προσδιορισμός των Η8 των γουανινών και των υπόλοιπων Η5/Η6 των κυτοσινών.

Τα H6 των κυτοσινών δίνουν cross peak στο NOESY με τα H8 της επόμενης γουανίνης. Με την σειρά τους τα H8 των γουανινών δίνουν NOE σήμα με τα H6 της επόμενης γουανίνης κ.ο.κ. (Εικόνα 26). Επιπλέον τα H8 είναι αρωματικά πρωτόνια και δίνουν χαρακτηριστικές απλές κορυφές σε εκείνη την περιοχή (Εικόνα 27) [1]. Έτσι εντοπίζονται τα H8 των G2 και G4, στην περιοχή 7,83-7,93 ppm, καθώς και τα πρωτόνια H5/H6 της C3.

### 4. Προσδιορισμός των Η8 των αδενινών.

Με την ίδια συλλογιστική πορεία, το H8 της A5 θα έχει NOE σήμα με το H8 της προηγούμενης κυτοσίνης. Πράγματι υπάρχει μία απλή κορυφή στα 8,08 ppm που αποδόθηκε σε αυτό το πρωτόνιο (Εικόνα 26). Στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR, η κορυφή αυτή έχει διπλάσια ολοκλήρωση σε σχέση με τις άλλες κορυφές, που αντιστοιχούν σε ένα πρωτόνιο. Με το δεδομένο αυτό, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι σε αυτή την κορυφή υπάρχει ακόμη ένα πρωτόνιο το οποίο ανήκει είτε στην A6 είτε σε μία από τις γουανίνες G10, G12 [104]. Αν το πρωτόνιο αυτό ανήκε σε μία γουανίνη θα έπρεπε να δίνει NOE σήμα με κάποια διπλή κορυφή από τα H6 των κυτοσινών C9 ή C11. Κάτι τέτοιο δεν το εντοπίζουμε άρα αρχικά υποθέσαμε και μετέπειτα επιβεβαιώθηκε, ότι το πρωτόνιο H8 της A6 έχει την ίδια χημική μετατόπιση με το H8 της A5, στα 8,08 ppm (Εικόνα 27).



Εικόνα 26. Φάσμα NOESY του d(5'-GCGCAATTCGCG-3')2. Στο φάσμα διακρίνονται cross-peaks μεταξύ των H8 των γουανινών και των H6 των επόμενων κυτοσινών, των H8 των αδενινών και τα H8 των προηγούμενων γουανινών, καθώς και των H2A5/H5C9.

### 5. Προσδιορισμός των σημάτων των πρωτονίων των θυμινών.

Η παραπάνω κορυφή στα 8.08 ppm δίνει cross-peak στο φάσμα NOESY, με την απλή κορυφή στα 7,09 ppm. Με την ίδια συλλογιστική πορεία, εκείνη των διανουκλεοτιδικών αλληλεπιδράσεων, το σήμα αυτό ανήκει στο H6 της T7. Το σήμα αυτό επαληθεύεται ότι ανήκει σε πρωτόνιο θυμίνης και από το φάσμα COSY, καθώς δίνει cross-peak με απλή κορυφή στα 1,24 ppm. Η απλή αυτή κορυφή, σχετικά υψηλής έντασης ανήκει στην μεθυλομάδα -CH<sub>3</sub>, της ίδιας θυμίνης. Σε εκείνη την περιοχή του φάσματος COSY, υπάρχει ακόμη μία διασταυρούμενη κορυφή, μεταξύ των κορυφών στα 1,51 και 7,35 ppm (Εικόνα 25) [104]. Οι κορυφές αυτές αποδίδονται στα πρωτόνια -CH<sub>3</sub> και H6 της T8. Αυτές οι cross-peaks εμφανίζονται και στο φάσμα NOESY, εξαιτίας της σταθερής απόστασης μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων H6 των θυμινών T7, T8 και των αντίστοιχων μεθυλομάδων (CH<sub>3</sub>) αυτών.

# 6. Προσδιορισμός των υπολοίπων πρωτονίων των γουανινών και των κυτοσινών.

Ακολουθώντας την πορεία των σημάτων ΝΟΕ μεταξύ των πρωτονίων Τ8H6  $\rightarrow$  C9H6, C9H6  $\rightarrow$  G10H8, G10H8  $\rightarrow$  C11H6 και C11H6  $\rightarrow$  G12H8, αποδίδονται τα υπόλοιπα H6 και H8 των C9, C11 και G10, G12 αντίστοιχα. Με βάση το βήμα 1 βρίσκονται και όλα σήματα των H5 των C9 και C11 (Εικόνα 26). Τέλος επιβεβαιώνεται ότι το H8 της A6 είναι στα 8,08 ppm.

## 7. Προσδιορισμός σημάτων Η2 πρωτονίων αδενινών.

Οι κορυφές αυτών των πρωτονίων θα βρίσκονται στην περιοχή 6-8 ppm, καθώς είναι αρωματικά πρωτόνια. Οι μόνες κορυφές που βρίσκονται σε αυτή την περιοχή και δεν έχουν αποδοθεί σε κάποιο πρωτόνιο είναι αυτές στα 7,21 ppm και 7,60 ppm. Με βάση τη βιβλιογραφία, οι κορυφές των Η2 πρωτονίων παρουσιάζουν ΝΟΕ σήμα, με τα κοντινά H5 πρωτόνια των κυτοσινών του συμπληρωματικού κλώνου. Έτσι στην περίπτωση σας το H2 της A5 με το H5 της C9. Πράγματι υπάρχει ΝΟΕ σήμα ανάμεσα στις κορυφές στα 7,21 και στα 5,60 ppm(Εικόνα 26). Άρα η χημική μετατόπιση του H2 της A6 είναι στα 7,60 ppm.



Εικόνα 27. Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>Η NMR του d(5'-GCGCAATTCGCG-3')2(ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz. Διακρίνονται τα μη ανταλλάξιμα πρωτόνια των βάσεων, καθώς και τα άμινο πρωτόνια που συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου (NH2b) και τα άμινο πρωτόνια που δε συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου (NH2n.b.)

### 8. Προσδιορισμός των Η1' πρωτονίων των σακχάρων.

Έχοντας ολοκληρώσει την απόδοση των πρωτονίων των αζωτούχων βάσεων του DNA, επιστρέφουμε στη μέθοδο «μετάβαση» από βάση  $\rightarrow$  σε σάκχαρο  $\rightarrow$  σε βάση, για την απόδοση όλων των H1' των υπόλοιπων σακχάρων. Συγκεκριμένα έχουμε τα NOE σήματα: G2H8  $\rightarrow$  G2H1', C3H6  $\rightarrow$  C3H1', G4H8  $\rightarrow$  G4H1', A5H8  $\rightarrow$  A5H1', A6H8  $\rightarrow$ A6H1', T7H8  $\rightarrow$  T7H1', T8H8  $\rightarrow$  T8H1', C9H6  $\rightarrow$  C9H1', G10H8  $\rightarrow$  G10H1', C11H6  $\rightarrow$ C11H1', G12H8  $\rightarrow$  G12H1'.

### 9. Προσδιορισμός των υπολοίπων πρωτονίων των σακχάρων.

Μετά τον προσδιορισμό των Η1' μπορεί να ακολουθήσει η ταυτοποίηση και των υπολοίπων πρωτονίων του σακχάρου, με τη βοήθεια του φάσματος COSY. Μέσω των COSY σημάτων των διαδοχικών γειτονικών πρωτονίων προσδιορίζεται ο σκελετός του

σακχάρου. Τα πρωτόνια H1' συνδέονται με τα H2' και H2''. Τα H2' και H2'' συνδέονται με τα H3', και αυτά με τα H4'. Ομοίως τα H4' συνδέονται με τα H5' και H5'', όμως η ταυτοποίηση των τελευταίων καθίσταται πιο δύσκολη, καθώς οι κορυφές των H4' και H5'-H5'' βρίσκονται σε κοντινές περιοχές χημικών μετατοπίσεων και επομένως αλληλεπικαλύπτονται στο φάσμα [105]. Η περιοχή του φάσματος COSY στην οποία εμφανίζονται οι διασταυρούμενες κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των σακχάρων εμφανίζονται στο φάσματος της *Εικόνας 25*. Αξίζει να σημειωθεί ότι με βάση τη βιβλιογραφία οι χημικές μετατοπίσεις των H2'' εμφανίζονται γενικά σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με των H2' [104]. Επίσης η απόδοση των H1' και H2' της A6 και T7 μπορούν να επαληθευτούν και από τις cross-peaks στο φάσμα NOESY. Συγκεκριμένα οι μεθυλομάδες -CH<sub>3</sub> των θυμινών έχουν NOE σήμα με τα H1' και H2' της T8 με τα H1'-H2' της T7 [104].

Καθώς το d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> είναι αυτοσυμπληρωματικό δε χρειάζεται να επαναληφθεί η παραπάνω διαδικασία και για τον δεύτερο κλώνο της έλικας. Τα αποτελέσματα των χημικών μετατοπίσεων για τα μη ανταλλάξιμα πρωτόνια του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, τα οποία προσδιορίστηκαν με βάση την παραπάνω μεθοδολογία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

				Πρωτόνια				
Βάσεις	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1'	H2'	H2"	Н3'	H4'	H5'5"
C1	7.60	5.88	5.72	1.89	2.37	4.60	3.91	3.69 3.72
G2	7.93		5.88	2.53	2.65	4.97	4.36	3.97 4.08
C3	7.25	5.35	5.56	1.81	2.22	4.77	4.10	4.12 4.15
G4	7.83		5.42	2.63	2.74	4.97	4.39	3.97 4.06
A5	8.09	7.21	6.13	2.67	2.89	5.03	4.45	4.15 4.19
A6	8.09	7.60	5.97	2.57	2.90	4.99	4.45	n.o. 4.25
T7	7.09	1.24	5.88	1.95	2.53	4.81	4.14	4.15
T8	7.35	1.51	6.12	2.14	2.53	4.88	4.19	4.09
С9	7.44	5.60	5.64	2.04	2.39	4.86	4.14	4.10 4.17
G10	7.89		5.83	2.54	2.67	4.97	4.41	4.04 4.15
C11	7.31	5.42	5.72	1.85	2.31	4.78	4.18	4.09 n.o.
G12	7.92		6.13	2.37	2.58	4.66	4.19	n.o. n.o.

Πίνακας 3.: Χημικές μετατοπίσεις των μη ανταλλάξιμων πρωτονίων του του d(5'-GCGCAATTCGCG-3')<sub>2</sub>

#### 3.1.2 Απόδοση ανταλλάξιμων πρωτονίων

Ανταλλάξιμα πρωτόνια στο ολιγονουκλεοτίδιο θεωρούνται τα ίμινο και άμινο πρωτόνια, που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων και τα άμινο πρωτόνια που δε συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου.

Αρχικά οι χημικές μετατοπίσεις των ίμινο πρωτονίων (N1H) αποδίδονται χρησιμοποιώντας συνδυαστικά τα φάσματα 2D NOESY και <sup>1</sup>H NMR. Επειδή τα ίμινο πρωτόνια είναι ανταλλάξιμα με το διαλύτη, καθίστανται ορατά στα φάσματα NMR μόνο εάν εμπλέκονται σε δεσμό υδρογόνου ή εάν προστατεύονται από τα εν λόγω φαινόμενα ανταλλαγής με το διαλύτη [104]. Συνήθως το εύρος τιμών για τα ίμινο πρωτόνια που ανήκουν σε ζεύγη βάσεων Watson-Crick είναι 11 έως 15 ppm. Τα ίμινο πρωτόνια των ζευγών βάσεων G-C εμφανίζονται μεταξύ 13,5 και 12 ppm, ενώ αυτά των ζευγών βάσεων A-T βρίσκονται μεταξύ 14 και 13,5 ppm [105]. Η παρουσία των πέντε cross peaks στο φάσμα NOESY του μελετώμενου ολιγονουκλεοτιδίου είναι ενδεικτική του σχηματισμού σταθερής διπλής έλικας, στην οποία όλες οι βάσεις σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, εκτός από τις τερματικές. Η ταυτοποίηση αυτών έγινε ως εξής:

1. Αρχικά ταυτοποιούνται τα ίμινο πρωτόνια των ζευγών βάσεων Watson-Crick A5-T8 και A6-T7, τα οποία δίνουν ισχυρό NOE σήμα με τα H2 πρωτόνια της αντίστοιχης αδενίνης. Έτσι, το H2 της A5, στα 7,21 ppm, έχει cross-peak με το ίμινο πρωτόνιο NH1 του ζεύγους A5-T8 (13,75 ppm) και το H2 της A6, στα 7,60 ppm, έχει cross-peak με το ίμινο πρωτόνιο N1H του ζεύγους A6-T7 (13,62 ppm) (*Εικόνα 28*).



Εικόνα 28: Περιοχή του φάσματος NOESY του d(5'-GCGCAATTCGCG-3')2 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz, tmix = 350 ms), όπου διακρίνονται cross peaks μεταξύ των ίμινο πρωτονίων των T8 και T7 με τα H2 των A5 και A6 αντίστοιχα καθώς και μεταξύ των GNH1 και των αντίστοιχων GNH2b 2. Στη συνέχεια ταυτοποιούνται τα ίμινο πρωτόνια των ζευγών βάσεων Watson-Crick G2-C11, C3-C10 και G4-C9. Η ταυτοποίηση αυτών πραγματοποιείται επίσης από το φάσμα NOESY, καθώς υπάρχουν σήματα ανάμεσα στα H5 των κυτοσινών και των αντίστοιχων ίμινο πρωτονίων *(Εικόνα S3)*. Για παράδειγμα το H5 της C11 έχει διασταυρούμενη κορυφή με το ίμινο πρωτόνιο του ζεύγους G2-C11. Οι τιμές NH1 των G2-C11, C3-C10 και G4-C9 βρέθηκαν στα 13,04, 12,88 και 12,68 ppm αντίστοιχα.



Εικόνα 29.: Φάσμα μίας διάστασης <sup>1</sup> Η ΝΜR. Διακρίνονται οι πέντε χαρακτηριστικές κορυφές των ίμινο- πρωτονίων του d(5'-GCGCAATTCGCG-3')2(ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz.

### 3. Απόδοση σημάτων άμινο πρωτονίων:

Σε κάθε αμινομάδα των ζευγών G2-C11, C3-C10 και G4-C9 το ένα αμινο πρωτόνιο συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου (NH2b) με την καρβονυλομάδα (C=O) της συμπληρωματικής βάσης, ενώ το άλλο δε συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου (NH2n.b.). Αρχικά ταυτοποιούνται τα σήματα NH2b μέσω των NOE cross-peaks που εμφανίζουν με τα NH1 (Εικόνα 28). Κατόπιν, επίσης από το φάσμα NOESY ταυτοποιούνται τα NH2n.b. μέσω των cross-peaks με τα NH2b. Έτσι τα NH2b πρωτόνια του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> εμφανίζουν κορυφές στα 8,3-8,5 ppm, ενώ τα NH2n.b. στα 6,3-6,8 ppm (Εικόνα 30). Ακόμα τα NH2b δίνουν NOE σήματα με τα H5 πρωτόνια των αντίστοιχων κυτοσινών(*Εικόνα 30*).



Εικόνα 30: Περιοχή του φάσματος NOESY του d(5'-GCGCAATTCGCG-3')<sub>2</sub> (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz, tmix = 350 ms), όπου διακρίνονται cross peaks μεταξύ των άμινο πρωτονίων NH2b και NH2n.b για τα ζεύγη βάσεων G10-C3, G2-C11 και G4-C9, καθώς και cross peaks μεταξύ των NH2b και των H5 της αντίστοιχης κυτοσίνης για τα ίδια ζεύγη βάσεων.

Οι τιμές των ανταλλάξιμων πρωτονίων του d(5'-GCGCAATTCGCG-3')<sub>2</sub> συνοψίζονται στο παρακάτω πίνακα.

Πρωτόνια											
Βάσεις	NH1	NH2b	NH2n.b.								
C1G12		n.o.	n.o.								
G2C11	13.04	8.44	6.57								
C3G10	12.88	8.36	6.41								
G4C9	12.68	8.40	6.79								
A5T8	13.75	-									
A6T7	13.62	-									

Πίνακας 4: Χημικές μετατοπίσεις των ανταλλάξιμων ίμινο- και άμινο- πρωτονίων του d(5'-GCGCAATTCGCG-3')<sub>2</sub>.

3.2 Μελέτη αλληλεπιδράσεων NMR των συμπλόκων με την αλληλουχία DNA d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>.

3.2.1. Μελέτη αλληλεπιδράσεων NMR του συμπλόκου {[(η<sup>6</sup>-cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>(BL-1)}Cl<sub>4</sub> με την αλληλουχία DNA d(5΄-CGCGAATTCGCG-3΄)<sub>2</sub>.

# 3.2.1.1. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του {[(η<sup>6</sup>-cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>(μ-4,4' bpy)}Cl<sub>4</sub>, **(4)**Cl<sub>4</sub>

Με την προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> (Εικόνα 31) στο ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, αρχικά σε αναλογία r = 0,5, παρατηρούνται διπλά σήματα για τις περισσότερες από τις κορυφές του συμπλόκου, γεγονός που υποδηλώνει πως η πρότερη συμμετρία του συμπλόκου αίρεται. Παρατηρούνται επίσης μετατοπίσεις των κορυφών του (4)Cl<sub>4</sub> προς υψηλότερα πεδία (upfield) σε κλίμακα από 0,1 έως 1 ppm. Πιο συγκεκριμένα τα πρωτόνια της φαινανθρολίνης μετατοπίζονται σε χαμηλότερες τιμές ppm κατά 0,11 έως και 1,37 ppm, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός ηλεκτρονιακά πλούσιου περιβάλλοντος. Επιπλέον παρατηρείται σημαντική διαπλάτυνση των κορυφών του συμπλόκου, η οποία δίνει στοιχεία πως η κινητική της αντίδρασης πρόσδεσης του συμπλόκου στο ολιγονουκλεοτιδίου είναι ενδιάμεση στην κλίμακα χρόνου του NMR και σε θερμοκρασία 298K.



Εικόνα 31: Δομή του συμπλόκου {[(η<sup>6</sup>-cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>(μ-BL-1)}Cl<sub>4</sub>, (**4**)Cl<sub>4</sub>

Αυτού του είδους η κινητική, καθώς και οι σημαντικές μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία υποδηλώνουν ισχυρή πρόσδεση του συμπλόκου στη διπλή έλικα του ολιγονουκλεοτιδίου.

Όπως προαναφέρθηκε παρουσιάζονται σημαντικές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων δύο μονάδων της φαινανθρολίνης, με τα πρωτόνια αυτών να δίνουν πλέον διπλά σήματα στο φάσμα <sup>1</sup>Η NMR (*Εικόνα S4*). Ωστόσο παρατηρείται πως οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων, αλλά και η διαπλάτυνση των κορυφών διαφέρουν για αυτές τις δύο μονάδες, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ελαφρώς διαφορετικού ηλεκτρονιακά περιβάλλοντος για την καθεμία από αυτές. Ακόμα, σε αντίθεση με τις δύο μονάδες της φαινανθρολίνης τα δύο πρωτόνια

της γέφυρας 4,4' bpy, H<sub>α</sub> και H<sub>β</sub> μετακινούνται ελαφρώς, τα H<sub>α</sub> προς υψηλότερα πεδία (κατά 0,12 ppm) και τα H<sub>β</sub> σε χαμηλότερα πεδία (κατά 0,05 ppm) (*Εικόνα S4*).

Τα πρωτόνια του κουμενίου μετατοπίζονται οριακά, με το H8c να παρουσιάζει την μεγαλύτερη μετακίνηση κατά -0,06 ppm. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πρωτόνια H9c/H10c εμφανίζουν πλέον δύο διαφορετικά σήματα, με μικρή μετατόπιση τόσο προς χαμηλότερα, όσο και προς υψηλότερα πεδία. Οι διαφορές αυτές είναι πιθανό να οφείλονται σαφώς στην ύπαρξη διαφορετικού περιβάλλοντος λόγω πιθανής προσέγγισης των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου στη μία από τις δύο μεθυλομάδες της ισοπροπυλομάδας του κουμενίου, κατά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου στο DNA.

Μεταβάλλοντας τις αναλογίες συμπλόκου-ολιγονουκλεοτιδίου σε r = 1 και r = 2 (*Εικόνες S7 και S10*) δεν παρατηρούνται γενικά σημαντικές αλλαγές ως προς τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του συμπλόκου, σε σχέση με την αναλογία r = 0,5. Παρόλα αυτά παρατηρούνται κάποια επιπλέον σήματα τα οποία αντιστοιχούν σε κορυφές του ελεύθερου συμπλόκου, καθώς και μια μικρή προοδευτική μετατόπιση των σημάτων των πρωτονίων των φαινανθρολινών προς χαμηλότερα πεδία. Για παράδειγμα σε r = 1 η παρουσία ελευθέρου συμπλόκου πλησιάζει το ποσοστό 1% της συνολικής προσθήκης (βάσει των ολοκληρωμάτων των κορυφών των πρωτονίων) και αυξάνεται σε 4% για r = 2. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ενδιάμεση κινητική στην ισορροπία ανάμεσα στο δεσμευμένο και το ελεύθερο σύμπλοκο.

Συνοψίζοντας η αλληλεπίδραση του συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> με το ολιγονουκλεοτίδιο d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>, πραγματοποιείται πιθανόν μέσω των υποκαταστατών της φαινανθρολίνης.



Εικόνα 32: Αρωματική περιοχή φάσματος <sup>1</sup>Η NMR με ταυτοποιημένα πρωτόνια (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0 ) (a) (**4**)Cl, (b) d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (c) αναλογίες r = 0.5 and (d) at r = 1, υποδεικνύονται με κόκκινο τα σήματα της μονάδας B και με αστερίσκο (\*) τα σήματα του ελέυθερου (**4**)Cl<sub>4</sub>.

Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του συμπλόκου στις τρεις αναλογίες προσθήκης d(5'-CGCGTAGGCC-3')<sup>2</sup> παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5: Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η NMR του (**4**)Cl<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0 ) ελέυθερο (r = 0), και με προσθήκη d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> σε αναλογίες r = 0.5, 1 και 2. Οι μεταβολές παρατίθενται στις παρενθέσεις (αρνητικό πρόσημο για μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία- upfield και θετικό πρόσημο για μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία- downfield). n.o. =μη παρατηρήσιμος- not observed. Τα A και B αντιστοιχούν στα σήματα των δύο μονάδων φαινανθρολίνης.

Πρωτόνια/r	0	0.	.5	1	L	2		
	( <b>4</b> )Cl <sub>4</sub>	А	В	А	В	А	В	
H <sub>2/9</sub>	10.02	9.91 (-0.11)	9.67 (-0.35)	9.94 (-0.08)	9.71 (-0.31)	9.97 (-0.05)	9.77 (-0.25)	
H <sub>3/8</sub>	8.20	8.00 (-0.20)	7.18 (-1.02)	8.00 (-0.20)	7.16 (-1.04)	8.09 (-0.11)	7.46 (-0.74)	
H <sub>4/7</sub>	8.80	8.34 (-0.46)	7.43 (-1.37)	n.o.	7.72 (1.16)	8.26 (-0.54)	7.98 (-0.82)	
H5/6	8.07	7.17 (-0.90)	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	
Ha	8.46	8.33 (	-0.13)	8.35 (	-0.11)	8.39 (	-0.07)	
Hb	7.39	7.44 (·	+0.05)	7.40 (·	+0.01)	7.42 (+0.02)		
H <sub>2c6c</sub>	6.50	6.42 (	-0.08)	6.39 (	-0.11)	6.42 (-0.08)		
H <sub>3c5c</sub>	6.14	6.18 (-	+0.04)	6.16 (·	+0.02)	6.16 (-	+0.02)	
H <sub>9c10c</sub>	0.72	0.74 (+0.02) 0.68 (-0.04)		0.74 (+0.02)	0.68 (-0.04)	0.74 (+0.02)	0.69 (-0.03)	
H <sub>7c</sub>	1.78	1.80 (+0.02)		1.81 (·	+0.03)	1.81 (+0.03)		
H <sub>8c</sub>	2.36	2.30 (	-0.06)	2.32 (	-0.04)	2.33-0.03)		

# 3.2.1.2. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')₂ μετά την προσθήκη του (**4**)Cl₄

Με την προσθήκη συμπλόκου παρατηρούνται αλλαγές και για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου στο φάσμα <sup>1</sup>Η NMR. Οι μεταβολές αυτές θα σχολιαστούν ξεχωριστά για τις δύο κατηγορίες πρωτονίων που διαθέτει το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, τα μη ανταλλάξιμα και τα ανταλλάξιμα πρωτόνια.

### *i.* Μη ανταλλάξιμα πρωτόνια

Σε αναλογία r = 0,5, τα σήματα των πρωτονίων H<sub>8</sub> των A<sub>5</sub>/A<sub>6</sub> διαχωρίζονται, ενώ στο ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο εμφανίζονταν ως μια κοινή απλή κορυφή. Επίσης τα διαχωρισμένα πλέον σήματα μετατοπίζονται προς χαμηλότερα πεδία κατά 0.02 και 0.03 ppm αντίστοιχα, φανερώνοντας άρση της συμμετρίας του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Παρόμοια μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία εμφανίζουν και τα πρωτόνια H8 των G2, G4 και G10, ενώ τα H8 της G12 και τα H6 των C1, C9 και T7, T8 παραμένουν πρακτικά ανεπηρέαστα. Αντιθέτως τα σήματα των πρωτονίων H2 των αδενινών A5 και A6 μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία (κατά 0,14 και 0,16 ppm αντίστοιχα) (*Εικόνα S4*). Οι μεταβολές αυτές δίνουν στοιχεία πως η πρόσδεση του συμπλόκου πραγματοποιείται κοντά στο κέντρο της έλικας. Πιο συγκεκριμένα, καθώς τα H2 των A5 A6 βρίσκονται στην μικρή αύλακα της διπλής έλικας του DNA φαίνεται πως η δέσμευση των μονάδων φαινανθρολίνης πραγματοποιείται στη μικρή αύλακα μεταξύ των βάσεων -Α5Α6-.

Στη διαμόρφωση DNA B-τύπου, τα πρωτόνια H1', H4' και H5' των σακχάρων βρίσκονται επίσης στη μικρή αύλακα και αναμένεται να επηρεάζονται και αυτά σημαντικά από την δέσμευση του συμπλόκου σε αυτή. Πράγματι, τα σήματα των H1' των A5, A6 και T8 μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία σε κλίμακα 0,07 έως 0,11 ppm. Αν υποθέσουμε λοιπόν πως η μία μονάδα της φαινανθρολίνης είναι προσδεδεμένη στην αλληλουχία -A5A6- και με δεδομένο ότι το μήκος της γέφυρας είναι περίπου 10.5 Å, το σύμπλοκο αλληλεπιδρά, μέσω της άλλη φαινανθρολίνης, σε συγκεκριμένη περιοχή του ολιγονουκλεοτιδίου και μπορεί να εκτείνεται είτε προς το -3' είτε προς το -5' άκρο της αλληλουχίας. Η πρόσδεση της έταιρης φαινανθρολίνης του συμπλόκου (**4**)Cl<sub>4</sub> στο ολιγονουκλεοτίδιο, δεν μπορεί να είναι ισχυρή, εξαιτίας της ακαμψίας του γεφυρωτικού υποκαταστάτη.

Στην πρώτη περίπτωση, δηλαδή την κατεύθυνση της δεύτερης φαινανθρολίνης προς το άκρο ( $\rightarrow$ 3') και με δεδομένο ότι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών αζωτούχων βάσεων στο Β-τύπου DNA είναι 3,4 Å, η αλληλεπίδραση αυτής θα πρέπει να πραγματοποιείται κατά μήκος της αλληλουχίας T7T8C9, άρα στη μεγάλη αύλακα της έλικας του DNA. Τα πρωτόνια που βρίσκονταν στην περιοχή αυτή, όπως τα H2'' και H3' της T7, τα H5' και 5'' της T8 και το H3' της C9, μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία (> 0.05 ppm) λόγω της μικρής απόστασης τους με το αρωματικό σύστημα της γέφυρας. Η παρατηρούμενη μετατόπιση του H1' της T8 σε χαμηλότερα ppm (κατά 0.07 ppm), μπορεί να εξηγηθεί αν υποθέσουμε πως η πρόσδεση του συμπλόκου μεταβάλει τη Β-διαμόρφωση του DNA.

Στη δεύτερη περίπτωση, δηλαδή την κατεύθυνση της δεύτερης φαινανθρολίνης στο άκρο (→5΄), η σύνδεση της αναμένεται να συμβαίνει ξανά στην μεγάλη αύλακα του DNA και συγκεκριμένα κατά μήκος των G4C3G2. Πράγματι τα πρωτόνια H2΄ και H2΄΄ των G4 και G2 εμφανίζουν μεγάλες μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία υποδεικνύοντας ότι το σύμπλοκο πιθανόν κατευθύνεται προς το 5΄- άκρο της αλληλουχίας. Έτσι με βάση τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR είναι πιθανές και οι δύο κατευθύνσεις του συμπλόκου κατά μήκος του ολιγονουκλεοτιδίου. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι οι μετατοπίσεις των πρωτονίων των σακχάρων της C1 προς χαμηλότερα πεδία είναι πιθανό να προκύπτουν λόγω των μεταβολών της δομής τη διπλής έλικας DNA.

Αυξάνοντας την αναλογία σε r = 1 παρατηρείται σημαντική μετατόπιση σε χαμηλότερα πεδία των αρωματικών πρωτονίων της μεγάλης αύλακας H8 των G2, G4 και G10, των H5 της C3 και C9, το H6 της C3 καθώς και στο –CH<sub>3</sub> της T8. Η μετατόπιση αυτή υποδεικνύει ότι το σύμπλοκο (4)Cl<sub>4</sub> εκτείνεται κατά μήκος και των δύο κατευθύνσεων, μετά την αρχική πρόσδεση της φαινανθρολίνης μεταξύ των βάσεων -A5A6- στη μικρή αύλακα. Στην αναλογία αυτή παρατηρείται και η εμφάνιση ενός νέου σήματος, το οποίο αντιστοιχεί και αυτό στο πρωτόνιο H1΄ της G4 και είναι μετατοπισμένο κατά -0,17 ppm σε σχέση με το αντίστοιχο αρχικό σήμα. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο διαφορετικό περιβάλλον των βάσεων G4 στις δύο αλυσίδες λόγω της διατάραξης της διπλής έλικας. Με περαιτέρω προσθήκη συμπλόκου, σε αναλογία r = 2 δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη μετατόπιση των κορυφών των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου συγκριτικά με την αναλογία r = 1 (*Πίνακας S2*). Εξαίρεση αποτελεί η μεγάλη μετατόπιση των δύο σημάτων των πρωτονίων H1' της G4, όπου μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία κατά 0,43 και 0,57 ppm. Οι μετατοπίσεις των σημάτων των μη ανταλλάξιμων πρωτονίων του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> φαίνονται αναλυτικά στον *Πίνακα 6*.

Πίνακας 6: τιμές χημικών μετατοπίσεων <sup>1</sup>Η NMR των μη ανταλλάξιμων πρωτονίων της αζωτούχου βάσης για το ελεύθερο d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0), με προσθήκη (**4**)Cl<sub>4</sub> σε αναλογίες r = 0.5, 1, and 2. Αρνητικό πρόσημο για μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία και θετικό για μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία, n.o. = μη παρατηρήσιμες- not observed. Υπογραμμισμένες διαφορές > 0.05 ppm.

r		0			0.5			1		2		
Βάσεις	H6/H8	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1′	H6/H8	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1′	H6/H8	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1′	H6/H8	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1′
C1	7.60	5.88	5.72	7.60 (0.00)	+0.01	+0.04	0.00	+0.01	<u>+0.06</u>	+0.01	+0.03	n.o.
G2	7.93		5.88	7.95 (+0.02)		<u>-0.07</u>	<u>+0.06</u>		<u>-0.09</u>	+0.02 +0.22		n.o.
C3	7.25	5.35	5.56	+0.02	-0.04	0.00	+0.05	<u>+0.07</u>	+0.01	+0.07	<u>+0.10</u>	+0.01
G4	7.83		5.42	+0.02		<u>-0.08</u>	<u>+0.06</u>	-0.20	<u>-0.09</u> <u>-0.16</u>	<u>+0.12</u> +0.22	<u>-0.21</u>	<u>-0.43</u> <u>-0.57</u>
A5	8.09	7.21	6.13	-0.02	<u>-0.14</u>	<u>-0.11</u>	+0.04	<u>-0.11</u>	<u>-0.11</u>	<u>+0.07</u>	-0.07	<u>-0.11</u>
A6	8.09	7.60	5.97	-0.03	<u>-0.16</u>	-0.04	+0.04	<u>-0.14</u>	-0.02	<u>+0.10</u>	n.o.	-0.04
Τ7	7.09	1.24	5.88	+0.02	+0.03	-0.04	+0.04	+0.03 <u>+0.06</u>	<u>-0.07</u>	<u>+0.08</u>	+0.09	-0.02
Т8	7.35	1.51	6.12	+0.02	+0.04	-0.02	+0.04	+0.04 <u>+0.09</u>	-0.04	<u>+0.05</u>	+0.15	<u>-0.09</u>
С9	7.44	5.60	5.64	+0.01	<u>+0.06</u>	-0.03	+0.02	<u>+0.06</u> +0.15	<u>+0.06</u>	0.00	+0.28	<u>-0.06</u>
G10	7.89		5.83	+0.04		0.00	+0.07		-0.02	+0.11		n.o.
C11	7.31	5.42	5.72	0.00	0.00	-0.04	-0.01	0.00	-0.08	+0.01	+0.03	<u>-0.12</u>
G12	7.92		6.13	0.00		-0.02	-0.03		<u>-0.06</u>	+0.01		<u>-0.14</u>

#### *ii. Ανταλλάξιμα πρωτόνια*

Σε αναλογία r = 0,5 τα ίμινο πρωτόνια (NH1) μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία, με αυτά NH1 των ζευγών A5-T8 και A6-T7 να μετακινείται σημαντικά κατά 0,11 και 0,06 ppm αντίστοιχα, ενισχύοντας τα στοιχεία για αλληλεπίδραση του συμπλόκου (**4**)Cl<sub>4</sub> στο σημείο αυτό της έλικας. Πέρα από μετατόπιση παρατηρείται και διαπλάτυνση των κορυφών αυτών. Αντιθέτως τα NH1 των βάσεων G2-C11, C3-G10 και G4-C9 ενώ παρουσιάζουν μικρή μετατόπιση προς χαμηλότερα ppm δεν φαίνεται να έχουν διαπλάτυνση σε αυτή την αναλογία.

Με περαιτέρω προσθήκη συμπλόκου και σε αναλογία r = 1 οι κορυφές των NH1 των ζευγών A5-T8 και A6-T7 δεν είναι πλέον ορατές, υποδεικνύοντας ότι οι παραπάνω βάσεις δεν συνδέονται πλέον με δεσμούς υδρογόνου. Σε αντίθεση με τις Α και Τ, τα υπόλοιπα σήματα των NH1 των βάσεων G2-C11, C3-G10 και G4-C9 εμφανίζονται σημαντικά μετατοπισμένα προς υψηλότερα πεδία κατά 0,18, 0,27 και 0,25 ppm αντίστοιχα. Η μετατόπιση αυτή φανερώνει την ασθενέστερη πλέον σύνδεση των συμπληρωματικών αυτών βάσεων με δεσμούς υδρογόνου. Επίσης, η ένταση των σημάτων αυτών ήταν χαμηλότερη, σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στη δημιουργία προϊόντων προσθήκης μεταξύ του (**4**)Cl<sub>4</sub> και του DNA.

Σε αναλογία r = 2 χάνονται πλέον και τα σήματα των NH1 των βάσεων G2-C11, C3-G10, ενώ το σήμα του NH1 G4-C9, το οποίο παραμένει μετατοπίζεται κατά -0,23 ppm. Έτσι το μοναδικό ζεύγος που παραμένει συνδεδεμένο με δεσμούς υδρογόνου σε αυτή την αναλογία είναι το G4- C9.

Τα άμινο- πρωτόνια διακρίνονται σε εκείνα που συμμετέχουν στο δεσμό υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων C-G και σε εκείνα που δε συμμετέχουν. Σε αναλογία r = 0.5 και για τα σήματα των G2-C11, C3-G10 που συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου (NH2b) μετατοπίζονται ελαφρώς προς υψηλότερα πεδία ενώ το NH2b των C4-G9 μετακινείται ελαφρώς προς χαμηλότερα. Τα σήματα των πρωτονίων που δε συμμετέχουν στο δεσμό υδρογόνου (NH2n.b.) μετακινούνται ελαφρώς προς χαμηλότερα πεδία και για τα τρία ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων (*Εικόνα 33*).



Εικόνα 33.Τμήμα του φάσματος <sup>1</sup>Η NMR του d(CGCGAATTCGCG)2.] (α) Ελεύθερο και με προσθήκη (4)Cl4 σε r = 0,5, 1, 2 (b–d), όπου φαίνονται τα ίμινο πρωτόνια των W.–C. δεσμών υδρογόνου.Στα συνδεδεμένα με δεσμούς υδρογόνου ζεύγη βάσεων Α-Τ και G-C φαίνονται η μεγάλη και η μικρή αύλακα της διπλής έλικας του DNA.

Σε r = 1 αξιοσημείωτη είναι η εμφάνιση διπλών σημάτων για τα NH2n.b. των G2-C11, C3-G10 και C4-G9, η οποία αποδίδεται στην άρση της συμμετρίας της διπλής έλικας λόγω της αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο. Αντίθετα δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στις μετατοπίσεις των NH2b (*Εικόνα 33*).

Σε r = 2 εμφανίζεται μόνο το σήμα του NH2b του δεσμού G4-C9 (Εικόνα 33), δηλαδή η διπλή έλικα συνδέεται πλέον μόνο μέσω των δεσμών υδρογόνου G4-C9, ενώ δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα σήματα των NH2n.b. σε σχέση με την r =1.

Συμπερασματικά η σταδιακή προσθήκη συμπλόκου προκαλεί σχάση της διπλής έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου, αρχικά στο κέντρο και πιο συγκεκριμένα στο κομμάτι της αλληλουχίας που περιέχει τις -A5-A6- και προοδευτικά προς τα δύο άκρα στις -G2-C3- και -G10-C11- ώστε τελικά να παραμένει σταθερό μόνο το ζεύγος C9-G4.

Πινακας 7: Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η NMR των ανταλλάξιμων ίμινο και άμινο πρωτονίων του ελευθέρου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0), και επαγόμενες μετατοπίσεις μετά από προσθήκη (**4**)Cl<sub>4</sub> σε αναλογίες r = 0.5, 1, και 2. Το αρνητικό πρόσημο αντιστοιχεί σε μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία, ενώ το θετικό πρόσημο προς χαμηλότερα. Με έντονη γραφή επισημαίνονται οι μετατοπίσεις μεγαλύτερες από 0.05 ppm.. Το n.o. = αντιστοιχεί σε μη παρατηρούμενες κορυφές.

r		0			0.5			1		2			
Βάσεις	N1H	N2Hb	N2Hn.b	N1H	N2Hb	N2Hn.b	N1H	N2Hb	N2Hn.b	N1H	N2Hb	N2Hn.b	
C1G12		n.o.	n.o.		n.o.	n.o.		n.o.	n.o.		n.o.	n.o.	
62011	13 04	8 11	6 5 7	12.94	8.42	6.61	12.77	8.43	6.51		_	6.77	
02011	13.04	0.44	0.57	-0.10	-0.02	+0.04	-0.27	-0.01	6.62		_	6.73	
C3G10	17.88	8 36	6.41	12.80	8.36	6.49	12.63	8.37	6.81		_	6.87	
C3010	12.00	0.30	0.41	-0.08	0.00	+0.08	-0.25	+0.01	6.94		-	6.92	
GACO	12.68	8 40	6 79	12.63	8.42	6.88	12.50	8.41	7.01	12.45	8.41	7.02	
0403	12.00	0.40	0.75	-0.05	+0.02	+0.09	-0.18	+0.01	7.06	-0.23	+0.01	7.05	
Δ5T8	13 75	_		13.69						_			
AJIO	15.75			-0.06			-			-			
<b>A6T7</b>	13 62			13.51			_						
	13.02			-0.11			-						

### 3.2.1.3. Αποτελέσματα φασματοσκοπίας NOESY

Στις τρεις αναλογίες r = 0.5, 1 and 2 λήφθηκαν και αναλύθηκαν επίσης φάσματα NOESY (*Εικόνες S6, S9, S12*) προκειμένου να δοθούν περισσότερα στοιχεία για τον τρόπο σύνδεσης του συμπλόκου με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Από τα φάσματα αυτά προέκυψαν μόνο μερικές cross-peaks

χαμηλής έντασης που μπορούν να αποδοθούν με ακρίβεια και οι οποίες προκύπτουν από τα πρωτόνια των φαινανθρολινών και του DNA.

Σημαντικά μπορούν να θεωρηθούν λοιπόν τα NOE σήματα που αντιστοιχούν σε πρόσδεση μεταξύ των A5A6 και της μίας μονάδας της φαινανθρολίνης (phen(H3/8, phenH4/7  $\rightarrow$  A6H8) καθώς επίσης και της δεύτερης μονάδας της φαινανθρολίνης (phenH2/9  $\rightarrow$  T8H3' και phenH4/7  $\rightarrow$  C9H5H5''). Οι συνδέσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο (4)Cl<sub>4</sub> έχει κατεύθυνση προς το 3'- άκρο της αλληλουχίας. Ακόμα τα NOE σήματα μεταξύ των πρωτονίων phenH2/9  $\rightarrow$  G2H8, C3H6 και C3H5 παρέχουν στοιχεία ότι το (4)Cl<sub>4</sub> αλληλεπιδρά και προς το 5'- άκρο της αλληλουχίας.



Εικόνα 36: Σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης του (**4**)Cl₄ στην αλληλουχία DNA d(5΄-CGCGTAGGCC-3΄)₂ βάσει των δεδομένων από τα φάσματα NMR. (a) πρόσδεση στο A5A6 που εκετείνεται προς την C1, (b) πρόσδεση στο A5A6 που εκετείνεται προς την G12.

3.2.2. Μελέτη αλληλεπιδράσεων NMR του συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> με την αλληλουχία DNA d(5'-CGCGAATTCGCG-3')2.

# 3.2.2.1 Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του {[(η<sup>6</sup>-cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>(μ-BL-2)}Cl<sub>4</sub>, **(5)**Cl<sub>4</sub>:

Η μεγαλύτερη ευκαμψία της γέφυρας BL-2 σε σχέση με την BL-1 οδηγεί σε διαφορετικό φάσμα <sup>1</sup>Η NMR κατά την τιτλοδότηση του DNA με το σύμπλοκο (**5**)Cl<sub>4</sub>. Σε αντίθεση με το σύμπλοκο (**4**)Cl<sub>4</sub>, η τιτλοδότηση με το (**5**)Cl<sub>4</sub> δίνει οξείες κορυφές στο φάσμα <sup>1</sup>Η NMR. Τα παραπάνω υποδεικνύουν γρήγορη κινητική της αντίδρασης στην κλίμακα χρόνου του NMR και σε θερμοκρασία 298K.



Εικόνα 37: Δομή του {[(η<sup>6</sup>-cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>(μ-BL-2)}Cl4, **(5)**Cl4

Τα περισσότερα από τα σήματα των πρωτονίων του συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> μετατοπίστηκαν προς υψηλότερα πεδία. Επίσης και σε αυτή την περίπτωση εμφανίζονται διπλά σήματα, κυρίως αυτά των δύο φαινανθρολινών, λόγω ύπαρξης διαφορετικού ηλεκτρονιακού περιβάλλοντος μεταξύ των δύο μονάδων. Οι μετατοπίσεις αυτές ωστόσο ήταν λιγότερο έντονες σε σχέση με εκείνες που παρατηρήθηκαν κατά την προσθήκη του συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub>. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί είτε λόγω πιθανής μη εκλεκτικής πρόσδεσης στο ολιγονουκλεοτίδιο, είτε λόγω πιθανής μα εκλεκτικής πρόσδεσης στο ολιγονουκλεοτίδιο, είτε λόγω πιθανής ασθενέστερης δέσμευσης σε αυτό. Η σύνδεση του (5)Cl<sub>4</sub> στο DNA φαίνεται να πραγματοποιείται ξανά μέσω και των δύο μονάδων της φαινανθρολίνης και θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν και σε αυτή την περίπτωση, ο περιορισμός που θέτει το μήκος του BL-2 στις περιοχές αλληλεπίδρασης του (5)Cl<sub>4</sub>. Αυξάνοντας την αναλογία σε r = 1 και r = 2 παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση των σημάτων του (5)Cl<sub>4</sub>, δίνοντας έτσι στοιχεία ότι η αντίδραση βρίσκεται σχεδόν σε κατάσταση ισορροπίας.

Піvакаς 8. Хημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>H NMR του (**5**)Cl<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0) ελέυθερο (r = 0), και με προσθήκη d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> σε αναλογίες r = 0,5, 1 και 2. Οι μεταβολές παρατίθενται στις παρενθέσεις (αρνητικό πρόσημο για μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία- upfield και θετικό πρόσημο για μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία- downfield). n.o. =μη παρατηρήσιμος- not observed. Τα A και B αντιστοιχούν στα σήματα των δύο μονάδων φαινανθρολίνης του (**5**)Cl<sub>4</sub>.

Πρωτόνια/r	0	0	.5		1	2			
	(5)Cl4	А	В	А	В	А	В		
H <sub>2/9</sub>	10.04	9.94 (-0.10)	9.82 (-0.22)	9.96 (-0.08)	9.86 (-0.18)	9.99 (-0.05)	9.89 (-0.15)		
H <sub>3/8</sub>	8.24	8.12 (-0.12)	7.78 (-0.46)	8.14 (-0.10)	7.82 (-0.42)	8.19 (-0.05)	7.86 (-0.38)		
H <sub>4/7</sub>	8.87	8.47 (-0.40)	8.32 (-0.55)	8.53 (-0.34)	8.36 (-0.51)	8.60 (-0.27)	8.43 (-0.34)		
H <sub>5/6</sub>	8.15	7.62 (-0.53)	7.60 (-0.55)	7.65 (-0.50)	7.65 (-0.50)	7.72 (-0.43)	7.70 (-0.45)		
Ha	8.20	8.19 (	-0.01)	8.18 (	-0.02)	8.17 (-0.03)			
Hb	7.06	7.13 (	+0.07)	7.13 (	+0.07)	7.11 (+0.05)			
Hc	2.74	2.73 (	-0.02)	2.71 (	-0.03)	2.68 (-0.04)			
H <sub>2c6c</sub>	6.52	6.41 (	-0.11)	6.41 (	-0.11)	6.42 (-0.10)			

H <sub>3c5c</sub>	6.09	6.10 (	+0.01)	6.09	(0.00)	6.08 (-0.01)		
H <sub>9c10c</sub>	0.72	0.67 (-0.05)	0.64 (-0.08)	0.67 (-0.05)	0.64 (-0.08)	0.67 (-0.05)	0.65 (-0.07)	
H <sub>7c</sub>	1.59	1.60 (	+0.01)	1.60 (	+0.01)	1.62 (	+0.03)	
H <sub>8c</sub>	2.37	2.27 (	-0.10)	2.29 (	-0.08)	2.29 (-0.08)		

### 3.2.2.2. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')2

Παρακάτω θα σχολιαστούν ξεχωριστά οι μεταβολές του φάσματος <sup>1</sup>Η NMR κατά την τιτλοδότηση του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> με το σύμπλοκο (5)Cl<sub>4</sub> για τις δύο κατηγορίες πρωτονίων που διαθέτει το ολιγονουκλεοτίδιο, τα μη ανταλλάξιμα και τα ανταλλάξιμα πρωτόνια.

### *i.* Μη ανταλλάξιμα πρωτόνια:

Οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων που διαθέτει το ολιγονουκλεοτίδιο παρέχουν επιπλέον πληροφορίες για τον τύπο της πρόσδεσης συμπλόκου-DNA. Σε αναλογία συμπλόκου: DNA r = 0,5:1, παρατηρούνται σημαντικές μετατοπίσεις, σε υψηλοτέρα ppm, για τα πρωτόνια H5 των C3 και C9 (κατά 0.06 ppm και 0.08 ppm αντίστοιχα) και για τα H8 των G4 και G10 (κατά 0.05 ppm), υποδεικνύοντας πως το stacking μεταξύ των βάσεων αυτών αρχίζει να ελαττώνεται. Σε αντίθεση με τα παραπάνω πρωτόνια, παρατηρούνται σημαντικές μετατοπίσεις, πος υψηλότερα πεδία για πρωτόνια της μικρής αύλακας, και πιο συγκεκριμένα για τα H1΄ των G2, G4, T8, G10 και C11 (*Εικόνα S13*). Η μετατόπιση αυτή υποδηλώνει την παρουσία του αρωματικού συστήματος του συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> στη μικρή αύλακα της έλικας του DNA. Τα πρωτόνια του σακχάρου της C1 μετατοπίζονται επίσης σε χαμηλότερα πεδία, οπότε ενισχύεται η υπόθεση πως η διαμόρφωση της έλικας διαταράσσεται στην αρχή της αλληλουχίας, στο σημείο δηλαδή που βρίσκονται οι βάσεις C1G2-.

Αυξάνοντας την αναλογία σε r = 1 (*Εικόνα S16*), οι σημαντικότερες μετατοπίσεις εντοπίζονται επίσης κυρίως σε κάποια από τα πρωτόνια των σακχάρων των C3 και T8. Με δεδομένη την μεγάλη απόσταση μεταξύ των τμημάτων -C3G4- και -T8C9- και το μήκος του BL-2, μπορούμε να υποθέσουμε ότι δύο μόρια του (**5**)Cl<sub>4</sub> έχουν τη δυνατότητα να προσδεθούν στο DNA.

Αυξάνοντας ακόμα περισσότερο την αναλογία σε r = 2 (Εικόνα S19) παρατηρείται μετατόπιση όλων των σημάτων των πρωτονίων του DNA. Σημαντικές μετατοπίσεις εμφανίζουν τα πρωτόνια C3H6, G2H8 και C11H6, καθώς και τα περισσότερα από τα H1΄του σακχάρου. Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις συνάδουν με τη δέσμευση του (5)Cl<sub>4</sub> στα τμήματα -C3G4- και -T8C9- της αλληλουχίας, με τέτοιο τρόπο ώστε η δεύτερη φαινανθρολίνη να εκτείνεται είτε προς το τέλος ( $\rightarrow$ 3') είτε προς την αρχή της αλληλουχίας ( $\rightarrow$ 5'). Τέλος να επισημανθεί και η αξιοσημείωτη μετατόπιση των αρωματικών πρωτονίων H5 και H6 της C3, H8 της G4, H5 της C9 και H8 της G10, τα οποία επηρεάζονται εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο και βρίσκονται στη μεγάλη αύλακα της έλικας καθώς και των H1΄του σακχάρου, που βρίσκονται στη μικρή αύλακα.

Πίνακας 9: Τιμές χημικών μετατοπίσεων <sup>1</sup>Η NMR των μη ανταλλάξιμων πρωτονίων της αζωτούχου βάσης για το ελεύθερο d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0), με προσθήκη (**5**)Cl<sub>4</sub> σε αναλογίες r = 0.5, 1, and 2. Αρνητικό πρόσημο για μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία και θετικό για μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία, n.o. = μη παρατηρήσιμες- not observed. Υπογραμμισμένες διαφορές > 0.05 ppm.

r		0			0.5		1			2		
Βάσει ς	H6/H8	H5/H /CH₃	H1′	H6/H 8	H5/H2/CH 3	H1′	H6/H 8	H5/H2/CH 3	H1′	H6/H 8	H5/H2/CH 3	H1′
C1	7.60	5.88	5.7 2	7.61 +0.01	5.90 +0.02	5.78 +0.0 6	7.62 +0.02	5.91 +0.03	5.79 +0.0 7	7.63 +0.03	5.93 +0.05	5.80 -0.08
G2	7.93		5.8 8	7.95 +0.02		5.80 -0.08	7.96 +0.03		5.76 -0.12	7.98 +0.05		5.75 -0.13
СЗ	7.25	5.35	5.5 6	7.28 +0.03	5.40 +0.05	5.57 +0.0 1	7.29 +0.04	5.43 +0.08	5.58 0.02	7.34 +0.09	5.53 +0.18	5.54 -0.02
G4	7.83		5.4 2	7.88 +0.05		5.37 -0.05	7.88 +0.05		5.37 -0.05	7.85 +0.02		5.32 -0.10
A5	8.09	7.21	6.1 3	8.10 +0.01	7.19 -0.02	5.93 -0.04	8.12 +0.03	7.20 -0.01	5.93 -0.04	8.12 +0.03	7.17 -0.04	5.86 -0.11
A6	8.09	7.60	5.9 7	8.10 +0.02	7.57 -0.03	6.12 -0.01	8.12 +0.03	7.55 -0.05	6.11 -0.02	8.12 +0.03	7.56 -0.04	6.08 -0.05
Т7	7.09	1.24	5.8 8	7.10 +0.01	1.27 +0.03	5.87 -0.01	7.12 +0.03	1.29 +0.05	5.86 -0.02	7.11 +0.02	1.27 +0.03	5.84 -0.04
Т8	7.35	1.51	6.1 2	7.35 0.00	1.54 +0.03	6.04 -0.08	7.35 0.00	1.55 +0.04	6.04 -0.08	7.35 0.00	1.55 +0.04	6.00 -0.12
С9	7.44	5.60	5.6 4	7.45 +0.01	5.66 +0.06	5.62 -0.02	7.44 0.00	5.70 +0.10	5.63 -0.01	7.45 +0.01	5.70 +0.10	5.66 +0.0 2
G10	7.89		5.8 3	7.94 +0.05		5.82 -0.01	7.93 +0.04		5.81 -0.02	7.91 +0.02		5.84 +0.0 1
C11	7.31	5.42	5.7 2	7.33 +0.02	5.44 +0.02	5.67 -0.05	7.31 0.00	5.44 +0.02	5.65 -0.07	7.37 +0.06	5.53 +0.11	5.62 -0.10
G12	7.92		6.1 3	7.92 0.00		6.10 -0.03	7.91 -0.01		6.09 -0.05	7.96 +0.04		6.07 -0.06

### ii. Ανταλλάξιμα πρωτόνια:

Η προσθήκη του συμπλόκου (**5**)Cl<sub>4</sub> στο DNA οδηγεί σε σημαντική μετατόπιση των σημάτων των NH2n.b. (των άμινο πρωτονίων που δε σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου) των ζευγών βάσεων C3-G10 και G4-C9, σε χαμηλότερα πεδία, υποδεικνύοντας τη διατάραξη της διπλής έλικας. Αντίθετα τα ίμινο πρωτόνια NH1 των G2-C11, C3-G10 και A6-T7 μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία (Εικόνα 38), υποδηλώνοντας πως οι δεσμοί υδρογόνου W.-C. μεταξύ αυτών αρχίζουν να εξασθενούν. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι τα εν λόγω πρωτόνια βρίσκονται τόσο στη μικρή, όσο και στη μεγάλη αύλακα μπορεί να θεωρηθεί ότι το (**5**)Cl<sub>4</sub> αλληλεπιδρά με το DNA, μέσω της μίας μονάδας φαινανθρολίνης, στη μεγάλη αύλακα και με κατεύθυνση προς στη μικρή αύλακα, σε απόσταση καθοριζόμενη από τη γέφυρα BL-2. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, υπάρχουν δύο διαφορετικές περιοχές όπου η φαινανθρολίνη του (**5**)Cl<sub>4</sub> προσδένεται στη μεγάλη αύλακα, αυτές των βάσεων -C3G4- και –T8C9-. Από αυτή τη θέση στην αλληλουχία το σύμπλοκο (**5**)Cl<sub>4</sub> μπορεί να εκτείνεται είτε προς το 3' άκρο, είτε προς το 5' άκρο. Είναι αξιοσημείωτο πως τα NH1 των G4-C9 και A5-T8 παρέμειναν ανεπηρέαστα κατά την τιτλοδότηση με σύμπλοκο, επομένως οι δεσμοί W.-C. αυτών των συμπληρωματικών βάσεων προσδίδουν σταθερότητα στη διπλή έλικα.



Εικόνα 38.: Τμήμα του φάσματος <sup>1</sup>Η NMR του d(5΄-CGCGAATTCGCG-3΄)<sub>2</sub> (a) ελεύθερο και κατόπιν προσθήκης (**5**)Cl<sub>4</sub> σε αναλογίες t r = 0.5, 1 and 2, (b)-(d), που απεικονίζει τα ίμινο πρωτόνια των δεσμών υδρογόνου W.-C.

Πίνακας 10: Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η NMR των ανταλλάξιμων ίμινο και άμινο πρωτονίων του ελευθέρου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0), και επαγόμενες μετατοπίσεις μετά από προσθήκη (5)Cl<sub>4</sub> σε αναλογίες r = 0.5, 1, και 2. Το αρνητικό πρόσημο αντιστοιχεί σε μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία, ενώ το θετικό πρόσημο προς χαμηλότερα. Με έντονη γραφή επισημαίνονται οι μετατοπίσεις μεγαλύτερες από 0.05 ppm.. Το n.o. = αντιστοιχεί σε μη παρατηρούμενες κορυφές.

		r = 0			r = 0.5	5	r = 1			r = 2		
Βάσεις	N1H	N2Hb	N2Hn.b	N1H	N2Hb	N2Hn.b	N1H	N2Hb	N2Hn.b	N1H	N2Hb	N2Hn.b
C1G12		n.o.	n.o.		n.o.	n.o.		n.o.	n.o.		n.o.	n.o.
G2C11	13.04	8.44	6.57	12.99 -0.05	8.42 -0.02	6.62 +0.05	12.97 -0.07	8.42 -0.02	6.65 +0.08	12.94 -0.10	8.42 -0.02	6.65 +0.08
C3G10	12.88	8.36	6.41	12.79 -0.09	8.36 0.00	6.53 +0.08	12.73 -0.15	8.36 0.00	6.53 +0.08	12.69 -0.19	8.34 -0.02	6.55 +0.14
G4C9	12.68	8.40	6.79	12.65 -0.03	8.43 +0.03	6.88 +0.09	12.63 -0.05	8.43 +0.03	6.93 +0.14	12.61 -0.07	8.42 +0.02	6.94 +0.15
A5T8	13.75	-	-	13.73 -0.02	-	-	13.73 -0.02	-	-	13.72 -0.03	-	-
A6T7	13.62	-	-	13.56 -0.06	-	-	13.53 -0.09	-	-	13.51 -0.11	-	-

### 3.2.2.3. Αποτελέσματα φασματοσκοπίας NOESY

Tα φάσματα NOESY σε όλες τις αναλογίες έδειξαν αρκετές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συμπλόκου (**5**)Cl₄ και του DNA, λόγω της γρήγορης κινητικής. (*Εικόνες S15, S18* και *S21*). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές προκύπτουν από τις δύο μονάδες φαινανθρολίνης. Πιο συγκεκεκριμένα στην πρώτη μονάδα αντιστοιχούν οι αλληλεπιδράσεις (phen(H2/9 → G4H8 και C3H5, phenH4/7 → C9H5') ενώ στη δεύτερη οι (phenH3/8 → T8H3', phenH4/7 → C9H5H5''). Επίσης cross-peaks μεταξύ των πρωτονίων της BL-2 και των πρωτονίων του σακχάρου του DNA, όπως οι Ha → C9H4', Hb → C9H3', Hc → A6H3' έδειξαν ότι το σύμπλοκο (**5**)Cl₄ εκτείνεται τόσο στη μεγάλη, όσο και στη μικρή αύλακα της έλικας.



Εικόνα 39: Σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης του (**5**) στην αλληλουχία DNA d(5΄-CGCGTAGGCC-3΄)₂ βάσει των δεδομένων από τα φάσματα NMR.(a) πρόσδεση στις βάσεις -C3G4- της μεγάλης αύλακας που εκτείνεται κατά μήκος της G12, (b) πρόσδεση στις βάσεις -G10C9- της μεγάλης αύλακας που εκτείνεται κατά μήκος της C1.

# 3.2.3. Μελέτη αλληλεπιδράσεων NMR του συμπλόκου (6)Cl<sub>4</sub> με την αλληλουχία DNA d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>.

# 3.2.3.1. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του {[(η<sup>6</sup>-cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>(μ-BL-3)}Cl<sub>4</sub>, **(6**)Cl<sub>4</sub>:

Ο γεφυρωτικός υποκαταστάτης BL-3 διαθέτει έναν επιπλέον άτομο άνθρακα σε σχέση με τον BL-2, έχοντας έτσι τρεις συνολικά άνθρακες στην αλειφατική αλυσίδα και εμφανίζει ακόμη μεγαλύτερη περιστροφική ικανότητα. Η ευκολότερη περιστροφή της γέφυρας συντελεί και σε διαφορετική συμπεριφορά των πρωτονίων του συμπλόκου, δηλαδή σε διαφορετικές μετατοπίσεις των κορυφών τους στο φάσμα <sup>1</sup>Η NMR κατά την τιτλοδότηση του DNA με αυτό.



Εικόνα 40: Δομή του συμπλόκου {[(η<sup>6</sup>-cym)Ru(phen)]<sub>2</sub>(μ-BL-3)}Cl<sub>4</sub>, **(6**)Cl<sub>4</sub>

Οι μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων για το BL-3 μοιάζουν περισσότερο με αυτές του BL-2 παρά του BL-1. Η προσθήκη συμπλόκου (**6**)Cl<sub>4</sub> στο DNA χαρακτηρίζεται από γρήγορη κινητική, στην κλίμακα χρόνου του NMR και διαταράσσει τη συμμετρία του συμπλόκου, καθώς καθεμία μονάδα φαινανθρολίνης εμφανίζει πλέον ένα ξεχωριστό διπλό σήμα. Σε αντίθεση όμως με τις προηγούμενες τιτλοδοτήσεις, με σύμπλοκο (**4**)Cl<sub>4</sub> και (**5**)Cl<sub>4</sub>, τα διπλά σήματα διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους (0,01-0,04 ppm).

Σε αναλογία r = 0.5 (Εικόνα S22) τα σήματα που επηρεάζονται περισσότερο είναι εκείνα των δύο φαινανθρολινών, τα οποία μετατοπίζονται σε υψηλότερα πεδία κατά 0,12 – 0,56 ppm. Έτσι φαίνεται πως και αυτό το σύμπλοκο (6)Cl<sub>4</sub> συνδέεται στο DNA μέσω των υποκαταστατών φαινανθρολίνης. Σημαντικές μετατοπίσεις προς χαμηλότερες τιμές ppm εμφανίζουν και τα αλειφατικά πρωτόνια του κουμενίου (H7c,H8c,H9c και H10c). Οι μετατοπίσεις αυτές δίνουν στοιχεία πως και το κουμένιο ίσως να συμμετέχει στην αλληλεπίδραση του (6)Cl<sub>4</sub> στο ολιγονουκλεοτίδιο. Παρά τις αρχικές ομοιότητες στο τρόπο σύνδεσης με το (5)Cl<sub>4</sub>, η συμμετοχή της μεθυλομάδας και ισοπροπυλομάδας του κουμενίου υποδεικνύει έναν διαφορετικό τρόπο πρόσδεσης.

Піνакаς 11: Хημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>H NMR του (**6**)Cl<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0 ) ελέυθερο (r = 0), και με προσθήκη d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> σε αναλογίες r = 0.5, 1 και 2. Οι μεταβολές παρατίθενται στις παρενθέσεις (αρνητικό πρόσημο για μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία- upfield και θετικό πρόσημο για μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία- downfield). n.o. =μη παρατηρήσιμος- not observed. Τα A και B αντιστοιχούν στα σήματα των δύο μονάδων φαινανθρολίνης του (**6**).

Πρωτόνια/r	0	0.	.5	1	L	2		
	(6)Cl <sub>4</sub>	А	В	А	В	А	В	
H <sub>2/9</sub>	10.03	9.91 (-0.12)	9.88 (-0.15)	9.91 (-0.09)	9.92 (-0.11)	9.93 (-0.10)	9.93 (-0.10)	
H <sub>3/8</sub>	8.21	7.91 (	-0.30)	7.96 (	-0.25)	8.04 (	(-0.17)	
H4/7	8.83	8.33 (-0.50)	8.29 (-0.54)	8.41 (-0.42)	8.37 (-0.46)	8.47 (-0.36)	8.43 (-0.40)	
H5/6	8.10	7.57 (-0.53)	7.54 (-0.56)	7.57 (-0.53)	7.56 (-0.54)	7.70 (-0.40)	7.69 (-0.41)	
Ha	8.20	8.15 (	-0.05)	8.16 (	-0.04)	8.16 (	-0.04)	
Hb	7.01	7.07 (·	+0.06)	7.09 (·	+0.08)	7.06 (	+0.05)	
Hc	2.40	2.42 (·	+0.02)	2.41 (·	+0.01)	2.42 (+0.02)		
Hd	1.57	1.55 (	-0.02)	1.55 (	-0.02)	1.55 (-0.02)		
H <sub>2c6c</sub>	6.51	6.37 (	-0.14)	6.39 (	-0.12)	6.41 (	(-0.10)	
H <sub>3c5c</sub>	6.14	6.05 (	-0.11)	6.07 (	-0.07)	6.08 (	(-0.06)	
H <sub>9c10c</sub>	0.75	0.67 (-0.08)	0.65 (-0.10)	0.69 (+0.06)	0.66 (-0.09)	0.69 (-0.06)	0.67 (-0.09)	
H <sub>7c</sub>	1.78	1.70 (	-0.08)	1.71 (	-0.07)	1.71 (-0.07)		
H <sub>8c</sub>	2.39	2.22 (	-0.17)	2.26 (	-0.13)	2.28 (	(-0.11)	

### 3.2.3.2. Μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')2

*i.* Μη ανταλλάξιμα πρωτόνια:

Οι μεταβολές των σημάτων των ανταλλάξιμων πρωτονίων του DNA με προσθήκη του (**6**)Cl<sub>4</sub> σε αναλογία r = 0,5 (*Εικόνα S22*) είναι πολύ μικρές, με εξαίρεση την μετατόπιση των πρωτονίων H5 των C1, C3 και C11 (+0.05 ppm) και του H1' της T8 (- 0.06 ppm).

Σε αναλογία r = 1 (Εικόνα S25) οι παραπάνω μετατοπίσεις ενισχύθηκαν, ενώ παρατηρήθηκαν επιπλέον μετατοπίσεις για τα πρωτόνια H6 των C3 και C11 προς χαμηλότερα πεδία (0,06 και 0,05 ppm αντίστοιχα) και για τα πρωτόνια H1' των G4, T8 και C11 προς υψηλότερα πεδία (0,07 ppm).

Σε αναλογία r = 2 (Εικόνα S28) παρατηρούνται επίσης μεταβολές προς υψηλότερα πεδία και μεγαλύτερες των 0,06 ppm στα σήματα πρωτονίων H1΄ των T8 και G12, οι οποίες βρίσκονται στο τέλος της αλληλουχίας του ολιγονουκλεοτιδίου. Τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν έναν τρόπο σύνδεσης στον οποίο το σύμπλοκο (6)Cl<sub>4</sub> προσδένεται τόσο στη μικρή, όσο και στη μεγάλη αύλακα της έλικας, τα H5 και H6 των C1, C3 και C11 και το H8 της G2 βρίσκονται στη μεγάλη αύλακα, ενώ τα H1΄ των σακχάρων στη μικρή.

Πίνακας 12: Τιμές χημικών μετατοπίσεων <sup>1</sup>Η NMR των μη ανταλλάξιμων πρωτονίων της αζωτούχου βάσης για το ελεύθερο d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0 ), με προσθήκη (6)Cl<sub>4</sub> σε αναλογίες r = 0.5, 1, and 2. Αρνητικό πρόσημο για μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία και θετικό για μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία, n.o. = μη παρατηρήσιμες- not observed. Υπογραμμισμένες διαφορές > 0.05 ppm.

r		0		0.5			1			2		
Βάσει ς	H6/H8	H5/H2 /CH₃	H1′	H6/H 8	H5/H2/CH 3	H1′	H6/H 8	H5/H2/CH 3	H1′	H6/H 8	H5/H2/CH 3	H1′
C1	7.60	5.88	5.7 2	7.63 +0.03	5.93 +0.05	5.76 +0.0 4	7.63 +0.03	5.97 +0.05	5.76 +0.0 4	7.63 +0.03	5.93 +0.05	5.74 +0.0 2
G2	7.93		5.8 8	7.95 +0.02	-	5.89 +0.0 1	7.97 +0.04		5.92 +0.0 4	7.98 +0.05		5.90 -0.02
C3	7.25	5.35	5.5 6	7.28 +0.03	5.40 +0.05	5.57 +0.0 1	7.31 +0.06	5.48 +0.13	5.51 -0.05	7.34 +0.09	5.53 +0.18	5.52 -0.04
G4	7.83		5.4 2	7.84 +0.01		5.40 -0.02	7.84 +0.01		5.35 -0.07	7.85 +0.02		5.32 -0.10
A5	8.09	7.21	6.1 3	8.09 0.00	7.21 0.00	5.96 -0.01	8.10 +0.01	7.18 -0.03	5.92 -0.05	8.10 +0.01	7.17 -0.04	5.93 - 0.04
A6	8.09	7.60	5.9 7	8.09 0.00	7.60 0.00	6.13 0.00	8.10 +0.01	7.58 -0.02	6.10 -0.03	8.10 +0.01	7.58 -0.02	6.10 -0.03
Т7	7.09	1.24	5.8 8	7.08 -0.01	1.26 +0.02	5.88 0.00	7.08 -0.01	1.27 +0.03	5.86 -0.02	7.08 -0.01	1.28 +0.04	5.86 -0.02

- 73 -
| Т8  | 7.35 | 1.51 | 6.1<br>2 | 7.35<br>0.00  | 1.53<br>+0.02 | 6.06<br>-0.06 | 7.35<br>0.00  | 1.54<br>+0.03 | 6.05<br>-0.07     | 7.34<br>-0.01 | 1.55<br>+0.04  | 6.03<br>-0.09     |
|-----|------|------|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|---------------|----------------|-------------------|
| С9  | 7.44 | 5.60 | 5.6<br>4 | 7.44<br>0.00  | 5.64<br>+0.04 | 5.64<br>0.00  | 7.45<br>+0.01 | 5.68<br>+0.04 | 5.65<br>+0.0<br>1 | 7.44<br>0.00  | 5.70<br>+0.10- | 5.70<br>+0.0<br>6 |
| G10 | 7.89 |      | 5.8<br>3 | 7.91<br>+0.02 |               | 5.82<br>-0.01 | 7.91<br>+0.02 |               | 5.79<br>-0.04     | 7.91<br>+0.02 |                | 5.78<br>-0.05     |
| C11 | 7.31 | 5.42 | 5.7<br>2 | 7.33<br>+0.02 | 5.47<br>+0.05 | 5.69<br>-0.03 | 7.36<br>+0.05 | 5.51<br>+0.09 | 5.64<br>-0.08     | 7.37<br>+0.06 | 5.53<br>+0.11  | 5.62<br>-0.10     |
| G12 | 7.92 |      | 6.1<br>3 | 7.92<br>0.00  |               | 6.07<br>-0.06 | 7.92<br>0.00  |               | 6.06<br>-0.07     | 7.96<br>+0.04 |                | 6.07<br>-0.06     |

#### *ii. Ανταλλάξιμα πρωτόνια:*

Με προσθήκη του συμπλόκου (**6**)Cl<sub>4</sub> στο DNA τα σήματα των άμινοπρωτονίων που δε σχηματίζουν δεσμό υδρογόνου, τα NH2n.b., μετατοπίζονται σημαντικά προς χαμηλότερα πεδία, γεγονός που υποδηλώνει την διατάραξη της προϋπάρχουσας δομής της διπλής έλικας. Ακόμα σε αναλογία r = 2 τα NH1 της G2-C11, μετατοπίζονται προς υψηλότερα πεδία κατά 0,26 ppm, υποδεικνύοντας πως το εν λόγω ζεύγος βάσεων αρχίζει να διαχωρίζεται. Τα NH1 των βάσεων C3-G10 και G4-C9 εμφάνισαν κι αυτά παρόμοιες μετατοπίσεις και τάση διαχωρισμού (*Εικόνα 41*). Σε αντίθεση με τα ζεύγη βάσεων G-C, το κεντρικό κομμάτι της αλληλουχίας του ολιγονουκλεοτιδίου, αυτό των -AATT- μένει ανεπηρέαστο από την προσθήκη του συμπλόκου. Έτσι συμπεραίνεται πως η πρόσδεση του (**6**)Cl<sub>4</sub> λαμβάνει χώρα στα άκρα της αλληλουχίας, ξετυλίγοντας τη διπλή έλικα του DNA στα τμήματα -CGCG-.



Εικόνα 41: Τμήμα του φάσματος <sup>1</sup>Η NMR του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> (a) ελεύθερο και κατόπιν προσθήκης (6)Cl<sub>4</sub> σε αναλογίες t r = 0.5, 1 and 2, (b)-(d), που απεικονίζει τα ίμινο πρωτόνια των δεσμών υδρογόνου W.-C.

Πίνακας 13: Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η NMR των ανταλλάξιμων ίμινο και άμινο πρωτονίων του ελευθέρου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0), και επαγόμενες μετατοπίσεις μετά από προσθήκη (**6**)Cl<sub>4</sub> σε αναλογίες r = 0.5, 1, και 2. Το αρνητικό πρόσημο αντιστοιχεί σε μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία, ενώ το θετικό πρόσημο προς χαμηλότερα. Με έντονη γραφή επισημαίνονται οι μετατοπίσεις μεγαλύτερες από 0.05 ppm.. Το n.o. = αντιστοιχεί σε μη παρατηρούμενες κορυφές.

r		0			0.5			1			2	
Βάσεις	N1H	N2Hb	N2Hn.b	N1H	N2Hb	N2Hn.b	N1H	N2Hb	N2Hn.b	N1H	N2Hb	N2Hn.b
C1G12		n.o.	n.o.		n.o.	n.o.		n.o.	n.o.		n.o.	n.o.
62011	12 04	0 11	6 5 7	12.97	8.44	6.62	12.86	8.47	6.68	12.78	no	6.72
62011	15.04	0.44	0.57	(-0.07)	(0.00)	(+0.05)	(-0.18)	(+0.03)	(+0.11)	(-0.26)	11.0.	(+0.15)
C2C10	12.88	0 26	6 11	12.84	8.39	6.48	12.78	8.42	6.57	12.74	8.43	6.62
C3G10		0.50	0.41	(-0.04)	(+0.03)	(+0.07)	(-0.10)	(+0.05)	(+0.16)	(-0.14)	(+0.07)	(+0.21)
6460	12.00	0 10	6 70	12.67	8.44	6.84	12.62	8.44	6.89	12.62	8.47	6.92
6409	12.00	0.40	0.79	(-0.01)	(+0.04)	(+0.05)	(-0.04)	(+0.04)	(+0.10)	(-0.06)	(+0.07)	(+0.14)
ΛΕΤΟ	12 75			13.74			13.72			13.71		
ASTO	15.75	-		(-0.01)	-	-	-0.03			(-0.04)		
A677	12 62			13.60			13.58			13.56		
A617	13.02	-		(-0.02)	-	-	-0.04			(-0.06)		

#### 3.2.3.3. Αποτελάσματα φασματοσκοπίας NOESY

Σε όλες τις αναλογίες τα φάσματα NOESY φανερώνουν cross-peaks πολύ χαμηλής έντασης μεταξύ του συμπλόκου (**6**)Cl<sub>4</sub> και του DNA, λόγω της γρήγορης κινητικής της αντίδρασης (*Εικόνες S24, S27* και *S30*). Κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις που μπορούν να διακριθούν προκύπτουν από τις δύο μονάδες φαινανθρολίνης. Πιο συγκεκριμένα στην πρώτη μονάδα αντιστοιχούν οι αλληλεπιδράσεις (phen(H2/9  $\rightarrow$  G3H6 και G4H5', phenH4/7  $\rightarrow$  C3H1') ενώ στη δεύτερη οι (phenH2/9  $\rightarrow$  A5H5').



Εικόνα 42: Σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης του (6) στην αλληλουχία DNA d(5'-CGCGTAGGCC-3')<sup>2</sup> βάσει των δεδομένων από τα φάσματα NMR. (a) πρόσδεση στις βάσεις -CG- της μεγάλης αύλακας που εκτείνεται κατά μήκος του κέντρου της αλληλουχίας, (b) πρόσδεση στις βάσεις -GC- της μεγάλης αύλακας που εκτείνεται κατά μήκος του κέντρου της αλληλουχίας.

# 3.2.4. Μελέτη αλληλεπιδράσεων NMR του μονοπυρηνικού συμπλόκου [(η<sup>6</sup>- cym)Ru(phen)(py)]Cl<sub>2</sub> (**7**)Cl<sub>2</sub> με την αλληλουχία DNA d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>.

Για λόγους σύγκρισης μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του μονοπυρηνικού συμπλόκου [(η<sup>6</sup>-cym)Ru(phen)(py)]Cl<sub>2</sub> (**7**)Cl<sub>2</sub> με το DNA(Figs. S45-S47). Σε αναλογία r = 1, παρατηρήθηκαν πολύ μικρές μετατοπίσεις των σημάτων των πρωτονίων του (**7**)Cl<sub>2</sub> προς υψηλότερα πεδία, οι οποίες αφορούσαν κυρίως τα πρωτόνια H5 και H6 των φαινανθρολινών (*Πίνακας 14*). Σε υψηλότερες αναλογίες τα πρωτόνια της φαινανθρολίνης φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από αυτά της πυριδίνης και του κουμενίου, υποδηλώνοντας ότι το (**7**)Cl<sub>2</sub> αλληλεπιδρά με το DNA μέσω του χηλικού υποκαταστάτη της φαινανθρολίνης. Παρά τις ενδείξεις αλληλεπίδρασης όμως θα πρέπει να αναφερθεί πως οι μετατοπίσεις προς υψηλότερα πεδία είναι ιδιαίτερα μικρές και επομένως και η πρόσδεση του (7)Cl<sub>2</sub> με το DNA είναι πολύ ασθενής. Όσον αφορά στα πρωτόνια του DNA, παρατηρούνται μόνο κάποιες οριακές μετατοπίσεις για τα μη ανταλλάξιμα πρωτόνια, ενώ τα σήματα των πρωτονίων που συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου W.-C. παραμένουν ανεπηρέαστα.



Εικόνα 43: Τμήμα του φάσματος <sup>1</sup>Η NMR του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> (a) ελεύθερο και κατόπιν προσθήκης (**7)**Cl<sub>4</sub> σε αναλογίες t r = 0.5, 1 and 2, (b)-(d), που απεικονίζει τα ίμινο πρωτόνια των δεσμών υδρογόνου W.-C.

Πίνακας 14: Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>Η NMR του (**7**)Cl<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0 ) ελέυθερο (r = 0), και με προσθήκη d(5΄-CGCGAATTCGCG-3΄)<sub>2</sub> σε αναλογίες r = 0.5, 1 και 2. Οι μεταβολές παρατίθενται στις παρενθέσεις (αρνητικό πρόσημο για μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία- upfield και θετικό πρόσημο για μετατόπιση προς χαμηλότερα πεδία- downfield). n.o. =μη παρατηρήσιμος- not observed

	H <sub>2/9</sub>	H <sub>3/8</sub>	H <sub>4/7</sub>	H <sub>5/6</sub>	$H_{2c6c}$	H <sub>3c5c</sub>	$H_{9c10c}$	H <sub>7c</sub>	H <sub>8c</sub>	pyH <sub>2/6</sub>	pyH <sub>3/5</sub>	$pyH_4$	
r = 0	10.06	8.23	8.84	8.12	6.53	6.17	0.75	1.83	2.21	8.40	7.27	7.78	
r – 1	10.05	8.22	8.82	8.08	6.51	6.16	0.74	1.81	2.21	8.39	7.26	7.78	
I – I	- 0.01	-0.01	-0.02	-0.04	-0.02	-0.01	-0.01	-0.02	0.00	-0.01	-0.01	0.00	
r = 2	10.03	8.20	8.80	8.05	6.50	6.14	0.74	1.80	2.20	8.38	7.25	7.77	
	- 0.03	-0.03	-0.04	-0.07	-0.03	-0.03	-0.01	-0.03	0.01	-0.02	-0.02	-0.01	

# 3.5. Μελέτες απόσβεσης φθορισμού των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των συμπλόκων (**4**)Cl<sub>4</sub>, (**5**)Cl<sub>4</sub>, (**6**)Cl<sub>4</sub> και του μονοπυρηνικού (**7**)Cl<sub>2</sub> με την αλληλουχία DNA d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>.

Στις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν εκτός των συμπλόκων (4)Cl<sub>4</sub>, (5)Cl<sub>4</sub>, (6)Cl<sub>4</sub> και τα (1)Cl<sub>4</sub>, (2)Cl<sub>4</sub>, (3)Cl<sub>4</sub> (*Εικόνα* 44), τα οποία ανήκουν στην ίδια σειρά συμπλόκων {[( $\eta^6$ -cym)Ru(L)]<sub>2</sub>( $\mu$ -BL)}Cl<sub>4</sub>, με τη διαφορά ότι το L αντιστοιχεί στο χηλικό υποκαταστάτη 2,2-διπυριδίνη, ενώ φέρουν τις ίδιες γέφυρες BL-1,BL-2, BL-3 αντίστοιχα.



Εικόνα 44: Από αριστερά προς τα δεξιά οι δομές των συμπλόκων {[(η<sup>6</sup>-cym)Ru(bpy)]<sub>2</sub>(μ-BL-1)}Cl<sub>4</sub>, (1)Cl<sub>4</sub>, {[(η<sup>6</sup>-cym)Ru(bpy)]<sub>2</sub>(μ-BL-2)}Cl<sub>4</sub>, (2)Cl<sub>4</sub> και {[(η<sup>6</sup>-cym)Ru(bpy)]<sub>2</sub>(μ-BL-3)}Cl<sub>4</sub>, (3)Cl<sub>4</sub>

Αρχικά προστίθεται ποσότητα EtBr σε διάλυμα d(5'-CGCGAATTCGCG-3')2 (υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM, pH = 7.0) έως ότου η ένταση της εκπομπής να αυξηθεί και να αποκτήσει πρακτικά μια σταθερή τιμή. Δείγματα του παραπάνω διαλύματος τιτλοδοτήθηκαν με τα σύμπλοκα (1)Cl4-(6)Cl4 καθώς και με το μονομεταλλικό (7)Cl<sub>2</sub>. Σε κάθε περίπτωση η ένταση του φθορισμού του συστήματος DNA-EtBr μειωνόταν με αύξηση της συγκέντρωσης των συμπλόκων, σε διαφορετικό βαθμό, χωρίς να υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά στο μήκος κύματος του μέγιστου της εκπομπής (Εικόνες 45, S34 και S35). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την αντικατάσταση του EtBr από το εκάστοτε σύμπλοκο στο σύστημα DNA-EtBr λόγω πρόσδεσης των αυτών, είτε μέσω παρεμβολής, είτε μέσω πρόσδεσης στη μικρή αύλακα της έλικας [106]. Το φαινόμενο αυτό εκφράζεται από τη σταθερά ανταγωνιστικής απόσβεσης (competition quenching constant), K<sub>sv</sub>. Τα ποσοστά απόσβεσης των συμπλόκων ήταν τα εξής: 31% - 81% στους 291 Κ, 49% - 90% στους 298 K and 54% - 91% στους 310 K. Οι τιμές της σταθεράς απόσβεσης Stern–Volmer (K<sub>sv</sub>) υπολογίστηκαν από τις κλίσεις των καμπυλών των γραφικών παραστάσεων F/F<sub>o</sub> = f([Q]) (Fig. S50). Η απόσβεση φθορισμού του DNA-EtBr συμφωνεί με τη γραμμική εξίσωση Stern-Volmer (R > 0.98).

Η σταθερά πρόσδεσης (K<sub>b</sub>) και ο αριθμός σημείων πρόσδεσης ανά διμερές (n) βρέθηκαν από τα δεδομένα της τιτλοδότησης φθορισμού και υπολογίστηκαν μέσω της διπλής λογαριθμικής εξίσωσης log[F<sub>0</sub>-F/F] συναρτήσει του log[Q] (Figs. S51 and S52). Οι τιμές K<sub>sv</sub>, K<sub>b</sub> και n συνοψίζονται στους *Πίνακες 15*, και S4. Οι τιμές των σταθερών πρόσδεσης κυμαίνονται μεταξύ των  $10^3 - 10^4$  M<sup>-1</sup>, υποδηλώνοντας μέτρια προς ισχυρή πρόσδεση των συμπλόκων με μόνο ένα σημείο πρόσδεσης [107].



Εικόνα 45: Φάσματα εκπομπής φθορισμού DNA-EtBr τιτλοδοτούμενου με (1)Cl<sub>4</sub> – (6)Cl<sub>4</sub> στους 298 K. [DNA] = 20 μM, [EtBr] = 5.2 μM, και [complex] = 0 έως 20.10 μM. (A) (1)Cl<sub>4</sub>, (B) (2)Cl<sub>4</sub>, (C) (3)Cl<sub>4</sub>, (D) (4)Cl<sub>4</sub>, (E) (5)Cl<sub>4</sub> και (F) (6)Cl<sub>4</sub>.

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως τα σύμπλοκα (**4**)Cl<sub>4</sub> και (**1**)Cl<sub>4</sub> ήταν πιο αποτελεσματικά στην ανταγωνιστική πρόσδεση με το EtBr, με την τάση ανταγωνιστικής πρόσδεσης να είναι η εξής με φθίνουσα σειρά: (**4**)Cl<sub>4</sub> > (**1**)Cl<sub>4</sub> > (**3**)Cl<sub>4</sub> > (**2**)Cl<sub>4</sub> > (**5**)Cl<sub>4</sub> > (**6**)Cl<sub>4</sub>. Επίσης οι σταθερές πρόσδεσης των (**4**)Cl<sub>4</sub> και (**1**)Cl<sub>4</sub> ήταν μία

τάξη μεγέθους μεγαλύτερες σε σχέση με των υπολοίπων συμπλόκων που μελετήθηκαν. Λαμβάνοντας υπόψιν τις τιμές των σταθερών K<sub>sv</sub> και K<sub>b</sub> συμπεραίνουμε πως τα σύμπλοκα (4)Cl4 και (1)Cl4 αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής, με τουλάχιστον μία μονάδα φαινανθρολίνης να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, ενώ τα (3)Cl<sub>4</sub>, (2)Cl<sub>4</sub>, (5)Cl<sub>4</sub> και (6)Cl<sub>4</sub> πιθανότατα αλληλεπιδρούν μέσω σύνδεσης στη μικρή αύλακα. Πέραν του γεφυρωτικού υποκαταστάτη, οι χηλικοί υποκαταστάτες (φαινανθρολίνη-phen ή διπυριδίνη -bpy) διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των συμπλόκων με το DNA. Η τιμή K<sub>sv</sub> του (4) ήταν 20 φορές μεγαλύτερη από αυτή του (1)Cl<sub>4</sub>, λόγω του πιο εκτεταμένου αρωματικού συστήματος της φαινανθρολίνης σε σχέση με αυτού της διπυριδίνης, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό το σύμπλοκο (4)Cl4 να παρεμβάλλεται πιο εύκολα μεταξύ των βάσεων του DNA[56]. Αντιθέτως, οι αντίστοιχες τιμές που υπολογίστηκαν για το μονομεταλλικό σύμπλοκο (7)Cl<sub>2</sub> K<sub>sv</sub> = 2.014 ± 0.129 x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> και K<sub>b</sub> 0.158 ± 0.001 x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> ήταν σημαντικά χαμηλότερες από αυτές των συμπλόκων (1)Cl<sub>4</sub>-(6)Cl<sub>4</sub>, υποδεικνύοντας μικρότερη ικανότητα του εν λόγω συμπλόκου να εκτοπίζει το EtBr από το σύστημα DNA-EtBr, καθώς και πολύ μικρότερη ικανότητα πρόσδεσης στο DNA από τα αντίστοιχα διμεταλλικά σύμπλοκα (Εικόνα S39). Ομοίως ασθενής ικανότητα πρόσδεσης έχει αναφερθεί και για το μονομεταλλικό σύμπλοκο [(η<sup>6</sup>cym) $Ru(bpm)(4,4'-bpy)]^{2+}$ [108].

Σύμπλοκο	K <sub>sv</sub> (10 <sup>4</sup> M <sup>-1</sup> )	K <sub>b</sub> (10 <sup>3</sup> M <sup>-1</sup> )	n	Quenching (%)
(1)	0.780 ± 0.073	10.002 ± 0.001	1.03	77.29
(2)	0.747 ± 0.031	6.511 ± 0.001	0.99	68.25
(3)	0.771 ± 0.025	3.473 ± 0.001	0.92	69.65
(4)	16.65 ± 0.080	12.133 ± 0.001	0.97	89.86
(5)	0.286 ± 0.018	2.333 ± 0.001	0.98	43.11
(6)	0.273 ± 0.027	3.336 ± 0.001	1.03	39.95
(7)	2.014 ± 0.129	$0.158 \pm 0.001$	0.98	35.03

Πίνακας 15: Τιμές παραμέτρων πρόσδεσης των συμπλόκων (**1**)Cl<sub>4</sub>-(**6**)Cl<sub>4</sub> και (**7**)Cl<sub>2</sub> με το διμερές του DNA d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> στους 298 K.

Γενικά ο τύπος αλληλεπίδρασης DNA – υποκαταστάτη μπορεί να προβλεφθεί μέσω των θερμοδυναμικών μεγεθών (ΔH<sup>°</sup>, ΔS<sup>°</sup> and ΔG<sup>°</sup>). Αυτές οι παράμετροι μπορούν συνήθως να υπολογιστούν από την εξίσωση van't Hoff και με βάση τις τιμές αυτών να εκτιμηθούν ποια είδη αλληλεπιδράσεων λαμβάνουν χώρα (*Εικόνα S40*).

Στις περιπτώσεις των (**1**)Cl<sub>4</sub>-(**6**)Cl<sub>4</sub>, οι τιμές τόσο των ΔΗ<sup>°</sup> όσο και των ΔS<sup>°</sup> ήταν θετικές, επομένως η πρόσδεση μεταξύ των συμπλόκων και του DNA βασίζεται στην ανάπτυξη υδροφοβικών δυνάμεων στις πλούσιες περιοχές της έλικας του DNA, όπως είναι η μικρή αύλακα του ολιγονουκλεοτιδίου και οι περιοχές ενδιάμεσα από τις βάσεις. Ακόμα οι αρνητικές τιμές της ΔG υποδηλώνουν, ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των συμπλόκων και του DNA είναι αυθόρμητη και οφείλεται στις μεγαλύτερες αρνητικές τιμές του γινομένου TΔS<sup>°</sup> σε σύγκριση με του ΔH<sup>°</sup>, καθιστώντας αντιληπτό πως οι αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων με το d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> καθορίζονται κατά βάση από την εντροπία (*Πίνακες 16* και *S5*).

ΣύμπλοκοΔH° (kJ/mol)ΔS° (J/mol)ΔG° (kJ/mol)(1) $40.38 \pm 0.019$ $212.18 \pm 0.065$ $-22.85 \pm 0.038$ (2) $63.77 \pm 0.108$ $286.51 \pm 0.366$ $-21.60 \pm 0.218$ (3) $64.24 \pm 0.187$ $282.46 \pm 0.630$ $-19.93 \pm 0.375$ (4) $28.09 \pm 0.032$ $172.31 \pm 0.107$ $-23.25 \pm 0.064$ (5) $34.56 \pm 0.032$ $180.61 \pm 0.108$ $-19.26 \pm 0.065$ (6) $88.01 \pm 0.172$ $363.63 \pm 0.581$ $-20.34 \pm 0.346$		-		-
(1) $40.38 \pm 0.019$ $212.18 \pm 0.065$ $-22.85 \pm 0.038$ (2) $63.77 \pm 0.108$ $286.51 \pm 0.366$ $-21.60 \pm 0.218$ (3) $64.24 \pm 0.187$ $282.46 \pm 0.630$ $-19.93 \pm 0.375$ (4) $28.09 \pm 0.032$ $172.31 \pm 0.107$ $-23.25 \pm 0.064$ (5) $34.56 \pm 0.032$ $180.61 \pm 0.108$ $-19.26 \pm 0.065$ (6) $88.01 \pm 0.172$ $363.63 \pm 0.581$ $-20.34 \pm 0.346$	Σύμπλοκο	ΔH° (kJ/mol)	∆S°(J/mol)	∆G° (kJ/mol)
(2) $63.77 \pm 0.108$ $286.51 \pm 0.366$ $-21.60 \pm 0.218$ (3) $64.24 \pm 0.187$ $282.46 \pm 0.630$ $-19.93 \pm 0.375$ (4) $28.09 \pm 0.032$ $172.31 \pm 0.107$ $-23.25 \pm 0.064$ (5) $34.56 \pm 0.032$ $180.61 \pm 0.108$ $-19.26 \pm 0.065$ (6) $88.01 \pm 0.172$ $363.63 \pm 0.581$ $-20.34 \pm 0.346$	(1)	40.38 ± 0.019	212.18 ± 0.065	-22.85 ± 0.038
(3) $64.24 \pm 0.187$ $282.46 \pm 0.630$ $-19.93 \pm 0.375$ (4) $28.09 \pm 0.032$ $172.31 \pm 0.107$ $-23.25 \pm 0.064$ (5) $34.56 \pm 0.032$ $180.61 \pm 0.108$ $-19.26 \pm 0.065$ (6) $88.01 \pm 0.172$ $363.63 \pm 0.581$ $-20.34 \pm 0.346$	(2)	63.77 ± 0.108	286.51 ± 0.366	-21.60 ± 0.218
(4) $28.09 \pm 0.032$ $172.31 \pm 0.107$ $-23.25 \pm 0.064$ (5) $34.56 \pm 0.032$ $180.61 \pm 0.108$ $-19.26 \pm 0.065$ (6) $88.01 \pm 0.172$ $363.63 \pm 0.581$ $-20.34 \pm 0.346$	(3)	64.24 ± 0.187	282.46 ± 0.630	-19.93 ± 0.375
(5) $34.56 \pm 0.032$ $180.61 \pm 0.108$ $-19.26 \pm 0.065$ (6) $88.01 \pm 0.172$ $363.63 \pm 0.581$ $-20.34 \pm 0.346$	(4)	28.09 ± 0.032	172.31 ± 0.107	-23.25 ± 0.064
(6) 88.01 ± 0.172 363.63 ± 0.581 -20.34 ± 0.346	(5)	34.56 ± 0.032	180.61 ± 0.108	-19.26 ± 0.065
	(6)	88.01 ± 0.172	363.63 ± 0.581	-20.34 ± 0.346

Πίνακας 16: Θερμοδυναμικές παράμετροι πρόσδεσης των συμπλόκων (**1**)Cl<sub>4</sub>-(**6**)Cl<sub>4</sub> στο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> στους 298 K.

#### 3.6.Μελέτες Molecular docking

Συμπληρωματικά των φασματοσκοπικών τεχνικών πραγματοποιήθηκαν μελέτες molecular docking για τα σύμπλοκα (**4**)Cl<sub>4</sub>, (**5**)Cl<sub>4</sub> και(**6**) Cl<sub>4</sub>, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται και σχολιάζονται παρακάτω.

Στην περίπτωση του συμπλόκου (**4**)Cl<sub>4</sub> λήφθηκαν υπ 'όψιν τα δεδομένα του NMR και του φθορισμού. Με κατάλληλο άνοιγμα της διπλής έλικας και εξετάζοντας τις πιθανές ενεργειακές διαμορφώσεις, το σύμπλοκο (**4**)Cl<sub>4</sub> φαίνεται να υιοθετεί τη διαμόρφωση με τη χαμηλότερη ενέργεια (-4.84 kcal mol<sup>-1</sup>) με πρόσδεσή μεταξύ των βάσεων A5 και A6 της μιας αλυσίδας μέσω της μιας μονάδας φαινανθρολίνης και να εκτείνεται κατά μήκος του τέλους της αλληλουχίας (με κατεύθυνση προς το -5' άκρο). Με βάση αυτή τη διαμόρφωση η δεύτερη μονάδα φαινανθρολίνης του (**4**)Cl<sub>4</sub> πρέπει να βρίσκεται κοντά στα ζεύγη βάσεων G10/C3 και C11/G2 (*Εικόνα 46*).

Στην περίπτωση του (**5**)Cl<sub>4</sub> η διαμόρφωση με τη χαμηλότερη ενέργεια πρόσδεσης υπέδειξε πρόσδεση του συμπλόκου στη μικρή αύλακα με τη μία μονάδα φαινανθρολίνης στο -AATT- τμήμα της αλληλουχίας, ενώ με τη δεύτερη να βρίσκεται στη μεγάλη αύλακα.

Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και για το (**6**)Cl<sub>4</sub>. Γενικά τα αποτελέσματα των μελετών μέσω molecular docking συμφωνούν με αυτά των μελετών μέσω NMR και φθορισμού. Τα αποτελέσματα αυτά εμφανίζονται στην *Εικόνα 46.* 



Εικόνα 46: Μοντέλα που προέκυψαν με molecular docking και αντιστοιχούν στα σύμπλοκα (a):(**4**)Cl<sub>4</sub> (b):(**5**)Cl<sub>4</sub> και (c): (**6**)Cl<sub>4</sub> και απεικονίζουν την πρόσδεση με την αλληλουχία DNA d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>.

#### 3.7. Κυτταροτοξικές μελέτες

Στις κυτταροτοξικές δοκιμές των τεσσάρων καρκινικών σειρών με τα (4)Cl<sub>4</sub>, (5)Cl<sub>4</sub> και (6)Cl<sub>4</sub> με και το cisplatin, όπως ήταν αναμενόμενο, το cisplatin εμφάνισε την καλύτερη κυτταροτοξικότητα από όλες τις σύμπλοκες ενώσεις και σε όλες τις κυτταρικές σειρές, με τιμές IC<sub>50</sub> που κυμαίνονταν από 3.87 έως 17.10 μM (*Πίνακας 17*). Αξίζει να σημειωθεί ότι η κυτταρική σειρά των καρκινικών κυττάρων των ανθρώπινων ωοθηκών A2780 και η ανθεκτική στο cisplatin ανάλογή της (A2780 cisres) έδειξαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στα σύμπλοκα (5)Cl<sub>4</sub> και (6)Cl<sub>4</sub>, τα οποία εμφάνισαν παρόμοια κυτταροτοξική δράση (πιν. 11). Αντίθετα, τα δύο αυτά σύμπλοκα εμφάνισαν ασθενή κυτταροτοξική δράση στην κυτταρική σειρά εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού NIH-3T3 και ακόμα ασθενέστερη στην κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του ανθρώπινου μαστού MCF-7. Το σύμπλοκο (4)Cl<sub>4</sub> εμφάνισε μέτρια κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα A2780 ,ασθενή στα NIH3T3 και A2780 cisres (ανθεκτικά στο cisplatin) κύτταρα και πολύ χαμηλή κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα MCF-7 (*Πίνακας 17*).

Συνοψίζοντας τα σύμπλοκα (**5**)Cl<sub>4</sub> και (**6**)Cl<sub>4</sub> είναι σχετικά αποτελεσματικά στον καρκίνο των ωοθηκών *in vitro* και εμφανίζουν χαμηλή κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, καθώς και στα φυσιολογικά. Τα δεδομένα αυτά παρέχουν ενδείξεις πως τα παραπάνω σύμπλοκα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακολογικοί παράγοντες για αυτούς τους συγκεκριμένους τύπους καρκίνου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον *Πίνακα 17*.

Πίνακας 17: Τιμές IC<sub>50</sub> των συμπλόκων (**4**)Cl<sub>4</sub> - (**6**)Cl<sub>4</sub>, έναντι των καρκινικών κυτταρικών σειρών MCF-7 (καρκίνος μαστού), A2780 (καρκίνος ανθρώπινων ωοθηκών) και A2780 cisres (καρκίνος ανθρώπινων ωοθηκών με αθενκτικότητα στο cisplatin) και μη κακοήθης κυτταρική σειρά NIH-3T3 (εμβρυονικός ινοβλάστης). Σε παρένθεση εμφανίζεται ο δείκτης εκλεκτικότητας (SI)<sup>\*</sup> για κάθε καρκινική κυτταρική σειρά. Οι τιμές δίνονται σε μΜ και αντιστοιχούν στη μέση τιμή τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

				•
	NIH-3T3	MCF-7	A2780	A2780cis-res
cisplatin	11.63 ± 0.60	11.88 ± 1.20 (1.0)	3.87 ± 0.33 (3.0)	17.10 ± 0.24 (0.7)
(6)Cl <sub>4</sub>	184.9 ± 13.07	337.5 ± 0.16 (0.5)	34.77 ± 1.71 (5.3)	47.42 ± 3.51 (3.9)
(5)Cl <sub>4</sub>	137.6 ± 18.45	275.8 ± 37.43 (0.5)	35.57 ± 9.75 (3.9)	46.00 ± 6.13 (3.0)
( <b>4</b> )Cl <sub>4</sub>	192.3 ± 25.38	302.7 ± 26.62 (0.6)	117.3 ± 26.92 (1.6)	193.00 ± 33.15 (1.0)

\*Ως δείκτης εκλεκτικότητας (SI) ορίζεται ο λόγος της τιμής IC<sub>50</sub> μίας ένωσης ενάντια σε μια καρκινική κυτταρική σειρά προς την τιμή IC<sub>50</sub> ενάντια σε μια μη κακοήθη κυτταρική σειρά.

## Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα από τις διαφορετικές τεχνικές που παρουσιάστηκαν στο *Κεφάλαιο 3*, τα κεντρικά συμπεράσματα από τη μελέτη αυτή συνοψίζονται στα εξής:

- 1. Το σύμπλοκο (4)Cl₄ αλληλεπιδρά με τη διπλή έλικα του d(5΄-CGCGAATTCGCG-3΄)₂, αρχικά μέσω παρεμβολής της μίας μονάδας φαινανθρολίνης μεταξύ των βάσεων A5 και A6, με καταστροφή των δεσμών υδρογόνου C.-W στο τμήμα της αλληλουχίας -AATT-, δηλαδή στο κέντρο της έλικας. Κατόπιν λόγω του μικρού μήκους του γεφυρωτικού υποκαταστάτη BL-1, ο οποίος εκτείνεται προς το 5΄ άκρο, δηλαδή κατά μήκος των βάσεων G4C3G2, ευνοείται η αλληλεπίδραση της δεύτερης μονάδας φαινανθρολίνης με τη μικρή αύλακα. Η σταθερά πρόσδεσης στο DNA που προκύπτει από τις μελέτες φθορισμού για το (4)Cl₄ (K<sub>b</sub> = 12.133 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>) αποδεικνύει την ισχυρή πρόσδεσή του στο ολιγονουκλεοτίδιο. Ωστόσο, το σύμπλοκο (4)Cl₄ εμφανίζει μέτρια έως μικρή δραστικότητα έναντι όλων των καρκινικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν για κυτταροτοξικές μελέτες, καθώς επίσης και χαμηλή εκλεκτικότητα των καρκινικών έναντι των υγιών κυττάρων.
- 2. Το σύμπλοκο (5)Cl₄ αλληλεπιδρά με τη διπλή έλικα του d(5΄-CGCGAATTCGCG-3΄)₂, μέσω πρόσδεσης της μίας μονάδας φαινανθρολίνης με τη μικρή αύλακα στην περιοχή -AATT-. Στη συνέχεια βάσει του μήκους της γέφυρας BL-2 και της σχετικά μεγαλύτερης ευκαμψίας της σε σχέση με την BL-1 πραγματοποιείται πρόσδεση και της δεύτερης μονάδας φαινανθρολίνης στη μεγάλη αύλακα του DNA, με κατεύθυνση προς το 3΄ άκρο, στην περιοχή T8C9. Η σταθερά πρόσδεσης του (5)Cl₄ στο ολιγονουκλεοτίδιο είναι μικρότερη από εκείνη του (4)Cl₄ (K<sub>b</sub> = 2.333 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>), επομένως και η πρόσδεση ασθενέστερη. Παρά την ασθενέστερη πρόσδεσή του όμως το (5)Cl₄ εμφανίζει αυξημένη και εκλεκτική κυτταροτοξική δράση ενάντια στις καρκινικές σειρές A2780 and A2780res.
- 3. Το σύμπλοκο (6)Cl<sub>4</sub> αλληλεπιδρά με τη διπλή έλικα του d(5΄-CGCGAATTCGCG-3΄)<sub>2</sub>, μέσω πρόσδεσης της μίας μονάδας φαινανθρολίνης με τη μικρή αύλακα στην περιοχή -AATT-. Στη συνέχεια βάσει του μήκους της γέφυρας BL-3 (μεγαλύτερη και πιο εύκαμπτη από τις BL-1 και BL-2) πραγματοποιείται πρόσδεση και της δεύτερης μονάδας φαινανθρολίνης στη μεγάλη αύλακα του DNA, με κατεύθυνση προς το 5΄ άκρο, στην περιοχή C3G2. Η σταθερά πρόσδεσης του (6)Cl<sub>4</sub> στο ολιγονουκλεοτίδιο είναι μικρότερη από εκείνη του (4)Cl<sub>4</sub> (K<sub>b</sub> = 3.336 × 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>), επομένως και η πρόσδεσή του ασθενέστερη. Παρά την ασθενέστερη πρόσδεσή του όμως το (6)Cl<sub>4</sub>, όπως και το (5)Cl<sub>4</sub> εμφανίζει αυξημένη και εκλεκτική κυτταροτοξική δράση ενάντια στις καρκινικές σειρές A2780 and A2780res.
- 4. Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων (4)Cl<sub>4</sub>, (5)Cl<sub>4</sub> και (6)Cl<sub>4</sub> με τη διπλή έλικα του DNA πραγματοποιείται μέσω και των δύο μονάδων του συμπλόκου, καθώς η

σταθερά πρόσδεσης του αντίστοιχου μονοπυρηνικού συμπλόκου (**6**)Cl<sub>2</sub>, είναι μικρότερη κατά δύο τάξεις μεγέθους σε σχέση με αυτές των διπυρηνικών (K<sub>b</sub>=  $0.158 \times 10^3 \, \text{M}^{-1}$ ), φανερώνοντας μια πιο ασθενή πρόσδεση. Το μονοπυρηνκό σύμπλοκο ωστόσο εμφανίζει υποσχόμενη κυτταροτοξική δράση έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A2780.

- 5. Γενικά, τα διπύρηνα σύμπλοκα η<sup>6</sup>-arene-Ru(II) με κορεσμένη σφαίρα ένταξης από κινητικά αδρανείς ομάδες συνδέονται με το DNA ισχυρότερα από το αντίστοιχο μονοπυρηνικό. Οι τιμές σταθεράς προσδεσης στο DNA (Kb) μπορεί να ρυθμίζονται και από τον γεφυρωτικό υποκαταστάτη BL (απόσταση μεταξύ των δύο κέντρων ρουθηνίου) και το είδος του υποκαταστάτη L, παρέχοντας τη δυνατότητα για διαφορετικούς τρόπους πρόσδεσης.
- 6. Η ισχυρή δέσμευση μέσω παρεμβολής, που προκαλεί σημαντικές μεταβολές στην έλικα του DNA (π.χ. διάσπαση δεσμών υδρογόνου C.-W), δεν είναι επαρκής προϋπόθεση για να εξασφαλιστεί η κυτταροτοξικότητα τέτοιων ενώσεων ρουθηνίου, όπως γίνεται αντιληπτό στην περίπτωση του (4)Cl4. Παρόλο που ο τρόπος δέσμευσης αποτελεί κρίσιμο παράγοντας, η απόσταση μεταξύ των περιοχών δέσμευσης στη νουκλεοτιδική αλληλουχία φαίνεται να ακολουθεί τον κανόνα, ότι η μεγαλύτερη απόσταση συνεπάγεται καλύτερη κυτταροτοξική δράση.

### Κεφάλαιο 5: Βιβλιογραφία

[1] L. Stryer, "Βιοχημεία", Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2017, p.112-121 [2] S. Neidle "DNA structure and recognition", Oxford University Press Inc, New York, 1994. [3] S. Neidle, Journal of Biological Chemistry, vol. 296, 2021, p. 100553 [4] D. Svozil, J. Kalina, et.al., Acids Res., vol 36, 2008, p.3690–706. [5] S. N. Rao and P. Kollman, J. Am. Chem. Soc., vol 107 1985, p.1611–17. [6] R. R. Sinden, DNA Structure and Function, Academic Press, Sydney, 1994. [7] J. Pages, J. Benjamin, et al., Dalton Trans., vol. 44, no. 8, 2015, p. 3505–26. [8] G.M. Blackburn, M.J. Gait, "Nucleic acids in chemistry and biology"2nd Ed, Oxford University Press Inc, New York 1996. [9] E. F. Gale, E. Cundliffe, P. E. Reynolds, M. H. Richmond and M. J. Waring, The Molecular Basis of Antibiotic Action, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2nd edn, 1981. [10] A. Richards, et.al., Chemical Society Reviews, vol. 36, 2007, p. 471–83. [11] R. Marrington, T. R. Dafforn, et.al., Biophys. J., vol 87, 2004, p. 2002 [12] A.Kellett, et al. Chemical Society Reviews, vol. 48, 2019, pp. 971-88. [13] L. S. Lerman, J. Mol. Biol., vol 3, 1961, p.18–30 [14] P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, et al., Nature, vol 377,1995, p. 649-652 [15] M. Karimi Goftar, N. M. Kor et al., J. Adv. Biol. Biomed. Res., vol 2, 2014, p. 811 - 22. [16] A.Kapur, , et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. ,vol13, 1999, p.2489-97 [17] J. Fernández, et al. Marine Drugs, vol. 12, 2014, p. 2668–99. [18] F. Gago, Methods, vol14,1998, p.277 - 92. [19] G. Arena, L. M. Scolaro, et al., Inorg. Chem., vol 34, 1995, p. 2994–3002. [20] R. R. Monaco, J. Nucleic Acids, vol.70, 2010, p.702-31 [21] B. J. Pages, D. L. Ang, et al., Dalton Trans., vol 44, 2015, p3505 -26. [22] D.Dickerson, E.Richard , et al. Science, vol. 216, 1982, p. 475-85 [23] Minchin, Steve, et al. Essays in Biochemistry, vol. 63, 2019, p. 433–56. [24] J. D Watson, F.Crick, Nature, vol171, 1953, p.737-8 [25] G. Fonseca, et al. Journal of the American Chemical Society, vol.122, 2000, p. 4117–28. [26] N.Foloppe, D. MacKerell et al., The Journal of Physical Chemistry B, vol. 102, 1998, p.6669-78. [27] S. Marchese, et al., Toxins, vol. 10, 2018, p.214-6. [28] S. Dasari, et al., European Journal of Pharmacology, vol. 740, 2014, p. 364–78. [29] M. Hartmann, B.K. Kepler Comm. Inorg. Chem., vol 16, 1995, p. 339 [30] N. Farrell Transition, Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents, Kluwer Academic, Boston, 1989 [31] B.K. Keppler, Metal Complexes in Cancer Chemotherapy, VCH, Weinheim, 1993 [32] A. Gelasco, S.J. Lippard Top. Biol. Inorg. Chem., vol1, 1999, p. 1-43 [33] E.R. Jamieson, S.J. Lippard, Chem. Rev., vol. 99,1999, p. 2467-98 [34] M.J. Clarke, F. Zhu, et al Chem. Rev., vol 99, 1999, p. 2511-34 [35] A.D. Kelman, M.J. Clarke, et al,. Oncol., vol. 7 1977, p. 274-91. [36] B.K. Keppler, Metal Complexes in Cancer Chemotherapy, VCH, Weinheim, 1993, p.129-57 [37] B.D. Palmer, W.R. Wilson, et al. Med. Chem., vol33, 1990, p. 112-21 [38] G.K. Snyder, Journ. Appl. Physiol., vol65, 1988, p. 23345 [39] D. Miklavcic, G. Sersa, et al. Bioelect., vol9, 1990, p. 1340

[40] C. G. Hartinger, A. D. Phillips, et al Current Topics in Medicinal Chemistry, vol11, 2011, p.2688 – 2702.

[41] M. A. Oberc-Greenwood, L. M. Muul, et al Journal of Neuro - Oncology, vol3, 1986, p.387 – 396.

[42] A. Amin, M. Buratovich, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, vol9, 2010, p.1489–1503

[43] M.Coluccia, G. Sava, et al. Eur. J. Cancer., vol 29A, 1993, p.1873-98.

[44] A. Bergamo, B. Gava, et al. Int. J. Oncol. vol21, 2002, p.1331-38

[45] C. Hartinger, G. Zorbas-Seifried, et al Inorg. Biochem., vol 100, 2006, p.891-904.

[46] W. S. Sheldrick, H.S. Hagen-Eckhard, et al. Inorg. Chim. Acta, vol206, 1993, p.15–21

[47] (α) Korn, S.; Sheldrick, W. S. Inorg. Chim. Acta, vol254, 1997, p.85–91; (β) Korn, S.;

Sheldrick, W. S. J. Chem. Soc. Dalton Trans., 1997, p.2191–99; (γ) Annen, P.; Schildberg, S.; Sheldrick, W. S. Inorg. Chim. Acta, vol307, 2000, p.115–24.

[48] F.Wang, A. Habtemariam, et al, P. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol102, 2005, 18269–74.

[49] P.Sadler F. Wang, H.M. Chen, H. M.; Parsons et al, P. J. Chem. Eur. J., vol9, 2003, 5810–20.

[50] F. Wang, P. Sadler, et al. Chem. Eur. J., vol12, 2006, p.6151–65.

[51] (α) O. Nováková, A.Nazarov, A. et al Biochem. Pharmacol., vol77, 2009, p364–374; (β) O. Nováková, J.Malina et al Chem. Eur. J., vol16, 2010, p.5744–54.

[52] H.M. Chen, J.Parkinson, J., P. Sadler, P et al , Am .Chem. Soc., vol.12, 2003, p.173-86.

[53] S. Grguric-Sipka, I. Stepanenko et al. Dalton Trans., vol 116, 2009, 3334–39.

[54] S. Parsons, P. Sadler, et al P. J. Chem. Eur. J., vol4., 1998, p.672–6.

[55] C. Scolaro, A. Bergamo, A.; et al. J. Med. Chem., vol 48., 2005, p.4161–71.

[56] (α) G. Süss-Fink, Dalton Trans., 2010, 39, 1673–1688 (β) Dyson, P. J. Chimia, vol 61., 2007, p.698–703.

[57] (α) A. Habtemariam, M. Melchart, P.Sadler, et al. J. Med. Chem., vol49, 2006, p.6858–68 (β) P. Štarha, Z.Trávnícek, et al, Z. Molecules, vol.23, 2018, p.420.

[58] H.K. Liu, S.Berners, et al. Chem.-Int. Ed., vol45, 2006, p.8153–56.

[59] A. F. A Peacock, P Sadler, et al., J. Chem. Asian J., vol3, 2008, p.1890–99 (β) Dougan, S. J.; Sadler, P. J. Chimia, vol61, 2007, p.704–715.

[60] G. Zhang, C. Y Wu et al J. Nanobiotechnol., vol.9, 2011, p.6.

[61] J. C. Ruchdeschel, C.Semin. Oncol., vol. 21, 1994,p.114.

[62] E Lengo, G.Mestroni, et al., J. Chem. Soc., Dalton Trans., vol10, 1995, p.1653-61

[63] J. Malina, M. J. Hannon, et al., Chemistry - A European Journal, vol.14, 2008, p.10408– 14.

[64] U. McDonnell, J. M. C. A. Kerchoffs, et al, Dalton Transactions, 2008, p.667–75.

[65] U. McDonnell, M. R. Hicks, et al., Journal of Inorganic Biochemistry, vol.102, 2008, p.2052–9.

[66] E. Alessio, E. Lengo, et al J. Inorg. Biochem., vol.79, 2000, p.173.

[67] K Van der Schilden,, PhD Thesis, University of Leiden.

[68] F. M O' Reilly, J. M Kelly, et al, A. Chem. Commun. 1996, p.1013.

[69] L. Bíró, E. Farkas and P. Buglyó, Dalton Transactions, vol.39, 2010, p.10272–78

[70] E. Lengo, G.Mestroni et al. J. Chem. Soc., Dalton Trans., vol.14, 1999, p.3361-71.

[71] E. Alessio, E. Lengo, et al., Inorg. Biochem. Vol.79, 2000, p.173.

[72] B. M. Zeglis, V. C. Pierre and J. K. Barton, Chem.Commun., vol.44, 2007, p.4549–96

[73] H. K. Saeed, I. Q. Saeed, et al., Eur. J., vol.23, 2017, p.5467–77.

[74] F. Li, J. G. Collins and F. R. Keene, Chem. Soc. Rev., vol44, 2015, p.2529–42.

[75] F. E. Poynton, S. A. Bright, S., et al., Chem. Soc. Rev., vol46, 2017, p.7706–56.

[76] P. Starha, Coord. Chem. Rev., vol,431, 2021, p.2136-90

[77] H. Chen, J. A. Parkinson, P. J. Sadler et al, Proc. Natl. Acad. Sci., vol.100, 2003, p.14623– 28

[78] A. Nazif, R. Rubbiani, W. S. Sheldrick et al, Dalton Trans., vol41, 2012, 5587–98.

[79] A. Nazif, W. S. Sheldrick et al, J. Inorg. Biochem., vol103,2009, p.1405–14.

[80] Τσώλης Θ., Διδακτορική Διατριβή, Αντικαρκινικά Οργανομεταλλικά Σύμπλοκα του Ru(II): Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Μηχανισμός Δράσης τους, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2018, p:17-22, 25-28.

[81] A.Nazarov, et al., Journal of Organometallic Chemistry, vol.751, 2014, p.251–60.

[82] M. Clarke, J. Michael, Coordination Chemistry Reviews, vol. 236, 2003, p.209–33.

[83] K. Wutchrich "NMR of proteins and nucleic acids", Wiley, New York, 1986.

[84] Y. Ni, Y. Wang, et al Actuators B Chem., vol.156, 2011, p.290–7,

[85] L. Jin, P. Li, J. Li, et al, J. Mol. Liq., vol.341, 2021, p.11735-7.

[86] C. Qiao, , Y. Sun et al, Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., vol 70 , 2008, p.136–143.

[87] N. Shahabadi, F. Shiri, et al, J. Mol. Liq., vol. 345, 2022, 117904.

[88] P.D. Ross, S. Subramanian, Biochem., vol20, 1981, p.3096–3102.

[89] S.U. Rehman, T. Sarwar, et al, Arch. Biochem. Biophys., vol.576, 2015, p.49–60.

[90] S.S. Kalanur, U. Katrahalli, J et al. Chem., vol636, 2009, p93–100.

[91] K P.aracan, O.Okay, Reactive & Functional Polymers, vol73, 2013 p.442-50.

[92] C.M Drăgoi., N Mitrea., et al Farmacia, vol.60, 2001 p.13-20.

[93] P. Jaividhya, R.Dhivya et al., Inorg. Biochem., vo. 114, 2012, p.94-105

[94] P. Sathyadevi, P. Krishnamoorthy et al., Inorganica Chimica Acta, vol384, 2012, p83-96.

[95] F. Arjmand F., S.Parveen et al., J. Photochem. Photobiol. B: Biology, vol. 114, 2012, p.15-26.

[96] J. García-Giménez, G. Alzuet G., et al, J. Inorg. Biochem., vol103, 2009, p.243-55.

[97] J.L García-Giménez., M Gonzáles-Alvarez. et al, J. Inorg. Biochem., vol103,2009, p.923-34.

[98] V. Brabec and J. Kasparkova, Coord. Chem. Rev., vol. 376, 2018, p.75 – 94

[99] R. Galindo-Murillo, T. E. Cheatham, Nucleic Acids Res., vol49,2021, p3735 - 47.

[100] C. Georgakopoulou, D. Thomos, et al. "Synthesis, Dalton Transactions, vol. 51, 2022, p. 13808–25.

[101] S. Betanzos-Lara, L. Salassa, P. J. Sadler. et al, Suplementary material, Organometallics, vol.20, 2012, p.7276–91.

[102] D. Renciuk, et al, Nucleic Acids Research, vol. 41, 2013, p. 9891–900.

[103] C. G. Ricci and P. A. Netz, J. Chem. Inf. Model., vol.49, 2009, p.1925–35.

[104] C. Spring, M. Alexander, et al. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, vol. 72, 2018.

[105] D.Hare, et al. Journal of Molecular Biology, vol. 171, 1983, p.319–36.

[106] (a) S. Anbu, M. Kandaswamy, et al, Dalton Trans., vol.40, 2011, p.7310–8, (b) T. Afrati,

A. A. Pantazaki, et al, Dalton Trans., vol39, 2010, p.765–75, (c) C. Gurses, A. Aktas, S. Balcioglu, et al , J. Mol. Struct., vol47, 2022, 1313-50.

[107] P. Khanvilkar, S. R. Dash, et al., J. Biomol. Struct. Dyn., vol. 39, 2021, p.6044–55.

[108] S. Betanzos-Lara, L. Salassa, A. Habtemariam, O. Novakova, A. M. Pizarro, G. J.

Clarkson, B. Liskova, V. Brabec and P. J. Sadler, Organometallics, vol31, 2012, p.3466–79.

[109] J. R. Lakowicz, Springer Science+Business Media: New York, 2006.

[110] J.R. Lakowicz, J., G. Webber, Biochemistry, vol. 12,1973, p.4161-70.

[111] M. Eftink, C. Ghiron, C, J. Phys. Chem., vol.80, 1976, p.486–93.

[112] T. Wang., Z. Zhao, et al, J. Mol. Struct., vol.97, 2010, p.128-33.

[113] N. Zhao, X. Wang, et al, Spectrochim. Acta., vol.75, 2010, p.1435–42.

[114] J. Jayabharathi, V. Thanikachalam, et al, M. Acta., vol. 79, 2011, p.502-7.

# Κεφάλαιο 6: Παράρτημα

Συπληρωματικό υλικό από εικόνες και πίνακες πειραματικών δεδομένων και αποτελεσμάτων.



**Εικόνα S1**: Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR of του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S2**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> σεH<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους298 K, 500 MHz.



**Figure S3**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H NOESY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.



**Εικόνα S4**: Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> σε r = 0.5 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S5**: Φάσμα  ${}^{1}$ Η –  ${}^{1}$ Η COSY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> at r = 0.5 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S6**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H NOESY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> σε r = 0.5 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.



**Εικόνα S7**: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> σε r = 1 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S8**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> σεr = 1 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S9**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H NOESY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> at r = 1 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.



**Εικόνα S10**: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR Spectra of d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> at r = 2 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S11**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> σε r = 2 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S12:** Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H NOESY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> σε r = 2 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.

**Πίνακας S1**: Διαφορές στις <sup>1</sup>Η χημικές μετατοπίσεις του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) μετά από προσθήκη συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> σε τρεις αναλογίες [Ru]/νουκλεοτιδίου, στους 298 K, 500 MHz. Οι τιμες στις παρενθέσεις σημαίνουν τις μετατοπίσεις σε υψηλότερα [upfield (-)] ή χαμηλότερα [downfield (+)] πεδία σε σχέση με αυτές του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου.

	r = 0											r	= 0.5								r = 1							I	r = 2			
	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2′	H2"	Н3′	H4'	H5'5"	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2′	H2"	Н3′	H4'	H5'5"	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2′	H2"	Н3'	H4'	H5'5"	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2′	H2"	Н3′	H4'	H5'5"
C1	7.60	5.88	5.72	1.89	2.37	4.60	3.91	3.69 3.72	7.60 0.00	5.91 +0.03	5.77 +0.05	1.90 +0.01	2.36 -0.01	4.66 +0.06	4.06 +0.15	3.68 -0.01 3.72 0.00	7.60 0.00	5.91 +0.03	5.79 +0.07	1.85 -0.04	2.36 -0.01	4.64 +0.04	4.04 +0.13	3.63 -0.06 3.73 +0.01	7.61 +0.01	5.93 +0.05	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o. n.o.
G2	7.93		5.88	2.53	2.65	4.97	4.36	3.97 4.08	7.95 +0.02		5.78 -0.10	2.48 -0.05	2.65 0.00	4.95 -0.02	4.33 -0.03	3.97 0.00 4.06 -0.02	7.98 +0.05		5.76 -0.12	2.62 +0.09	2.67 +0.02	4.93 -0.04	4.34 -0.02	3.98 +0.01 4.06 -0.02	7.94 +0.01		n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o. n.o.
СЗ	7.25	5.35	5.56	1.81	2.22	4.77	4.10	4.12 4.15	7.29 +0.04	5.31 -0.04	5.57 +0.01	1.81 0.00	2.22 0.00	4.73 -0.04	4.09 -0.01	n.o. n.o.	7.29 +0.04	5.42 +0.07	5.56 0.00	1.83 +0.02	2.21 -0.01	4.76 -0.01	4.10 0.00	n.o. n.o.	7.34 +0.09	5.50 +0.15	5.59 +0.03	1.83 +0.02	2.21 -0.01	4.76 -0.01	4.10 0.00	n.o. n.o.
G4	7.83		5.42	2.63	2.74	4.97	4.39	3.97 4.06	7.85 +0.02		5.33 -0.09	2.58 -0.05	2.70 -0.04	4.96 -0.01	4.31 -0.08	3.99 +0.02 4.06 0.00	7.88 +0.05		5.32 -0.10 5.25* -0.17	2.63 0.00	2.86 +0.12	4.97 0.00	4.34 -0.05	3.99 +0.02 4.06 0.00	7.94 +0.11		5.13 -0.43 4.99* -0.57	2.63 0.00	2.67 -0.07	4.93 -0.04	4.35 - 0.04	n.o. n.o.
A5	8.09	7.21	6.13	2.67	2.89	5.03	4.45	4.15 4.19	8.11 +0.02	7.07 -0.14	6.09 -0.06	2.64 -0.03	n.o.	5.03 0.00	4.45 0.00	<b>4.10</b> - <b>0.05</b> 4.18 -0.01	8.12 +0.03	7.11 -0.10	5.86 -0.27	2.65 -0.02	2.84 -0.05	5.03 0.00	4.45 0.00	4.11 -0.04 4.19 0.00	8.15 +0.06	7.15 -0.06	5.86 -0.27	2.64 -0.03	2.85 -0.04	5.00 -0.03	4.45 0.00	n.o. n.o.
A6	8.09	7.60	5.97	2.57	2.90	4.99	4.45	n.o. 4.25	8.12 +0.03	7.44 -0.16	5.88 -0.09	2.52 -0.05	3.00 +0.10	5.00 +0.01	4.44 -0.01	n.o 4.23 -0.02	8.12 +0.03	7.42 -0.18	6.10 -0.13	2.60 +0.03	2.85 -0.05	4.99 0.00	4.45 0.00	n.o. 4.24 -0.01	8.18 +0.09	7.41 -0.19	6.09 +0.12	2.59 +0.02	2.84 -0.06	4.99 0.00	4.43 - 0.02	n.o. 4.30 +0.05
77	7.09	1.24	5.88	1.95	2.53	4.81	4.14	4.15	7.11 +0.02	1.27 +0.03	5.84 -0.04	1.97 +0.02	2.58 +0.05	4.86 +0.05	4.16 +0.02	n.o. n.o.	7.12 +0.03	1.28 +0.04	5.81 -0.07	1.94 -0.01	2.54 +0.01	4.82 +0.01	4.14 0.00	n.o. n.o.	7.15 +0.06	1.34 +0.10	5.87 -0.01	1.81 -0.14	2.56 +0.03	4.68 -0.13	n.o.	n.o. n.o.
т8	7.35	1.51	6.12	2.14	2.53	4.88	4.19	4.09	7.36 +0.01	1.54 +0.03	6.05 -0.07	2.13 +0.01	2.52 +0.01	4.88 0.00	4.21 +0.02	3.99 -0.10	7.38 +0.03	1.58 +0.07	6.03 -0.09	2.13 -0.01	2.60 +0.07	4.88 0.00	4.15 -0.04	n.o. n.o.	7.39 +0.04	1.65 +0.14	5.99 -0.13	2.08 -0.06	2.63 -0.10	4.93 +0.05	4.17 - 0.02	n.o. n.o.
С9	7.44	5.60	5.64	2.04	2.39	4.86	4.14	4.10 4.17	7.44 0.00	5.66 +0.06	5.66 +0.02	2.03 -0.01	2.42 +0.03	4.92 +0.06	4.13 -0.01	4.12 +0.02 n.o	7.42 -0.02	5.75 +0.15	5.65 +0.01	2.05 +0.01	2.34 -0.05	4.91 +0.05	4.15 +0.01	4.12 +0.02	7.44 0.00	5.88 +0.28	5.57 -0.07	2.05 +0.01	2.31 -0.08	4.90 +0.04	4.14 0.00	4.13 +0.03 n.o.
G10	7.89		5.83	2.54	2.67	4.97	4.41	4.04 4.15	7.92 +0.03		5.82 -0.01	2.59 +0.05	2.62 -0.05	4.97 0.00	4.41 0.00	4.06 +0.02 4.15 0.00	7.95 +0.06		5.80 -0.03	2.57 +0.03	2.66 -0.01	4.92 -0.05	4.40 -0.01	4.06 +0.02 n.o.	7.97 +0.08		n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o. n.o.
C11	7.31	5.42	5.72	1.85	2.31	4.78	4.18	4.09	7.29	5.40 -0.02	5.69	1.86	2.32	4.78 +0.01	4.16	n.o.	7.29	5.42	5.65	1.85	2.36	4.76	4.15	n.o.	7.31	5.45 +0.03	5.61 -0.11	2.02	2.22	4.87	4.18	n.o.
G12	7.92		6.13	2.37	2.58	4.66	4.19	n.o. n.o.	7.92 0.00	0.02	6.11 -0.02	2.38 +0.01	2.53 -0.05	4.66 +0.03	4.18 -0.01	n.o. n.o.	7.95 +0.03	0.00	6.07 -0.06	2.36 -0.01	2.65 +0.07	4.67 +0.01	4.13 +0.06	n.o. n.o.	7.94 +0.02	.0.03	6.00 -0.13	2.36 -0.01	2.67 +0.09	4.67 +0.01	4.13 - 0.06	n.o. n.o.



**Εικόνα S13**: : Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> σε r = 0.5 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S14**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2 2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> σε r = 0.5 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S15**:Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H NOESY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> σε r = 0.5 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) στους 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.







**Εικόνα S17**: Φάσα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> σε r = 1 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S18**:Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H NOESY NMR τουf d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> σε r = 1 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.



**Εικόνα S19**: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> σε r = 2 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S20**: Φάσμα  ${}^{1}$ H –  ${}^{1}$ H COSY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> Φάσμα  ${}^{1}$ H NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> σε r = 2 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.


Εικόνα S21: Φάσμα <sup>1</sup>H − <sup>1</sup>H NOESY NMR του d(CGCGAATTCGCG) Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (5)Cl₄ σε r = 2 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.

Πίνακας S2 Διαφορές στις <sup>1</sup>Η χημικές μετατοπίσεις του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) μετά από προσθήκη συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> σε τρεις αναλογίες [Ru]/νουκλεοτιδίου, στους 298 K, 500 MHz. Οι τιμες στις παρενθέσεις σημαίνουν τις μετατοπίσεις σε υψηλότερα [upfield (-)] ή χαμηλότερα [downfield (+)] πεδία σε σχέση με αυτές του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου.

	r = 0							r = 0.5							r = 1								r = 2									
	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2′	H2″	Н3′	H4′	H5'5"	Н8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2′	H2"	Н3′	H4′	H5′5″	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2′	H2"	Н3′	H4'	H5'5"	Н8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2′	H2"	Н3′	H4′	H5′5″
C1	7.60	5.88	5.72	1.89	2.37	4.60	3.91	3.69 3.72	7.61 +0.01	5.90 +0.02	5.78 +0.06	1.92 +0.03	2.41 +0.04	4.66 +0.06	4.04 +0.13	3.59 +0.10 3.71 -0.01	7.62 +0.02	5.91 +0.03	5.79 +0.07	1.91 +0.02	2.37 0.00	4.69 +0.09	4.08 +0.17	3.57 -0.12 3.71 -0.01	7.63 +0.03	5.93 +0.05	5.80 -0.08	1.89 0.00	2.39 +0.02	4.63 +0.03	4.08 +0.17	3.57 -0.12 3.71 -0.01
G2	7.93	-	5.88	2.53	2.65	4.97	4.36	3.97 4.08	7.95 +0.02	-	5.80 -0.08	2.47 -0.06	2.66 +0.01	4.97 0.00	4.32 -0.04	3.93 -0.04 4.08 0.00	7.96 +0.03	-	5.76 -0.12	n.o.	2.67 +0.02	4.97 0.00	4.32 -0.04	3.93 -0.04 4.08 0.00	7.98 +0.05	-	5.75 -0.13	n.o.	2.65 0.00	4.32 -0.04	3.93 -0.04 4.08 0.00	4.32 -0.04
C3	7.25	5.35	5.56	1.81	2.22	4.77	4.10	4.12 4.15	7.28 +0.03	5.40 +0.05	5.57 +0.01	1.89 +0.08	2.24 +0.02	4.77 0.00	n.o.	n.o. n.o.	7.29 +0.04	5.43 +0.08	5.58 0.02	1.90 +0.09	2.24 +0.02	4.78 +0.01	n.o.	n.o. n.o.	7.34 +0.09	5.53 +0.18	5.54 -0.02	1.90 +0.09	2.22 0.00	4.70 -0.07	n.o	n.o. n.o.
G4	7.83	-	5.42	2.63	2.74	4.97	4.39	3.97 4.06	7.88 +0.05	-	5.37 -0.05	2.64 +0.01	2.77 +0.03	4.98 +0.01	4.31 -0.08	3.93 -0.04 4.09 +0.03	7.88 +0.05	-	5.37 -0.05	2.65 +0.02	n.o.	4.99 +0.02	4.32 -0.07	3.93 -0.04 4.08 +0.02	7.85 +0.02	-	5.32 -0.10	2.65 +0.02	n.o.	4.96 -0.01	4.36 -0.03	n.o. n.o.
A5	8.09	7.21	5.97	2.67	2.89	5.03	4.45	4.15 4.19	8.10 +0.01	7.19 -0.02	5.93 -0.04	2.70 +0.03	2.87 -0.02	5.04 +0.01	4.42 -0.03	4.11 -0.04 n.o.	8.12 +0.03	7.20 -0.01	5.93 -0.04	2.67 0.00	2.87 -0.02	5.04 +0.01	n.o.	n.o.	8.12 +0.03	7.17 -0.04	5.86 -0.11	2.67 0.00	2.85 -0.04	5.03 0.00	n.o.	n.o. n.o.
A6	8.09	7.60	6.13	2.57	2.90	4.99	4.45	n.o. 4.25	8.10 +0.02	7.57 -0.03	6.12 -0.01	2.58 -0.01	2.88 -0.02	4.98 -0.01	4.42 -0.03	n.o 4.24 -0.01	8.12 +0.03	7.55 -0.05	6.11 -0.02	2.59 0.00	2.89 -0.01	4.98 -0.01	n.o.	n.o.	8.12 +0.03	7.56 -0.04	6.08 -0.05	2.59 +0.02	2.84 -0.06	4.96 -0.03	n.o.	n.o. n.o.
77	7.09	1.24	5.88	1.95	2.53	4.81	4.14	4.15	7.10 +0.01	1.27 +0.03	5.87 -0.01	1.94 -0.01	2.51 -0.02	4.80 -0.01	4.13 -0.01	n.o. n.o.	7.12 +0.03	1.29 +0.05	5.86 -0.02	n.o.	2.53 +0.00	4.80 -0.01	4.12 -0.02	n.o. n.o.	7.11 +0.02	1.27 +0.03	5.84 -0.04	1.94 -0.01	n.o.	4.83 +0.02	n.o.	n.o. n.o.
Т8	7.35	1.51	6.12	2.14	2.53	4.88	4.19	4.09	7.35 0.00	1.54 +0.03	6.04 -0.08	2.13 +0.01	2.54 +0.01	4.87 -0.01	4.26 +0.07	n.o	7.35 0.00	1.55 +0.04	6.04 -0.08	2.06 -0.08	2.50 -0.07	4.87 -0.01	n.o.	n.o. n.o.	7.35 0.00	1.55 +0.04	6.00 -0.12	2.06 -0.08	2.42 -0.15	4.87 -0.01	n.o.	n.o. n.o.
С9	7.44	5.60	5.64	2.04	2.39	4.86	4.14	4.10 4.17	7.45 +0.01	5.66 +0.06	5.62 -0.02	2.02 -0.02	2.37 -0.02	4.86 0.00	4.11 -0.03	n.o. n.o.	7.44 0.00	5.70 +0.10	5.63 -0.01	2.02 -0.02	n.o.	4.86 0.00	4.08 -0.06	4.12 +0.02 n.o.	7.45 +0.01	5.70 +0.10	5.66 +0.02	2.01 -0.03	2.38 -0.01	4.84 -0.02	4.08 -0.06	4.12 +0.02 n.o.
G10	7.89	-	5.83	2.54	2.67	4.97	4.41	4.04 4.15	7.94 +0.05	-	5.82 -0.01	2.56 +0.02	2.68 +0.01	4.98 +0.01	4.36 -0.05	4.04 0.00 4.11 -0.04	7.93 +0.04	-	5.81 -0.02	2.59 +0.05	2.68 +0.01	4.98 +0.01	4.35 -0.06	4.06 +0.02 n.o.	7.91 +0.02	-	5.84 +0.01	2.59 +0.05	2.68 +0.01	4.98 +0.01.	n.o.	n.o. n.o.
C11	7.31	5.42	5.72	1.85	2.31	4.78	4.18	4.09 n.o.	7.33 +0.02	5.44 +0.02	5.67 -0.05	1.90 +0.05	2.32 +0.01	4.77 -0.01	n.o. n.o	n.o. n.o.	7.31 0.00	5.44 +0.02	5.65 -0.07	1.91 +0.06	2.33 +0.02	n.o.	n.o.	n.o. n.o.	7.37 +0.06	5.53 +0.11	5.62 -0.10	1.94 +0.09	2.39 +0.08	n.o.	n.o.	n.o. n.o.
G12	7.92	-	6.13	2.37	2.58	4.66	4.19	n.o. n.o.	7.92 0.00	-	6.10 -0.03	2.37 0.00	2.59 +0.01	4.67 +0.01	4.15 -0.04	n.o. n.o.	7.91 -0.01	-	6.09 -0.05	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o. n.o.	7.96 +0.04	-	6.07 -0.06	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o. n.o



**Εικόνα S22**: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (6)Cl<sub>4</sub> σε r = 0.5 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S23**: Φάσμα <sup>1</sup>H − <sup>1</sup>H COSY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (6)Cl₄ σε r = 0.5 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S24**: Φάσμα <sup>1</sup>H − <sup>1</sup>H NOESY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (6)Cl₄ σε r = 0.5 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.



**Εικόνα S25**: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (6)Cl<sub>4</sub> σε r = 1 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S26**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY NMR Spectra of d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> upon addition of complex (6)Cl<sub>4</sub> at r = 1 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (buffer phosphate 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S27**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H NOESY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (6)Cl<sub>4</sub> σε r = 1 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.



**Εικόνα S28**: Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR του d(CGCGAATTCGCG) μετά από προσθήκη συμπλόκου (6)Cl₄ σε r =2 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S29**: Φάσμα <sup>1</sup>H − <sup>1</sup>H COSY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (6)Cl₄ σε r =2 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S30**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H NOESY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (6)Cl<sub>4</sub> σε r =2 σε H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.

**Πίνακας S3** Διαφορές στις <sup>1</sup>Η χημικές μετατοπίσεις του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) μετά από προσθήκη συμπλόκου (6)Cl<sub>4</sub> σε τρεις αναλογίες [Ru]/νουκλεοτιδίου, στους 298 K, 500 MHz. Οι τιμες στις παρενθέσεις σημαίνουν τις μετατοπίσεις σε υψηλότερα [upfield (-)] ή χαμηλότερα [downfield (+)] πεδία σε σχέση με αυτές του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου.

				r =	0							r =	0.5							1	-= 1							r = 2				
	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1'	H2'	H2"	Н3′	H4′	H5'5"	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2'	H2"	Н3′	H4′	H5'5"	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2'	H2"	Н3′	H4'	H5'5"	H8/6	H5/H2 -CH₃	H1′	H2′	H2"	Н3'	H4'	H5'5''
C1	7.60	5.88	5.72	1.89	2.37	4.60	3.91	3.69 3.72	7.63 +0.03	5.93 +0.05	5.76 +0.04	1.90 +0.01	2.39 +0.02	4.65 +0.05	3.98 +0.07	3.65 +0.04 3.73 +0.01	7.63 +0.03	5.97 +0.05	5.76 +0.04	1.90 +0.01	2.37 0.00	n.o.	n.o.	n.o. n.o.	7.63 +0.03	5.93 +0.05	5.74 +0.02	1.90 +0.01	n.o.	n.o.	n.o.	n.o. n.o.
G2	7.93	-	5.88	2.53	2.65	4.97	4.36	3.97 4.08	7.95 +0.02	-	5.89 +0.01	2.53 0.00	2.63 -0.02	4.97 0.00	4.32 -0.04	3.98 +0.01 4.08 0.00	7.97 +0.04	-	5.92 +0.04	n.o.	2.63 -0.02	4.97 0.00	4.33 -0.03	3.98 +0.01 4.07 -0.01	7.98 +0.05	-	5.90 -0.02	n.o.	2.67 +0.02	4.97 0.00	4.31 -0.05	n.o. 4.08 0.00
С3	7.25	5.35	5.56	1.81	2.22	4.77	4.10	4.12 4.15	7.28 +0.03	5.40 +0.05	5.57 +0.01	1.85 +0.04	2.21 -0.01	n.o.	n.o.	n.o. n.o.	7.31 +0.06	5.48 +0.13	5.51 -0.05	1.87 +0.06	2.22 0.00	n.o.	n.o.	n.o. n.o.	7.34 +0.09	5.53 +0.18	5.52 -0.04	1.88 +0.07	2.22 0.00	n.o.	n.o.	n.o. n.o.
G4	7.83	-	5.42	2.63	2.74	4.97	4.39	3.97 4.06	7.84 +0.01	-	5.40 -0.02	2.63 0.00	2.72 -0.02	4.97 0.00	4.34 -0.05	3.98 +0.01 4.08 +0.02	7.84 +0.01	-	5.35 -0.07	2.63 0.00	2.74 0.00	4.97 0.00	4.33 -0.06	3.98 +0.01 4.07 -0.01	7.85 +0.02	-	5.32 -0.10	2.60 -0.03	2.69 -0.05	4.97 0.00	4.31 -0.08	n.o. 4.08 +0.02
A5	8.09	7.21	5.97	2.67	2.89	5.03	4.45	4.15 4.19	8.09 0.00	7.21 0.00	5.96 -0.01	2.67 0.00	2.89 0.00	5.04 +0.01	4.42 -0.03	4.13 -0.02 n.o.	8.10 +0.01	7.18 -0.03	5.92 -0.05	2.67 0.00	2.88 -0.01	5.03 0.00	4.41 -0.04	4.14 -0.01 n.o.	8.10 +0.01	7.17 -0.04	5.93 -0.04	2.64 -0.03	2.87 -0.02	5.04 +0.00	4.38 -0.07	4.11 -0.04 n.o.
A6	8.09	7.60	6.13	2.57	2.90	4.99	4.45	n.o. 4.25	8.09 0.00	7.60 0.00	6.13 0.00	2.57 0.00	2.89 -0.01	4.98 -0.01	4.42 -0.03	n.o 4.23 -0.02	8.10 +0.01	7.58 -0.02	6.10 -0.03	2.58 +0.01	2.88 -0.02	4.97 -0.02	4.41 -0.04	n.o. 4.27 +0.02	8.10 +0.01	7.58 -0.02	6.10 -0.03	2.55 -0.02	2.87 -0.03	4.97 -0.02	4.38 -0.07	n.o. 4.26 +0.01
т7	7.09	1.24	5.88	1.95	2.53	4.81	4.14	4.15	7.08 -0.01	1.26 +0.02	5.88 0.00	1.95 0.00	2.54 +0.01	4.89 +0.08	4.14 0.00	n.o. n.o.	7.08 -0.01	1.27 +0.03	5.86 -0.02	1.95 0.00	2.52 -0.01	4.90 +0.10	n.o.	n.o. n.o.	7.08 -0.01	1.28 +0.04	5.86 -0.02	1.95 0.00	2.52 -0.01	4.89 +0.08	n.o.	n.o. n.o.
Т8	7.35	1.51	6.12	2.14	2.53	4.88	4.19	4.09	7.35	1.53 +0.02	6.06 -0.06	2.18 +0.04	2.63 +0.10	4.92 +0.04	4.16 -0.03	3.98	7.35 0.00	1.54 +0.03	6.05 -0.07	2.14 0.00	n.o.	4.88	4.14	n.o. n.o.	7.34	1.55 +0.04	6.03 -0.09	2.10	n.o.	4.91 +0.03	4.20 +0.01	n.o. n.o.
С9	7.44	5.60	5.64	2.04	2.39	4.86	4.14	4.10 4.17	7.44 0.00	5.64 +0.04	5.64 0.00	2.07 +0.03	2.39 0.00	4.88 +0.02	4.14 0.00	n.o. n.o.	7.45 +0.01	5.68 +0.04	5.65 +0.01	2.05 +0.01	2.39 0.00	4.90 +0.04	n.o	n.o	7.44 0.00	5.70 +0.10-	5.70 +0.06	2.05 +0.01	2.40 +0.01	4.90 -0.07	4.13 -0.01	n.o. n.o
G10	7.89	-	5.83	2.54	2.67	4.97	4.41	4.04 4.15	7.91 +0.02	-	5.82 -0.01	2.53 -0.01	2.63 -0.04	4.97 0.00	4.42 +0.01	4.05 +0.01 4.16 +0.01	7.91 +0.02	-	5.79 -0.04	2.55 +0.01	2.68 +0.01	4.97 0.00	4.42 +0.01	4.07 +0.03 4.14	7.91 +0.02	-	5.78 -0.05	n.o.	2.64 -0.03	4.97 0.00	4.38 -0.03	4.08 +0.04 4.11 -0.05
C11	7.31	5.42	5.72	1.85	2.31	4.78	4.18	4.09 n.o.	7.33 +0.02	5.47 +0.05	5.69 -0.03	1.85 0.00	2.30 -0.01	4.68 -0.10	4.17 -0.01	n.o. n.o.	7.36 +0.05	5.51 +0.09	5.64 -0.08	1.87 +0.02	2.33 +0.02	4.76 -0.02	4.64 +0.14	n.o. n.o.	7.37 +0.06	5.53 +0.11	5.62 -0.10	1.88 +0.03	2.33 +0.02	n.o	n.o	n.o. n.o.
G12	7.92	-	6.13	2.37	2.58	4.66	4.19	n.o. n.o.	7.92 0.00	-	6.07 -0.06	2.37 0.00	2.58 0.00	4.66 0.00	4.17 -0.02	n.o. n.o.	7.92 0.00	-	6.06 -0.07	n.o.	2.58 0.00	4.70 +0.04	4.13 +0.06	n.o. n.o.	7.96 +0.04	-	6.07 -0.06	2.41 +0.04	2.54 -0.04	4.70 +0.04	4.13 -0.06	n.o. n.o.



**Εικόνα S31**: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (7)Cl<sub>2</sub> σε r =0.5 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S32**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H COSY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (7)Cl<sub>2</sub> σε r =0.5 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz.



**Εικόνα S33**: Φάσμα <sup>1</sup>H – <sup>1</sup>H NOESY NMR του d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> μετά από προσθήκη συμπλόκου (7)Cl<sub>2</sub> σε r =0.5 in H<sub>2</sub>O/ D<sub>2</sub>O 9:1 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 100 mM, pH = 7.0) at 298 K, 500 MHz, t<sub>mix</sub> = 350 ms.



**Εικόνα S34** : Φάσματα εκπομπής φθορισμού του συστήματος DNA–EtBr με διάφορες συγκεντρώσεις συμπλόκου (1)Cl<sub>4</sub> {A}, συμπλόκου (2)Cl<sub>4</sub> {B}, συμπλόκου (3)Cl<sub>4</sub> {C}, συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> {D}, συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> {E} και συμπλόκου (6)Cl<sub>4</sub> {F}. [DNA] = 20 μM, [EB] = 5.2 μM, εύρος συγκεντρώσεων συμπλόκων = 0 – 20.10 μM στους 291 K.



**Εικόνα S35** : Φάσματα εκπομπής φθορισμού του συστήματος DNA–EtBr με διάφορες συγκεντρώσεις συμπλόκου (1)Cl<sub>4</sub> {A}, συμπλόκου (2)Cl<sub>4</sub> {B}, συμπλόκου (3)Cl<sub>4</sub> {C}, συμπλόκου (4)Cl<sub>4</sub> {D}, συμπλόκου (5)Cl<sub>4</sub> {E} και συμπλόκου (6)Cl<sub>4</sub> {F}. [DNA] = 20 μM, [EB] = 5.2 μM, εύρος συγκεντρώσεων συμπλόκων = 0 – 20.10 μM στους 310 K.



**Εικόνα S36**: Διαγράμματα Stern–Volmer της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το σύστημα DNA– EtBr σε τρεις θερμοκρασίες (291 K, 298 K, και 310 K).

Complex	$K (10^4 M^{-1})$	K <sub>q</sub> (10 <sup>11</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-</sup>	$K_{\rm L}$ (10 <sup>3</sup> M <sup>-1</sup> )	n	percentage
complex		<sup>1</sup> )			quenching
	0.7018 ±	7.018	$6.894 \pm 0.001$	1.00	73.12
	0.081 (291 K)	(291 K)	(291 K)	(291 K)	
(1)	1,4423 ±	14.423	19.124 ±	1.04	84.38
	0.076 (310 K)	(310 K)	0.001	(310 K)	
			(310 K)		
	0.7233 ±	7.233	3.173 ± 0.001	0.92	65,45
	0.034 (291 K)	(291 K)	(291 K)	(291 K)	
(2)	0.7572 ±	7.572	16.195 ±	1.10	69.19
	0.029	(310 K)	0.001 (310 K)	(310 K)	
	(310 K)				
	0.3057 ±	2 057	1 567 + 0 001	0.96	48.66
	0.027 (291 K)	(291 K)	(201 K)	(291 K)	
(3)	0.8038 ±	8 038	(231 K) 8 179 + 0 001	(231 K) 1 00	70.41
	0.029	(310 K)	(310 K)	(310 K)	
	(310 K)	(310 K)	(310 K)	(310 K)	
	8.7854 ±	87.854	8.970 ± 0.001	1.00	81,67
	0.085	(291 K)	(291 K)	(291 K)	
(4)	(291 K)	178.07	18.352 ±	1.00	91.29
(-)	17.807 ±	(310 K)	0.001	(310 K)	
	0.078		(310 K)		
	(310 K)				
	0.2415 ±	2.415	$1.718 \pm 0.001$	0.96	37.92
	0.017	(291 K)	(291 K)	(291 K)	
(5)	(291 K)	2.899	$4.106 \pm 0.001$	1.04	52.03
(3)	0.2899 ±	(310 K)	(310 K)	(310 K)	
	0.020				
	(310 K)				
	0.1673 ±	1.485	$1.663 \pm 0.001$	1.00	34.20
	0.026 (291 K)	(291 K)	(291 K)	(291 K)	
(6)	0.2863 ±	2.877	15.114 ±	1.21	41.68
	0.024	(310 K)	0.001	(310 K)	
	(310 K)		(310 K)		

**Πίνακας S4**: Παράμετροι πρόσδεσης των διμεταλλικών συμπλόκων του Ru(II) με το d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> στους 291 K και 310 K.



Εικόνα S37: Διπλά λογαριθμικά διαγράμματα της απόσβεσης που προκαλούν τα σύμπλοκα στο φθορισμό του συστήματος d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>-EtBr σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (291 K, 298 K και 310 K) και διαγράμμτα van't Hoff για την πρόσδεση των συμπλόκων με το d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>. (A) για το σύμπλοκο (1)Cl<sub>4</sub>, (B) για το σύμπλοκο (2)Cl<sub>4</sub> και (C) για το σύμπλοκο (3)Cl<sub>4</sub>.



Εικόνα S38: Διπλά λογαριθμικά διαγράμματα της απόσβεσης που προκαλούν τα σύμπλοκα στο φθορισμό του συστήματος d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>-EtBr σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (291 K, 298 K και 310 K) και διαγράμμτα van't Hoff για την πρόσδεση των συμπλόκων με το d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>. (A) για το σύμπλοκο (4)Cl<sub>4</sub>, (B) για το σύμπλοκο (5)Cl<sub>4</sub> και (C) για το σύμπλοκο



**Εικόνα S39** : Φάσμα εκπομπής φθορισμού του συστήματος DNA–EtBr με διάφορες συγκεντρώσεις συμπλόκου  $[[\eta^6$ -cym)Ru(phen)(py)]^{2+}. [DNA] = 20 μM, [EB] = 5.2 μM, και  $[[\eta^6$ -cym)Ru(phen)(py)]^{2+} = 0 – 20.10 μM στους 298 K (A). Διαγράμματα Stern–Volmer για την αλληλεπίδραση του  $[[\eta^6$ -cym)Ru(phen)(py)]^{2+} με το DNA–EtBr στους 298 K (B). Διπλό λογαριθμικό διάγραμμα της απόσβεσης που προκαλέι το σύμπλοκο  $[[\eta^6$ -cym)Ru(phen)(py)]^{2+} στο φθορισμό του συστήματος d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>-EtBr στους 298 K (C).

Complex	ΔH° (kJ/mol)	ΔS°(J/mol)	ΔG° (kJ/mol)
(1)	40.38 ± 0.019	212.18 ± 0.065	-21.37 ± 0.034 (291 К) -25.40 ± 0.033 (310 К)
(2)	63.77 ± 0.108	286.51 ± 0.366	-19.59 ± 0.221 (291 K) -25.04 ± 0.222 (310 K)
(3)	64.24 ± 0.187	282.46 ± 0.630	-17.96 ± 0.376 (291 K) -23.32 ± 0.372 (310 K)
(4)	40.38 ± 0.032	212.18 ± 0.107	-22.05 ± 0.063 (291 K) 25.32 ± 0.068 (310 K)
(5)	34.56 ± 0.032	180.61 ± 0.108	-17.99 ± 0.063 (291 K) -21.42 ± 0.067 (310 K)
(6)	88.01 ± 0.172	363.63 ± 0.581	-17.80 ± 0.341 (291 K) -24.71 ± 0.348 (310 K)

**Πίνακας S5**: Thermodynamic parameters of the bimetallic Ru(II) complexes with d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> at 291 K and 310 K.



**Εικόνα S40**: Διαγράμματα van't Hoff για την πρόσδεση των συμπλόκων με το d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub>. (A) για το σύμπλοκο (1)Cl<sub>4</sub>, (B) για το σύμπλοκο (2)Cl<sub>4</sub>, (C) για το σύμπλοκο (3)Cl<sub>4</sub> (D) για το σύμπλοκο (4)Cl<sub>4</sub>, (E) για το σύμπλοκο (5)Cl<sub>4</sub> και (F) για το σύμπλοκο (6)Cl<sub>4</sub>.