

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΕΡΑΣΜΙΑΣ ΚΑΤΣΑΡΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΥ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΡΙΑΔΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
Pt(II) ΚΑΙ Pd(II) με ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ -
ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΑ-ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΑ**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1998

Ιωάννινα, 6-3-1998

Προς
το Τμήμα Χημείας
του Παν/μίου Ιωαννίνων

Θέμα: Απονομή του τίτλου του
Διδάκτορα στην κ. Κατσαρού Ερασμία

Σήμερα, στις 6 Μαρτίου 1998, έγινε από την υποψήφια Διδάκτορα κ. Κατσαρού Ερασμία η δημόσια παρουσίαση της Διδακτορικής της Διατριβής με θέμα:

“Σύνθεση και μελέτη τριτοταγών συστημάτων Ρι(II) και Ρd(II) με νουκλεοζίδες-ολιγονουκλεοτίδια και αμινοξέα-διπεπτίδια”

Στη συνέχεια, αφού η υποψήφια απάντησε σε σχετικές ερωτήσεις, αποχώρησε το ακροατήριο και έγινε σύσκεψη της Εξεταστικής Επιτροπής, η οποία έκρινε ότι το περιεχόμενο της διδακτορικής διατριβής είναι πρωτότυπο και συμβάλλει ουσιαστικά στην επιστήμη, η δε κατάρτιση της υποψηφίας είναι ευρεία και ολοκληρωμένη.

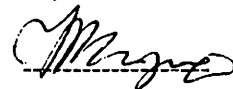
Με βάση τα ανωτέρω έγινε σύσκεψη της Εξεταστικής Επιτροπής και αποφασίστηκε να γίνει η απονομή του τίτλου του Διδάκτορα από το Τμήμα Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων στην κ. Κατσαρού Ερασμία με βαθμό *A.P.I.Σ.Τ.Α*

Τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

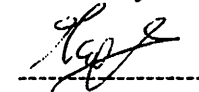
1. Χατζηλιάδης Νικόλαος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας
Παν/μίου Ιωαννίνων (Επιβλέπων Καθηγητής)



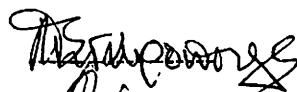
2. Τσαγκάρης Ιωάννης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας
Παν/μίου Ιωαννίνων (Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής)



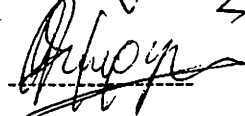
3. Περλεπές Σπυρίδων, Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας
Παν/μίου Πατρών (Μέλος της Συμβουλευτικής Επιτροπής)



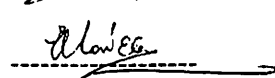
4. Σταυρόπουλος Γεώργιος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας
Παν/μίου Πατρών



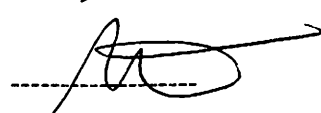
5. Κόβαλα-Δεμερτζή Δήμητρα, Επικ. Καθηγήτρια Τμήματος
Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων



6. Μάνεση-Ζούπα Ευδοξία, Επικ. Καθηγήτρια Τμήματος
Χημείας Παν/μίου Πατρών



7. Λουλούδη Μαρία, Αέκτορας Τμήματος Χημείας
Παν/μίου Ιωαννίνων



Η διατριβή αυτή εκπονήθηκε κατά την περίοδο 1992-1998, στο Εργαστήριο Γενικής και Ανοργάνου Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η ανάθεση του θέματος και η συνολική επίβλεψη της διατριβής έγινε από τον καθηγητή Ανοργάνου και Γενικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ν. Χατζηλιάδη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για το ενδιαφέρον, την ενθάρρυνσή του και για τη βοήθεια-υλική και ηθική -που μου προσέφερε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Επίσης ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου, κ. Ι. Τσαγκάρη, καθηγητή Ανοργάνου και Γενικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και κ. Σ. Περλεπέ, αν. καθηγητή Ανοργάνου Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών, για την υποστήριξή τους κατά τη διεξαγωγή της εργασίας αυτής.

Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου του Dortmund Γερμανίας, κ. B. Lippert καθώς και τον καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου του Bergen Νορβηγίας, κ. E. Sletten, στα εργαστήρια των οποίων φιλοξενήθηκα για μερικούς μήνες. Οι υποδείξεις και συμβουλές τους με βοήθησαν σημαντικά στην πρόοδο της εργασίας μου.

Ευχαριστώ ακόμα τον καθηγητή Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών κ. Γ. Σταυρόπουλο, ο οποίος με βοήθησε στη σύνθεση πολλών από τα διπεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως υποκαταστάτες στη σύνθεση των συμπλόκων.

Ευχαριστώ τους φίλους και συναδέλφους μου Μ. Λουλούδη, Κ. Ντόντη, Θ. Φιλιππόπουλο, Π. Τσιβεριώτη, Γ. Μαλανδρίνο, Α. Ντομοπούλου, Β. Αλετρά, Α. Γαρούφη, Β. Μαγκαφά, Ν. Θεοφανίδη, S. Hohmann, G. Feldmann, H. Rauter, A. Kolstad-Morken, N. Froystein, V. Jensen για τις εποικοδομητικές συζητήσεις, την άψογη συνεργασία και κυρίως την ηθική βοήθεια που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια της διατριβής μου.

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελ.
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Ιστορική αναδρομή	1
1.2. Πιθανός μηχανισμός δράσης του cis-DDP	5
2. ΤΡΙΑΔΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΤΟΥ Pd(II) ΚΑΙ Pt(II) ΜΕ ΑΜΙΝΟΞΕΑ-ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΟΒΑΣΕΙΣ-ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ-ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ	11
2.1. Τριαδικά σύμπλοκα παλλαδίου	15
2.2. Τριαδικά σύμπλοκα λευκοχρύσου	22
3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ	28
3.1. Φασματοσκοπικές μέθοδοι	32
3.1.1. Φασματοσκοπία συσχέτισης δύο διαστάσεων (2D-Correlation Spectroscopy, COSY)	33
3.1.2. Φασματοσκοπία δύο διαστάσεων NOE (NOESY)	33
3.1.3. Ανταλλασσόμενα πρωτόνια	35
3.1.4. Φασματοσκοπία ετεροπυρήνων, X-NMR (X= ¹³ C, ¹⁵ N, ³¹ P)	36
3.1.5. Άλλες μέθοδοι (UV, CD, gel electrophoresis, X-ray)	37
3.2. Αλληλεπιδράσεις Pt(II) και Pd(II) με ολιγονουκλεοτίδια	38
3.2.1. Δινουκλεοτίδια	38
3.2.2. Τρινουκλεοτίδια	43
3.2.3. Ολιγονουκλεοτίδια	47
3.3. Αλληλεπιδράσεις ολιγονουκλεοτιδίων με άλλα μεταλλικά ιόντα	66
3.3.1. Μαγνήσιο, Mg(II)	66
3.3.2. Ψευδάργυρος, Zn(II)	67
3.3.3. Υδράργυρος, Hg(II)	67
3.3.4. Μαγγάνιο, Mn(II)	68

ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΓΟΥΑΝΟΣΙΝΗ ΚΑΙ ΚΥΤΙΔΙΝΗ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

3.1.	Εισαγωγή	139
3.2.	Σύνθεση των τριαδικών συμπλόκων	139
3.3.	Φασματοσκοπία υπερώθρου (FT-IR)	140
3.4.	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων (¹ H-NMR)	146
3.4.1.	Θέσεις δεσμού των υποκαταστατών	146
(i)	Τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη	146
(ii)	Τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη	148
3.4.2.	Υδρόφοβες αλειφατικές-αρωματικές αλληλεπιδράσεις	162
3.4.3.	Διαμόρφωση του σακχάρου	164
3.4.4.	Διαμόρφωση γύρω από το δεσμό C _α -C _β των αμινοξέων	165
3.5.	Φασματοσκοπία ¹³ C-NMR	167
3.6.	Φασματοσκοπία ¹⁹⁵ Pt-NMR	168
3.7.	Συμπεράσματα	181
4.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ Pd(II), <u>trans</u>-Cl₂Pd(glyglyOH)₂ ΚΑΙ <u>trans</u>-Cl₂Pd(glyⁿvalOH)₂ ΚΑΙ ΤΟΥ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ [d(CGCGAATTCGCG)]₂.	183
4.1.	Εισαγωγή	183
4.2.	Η μέθοδος NMR	184
4.3.	Αποτελέσματα	190
4.3.1.	Αλληλεπίδραση του δωδεκανουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο <u>trans</u> -Cl ₂ Pd(glyglyOH) ₂	190
4.3.2.	Αλληλεπίδραση του δωδεκανουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο <u>trans</u> -Cl ₂ Pd(gly ⁿ valOH) ₂	192
4.4.	Συμπεράσματα	195
	ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	204
1.	Σύνθεση και μελέτη δυαδικών και τριαδικών συμπλόκων του λευκοχρύσου, Pt(II)	204
1.1	Αντιδραστήρια	204

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

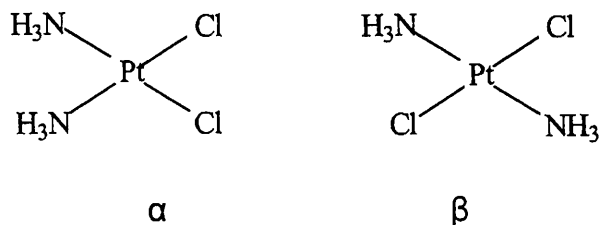
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ιστορική Αναδρομή

Το 1964 ο Αμερικανός Βιοφυσικός Barnett Rosenberg και οι συνεργάτες του, ενώ χρησιμοποιούσαν αδρανή ηλεκτρόδια λευκοχρύσου για να εφαρμόσουν ένα ηλεκτρικό πεδίο σ'ένα θάλαμο ανάπτυξης βακτηριδίων *E.coli*, με σκοπό να μελετήσουν την επίδραση του πεδίου στην ανάπτυξή τους, παρατήρησαν έκπληκτοι το εξής φαινόμενο: Διακόπηκε η αναπαραγωγή (κυτταρική διαίρεση) των βακτηριδίων, ενώ αντίθετα αυτά άρχισαν να μεγαλώνουν σε μέγεθος (μέχρι και 300 φορές του φυσιολογικού τους μεγέθους) σχηματίζοντας μακρές κυτταρικές ίνες [1].

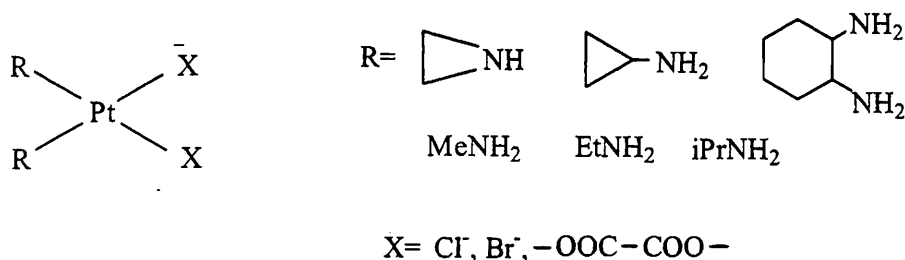
Η παρατήρηση αυτή βρέθηκε τελικά ότι οφειλόταν στην παρουσία αμινο-χλωρο-συμπλόκων των Pt(II) και Pt(IV), που παράγονταν λόγω ηλεκτρόλυσης σε ποσότητες της τάξης των 10 ppm από τα ηλεκτρόδια λευκοχρύσου και το άλας NH_4Cl , το οποίο περιεχόταν στο ρυθμιστικό διάλυμα των παραπάνω πειραμάτων [2,3].

Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι μια από τις ενώσεις αυτές ήταν η σύμπλοκη ένωση cis-Pt(NH₃)₂Cl₂ (cis-DDP ή cisplatin), μια κλασσική σύμπλοκη ένωση, η σύνθεση και η δομή της οποίας ήταν γνωστές για παραπάνω από έναν αιώνα [4α,β]. Αντίθετα, το trans-ισομερές βρέθηκε να μην παρουσιάζει ανάλογη δράση (Σχήμα 1) [3].



Σχήμα 1: Τα cis- (α) και trans- (β) ισομερή του $(\text{NH}_3)_2\text{PtCl}_2$.

Το 1978 ο Rosenberg παρουσιάζει κάποια ανάλογα του cis-DDP που παρουσιάζουν επίσης αντικαρκινική δράση [13], (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: Ανάλογα του cis-DDP με αντικαρκινική δράση.

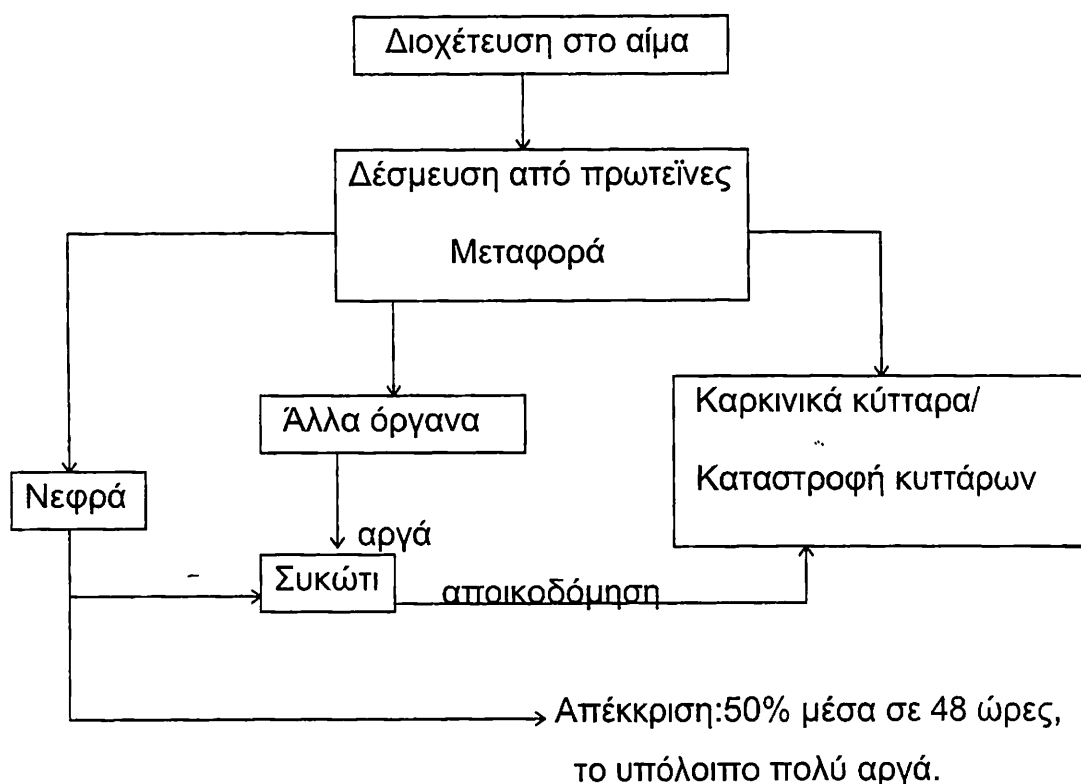
Μερικά άλλα ανάλογα του cis-DDP που παρουσιάζουν αξιόλογη αντικαρκινική δράση και βρίσκονται προς το παρόν στο στάδιο κλινικών δοκιμών (εκτός από το Carboplatin) παρουσιάζονται στο Σχήμα 3. Από αυτά, το μόνο που κυκλοφορεί ευρέως στην αγορά είναι το ανάλογο cis- $[(NH_3)_2Pt(CBDA)]$, όπου CBDA = το ανιόν του 1,1-δι-καρβοξυλοκυκλοβουτανίου ή Carboplatin ή Paraplatin, το οποίο είναι λιγότερο τοξικό από το oisriatin [14α]. Πρόσφατα βρέθηκαν και trans σύμπλοκα του Pt(II) με αντικαρκινική δράση [14β,γ]

Σήμερα το oisplatin χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα που προαναφέρθηκαν ή σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία [15,16] στη θεραπεία του καρκίνου των όρχεων, των ωθηκών, της κύστεως, καθώς και στη θεραπεία όγκων της κεφαλής και του λαιμού. Παρόλα αυτά δεν έχει σχεδόν κανένα αποτέλεσμα σε πιο συνηθισμένα είδη καρκίνου, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα ή του γαστρεντερικού συστήματος [17].

Έρευνες για την ανακάλυψη νέων συμπλόκων ενώσεων του λευκοχρύσου ή άλλων μεταλλικών ιόντων με την ίδια ή μεγαλύτερη και σε ευρύτερο φάσμα δραστηριότητα από αυτή του oisplatin καθώς και με μικρότερη τοξικότητα, συνεχίζονται εντατικά από πολλές ερευνητικές ομάδες στις μέρες μας. Επίσης αν και μετά 30 χρόνια από την ανακάλυψη της αντικαρκινικής δράσης του φαρμάκου, οι ερευνητές συνεχίζουν να εστιάζουν στη μελέτη του μηχανισμού δράσης του

1.2. Πιθανός μηχανισμός δράσης του cis-DDP

Και τα δύο σύμπλοκα του Pt(II), cis- και trans-DDP είναι μικρά, ουδέτερα μόρια που διατηρούν τη δομή τους όταν εισέρχονται στο πλάσμα του αίματος, όπου η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου είναι περίπου 100 mM. Καθώς όμως περνούν στο κυτόπλασμα των κυττάρων, όπου η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου μειώνεται στα 4 mM, τα σύμπλοκα υδρολύονται (Σχήματα 4, 5). Έχει υπολογιστεί ότι οι σχετικές αναλογίες των προϊόντων υδρόλυσης του cisplatin στα κύτταρα είναι: 0.46 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$: 3.63 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH})_2]$: 2.90 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})]^+$: 1.0 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})(\text{Cl})]^+$: 1.0 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH})(\text{Cl})]$: 0.915 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ [18,19].



Σχήμα 4: Σχηματική παράσταση της κυκλοφορίας του cisplatin μέσα στον οργανισμό.

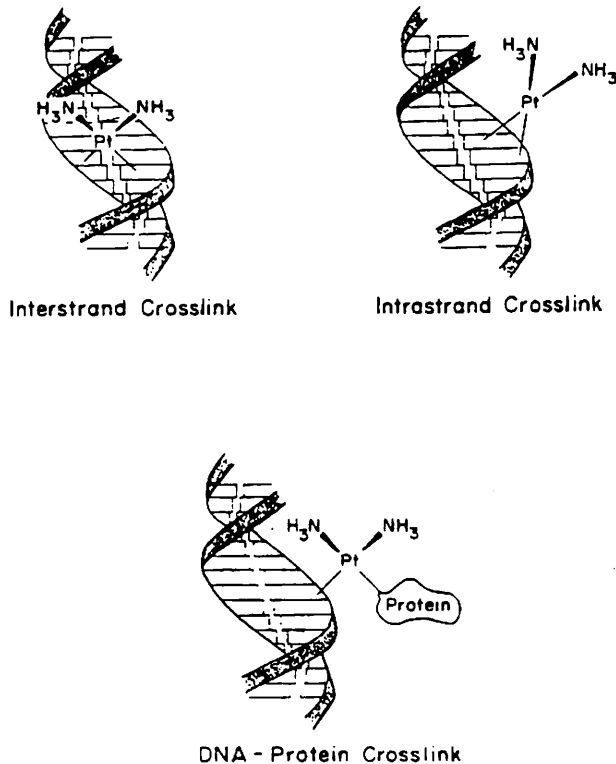
ανάπτυξη στα βακτήρια, β) λυσογένεια, γ) καρκινογένεση, δ) αδρανοποίηση των ιών και ε) απενεργοποίηση των βακτηριοφάγων που περιέχουν DNA και μεταφέρουν DNA [21,22].

Επίσης το cis-DDP παρουσιάζει τις εξής βιοχημικές ιδιότητες που ενισχύουν το παραπάνω συμπέρασμα: α) εκλεκτική αναστολή της σύνθεσης του DNA και όχι της σύνθεσης του RNA ή της πρωτεϊνοσύνθεσης, β) αδρανοποίηση του υποστρώματος του ενζύμου DNA-πολυμεράση, γ) εκλεκτική σύνδεση με το DNA, δ) διαφορετικά σύμπλοκα του λευκοχρύσου συνδέονται με παρόμοιο τρόπο με το cis-DDP και ε) συσχέτιση μεταξύ της αντικαρκινικής δραστηριότητας και της αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριδίων [21,22].

Μελέτες σχετικές με την αλληλεπίδραση Pt-DNA [23-28] οδήγησαν στα εξής συμπεράσματα: Η συμπλοκοποίηση των προϊόντων υδρόλυσης του λευκοχρύσου με το DNA πραγματοποιείται σε δύο βήματα, με σημαντική εκλεκτικότητα ως προς την ακολουθία βάσεων του DNA. Το πρώτο βήμα αφορά στο σχηματισμό μονοδοντικών προϊόντων προσθήκης, κυρίως στη θέση N₇ μιας γουανίνης ή αδενίνης. Στη συνέχεια, τα μονοδοντικά αυτά προϊόντα αντιδρούν περαιτέρω προς σχηματισμό διδοντικών προϊόντων, κυρίως στη θέση N₇ μιας γειτονικής γουανίνης και σε μικρότερη έκταση, μιας γειτονικής αδενίνης. Αν οι συμπλοκοποιημένες νουκλεοβάσεις ανήκουν στον ίδιο κλώνο DNA, σχηματίζεται ένας ενδοκλωνικά διασταυρούμενος δεσμός (ΕΔΔ, Intrastrand Crosslink). Αν ο λευκόχρυσος συνδέεται με δυο βάσεις σε διαφορετικούς κλώνους του DNA, τότε σχηματίζεται ένας διακλωνικά διασταυρούμενος δεσμός (ΔΔΔ, Interstrand Crosslink). Τέλος, υπάρχει και η περίπτωση σχηματισμού διασταυρούμενων δεσμών τύπου DNA-Pt-πρωτεΐνης (Σχήμα 6).

Η σχετική ποσότητα κάθε προϊόντος προσθήκης υπολογίστηκε αρχικά In vitro, επιδρώντας cisplatin σε DNA και στη συνέχεια αποικοδομώντας το DNA ενζυματικά σε νουκλεοτίδια με DNάση I και νουκλεάση P1. Τα προϊόντα διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά και

Όλα αυτά τα στοιχεία οδηγούν σε σοβαρές υποθέσεις για τη σημασία των Pt-DNA προϊόντων προσθήκης γενικά και ειδικότερα των d(GpG) και d(ApG) ενδοκλωνικά διασταυρούμενων δεσμών, ως καθοριστικών παραγόντων για τις αντικαρκινικές ιδιότητες του cisplatin.



Σχήμα 6: Διάφοροι τρόποι σύνδεσης του DNA με cis-DDP ή/και με πρωτεΐνες.

Το cis-DDP αντιδρά επίσης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, και μάλιστα περίπου το 50% του φαρμάκου δεσμεύεται εκεί μια ώρα μετά τη χορήγησή του [33]. Κύρια θέση δέσμευσης του φαρμάκου είναι το θείο της γλουταθειόνης (GSH) [34-36] ή η σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης (Cys). Αυτή η δέσμευση συσχετίστηκε με τη μεγαλύτερη

άλλους τύπους βλάβης του DNA. Ο δεσμός αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να αποτελεί στοιχείο για τη μοριακή εξήγηση της αντικαρκινικής δράσης του cisplatin, αφού η προστασία των 1,2 ενδοκλωνικά διασταυρούμενων συμπλόκων από τις DRPs, με αποτέλεσμα τη μη αναγνώρισή τους από τα κυτταρικά επιδιορθωτικά ένζυμα, θα είχε σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση της παραμόρφωσης του DNA και την εμπόδιση της αντιγραφής του.

Η πρόοδος που έχει γίνει τα τελευταία είκοσι χρόνια στην κατανόηση του μηχανισμού αντικαρκινικής και τοξικής δράσης του cisplatin είναι μεγάλη, αλλά ακόμα απέχουμε πολύ από το να διευκρινίσουμε πλήρως το μηχανισμό αυτό. Η ερευνητική προσπάθεια συνεχίζεται και στα πλαίσια αυτής εντάσσεται και η παρούσα εργασία.

2. ΤΡΙΑΔΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ Pd(II) ΚΑΙ Pt(II) ΜΕ ΑΜΙΝΟΞΕΑ-ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΚΑΙ ΝΟΥΚΛΕΟΒΑΣΕΙΣ-ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ-ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ.

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ νουκλεϊνικών οξέων, πρωτεϊνών και μεταλλικών ιόντων παίζουν σημαντικό ρόλο στη μοριακή βιολογία [46-50]. Η έκφραση της γενετικής πληροφορίας ελέγχεται κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασης ρυθμιστικών πρωτεϊνών με DNA. Μεγάλος αριθμός συμπλόκων πρωτεΐνης-μεταλλικού ιόντος συμμετέχει στη διαμόρφωση στο χώρο (packing), στην επιδιόρθωση, στον ανασυνδυασμό και στην αναπαραγωγή του DNA. Τέτοια σύμπλοκα πραγματοποιούν επίσης σημαντικές λειτουργίες στον τεμαχισμό, στην αποθήκευση και στη μεταφορά του RNA.

Ανάλογα με τη θέση του δεσμού του μετάλλου, τα τριαδικά σύμπλοκα μεταλλικό ιόν-νουκλεϊνικό οξύ-πρωτεΐνη μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους (Σχήμα 7) [51]: Αλληλεπίδραση μεταξύ ενός συμπλόκου μετάλλου-πρωτεΐνης και ενός νουκλεϊνικού οξέος ή νουκλεοτιδίου μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό τριαδικού συμπλόκου τύπου I. Μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να ενωθούν με

των α- και β-φωσφορικών ομάδων του ADP και με τέσσερα μόρια νερού. Η φωσφορική ομάδα σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το τμήμα His122. Η βάση της αδενίνης συνδέεται με το ένζυμο μόνο, όχι πολικά.

Σύμπλοκα τύπου III σχηματίζονται σε πολλά πρωτεολυτικά τμήματα της πολυμεράσης I του DNA των βακτηρίων E.coli, με dTMP και δισθενή μεταλλικά ιόντα, τα οποία ενώνονται συγχρόνως με τις φωσφορικές ομάδες και τα αμινοξέα των τμημάτων πρωτεΐνης [54].

Στα σύμπλοκα τύπου II και III τα μεταλλικά ιόντα αλληλεπιδρούν μόνο με τις φωσφορικές ομάδες των νουκλεοτιδίων. Οι βάσεις δεν συμμετέχουν στο μεταλλικό δεσμό. Όμως, αρκετά μεταλλικά ιόντα όπως Mn(II), Co(II), Cu(II) και Zn(II) μπορούν να σχηματίσουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τα άτομα αζώτου των βάσεων, όπως και με τις φωσφορικές ομάδες [55]. Επίσης, κάποια μεταλλικά ιόντα όπως τα Mn(II) [56] και Zn(II) [57] ενώνονται με τα εξωκυκλικά άτομα οξυγόνου των βάσεων. Τέλος, μερικά μέταλλα μεταπτώσεως όπως το ρουθίνιο [58], το όσμιο [59] και ο υδράργυρος [60] μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα άτομα άνθρακα που συμμετέχουν στους διπλούς δεσμούς των δακτυλίων της θυμίνης, της ουρακίλης και της κυτοσίνης.

Η τεράστια πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων DNA-μετάλλου-πρωτεϊνών οδήγησε σε προσπάθειες σχεδιασμού και μελέτης μικρότερων συμπλόκων ενώσεων ως μοντέλων των συστημάτων αυτών. Σε αυτές τις σύμπλοκες ενώσεις-μοντέλα, οι υποτιθέμενες θέσεις δεσμού του μετάλλου αντιπροσωπεύονται από αμινοξέα ή μικρά πεπτιδία και νουκλεοβάσεις-νουκλεοζίτες-νουκλεοτιδία. Παρά το γεγονός βέβαια, ότι το κύριο κίνητρο για τη μελέτη των συστημάτων αυτών ήταν η ανάγκη να βγάλουμε συμπεράσματα σχετικά με τους τρόπους ένταξης του μεταλλικού ιόντος, σε μερικές περιπτώσεις ήρθαν στο φως ενδιαφέροντα στοιχεία που αφορούσαν τη δομή και τη δραστικότητα των μοντέλων αυτών. Έτσι, στα μικτά σύμπλοκα, εκτός από τη γεωμετρία ένταξης και τις θέσεις δεσμού, ανιχνεύθηκαν και μελετήθηκαν μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών γύρω από

2.1. Τριαδικά σύμπλοκα παλλαδίου

Ο Kozlowski, το 1977 μελέτησε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ την αντίδραση μεταξύ του δυαδικού συμπλόκου $\text{Pd(II)-Glycyl-L-aspartic Acid}$, αδενοσίνης και ATP [67]. Στο αρχικό δυαδικό σύμπλοκο, το διπεπτιδίο δρα σαν τριδοντικός υποκαταστάτης σε περιοχή pH από 4 ως 13, μέσω της τελικής αμινομάδας, του πεπτιδικού αζώτου και της καρβοξυλικής ομάδας. Η αντίδραση αυτού του συμπλόκου με αδενοσίνη εξαρτάται από το pH . Σε περιοχές pH από 4 ως 7, στο διάλυμα ανιχνεύονται τριών ειδών προϊόντα: δύο μονομερή στα οποία το Pd(II) συμπλέκεται με το νουκλεοζίτη μέσω N1 (Pd-N1) και N7 (Pd-N7) αντίστοιχα και ένα διμερές, όπου δύο μόρια $\text{Pd(II)-διπεπτιδίου}$ συμπλέκονται με ένα μόριο αδενοσίνης, μέσω του αζώτου N1 το πρώτο και του N7 το δεύτερο. Από τα δύο μονομερή πιο σταθερό είναι το Pd-N1 , το οποίο συνεχίζει να υπάρχει ακόμα και σε $\text{pH}=11$. Στα διαλύματα που περιέχουν ATP και σε αναλογία συμπλόκου $\text{Pd(II)-διπεπτιδίου: ATP}$ 2:1, ανάλογα με το pH , ανιχνεύονται διαφορετικά προϊόντα. Σε $\text{pH}=5-7$ υπάρχει μόνο το διμερές προϊόν Pd-N1+Pd-N7 . Σε $\text{pH}>7$, ανιχνεύονται επίσης τα μονομερή σύμπλοκα Pd-N1 και Pd-N7 , με σταθερότερο το πρώτο. Σε διαλύματα διαφορετικής ποσοτικής σύστασης, ανιχνεύονται τα ίδια σύμπλοκα, αλλά σε διαφορετικές αναλογίες.

Συνεχίζοντας τις μελέτες του σε τριαδικά συστήματα, ο Kozlowski μελέτησε την αλληλεπίδραση μεταξύ του δυαδικού συμπλόκου Gly-Tyr-Pd(II) και ATP-ADP , με τη βοήθεια φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$ [68]. Το διπεπτιδίο και σε αυτή την περίπτωση δρα ως τριδοντικός υποκαταστάτης. Τα προϊόντα που ανιχνεύτηκαν στο διάλυμα ήταν δύο: ένα μονομερές σε $\text{pH}>6$, όπου το Pd(II) συμπλέκεται μέσω του αζώτου N1 της βάσης του ATP (ή ADP) και ένα διμερές σύμπλοκο, Pd-N1+Pd-N7 , το οποίο σχηματίζεται σε μεγαλύτερη αναλογία και είναι και το πιο σταθερό, ακόμα και σε διάλυμα μοριακής αναλογίας Gly-Tyr-Pd(II) προς νουκλεοτίδιο 1:1. Μονομερές σύμπλοκο τύπου Pd-N7 δεν ανιχνεύτηκε.

έδωσε ως προϊόντα σύμπλοκα του τύπου $\{Pd(\text{pro})(\text{Nuol})\text{Cl}\}$, στα οποία οι νουκλεοζίτες δρουν ως μονοδοντικοί υποκαταστάτες μέσω του αζώτου N7. Η αδενοσίνη (Ado) αντιδρά διαφορετικά, δίνοντας μόνο διπυρηνικά σύμπλοκα του τύπου $\{\text{Cl}(\text{Pro})\text{PdAdoPd}(\text{Pro})\text{Cl}\}$, όπου η αδενοσίνη συνδέει δύο άτομα Pd μέσω των αζώτων N7 και N1. Τέλος, η αντίδραση με κυτιδίνη (Cyd) δίνει το μονομερές σύμπλοκο $\text{Pd}(\text{Pro})(\text{Cyd})\text{Cl}$, όπου η Cyd συνδέεται μέσω του αζώτου N3 [70].

Σε διάλυμα $\text{glyglyOEt-Pd(II)-Cytidine}$, σε αναλογία 1:1:2, φασματοσκοπική (^1H -, ^{13}C -NMR) μελέτη έδειξε πως στο σχηματιζόμενο σύμπλοκο το διπεπτίδιο είναι διδοντικά συμπλοκοποιημένο με το μέταλλο, μέσω της αμινομάδας και του αμιδικού αζώτου και δυο μόρια νουκλεοζίτη συμπλέκονται με το Pd(II) μέσω του αζώτου N3. Ανάλογη είναι και η συμπλοκοποίηση στο σύστημα $\text{Asp-Pd(II)-Cytidine}$, όπου το αμινοξύ συμπλέκεται χηλικά με το μέταλλο, μέσω της αμινομάδας και της καρβοξυλομάδας του και η κυτιδίνη μέσω του αζώτου N3, σε $\text{pH} < 7$. Στο σύστημα αυτό οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις συσώρευσης είναι πιο ισχυρές σε αλκαλικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα η πιο σταθερή δομή, στην οποία το σύμπλοκο είναι "επίπεδο" επικρατεί σε μεγάλες τιμές pH [71].

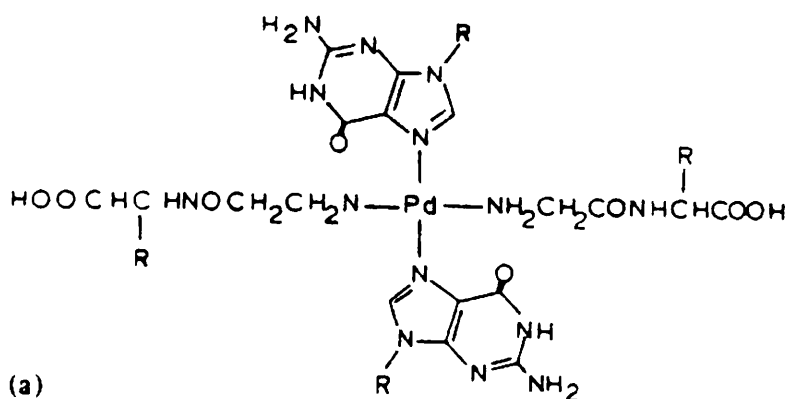
Το σύμπλοκο $\text{Gly-Tyr-Pd(II)-Cytidine}$ μελετήθηκε με φασματοσκοπία ^1H -NMR [71] και η δομή του λύθηκε με τεχνικές περίθλασης ακτίνων-X [72]. Το διπεπτίδιο ενώνεται με το μέταλλο τριδοντικά, μέσω της τελικής αμινομάδας, του αμιδικού αζώτου και της καρβοξυλομάδας του, ενώ η κυτιδίνη συμπλοκοποιείται μέσω του αζώτου N3 του πυριμιδινικού δακτυλίου. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου έδειξε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου της τυροσίνης, της κυτιδίνης και του φουρανοζικού οξυγόνου ($\text{O}(4')\dots\text{Cyd}\dots\text{Tyr}$), με μια μάλλον εκτεταμένη συσώρευση μεταξύ των δακτυλίων της κυτιδίνης και της τυροσίνης (Σχήμα 8). Η διαμόρφωση του σακχάρου του νουκλεοζίτη βρέθηκε να

θέσεις έχουν καταληφθεί από τα τριδοντικά πεπτίδια. Και στα τρία αυτά τριαδικά σύμπλοκα η αναλογία του μονομερούς Pd-N7 προς το μονομερές Pd-N1 είναι περίπου 1:3. Στην περίπτωση όμως των αρωματικών αμινοξέων (Tyr, Phe) παρατηρείται μια χημική μετατόπιση των πρωτονίων της πουρίνης (του H8 όταν αυτή ενώνεται μέσω του N7 και του H2 όταν αυτή ενώνεται μέσω του N1), ενώ αντίθετα τα πρωτόνια του διπεπτιδίου παραμένουν ανεπηρέαστα. Ανάλογες ήταν οι παρατηρήσεις σε τριαδικά συστήματα μεταξύ των συμπλόκων του Pd(II) με τα διπεπτίδια Gly-Phe και Gly-Tyr και τους νουκλεοζίτες/νουκλεοτίδια ινοσίνη, IMP και GMP [75]. Εξηγώντας τις παρατηρήσεις αυτές, προτάθηκε ένα μοντέλο, στο οποίο η αρωματική αλυσίδα του διπεπτιδίου βρίσκεται πάνω από το μέταλλο, σχεδόν παράλληλη με το τετραγωνικό επίπεδο του συμπλόκου και ο νουκλεοζίτης βρίσκεται κάθετα προς αυτό.

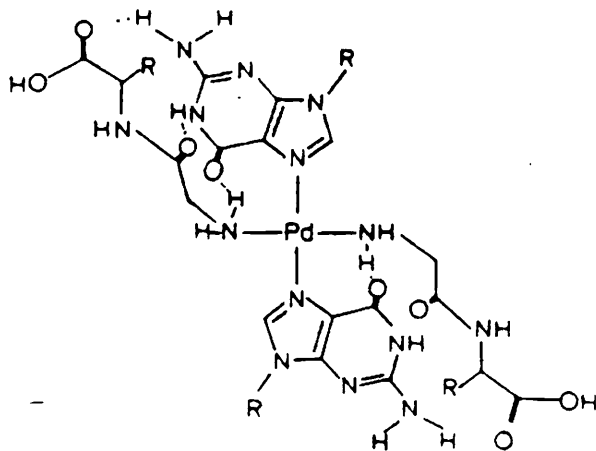
Ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιμιδαζολικού δακτυλίου και του δακτυλίου της πουρίνης παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση μικτών συμπλόκων μεταξύ του συμπλόκου (GlyHisLys)-Pd(II) και 5'-IMP ή 5'-GMP [76]. Στα σύμπλοκα αυτά το νουκλεοτίδιο ενώνεται με το Pd(II) μέσω του αζώτου N7, με 1:2 στοιχειομετρία. Ενδιαφέρον είναι ότι στα δυο τριαδικά σύμπλοκα οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων H8 και H1' (οι οποίες οφείλονται σε δυο αντίθετα φαινόμενα: στην αλληλεπίδραση των αρωματικών δακτυλίων (upfield shift) και στην αλληλεπίδραση της βάσης με το μέταλλο (downfield shift)) παρατηρούνται σε αντίθετες κατευθύνσεις. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στο σύμπλοκο με 5'-IMP ο δακτύλιος της πουρίνης βρίσκεται σε σχεδόν κάθετη θέση σε σχέση με το ιμιδαζολικό επίπεδο (antistacking effect), ενώ στο σύμπλοκο με 5'-GMP, ο αρωματικός δακτύλιος είναι σχεδόν παράλληλος με το επίπεδο του συμπλόκου (stacking effect).

Ο Χατζηλιάδης και η ομάδα του συνέθεσαν τριαδικά σύμπλοκα του τύπου trans-[Pd(dipeptide)₂(nucl)₂]X₂ με τους νουκλεοζίτες (nucl),

σύμπλοκο του Pd(II) με το διπεπτιδίο συνδέεται με τις τέσσερις βάσεις κατά προτίμηση με την ακόλουθη σειρά: Hegua-N7 \approx mcyt-N3 \gg made-N1 > made-N7 > mura-N3. Το σύμπλοκο με την mcyt χαρακτηρίστηκε κρυσταλλογραφικά (Σχήμα 10). Το διπεπτιδίο gly-L-his δρα ως τριδοντικός υποκαταστάτης και εντάσσεται με το Pd(II) μέσω του αποπρωτονιωμένου αμιδικού αζώτου, της αμινομάδας και του αζώτου N3 του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης. Το επίπεδο της βάσης σχηματίζει γωνία 83.1° με το επίπεδο του τετραγωνικού συμπλόκου.



opened



closed

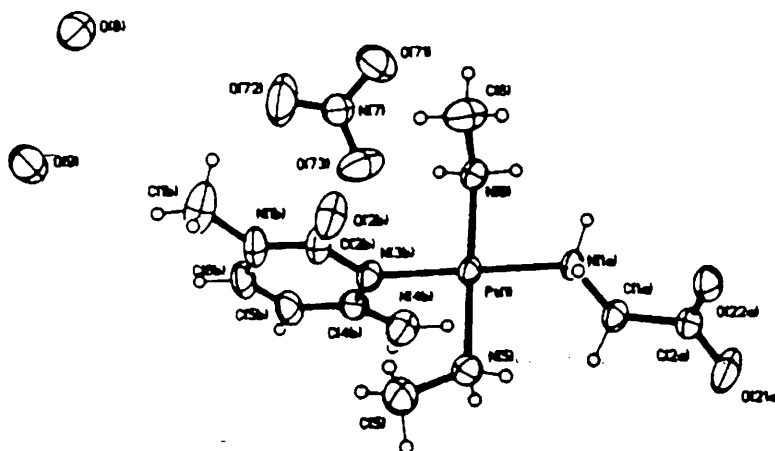
(b)

Σχήμα 9: (α) “Κλειστός” και (β) “Ανοικτός” τύπος ισομερούς του συμπλόκου trans-[(guo)₂Pd(dipeptide)₂]Cl₂

μεθανολικά διαλύματα [82]. Τα προϊόντα ήταν του τύπου cis-[Pt(ino)₂(amac)]Cl, τα οποία στη συνέχεια με επίδραση HCl παρείχαν σύμπλοκα του τύπου cis-[Pt(ino)₂(amach)Cl]Cl. Στα συστήματα αυτά ο νουκλεοζίτης συμπλοκοποιείται μέσω του αζώτου N7, ενώ τα αμινοξέα συμπλοκοποιούνται χηλικά μέσω αμινομάδας και καρβοξυλομάδας, στην πρώτη σειρά και μονοδοντικά μέσω μόνο της αμινομάδας στη δεύτερη σειρά συμπλόκων. Τα φάσματα ¹H-NMR έδειξαν ότι τα πρωτόνια H8 και H2 της βάσης μετατοπίζονται προς υψηλότερες τιμές πεδίου στα τριαδικά σύμπλοκα σε σχέση με τα δυαδικά και τα πρωτόνια των αμινοξέων παρουσιάζουν πολύ μικρή μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές πεδίου ως προς αυτά των ελεύθερων αμινοξέων και σε υψηλότερες τιμές πεδίου ως προς αυτά των δυαδικών συμπλόκων, γεγονός που αποδεικνύει την ύπαρξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων των υποκαταστατών. Και στις δύο σειρές συμπλόκων το τμήμα του σακχάρου του νουκλεοζίτη παρουσιάζει αυξημένη ³E=C₃-endo-anti διαμόρφωση σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη.

Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις υποκαταστατών παρατηρήθηκαν και στα τριαδικά σύμπλοκα του τύπου trans-[(guo)₂Pt(amach₂)]Cl₂, όπου amac=Glycine, L-alanine, L-valine και L-isoleucine, στα οποία ο νουκλεοζίτης συνδέεται με το μέταλλο με το άζωτο N7 και τα αμινοξέα συνδέονται μονοδοντικά, μέσω της αμινομάδας τους [83]. Αυτές ήταν πιο ισχυρές κοντά στα σημεία δεσμού, αντίθετα με ό,τι παρατηρήθηκε για τα cis ανάλογα. Το ποσοστό της αντί διαμόρφωσης του σακχάρου παρουσιάστηκε ιδιαίτερα αυξημένο σε σχέση με αυτό στα δυαδικά ή στα cis συστήματα, γεγονός που σχετίστηκε με την αυξημένη τοξικότητα του trans-DDP συγκριτικά με το cis-DDP.

Τριαδικά συστήματα του Pt(II) με τα αμινοξέα (amac), glycine, L-alanine, L-2-aminobutyric acid, L-valine και L-norvaline και τις νουκλεοβάσεις (nucl), 1-μεθυλοκυτοσίνη και 9-μεθυλογουανίνη, του τύπου cis-[(NH₃)₂Pt(nucl)(amac)]NO₃, απομονώθηκαν σε στερεά φάση και μελετήθηκαν με φασματοσκοπία ¹H-NMR [84]. Οι νουκλεοβάσεις



Σχήμα 12: Κρυσταλλική δομή του μορίου του συμπλόκου trans- $[(\text{CH}_3\text{NH}_2)_2\text{Pt}(1\text{-MeC})(\text{gly-N})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Τα ανάλογα trans-ισομερή του τύπου trans- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{nucl})(\text{amac})]\text{NO}_3$, με nucl τις παραπάνω νουκλεοβάσεις και amac τα παραπάνω αμινοξέα, παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν με σκοπό τη σύγκριση με τα αντίστοιχα cis-ισομερή [86,87]. Βρέθηκε ότι οι αλληλεπιδράσεις υποκαταστατών είναι κατά πολύ ασθενέστερες από αυτές στα cis-ισομερή και είναι περισσότερο πιθανό να είναι διαμοριακές παρά ενδομοριακές. Αυτό ήταν αναμενόμενο λόγω της θέσης των δύο υποκαταστατών στα δύο ισομερή.

Το παραπάνω συμπέρασμα επιβεβαιώθηκε ύστερα από τη σύνθεση και μελέτη τριαδικών συμπλόκων του Pt(II) των τύπων: cis- και trans- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(9\text{-MeG})(\text{dipeptide})]\text{Y}$, όπου dipeptide = glygly, glyala, gly-2aba, glynval και glynleu [88]. Η βάση συνδέεται μέσω του N7, ενώ τα διπεπτιδία⁻ συνδέονται μονοδοντικά μέσω της τελικής αμινομάδας της γλυκίνης. Και σε αυτά τα συστήματα οι αλληλεπιδράσεις υποκαταστατών είναι ασθενέστερες (και μάλλον διαμοριακές) στα trans-ισομερή από ό,τι στα cis-ισομερή.

Προσπάθειες παρασκευής τριαδικών συμπλόκων σύμφωνα με το σχήμα:

$\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{amac})]\text{NO}_3 + \text{nucleobase} \rightarrow \text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{nucleobase})(\text{amac})]\text{NO}_3$,
όπου nucl = 9-MeG, 9-MeA και amac = αμινοξέα συνδεόμενα χηλικά με

ισομερές με τα μονονουκλεοτίδια και τα ιμιδαζολικά σύμπλοκα αντιδρούν ταχύτερα από τα ιστιδινικά. Επίσης, επιπλέον μελέτες στην κινητική αντιδράσεων των παραπάνω αμινοξέων με τα σύμπλοκα *cis*- και *trans*-[Pt(NH₃)₂(G^{uo}-N7)Cl]⁺, έδειξαν ότι ο σχηματισμός τριαδικού συμπλόκου με το 1-μεθυλιμιδαζόλιο πραγματοποιείται πιο αργά από ό,τι στο προηγούμενο σύστημα, ενώ τα N_α προστατευμένα αμινοξέα ιστιδίνη και μεθειονίνη αντιδρούν ακόμα πιο αργά και οδηγούν στο σχηματισμό μίγματος προϊόντων. Τα συμπεράσματα αυτά οδήγησαν στην υπόθεση ότι ο πιο γρήγορος μηχανισμός σχηματισμού διασταυρούμενων δεσμών *in vitro* και *in vivo* ίσως, πρέπει να είναι αυτός κατά τον οποίο ο Pt(II) συνδέεται πρώτα με το αμινοξύ και στη συνέχεια με το νουκλεοτίδιο.

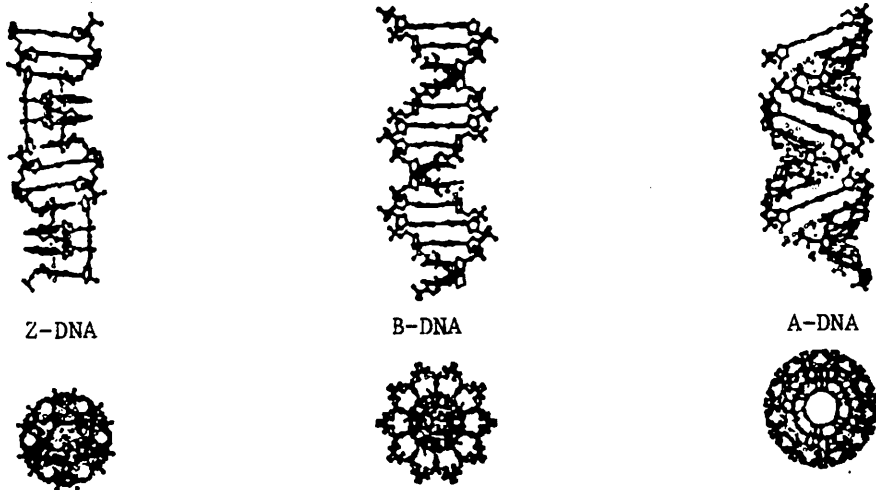
Η τελευταία κρυσταλλική δομή τριαδικού συμπλόκου του Pt(II) που δημοσιεύτηκε μέχρι σήμερα είναι του *cis*-[(NH₃)₂Pt(glyH-N)(1-MeU-N3)]ClO₄·H₂O (Σχήμα 13) [93]. Ο νουκλεοζίτης συνδέεται με το μέταλλο μέσω του αζώτου N3, ενώ η γλυκίνη μέσω της αμινομάδας της. Το σύμπλοκο έχει επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία και το επίπεδο της νουκλεοβάσης βρίσκεται σε γωνία 76.1° σε σχέση με το επίπεδο συναρμογής του Pt(II). Η δομή σταθεροποιείται με τον εκτεταμένο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των δύο μορίων αμμωνίας του συμπλόκου του Pt, της αμινομάδας και της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος, των εξωκυκλικών ατόμων οξυγόνου της νουκλεοβάσης, των μορίων νερού και των υπερχλωρικών ατόμων οξυγόνου. Διαμοριακές αλληλεπιδράσεις συσσώρευσης (*stacking interactions*) παρατηρούνται μεταξύ των μορίων του συμπλόκου, οι οποίες ενισχύονται μέσω των δεσμών υδρογόνου.

17). Η μεγάλη αύλακα είναι αυτή η οποία μεταφέρει το μήνυμα της αλληλουχίας των βάσεων του DNA και θεωρείται η κύρια θέση αναγνώρισης από τις πρωτεΐνες [95].

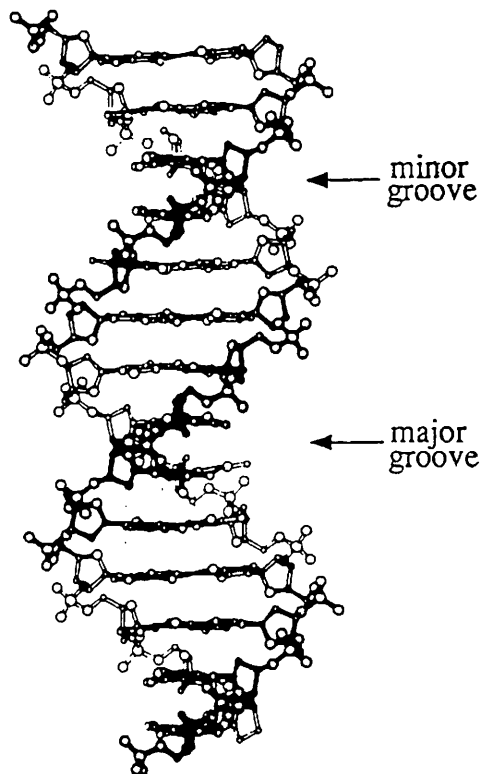
Το 1979 ο A. H.-J. Wang και οι συνεργάτες του μελέτησαν την κρυσταλλική δομή του εξανουκλεοτιδίου CGCGCG [96] και λίγους μήνες αργότερα ο H. R. Drew προσδιόρισε τη δομή του τετραμερούς CGCG [97]. Και τα δύο μόρια βρέθηκε να μην ανήκουν σε καμιά από τις δύο μορφές A-DNA ή B-DNA. Αντίθετα, ήταν αριστερόστροφες έλικες, με μια ραχοκοκκαλιά τύπου ζικ-ζακ. Η μορφή αυτή του DNA ονομάστηκε Z-DNA.

Οι επόμενες κρυσταλλικές δομές πολυνουκλεοτιδίων έδωσαν μορφές A- και B-DNA: Η δομή των δωδεκαμερών d(CGCGAATTCGCG) και d(CGCTCTAGAGCG) και του οκταμερούς d(CGCTAGCG) έδειξε ότι αυτά ανήκουν στη μορφή B-DNA [98,99], ενώ αυτή των ολιγομερών d(CCGC), d(GGCCGGCC) και d(GGTATACC) [100] έδειξε ότι αντιπροσωπεύουν τη μορφή A-DNA.

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη αποδοτικών και γρήγορων μεθόδων σύνθεσης ολιγονουκλεοτιδίων [101] μας έδωσε τη δυνατότητα να σχεδιάσουμε και να παρασκευάσουμε μια μεγάλη ποικιλία αυτών με μεγάλη καθαρότητα και να μελετήσουμε την επίδρασή τους με διάφορα μεταλλικά ιόντα.



Σχήμα 16: Οι A-DNA και B-DNA έλικες.



Σχήμα 17: Η μεγάλη και η μικρή αύλακα των ζευγών βάσεων.

μετατοπίζονται σε χαμηλότερες τιμές pH, λόγω της πλατινίωσης. Μετρήσεις με μεταβαλλόμενη θερμοκρασία μας δίνουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με δια- και ενδο-μοριακές αλληλεπιδράσεις (συσσώρευσης και συσχέτισης ζεύγους βάσεων). Οι σταθερές σύζευξης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθορίσουμε τη διαμόρφωση του δακτυλίου του σακχάρου και δεδομένα NOE και χρόνων αποδιέγερσης T_1 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των διαμορφώσεων γύρω από το γλυκοζιτικό δεσμό.

3.1.1. Φασματοσκοπία συσχέτισης δύο διαστάσεων (2D-Correlation Spectroscopy, COSY).

Οι ταυτοποιήσεις των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων ^1H για κάθε νουκλεοτίδιο βασίζονται στις αμοιβαίες συζεύξεις (J), οι οποίες πραγματοποιούνται μέσω των χημικών δεσμών. Σε ένα δύο διαστάσεων φάσμα συσχέτισης (COSY, DQF-COSY), οι συζεύξεις αυτές δηλώνονται σαν ζεύγη από σήματα, τα οποία βρίσκονται συμμετρικά ως προς τη διαγώνιο του φάσματος [103-106]. Η μελέτη του δικτύου των σημάτων αυτών οδηγεί στην ταυτοποίηση των συχνοτήτων συντονισμού των πρωτονίων που ανήκουν σε κάθε σάκχαρο δεοξυριβόζης. Το μέγεθος των σταθερών J-σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων του σακχάρου εξαρτάται από την κατάλληλη δίεδρη γωνία, και συνεπώς από τη διαμόρφωση του πενταμελούς δακτυλίου. Έτσι, μέσω των εξισώσεων Karplus [107], οι σταθερές σύζευξης J μπορούν να μας δώσουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη μορφολογία του DNA και με κάθε είδους τοπικές μεταβολές στη διαμόρφωσή του.

3.1.2. Φασματοσκοπία δύο διαστάσεων NOE (NOESY)

Η τεχνική αυτή μας βοηθάει ώστε να συσχετίσουμε κάθε πρωτόνιο ριβόζης και νουκλεοβάσης με το νουκλεοτίδιο του DNA-

του DNA σε επίπεδα φυσιολογικής περιεκτικότητας σε πυρήνες ^{13}C [120] και σε πυρήνες ^{15}N [113,121,122]. Μεγάλο εύρος δυνατοτήτων υπάρχει για τον 100% σε περιεκτικότητα πυρήνα ^{31}P του DNA [123,124].

3.1.5. Άλλες μέθοδοι (UV, CD, gel electrophoresis, X-ray)

Στην στερεά φάση η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ είναι η καλύτερη μέθοδος, που χρησιμοποιείται για τη μελέτη των θέσεων δεσμού και τον καθορισμό της δομής συμπλόκων μετάλλων-συστατικών DNA. Οι δομές συμπλόκων του *cis*-Pt με δι- και τρι-νουκλεοτίδια έχουν μελετηθεί με αυτή τη μέθοδο [125,126]. Η δυσκολία όμως να πάρουμε κρυστάλλους Pt/DNA και το πλεονέκτημα της μελέτης βιολογικών ενεργών μορίων, ευνοεί τις προσπάθειες για μελέτες σε διάλυμα.

Σε διάλυμα, διάφορες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταλλικών ιόντων-DNA, εκτός από τις τεχνικές NMR. Οι μελέτες κινητικότητας ηλεκτροφόρησης πηκτής δείχνουν ότι το cisplatin προκαλεί παραμορφώσεις (kinks, bending, unwinding) στο DNA [127,129]. Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD) συμβάλλει στη διάκριση μεταξύ διαφόρων διαμορφομερών του DNA, π.χ. B, A ή Z-DNA [129,130]. Η φασματοσκοπία υπεριώδους (UV) χρησιμοποιείται για τη μελέτη της συμπεριφοράς τήξης και αποσύνθεσης του DNA και των συμπλόκων μετάλλου-DNA [131,132]. Όμως, οι φασματοσκοπικές τεχνικές CD και UV δεν παρέχουν πληροφορίες σε ατομικό επίπεδο σχετικά με τις θέσεις δεσμού. Γι' αυτό, η φασματοσκοπία NMR, συνδυασμένη με υπολογισμούς μοριακής δυναμικής, είναι η πιο χρήσιμη μέθοδος για τον καθορισμό της δομής μικρού και μεσαίου μεγέθους βιομορίων σε διάλυμα.

αποτέλεσμα το δινουκλεοτίδιο να γίνεται αριστερόστροφο, όπως επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα κυκλικού διχρωισμού. Φαίνεται ότι ο σχηματισμός χηλικού συμπλόκου μεταξύ μιας γουανίνης και της γειτονικής της κυτοσίνης μπορεί να συμβεί μόνο σε αριστερόστροφα τμήματα ενός πολυνουκλεοτιδίου. Στην αντίδραση με ArC παρατηρείται επίσης μεγαλύτερη προτίμηση σχηματισμού δεσμού με την κυτοσίνη. Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη της αντίδρασης μεταξύ *cis*-DDP και GrC, όπου η κυτοσίνη δε συμμετείχε σε δεσμό με τον Pt(II) [135].

Μια ακόμη μελέτη που αφορά στην αντίδραση των CrG και d(pCrG) με το *cis*-DDP ή το εφυδατωμένο παράγωγό του *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂](NO₃)₂ σε αναλογία 1:1 και σε pH=4, έδειξε ότι το προϊόν που σχηματίζεται είναι το χηλικό CN3-GN7, το οποίο υπάρχει σε δύο ισομερείς μορφές, C(anti)-G(anti) και C(syn)-G(anti). Οι μορφές αυτές είναι στην ουσία ισομερή διαμόρφωσης γύρω από το δεσμό Pt-N3 και γύρω από τους γλυκοζιτικούς δεσμούς της κυτιδίνης και αντιπροσωπεύουν αριστερόστροφες και δεξιόστροφες διευθετήσεις ψευδοέλικας αντίστοιχα. Στο σύμπλοκο CrG-*cis*-Pt, η ριβόζη της κυτιδίνης έχει διαμόρφωση κυρίως N (C3'-endo), ενώ η ριβόζη της γουανοσίνης διαμόρφωση S (C2'-endo). Στο σύμπλοκο d(pCrG)-*cis*-Pt, οι διαμορφώσεις των 5'- και 3'- σακχάρων είναι αντίστοιχα N και S [136].

Τα συμπεράσματα αυτά τα σχετικά με την αλληλεπίδραση του GrG με *cis*-Pt(I) επιβεβαιώθηκαν και από τη φασματοσκοπική μελέτη της αντίδρασης των δινουκλεοτιδίων GrG, d(GrG) και d(pGrG) με *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂](NO₃)₂, σε αναλογία 1:1 [137]. Σε όλες τις περιπτώσεις σχηματίζεται ένα μόνο προϊόν, στο οποίο το μέταλλο συνδέεται χηλικά N(7)-N(7) με τις βάσεις, οι οποίες έχουν διαμόρφωση anti-anti. Τέτοιου είδους συμπλοκοποίηση και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται να γίνεται ύστερα από τοπική παραμόρφωση του DNA.

προϊόντος Pt-ApG στο πλατινωμένο DNA, μελετήθηκε η αντίδραση μεταξύ των ριβοδινουκλεοτιδίων r(ApG) και r(GpA) με το cisplatin ή το εφυδατωμένο παράγωγό του, σε αναλογία 1:1 και σε pH=5.5, με τεχνικές φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης, CD και $^1\text{H-NMR}$ [140]. Το ApG δίνει μόνο ένα προϊόν (95%), το AN7-GN7 χηλικό, με anti-anti διαμόρφωση βάσεων, ενώ το GpA δίνει τέσσερα ισομερή προϊόντα: το χηλικό GN7-AN1 (32%) και τρία GN7-AN7 χηλικά, με διαμορφώσεις βάσεων GsynAsyn (5%), GantiAanti (42%) και GantiAsyn (21%). Και τα δύο δινουκλεοτίδια αντιδρούν αρχικά με το cis-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂](NO₃) για να δώσουν ένα ενδιάμεσο προϊόν με σύνδεση μέσω του αζώτου GN7 (πρώτο βήμα) και στη συνέχεια σχηματίζεται το τελικό χηλικό σύμπλοκο (δεύτερο βήμα). Κινητικές μελέτες έδειξαν ότι στο πρώτο βήμα το ApG αντιδρά με ταχύτητα διπλάσια του GpA, ενώ για το δεύτερο βήμα το ApG αντιδρά τρεις φορές πιο αργά από το GpA. Για το πρώτο βήμα, αυτό αποδίδεται στη σταθεροποίηση που επιφέρει ο δεσμός υδρογόνου ή η επίδραση φορτίων μεταξύ του θετικά φορτισμένου πλατινωμένου τμήματος και της αρνητικά φορτισμένης 5'-φωσφοδιεστερικής ομάδας, με αποτέλεσμα να ευνοείται η πλατινίωση στη θέση N7 της 3'-πουρίνης. Για το δεύτερο βήμα, του σχηματισμού του χηλικού, στο δεσμό υδρογόνου στο ενδιάμεσο προϊόν μεταξύ της φωσφοδιεστερικής γέφυρας και μιας αμμωνίας ή ενός μορίου νερού του συμπλόκου του λευκοχρύσου. Η τελευταία αυτή αλληλεπίδραση εμποδίζει την περιστροφή της γουανίνης και ευνοεί τη συσσώρευση των βάσεων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μόνο του χηλικού AN7-GN7 anti-anti προϊόντος.

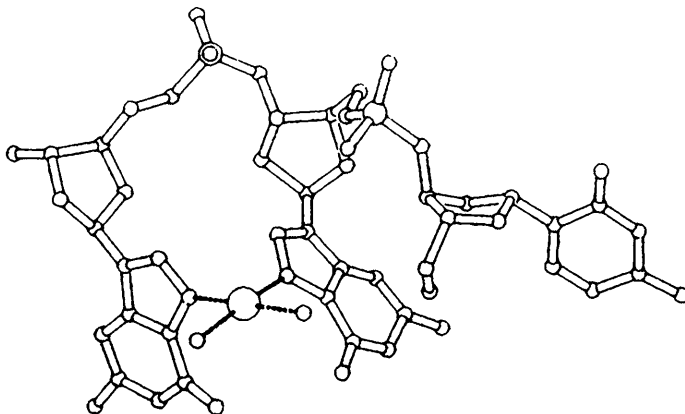
Η αντίδραση υποκατεστημένων αναλόγων του cisplatin με r(ApG) έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ή δύο AN7-GN7 προϊόντων προσθήκης, ανάλογα με τη συμμετρία των ενώσεων του λευκοχρύσου [141]. Οι σχηματιζόμενες δομές, οι οποίες διαφέρουν λίγο από αυτή του cisplatin, μελετήθηκαν με φασματοσκοπία NMR και CD. Οι διαφορετικοί υποκαταστάτες έχουν σημαντική επίδραση στην ταχύτητα της

διπυρηνικά σύμπλοκα του λευκοχρύσου έχουν ενδιαφέρον γιατί παρουσιάζουν υψηλή δραστικότητα εναντίον καρκινικών κυτάρων ανθεκτικών στο cisplatin, τόσο in vitro όσο και in vivo [144]. Η ταχύτητα του πρώτου βήματος της αντίδρασης, της αρχικής σύνδεσης δηλαδή με την 5'-G ή την 3'-G, είναι μεγάλη, ενώ αυτή ελαττώνεται στο δεύτερο βήμα, στο σχηματισμό δηλαδή του δακτυλίου του μακροχηλικού συμπλόκου, μέσω των αζώτων N7(1) και N7(2). Σύμπλοκα με μακριά διαμινική αλυσίδα αντιδρούν πιο γρήγορα προς σχηματισμό χηλικού. Η κύρια διαφορά μεταξύ του προϊόντος προσθήκης του διπυρηνικού συμπλόκου και του προϊόντος προσθήκης του cis-DDP, είναι ότι στο πρώτο ο προσανατολισμός γύρω από το γλυκοζιτικό δεσμό είναι syn για την G(2), ενώ για την G(1) παραμένει anti. Επίσης το ποσοστό της N διαμόρφωσης για τις βάσεις αυξάνει σε σχέση με το μη πλατινωμένο DNA. Τα διπυρηνικά σύμπλοκα του λευκοχρύσου προκαλούν μια "ευλύγιστη" παραμόρφωση στο DNA σε αντίθεση με την "άκαμπτη" παραμόρφωση κατευθυνόμενη προς την μεγάλη αύλακα που προκαλεί το cis-DDP. Ίσως η διαφορετική δραστικότητα των διπυρηνικών συμπλόκων σε σχέση με αυτή του cis-DDP να οφείλεται στην διαφορετική αναγνώριση των παραπάνω παραμορφώσεων από τις πρωτεΐνες επιδιόρθωσης.

3.2.2. Τρινουκλεοτίδια

Κατά τη δεκαετία του '80 και αργότερα ο Reedijk και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν αρκετές μελέτες σχετικές με την αλληλεπίδραση cisplatin με τρινουκλεοτίδια. Η αντίδραση του cisplatin με το τρινουκλεοτίδιο d(GpCpG) οδηγεί στο σχηματισμό του χηλικού προϊόντος cis-Pt(NH₃)₂{d(GpCpG)}, όπου ο λευκόχρυσος συνδέεται με τα άζωτα N7 των δύο γουανινών (1) και (3) [145]. Φασματοσκοπική

περίθλασης ακτίνων-Χ [126]. Στην πραγματικότητα αυτό είναι το μεγαλύτερο ολιγονουκλεοτίδιο που κρυσταλλώθηκε μέχρι σήμερα σε σύμπλοκό του με το cisplatin.



Σχήμα 20: Κρυσταλλική δομή του μορίου του συμπλόκου cis-[(NH₃)₂Pt{d(CpGpG)-N7(2),N7(3)}].

Στην αντίδραση μεταξύ του τρινουκλεοτιδίου d(GpTpG) και των δύο ισομερών cis- και trans-Pt(NH₃)₂Cl, το κύριο προϊόν ήταν το χηλικό GN7(1)-GN7(3), αφού το ¹H-NMR φάσμα του προϊόντος έδειχνε μετατόπιση των πρωτονίων H8 των γουανινών σε χαμηλότερες τιμές πεδίου καθώς και μη πρωτονίωση του αζώτου N7, με μεταβολή του pH [149]. Κινητικές μελέτες στην αντίδραση του cis-ισομερούς με το ίδιο τρινουκλεοτίδιο έδειξαν ότι το μέταλλο αρχικά αντιδρά σχεδόν αποκλειστικά με το GN7(3) και στη συνέχεια με το GN7(1), σχηματίζοντας το χηλικό δακτύλιο [150]. (Μια ακόμα κινητική μελέτη στην αντίδραση του εφυδατωμένου cis-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂]²⁺, έδειξε ότι αν και οι δύο γουανίνες παρουσιάζουν την ίδια δραστηριότητα στη δημιουργία μονοδοντικού ενδιάμεσου προϊόντος, ο σχηματισμός χηλικού ευνοείται κινητικά για το ενδιάμεσο με την 3'-γουανίνη [151]). Η ενδιάμεση βάση της θυμίνης T(2) δε συμμετέχει στη συσσώρευση των

3'-αδενίνης ελαττώνονται κατά την πλατινίωση, ενώ οι αλληλεπιδράσεις συσσωρεύσης μεταξύ της γουανίνης και της 5'-αδενίνης παραμένουν ανεπηρέαστες. Επίσης η πλατινίωση προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση και των τριών μονονουκλεοτιδίων, από 80-100% S η διαμόρφωσή τους γίνεται 50% N/S. Η αλλαγή αυτή στη διαμόρφωση των σακχάρων φαίνεται να είναι η αιτία για τον πιο εύκολο σχηματισμό του δεσμού του λευκοχρύσου με το 5'-άκρο του μορίου, με αποτέλεσμα τον τελικό σχηματισμό του AG χηλικού και όχι του GA. Στη στερεά φάση οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις είναι περιορισμένες. Μόνο ασθενείς δεσμοί υδρογόνου παρατηρούνται μεταξύ μιας αμμωνίας και ενός φωσφορικού οξυγόνου ή του ατόμου O6 της γουανίνης. Οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις είναι πιο ισχυρές, με αποτέλεσμα να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των μοριακών δομών και διαμορφώσεων μεταξύ στερεάς φάσης και δαλύματος.

Τα προϊόντα της αντίδρασης του cisplatin με το τρινουκλεοτίδιο d(GpGpG), όπως ανιχνεύτηκαν με φασματοσκοπία NMR, ήταν δύο: ένα κύριο προϊόν του τύπου cis-Pt(NH₃)₂[d(GpGpG)-N7(1),N7(2)] και ένα σε πολύ μικρότερη αναλογία, του τύπου cis-Pt(NH₃)₂[d(GpGpG)-N7(2),N7(3)]. Δεν βρέθηκαν ενδείξεις για σχηματισμό του GNG προϊόντος [156]. Όπως και σε άλλες μελέτες [29] επιβεβαιώθηκε και στη συγκεκριμένη, η προτίμηση του cisplatin για ακολουθίες GG.

3.2.3. Ολιγονουκλεοτίδια

Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει από ερευνητικές ομάδες σε όλο τον κόσμο να διευκρινιστεί ο μηχανισμός σύνδεσης του cisplatin με το DNA, μελετώντας την αντίδραση του φαρμάκου με ολιγο/πολυνουκλεοτίδια [25,27,157,158]. Η συνηθισμένη διαδικασία αποτελείται από πλατινίωση του μονόκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου, διαχωρισμό των διαφορετικών προϊόντων με υγρή χρωματογραφία HPLC, και στη συνέχεια σύζευξη (annealing) του συμπλόκου με το μη

ήταν η παρατήρηση του Lippard και της ομάδας του, κατά την αντίδραση του cisplatin με το αυτοσυμπληρωματικό εξανουκλεοτίδιο d(AGGCCT)₂ όπου ακόμα και υπό συνθήκες ευνοϊκές για την ύπαρξη διπλής έλικας το σχηματιζόμενο G(2)N7-G(3)N7 χηλικό προϊόν είναι μονόκλωνο [162]. Αντίθετα ο Chottard και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι ένα d(GpG) πλατινωμένο ολιγονουκλεοτίδιο μπορεί να σχηματίσει διπλή έλικα με το συμπληρωματικό κλώνο [163]. Ως παράδειγμα χρησιμοποίησαν το οκτανουκλεοτίδιο d(GATCCGGC), το οποίο δίνει με το cisplatin το σύμπλοκο cis-[Pt(NH₃)₂d(GATCCGGC)-N7(6),N7(7)] και το οποίο στη συνέχεια σχηματίζει διπλή έλικα με το συμπληρωματικό κλώνο d(GCCGθATCGC). Η θερμοκρασία τήξης της έλικας είναι 30° και υπάρχουν οχτώ ίμινο-πρωτόνια που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των δύο κλώνων και τα οποία παρατηρούνται στο φάσμα της ένωσης σε νερό.

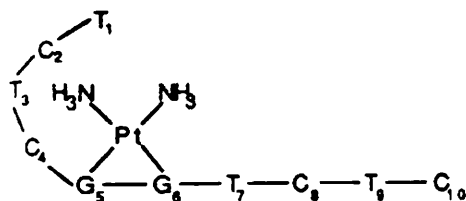
Ο σχηματισμός 1,2 και 1,3 ενδοκλωνικά διασταυρούμενων δεσμών επιβεβαιώθηκε κατά την αντίδραση του cisplatin με τα ολιγονουκλεοτίδια d(CpCpGpG), d(GpCpG), d(pCpGpCpG), d(pGpCpGpC) και d(pCpGpCpG) [164] και κατά την αντίδραση του [Pt(dien)Cl]Cl με τα d(CpCpGpG) και d(GpCpG). Τα προϊόντα των αντιδράσεων μελετήθηκαν με φασματοσκοπία NMR συναρτήσεως του pH, κυκλικό διχρωϊσμό (CD) και ανάλυση λευκοχρύσου. Όλα τα προϊόντα της αντίδρασης του cisplatin ήταν χηλικά, μέσω των αζώτων N7 δύο γουανινών του ίδιου ολιγονουκλεοτιδίου: d(GpG)· cisPt ή d(GpCpG)· cisPt, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τη μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων H8 σε μικρότερες τιμές πεδίου. Στα 1,3 χηλικά, η ενδιάμεση κυτιδίνη δε συμμετέχει σε δεσμό και βρίσκεται εκτός της διευθέτησης συσσώρευσης των βάσεων, με αποτέλεσμα την παρατήρηση στο φάσμα NMR μετατόπισης των πρωτονίων H6 και H5 σε μικρότερες τιμές πεδίου. Στην περίπτωση του [Pt(dien)Cl]Cl σχηματίζονται δύο προϊόντα προσθήκης : αυτό με ένα άτομο Pt ανά μόριο και αυτό με δύο άτομα Pt ανά μόριο. Το φάσμα

ζεύγους G-C. Η θερμοκρασία τήξης της έλικας ελαττώνεται κατά 26°C. Η παραμόρφωση αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που προκαλεί το cisplatin, όταν συνδέεται με δύο γειτονικές βάσεις γουανίνης, γεγονός που υπογραμμίζει τη σπουδαιότητα αυτού του είδους δεσμού που δεν απαντά συχνά στο DNA [167].

Με ανάλογο τρόπο σχηματίζεται και το χηλικό σύμπλοκο διπλής έλικας cis-[Pt(NH₃)₂{d(GCCGGATCGC)-N7(4),N7(5)}]-d(GCGATCCGG C), για το οποίο υπολογίστηκε σχετικά υψηλή θερμοκρασία τήξης (T_m=49°C) σε σχέση με τη μη πλατινωμένη διπλή έλικα (T_m=58°C) [168]. Προηγούμενα δεδομένα 2D NOESY έδειξαν ότι το χηλικό έχει τυπική δομή “κεφαλή-προς-κεφαλή (head-to-head) με G(5′)C3′-endo και G(3′)C2′-endo διαμόρφωση [169]. Η πλατινωμένη διπλή έλικα είναι τύπου B-DNA και ο σχηματισμός του χηλικού δεν επηρεάζει τα ζεύγη βάσεων στο 3′-άκρο ως προς τον πλατινωμένο κλώνο. Παρόλα αυτά, η συσσώρευση μερικών βάσεων επηρεάζεται και η τοπική παραμόρφωση της έλικας (kinked structure) διευκολύνει την ανταλλαγή των πρωτονίων N1-H των δύο συναρμοσμένων γουανινών με μόρια νερού.

Τα ³¹P και ¹H-NMR φάσματα του d(TGGT) μελετήθηκαν κατά το σχηματισμό προϊόντων προσθήκης με σύμπλοκα του τύπου cis-PtA₂Cl₂, όπου A₂=en (αιθυλενοδιαμίνη), (NH₃)₂, (MeNH₂)₂, tn (1,3-προπανοδιαμίνη), Me₂tn (2,2-διμεθυλ-1,3-προπανοδιαμίνη) και N,N-Me₂en (N,N-διμεθυλαιθυλενοδιαμίνη) [170]. Επιπλέον, περιορισμένες φασματοσκοπικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν και για τα ολιγονουκλεοτίδια d(TTGG), d(GGTT) και d(pGGTT). Σε όλους τους συνδυασμούς που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε μια μετατόπιση του ³¹P σήματος σε μικρότερες τιμές πεδίου. Σε όλες τις περιπτώσεις το προϊόν ήταν το GN7-GN7 χηλικό και για το d(TGGT)Pt(en), μελέτη 2D NOE, έδειξε ότι α) η 5′-G έχει διαμόρφωση N (C3′-endo) και μάλιστα anti, ενώ οι άλλες βάσεις διατηρούν την S-τύπου διαμόρφωση, β) οι δύο γουανίνες έχουν διευθέτηση κεφαλή-προς-κεφαλή, γ) οι βάσεις 3′-G και 3′-T έχουν διευθέτηση συσσώρευσης μεταξύ τους και δ) η διευθέτηση

παραπάνω πειράματα συνδυασμένα με φασματοσκοπία ^1H - και ^{195}Pt -NMR, μετρήσεις UV και πειράματα ηλεκτροφόρησης, οδήγησαν στην πρόταση του μοντέλου I (Σχήμα 21) για το προϊόν προσθήκης του λευκοχρύσου με το μονόκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο.

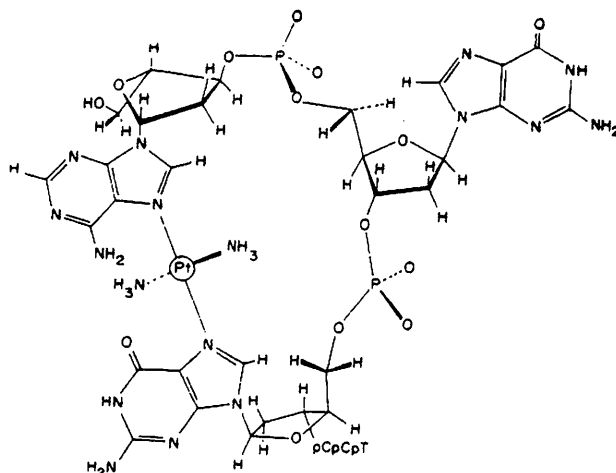


Model I

Σχήμα 21: Προτεινόμενο μοντέλο του προϊόντος αλληλεπίδρασης cis-DDP με το ολιγονουκλεοτίδιο d(TCTCGGTCTC).

Η αντίδραση μεταξύ του συμπλόκου $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_3]\text{Cl}$ και του εννεανουκλεοτιδίου d(TCTCGTCTC) οδηγεί στο σχηματισμό του μονοδοντικού προϊόντος προσθήκης, μέσω του αζώτου N7 της γουανίνης. Κατά την προσθήκη του συμπληρωματικού κλώνου σχηματίζεται το προϊόν της διπλής έλικας, όπως φαίνεται από την ύπαρξη των σημάτων των ίμινο-πρωτονίων στο NMR φάσμα σε H_2O , σε χαμηλές θερμοκρασίες. Φασματοσκοπία ^1H - και ^{31}P -NMR, CD και UV, χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της δομής του προϊόντος και για τη σύγκρισή του με το χηλικό παράγωγο του διδοντικού cisplatin [131]. Αν και η μονοδοντική ένταξη του μετάλλου προκαλεί μια τοπική παραμόρφωση στη δομή της έλικας, καθώς και μείωση της θερμοκρασίας τήξης της, σύμφωνα και με προηγούμενες παρατηρήσεις [129], αναλόγως με τις αλλαγές που επιφέρει το cisplatin, δεν προκαλεί στροφή (kink) της έλικας, δομικό χαρακτηριστικό που απαντά σε αλληλεπιδράσεις του DNA με σύμπλοκα λευκοχρύσου αντικαρκινικής δράσης [166]. Ίσως αυτός είναι ένας από τους λόγους, στους οποίους οφείλεται η μη αντικαρκινική δράση των μονοδοντικών συμπλόκων του λευκοχρύσου.

Ο Lippard και οι συνεργάτες του μελέτησαν αντιδράσεις του ανενεργού trans- $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ με διάφορα ολιγονουκλεοτίδια



Σχήμα 22: Σχηματική παράσταση του μορίου του trans-[Pt(NH₃)₂{d(ApGpGpCpCpT)-N7-A(1),N7-G(3)}].

Πολύ ενδιαφέρουσα είναι η εφαρμογή μεθόδων ετεροπυρηνικής ¹³C-¹H NMR συσχέτισης, πολυκβαντικής (HMQC) και πολυδεσμικής (HMBC) στο σύστημα [d(TGGT)-N7,N7]-Pt(en) [178] (Σχήμα 23). Παρατηρήθηκαν ενδομοριακές ετεροπυρηνικές συζεύξεις μεταξύ των πρωτονίων H1' και των ατόμων άνθρακα C2 και C6 πυριμιδινικών βάσεων και μεταξύ του πρωτονίου H6 και των ανθράκων C1' της δεοξυριβόζης, αν και συζεύξεις που παρατηρούνται στο μη πλατινωμένο ολιγονουκλεοτίδιο, λείπουν από το φάσμα του πλατινωμένου, ενδεικτικό της δομικής παραμόρφωσης του συστήματος. Η μέθοδος δείχνει να είναι χρήσιμη για τη διευκρίνηση των θέσεων πλατινίωσης. Επίσης, η μετατόπιση του σήματος του πυρήνα C3' της γουοσίνης G2 σε μεγαλύτερες τιμές πεδίου κατά 6.6 ppm δείχνει μια μεταβολή της διαμόρφωσης του σακχάρου της από S σε N.

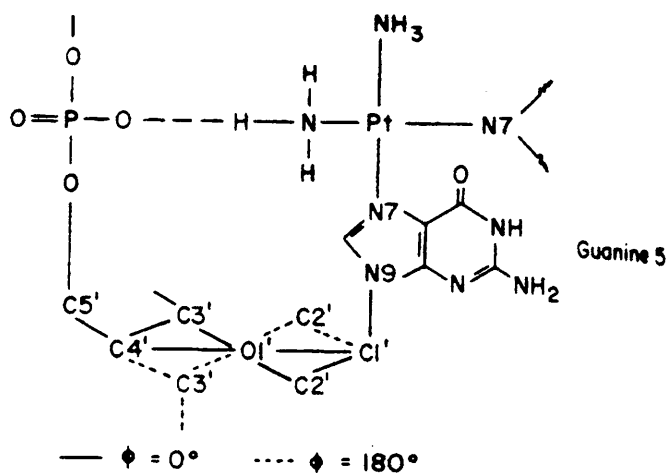
Μια ακόμη εφαρμογή της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στη μελέτη της αντίδρασης του cisplatin με ολιγονουκλεοτίδια εφαρμόστηκε πρόσφατα στο σύστημα cisplatin-d(ACATGGTACA) και cisplatin-d(ACATGGTACA).d(TGACCATGT) [179]. Φασματοσκοπία 2D [¹H, ¹⁵N] HSQC χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την έρευνα του μηχανισμού πλατινίωσης του DNA, σε διαλύματα μικρής

τρεις από αυτές συνδέονται με το μέταλλο, με σειρά αυξανόμενης συγγένειας $G10 < G4 < G16$ (Σχήμα 24). Η εκλεκτικότητα αυτή σχετίζεται με την ελευθερία στο χώρο των γουανινών και την ευκολία με την οποία μπορούν να κινηθούν ελαφρά προς τη μεγάλη αύλακα της έλικας. Ένας ακόμη σταθεροποιητικός παράγοντας φαίνεται ότι είναι η δυνατότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου μεταξύ πιθανόν ενός μορίου νερού ενταγμένου στο λευκόχρυσο και ενός ατόμου O6 της ίδιας γουανίνης, με την οποία συνδέεται ο λευκόχρυσος. Αυτό προτάθηκε ως βάση της διαφοράς δραστηριότητας μεταξύ των cis και trans ισομερών.

Η παρακολούθηση της αντίδρασης του cis-DDP με τα αυτοσυμπληρωματικά τετρανουκλεοτίδια $d(GGCC)_2$ και $d(CCGG)_2$ πραγματοποιήθηκε με μεθόδους ενζυματικής αποικοδόμησης [181]. Χρησιμοποιήθηκαν οι φωσφοδιεστεράσες VDP και SPD, καθώς και μια αλκαλική φωσφατάση και τα προϊόντα της αποικοδόμησης διαχωρίστηκαν με χρωματογραφία HPLC. Επιβεβαιώθηκε και σε αυτή την περίπτωση η εκλεκτικότητα της δράσης του cis-DDP, το οποίο βρέθηκε να συνδέεται με τα άζωτα N7 των δύο γειτονικών γουανινών.

Υπολογισμοί μοριακής μηχανικής των 1,2 χηλικών προϊόντων προσθήκης που σχηματίζονται μεταξύ του cis-DDP και δύο διαφορετικών δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων, $d(GGCCGGCC)_2$ και $d(TCTCGGTCTC)_2$ έδωσαν τα εξής συμπεράσματα: 1) Η 5'-συνδεδεμένη γουανίνη γέρνει εκτός της συσσώρευσης των βάσεων, καταστρέφοντας έτσι έναν από τους αμινο-δεσμούς υδρογόνου που συμμετέχουν στο ζεύγος βάσεων GC και ή αδυνατίζει τον ίμινο-δεσμό υδρογόνου (στο A-DNA) ή σχηματίζει έναν αδύναμο δεσμό μεταξύ των ιμινικών υδρογόνων H1 και δύο N3 ατόμων των απέναντι βάσεων (στο B-DNA), 2) Υπάρχει ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ της αμμωνίας του συμπλόκου του λευκοχρύσου και της 5'-φωσφορικής ομάδας της μονάδας $d(\rho GrG)$ και στους δύο τύπους του DNA. Αυτός ο δεσμός υδρογόνου κλείνει έναν δακτύλιο, στον οποίο το 5'-σάκχαρο βρίσκεται σε διαμόρφωση C2'-endo, C3'-exo ή σε διαμόρφωση C3'-endo, C2'-

παραπάνω μοντέλο έδειξαν ότι οι γουανοσίνες G(4) και G(5) έχουν διαμορφώσεις anti και syn αντίστοιχα. Η G(5) είναι κάθετη στο επίπεδο ένταξης, ενώ η G(4) βρίσκεται σχεδόν πάνω στο επίπεδο αυτό, με αποτέλεσμα οι δύο πενταμελείς δακτύλιοι των πουρινών να βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους ($G(5)H8-G(4)H(8) < 3 \text{ \AA}$, σε σχέση με τη συνηθισμένη απόσταση των 3.4 \AA). Αν και συνήθως στις πλατινωμένες διπλές έλικες η διαμόρφωση των $5'GpG3'$ είναι anti-anti, head-to-head, στο συγκεκριμένο μοντέλο η διαμόρφωση είναι anti-syn, head-to-side (Σχήμα 27) [185]. Η ασυνήθιστη αυτή διαμόρφωση της πλατινωμένης διπλής έλικας δημιουργείται με σκοπό την εξισορρόπηση των δομικών απαιτήσεων του DNA και του Pt και είναι πιθανό να σχετίζεται με την αντικαρκινική δράση του φαρμάκου.



Σχήμα 25: Σχηματική παράσταση του σχηματισμού δακτυλίου με τη συμμετοχή ενός δεσμού υδρογόνου. Η διακοπτόμενη γραμμή παριστάνει C(2')-endo, C(3')-exo διαμόρφωση, ενώ η συνεχόμενη παριστάνει C(3')-endo, C(2')-exo διαμόρφωση.

στραμμένου συμπληρωματικού κλώνου. Τέλος, οι γουανοσίνες G*(4) | G*(5) βρέθηκε να έχουν διαμόρφωση N,anti και S,anti αντίστοιχα.

Η δομή του προϊόντος προσθήκης cis-Pt-G(6)T(7)G(8) στο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο d(C(1)T(2)C(3)T(4)A(5)G(6)T(7)G(8)C(9)T(10)C(11)A(12)C(13)) . d(G(26)T(25)G(24)A(23)G(22)C(21)A(20)C(19)T(18)A(17)G(16)A(15)G(14)), μελετήθηκε με φασματοσκοπία 1D ¹H, ³¹P NMR, NOESY, HMQC, COSY και στη συνέχεια με υπολογισμούς μοριακής δυναμικής [128]. Οι παραμορφώσεις που προκαλεί η πλατινίωση ήταν τοπικές και περιορίζονταν στην περιοχή cis-Pt-G(6).C(21) και T7.A20, ενώ το τμήμα cis-Pt-G(8).C(19) σχημάτιζε κανονικά δεσμό υδρογόνου. Η παραμόρφωση περιοριζόταν στο 5'-τμήμα του πλατινωμένου κλώνου. Σήμα NOE μεταξύ του G(6)H8 και του G(6)H3' έδειξε την παρουσία διαμόρφωσης 100% τύπου N για το δακτύλιο του σακχάρου της 5' γουανοσίνης, G(6), ενώ η 3' γουανοσίνη, G(8) διατηρεί διαμόρφωση τύπου S. Το δομικό μοντέλο έδειξε μια στροφή της έλικας κατά 20° και ένα τοπικό ξεδίπλωμα αυτής κατά 19°, στο σημείο πλατινίωσης. Στη θυμίνη T(7) ο γλυκοζιτικός δεσμός είναι syn και αυτή είναι τοποθετημένη στη μικρή αύλακα, συσσωρευόμενη με την παραμορφωμένη (propeller-twisted) cis-Pt-G(6), γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικές με την ενδιάμεση βάση στο τμήμα GNG. Η παραμόρφωση αυτή της μικρής αύλακας δεν παρατηρείται με τα προϊόντα cis-Pt-GG- και cis-Pt-AG- και ίσως έτσι να εξηγείται το γιατί οι πρωτεΐνες DRP αναγνωρίζουν τις cis-Pt-GG- και cis-Pt-AG- βλάβες του DNA, όχι όμως τις αντίστοιχες cis-Pt-GNG- [45].

Φασματοσκοπίες 1D ¹H-NMR και NOESY χρησιμοποιήθηκαν για τη διευκρίνιση του τρόπου σύνδεσης του Pt(en)₂ με τα δύο δωδεκανουκλεοτίδια d(CAATCCGGATTG)₂ και d(TCGGATCCGA)₂, και έδειξαν ότι το μέταλλο συνδεόταν σε περιοχές AT [189]. Οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων παρατηρήθηκαν για τα πρωτόνια μικρής αύλακας, A3H2 στο πρώτο και

αρχικά στα ακραία ζεύγη βάσεων. Στην τιτλοδότηση του δωδεκανουκλεοτιδίου με το διδοντικό Pd-en η γουανίνη G4 είναι αυτή που φαίνεται να επηρεάζεται αρχικά, ενώ στην πορεία της τιτλοδότησης και οι τέσσερις γουανίνες επηρεάζονται εξίσου. Τέλος, στην τιτλοδότηση με το “γυμνό” κατιόν $\text{Pd}(\text{aq})^{2+}$ η αντίδραση πραγματοποιείται πιο βίαια και ενώ αρχικά παρατηρείται εκλεκτικότητα για τη θυμίνη T8 και τη γουανίνη G4, σε αναλογία Pd(I)/duplex ίση με 4:1 έχουμε πλήρη παραμόρφωση της διπλής έλικας.

Τα τελευταία χρόνια, έχει παρουσιάσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον [191-193] η καινούρια κατηγορία διπυρηνικών συμπλόκων του λευκοχρύσου του τύπου $[\{\text{PtCl}_m(\text{NH}_3)_{3-m}\}_2(\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2)]^{2(2-m)+}$ ($m=0,1,2$, $n=1,2$) (Σχήμα 29), ως πιθανών αντικαρκινικών φαρμάκων. Μελέτες κυκλικού διχρωισμού σε αντιδράσεις των διπυρηνικών αυτών συμπλόκων με τα πολυμερή poly(dG-dC).poly(dG-dC) και poly(dG-m5dC). poly(dG-m5dC) έδειξαν ότι προκαλούν αλλαγή διαμόρφωσης των πολυμερών από B- σε Z-τύπου. Η αλλαγή αυτή είναι ανεξάρτητη από το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού και οφείλεται αρχικά σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στο διάλυμα. Το cis-DDP αντίθετα σταθεροποιεί τη B-μορφή του DNA και αυτή είναι η κύρια διαφορά των δύο κατηγοριών συμπλόκων. Επίσης, τα διπυρηνικά σύμπλοκα σχηματίζουν 1,2, 1,3 και 1,4 διακλωνικούς διασταυρούμενους δεσμούς με γουανίνες σε ποσοστό μεγαλύτερο από το cis-DDP (<5%). Τέλος, ο σχηματισμός ενδοκλωνικών διασταυρούμενων δεσμών από τα διπυρηνικά σύμπλοκα μελετήθηκε με τεχνικές ηλεκτροφόρησης gel και φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ σε ολιγονουκλεοτίδια που περιείχαν το τμήμα d(TGGT). Διαπιστώθηκε ότι τα (Pt,Pt)-προϊόντα προκαλούν μια ευλύγιστη, μη προσανατολισμένη στροφή (bent) στο DNA, σε αντίθεση με το cis-DDP και ότι η διαμόρφωση των βάσεων ήταν N,anti για την 5'-T, S/N,anti για την G1, N,anti/syn για την G2 και S,anti για την 3'-T. Οι διαφορές στα δομικά χαρακτηριστικά και στην ποσοτική αναλογία των προϊόντων των διπυρηνικών αυτών συμπλόκων σε σχέση με εκείνα των

της σύνδεσης του μαγνησίου στη σταθερότητα της διπλής έλικας για το ολιγονουκλεοτίδιο $d(ATGGGTACCCAT)_2$ μελετήθηκε με φασματοσκοπία ^1H-NMR [194]. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις (4 mM) και σε θερμοκρασία $23^\circ C$, το $^-$ ολιγονουκλεοτίδιο υιοθετεί διαμόρφωση φουρκέτας, όπως φαίνεται από το NMR φάσμα των ίμινο-πρωτονίων. Η προσθήκη άλατος μαγνησίου προκαλεί μετατροπή της διαμόρφωσης από αυτή της φουρκέτας σε αυτή της διπλής έλικας, σε αναλογία $Mg(II)/duplex$ ίση με 15. Η εξάρτηση των σημάτων συντονισμού των ίμινο-πρωτονίων από τη θερμοκρασία δείχνει ότι η τήξη της έλικας αρχίζει από τα άκρα της.

3.3.2. Ψευδάργυρος, Zn(II)

Φασματοσκοπία ^1H-NMR χρησιμοποιήθηκε για τη διευκρίνιση των θέσεων δεσμού του $Zn(II)$ με ολιγονουκλεοτίδια [194-196]. Στην αντίδραση του $Zn(II)$ με το δωδεκαμερές $[d(CGCGAATTCGCG)]_2$ μόνο η γουανίνη G4 φαίνεται να επηρεάζεται. Το πρωτόνιο G4-H8 μετατοπίζεται σημαντικά σε μικρότερα μήκη κύματος, ενδεικτικό του δεσμού $Zn-N7$. Επίσης, το ίμινο-πρωτόνιο G4(N1-H) μετατοπίζεται σε μικρότερες τιμές πεδίου, ώσπου τελικά αλληλοεπικαλύπτεται με το σήμα του ίμινο-πρωτονίου της G2. Τιτλοδότηση του δωδεκανουκλεοτιδίου $[d(ATGGGTACCCAT)]_2$ με $Zn(II)$, έδειξε τον ίδιο τύπο εκλεκτικότητας. Οι κυριότερες μετατοπίσεις ήταν για τα σήματα G3-H8 και G4-H8, δηλώνοντας την ύπαρξη δεσμού του $Zn(II)$ με τα άτομα N7 των δύο γουανινών.

3.3.3. Υδράργυρος, Hg(II)

Αντιδράσεις του $Hg(II)$ με ολιγονουκλεοτίδια έχουν μελετηθεί με φασματοσκοπία ^1H-NMR [113,197-199]. Κατά την τιτλοδότηση του δωδεκανουκλεοτιδίου $[d(CGCGAATTCGCG)]_2$ με άλας $Hg(II)$, παρατηρήθηκε εξαφάνιση των σημάτων συντονισμού των ίμινο-πρωτονίων των θυμινών καθώς και μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων των μεθυλομάδων των T7 και T8 προς

των τεσσάρων γουανινών [200]. Επιπλέον πειράματα με δέκα διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια, έδειξαν ότι η συγγένεια μεταξύ του αζώτου N7 της 5'-γουανίνης και του μετάλλου ακολουθεί τη σειρά: 5'-GG \geq G \bar{A} > GT >> GC. Τα αποτελέσματα αυτά συνδέθηκαν με διακυμάνσεις στο ηλεκτροστατικό δυναμικό, οι οποίες εξαρτώνται από το είδος της ακολουθίας και με μικρές αλλαγές διαμόρφωσης ανάλογα με την ακολουθία, οι οποίες μεταβάλλοντας τη συσσώρευση των βάσεων, επηρεάζουν τη νουκλεοφιλικότητα των θέσεων G-N7.

Τιτλοδοτήσεις με Mn(II) σε δύο διπλόκλινα εξανουκλεοτίδια, τα d(CGTACG)₂ και d(GCATGC)₂, έδειξαν μια ελάχιστη διαφορά εκλεκτικότητας μεταξύ των 5'-GC και 3'-GC [200].

Τελευταία, ο Limmer και οι συνεργάτες του μελέτησαν με φασματοσκοπία ¹H-NMR, τη σύνδεση Mn(II)/Mg(II) ιόντων με διάφορες μικροέλικες, που προήλθαν από πέντε διαφορετικά tRNAs [201,202]. Οι μικροέλικες αποτελούνταν από επτά ζεύγη βάσεων και ένα μονόκλινο ακραίο τμήμα 3'-ACCA. Τα ίμινο-πρωτόνια της μικροέλικας:



δίνουν σήματα συντονισμού παραμαγνητικά διευρυσμένα για τις γουανίνες G1, G2 και G3, ύστερα από την προσθήκη MnCl₂.

πρώτη φορά που γίνεται μελέτη ενός τέτοιου τύπου τριαδικού συστήματος.

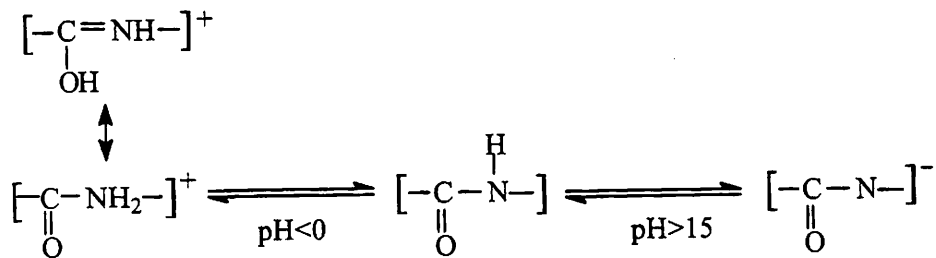
Για τη σύνθεση των τριαδικών συμπλόκων επιλέχθηκαν οι νουκλεοζίδες γουανοσίνη (Guo) και κυτιδίνη (Cyd), οι οποίες αποτελούν συμπληρωματικό ζεύγος τόσο του DNA όσο και του RNA, έτσι ώστε να μπορέσουμε να συγκρίνουμε τη συμπλοκοποίηση ενός εκπροσώπου των πυριμιδινικών νουκλεοζιδών με αυτή ενός εκπροσώπου των πουρινικών.

Τα αμινοξέα και διπεπτίδια επιλέχθηκαν, έχοντας σαν αρχικά τη γλυκίνη (gly) και τη γλυκυλγλυκίνη (gly-gly) αντίστοιχα και αυξάνοντας σταδιακά τις πλευρικές αλειφατικές αλυσίδες τους (στην περίπτωση του διπεπτιδίου αυτό αφορά μόνο στο δεύτερο αμινοξύ), με σκοπό τη μελέτη της εξάρτησης των υδρόφοβων μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αρωματικού συστήματος των βάσεων των νουκλεοζιδών και της πλευρικής αυτής αλυσίδας, καθώς αυξάνεται το μέγεθός της.

Το δίκλωνο δωδεκανουκλεοτίδιο που επιλέχτηκε για τη μελέτη σε διάλυμα ήταν το $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$, το οποίο σχηματίζει εύκολα διπλή έλικα και περιέχει την ακολουθία $d(\text{GAATTC})$, την οποία αναγνωρίζει το περιοριστικό ένζυμο EcoRI.

Παράλληλος σκοπός της διατριβής είναι και η σύνθεση νέων συμπλόκων ενώσεων του λευκοχρύσου με πιθανή αντικαρκινική δράση, όπως τα σύμπλοκα $\text{cis-Cl}_2\text{Pt}(\text{dipeptideester})_2$, τα οποία αποτελούν ανάλογα του cisplatin με υποκαταστάτες βιολογικά μόρια, που πιθανόν να δευκολύνουν τη μεταφορά του φαρμάκου στα κύτταρα και τα οποία δοκιμάζονται κλινικά.

σύμπλοκα τύπου ML, τα διπεπτίδια δρουν ως τριδοντικοί υποκαταστάτες, με δυο πενταμελείς χηλικούς δακτυλίους, που σχηματίζονται από το μέταλλο, την τελική αμινομάδα, το αμιδικό άζωτο και το οξύγονο του τελικού καρβοξυλίου, σε τιμές pH μικρότερες από 4.0 [209-213]. Η συμπλοκοποίηση συνήθως αρχίζει από την N-τελική αμινομάδα και συνεχίζεται προς το C-άκρο, σχηματίζοντας πολύ σταθερούς δεσμούς με το αμιδικό άζωτο [214-216]. Όταν δεν υπάρχουν άτομα δότες στην πλευρική αλυσίδα των αμινοξέων, ώστε να συναγωνιστούν με τα άτομα αζώτου της ραχοκοκκαλιάς, τότε ο τρόπος συμπλοκοποίησης, σε χαμηλό pH, είναι προβλέψιμος.

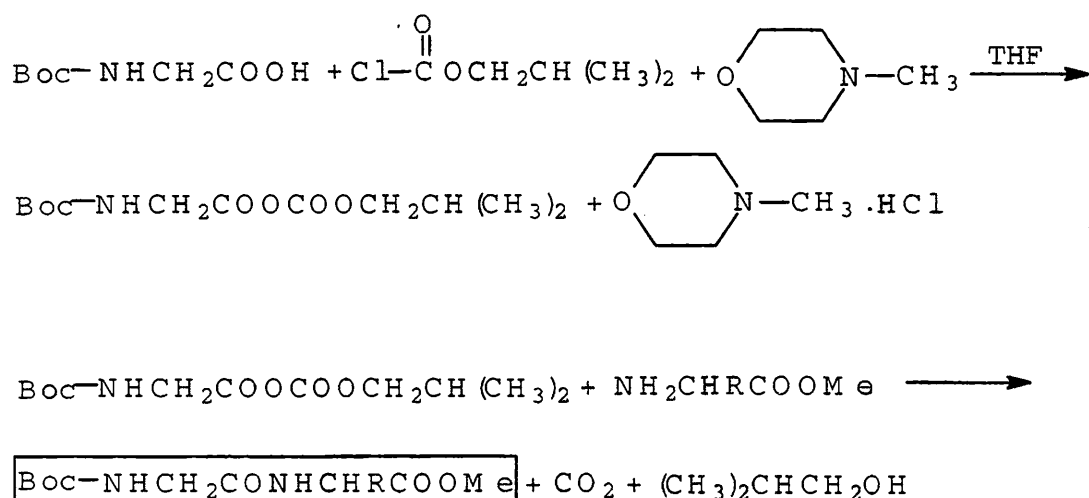


Σχήμα 31: Πορεία πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης της αμιδικής ομάδας.

Βέβαια, συχνές είναι οι περιπτώσεις, όπου έχουμε μονοδοντική ένταξη του πεπτιδίου μέσω της τελικής αμινομάδας. Ο Beck και οι συνεργάτες του συνέθεσαν σύμπλοκα με διπεπτίδια του τύπου cis- και trans-Cl₂Pt(dipeptidester)₂ είτε μέσω πεπτιδικής σύνθεσης πάνω στο μέταλλο, το οποίο δρα ως προστατευτική ομάδα για την τελική αμινομάδα, χρησιμοποιώντας το καρβοδιιμίδιο (DCC, C₆H₁₁NCNC₆H₁₁) ως συζευκτικό παράγοντα είτε με απευθείας αντίδραση του εστέρα του διπεπτιδίου με το άλας K₂PtCl₄ [217-220] (Σχήμα 32). Ανάλογες συνθέσεις με Pt(II) και Pd(II) έγιναν και από τον Castillo και τους συνεργάτες του, χρησιμοποιώντας ως συζευκτικό παράγοντα ένα πολυμερές που περιείχε την ομάδα του καρβοδιιμιδίου [221].

1.2. Σύνθεση εστέρων των διπεπτιδίων

Η σύνθεση των εστέρων των διπεπτιδίων (εκτός του HCl.GlyGlyOEt, που αγοράστηκε από τη Sigma Co.) έγινε με τη γνωστή από τη βιβλιογραφία μέθοδο των μικτών ανυδριτών [225-228], χρησιμοποιώντας χλωρομυρμηκικό ισοβουτυλεστέρα ως μικτό ανυδρίτη και ξεκινώντας σε όλες τις περιπτώσεις από την Boc-γλυκίνη, σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα 34: Γενική πορεία αντιδράσεων σύνθεσης των εστέρων των διπεπτιδίων.

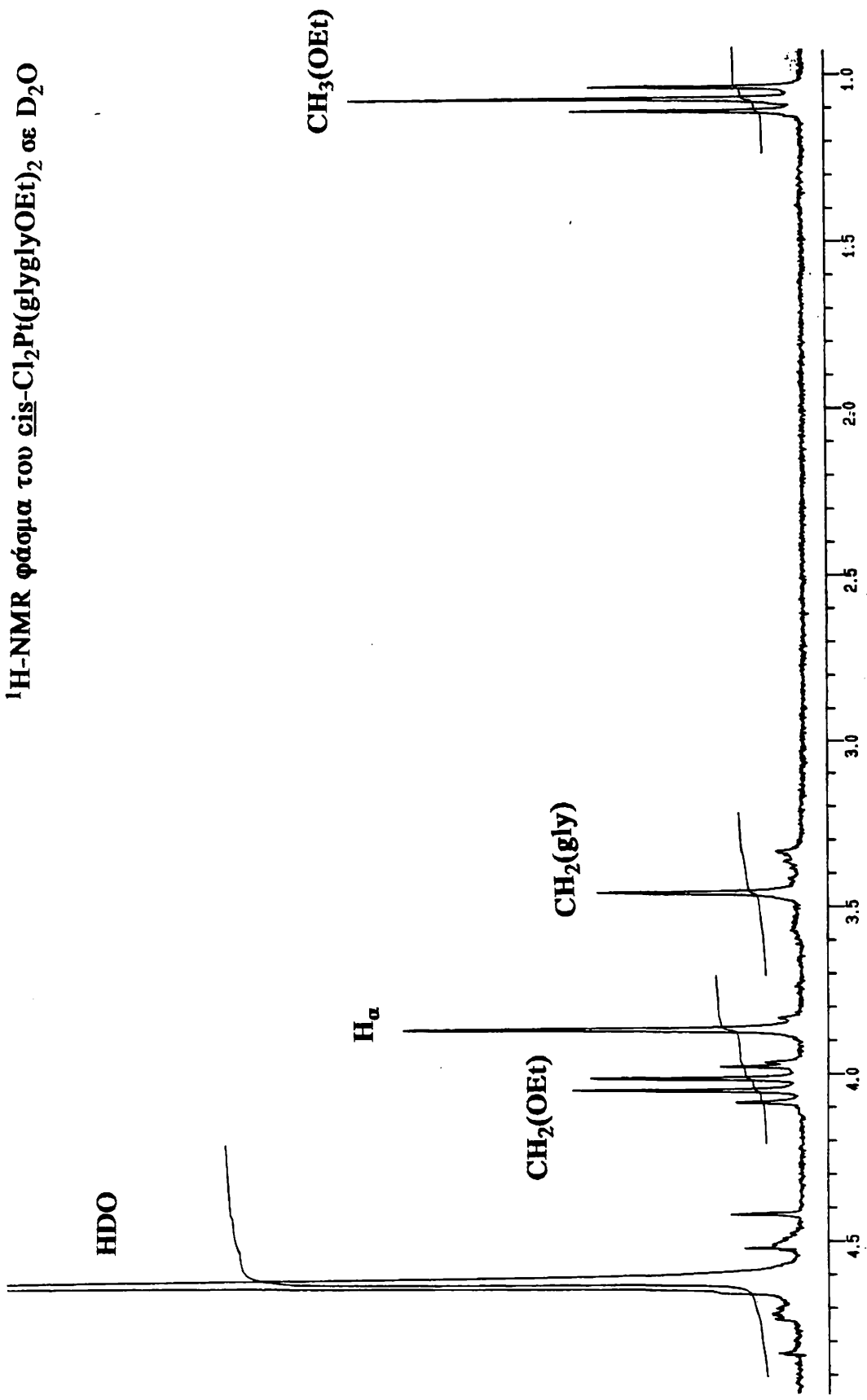
Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε διάφορα συστήματα διαλυτών και αντίδραση με νινυδρίνη. Στη συνέχεια ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος με flash χρωματογραφία [229]. Οι αποδόσεις των συνθέσεων έφταναν το 70%. Τέλος, έγινε η αποπροστασία της αμινομάδας, απομακρύνοντας την ομάδα Boc- με HCl/Διοξάνη, 4N.

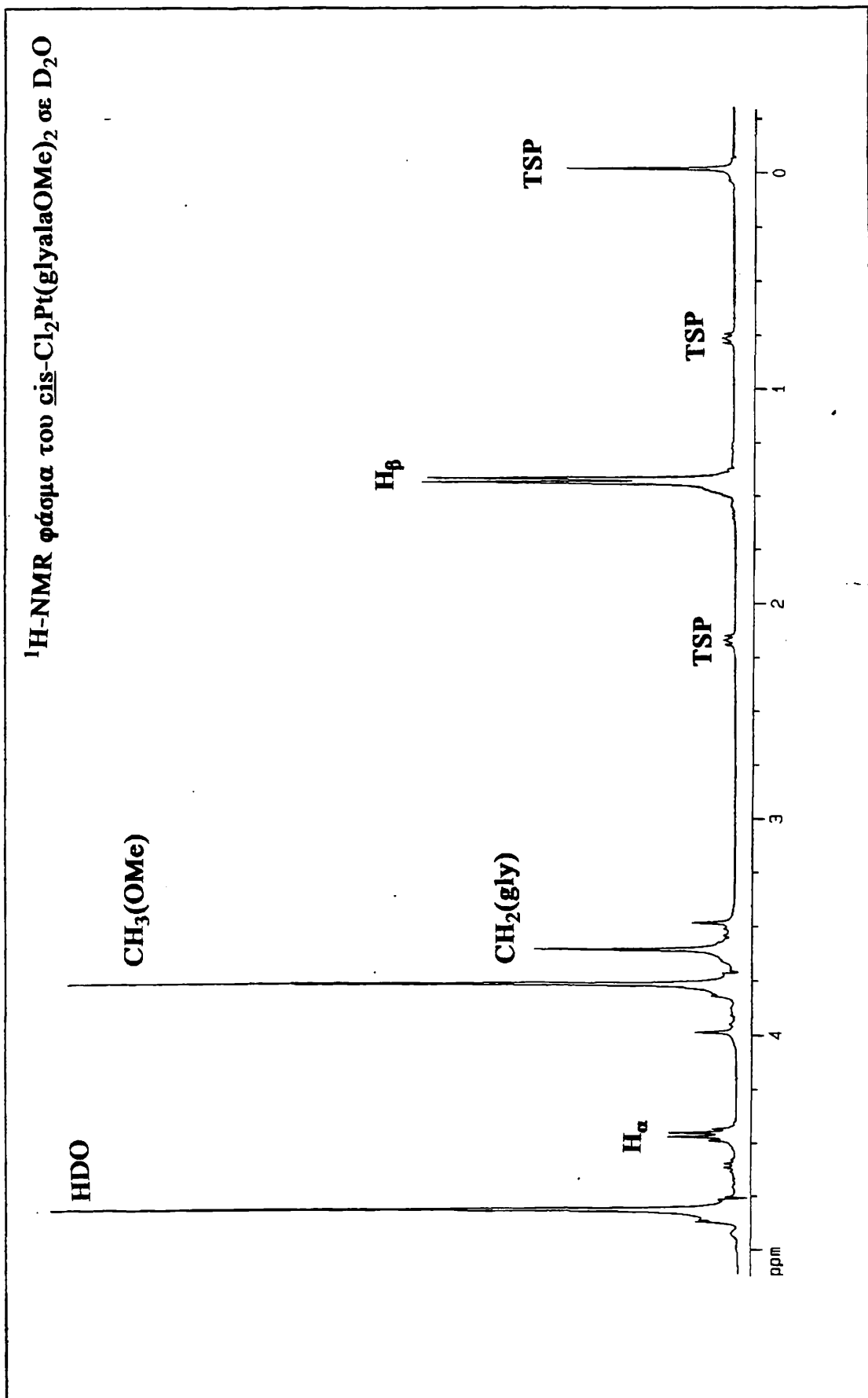
Η ταυτοποίηση και ο έλεγχος της καθαρότητας των υδροχλωρικών εστέρων των διπεπτιδίων έγινε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ σε διαλύτη D_2O ή και σε DMSO.

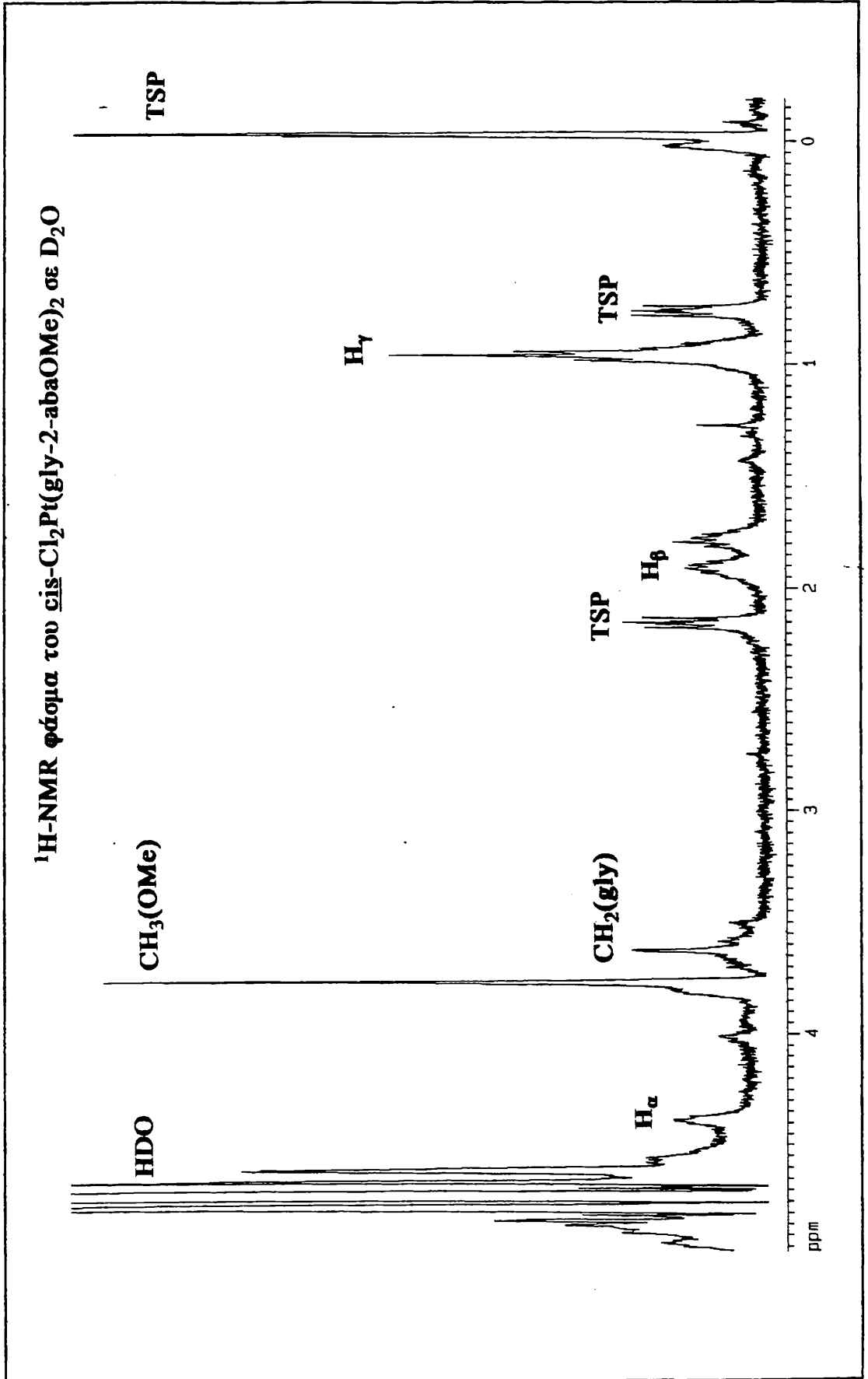
1.4. Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των δυαδικών συμπλόκων σε D_2O και DMSO παρουσιάζονται στις σελίδες 79-87. Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται τα δεδομένα από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$. Η συμπλοκοποίηση των διπεπτιδίων με το μέταλλο έχει γενικά ως αποτέλεσμα τη μείωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας των ατόμων του πεπτιδίου, η οποία γίνεται αισθητή και στα άτομα υδρογόνου. Με αυτό τον τρόπο οι πυρήνες αποπροστατεύονται και κυρίως αυτοί που βρίσκονται πιο κοντά στις θέσεις δεσμού με το μέταλλο. Ενδεικτική της αποπροστασίας είναι η μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των πυρήνων σε μικρότερες τιμές πεδίου (downfield). Στην περίπτωση της σύγκρισης μεταξύ των πρωτονιωμένων και συμπλοκοποιημένων διπεπτιδίων, παρατηρούμε ότι η αποπροστασία είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση της πρωτονίωσης από ό,τι στην περίπτωση της συμπλοκοποίησης όσο αφορά στα πρωτόνια της μεθυλενομάδας της N-γλυκίνης σε D_2O και στα πρωτόνια της N-αμινομάδας αυτής σε DMSO . Τα σήματα συντονισμού των παραπάνω πρωτονίων μετατοπίζονται σε υψηλότερες τιμές πεδίου (upfield) στα δυαδικά σύμπλοκα από ό,τι στα πρωτονιωμένα διπεπτίδια (Ιδιαίτερα στην περίπτωση της αμινομάδας, μέσω της οποίας γίνεται η συμπλοκοποίηση με το μέταλλο, η μετατόπιση είναι κατά περίπου 3 ppm). Αντίθετα, όλα τα πρωτόνια του δεύτερου αμινοξέος των εστέρων των διπεπτιδίων, εκτός του GlyglyOEt, δίνουν κατά τη συμπλοκοποίησή τους με το μέταλλο, σήματα μετατοπισμένα σε μικρότερες τιμές πεδίου (downfield) κατά περίπου 0.2 ppm σε σχέση με τα σήματα των πρωτονιωμένων αναλόγων τους. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει τη συμπλοκοποίησή τους με το λευκόχρυσο.

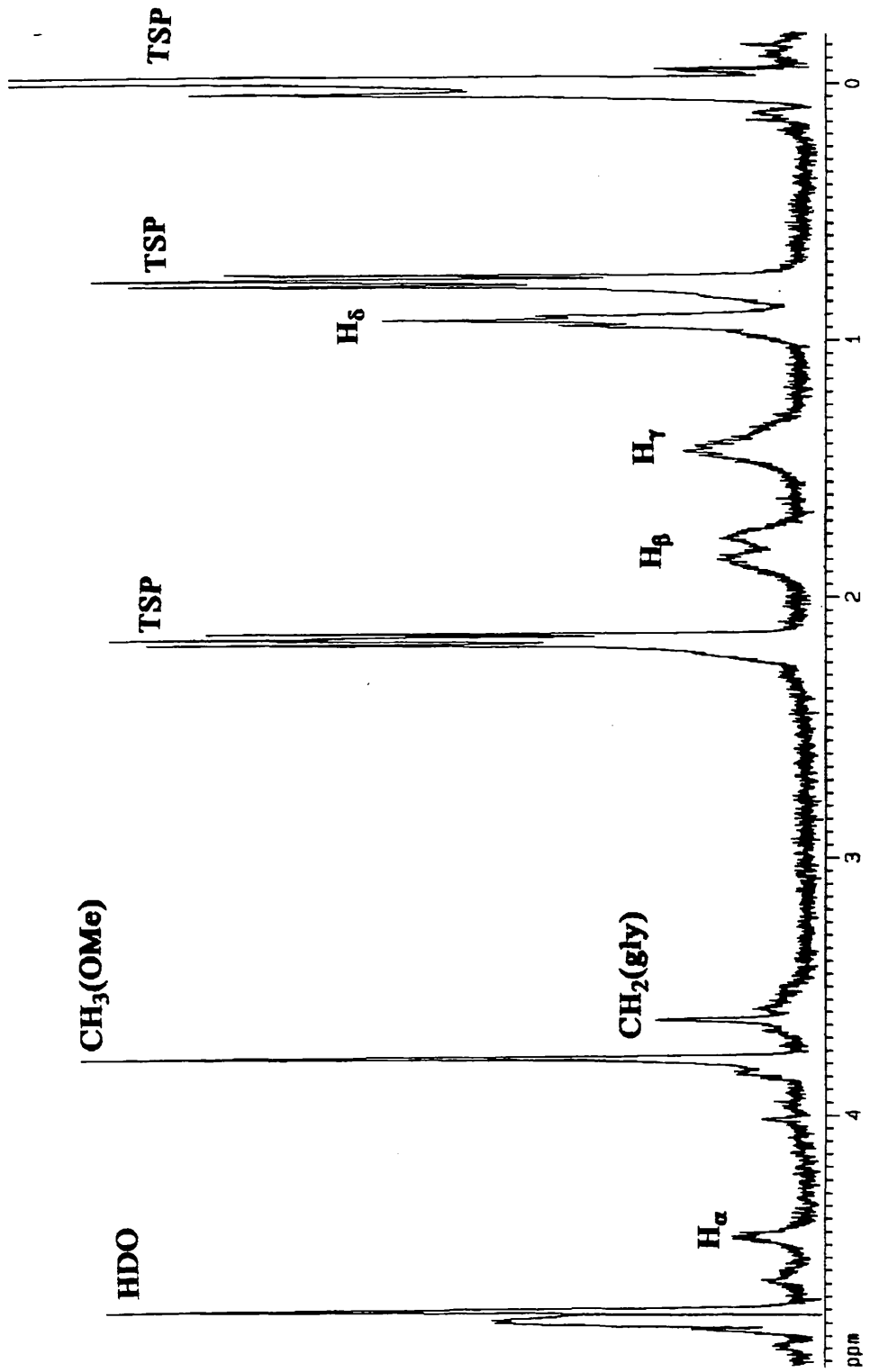
¹H-NMR φάσμα του *cis*-Cl₂Pt(glyglyOEt)₂ σε D₂O

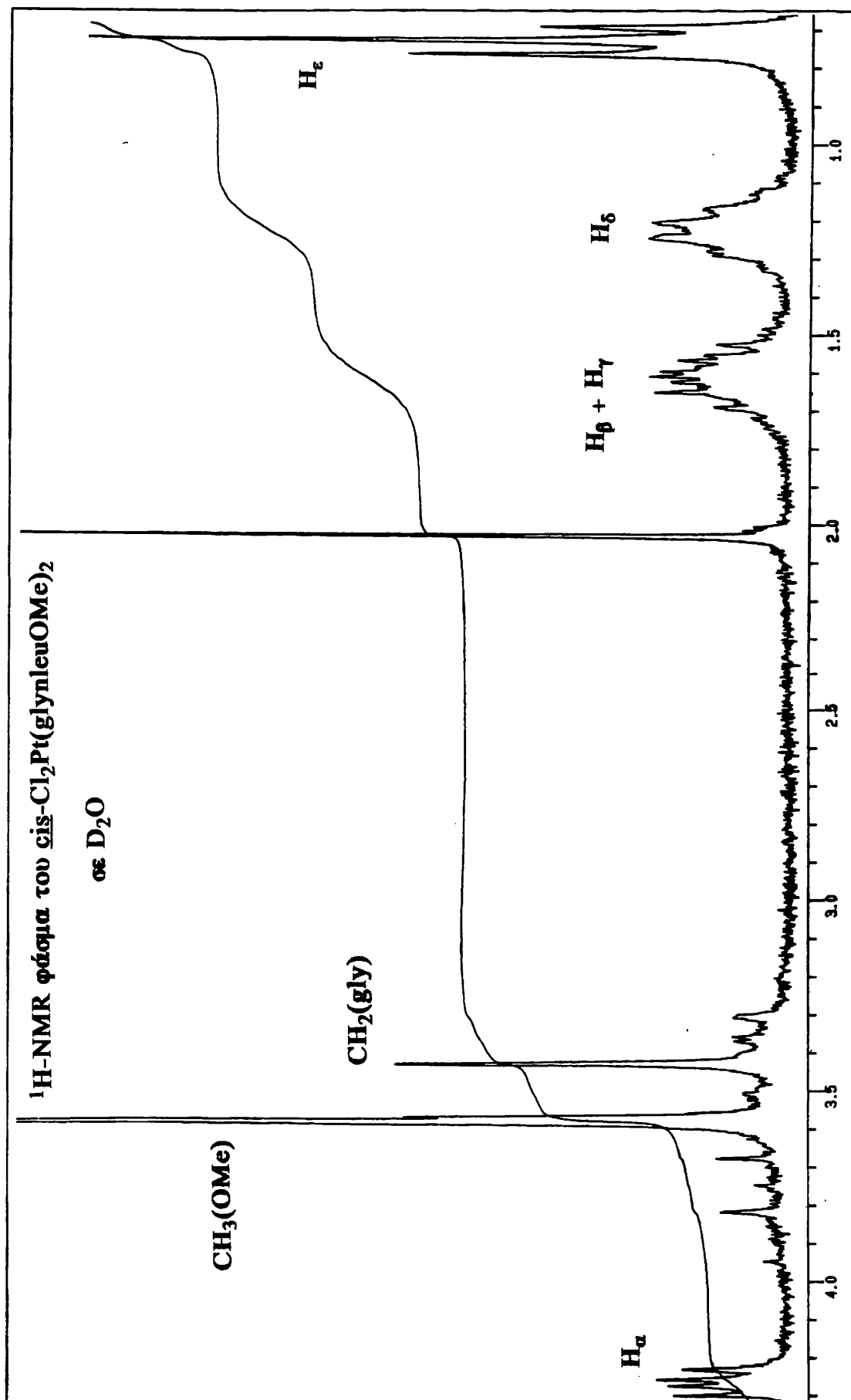






$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του $\text{cis-Cl}_2\text{Pt}(\text{glynvalOMe})_2$ σε D_2O





παραπάνω βάσεις θεωρείται ασήμαντη σήμερα και θεωρούμε ότι οι βάσεις βρίσκονται στην παραπάνω μορφή σε διαλύματα. Για τη γουανοσίνη, η πιο πιθανή θέση για συμπλοκοποίηση με το λευκόχρυσο είναι το άζωτο N7 σε ουδέτερο pH. Είναι αποπρωτονιωμένο ($pK_a(N7)=2.1$ και $pK_a(N1)=9.2$ [230]) και στη διπλή έλικα B-DNA είναι εύκολη η πρόσβασή του στην περιοχή της μεγάλης αύλακας. Η σύζευξη Pt-H8, που παρατηρήθηκε σε σύμπλοκα Pt-γουανοσίνη, χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την απόδειξη της ύπαρξης του δεσμού με το άζωτο N7 [231], η οποία αργότερα επιβεβαιώθηκε με κρυσταλλογραφικά δεδομένα [232,233]. Θεωρητικοί υπολογισμοί σε ενέργειες δεσμού του $\{Pt(NH_3)_3\}$ με διάφορες θέσεις νουκλεοβάσεων, απέδειξαν ότι η θέση G-N7 είναι η πιο ευνοϊκή ενεργειακά [234]. Η πλατινίωση στη θέση N7 επιφέρει τα εξής αποτελέσματα:

1. Στο φάσμα ^1H-NMR , τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων του δακτυλίου της γουανίνης μετατοπίζονται προς μικρότερες τιμές πεδίου σε σχέση με αυτά του ελεύθερου υποκαταστάτη. Οι μετατοπίσεις αυτές είναι πάντως μικρότερες από αυτές που συμβαίνουν κατά την πρωτονίωση [235] και επίσης εξαρτώνται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών.
2. Το πρωτόνιο H8 της N7 πλατινιωμένης γουανοσίνης παρουσιάζει μια αυξημένη τάση για ανταλλαγή. Σε διαλύματα D_2O , η ανταλλαγή με δευτέριο έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης του σήματος και τελικά την εξαφάνισή του.
3. Το πρωτόνιο στη θέση N1 γίνεται πιο όξινο. Η αύξηση της οξύτητάς του είναι μεγέθους 1.6-2 λογαριθμικές μονάδες [135,236].

Εκτός από τη θέση N7, πλατινίωση μπορεί βέβαια να συμβεί και σε άλλες θέσεις του μορίου, όπως πλατινίωση στη θέση N1 σε α) ουδέτερο ή ελαφρά αλκαλικό περιβάλλον με περίσσεια του ηλεκτρονιόφιλου Pt [237-239] και β) σε ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον ($pH=10.5$) [239]. Η υπόθεση για το σχηματισμό χηλικού συμπλόκου με τα άτομα N7 και O6 της γουανοσίνης δεν έχει ακόμα επιβεβαιωθεί, αν

συγκέντρωσης 10^{-3} M, είχε σε όλες τις περιπτώσεις τιμή ίση με $200 \text{ ohm}^{-1} \text{cm}^2/\text{mole}$ περίπου, τιμή που συμφωνεί με την υπόθεση δομής 1:2 ηλεκτρολύτη. Οι στοιχειακές αναλύσεις των συμπλόκων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 και όπως φαίνεται συμφωνούν με τους προτεινόμενους μοριακούς τύπους.

Πίνακας 3: Στοιχειακές αναλύσεις των τριαδικών συμπλόκων

Σύμπλοκα	C%	H%	N%	C/N
cis-[(guo) ₂ Pt(glyglyOEt) ₂]Cl ₂ ·4H ₂ O	31.20 (31.37)	4.50 (4.37)	15.90 (16.01)	1.96 (1.96)
cis-[(guo) ₂ Pt(glyalaOMe) ₂]Cl ₂ ·6H ₂ O	30.65 (30.47)	4.57 (4.92)	15.90 (15.55)	1.93 (1.96)
cis-[(guo) ₂ Pt(gly-2-abaOMe) ₂](NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	31.07 (31.26)	4.07 (4.75)	17.36 (17.16)	1.79 (1.82)
cis-[(guo) ₂ Pt(glynvalOMe) ₂]Cl ₂ ·6H ₂ O	32.69 (32.83)	4.79 (5.32)	14.36 (14.89)	2.24 (2.24)
cis-[(guo) ₂ Pt(glynleuOMe) ₂](NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	33.05 (33.50)	4.90 (5.14)	16.10 (16.45)	2.05 (2.04)
cis-[(cyd) ₂ Pt(glyglyOEt) ₂]Cl ₂ ·6H ₂ O	30.16 (30.50)	4.67 (5.25)	11.83 (11.86)	2.55 (2.57)
cis-[(cyd) ₂ Pt(glyalaOMe) ₂]Cl ₂ ·6H ₂ O	29.56 (30.50)	4.59 (5.25)	11.41 (11.86)	2.59 (2.57)
cis-[(cyd) ₂ Pt(gly-2-abaOMe) ₂]Cl ₂ ·10H ₂ O	29.54 (30.00)	4.60 (4.22)	10.08 (10.94)	2.74 (2.94)
cis-[(cyd) ₂ Pt(glynvalOMe) ₂]Cl ₂ ·4H ₂ O	34.31 (34.00)	4.71 (5.50)	11.49 (11.66)	2.91 (2.98)
cis-[(cyd) ₂ Pt(glynleuOMe) ₂]Cl ₂ ·4H ₂ O	35.33 (35.18)	5.64 (5.70)	11.90 (11.40)	2.97 (3.08)

* Οι τιμές σε παρένθεση είναι οι θεωρητικές τιμές

2.3. Φασματοσκοπία υπερώθρου (IR)

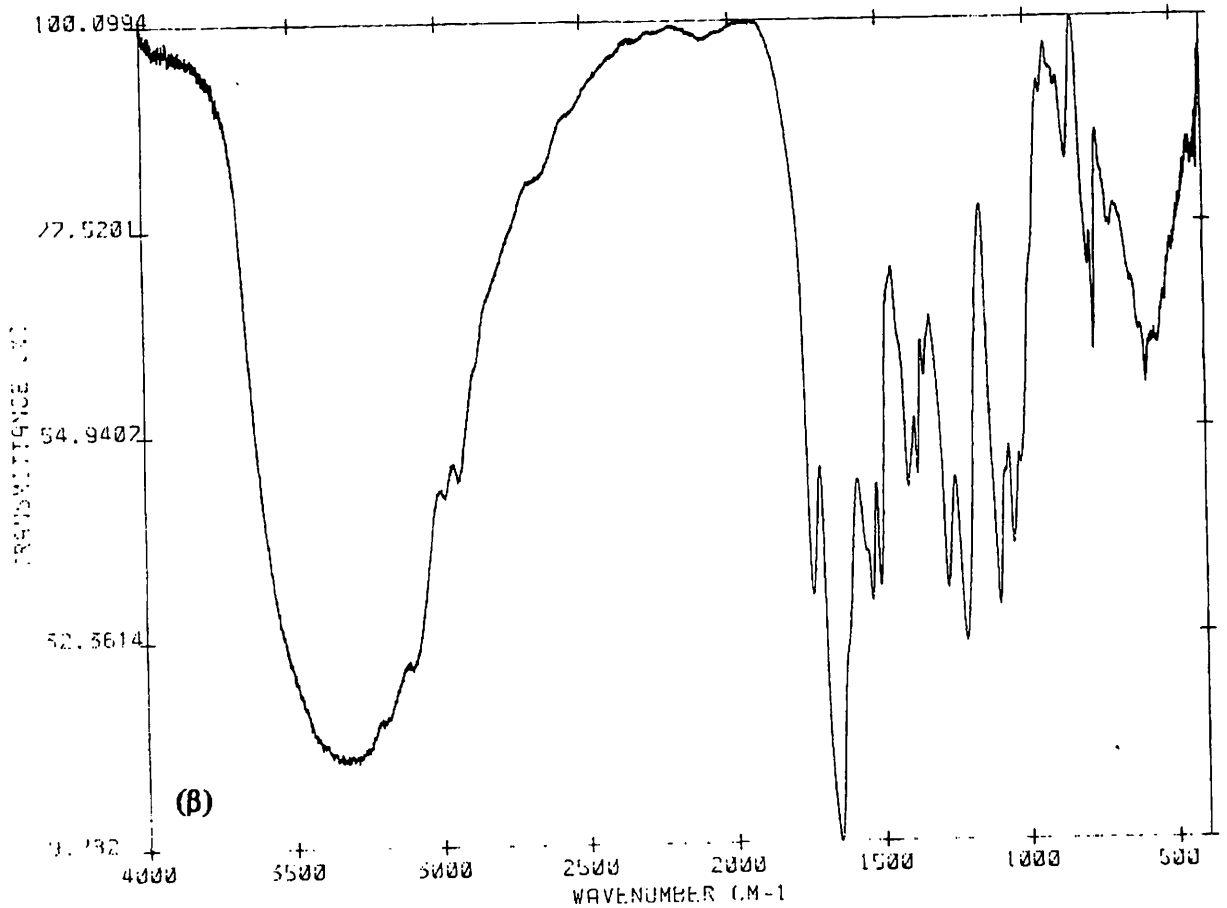
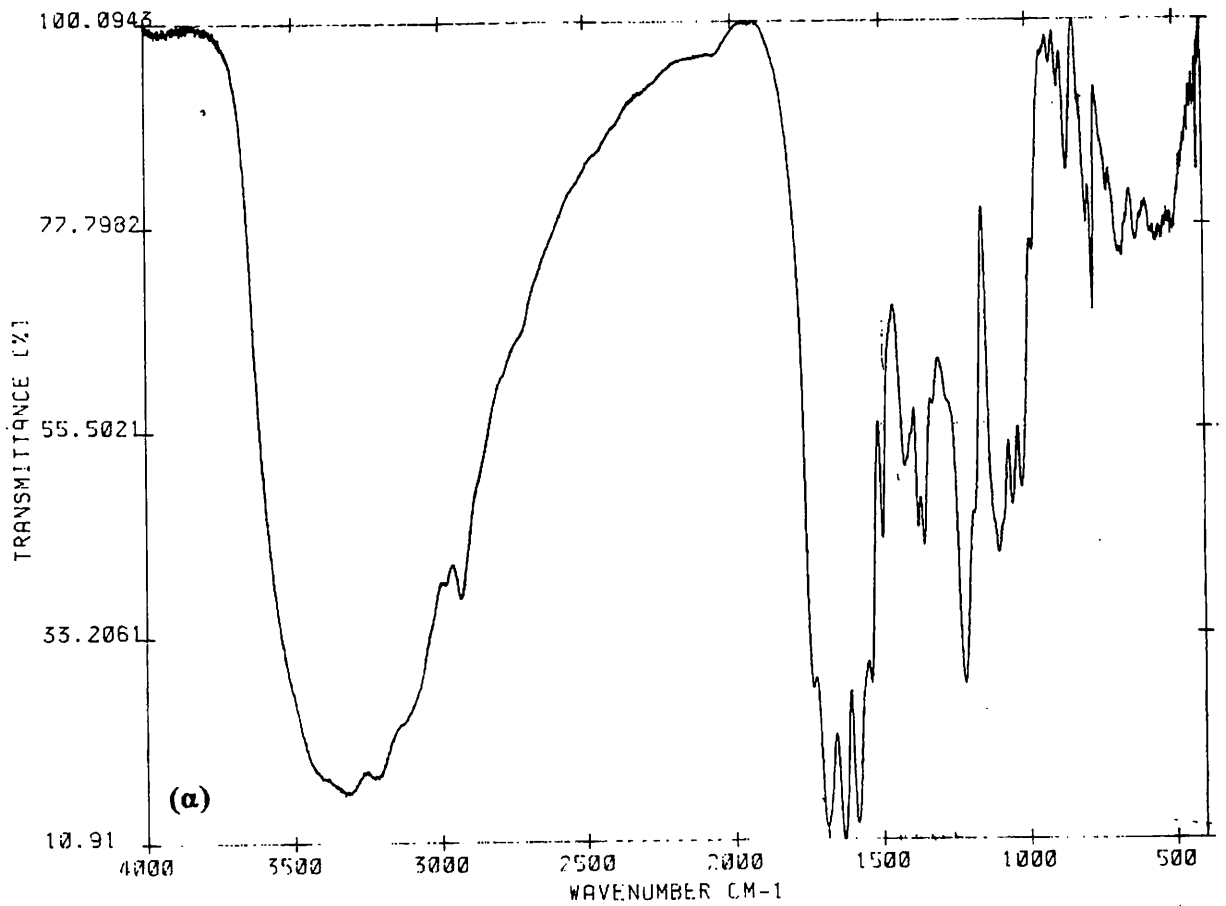
Τα φάσματα υπερώθρου των τριαδικών συμπλόκων αναφέρονται στην περιοχή $4000-200 \text{ cm}^{-1}$ και φαίνονται στις σελίδες 95-99, ενώ οι πιο χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης συγκεντρώνονται στον Πίνακα 4.

Στην περιοχή των $4000-1800 \text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται ευρείες ταινίες που αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης των ομάδων υδροξυλίου [254], των NH ομάδων [255] των νουκλεοζιτών και των αμινοξέων καθώς και

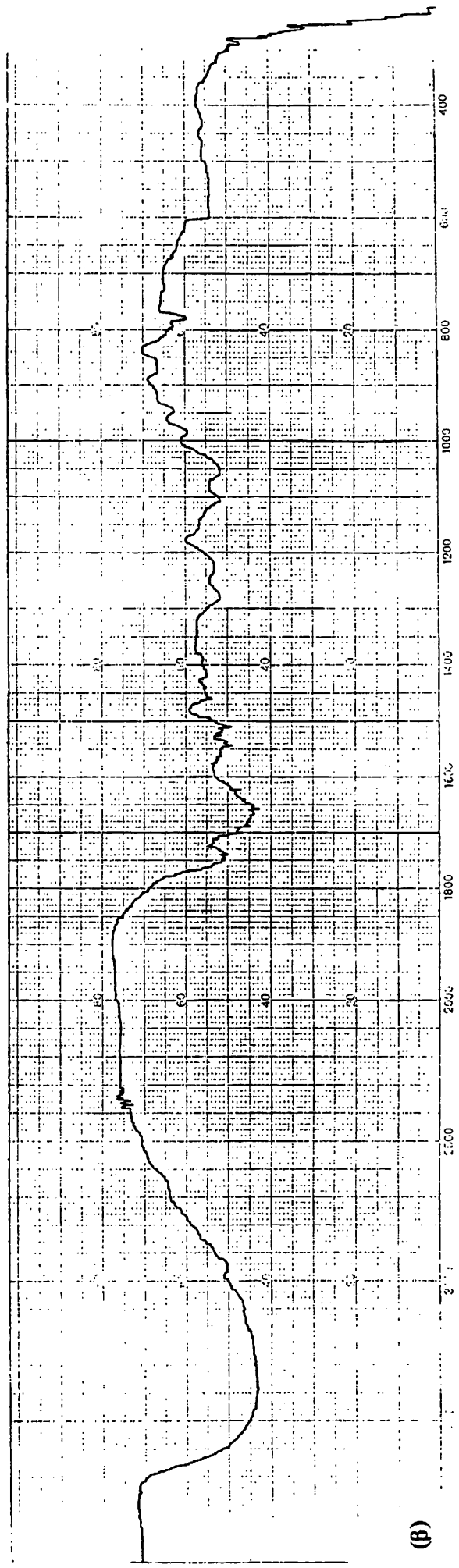
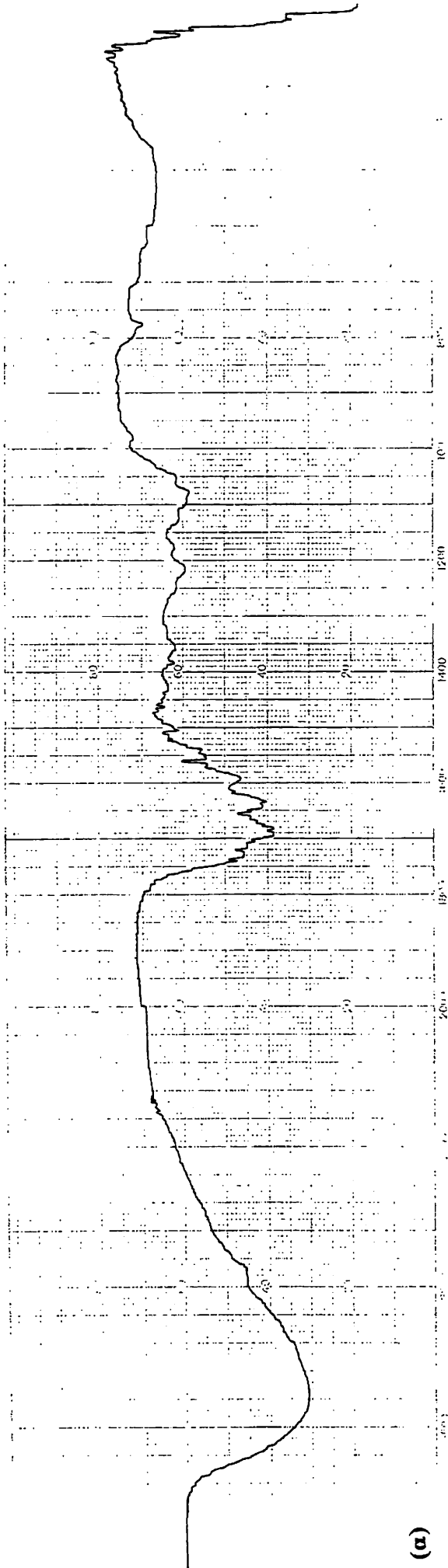
διαπιστώθηκε ότι συμπλοκοποίηση μέσω του N7 έχει σαν αποτέλεσμα η ταινία να παραμένει σχεδόν σταθερή στην περιοχή γύρω στα 1700 cm^{-1} , ενώ συμπλοκοποίηση μέσω N1 ή O6 ή χηλικού δακτυλίου N7-O6 μετατοπίζει την ταινία στα 1625 cm^{-1} [260-264]. Η αντίστοιχη ταινία για τα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη εμφανίζεται στην περιοχή $1655\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$, ενδεικτική της συμπλοκοποίησης του υποκαταστάτη μέσω του αζώτου N3 [84].

Στην ελεύθερη γουανοσίνη, που περιέχει 38% $C_3\text{-endo}$ διαμόρφωση στο σάκχαρο, εμφανίζονται δυο ταινίες στη περιοχή των 800 cm^{-1} : στα 824 cm^{-1} και 801 cm^{-1} αντίστοιχα που οφείλονται στη διαμόρφωση 2E ($C_2\text{-endo}$) και 3E ($C_3\text{-endo}$) η δεύτερη [265]. Στα φάσματα των τριαδικών συμπλόκων με γουανοσίνη η ταινία στα 824 cm^{-1} εμφανίζεται με μειωμένη ένταση, ενώ αντίθετα η ταινία στα 801 cm^{-1} αυξάνεται σε ένταση. Αναμένεται κατά συνέπεια τα σύμπλοκα να εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό 3E διαμόρφωσης από τον ελεύθερο υποκαταστάτη (Βλέπε φάσματα ${}^1\text{H-NMR}$).

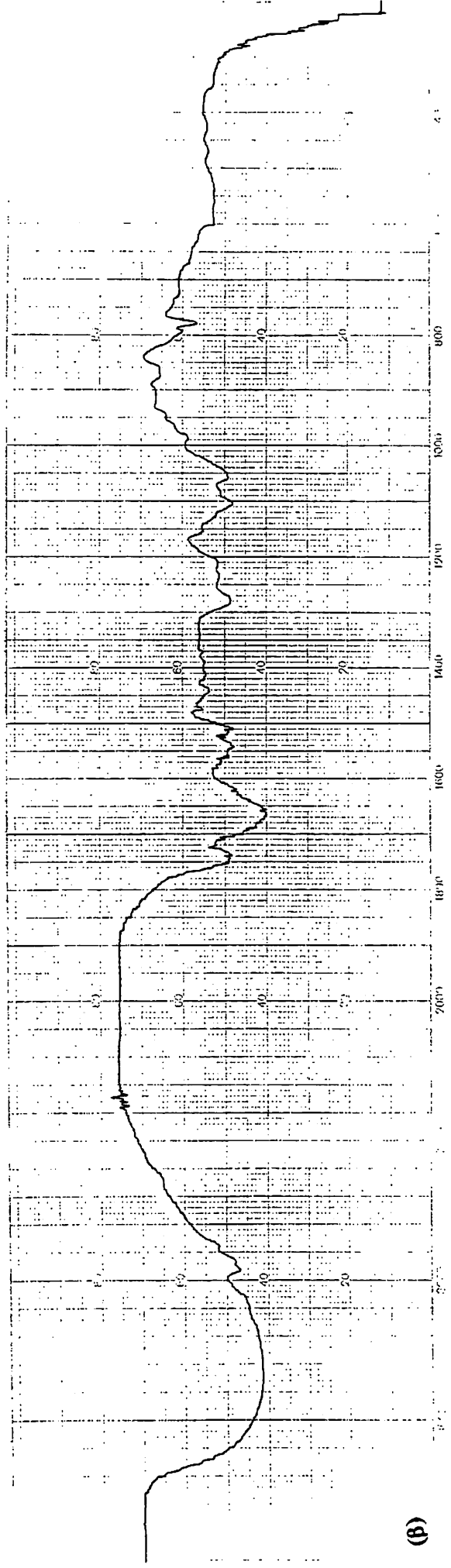
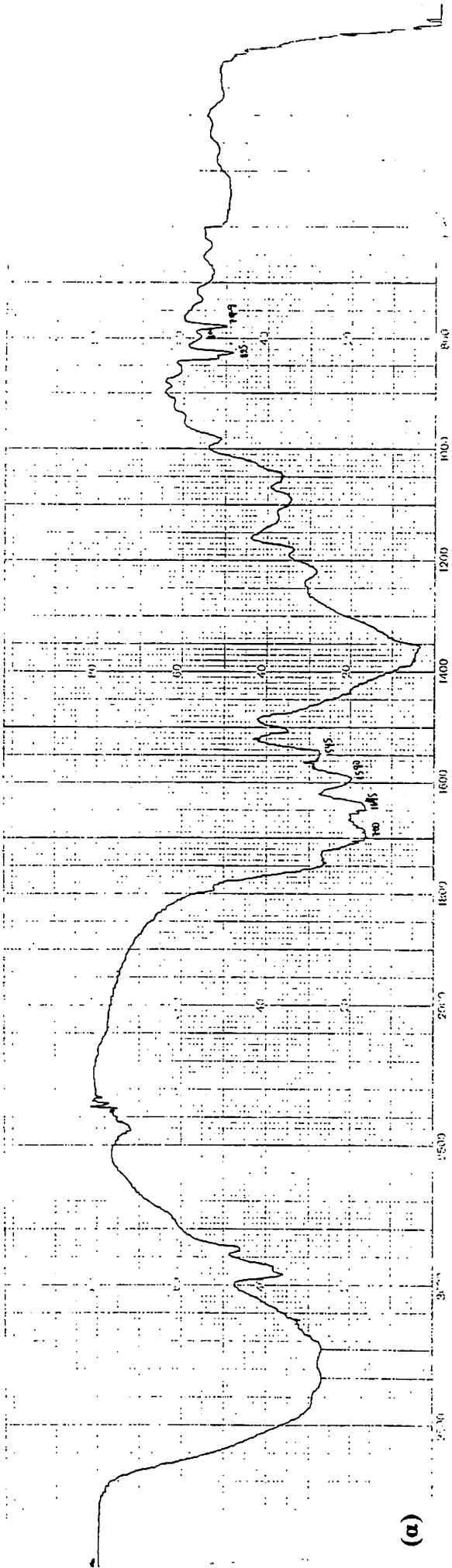
Τέλος, στα φάσματα των τριαδικών συμπλόκων τόσο της γουανοσίνης όσο και της κυτιδίνης δεν εμφανίζονται οι ταινίες που αντιστοιχούν στις δονήσεις Pt-Cl, στα $330\text{-}320\text{ cm}^{-1}$, οι οποίες αντίθετα είναι παρούσες στα φάσματα των δυαδικών συμπλόκων, γεγονός που δηλώνει πως και οι τέσσερις θέσεις υποκαταστατών του Pt(II) έχουν καλυφθεί από άζωτα δότες ηλεκτρονίων.



FT-IR φάσματα των συμπλόκων: (α) $\text{cis-}[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glyglyOEt})_2]\text{Cl}_2$ και
 (β) $\text{cis-}[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{glyglyOEt})_2]\text{Cl}_2$



IR φάσματα των συμπλόκων: (α) $\text{cis-}[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{gly-2-abaOMe})_2]\text{Cl}_2$ και (β) $\text{cis-}[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{gly-2-abaOMe})_2]\text{Cl}_2$



IR φάσματα των συμπλόκων: (α) $\text{cis-}[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glyneuOMe})_2]\text{Cl}_2$ και (β) $\text{cis-}[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{glyneuOMe})_2]\text{Cl}_2$

δημιουργίας ενός θετικού κέντρου, εξ' αιτίας της συμπλοκοποίησης, στο γειτονικό στο πρωτόνιο H8, άζωτο (N7) και ελάττωση έτσι της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, που έχει σαν αποτέλεσμα τελικά την αποπροστασία του πρωτονίου αυτού [90,270]. Η μετατόπιση κατά 0.45 ppm είναι σαφώς μικρότερη από εκείνη που προκαλεί η συμπλοκοποίηση του cis-DDP με γουανοσίνη μέσω N7 (1 ppm) [231,271] και η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη διαμοριακών ή ενδομοριακών υδροφοβων αλληλεπιδράσεων υποκαταστατών (stacking interactions), οι οποίες γενικά μειώνουν την ένταση του παραπάνω φαινομένου. Τα σήματα των υπόλοιπων πρωτονίων (πρωτόνια σακχάρου) μένουν σχεδόν ανεπηρέαστα από τη συμπλοκοποίηση, όπως αναμενόταν, αφού βρίσκονται μακριά από τη θέση δεσμού.

Σε μερικές περιπτώσεις παρασκευής συμπλόκων Pt(II) ή Pd(II) με δύο μόρια γουανοσίνης, παρατηρήθηκε η ύπαρξη ισομερών εκ περιστροφής σε διάλυμα [77,78,272-276]. Αυτό διαπιστώθηκε από την παρατήρηση περισσότερων του ενός σημάτων για τα πρωτόνια H8, τα οποία παύουν να είναι ισοδύναμα. Τα ισομερή αυτά αποδόθηκαν σε διαμορφώσεις “κεφαλής προς κεφαλή” (head-to-head) ή “κεφαλής προς ουρά” (head-to tail) ή σε διαμορφώσεις “ανοιχτού” και “κλειστού” τύπου (Σχήματα 9,36).

Τα $^1\text{H-NMR}$ φάσματα των τριαδικών μας συμπλόκων με γουανοσίνη έδωσαν μόνο ένα σήμα συντονισμού για τα πρωτόνια H8, σε συνηθισμένη θερμοκρασία, γεγονός που δείχνει πως η περιστροφή γύρω από το δεσμό Pt-N7 πραγματοποιείται ελεύθερα και η αλληλομετατροπή μεταξύ των διαμορφωμένων γίνεται πολύ γρήγορα ως προς την NMR κλίμακα χρόνου, ώστε να παρατηρείται μόνο ο μέσος όρος των σημάτων των διαμορφωμένων. Το φαινόμενο αυτό ήταν αναμενόμενο άλλωστε, μια και οι υπόλοιποι υποκαταστάτες (διπεπτίδια) δεν είναι αρκετά ογκώδεις και το Pt(II) είναι μεγαλύτερου γενικά μεγέθους από το Pd(II).

την περίπτωση του τριαδικού συμπλόκου με glyglyOEt, σε όλα τα υπόλοιπα σύμπλοκα δίνει δύο ομάδες διπλών κορυφών ίδιας περιόδου έντασης. (Η τιμή της σταθεράς σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων H6 και H5, $^3J_{H,H}$, διατηρεί σε όλες τις περιπτώσεις την κανονική τιμή της 7.7 Hz). Επίσης παρατηρείται σχάση του σήματος των πρωτονίων του μεθυλεστέρα των διπεπτιδίων (OMe), το οποίο εμφανίζεται ως δύο απλές κορυφές, αντί μιας απλής. Οι παραπάνω παρατηρήσεις υφίστανται ακόμη και ύστερα από τη λήψη φασμάτων 1H -NMR σε θερμοκρασία 90°C.

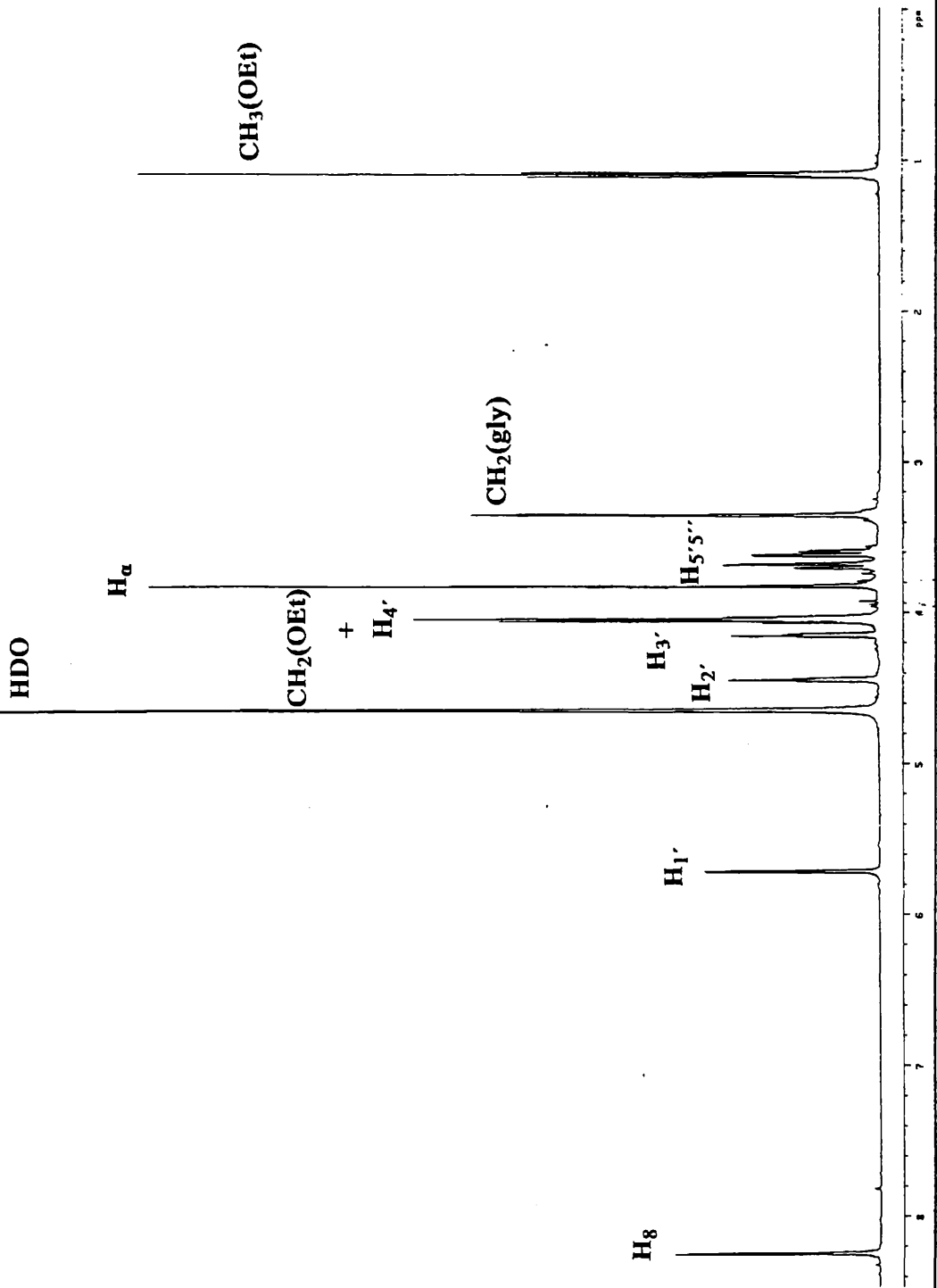
Οι σχάσεις των σημάτων οφείλονται στην ύπαρξη διαμορφωμερών στο διάλυμα και είναι συχνές οι αναφορές τους στη βιβλιογραφία [243,277,280-282]. Τα διαμορφωμερή απαντούν συχνά σε σύμπλοκα παραγώγων κυτοσίνης/κυτιδίνης με λευκόχρυσο, στα οποία η βάση συμπλοκοποιείται μέσω του αζώτου N3. Στην περίπτωση αυτή οι ομάδες NH₂ και C=O, βρίσκονται σε θέση ορθο ως προς το δεσμό Pt-N3, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η περιστροφή γύρω από το δεσμό αυτό και έτσι να είναι δυνατή η παρατήρηση των ισομερών εκ περιστροφής (διαμορφωμερών) στην κλίμακα χρόνου του φάσματος NMR.

Αρχικά, η σχάση των σημάτων συντονισμού για το σύμπλοκο [Pt(en)(Cyd)₂]²⁺ αποδόθηκε από τους Chu, Dunkan και Tobias [243] στην ύπαρξη δύο ισομερών μορφών: “κεφαλής προς κεφαλή” και “κεφαλής προς ουρά”. Στην περίπτωση, όμως που η ένταση όλων των σημάτων είναι η ίδια, δεν είναι δυνατόν να έχουμε μίγμα των δύο αυτών ισομερών μορφών. Ακολουθώντας το συλλογισμό αυτό και πιστεύοντας ότι το ισομερές “κεφαλή προς κεφαλή” δεν ευνοείται ενεργειακά, οι Marzilli [281] και Lippert [282] απέδωσαν το διπλασιασμό των σημάτων NMR σε σύμπλοκα με 1-MeC και dCMP αντίστοιχα, στην ύπαρξη δύο διαστερεομερών με “κεφαλή προς ουρά” προσανατολισμό των νουκλεοβάσεων (Σχήμα 36). Δεχόμαστε ότι αυτά είναι τα διαστερεομερή και στα δικά μας διαλύματα τριαδικών συμπλόκων με κυτιδίνη.

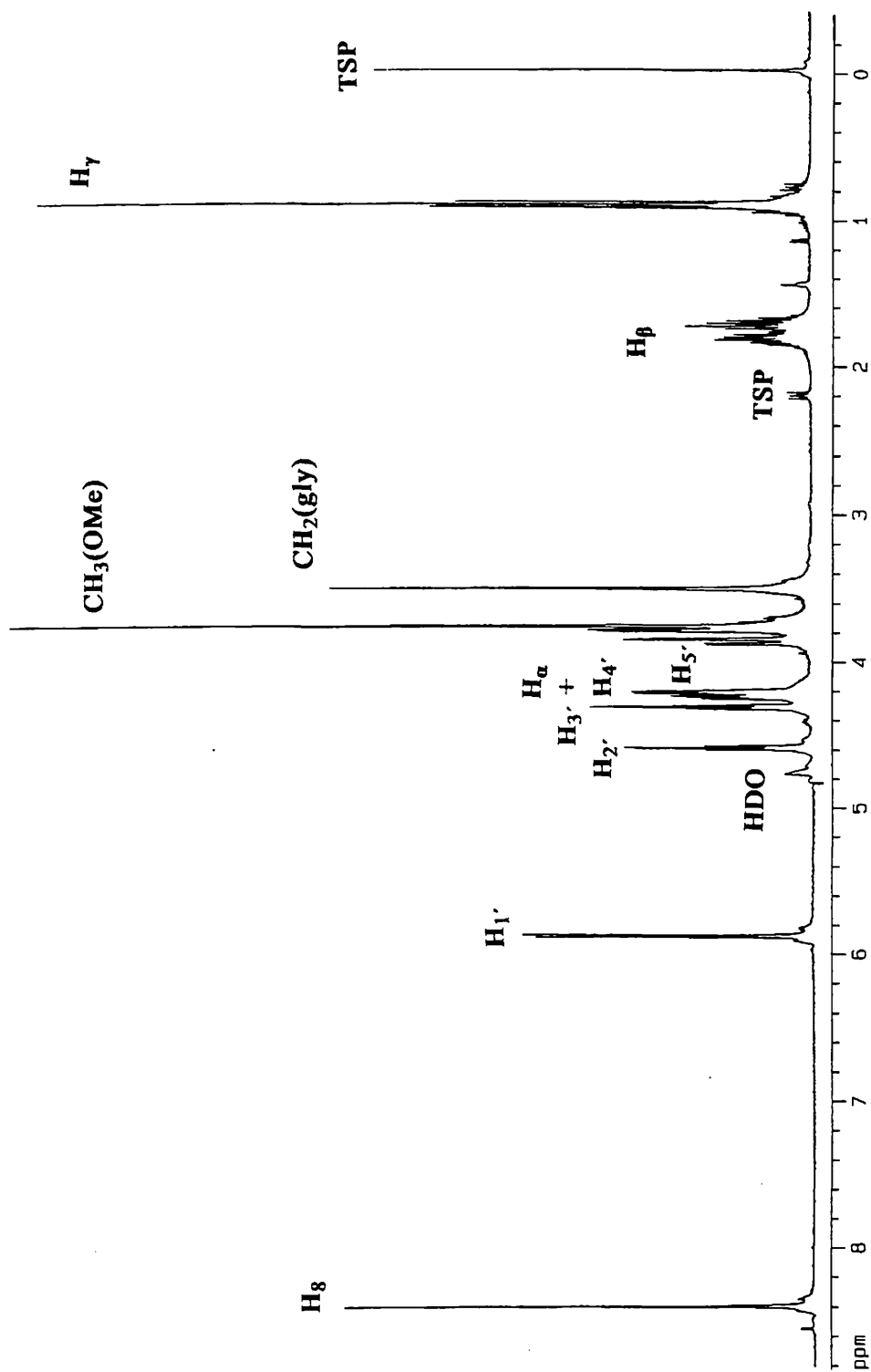
Πίνακας 6: Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των σακχάρων, σταθερές σύζευξης και ποσοστά των gg, ³E και αντι διαμορφώσεων.

Ένωση	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	J _{1'2'}	J _{2'3'}	J _{3'4'}	J _{4'5'}	J _{4'5''}	gg%	gt,lg%	³ E	K _{eq} = ³ E'/E	anti%	
guo	5.89(d)	4.71(t)	4.39(t)	4.21(m)	3.84(m)	5.90	5.20	3.70	3.20	3.80	69	31	38	0.61	51	
cis-[(guo) ₂ Pt(GlyGlyOEt) ₂]Cl ₂	5.89(d)	4.62(t)	4.32(t)	4.23(t)	3.82(m)	4.96	4.72	4.72	2.88	4.08	60	40	49	0.96	64	
cis-[(guo) ₂ Pt(GlyAlaOMe) ₂]Cl ₂	5.90(d)	4.59(t)	4.32(t)	4.20(q)	3.81(m)	4.92	5.02	4.08	2.92	4.16	59	41	45	0.82	69	
cis-[(guo) ₂ Pt(Gly-2-AbaoMe) ₂]Cl ₂	5.89(d)	4.61(t)	4.33(t)	4.22(q)	3.84(m)	4.98	4.80	4.20	2.84	4.08	61	39	46	0.85	66	
cis-[(guo) ₂ Pt(GlyValOMe) ₂]Cl ₂	5.90(d)	4.61(t)	4.33(t)	4.23(q)	3.84(m)	4.84	4.83	4.04	2.76	3.96	67	33	46	0.85	66	
cis-[(guo) ₂ Pt(GlyLeuOMe) ₂]Cl ₂	5.90(d)	4.62(t)	4.34(t)	4.34(q)	3.84(m)	4.80	4.68	4.00	2.56	---	---	---	46	0.85	64	
cyd	5.88(d)	4.30(t)	4.19(t)	4.13(m)	3.85(m)	4.30(t)	4.19(t)	4.13(m)	---	---	---	---	---	---	---	---
cis-[(cyd) ₂ Pt(GlyGlyOEt) ₂]Cl ₂	5.94(d)	4.38(t)	4.26(m)	4.19(s,br)	3.89(m)	4.38(t)	4.26(m)	4.19(s,br)	---	---	---	---	---	---	---	---
cis-[(cyd) ₂ Pt(GlyAlaOMe) ₂]Cl ₂	5.95(d)	4.48(t)	4.38(t)	4.19(s,br)	3.90(m)	4.48(t)	4.24(t)	4.17(m)	---	---	---	---	---	---	---	---
cis-[(cyd) ₂ Pt(Gly-2-AbaoMe) ₂]Cl ₂	5.93(d)	4.38(t)	4.24(t)	4.17(m)	3.88(m)	4.38(t)	4.24(t)	4.17(m)	---	---	---	---	---	---	---	---
cis-[(cyd) ₂ Pt(GlyValOMe) ₂]Cl ₂	5.96(d)	4.47(t)	4.40(t)	4.20(s,br)	3.93(m)	4.47(t)	4.40(t)	4.20(s,br)	---	---	---	---	---	---	---	---
cis-[(cyd) ₂ Pt(GlyLeuOMe) ₂]Cl ₂	5.89(d)	4.46(t)	4.35(t)	4.14(q)	3.86(m)	4.46(t)	4.35(t)	4.14(q)	---	---	---	---	---	---	---	---

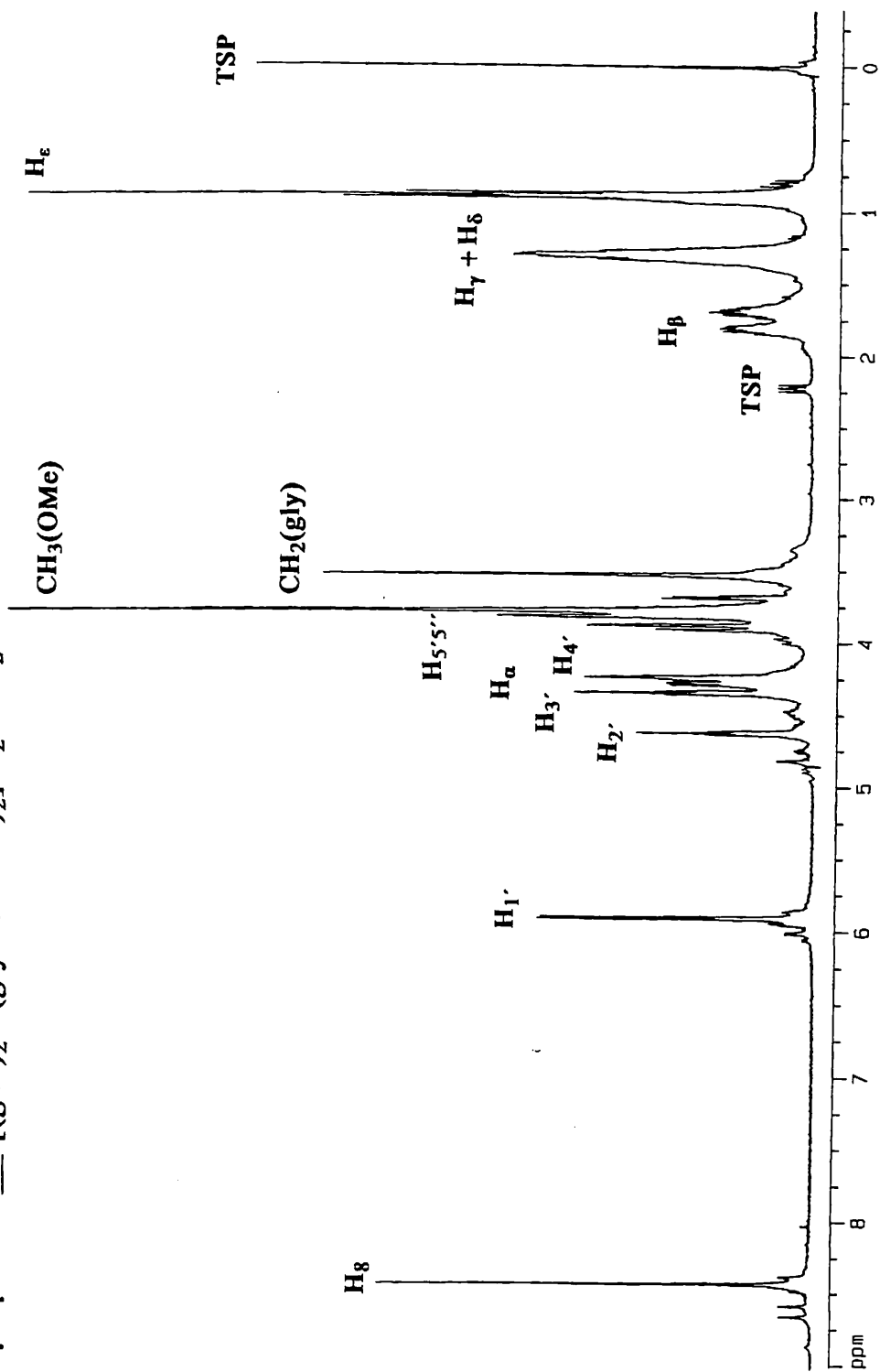
$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glyglyOEt})_2]\text{Cl}_2$ σε D_2O



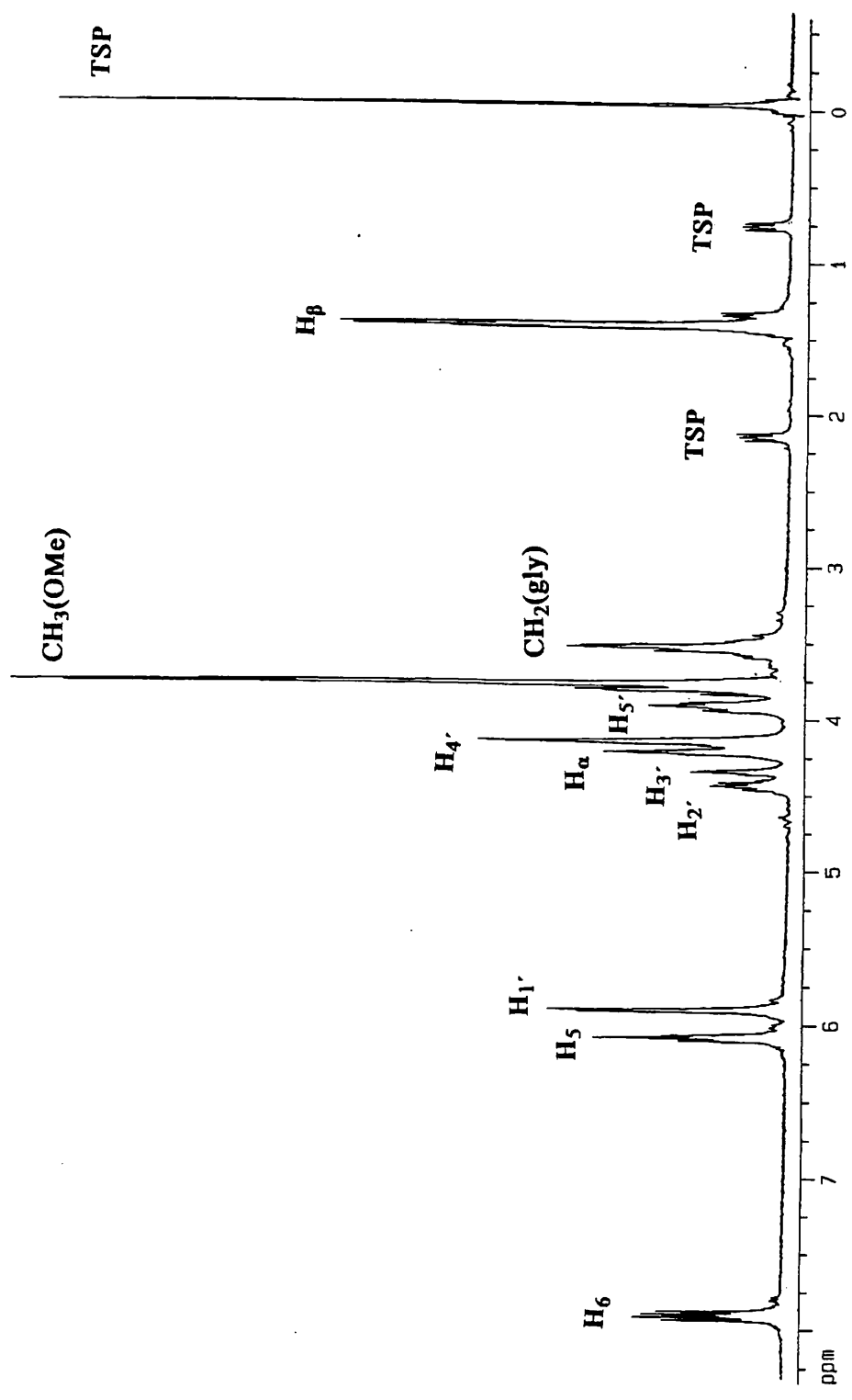
$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*-[(guo) $_2\text{Pt}(\text{gly-2-abaOMe})_2\text{Cl}_2$] σε D_2O



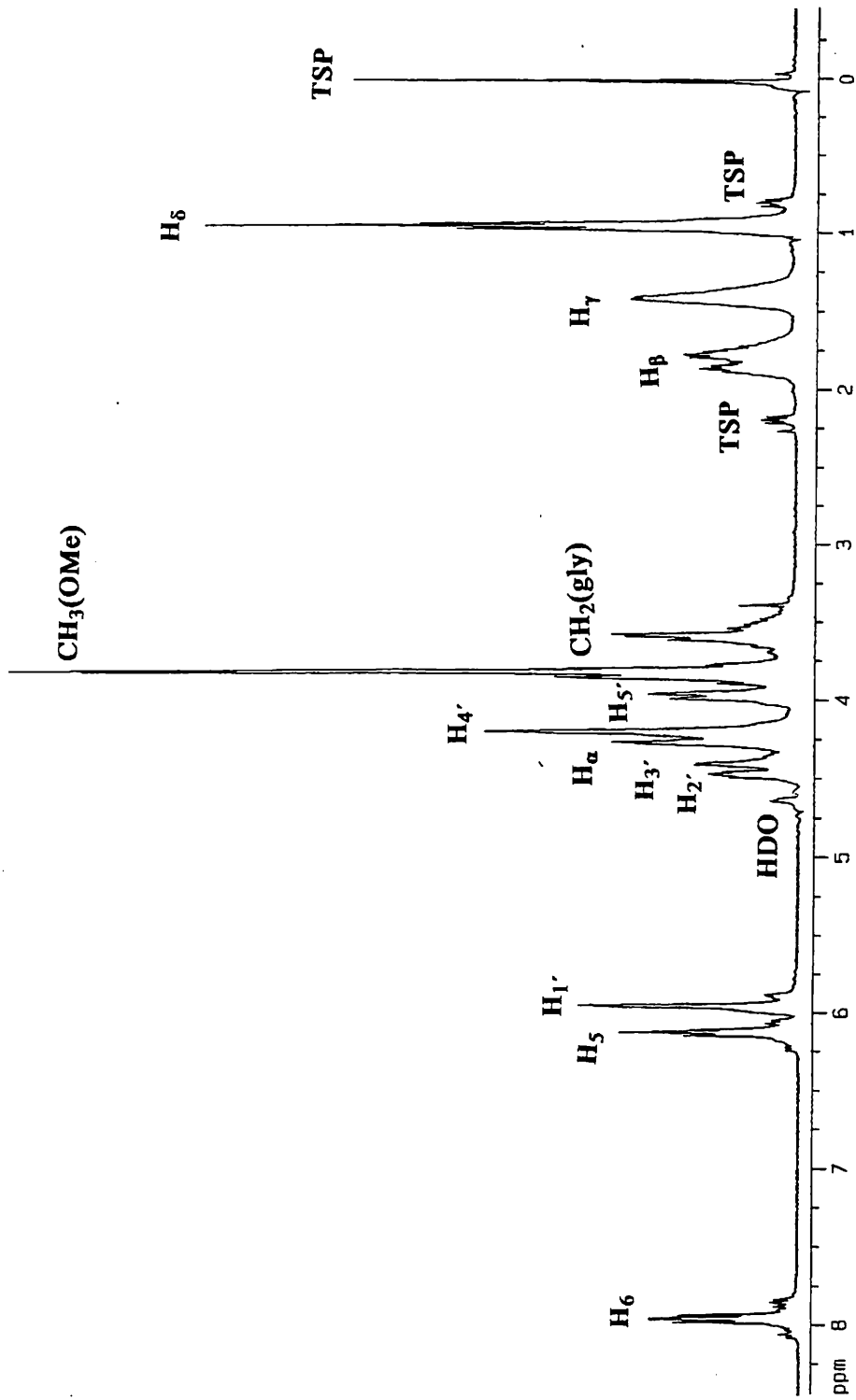
$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glynleuOMe})_2]\text{Cl}_2$ σε D_2O



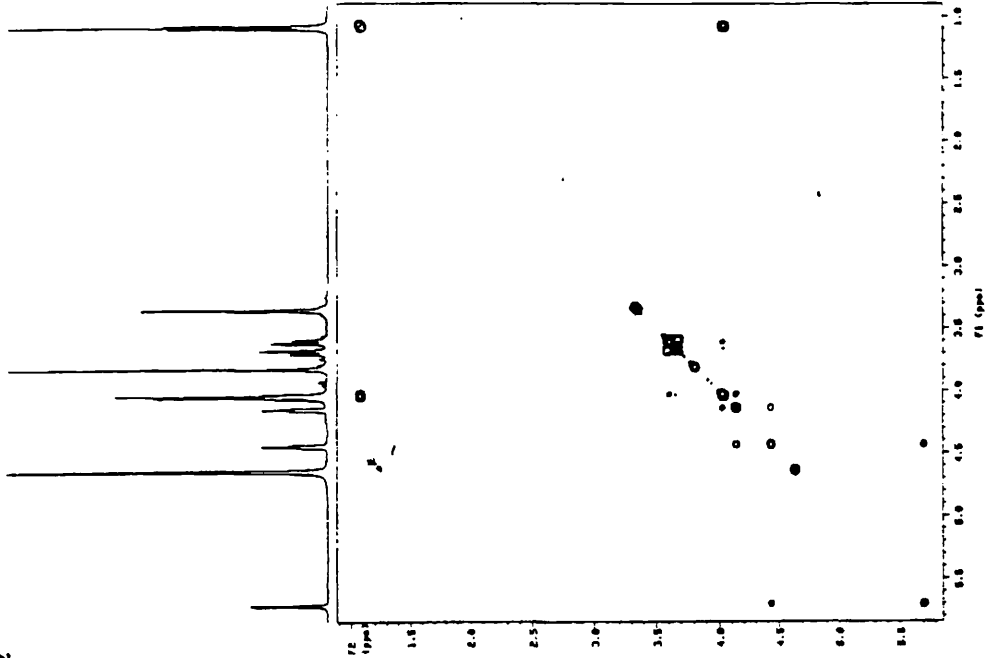
¹H-NMR φάσμα του *cis*-[(*cyd*)₂Pt(*glyalaOMe*)₂]Cl₂ σε D₂O



$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του cis- $[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{glynvalOMe})_2]\text{Cl}_2$ σε D_2O



^1H , ^1H COSY NMR φάσμα του *cis*- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glyglyOEt})_2]\text{Cl}_2$



2.4.2. Διαμόρφωση του σακχάρου

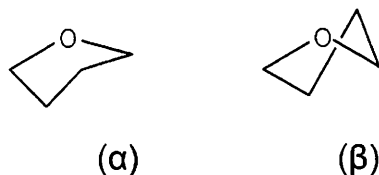
Η μελέτη της διαμόρφωσης του σακχάρου των νουκλεοζιτών κατά την πλατινίωσή τους είναι πολύ σημαντική, ώστε να βγάλουμε γενικότερα συμπεράσματα σχετικά με τη συνολική μεταβολή της δομής του DNA κατά την αλληλεπίδρασή του με το cisplatin και στη συγκεκριμένη περίπτωση κατά το σχηματισμό διασταυρούμενων δεσμών DNA-Pt-πρωτεϊνών.

Μέσω της τεχνικής της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μπορούμε να μελετήσουμε τη σκελετική διαμόρφωση της ριβόζης, τη διαμόρφωση γύρω από το δεσμό C₄-C₅ και τέλος τη σχετική θέση του σακχάρου ως προς τον πουρινικό ή πυριμιδινικό δακτύλιο, υπολογίζοντας από τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του σακχάρου τις σταθερές σύζευξης (J) μεταξύ τους.

Η πολλαπλότητα των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων καλείται σύζευξη spin-spin και οφείλεται σε αλληλεπίδραση με τα spin γειτονικών μαγνητικών πυρήνων, η οποία διαδίδεται όχι μέσω του χώρου, αλλά μέσω των δεσμών του μορίου. Χαρακτηριστικό των πολλαπλών κορυφών είναι ότι αυτές ισαπέχουν μεταξύ τους και η απόσταση αυτή σε Hz είναι ίδια για τα πρωτόνια που αλληλεπιδρούν ή βρίσκονται σε σύζευξη και ονομάζεται σταθερά σύζευξης J των πρωτονίων αυτών. Η σταθερά σύζευξης J μεταξύ δυο πρωτονίων που χωρίζονται από τρεις δεσμούς συμβολίζεται ως ³J [283].

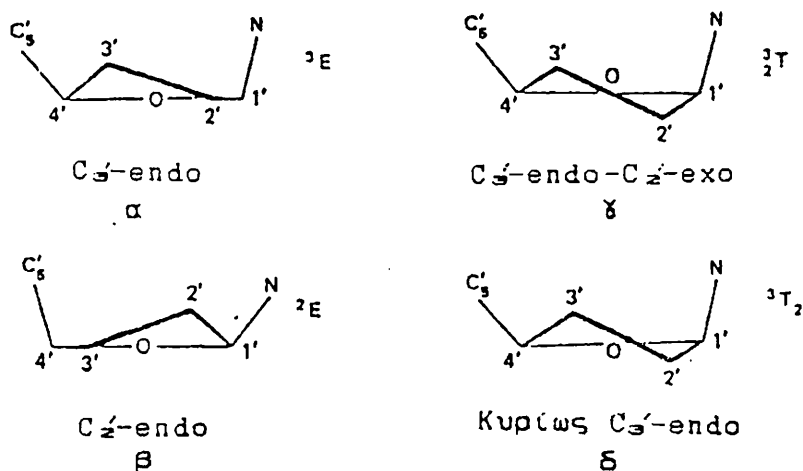
Σε διαλύτη D₂O ένα τυπικό φάσμα της ριβόζης έχει τη μορφή που φαίνεται στο Σχήμα 37. Για το πρωτόνιο H₁ παρουσιάζεται μια διπλή ταινία συντονισμού λόγω της σύζευξης με το πρωτόνιο H₂. Η απόσταση των δυο ταινιών μετρημένη σε Hz αποτελεί τη σταθερά σύζευξης J_{1,2}. Η τριπλή ταινία που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H₂ οφείλει την πολλαπλότητά της στη σύζευξη με τα πρωτόνια H₁ και H₃. Ο υπολογισμός της σταθεράς σύζευξης J_{2,3} φαίνεται στο Σχήμα 37. Η πολλαπλότητα της ταινίας του πρωτονίου H₃ οφείλεται στη σύζευξη με

αυτό, ενώ στη δεύτερη διαμόρφωση τρία άτομα ορίζουν ένα επίπεδο και τα άλλα δυο βρίσκονται πάνω και κάτω από αυτό (Σχήμα 38).



Σχήμα 38: Διαμορφώσεις του σακχάρου: α) "φακέλου" και β) "λικνιζόμενη".

Αν το εκτός επιπέδου άτομο βρίσκεται από την πλευρά του C_5 , τότε η διαμόρφωση είναι endo, π.χ. C_3 -endo, ενώ αν βρίσκεται από την αντίθετη πλευρά είναι exo, π.χ. C_2 -exo. Αν είναι διαμόρφωση φακέλου συμβολίζεται με το γράμμα E, ενώ αν είναι λικνιζόμενη με το γράμμα T. Πάνω αριστερά του γράμματος υπάρχει ο αριθμός της θέσης του ατόμου, αν αυτό είναι endo και κάτω αριστερά αν αυτό είναι exo, π.χ. 3E , 2E ή 3_2T (Σχήμα 39).



Σχήμα 39: (α) C_3 -endo διαμόρφωση, (β) C_2 -endo διαμόρφωση, (γ) C_3 -endo - C_2 -exo διαμόρφωση, (δ) κυρίως C_3 -endo διαμόρφωση.

Οι Altona και Sundaralingam [284] προσδιόρισαν μια μέθοδο υπολογισμού της διαμόρφωσης αυτής του σακχάρου, που προϋποθέτει

Επιλύοντας το σύστημα εξισώσεων:

$$K_{eq} = \frac{X_S}{X_N} = \frac{J_{1'2'}}{J_{3'4'}} \quad X_S + X_N = 1$$

έχουμε:

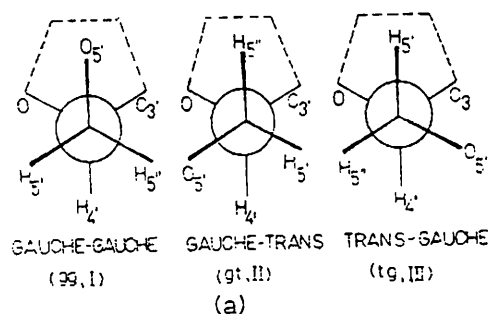
$$X_S = \frac{J_{1'2'}}{J_{1'2'} + J_{3'4'}} \quad (2) \quad \text{και} \quad X_N = \frac{J_{3'4'}}{J_{1'2'} + J_{3'4'}} \quad (3)$$

Χρησιμοποιώντας τις παραπάνω εξισώσεις υπολογίστηκε το ποσοστό της διαμόρφωσης του σακχάρου και σε σύμπλοκα νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων με Pt(II) και *cis*-DDP [259,293-296].

Χρησιμοποιώντας τις παραπάνω εξισώσεις βρέθηκε ότι η ελεύθερη γουανοσίνη έχει ποσοστό C₃-*endo* διαμόρφωσης (³E) 38% [288], η ινοσίνη 45% ³E [284] και η αδενοσίνη 40% ³E [284]. Οι πυριμιδινικοί νουκλεοζίτες παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό ³E διαμόρφωσης, 60% η κυτιδίνη και 58% η ουριδίνη [297]. Τα 5'-φωσφορικά νουκλεοτίδια για τους μεν πουρινικούς νουκλεοζίτες διατηρούν το ίδιο επίπεδο ³E διαμόρφωσης, ενώ για τους πυριμιδινικούς το μειώνουν κατά 20% περίπου [287]. Παρόμοια είναι τα ποσοστά που υπολογίστηκαν για τα τρι- και τετρα-νουκλεοτίδια [291,293].

Πλατινίωση στη θέση N7 της γουανοσίνης προκαλεί αλλαγή της διαμόρφωσης του δακτυλίου της ριβόζης από C₂-*endo* σε C₃-*endo* [293-295,298,265]. Ενώ η ελεύθερη γουανοσίνη έχει ποσοστό ³E διαμόρφωσης 38%, σύμπλοκά της με το λευκόχρυσο παρουσιάζουν αύξηση του ποσοστού αυτού κατά 10% περίπου. Για παράδειγμα το σύμπλοκο [(NH₃)₃Pt(guo)]²⁺ έχει ποσοστό ³E 45% ενώ το σύμπλοκο *cis*-[(NH₃)₂Pt(guo)₂]²⁺ έχει ποσοστό 47% [265]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η συμπεριφορά του σακχάρου του νουκλεοζίτη κατά τη

γύρω από το δεσμό C_4-C_5 . Από τη γωνία στροφής του δεσμού αυτού εξαρτάται η σχετική θέση των φωσφορικών ομάδων δυο γειτονικών σακχάρων και συνεπώς η γεωμετρία του πολυνουκλεοτιδίου. Η γωνία αυτή συμβολίζεται με το γράμμα γ [299] και είναι η διεδρη γωνία που σχηματίζεται μεταξύ των επιπέδων $C_4-C_5-O_5'$ και $C_5-C_4-C_3'$. Σε διάλυμα η γωνία αυτή μπορεί να πάρει θεωρητικά όλες τις δυνατές τιμές. Η τελική διαμόρφωση του σακχάρου αποτελεί μια δυναμική ισορροπία μεταξύ των εξής διαμορφώσεων: τη διαμόρφωση *gauche-gauche* (gg), στην οποία η ομάδα $5'-OH$ βρίσκεται πάνω από το δακτύλιο του σακχάρου και η γωνία γ έχει τιμή 60° και τις διαμορφώσεις *gauche-trans* (gt) *trans-gauche* (tg), όπου η ομάδα $5'-OH$ βρίσκεται εκτός του δακτυλίου, ενώ το άτομο H_4' βρίσκεται σε θέση *trans* ως προς ένα μεθυλενικό άτομο υδρογόνου. Στις δυο τελευταίες διαμορφώσεις η γωνία γ έχει τιμή 180° . Οι κατά Newman τύποι των παραπάνω διαμορφώσεων φαίνονται στο Σχήμα 41.

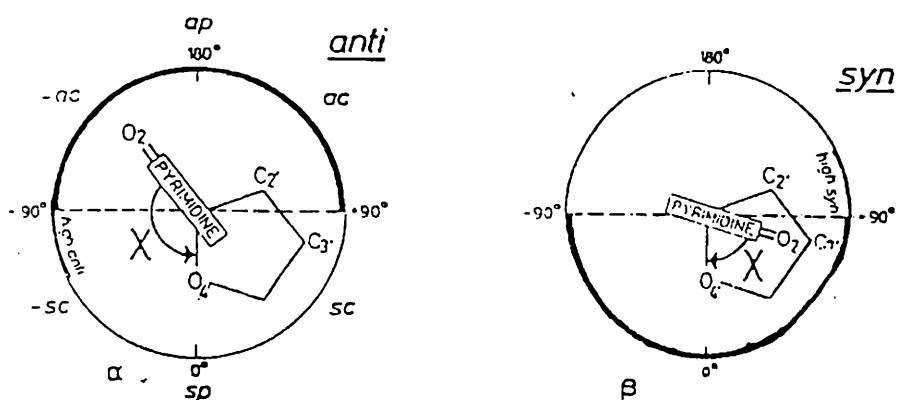


Σχήμα 41: Κατά Newman τύποι των διαμορφώσεων gg, gt και tg.

Τα ποσοστά των διαμορφώσεων gg, tg και gt μπορούν να υπολογιστούν αν γνωρίζουμε το άθροισμα των τιμών των σταθερών σύζευξης $J_{4'5'}$ και $J_{4'5''}$. Έτσι, στη διαμόρφωση gg το άθροισμα αυτό είναι μικρό, της τάξης των 2-4 Hz, ενώ στις διαμορφώσεις tg και gt το άθροισμα αυτό είναι μεγάλο, της τάξης των 8-10 Hz [300].

Οι Davies και Danyluk [287] πρότειναν τον παρακάτω τύπο, για τον υπολογισμό των ποσοστών των διαμορφώσεων αυτών:

επιπέδων $O_4 \cdot C_1 \cdot N_9$ και $C_1 \cdot N_9 \cdot C_2'$ και στις πυριμιδίνες σαν η διεδρη γωνία μεταξύ των επιπέδων $O_4 \cdot C_1 \cdot N_1$ και $C_1 \cdot N_1 \cdot C_2'$.



Σχήμα 42: Anti και syn διαμορφώσεις του σακχάρου του νουκλεοζίτη.

Μελέτες φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ σε 8-υποκατεστημένους νουκλεοζίτες [303-306] και νουκλεοτίδια [307-310] ασχολήθηκαν με την επίδραση της ύπαρξης ογκωδών υποκαταστατών στη διαμόρφωση του σακχάρου. Έτσι βρέθηκε ότι η βρωμίωση στη θέση 8 της γουανοσίνης δημιουργεί syn διαμόρφωση και σταθεροποιεί την Z-έλικα του DNA [311], ενώ το προϊόν της αντίδρασης του cis-DDP με d-GMP σε διάλυμα D_2O , δείχνει ότι η διαμόρφωση του σακχάρου γύρω από το γλυκοζιτικό δεσμό είναι anti [271]. Επίσης, η αντίδραση της γουανοσίνης με το καρκινογόνο AAF (2-ακετυλάμινο-φθορίδιο) προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση του σακχάρου από anti σε syn [307]. Οι αλλαγές αυτές παρατηρήθηκε ότι σχετίζονται με τη μετατόπιση του πρωτονίου H_2' στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της ένωσης. Μετατόπιση σε χαμηλότερα πεδία συνδέεται με μεταβολή στη διαμόρφωση του σακχάρου από anti σε syn, ενώ μετατόπιση σε υψηλότερα πεδία συνδέεται με μεταβολή από syn σε anti [294]. Η γρήγορη ισορροπία μεταξύ των δυο μορφών syn και anti έχει σαν αποτέλεσμα η παρατηρούμενη χημική μετατόπιση να δίνεται από τη σχέση:

$$\delta_{\text{παρ}} = P_{\text{syn}} \cdot \delta_{\text{syn}} + P_{\text{anti}} \cdot \delta_{\text{anti}} \quad (5)$$

Στο *t* ισομερές οι ογκώδεις υποκαταστάτες R βρίσκονται σε θέση trans ως προς την καρβοξυλομάδα, ενώ στα ισομερή *h* και *g* βρίσκονται σε θέση gauche. Επίσης, στο ισομερές *h* οι τρεις υποκατεστημένες ομάδες (NH₃, COO⁻, R) και τα τρία άτομα υδρογόνου βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις.

Τα ποσοστά των ισομερών αυτών στο διάλυμα μπορούν να υπολογιστούν αν γνωρίζουμε τις τιμές των σταθερών σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων J_{AC} και J_{BC} , με βάση τις σχέσεις του Martin [297,313]:

$$h = \frac{J_T + J_G - 2J_{av}}{J_T - J_G}, \quad J_{av} = (J_{AC} + J_{BC}) / 2, \quad J_G = 2.4 \text{ Hz}, \quad J_T = 13.3 \text{ Hz} \quad (6)$$

Πίνακας 8: Σταθερές σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων της α - και β -θέσης των αμινοξέων και κατανομή των διαμορφωμένων εκ περιστροφής για τα δυαδικά και τριαδικά με γουανοσίνη σύμπλοκα του Pt(II).

Σύμπλοκα	$J_{AC} + J_{BC}$	h%	(g+t)%
cis-Cl ₂ Pt(Gly-2-AbaOMe) ₂	10.80	44.9	55.1
cis-Cl ₂ Pt(GlyValOMe) ₂	11.00	43.1	56.9
cis-Cl ₂ Pt(GlyLeuOMe) ₂	10.50	47.7	52.3
cis-[(guo) ₂ Pt(Gly-2-AbaOMe) ₂]Cl ₂	11.76	36.1	63.9
cis-[(guo) ₂ Pt(GlyValOMe) ₂]Cl ₂	11.12	42.0	58.0
cis-[(guo) ₂ Pt(GlyLeuOMe) ₂]Cl ₂	10.96	43.5	56.5

Στον Πίνακα 8 βρίσκονται οι τιμές των σταθερών σύζευξης καθώς και τα ποσοστά των ισομερών *h* και *g+t*, όπως υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τις παραπάνω σχέσεις, για τα δυαδικά και τα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη και τα διπεπτίδια Gly-2-AbaOMe, GlyValOMe και GlyLeuOMe. Παρατηρούμε ότι το ποσοστό του *h* διαμορφωμερούς μειώνεται καθώς περνάμε από τα δυαδικά στα τριαδικά σύμπλοκα, με αποτέλεσμα να επικρατούν τα διαμορφωμερή *t* και *g* στο διάλυμα. Αυτό ενδεχομένως δείχνει ότι με την εισαγωγή του νουκλεοζίτη στα δυαδικά σύμπλοκα η αλειφατική πλευρική αλυσίδα του

συμπλόκων καθώς και των υποκαταστατών φαίνονται στον Πίνακα 9. Η απόδοση των σημάτων συντονισμού των πυρήνων ^{13}C για τους ελεύθερους υποκαταστάτες έγινε κυρίως με τη βοήθεια της βιβλιογραφίας [318,319].

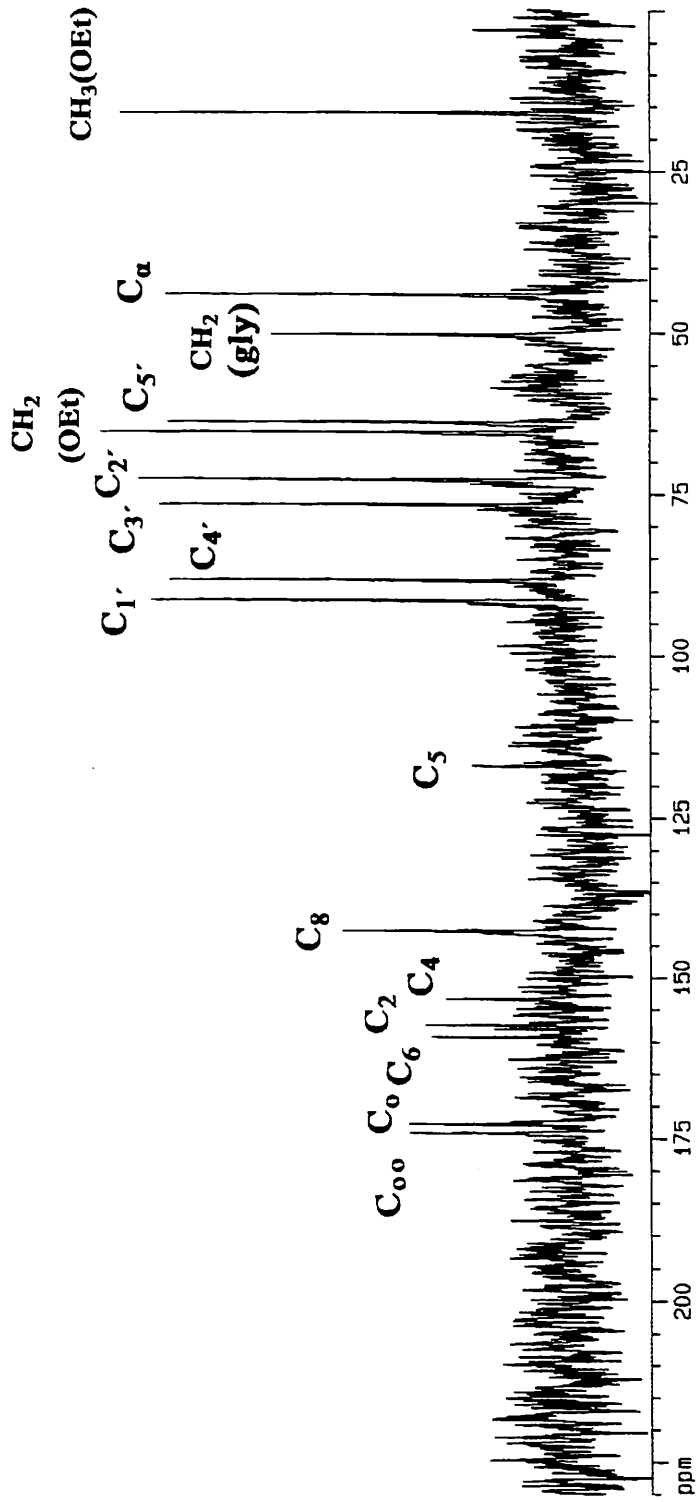
Στα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις προς χαμηλότερα πεδία (downfield) παρατηρούνται για τον C8, ο οποίος βρίσκεται πλησιέστερα στο σημείο δεσμού. Οι μετατοπίσεις αυτές είναι περίπου 7 ppm σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη. Μετατοπίσεις σε χαμηλότερα πεδία παρατηρούνται και για όλα τα υπόλοιπα άτομα άνθρακα του πουρινικού δακτυλίου και του σακχάρου της γουανοσίνης, σε μικρότερη έκταση όμως (2-4 ppm). Οι παρατηρούμενες μετατοπίσεις είναι ενδεικτικές για τη μέσω N7 σύνδεση του νουκλεοζίτη [319,320].

Στα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη παρατηρούμε αντίθετα, μετατοπίσεις σε υψηλότερα πεδία κυρίως για τον άνθρακα C2, ο οποίος βρίσκεται κοντά στο σημείο δεσμού. Οι μετατοπίσεις αυτές είναι περίπου 2.5 ppm σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη (Πίνακας 9) και είναι παρόμοιες με αυτές που έχουν παρατηρηθεί στο παρελθόν σε ανάλογα συστήματα [80,318]. Τα υπόλοιπα άτομα άνθρακα δεν επηρεάζονται σημαντικά.

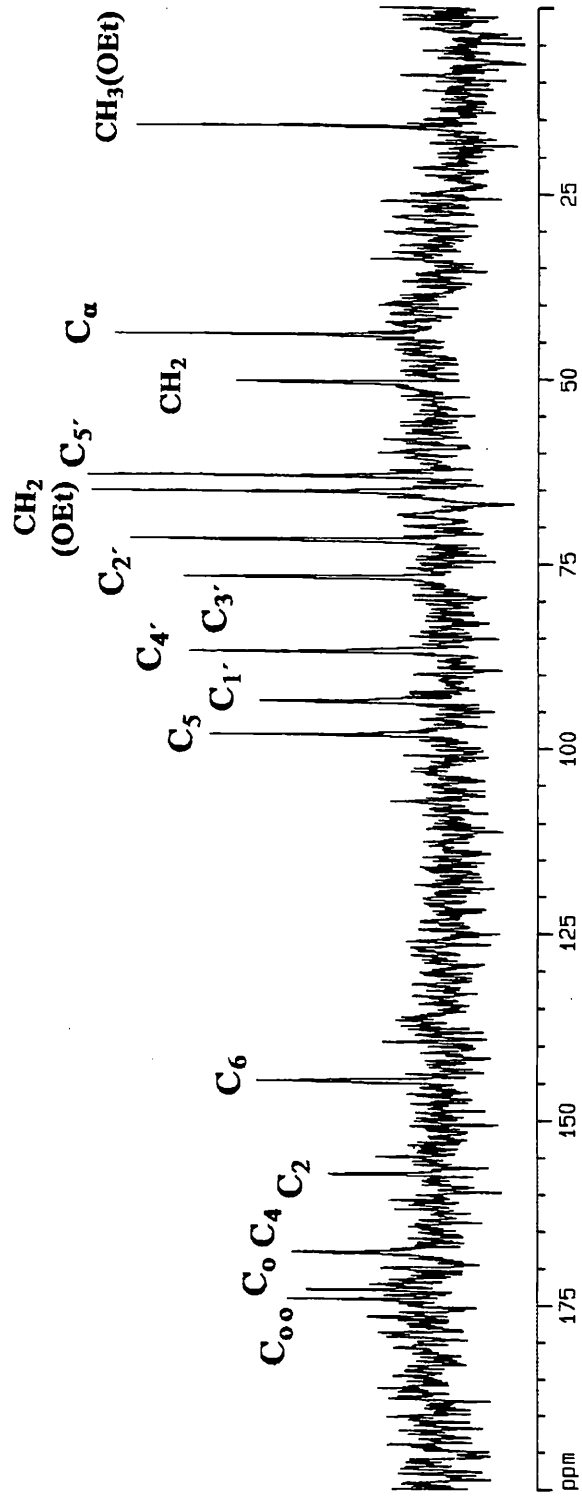
Αντίθετα από ό,τι παρατηρήσαμε στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$, στην περίπτωση των φασμάτων $^{13}\text{C-NMR}$ κάθε άτομο άνθρακα της κυτιδίνης δίνει μόνο ένα σήμα συντονισμού. Αν και διαπιστώσαμε την ύπαρξη διαμορφωμερών για τα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη, οι διαφορές στο περιβάλλον τους είναι μικρές και έτσι λαμβάνοντας υπόψη τη δύναμη του πεδίου που εφαρμόστηκε κατά τη λήψη των φασμάτων $^{13}\text{C-NMR}$, δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός των σημάτων [321].

Από τα άτομα άνθρακα των διπεπτιδίων GlyGlyOEt και GlyAlaOMe, η μεγαλύτερη μετατόπιση παρατηρείται για τον άνθρακα της μεθυλενομάδας της γλυκίνης, ο οποίος βρίσκεται συνδεδεμένος με την τελική αμινομάδα του διπεπτιδίου. Η μετατόπιση αυτή είναι κατά

^{13}C -NMR φάσμα του *cis*- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glyglyOEt})_2]\text{Cl}_2$



^{13}C -NMR φάσμα του *cis*- $[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{glyglyOEt})_2]\text{Cl}_2$



2.6. Συμπεράσματα

1. Στα οis-τριαδικά σύμπλοκα του Pt(II) με τους νουκλεοζίτες γουανοσίνη και κυτιδίνη και με διπεπτίδια η ένταξη των υποκαταστατών πραγματοποιείται μέσω των N7, N3 και της τελικής αμινομάδας αντίστοιχα.
2. Τα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη βρίσκονται στο διάλυμα σε μορφή μίγματος δυο διαμορφωμένων με προσανατολισμό των βάσεων “κεφαλή προς ουρά”.
3. Μεταξύ των υποκαταστατών υπάρχουν υδρόφοβες αλειφατικές-αρωματικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες μειώνονται με την αύξηση της απόστασης από το σημείο δεσμού με το μέταλλο.
4. Το ποσοστό του *h* ισομερούς για τα διπεπτίδια στα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη εμφανίζεται μειωμένο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δυαδικά, ενώ αυξάνεται καθώς αυξάνεται η πλευρική αλειφατική αλυσίδα του δεύτερου αμινοξέος των διπεπτιδίων.
5. Για τα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού της ³E διαμόρφωσης σε σχέση με την ελεύθερη γουανοσίνη κατά 8-11%, ανεξάρτητα από το μέγεθος της πλευρικής αλυσίδας του διπεπτιδίου. Αντίθετα για το ποσοστό της *gg* διαμόρφωσης παρατηρήθηκε μείωση κατά περίπου 9% σε σχέση με την ελεύθερη γουανοσίνη. Τέλος η anti διαμόρφωση ήταν αυξημένη κατά 15%.
6. Στο πρότυπο DNA-Pt-πρωτεΐνης τα παραπάνω θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν για να πούμε ότι υπάρχουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ DNA και πρωτεΐνης, οι οποίες αν και ασθενείς σε σχέση π.χ. με τις ιονικές αλληλεπιδράσεις ή τους δεσμούς υδρογόνου, συνεισφέρουν στην αύξηση της σταθερότητας του διασταυρούμενου δεσμού cis-γεωμετρίας. Επίσης, η παρουσία του διπεπτιδίου, ως πρωτεϊνικού μοντέλου, επηρεάζει τη διαμόρφωση των νουκλεοζιτών, που χρησιμεύουν ως μοντέλα του DNA,

3. ΤΡΙΑΔΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΛΕΥΚΟΧΡΥΣΟΥ(II) ΜΕ ΤΟΥΣ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΓΟΥΑΝΟΣΙΝΗ ΚΑΙ ΚΥΤΙΔΙΝΗ ΚΑΙ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

3.1. Εισαγωγή

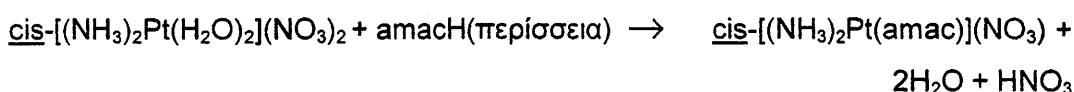
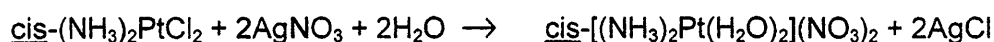
Συνεχίζοντας τη μελέτη cis-τριαδικών συστημάτων του Pt(II) με τους νουκλεοζίτες γουανοσίνη και κυτιδίνη, παρασκευάσαμε μια νέα σειρά συμπλόκων αντικαθιστώντας τα διπεπτίδια με απλά αμινοξέα, επιχειρώντας μια σύγκριση αυτών με τα αντίστοιχα τριαδικά σύμπλοκα με διπεπτίδια, καθώς και με τα ανάλογά τους με τις νουκλεοβάσεις 9-μέθυλο-γουανίνη και 1-μέθυλο-κυτιδίνη [84-88] ή με τα ανάλογα σύμπλοκα του Pd(II) [77-78].

Τα αμινοξέα επιλέχθηκαν έτσι ώστε να επιτευχθεί σταδιακή αύξηση της αλειφατικής πλευρικής αλυσίδας με σκοπό να παρατηρηθούν οι συνέπειες αυτής της αύξησης στον τρόπο αλληλεπίδρασης αμινοξέος-νουκλεοζίτη.

Η φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού αποδείχτηκε για άλλη μια φορά σπουδαίο εργαλείο για τη μελέτη της δομής των συμπλόκων και της διαμόρφωσης των υποκαταστατών τους και της αλληλεπίδρασης των υποκαταστατών στα σύμπλοκα.

3.2. Σύνθεση των τριαδικών συμπλόκων

Αρχικά παρασκευάσθηκαν τα χηλικά σύμπλοκα με τα πέντε αμινοξέα (amacH): γλυκίνη (gly), L-αλανίνη (ala), L-2-αμινοβουτυρικό οξύ (2-aba), L-νορβαλίνη (nval) και L-νορλευκίνη (nleu), με βάση τις μεθόδους τις βιβλιογραφίας [339,340] και σύμφωνα με το σχήμα:

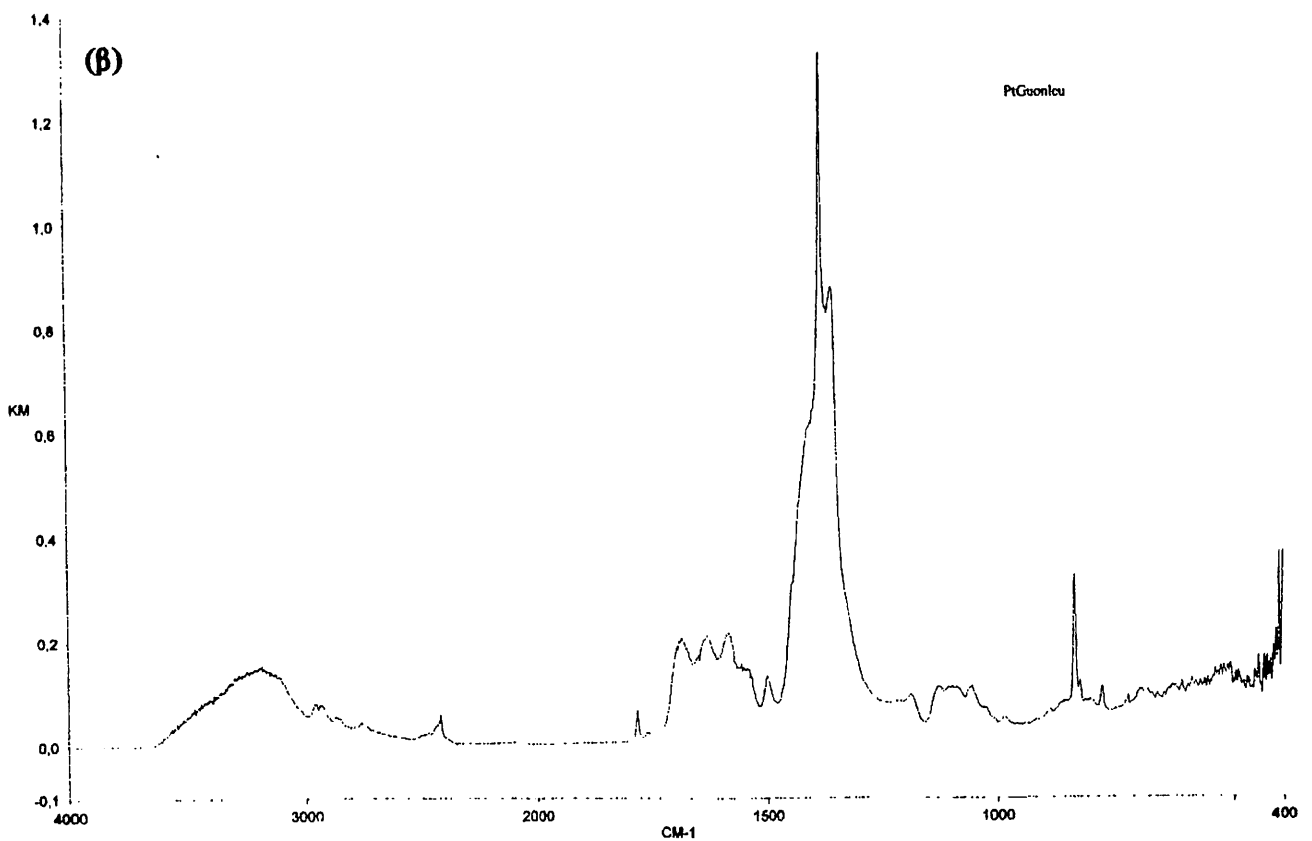
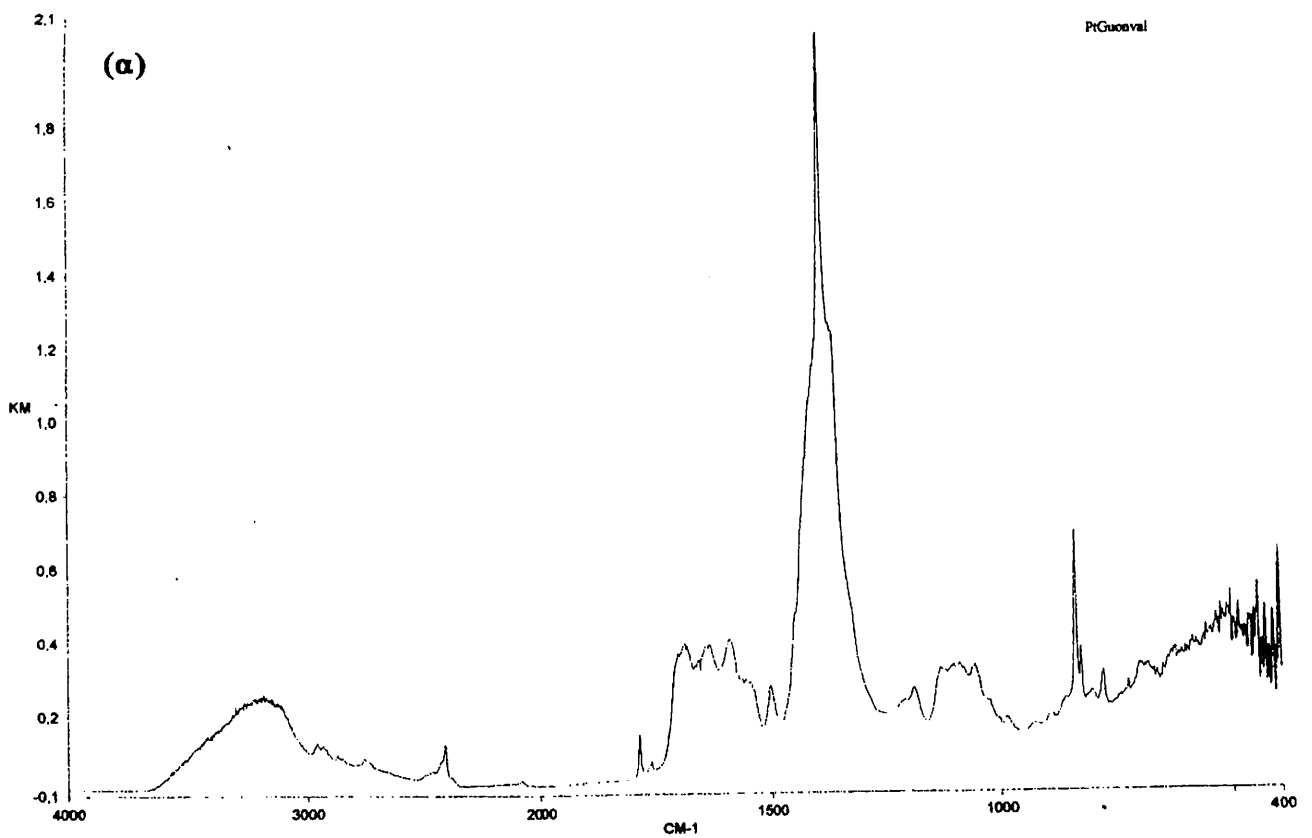


τελικού αμινοξέος [254], των (NH) ομάδων [255] καθώς και των (CH) αρωματικών και αλειφατικών ομάδων [256] και των δυο υποκαταστατών.

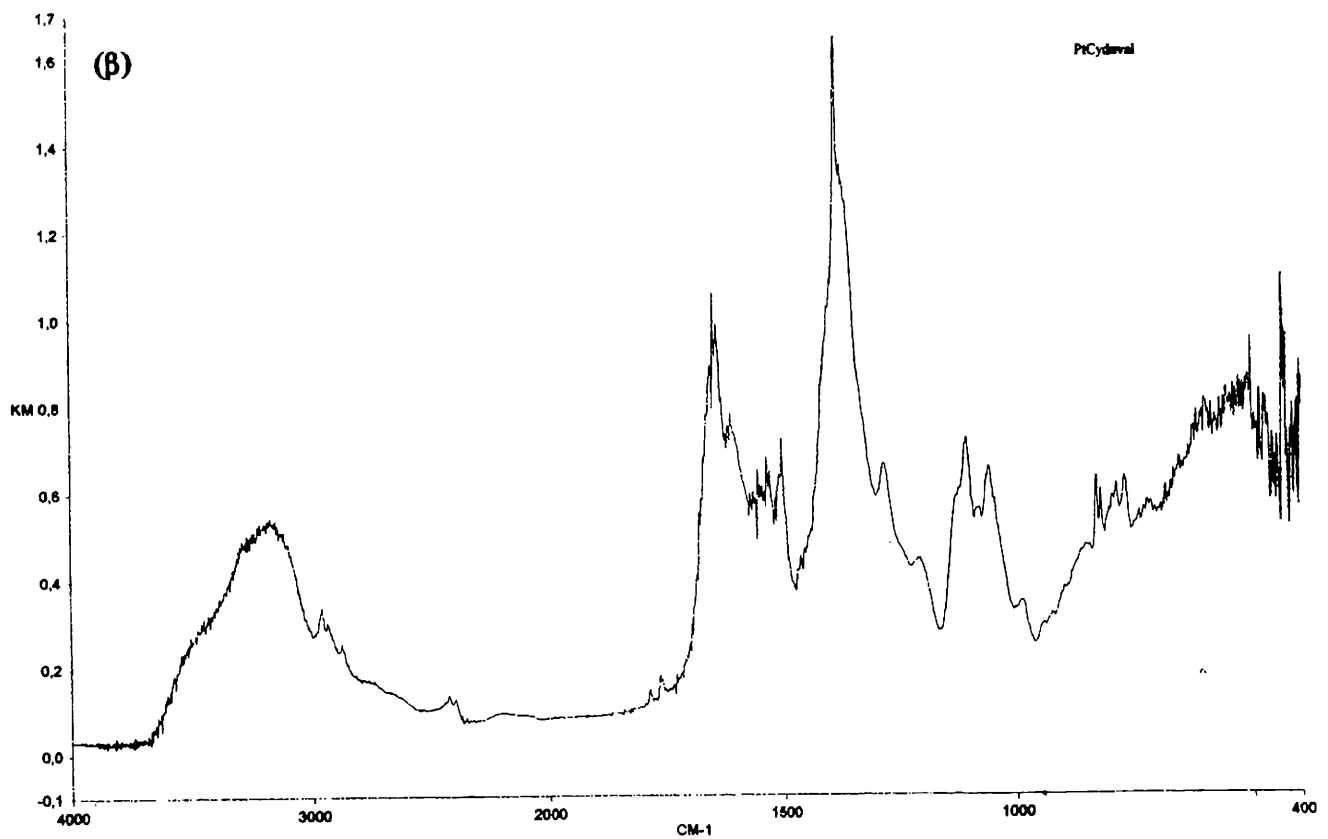
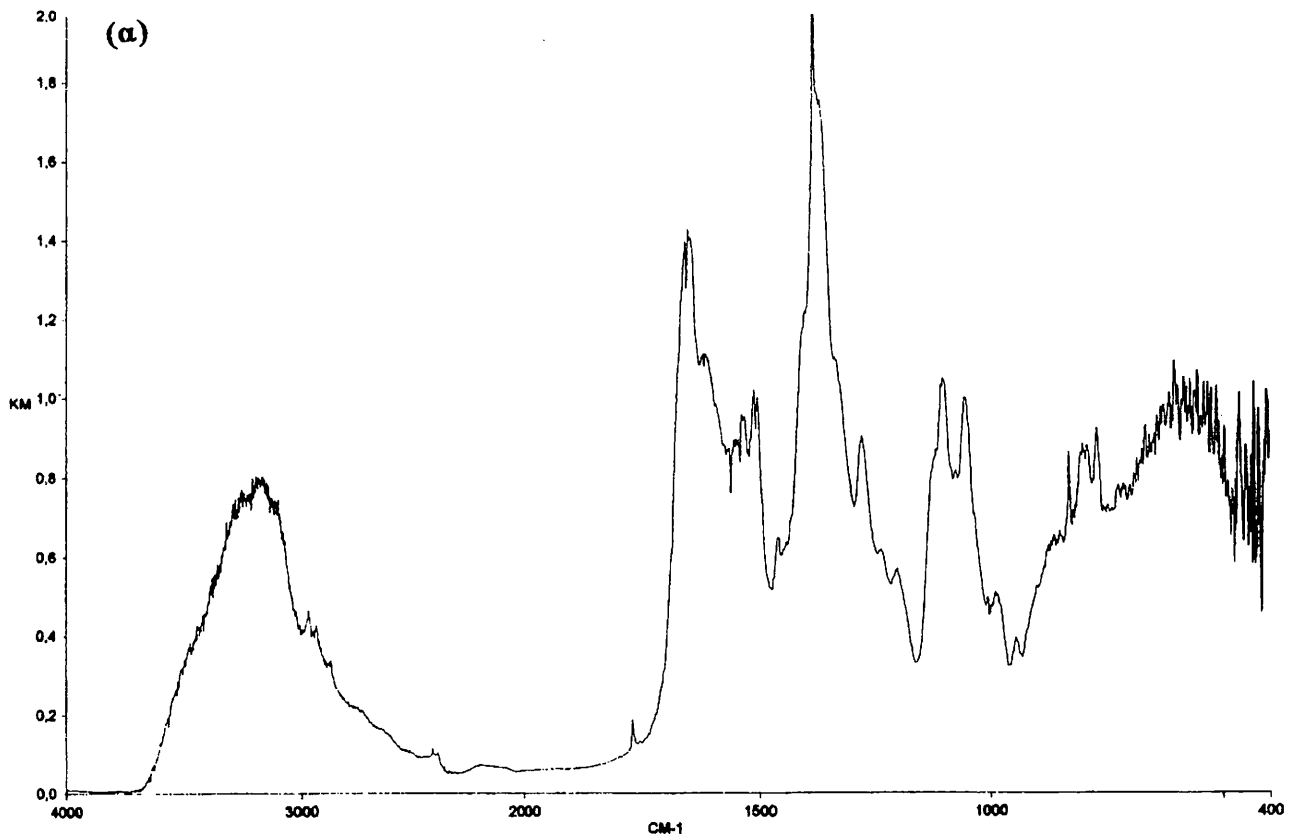
Στην περιοχή $1800-400\text{ cm}^{-1}$ ενδιαφέρουσες είναι οι ακόλουθες παρατηρήσεις: Η δόνηση τάσης $\nu(\text{C}=\text{O})$ για τα σύμπλοκα με γουανοσίνη εμφανίζεται στην περιοχή $1690-1715\text{ cm}^{-1}$, χαρακτηριστική της συμπλοκοποίησης μέσω του N7 [78], ενώ για τα σύμπλοκα με κυτιδίνη στην περιοχή $1650-1660\text{ cm}^{-1}$, χαρακτηριστική για τη συμπλοκοποίηση μέσω του N3 [84]. Η ταινία γύρω στα $1585-1615\text{ cm}^{-1}$, που εμφανίζεται και στις δυο σειρές συμπλόκων και αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση τάσης της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος, δείχνει ότι η ομάδα αυτή είναι αποπρωτονιωμένη και ελεύθερη (μη ενταγμένη) στα τριαδικά σύμπλοκα [84,86]. Στα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη παρατηρείται ξανά η μείωση στην ένταση της ταινίας στα 824 cm^{-1} περίπου και η αύξηση αυτής στα 801 cm^{-1} , γεγονός που υποδηλώνει την επικράτηση της ${}^3\text{E}$ διαμόρφωσης και για αυτή τη σειρά των συμπλόκων [265], όπως διαπιστώνεται παρακάτω κατά τη μελέτη των ${}^1\text{H-NMR}$ φασμάτων.

Πίνακας 11: Χαρακτηριστικές ταινίες IR των συμπλόκων (cm^{-1})

Σύμπλοκα	$\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{nucl}}$	$\delta\text{NH}(\text{NH}_2, \text{NH}_3)$	$\nu^{\text{as}}(\text{COO}^-)_{\text{amac}}$	ring breathing	sugar conformation
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{gly})]\text{NO}_3$	1695(s,br)	1625(s,br)	1585(s)	690(m)	822(m), 795(w)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{ala})]\text{NO}_3$	1714(s)	1634(s)	1585(s)	699(m)	825(m), 802(w)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(2\text{-aba})]\text{NO}_3$	1696(s,br)	1634(s)	1588(s)	692(m)	825(m), 804(w)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nval})]\text{NO}_3$	1686(s,br)	1633(s)	1591(s)	701(m)	825(m), 802(w)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nleu})]\text{NO}_3$	1691(s)	1636(s)	1588(s)	701(m)	825(m), 802(w)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{gly})]\text{NO}_3$	1651(s)	1538(s)		791(w)	
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{ala})]\text{NO}_3$	1652(m)	1540(sh)	1593(s)	791(w)	
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(2\text{-aba})]\text{NO}_3$	1656(s)	1537(m)	1613(m)	793(m)	
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{oyd})(\text{nval})]\text{NO}_3$	1657(s)	1538(m)	1615(m)	791(m)	
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{oyd})(\text{nleu})]\text{NO}_3$	1657(s)	1537(m)	1617(m)	791(m)	



FT-IR φάσματα των συμπλόκων: (α) $\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nval})]\text{NO}_3$ και
 (β) $\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nleu})]\text{NO}_3$



FT-IR φάσματα των συμπλόκων: (α) $\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(2\text{-aba})]\text{NO}_3$ και (β) $\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{nval})]\text{NO}_3$

Είναι γνωστό ότι όταν ένα αμινοξύ συμπλέκεται με το λευκόχρυσο παρατηρείται μια μετατόπιση των $^1\text{H-NMR}$ σημάτων όλων των πρωτονίων προς χαμηλότερα πεδία. Ωστόσο, η παρουσία ενός αρωματικού συστήματος κοντά στο αμινοξύ μπορεί να προκαλέσει μετατόπιση αυτών των σημάτων προς υψηλότερα πεδία, το σχετικό μέγεθος της οποίας είναι ανάλογο της αλληλεπίδρασης. Έτσι, τα σήματα των πρωτονίων των αμινοξέων στα τριαδικά σύμπλοκα αναμένεται να είναι μετατοπισμένα προς υψηλότερα πεδία (upfield) σε σύγκριση με τα αντίστοιχα χηλικά σύμπλοκα, σαν αποτέλεσμα της αποδέσμευσης της καρβοξυλομάδας από το Pt(II) και της ένταξης της νουκλεοβάσης. Αυτό πράγματι παρατηρείται, όπως φαίνεται στον Πίνακα 12. Η χημική μετατόπιση των σημάτων των πρωτονίων των αμινοξέων καθορίζεται από τη συνισταμένη της επίδρασης του Pt(II) (αποπροστασία) και της επίδρασης του γειτονικού υποκαταστάτη (προστασία στην περίπτωση του νουκλεοζίτη). Το συνολικό αποτέλεσμα είναι μια μικρή μετατόπιση των σημάτων των πρωτονίων, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των ελεύθερων αμινοξέων, άλλοτε προς υψηλότερα και άλλοτε προς χαμηλότερα πεδία.

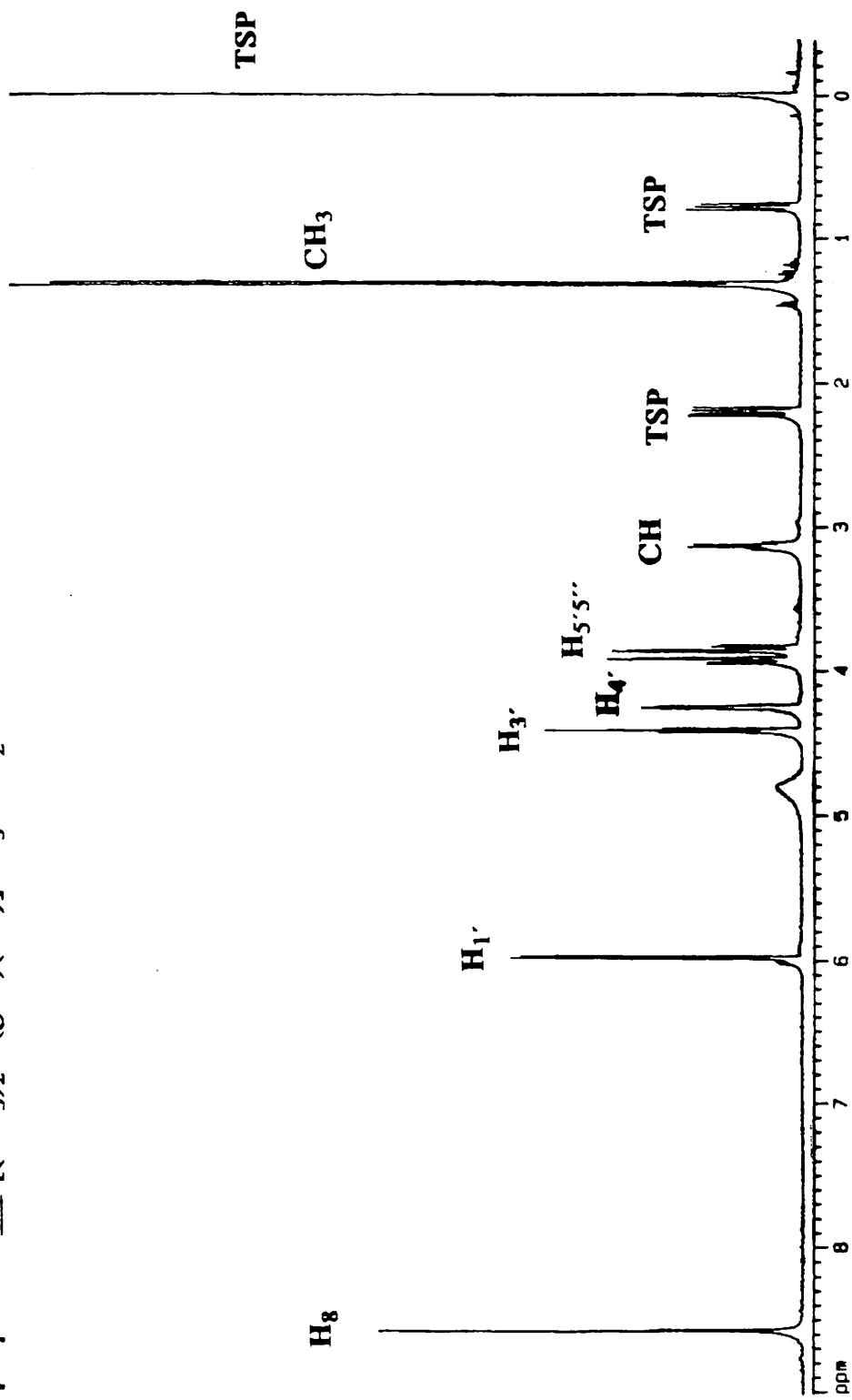
Η μεγαλύτερη μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία σε σύγκριση με τα χηλικά σύμπλοκα, παρατηρείται για τα σήματα των πρωτονίων Ha (0.5-0.7 ppm), τα οποία βρίσκονται πλησιέστερα στο σημείο ένταξης με το μέταλλο, δηλαδή την αμινομάδα του αμινοξέος. Η μετατόπιση των σημάτων μειώνεται σταδιακά (και φτάνει στην τιμή των 0.2 ppm) καθώς απομακρυνόμαστε από τη θέση δεσμού, οπότε και η αλληλεπίδραση με τη γουανοσίνη (προστασία) γίνεται πιο ασθενής.

Τα σήματα των πρωτονίων των αμινοξέων είναι και σε αυτή τη σειρά συμπλόκων μετατοπισμένα προς υψηλότερα πεδία σε σύγκριση με τα σήματα στα αντίστοιχα χηλικά σύμπλοκα, λόγω της προστασίας που παρέχει η παρουσία της κυτιδίνης. Η μεγαλύτερη μετατόπιση παρατηρείται για τα πρωτόνια τα γειτονικά στην αμινομάδα, Ηα (0.4-0.5 ppm). Η μετατόπιση αυτή είναι μικρότερη σε σχέση με εκείνη που παρατηρείται στα αντίστοιχα σύμπλοκα με γουανοσίνη, γεγονός που δείχνει πως η αλληλεπίδραση των αμινοξέων με γουανοσίνη είναι ισχυρότερη από ό,τι με κυτιδίνη (βλ. επόμενη παράγραφο).

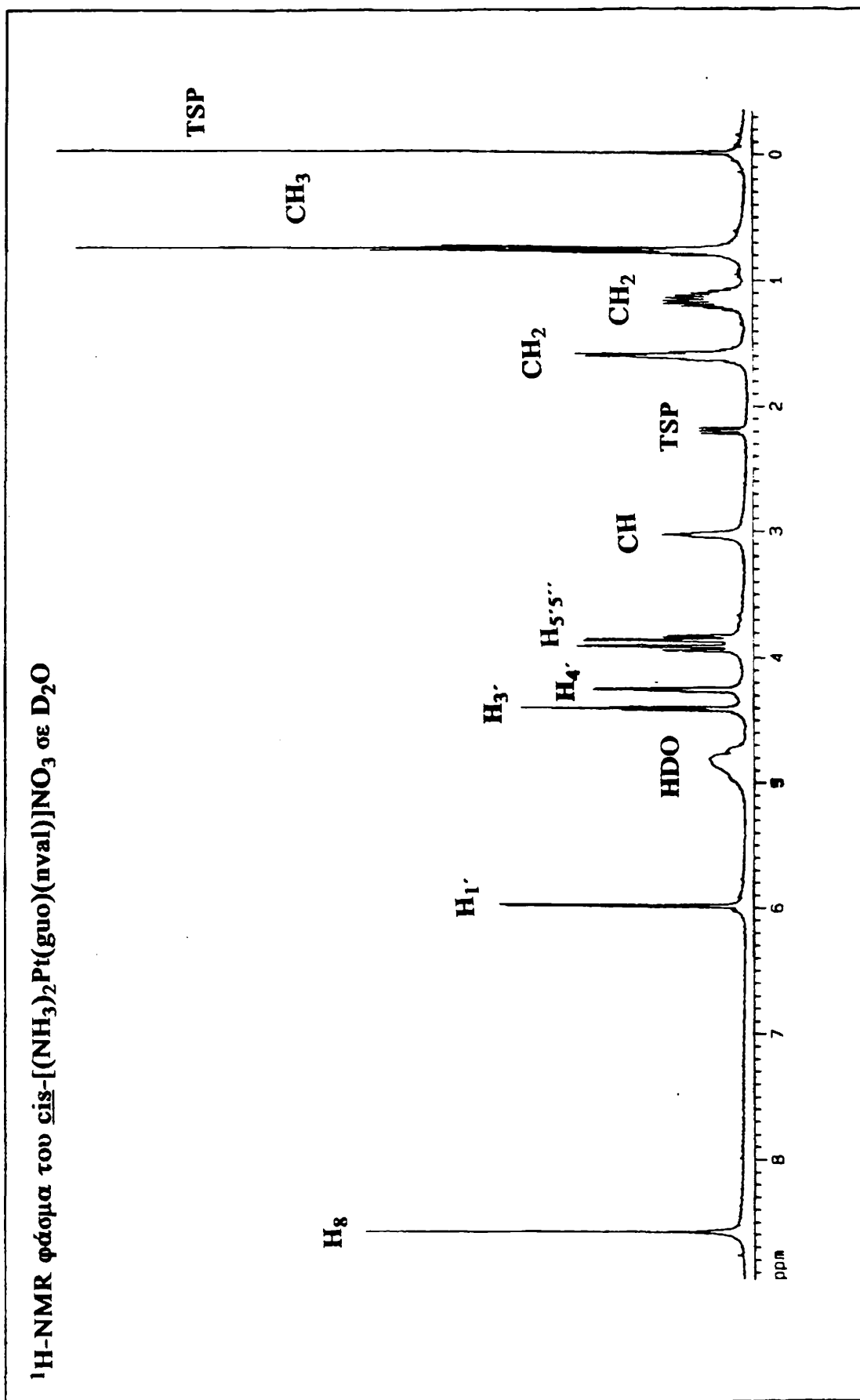
Πίνακας 13: Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των σακχάρων σταθερές σύζευξης και ποσοστά των gg, ³E και anti διαμορφώσεων.

Σύμπλοκα	pD	H _{1'}	H ₂	H ₃	H ₄	H _{5'5''}	J _{1'2'}	J _{2'3'}	J _{3'4'}	J _{4'5'}	J _{4'5''}	gg %	³ E %	Keq (³ E/ ² E)	anti %
cis-[(NH ₃) ₂ P(guo)(gly)]NO ₃	5.6	5.985, 5.973(d)	4.710(t)	4.417(t)	4.253(q)	3.888(m)	4.80	4.86	3.98	2.94	4.12	68	45	0.82	51
cis-[(NH ₃) ₂ P(guo)(ala)]NO ₃	5.6	5.987 5.979(d)	4.700(t)	4.416(t)	4.259(q)	3.899(m)	5.07	4.88	4.09	2.88	4.07	69	45	0.82	53
cis-[(NH ₃) ₂ P(guo)(2-aba)]NO ₃	5.6	5.968 5.959(d)	4.706(t)	4.417(t)	4.263(q)	3.893(m)	5.13	4.81	3.92	2.84	4.06	70	43	0.75	52
cis-[(NH ₃) ₂ P(guo)(nval)]NO ₃	5.6	5.998 5.985(d)	4.702(t)	4.416(t)	4.265(q)	3.895(m)	5.13	4.76	4.04	2.90	4.11	69	44	0.78	53
cis-[(NH ₃) ₂ P(guo)(nleu)]NO ₃	5.6	5.993 5.984(d)	4.698(t)	4.410(t)	4.261(d)	3.890(m)	5.12	4.82	4.08	2.94	4.11	68	44	0.78	53
guo ^a		5.895(d)	4.712(t)	4.394(t)	4.215(m)	3.845(m)	5.90	5.20	3.70	3.20	3.80	69	38	0.61	51
cis-[(NH ₃) ₂ P(cyd)(gly)]NO ₃	5.5	5.931 5.925 5.903 5.896(dd)	4.341(q)	4.209(t)	4.161(m)	3.890(m)	3.61		5.05	2.72	4.74	64	58	1.38	
ois-[(NH ₃) ₂ P(cyd)(ala)]NO ₃	5.5	5.939 5.933 5.897 5.891(dd)	4.352(q)	4.221(q)	4.164(m)	3.888(m)	3.68		5.37	2.73	4.27	69	59	1.44	
cis-[(NH ₃) ₂ P(cyd)(2-aba)]NO ₃	5.5	5.948 5.942 5.896 5.890(dd)	4.350(m)	4.218(q)	4.165(m)	3.886(m)	3.69		2.75	4.32	4.32	68			
cis-[(NH ₃) ₂ P(cyd)(nval)]NO ₃	5.5	5.944 5.938 5.891 5.885(dd)	4.344(m)	4.215(q)	4.162(m)	3.887(m)	3.66		5.89	2.69	4.32	69	61	1.56	
cis-[(NH ₃) ₂ P(cyd)(nleu)]NO ₃	5.5	5.947 5.927 5.893 5.884(dd)	4.344(m)	4.219(q)	4.168(m)	3.887(m)	3.72		3.04	4.36	4.36	65			
cyd	5.5	5.920(d)	4.331(t)	4.229(t)	4.156(q)	3.898(m)			2.24	4.32	4.32	73	60	1.50	

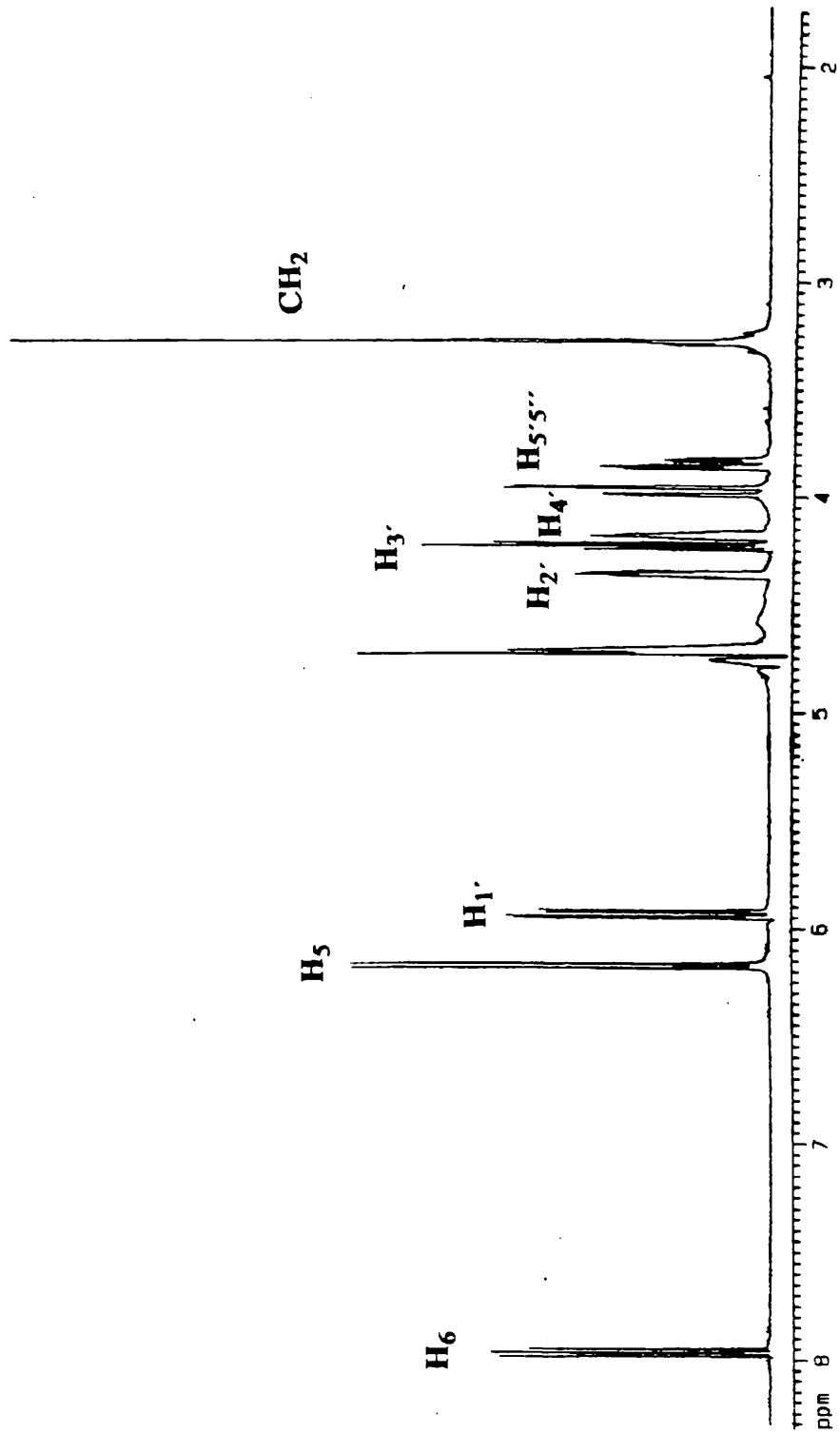
$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{ala})]\text{NO}_3$ σε D_2O



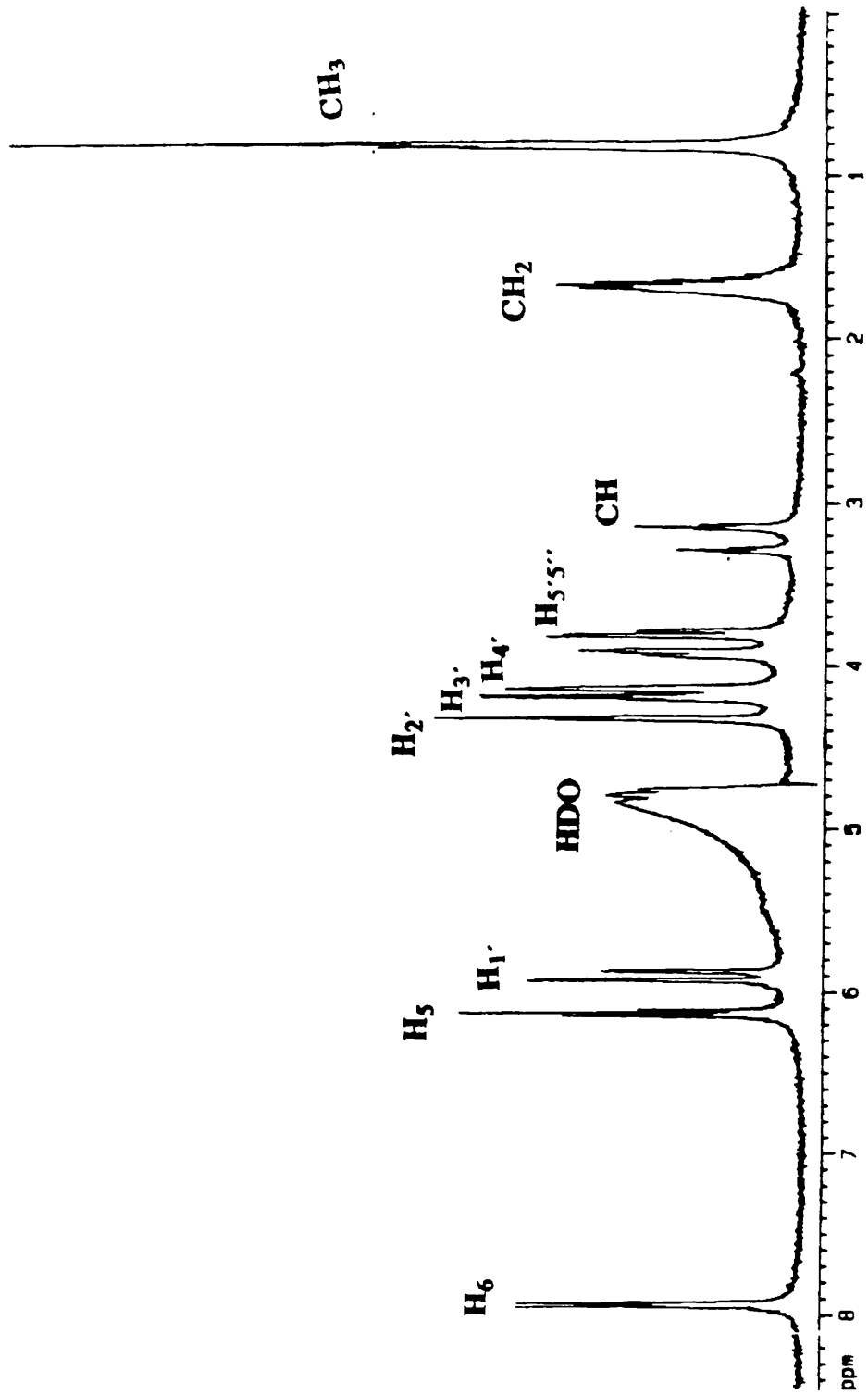
$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{pval})]\text{NO}_3$ σε D_2O



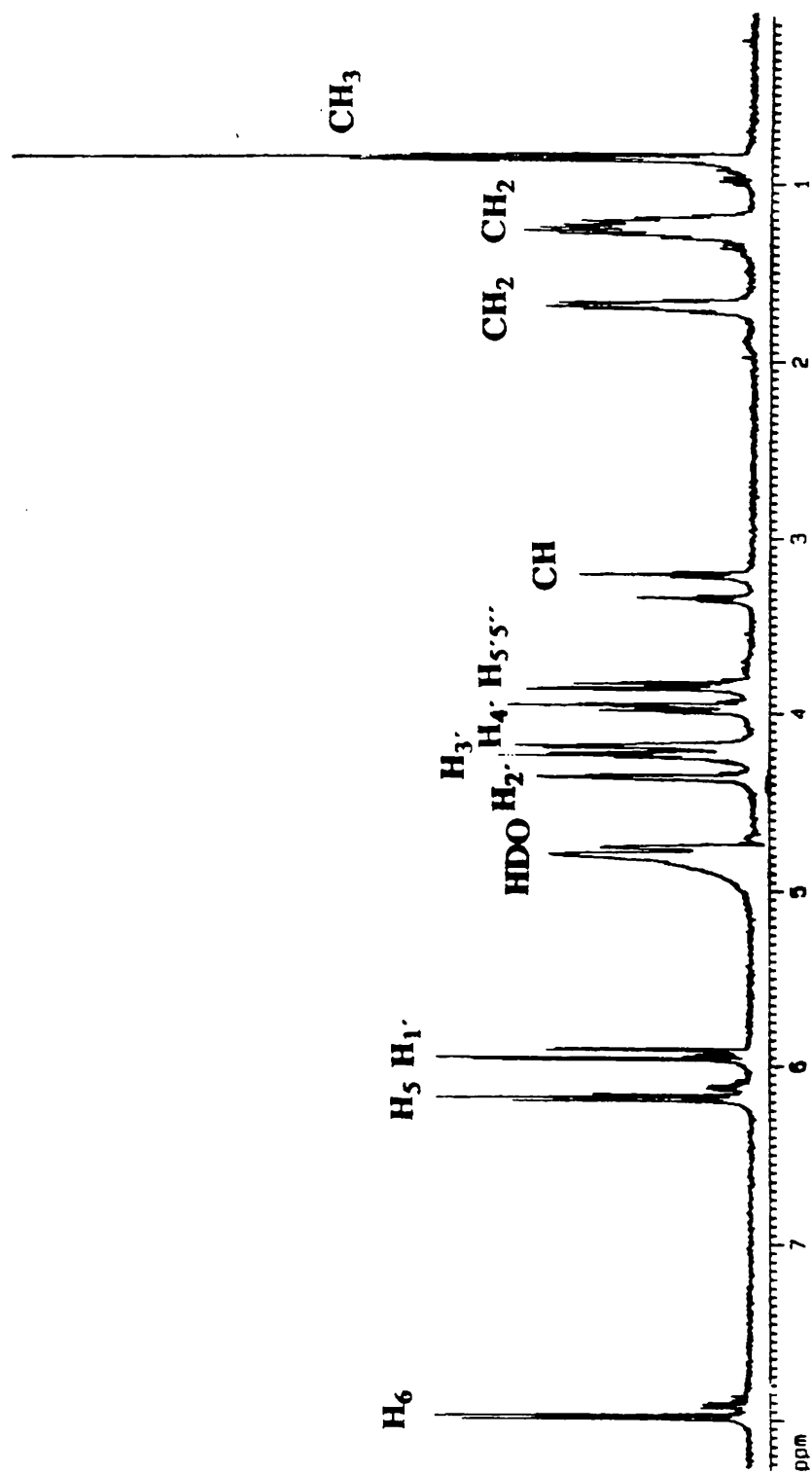
$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{gly})]\text{NO}_3$ σε D_2O



$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(2\text{-aba})]\text{NO}_3$ σε D_2O



$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{nleu})]\text{NO}_3$ σε D_2O



μεταξύ των υποκαταστατών είναι μεγαλύτερες στα σύμπλοκα με γουανοσίνη από ό,τι στα αντίστοιχα με κυτιδίνη, όπως ήταν αναμενόμενο.

Πίνακας 14: Διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις, $\Delta\delta$ (ppm), μεταξύ των πρωτονίων των τελικών μεθυλομάδων των αμινοξέων στην ανιονική τους μορφή και των πρωτονίων αυτών στα τριαδικά σύμπλοκα.

$\Delta\delta$	ala	2-aba	nval	nleu
$\delta_{\text{amac}} - \delta_{\text{tern.complex(guo)}}$	-0.09	0.094	0.107	0.130
$\delta_{\text{amac}} - \delta_{\text{tern.complex(cyd)}}$	-0.128	0.003	0.027	0.045

Στον Πίνακα 15 φαίνονται οι διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των αμινοξέων στην αμφολυτική τους μορφή και στα τριαδικά τους σύμπλοκα με τους νουκλεοζίτες ($\Delta\delta = \delta_{\text{amac}} - \delta_{\text{tern.complex}}$). Παρατηρούμε ότι η τιμή του $\Delta\delta$ για κάθε σύμπλοκο μειώνεται πηγαίνοντας από τα πρωτόνια H_α στα H_ϵ . Αυτό σημαίνει ότι οι ενδομοριακές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι μεγαλύτερες για τις ομάδες που βρίσκονται κοντά στη θέση σύμπλεξης με το μέταλλο και ελαττώνονται καθώς απομακρυνόμαστε από αυτό. Επίσης όπως φαίνεται από τον Πίνακα 15 και το Διάγραμμα του Σχήματος 45, οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι γενικά μεγαλύτερες για τα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη από ό,τι για τα αντίστοιχα με κυτιδίνη.

Πίνακας 15: Διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις, $\Delta\delta$ (ppm), μεταξύ των πρωτονίων των αμινοξέων στην αμφολυτική τους μορφή και των πρωτονίων των αμινοξέων στα τριαδικά σύμπλοκα.

$\Delta\delta$	H_α	H_β	H_γ	H_δ	H_ϵ	
$\delta_{2\text{-aba}} - \delta_{\text{tern.complex(guo)}}$	0.711	0.236	0.210			
$\delta_{\text{nval}} - \delta_{\text{tern.complex(guo)}}$	0.698	0.273	0.239	0.153		
$\delta_{\text{nleu}} - \delta_{\text{tern.complex(guo)}}$	0.702	0.297	0.270	0.220	0.143	
$\delta_{2\text{-aba}} - \delta_{\text{tern.complex(cyd)}}$	0.537	0.396	0.207	0.139		
$\delta_{\text{nval}} - \delta_{\text{tern.complex(cyd)}}$	0.535	0.400	0.196	0.158	0.093	
$\delta_{\text{nleu}} - \delta_{\text{tern.complex(cyd)}}$	0.534	0.400	0.176	0.165	0.105	0.058

$[(\text{guo})_2\text{Pd}(\text{dipeptide})_2]\text{Cl}_2$ [77], 11-16%, αλλά σε καμία περίπτωση δε βρέθηκε να εξαρτάται από το αμινοξύ ή το πεπτίδιο.

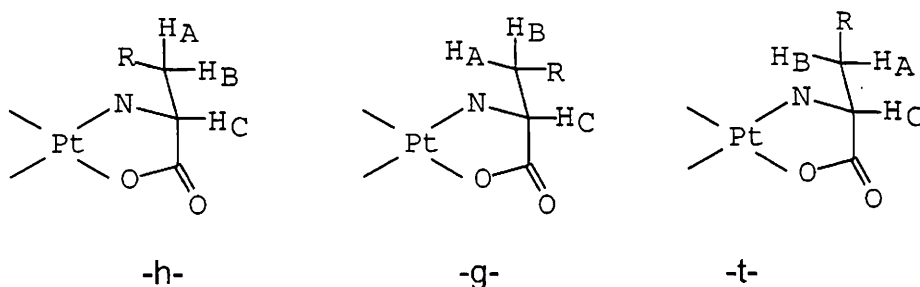
Το ποσοστό της ^3E διαμόρφωσης στα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη παραμένει σχεδόν σταθερό και ίσο με το ποσοστό αυτό στην ελεύθερη κυτιδίνη (60%) [297].

Το ποσοστό της διαμόρφωσης gg στα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη παραμένει σταθερό και ίσο με το ποσοστό αυτό στον ελεύθερο υποκαταστάτη, όπως άλλωστε συμβαίνει και στην περίπτωση της συμπλοκοποίησης με το *cis*-DDP [294,265]. Στην περίπτωση όμως των συμπλόκων με κυτιδίνη το ποσοστό αυτό μειώνεται κατά 4-9%.

Τέλος, το ποσοστό της αντι διαμόρφωσης στα σύμπλοκα με γουανοσίνη αυξάνεται ελαφρά σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη (1-2%), σε αντίθεση με ό,τι παρατηρήσαμε στα σύμπλοκα *cis*- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{dipeptidester})_2]\text{Cl}_2$, όπου η αύξηση ήταν 13-18%.

3.4.4. Διαμόρφωση γύρω από το δεσμό $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ των αμινοξέων

Το σχετικό ποσοστό των διαμορφωμερών εκ περιστροφής γύρω από το δεσμό $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ του ενταγμένου αμινοξέος (Σχήμα 46) υπολογίστηκε από τις τιμές των σταθερών σύζευξης $^3J_{\alpha\beta}$ των $^1\text{H-NMR}$ φασμάτων.



Σχήμα 46: Τα τρία διαμορφωμερή h, g, t για χηλικά ενταγμένα αμινοξέα.

Τα αποτελέσματα για τα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη δίνονται στον Πίνακα 16. (Στην περίπτωση των τριαδικών συμπλόκων με

3.5. Φασματοσκοπία ^{13}C -NMR

Τα φάσματα ^{13}C -NMR ελήφθησαν σε διαλύματα D_2O για όλα τα σύμπλοκα καθώς και για τους ελεύθερους υποκαταστάτες και φαίνονται στις σελίδες 171-180. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 17. Η απόδοση των σημάτων συντονισμού για τους πυρήνες ^{13}C των ελεύθερων αμινοξέων έγινε με τη βοήθεια φασματοσκοπίας δυο διαστάσεων ^1H , ^{13}C COSY.

Στα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη παρατηρείται μετατόπιση σε χαμηλότερα πεδία (downfield) για όλους τους άνθρακες της βάσης και του σακχάρου κατά 2-7 ppm, αλλά η μεγαλύτερη μετατόπιση (~7 ppm) παρατηρείται, όπως αναμενόταν για τον άνθρακα C8, ο οποίος βρίσκεται κοντά στο σημείο δεσμού. Επιβεβαιώνεται έτσι για μια ακόμα φορά η ένταξη του μετάλλου μέσω του αζώτου N7 του νουκλεοζίτη [319,320].

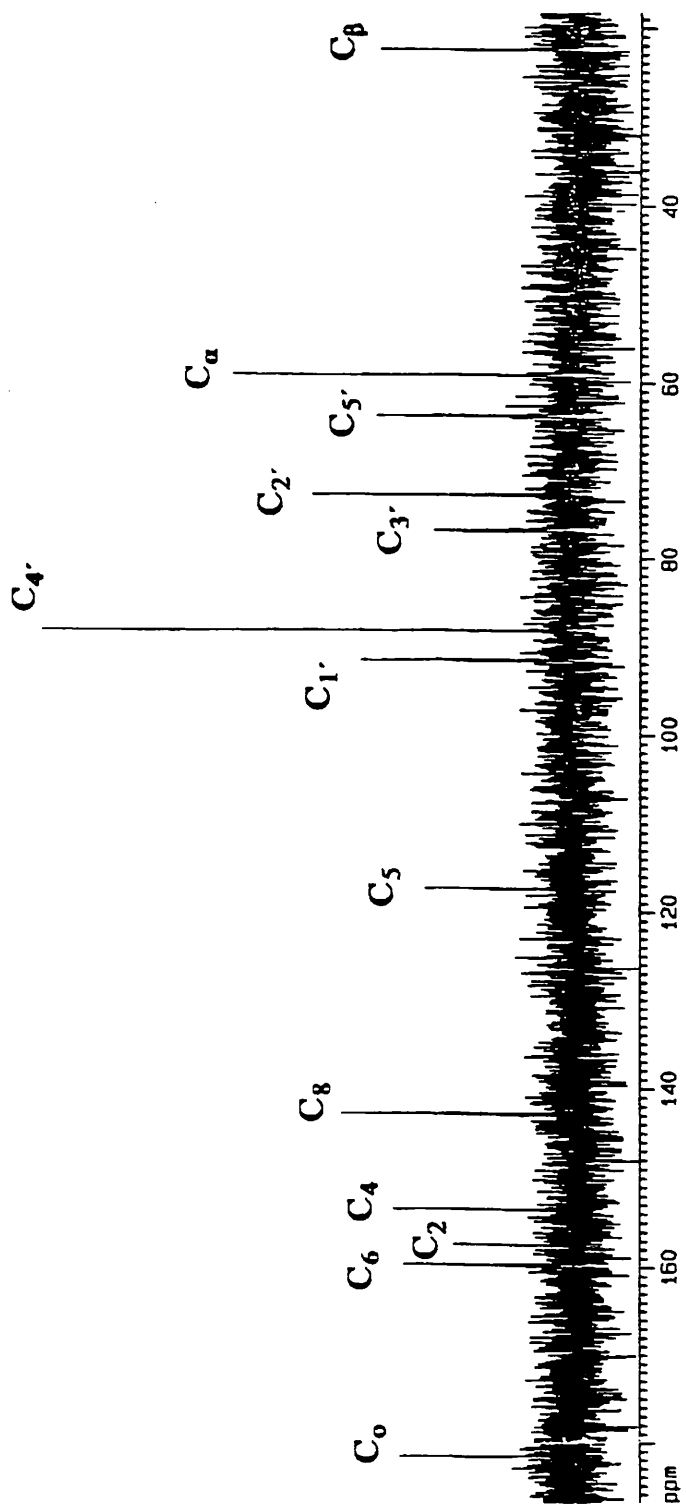
Αντίθετα, στα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη ο άνθρακας που επηρεάζεται περισσότερο από τη συμπλοκοποίηση είναι ο C2, ο οποίος βρίσκεται πλησιέστερα στο σημείο δεσμού N3. Μετατοπίζεται κατά περίπου 3 ppm προς υψηλότερα πεδία (upfield), μετατόπιση ανάλογη αυτής που παρατηρήθηκε και στα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη και διπεπτίδια (σελίδα 124). Τα υπόλοιπα άτομα άνθρακα του νουκλεοζίτη δεν επηρεάζονται σημαντικά.

Παρατηρώντας τα φάσματα των τριαδικών συμπλόκων με κυτιδίνη, βλέπουμε πως τα σήματα συντονισμού για τα περισσότερα άτομα άνθρακα της κυτιδίνης καθώς και για τα περισσότερα άτομα άνθρακα των αμινοξέων, σχάζονται σε δυο κορυφές. Αυτό είναι αποτέλεσμα της παρεμποδισμένης περιστροφής γύρω από το δεσμό Pt-N3, την οποία παρατηρήσαμε ήδη μελετώντας τα φάσματα ^1H -NMR.

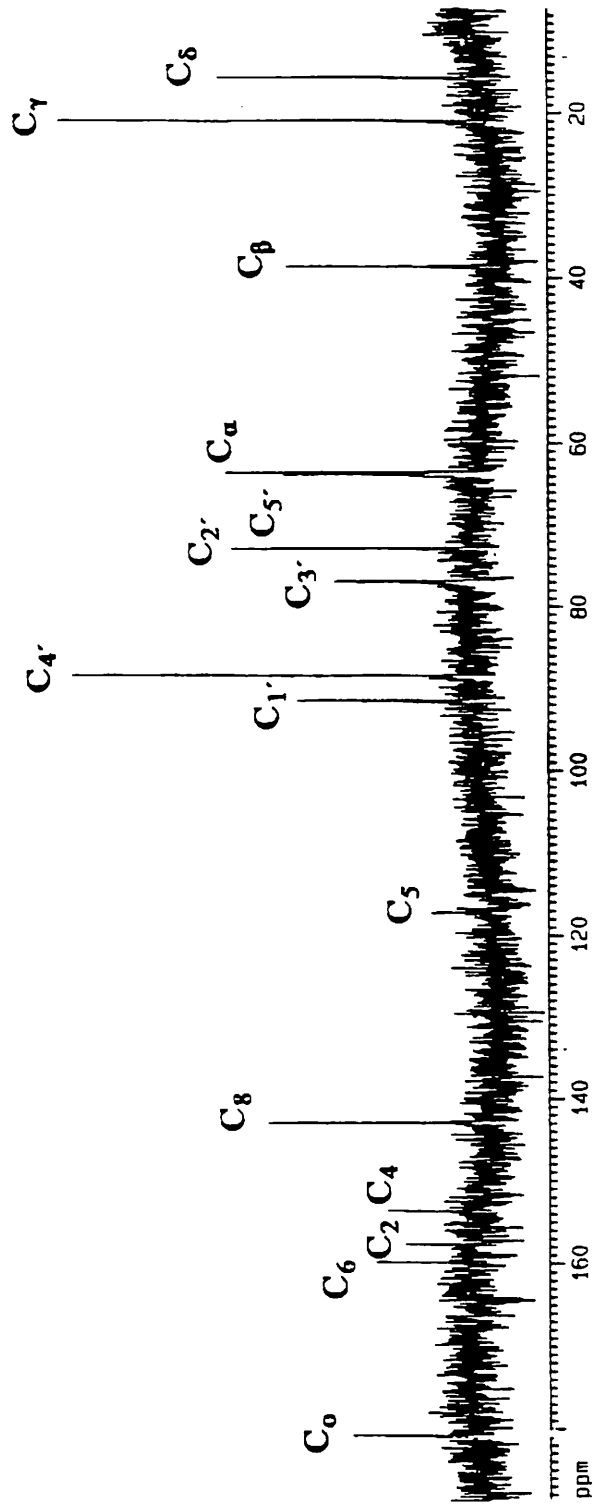
Τα άτομα άνθρακα των αμινοξέων εξάλλου, δεν επηρεάζονται σημαντικά από τη συμπλοκοποίηση, με εξαίρεση το άτομο C_α , το οποίο βρίσκεται δίπλα στην αμινομάδα ($-\text{NH}_2$) μέσω της οποίας γίνεται η

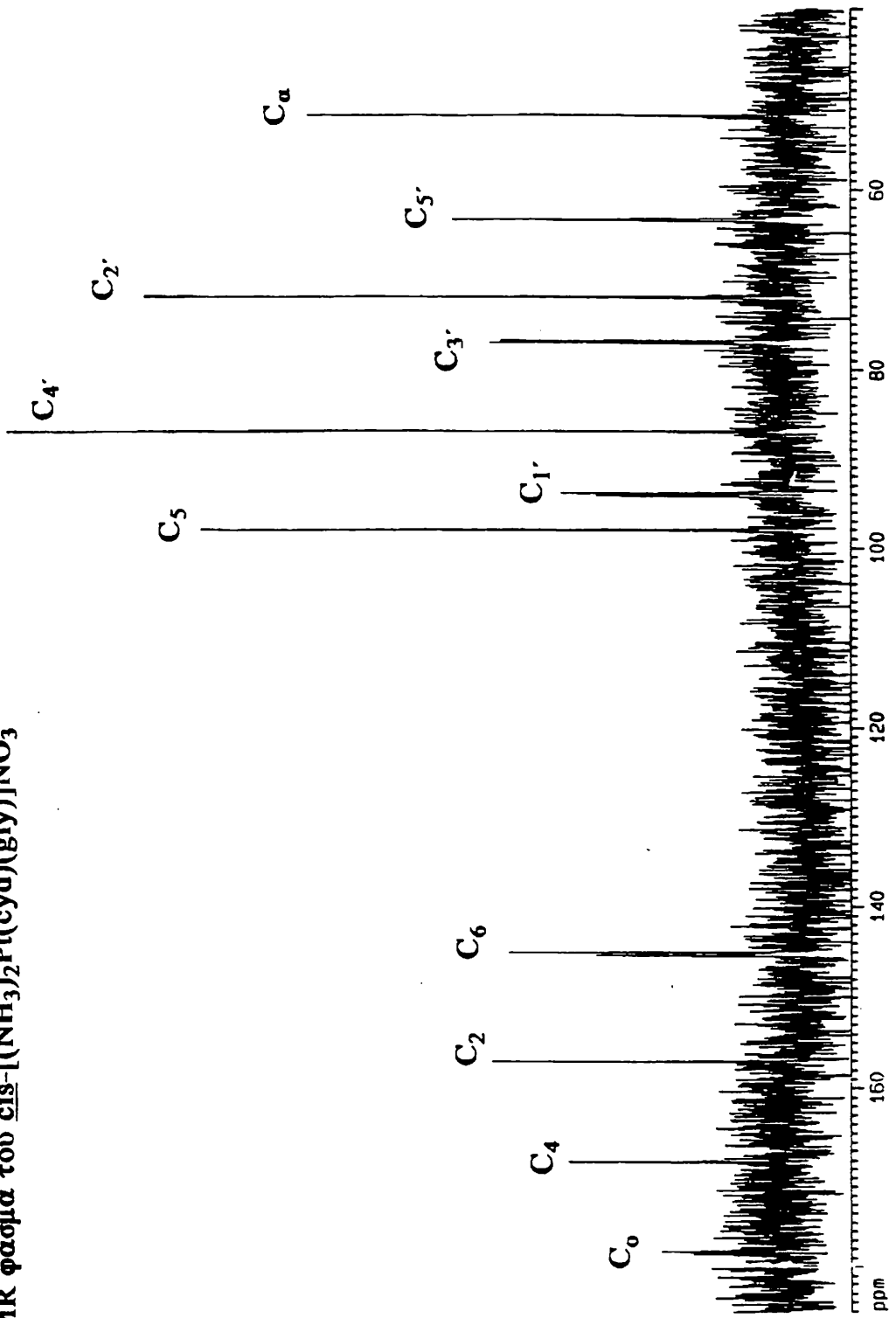
Πίνακας 17: Χημικές μετατοπίσεις, δ (ppm), των ατόμων άνθρακα των ¹³C-NMR φασμάτων των αμινοξέων και των διαδικών και τριαδικών συμπλόκων τους (Διαλύτης D₂O).

Ενώσεις	C ₂	C ₄	C ₅	C ₈	C ₈	C ₈	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C _β	C _γ	C _δ	C _ε	C _ο
gly												44.32					175.28
ala												53.50	19.03				178.61
2-aba												58.73	26.52	11.37			177.65
nval												57.54	35.37	20.68	15.76		177.90
nleu												57.62	32.87	29.18	24.46	15.77	177.89
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(gly)]NO ₃												49.03					191.71
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(ala)]NO ₃												56.64	21.01				192.00
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(2-aba)]NO ₃												61.73	28.53	11.66			192.11
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(nval)]NO ₃												60.33	37.31	20.74	15.70		192.41
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(nleu)]NO ₃												60.51	34.90	29.39	24.48	15.88	187.67
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(guo)(gly)]NO ₃	157.40	153.50	117.44	159.72	142.83	91.64	72.78	76.78	88.35	63.80	51.22						178.22
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(guo)(ala)]NO ₃	157.42	153.51	117.36	159.72	142.82	91.63	72.72	76.78	88.31	63.74	59.15						181.53
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(guo)(2-aba)]NO ₃	157.48	153.57	117.21	159.78	142.78	91.52	72.72	76.84	88.37	63.78	64.94						180.46
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(guo)(nval)]NO ₃	157.50	153.60	118.85	159.77	142.88	91.56	72.86	76.87	88.44	63.82	63.57						180.73
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(guo)(nleu)]NO ₃	157.52	153.61	118.80	159.79	142.94	91.63	72.87	76.96	88.45	63.86	63.69						180.74
guo	153.57	151.23	116.57	156.70	135.54	86.28	70.28	73.62	85.12	61.67							
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(gly)]NO ₃	157.04	168.23	98.05	145.32	144.99	94.28	72.00	77.00	86.96	63.43	51.89						178.64
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(ala)]NO ₃	157.00	168.24	98.11	145.32	144.99	93.94	72.04	76.96	87.03	63.46	59.79						178.22
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(2-aba)]NO ₃	156.88	168.13	98.04	145.06	145.06	93.90	71.98	76.85	86.92	63.48	59.53						181.45
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(nval)]NO ₃	157.01	168.22	98.16	145.38	145.38	94.37	72.10	77.05	87.11	63.48	65.55						180.22
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(nleu)]NO ₃	156.86	168.09	98.14	145.07	145.07	93.71	71.99	76.23	86.96	63.47	65.18						180.50
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(nval)]NO ₃	157.00	168.23	98.14	145.39	145.39	94.38	72.09	77.05	87.09	63.47	64.25						180.50
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(nleu)]NO ₃	156.87	168.09	98.02	145.07	145.07	93.80	71.99	76.83	86.96	63.45	63.95						180.51
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(nleu)]NO ₃	157.01	168.22	98.13	145.40	145.40	94.36	72.07	77.08	87.08	63.44	64.43						180.51
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(nleu)]NO ₃	156.80	168.08	98.02	145.08	145.08	93.82	71.98	76.85	86.96	63.44	64.10						180.51
cyd	159.85	168.57	98.92	144.60	144.60	93.17	72.12	76.79	86.63	63.57							

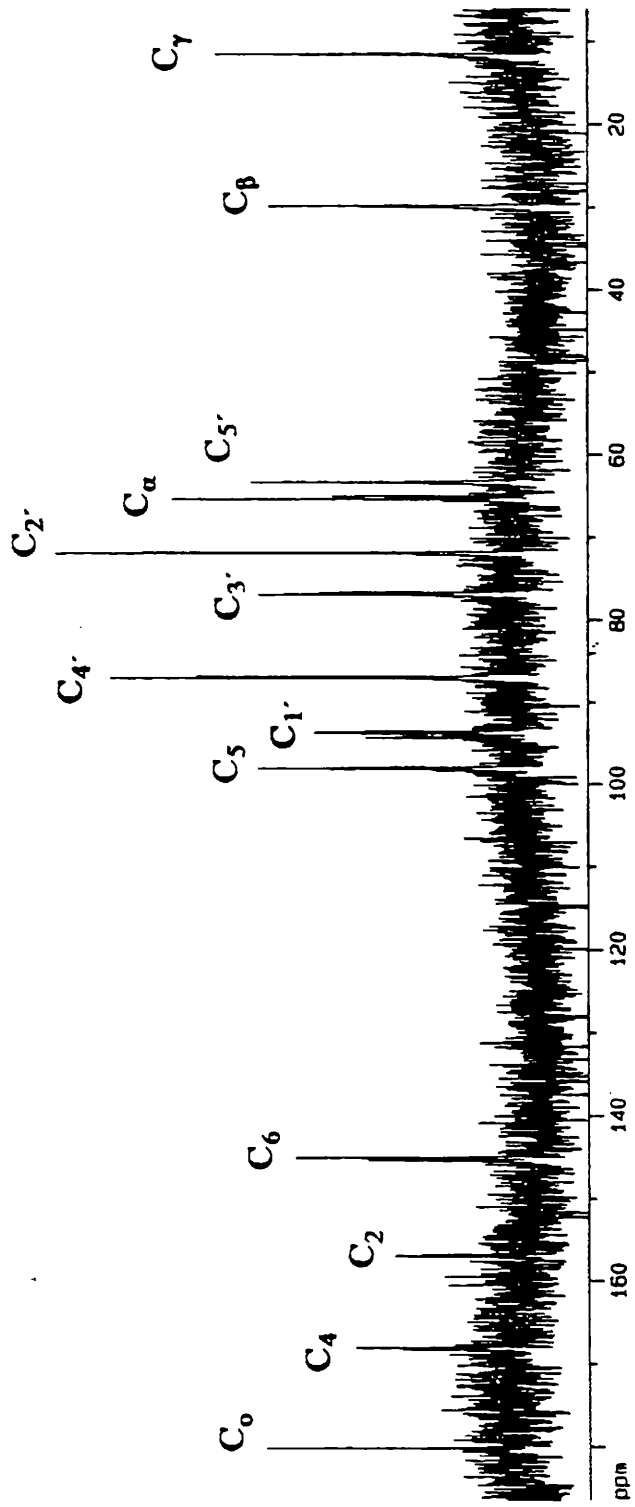
$^{13}\text{C-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{ala})]\text{NO}_3$ 

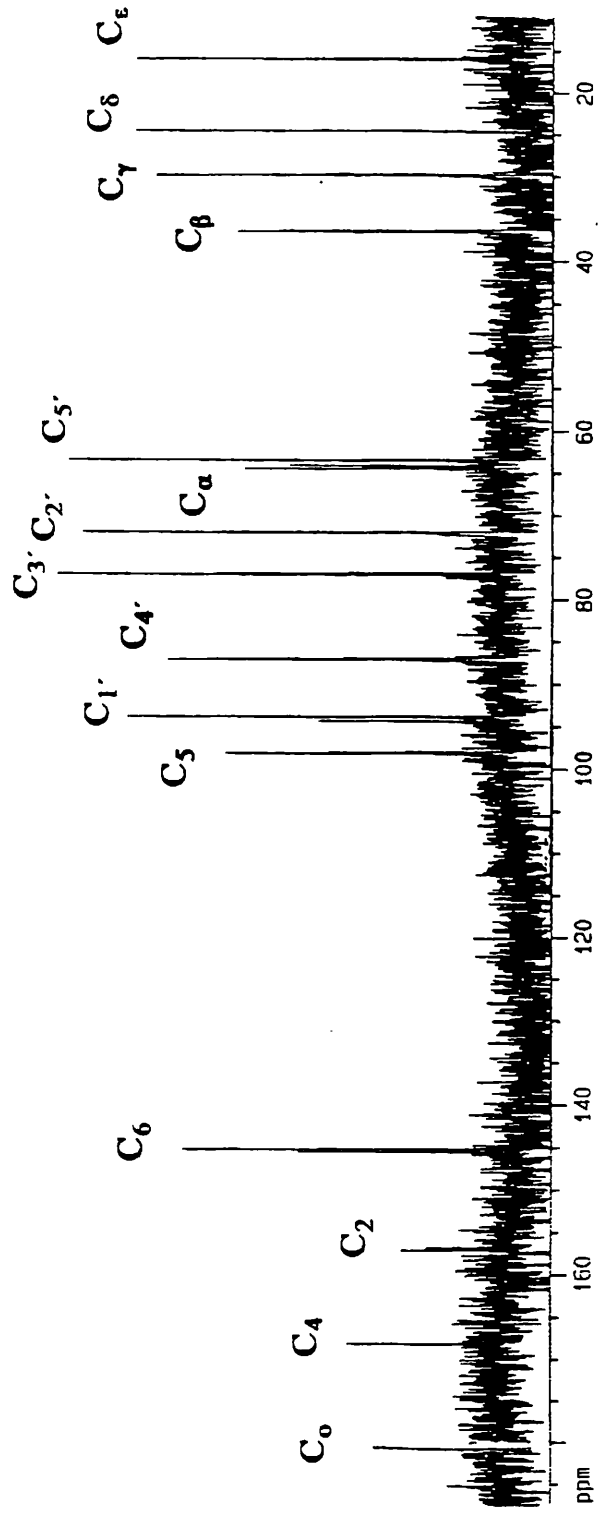
^{13}C -NMR φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{pval})]\text{NO}_3$



^{13}C -NMR φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyc})(\text{gly})]\text{NO}_3$ 

^{13}C -NMR φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(2\text{-aba})]\text{NO}_3$



$^{13}\text{C-NMR}$ φάσμα του cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{nleu})]\text{NO}_3$ 

3.7. Συμπεράσματα

1) Στα cis-τριαδικά σύμπλοκα του Pt(II) με τους νουκλεοζίτες γουανοσίνη και κυτιδίνη και με αμινοξέα, οι θέσεις δεσμού είναι τα άζωτα N7 και N3 και η αμινομάδα αντίστοιχα.

2) Παρατηρήθηκε και σε αυτή τη σειρά των συμπλόκων η ύπαρξη ισομερών εκ περιστροφής γύρω από το δεσμό Pt-N3 για τα σύμπλοκα της κυτιδίνης.

3) Οι ενδομοριακές υδρόφοβες αλειφατικές-αρωματικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών αυξάνονται με την αύξηση της πλευρικής αλειφατικής αλυσίδας του αμινοξέος, ενώ ελαττώνονται καθώς απομακρυνόμαστε από το σημείο δεσμού. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ισχυρότερες για τα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη από ό,τι για τα τριαδικά με κυτιδίνη. Αυτό θα πρέπει να οφείλεται στο μεγαλύτερο μέγεθος και στο πιο εκτεταμένο π-ηλεκτρονικό σύστημα της πουρίνης, το οποίο φαίνεται ότι καθορίζει την ισχύ της αρωματικής-αλειφατικής αλληλεπίδρασης των υποκαταστατών.

4) Το ποσοστό της ³E διαμόρφωσης της γουανοσίνης αυξάνεται κατά 5-7% στα τριαδικά σύμπλοκα και είναι ανεξάρτητη από το μέγεθος του αμινοξέος. Το ποσοστό αυτό για την κυτιδίνη δε μεταβάλλεται στα τριαδικά σύμπλοκα. Επίσης το ποσοστό της gg διαμόρφωσης της γουανοσίνης μένει σταθερό, ενώ παρατηρείται μια μικρή αύξηση για το αντίστοιχο ποσοστό της κυτιδίνης. Τέλος, η τιμή του ποσοστού της anti διαμόρφωσης εμφανίζει μικρή αύξηση στα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη.

5) Συγκρίνοντας τα τριαδικά σύμπλοκα με διπεπτίδια με τα τριαδικά με αμινοξέα, παρατηρούμε ότι στα πρώτα η μεταβολή που προκαλούν οι υποκαταστάτες στη διαμόρφωση των νουκλεοζιτών είναι μεγαλύτερη από ό,τι στα δεύτερα. Καταλαβαίνουμε πως καθώς οι υποκαταστάτες μας πλησιάζουν ως μοντέλα τα βιολογικά μόρια που μας ενδιαφέρουν (DNA, πρωτεΐνη), τόσο πιο πολλές και αξιόπιστες πληροφορίες

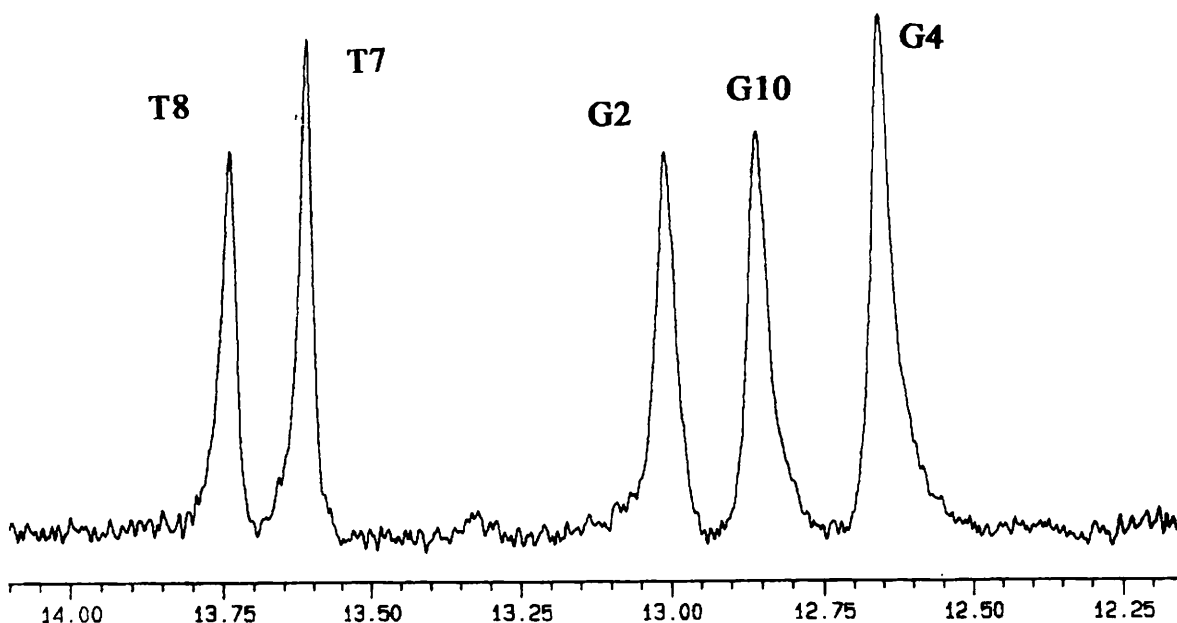
4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ Pd(II), trans-Cl₂Pd(glyglyOH)₂ ΚΑΙ trans-Cl₂Pd(glynlvalOH)₂ ΚΑΙ ΤΟΥ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ [d(CGCGAATTCGCG)]₂

4.1. Εισαγωγή

Μελέτες ¹H-NMR αλληλεπιδράσεων των cis- και trans-DDP με DNA οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο τύπος δεσμού που απαντά πιο συχνά είναι ο ενδοκλωνικά διασταυρούμενος δεσμός. Γενικά προτιμάται ο δεσμός με βάσεις γουανίνης και αν και οι δυο τύποι χηλικού: 5'-GG(N7-N7), 5'-GNG(N7-N7), έχουν αναφερθεί για το cis-DDP, μόνο ο δεύτερος τύπος έχει αναφερθεί για το trans- ισομερές [27,328-330]. Βέβαια, σήμερα γνωρίζουμε ότι σημαντικό ρόλο στη βιολογική δράση του φαρμάκου παίζει και ο σχηματισμός διασταυρούμενων δεσμών DNA-Pt(II)-πρωτεΐνης, καθώς και ότι πρόσφατα ανακαλύφθηκαν και σύμπλοκα λευκοχρύσου trans γεωμετρίας με αντικαρκινικές ιδιότητες [14β,γ]. Έτσι, αποφασίσαμε να μελετήσουμε, με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας ¹H-NMR, την αλληλεπίδραση των συμπλόκων trans-Cl₂Pd(glyglyOH)₂ και trans-Cl₂Pd(glynlvalOH)₂ με το δωδεκανουκλεοτίδιο [d(CGCGAATTCGCG)]₂. Το ιόν Pd(II) επιλέχθηκε αντί του Pt(II), αφού όπως είναι γνωστό αντιδρά 10⁵ φορές πιο γρήγορα από το Pt(II), ενώ διαθέτει ανάλογη ιονική ακτίνα με αυτό, προτιμά άτομα αζώτου παρά άτομα οξυγόνου ως δότες ηλεκτρονίων και σχηματίζει όπως και το Pt(II) σταθερά τετραγωνικά σύμπλοκα. Το δωδεκαμερές επιλέχθηκε διότι σχηματίζει σχετικά εύκολα δομή διπλής έλικας, η οποία έχει μελετηθεί σε στερεά κατάσταση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X [331] και σε διάλυμα με μεθόδους NMR [332]. Επίσης, το παραπάνω δωδεκανουκλεοτίδιο περιέχει την ακολουθία d(GAATTC), η οποία αναγνωρίζεται από το ένζυμο περιορισμού EcoRI [110,333].

Το δωδεκαμερές έχει σε διάλυμα τη δομή μιας δεξιόστροφης B-DNA έλικας, συμπληρώνοντας μια πλήρη στροφή αυτής. Επίσης είναι

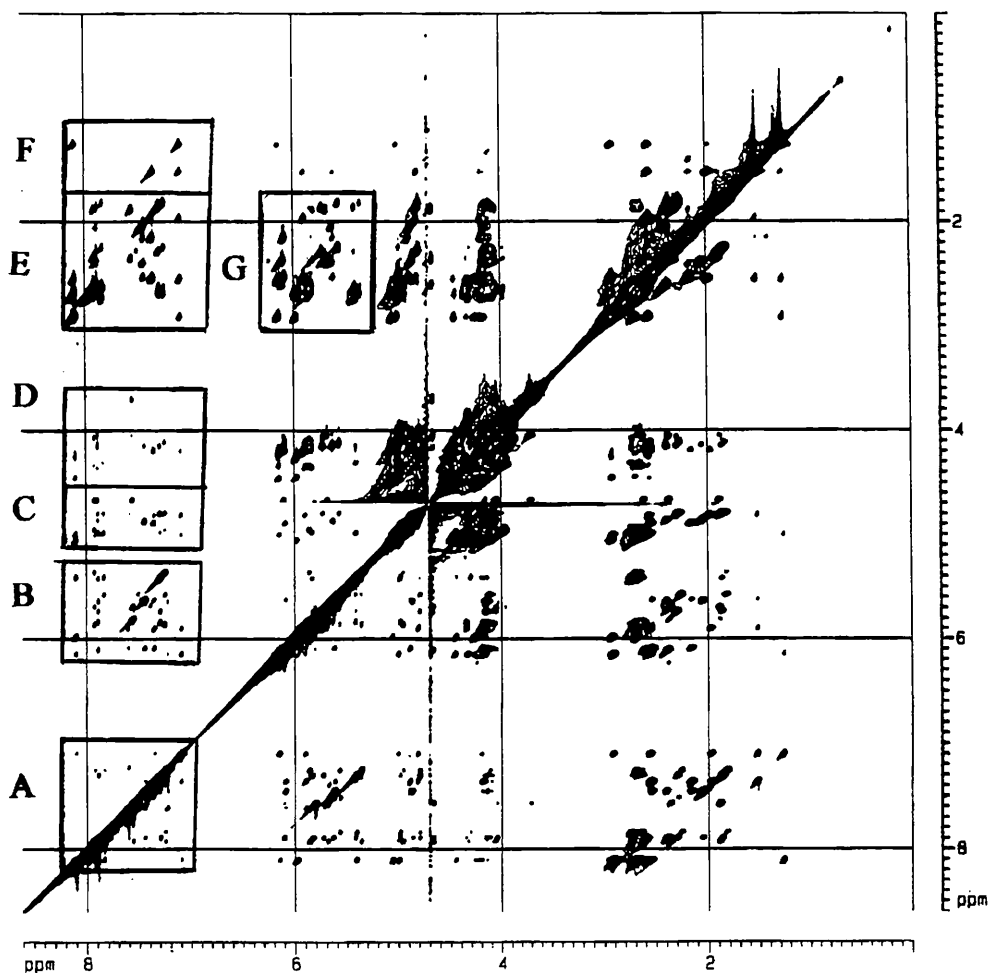
σήματα συντονισμού για τα μέθυλο πρωτόνια, τα οποία παρατηρούνται σε D_2O διαλύματα. Επίσης, σε H_2O διαλύματα παρατηρούνται ακόμα σήματα συντονισμού για 6 ίμινο πρωτόνια και για μερικά από τα 20 άμινο πρωτόνια. Τα σήματα συντονισμού των ίμινο πρωτονίων παρέχουν στοιχεία για τον αριθμό των ανέπαφων ζευγών βάσεων στο μόριο και έτσι δίνουν τη δυνατότητα αναγνώρισης τοπικών παραμορφώσεων στη διπλή έλικα. Σε κανονικές έλικες τα ίμινο πρωτόνια των βάσεων Α και Τ συντονίζονται σε μικρότερες τιμές πεδίου σε σχέση με τα ίμινο πρωτόνια των βάσεων G και C (Σχήμα 47). Για να αποφύγουμε την ανταλλαγή των ίμινο και άμινο πρωτονίων με το νερό συχνά μειώνουμε τη θερμοκρασία πραγματοποίησης του πειράματος NMR.



Σχήμα 47: Περιοχή συντονισμού των ίμινο πρωτονίων στο φάσμα 1H -NMR του δωδεκανουκλεοτιδίου σε H_2O .

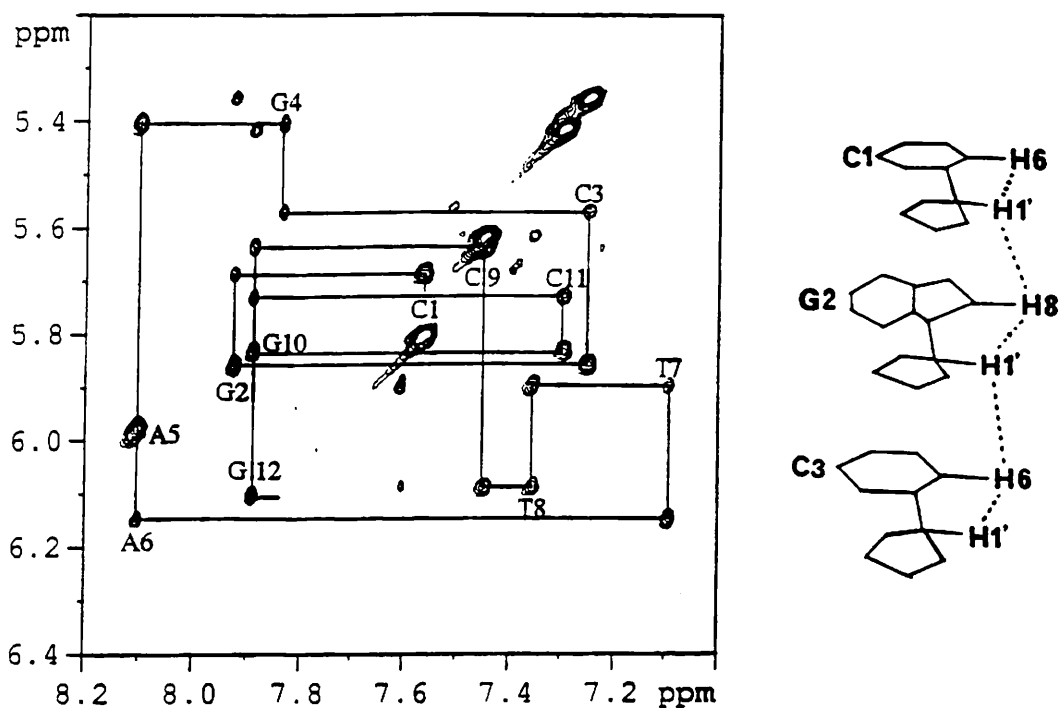
Ένα τυπικό φάσμα 1H -NMR του δωδεκανουκλεοτιδίου $[d(CGCGAATTCGCG)]_2$ σε D_2O φαίνεται στο Σχήμα 48. Διαφορετικές περιοχές του φάσματος αντιστοιχούν σε διαφορετικούς τύπους πρωτονίων. Τιτλοδότηση με διαμαγνητικά μεταλλικά ιόντα, όπως το

που προέρχονται από πρωτόνια, που ανήκουν στο ίδιο νουκλεοτίδιο και β) σε εκείνα που προέρχονται από πρωτόνια που ανήκουν σε διαφορετικά νουκλεοτίδια. Τα πρώτα επιτρέπουν την απόδοση των πρωτονίων των σακχάρων σε ένα συγκεκριμένο τύπο νουκλεοτιδίου, π.χ. C, T, G ή A, ενώ τα δεύτερα επιτρέπουν απόδοση των πρωτονίων, σύμφωνα με την ακολουθία σε συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο.

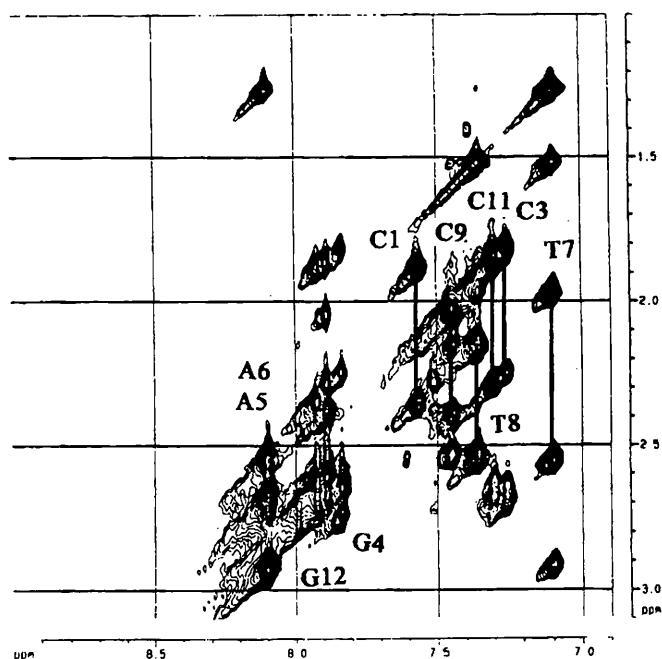


Σχήμα 49: Χάρτης του NOESY φάσματος στα 600 MHz του δωδεκανουκλεοτιδίου σε D₂O, όπου φαίνονται οι περιοχές που αντιστοιχούν σε διαφορετικούς τύπους πρωτονίων.

Αναφερόμενοι σε δεξιόστροφη δομή B-DNA, όπου οι νουκλεοβάσεις έχουν αντί προσανατολισμό σε σχέση με τις μονάδες της ριβόζης και η διαμόρφωση του σακχάρου είναι 2'-endo, μπορούμε



Σχήμα 50: Περιοχή H6/H8-H1' του NOESY φάσματος στα 600 MHz του δωδεκανουκλεοτιδίου $[d(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$. Οι συσχετίσεις ακολουθίας σημειώνονται.



Σχήμα 51: H6/H8-H2'/H2'' περιοχή του NOESY φάσματος στα 600 MHz του δωδεκανουκλεοτιδίου $[d(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$.

συντονισμού συνεχίζουν να υπάρχουν τα αρχικά σήματα των πρωτονίων αν και μειωμένης έντασης. Είναι δύσκολο βέβαια να αποδώσουμε με ακρίβεια τα νέα σήματα συντονισμού σε πρωτόνια συγκεκριμένων βάσεων, ώστε να μιλήσουμε με σιγουριά για τον τρόπο συμπλοκοποίησης. Παρόλα αυτά, βασιζόμενοι στη σύγκριση των ολοκληρωμένων εντάσεων των αρχικών και των νέων σημάτων, μπορούμε να αποδώσουμε την κορυφή στα 8.14 ppm στο πρωτόνιο H8 της γουανίνης G4, την κορυφή στα 8.25 ppm στο H8 της G2, την κορυφή στα 8.27 ppm στο H8 της G12 και αυτήν στα 8.30 ppm στο H8 της G10. Οι μετατοπίσεις αυτές είναι ανάλογες εκείνων που παρατηρήθηκαν και κατά την αλληλεπίδραση του δωδεκαμερούς $[d(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$ με το μονοδοντικό σύμπλοκο $[\text{Pd}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ [190]. Το πρωτόνιο H8 της G4 φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο από τη συμπλοκοποίηση και ακολουθεί το πρωτόνιο H8 της G2. Αντίθετα τα πρωτόνια H8 των G10 και G12 φαίνεται να επηρεάζονται λιγότερο. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί μια ένδειξη εκλεκτικής συμπλοκοποίησης του μετάλλου αρχικά μέσω του N7 αζώτου της γουανίνης G4 και στη συνέχεια μέσω του N7 αζώτου της γουανίνης G2.

Τα μέθυλο πρωτόνια των θυμινών T7 και T8 μετατοπίζονται προς μικρότερες τιμές πεδίου. Σε αναλογία Pd(II)/διπλής έλικας ίση με 1, νέα σήματα εμφανίζονται στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$, στα 1.53 και στα 1.27 ppm, για τα πρωτόνια των T7 και T8 αντίστοιχα. Καθώς αυξάνεται η αναλογία Pd(II)/διπλή έλικα, τα αρχικά σήματα της ελεύθερης έλικας εξαφανίζονται ενώ ενισχύονται τα νέα σήματα των πρωτονίων. Η μετατόπιση των μέθυλο πρωτονίων των θυμινών σε μικρότερες τιμές πεδίου έχει συνδυαστεί με τη θερμικά προκαλούμενη παραμόρφωση της διπλής έλικας σε δομή σπείρας (helix to coil transition) [335].

Όταν η αναλογία Pd(II)/διπλή έλικα γίνεται ίση με 1.5 παρατηρούμε ότι και τα σήματα των αρωματικών πρωτονίων και άλλων βάσεων, εκτός των γουανινών επηρεάζονται και νέα σήματα εμφανίζονται. Τα σήματα που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H8 των A5 και

τιμές πεδίου σε σχέση με τα αρχικά σήματα και δηλώνουν συμπλοκοποίηση του μετάλλου μέσω του αζώτου N7 των γουανινών. Το πρωτόνιο που επηρεάζεται περισσότερο είναι το H8 της γουανίνης G4, ενώ ακολουθεί το H8 της G2. Τα μέθυλο πρωτόνια των θυμινών μετατοπίζονται ελαφρά, κατά 0.06 ppm προς υψηλότερα πεδία το πρωτόνιο της T8 και κατά 0.03 ppm προς χαμηλότερα πεδία το πρωτόνιο της T7.

Φάσματα NOESY λήφθησαν για τις αναλογίες Pd(II)/διπλή έλικα 0.6, 1.2, 2.4 και 3.3. Το μονοπάτι της ακολουθίας ήταν δυνατό να συμπληρωθεί χρησιμοποιώντας τους συσχετισμούς H6/H8-H1' καθώς και H6/H8-H2'/H2'' ακόμα και για τιμή της παραπάνω αναλογίας ίση με 2.4. Συνεπώς, ακόμα και σε τόσο αυξημένη αναλογία το ολιγομερές συνεχίζει να υιοθετεί ανέπαφη τη διαμόρφωση δεξιόστροφης διπλής έλικας. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι η ένταση των NOE συσχετίσεων μεταξύ των σημάτων G4H8-H1' και C3H6-H1' και μεταξύ των σημάτων G2H8-H1' και C1H6-H1' παρουσιάζεται μειωμένη (Σχήμα 55).

Το NOESY φάσμα σε αναλογία Pd(II)/διπλή έλικα=3.3, δίνει μεγαλύτερες μεταβολές, δείχνοντας μια παραμόρφωση της διπλής έλικας. Στην περιοχή H6/H8-H1' τα σήματα G4H8-H1' και G2H8-H1' έχουν σχεδόν εξαφανιστεί. Το μονοπάτι της ακολουθίας έχει διακοπεί, λόγω της απουσίας NOE συσχετίσεων μεταξύ των σημάτων G4H8-H1' και C3H6-H1' και μεταξύ των σημάτων G2H8-H1' και C1H6-H1'. Επίσης, το NOE σήμα C3H5-G2H1' έχει εξαφανιστεί.

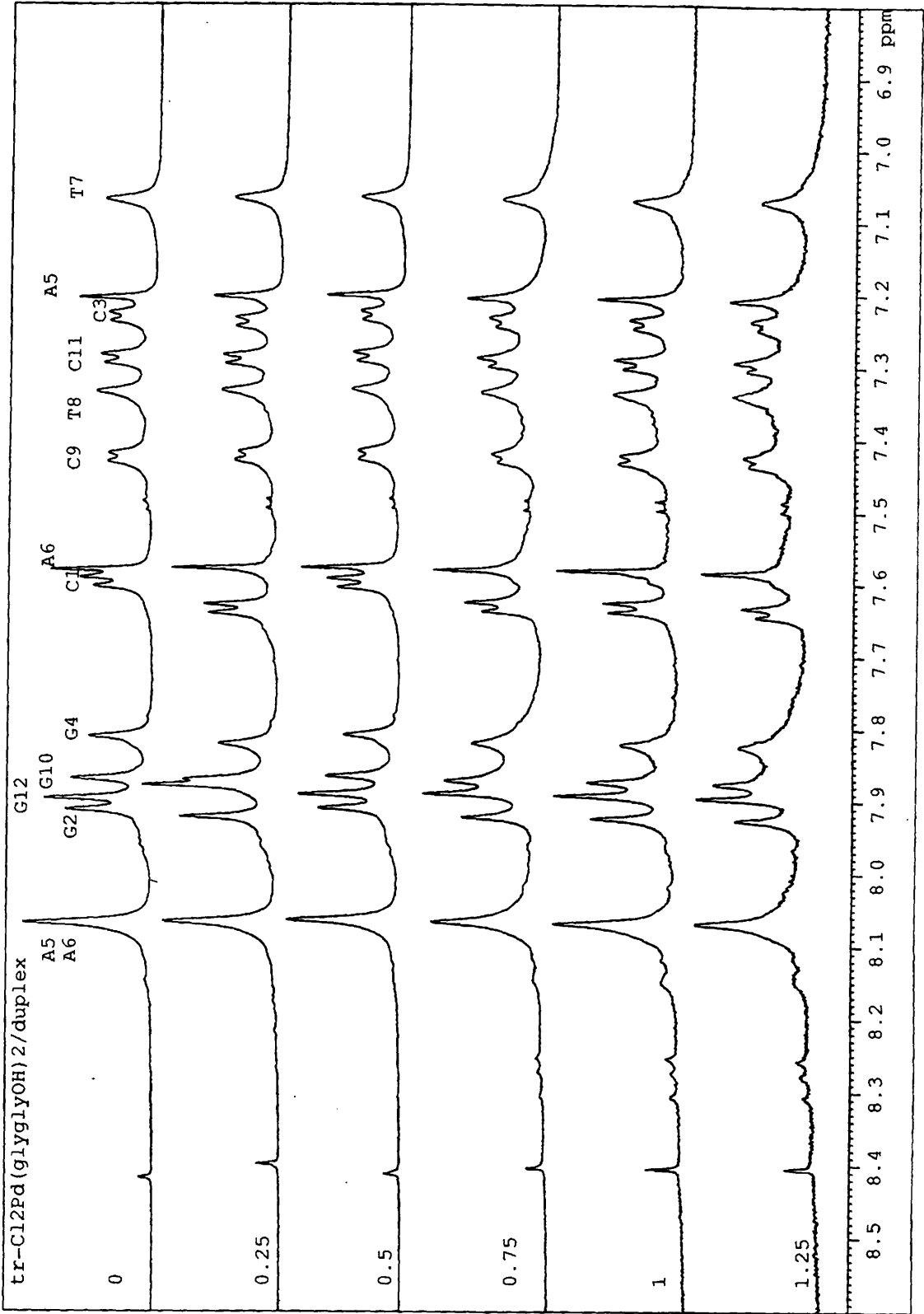
Στην αρωματική-αρωματική (H6/H8-H6/H8) περιοχή του φάσματος όλα τα σήματα NOE έχουν μειωθεί αρκετά και μερικά από αυτά έχουν εξαφανιστεί. Στην περιοχή H6/H8-H2'/H2'', η ένταση των NOE συσχετίσεων μεταξύ των σημάτων G2H8-H2' και C3H6-H2' έχει ελαττωθεί, ενώ οι NOE συσχετίσεις μεταξύ των σημάτων G4H8-H2' και C3H6-H2', καθώς και μεταξύ των σημάτων G2H8-H2' και C1H6-H2'

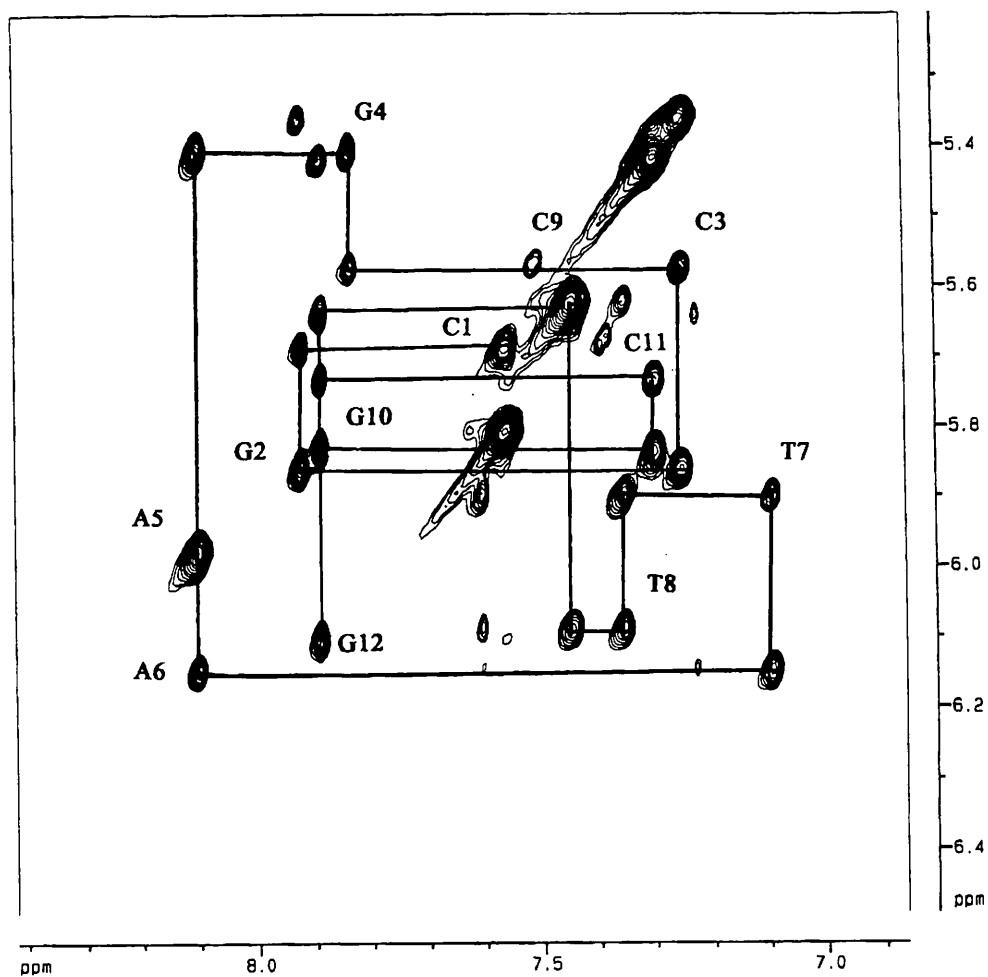
4.4. Συμπεράσματα

Η εκλεκτική συμπλοκοποίηση του δωδεκαμερούς $[d(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$ με διάφορα μεταλλικά ιόντα μελετήθηκε σχετικά πρόσφατα. Βρέθηκε ότι το Mn(II) και ο Zn(II) προτιμούν το άζωτο N7 της γουανίνης G4 [195,196], ενώ ο Hg συμπλέκεται στην περιοχή AT [113]. Επίσης η μελέτη της αλληλεπίδρασης του δωδεκαμερούς με διάφορα μονο- ή δις-υποκατεστημένα σύμπλοκα του παλλαδίου όπως $[\text{Pd}(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ και $[\text{Pd}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ και το άλας K_2PdCl_4 έδειξε ότι υπάρχει σημαντικός βαθμός εκλεκτικότητας [190]. Τα μονοϋποκατεστημένα παράγωγα προσβάλλουν τη διπλή έλικα στα άκρα της, ενώ δείχνουν μια εκλεκτικότητα για τις βάσεις G2 και G10. Τα δις-υποκατεστημένα παράγωγα δείχνουν μια εκλεκτικότητα για το άζωτο N7 της γουανίνης G4, ενώ τα ιόντα $\text{Pd}(\text{aq})^{2+}$ επηρεάζουν εξίσου τις βάσεις G4 και G2 [190].

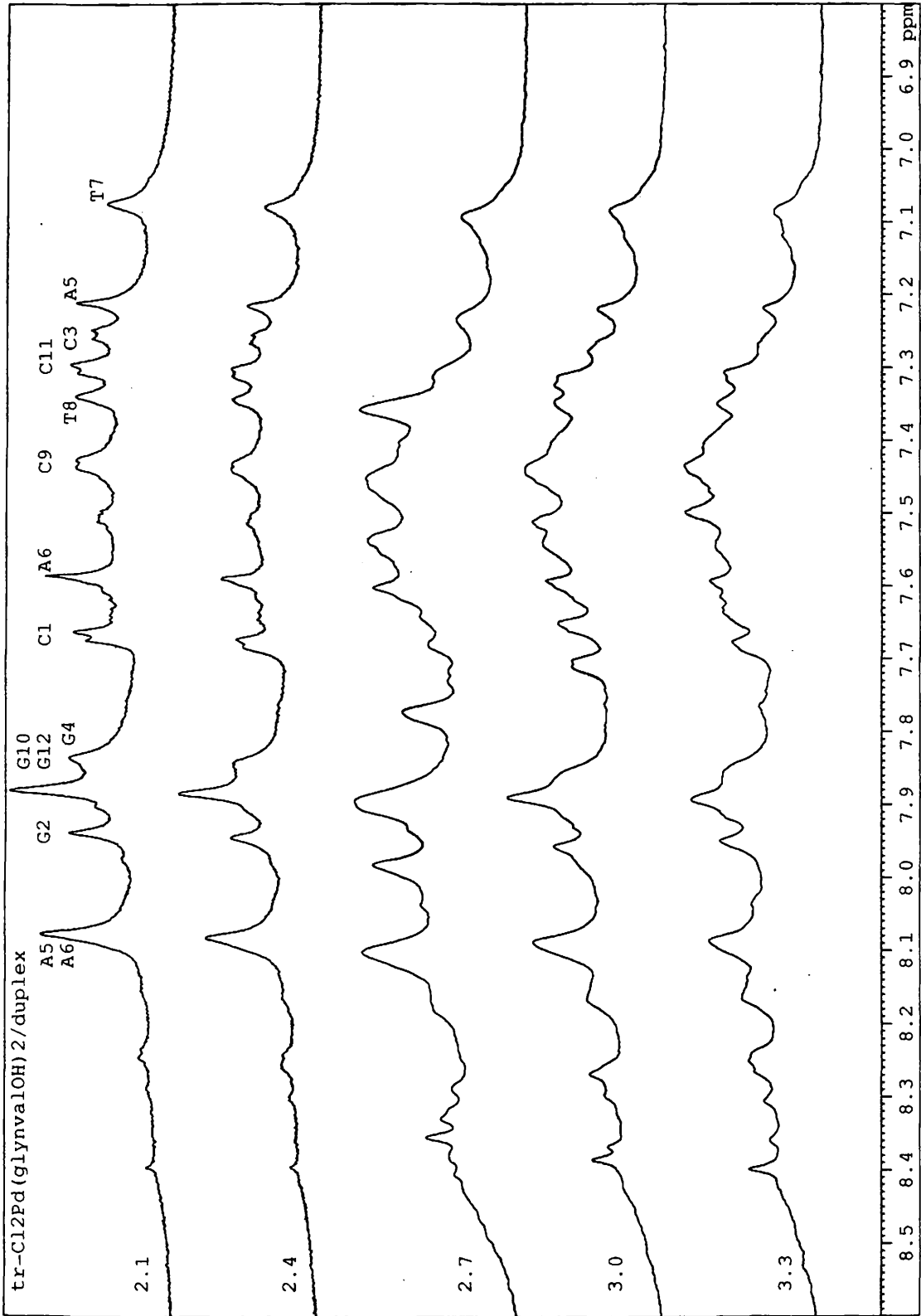
Επίσης, μελέτες σχετικές με το μηχανισμό συμπλοκοποίησης των *cis*- και *trans*-DDP με το DNA, έδειξαν σχηματισμό χηλικού συμπλόκου του τύπου 5'-GG(N7-N7) και 5'-GNG(N7-N7) για το *cis*-DDP, ενώ μόνο ο δεύτερος τύπος συμπλόκου βρέθηκε για το *trans*-ισομερές [27,326-328]. Το παραπάνω μοντέλο φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση του συστήματος που μελετάμε. Θεωρώντας ότι το Pt(II) έχει αντικατασταθεί από το Pd(II) , και τα δυο σύμπλοκα που χρησιμοποιήσαμε έχουν *trans*-γεωμετρία και δείχνουν την ίδια εκλεκτικότητα: προσβάλλουν αρχικά τη γουανίνη G4 και στη συνέχεια τη γουανίνη G2 του δωδεκαμερούς, εκλεκτικότητα ανάλογη των ιόντων $\text{Pd}(\text{aq})^{2+}$. Συμπεραίνουμε ότι είναι πολύ πιθανό και σε αυτή την περίπτωση να σχηματίζεται χηλικό σύμπλοκο τύπου GNG(G2C3G4)(N7-N7) μεταξύ του Pd(II) και του δωδεκαμερούς.

Οι παρατηρήσεις μας από τα $^1\text{H-NMR}$ και NOESY φάσματα κατά τη διάρκεια των δυο τιτλοδοτήσεων, οδηγούν στο συμπέρασμα πως περνώντας από το σύμπλοκο *trans*- $\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{glyglyOH})_2$ στο *trans*-

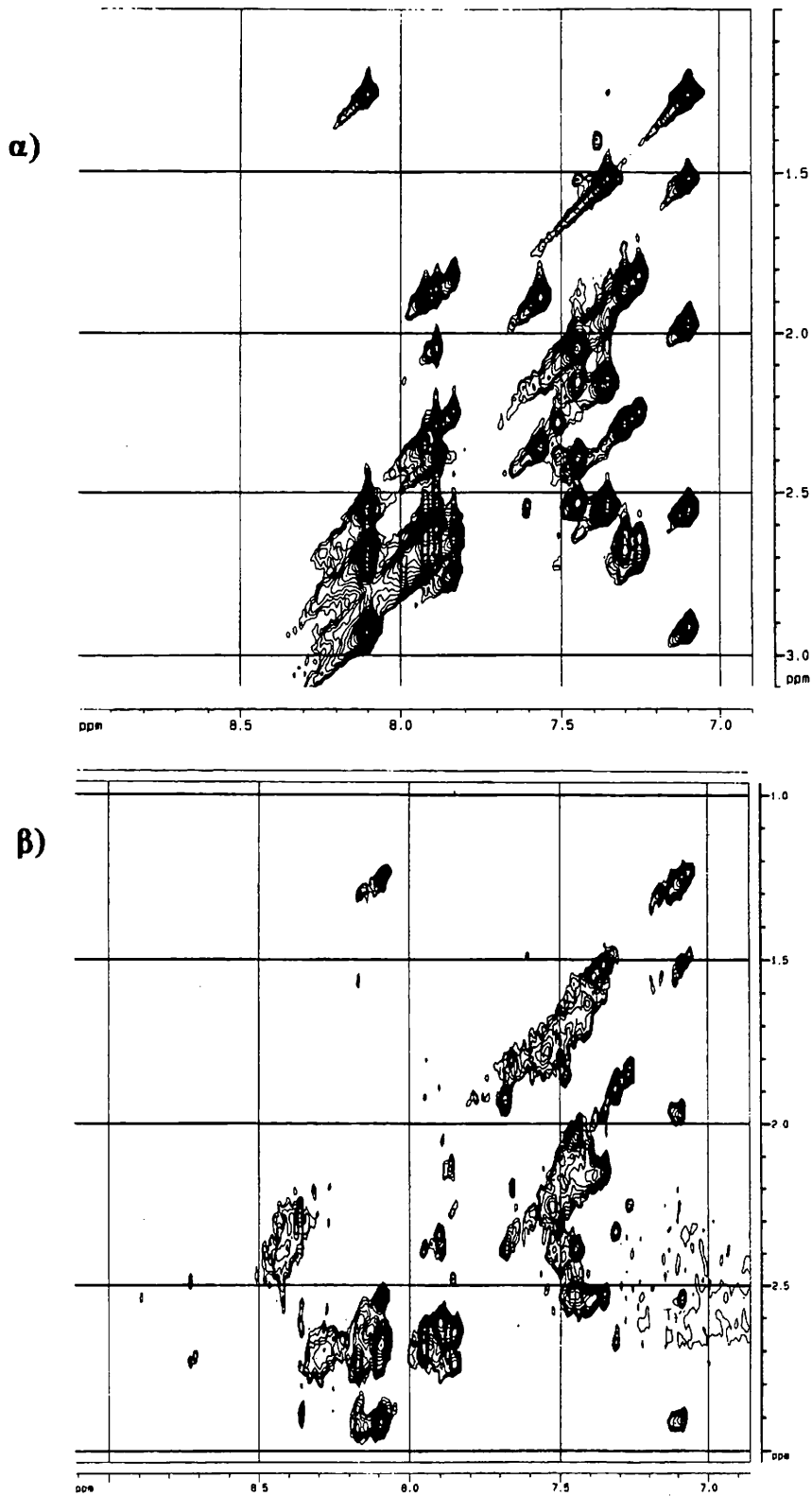




Σχήμα 53: 600 MHz ^1H -NMR NOESY φάσμα στους 300 K της αρωματικής- $\text{H1}'$ περιοχής του δωδεκαμερούς $[\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$, σε διάλυμα αυτού 3 mM, μετά την προσθήκη trans- $\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{glyglyOH})_2$ σε αναλογία Pd(II)/διπλή έλικα ίση με 2.



Σχήμα 54: 600 MHz ¹H-NMR φάσμα της αρωματικής περιοχής του δωδεκαμερούς [d(CGCGAATTCGG)]₂, στο οποίο φαίνονται τα αποτελέσματα της διαδοχικής προσθήκης του συμπλόκου trans-Cl₂Pd(gly_nvalOH)₂.



Σχήμα 56: 600 MHz ^1H -NMR NOESY φάσμα στους 300 K της αρωματικής- $\text{H}2'/\text{H}2''$ περιοχής του δωδεκαμερούς $[\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})_2]$, σε διάλυμα αυτού 3 mM: α) πριν την προσθήκη συμπλόκου του μετάλλου, β) μετά την προσθήκη trans- $\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{glynvalOH})_2$ σε αναλογία Pd(II)/διπλή έλικα ίση με 3.3.

Elmer 783 ή σε φασματοφωτόμετρο FT-IR, Perkin-Elmer 1720X, στην περιοχή $4000-200\text{ cm}^{-1}$, σε παστίλιες KBr για τα σύμπλοκα και σε Nujol για τα δευτεριωμένα ανάλογά τους.

Τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των συμπλόκων λήφθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή/και υψηλότερη σε όργανα Bruker AMX-400 MHz (Παν/μιο Ιωαννίνων) και Bruker DRX-600 MHz (Παν/μιο Bergen, Νορβηγίας), σε D_2O , με εσωτερική πρότυπη ουσία αναφοράς TSP, δηλ. $(\text{CH}_3)_4\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_4\text{Na}$ $\{\delta(\text{CH}_3)=0.0\text{ ppm}, \delta(\text{CH}_2)=0.627\text{ (t) ppm}, \delta(\text{CH}_2)=1.73\text{ ppm (m)}\}$. Χρησιμοποιήθηκε εύρος συχνοτήτων 6024 Hz και 6009 Hz, στα 400 και 600 MHz αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκαν 16 σαρώσεις και συλλέχθηκαν 16K σημεία. Τέλος, κατά την επεξεργασία των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε ένας παράγοντας διεύρυνσης των γραμμών (line broadening factor, lb) με τιμή 0.3 Hz.

Τα φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ των συμπλόκων λήφθηκαν στο όργανο Bruker AMX-400 MHz, στα 100.62 MHz. Η συγκέντρωση του συμπλόκου ήταν περίπου 20 mM. Χρησιμοποιήθηκε εύρος συχνοτήτων 22727 Hz, πραγματοποιήθηκαν 2500-3000 σαρώσεις και συλλέχθηκαν 16K σημεία. Κατά την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε line broadening factor με τιμή 2.5 Hz.

Τα φάσματα $^{195}\text{Pt-NMR}$ λήφθηκαν στο όργανο Bruker AMX-400 MHz, στα 86.02 MHz. Τα σήματα συντονισμού είναι σχετικά ως προς το πρότυπο K_2PtCl_4 (1630 ppm). Η συγκέντρωση των συμπλόκων ήταν περίπου 20 mM. Πραγματοποιήθηκαν 40000 σαρώσεις και το εύρος συχνοτήτων ήταν 125 KHz. Η διάρκεια του παλμού ήταν 35.6 ms, ο χρόνος συλλογής (acquisition time) ήταν 65 ms και ο χρόνος καθυστέρησης (delay time) ήταν 0.1 sec. Κατά την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε παράγοντας διεύρυνσης των γραμμών (lb) με τιμή 25 Hz.

μέχρι μικρού όγκου (~2 ml) σε rotary evaporator και διαβιβάστηκε σε στήλη Sephadex G-10 (Pharmacia), δαστάσεων 60×1.5 cm και εκλούστηκε με νερό, με ταχύτητα ροής 1 ml/min. Συλλέχθηκαν κλάσματα των 2 ml, τα οποία ανιχνεύτηκαν με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού στα 260 nm. Πρώτα εκλούεται το τριαδικό σύμπλοκο και στη συνέχεια εκλούεται ποσότητα περίσσειας γουανοσίνης. Ακολούθησε συμπύκνωση των κλασμάτων που περιείχαν το προϊόν μέχρι ξηρού και στη συνέχεια στοιχειακή ανάλυση, καθώς και χαρακτηρισμός με φάσματα IR και NMR και μετρήσεις μοριακής αγωγιμότητας. Οι αποδόσεις ήταν 15-30%.

(ii) 1.5 mmole κυτιδίνης διαλύθηκε σε 50 ml νερού, υπό ανάδευση στους 60°C, απουσία φωτός. Στο διάλυμα προστέθηκε 1 mmole του κατάλληλου χηλικού συμπλόκου $\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{amac})]\text{NO}_3$ και το μίγμα θερμάνθηκε στους 60 °C για 2 μέρες. Το pH διατηρήθηκε στην τιμή 5.0 με την περιοδική προσθήκη μικρής ποσότητας διαλύματος HNO_3 10^{-1} M. Στη συνέχεια, το διάλυμα συμπυκνώθηκε μέχρι όγκου 2 ml και το προϊόν απομονώθηκε με χρωματογραφία πηκτής (gel filtration), όπως αναφέρεται παραπάνω. Οι αποδόσεις ήταν 15-30%.

1.4.2. Σύμπλοκα του τύπου $\text{cis}-[(\text{nucl})_2\text{Pt}(\text{dipeptidester})]\text{Cl}_2$, όπου $\text{nucl}=\text{γουανοσίνη}$ (i), κυτιδίνη (ii) και $\text{dipeptidester}=\text{glyglyOEt}$, glyalaOMe , gly-2-abaOMe , glynvalOMe , glynleuOMe .

(i) 0.45 mmoles γουανοσίνης διαλύθηκαν σε 50 ml νερού, υπό ανάδευση στους 40 °C. Προστέθηκαν 0.15 mmoles του κατάλληλου δυαδικού συμπλόκου $\text{cis}-\text{Cl}_2\text{Pt}(\text{dipeptidester})_2$ και το μίγμα θερμάνθηκε στους 40 °C για 2 μέρες, απουσία φωτός, μέχρι που έγινε άχρωμο (από ελαφρά κίτρινο που ήταν αρχικά). Το pH του αντιδρώντος μίγματος παρέμεινε σταθερό στην τιμή 4.5, με την περιοδική προσθήκη μικρής ποσότητας

Το δωδεκανουκλεοτίδιο αγοράστηκε από την "Integrated DNA Technologies", Inc. USA. Απομονώθηκε καθαρό με χρήση χρωματογραφίας πηκτικής, αφού προστέθηκε σε αυτό μικρή ποσότητα διαλύματος ETDA 2 mM. Η έκλουση έγινε με αποσταγμένο νερό σε στήλη Sephadex G-25, διαστάσεων 120×2.5 cm και τα κλάσματα όγκου 5 ml ταυτοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στα 260 nm. Στη συνέχεια το μίγμα των κλασμάτων ξηράνθηκε με λυοφιλοποίηση και αφού επαναδιαλύθηκε σε νερό διαβιβάστηκε μέσω ρητίνης χηλικοποίησης (Sigma inc.) μέσα σε γυάλινο σιφώνιο, με σκοπό την πλήρη απομάκρυνση των παραμαγνητικών προσμίξεων. Η ποσότητα του ολιγονουκλεοτιδίου προσδιορίστηκε με μετρήσεις της απορρόφησης στα 260 nm, υποθέτοντας ότι το δωδεκαμερές υιοθετεί τυχαία μονόκλωνη διαμόρφωση σε αραιά υδατικά διαλύματα, απουσία ρυθμιστικού συστήματος (buffer). Χρησιμοποιώντας συντελεστή $\epsilon_{260} = 1.107 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [344] για τον ένα κλώνο του ολιγομερούς, η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε να είναι 3 mM και στα δύο αρχικά διαλύματα, που χρησιμοποιήθηκαν για τις δύο σειρές τιτλοδοτήσεων. Πριν τη χρησιμοποίηση των δειγμάτων, αυτά υποβλήθηκαν σε διαδικασία annealing, δηλαδή αργή ψύξη τους σε υδρόλουτρο από τους 60 °C σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με σκοπό το σχηματισμό διπλής έλικας από τα ολιγομερή.

Για τη λήψη NMR φασμάτων σε H₂O, τα δύο δείγματα του DNA διαλύθηκαν σε 0.4 ml H₂O, το οποίο περιείχε 10% D₂O και 200 mM NaCl. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 4.5, με προσθήκη μικρών ποσοτήτων διαλύματος NaOH, 0.01 M. Για τη λήψη NMR φασμάτων των δευτεριωμένων δειγμάτων, αυτά λυοφιλοποιήθηκαν μέχρι ξηρού και διαλύθηκαν σε 99.9% D₂O και ακολούθησε και επόμενη λυοφιλοποίηση και επαναδιάλυσή τους σε 99.96% D₂O και τέλος μεταφορά τους σε σωλήνες 5 mm O. D. NMR.

Κατά τις τιτλοδοτήσεις, έγινε διαδοχική προσθήκη μικρών ποσοτήτων συμπλόκων του παλλαδίου σε στερεή μορφή στο διάλυμα

μια εκθετική συνάρτηση, αυξάνοντας το εύρος των γραμμών κατά 0.3 Hz και ακολούθησε μετασχηματισμός Fourier.

Τα ^1H -NOESY φάσματα λήφθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο States-TPPI. Στο χρόνο t_2 συλλέχθηκαν 2048 σημεία για κάθε μια από τις 1024 προσαυξήσεις του t_1 . Πραγματοποιήθηκαν 32 σαρώσεις για κάθε προσαύξηση. Το εύρος συχνοτήτων ήταν 6009 Hz και ο χρόνος αποδιέγερσης 2 sec. Ο χρόνος μίξης ήταν 200 msec. Η ένταση του σήματος του νερού μειώθηκε κατά τη διάρκεια της αποδιέγερσης με ένα παλμό ισχύος 50 dB. Τα δεδομένα πολλαπλασιάστηκαν με μια τετραγωνική ημιτονοειδή συνάρτηση, ακολούθησε μετασχηματισμός Fourier και υπολογίστηκε το συνολικό φάσμα.

- Caputo, F. P. Intini, G. Natile, *Chem.-Biol. Interactions*, 98 (1996) 251.
15. E. B. Double, *Plat. Met. Rev.*, 29 (1985) 118.
 16. E. Bajetta, R. Rovej, R. Buzzoni, M. Vagliniand and G. Bonadonna, *Cancer Treat. Rep.*, 66 (1982) 1299.
 17. M. V. Fiorentino and C. Ghiotto, *Inorg. Chim. Acta*, 137 (1987) 59.
 18. M. E. Howe-Grant and S. Lippard, *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel, Ed., Vol. 20, Marcel Dekker, New York, 1980, σελ. 63-125.
 19. M. C. Lim and R. B. Martin, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 38 (1976) 1911.
 20. α) R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.*, 45 (1968) 581.
b) S. L. Bruhn, J. H. Toney and S. J. Lippard, *Progress in Inorganic Chemistry*, S. J. Lippard, Ed., Vol. 38, 1990 John Wiley & Sons, Inc., σελ. 477-516.
 21. N. Farrell, "Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents", 1st Eds, London, Kluwer publ., 1989, chapt. 2.4.1.
 22. J. J. Roberts, A. J. Thomson, *Progr. Nucl. Acid Res. and Mol. Biology*, 22 (1979) 71.
 23. A. Eastman, *Pharmacol. Ther.*, 34 (1987) 155.
 24. A. L. Pinto and S. J. Lippard, *Biochem. Biophys. Acta*, 780 (1985) 167.
 25. J. Reedijk, *Pure Appl. Chem.*, 59 (1987) 181.
 26. J. Reedijk and P. H. M. Lohman, *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.*, 11 (1985) 173.
 27. S. E. Sherman and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 87 (1987) 1153.
 28. M. J. Bloemink and J. Reedijk, "Metal Ions in Biological Systems", H. Sigel, Ed., 1996, Vol. 32, σελ. 641-685.
 29. A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. H. J. der

- Toney, S. J. Lippard and J. M. Essigman, *Biochemistry*, 29 (1990) 5872.
46. T. V. O'Halloran, *Science*, 261 (1993) 715.
47. D. J. Thiele, *Nucl. Acids Res.*, 20 (1993) 1183.
48. J. E. Coleman, *Annu. Rev. Biochem.*, 61 (1992) 897.
49. M. A. Khaled, C. L. Watkins and J. C. Hasey, *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, 106 (1982) 1426.
50. H. C. Marnirot, *J. C. Crit. Rev. Biochem.*, 11 (1981) 213.
51. M. Sabat, "Metal Ions in Biological Systems", H. Sigel, Ed., 1996, Vol. 32, σελ. 521-555..
52. N. P. Pavletich and C. O. Pabo, *Science*, 252 (1991) 809.
53. R. L. Williams, D. A. Oren, J. Munoz-Dorado, S. Inouye, M. Inouye and E. Arnold, *J. Mol. Biol.*, 234 (1993) 1230.
54. L. S. Beese and T. A. Steitz, *EMBO J.*, 10 (1991) 25.
55. H. Sigel, *Chem. Soc. Rev.*, 22 (1993) 255.
56. K. Aoki, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 748 (1976).
57. E. C. Fusch and B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 7204.
58. M. J. Clarke and H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (1975) 1397.
59. T. J. Kistenmacher, L. G. Marzilli and M. Rossi, *Bioinorg. Chem.*, 6 (1976) 347.
60. R. M. K. Dale, E. Martin, D. C. Livingston and D. C. Ward, *Biochemistry*, 14 (1975) 2447.
61. O. Yamauchi, *J. Molecular Catalysis*, 23 (1984) 255.
62. O. Yamauchi, *Pure Appl. Chem.*, 67 (1995) 297.
63. L. G. Marzilli and T. J. Kistenmacher, *Acc. Chem. Res.*, 10 (1977) 146.
64. Z. M. Banjar, L. S. Hnilika, *Biochem.*, 23 (1984) 1921.
65. S. Kasselouri, A. Garoufis, M. Lamera-Hadjiliadis and N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.*, 104 (1990) 1.
66. A. Garoufis, S. Kasselouri, M. Lamera-Hadjiliadis and N. Hadjiliadis, *Chimika Chronika*, 21 (1992) 11.

- and B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta*, 184 (1991) 209.
85. F. J. Pesch, H. Preut and B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta*, 169 (1990) 195.
86. V. Aletras and N. Hadjiliadis, *Polyedron*, 11 (1992) 1359.
87. V. Aletras, A. Iakovidis and N. Hadjiliadis, "Properties and Chemistry of Biomolecular Systems", N. Russo (eds.), 1994 Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 19-22.
88. V. Aletras, N. Hadjiladis, A. Lymberopoulou-Karaliota, I. Rombeck and B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta*, 227 (1994) 17.
89. A. Iakovidis, N. Hadjiliadis, F. Dahan, J.-P. Laussac and B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta*, 175 (1990) 57.
90. B. T. Khan, G. N. Goud and S. V. Kumari, *Inorg. Chim. Acta*, 80 (1983) 145.
91. B. T. Khan, K. Venkatasubramanian, K. Najmuddin, S. Shamsuddin and S. M. Zakeeruddin, *Inorg. Chim. Acta*, 179 (1991) 117.
92. D. Gibson, G. M. Arvanitis and H. M. Berman, *Inorg. Chim. Acta*, 218 (1994) 11.
93. S. Hohmann, A. Erxleben, T. Wienkotter and B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta*, 247 (1996) 79.
94. J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, 171 (1953) 738.
95. R. E. Dickerson, *Scientific American*, (1983) 3.
96. A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel and A. Rich, *Nature*, 282 (1979) 680.
97. J. L. Crawford, F. J. Kolpak, A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, J. H. van Boom, G. van der Marel and A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 (1980) 4016.
98. R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura and R. E. Dickerson, *Nature*, 287 (1980) 755.
99. V. Tereshko, L. Urvp, L. Malinina, T. Huynh-Dinh and J. A.

- Acad. Sci. USA*, 80 (1983) 2184.
115. A. Bax, R. H. Griffey and B. L. Hawkins, *J. Magn. Reson.*, 55 (1983) 301.
116. R. A. Byrd, M. F. Summers and G. Zon, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 504.
117. S. J. Berners-Price, J. D. Ranford and P. J. Sadler, *Inorg. Chem.*, 33 (1994) 5842.
118. T. J. Norwood, J. Boyd, J. E. Heritage, N. Soffe and I. D. Campbell, *J. Magn. Res.*, 87 (1990) 488.
119. A. Bax and M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 2093.
120. P. Schmieder, J. H. Ippel, H. van der Elst, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, C. Altona and H. Kessler, *Nucl. Acids Res.*, 20 (1992) 4747.
121. D. H. Live, I. Radhakrishnan, V. Misra and D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (1991) 4687.
122. I. Radhakrishnan, X. Gao, C. de los Santos, D. Live and D. J. Patel, *Biochemistry*, 30 (1991) 9022.
123. J. Ott and F. Eckstein, *Biochemistry*, 24 (1985) 2530.
124. D. G. Gorenstein, *Chem. Rev.*, 94 (1994) 1315.
125. S. E. Sherman, D. Gibson, A. H. J. Wang and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 110 (1988) 7368.
126. G. Admiral, J. L. van der Veer, R. A. G. de Graaf, J. H. J. den Hartog and J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, 109 (1987) 592.
127. T. Maniatis, A. Jeffrey and H. van deSande, *Biochemistry*, 14 (1975) 3787.
128. C. J. van Garderen and L. P. A. van Houte, *Eur. J. Biochem.*, 225 (1994) 1169.
129. C. J. van Garderen, H. van den Elst, J. H. van Boom and J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 4123.

146. J. H. J. den Hartog, C. Altona, J. H. van Boom, A. T. M. Marcellis, G. A. van der Marel, L. J. Rinkel, G. Wille-Hazeleger and J. Reedijk, *Eur. J. Biochem.*, 134 (1983) 485.
147. D. Gibson and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 26 (1987) 2275.
148. J. H. J. den Hartog, C. Altona, G. A. van der Marel and J. Reedijk, *Eur. J. Biochem.*, 147 (1985) 371.
149. J. L. van der Veer, G. J. Ligtoet, H. van der Elst and J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 3860.
150. M. Garner, M. Green, N. Boogaard and J. Reedijk, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1993) 290.
151. F. Gonnet, J. Kozelka and J.-C. Chottard, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31 (1992) 1483.
152. N. Boogaard, C. Altona and J. Reedijk, *J. Inorg. Biochemistry*, 49 (1993) 129.
153. J. L. van der Veer, H. van der Elst, J. H. J. den Hartog, A. M. J. Fichtinger-Schepman and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 25 (1986) 4657.
154. T. W. Hambley, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1988) 221.
155. G. Admiral, M. Alink, C. Altona, F. J. Dijt, C. J. van Garderen, R. A. G. de Graaf and J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 930.
156. J. L. van der Veer, G. A. van der Marel, H. van der Elst and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 26 (1987) 2272.
157. W. I. Sundquist and S. J. Lippard, *Coord. Chem. Rev.*, 100 (1990) 293.
158. M. J. Bloemink and J. Reedijk, "Metal Ions in Biological Systems", H. Sigel (ed.), Vol. 32 (1996), pp 641-685.
159. S. Wherland, E. Deutsch, J. Eliason and P. B. Sigler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 54 (1973) 662.
160. W. M. Scovell and R. S. Reaach, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (1979) 174.

- Soc., 111 (1989) 7057.
175. C. A. Lepre, L. Chassot, C. E. Costello and S. J. Lippard, *Biochemistry*, 29 (1990) 811.
176. S. F. Bellon and S. J. Lippard, *Biophys. Chem.*, 35 (1990) 179.
177. J. P. Caradonna and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 27 (1988) 1454.
178. S. Mukundan, Y. Xu, G. Zon and L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.*, 113 (1991) 3021.
179. K. J. Barnham, S. J. Berners-Price, T. A. Frenkiel, U. Frey and P. J. Sadler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34 (1995) 1874.
180. R. M. Wing, P. Pjura, H. R. Drew and R. F. Dickerson, *EMBO J.*, 3 (1984) 1201.
181. K. Inagaki, K. Kasuya and Y. Kidani, *Inorg. Chim. Acta*, 91 (1984) L13.
182. J. Kozelka, G. A. Petsko and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 4079.
183. T. P. Kline, L. G. Marzilli, D. Line and G. Zon, *Biochem. Pharm.*, 40 (1990) 97.
184. P. G. Yohannes, G. Zon, P. W. Doetsch and L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 5105.
185. M. Iwamoto, S. Mukundan and L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 6238.
186. F. Herman, J. Kozelka, V. Stoven, E. Guittet, J.-P. Girault, T. Huynh-Dinh, J. Igolen, J.-Y. Lallemand and J.-C. Chottard, *Eur. J. Biochem.*, 194 (1990) 119.
187. S. F. Bellon, J. H. Coleman and S. J. Lippard, *Biochemistry*, 30 (1991) 8026.
188. J. A. Rice, D. M. Crothers, A. L. Pinto and S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 (1988) 4158.
189. C. A. Franklin, J. V. Fry and J. Grant Collins, *Inorg. Chem.*, 35 (1996) 7541.

- 41 (1968) 854.
208. T. Komorita, J. Hidaki and Y. Shimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 44 (1971) 3353.
209. L. D. Pettit and M. Bezer, *Coord. Chem. Rev.*, 61 (1985) 97.
210. L. E. Nance, A. F. Schreiner and G. Frye, *Bioinorg. Chem.*, 3 (1974) 135.
211. H. Kozlowski, M. Jezowska and H. Szyszuk, *J. Mol. Struct.*, 50 (1978) 73.
212. H. Kozlowski and M. Jezowska, *Chem. Phys. Letters*, 47 (1977) 452.
213. R. W. Hay and M. P. Pujari, *Inorg. Chim. Acta*, 123 (1986) 175.
214. H. Kozlowski, *Inorg. Chim. Acta*, 31 (1978) 135.
215. P. I. Vestues and R. B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 7906.
216. G. E. Kirvan and D. W. Margerum, *Inorg. Chem.*, 24 (1985) 3017.
217. W. Beck, H. Bissinger, M. Girnth-Weller, B. Purucker, G. Thiel, H. Zippel, H. Seidenberger, B. Wappes and H. Schonenberger, *Chem. Ber.*, 115 (1982) 2256.
218. W. Beck, H. Bissinger, T. Castrillo de Castro, L. Olgemoller and B. Purucker, *Chem. Ber.*, 118 (1985) 3135.
220. B. Purucker and W. Beck, *Z. Naturforsch.*, 27b (1972) 1140.
220. W. Beck, *Pure & Appl. Chem.*, 60 (1988) 1357.
221. M. Castillo, A. Romero and E. Ramirez, *Trans. Met. Chem.*, 8 (1983) 262.
222. W. Beck, B. Purucker and M. Girnth, *Z. Naturforsch.*, 31b (1976) 832.
223. H. Kozlowski and L. D. Pettit, "Chemistry of the Platinum Group Metals", ed. F. R. Hartley, Elsevier, 1991, Chap. 15.
224. A. Iakovidis and N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.*, 135 (1994) 17.

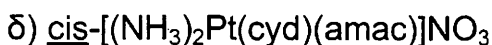
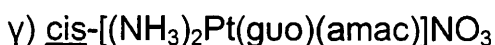
- Soc., 95 (1973) 1633.
242. B. Lippert, U. Thewalt, H. Schollhorn, D. M. L. Goodgame and R. W. Rollins, *Inorg. Chem.*, 23 (1984) 2807.
243. G. Y. H. Chu, R. E. Duncan and R. S. Tobias, *Inorg. Chem.*, 16 (1977) 2625.
244. M. Nee and J. D. Roberts, *Biochemistry*, 21 (1982) 4920.
245. R. Melanson and F. D. Rochon, *Inorg. Chem.*, 17 (1978) 679.
246. A. P. Hitchcock, C. J. L. Lock and W. M. C. Pratt, *Inorg. Chim. Acta*, 66 (1982) L45
247. H. Schollhorn, R. Beyerle-Pfnur, U. Thewalt and B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (1986) 3680.
248. R. Beyerle-Pfnur, B. Brown, R. Faggiani, B. Lippert and C. J. L. Lock, *Inorg. Chem.*, 24 (1985) 4001.
249. S. Louie and R. Bau, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 3874.
250. S. Jaworski, H. Schollhorn, P. Eisenmann, U. Thewalt and B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta*, 153 (1988) 31.
251. R. Stewart and M. G. Harris, *Can. J. Chem.*, 55 (1977) 3807.
252. R. Faggiani, B. Lippert, C. J. L. Lock and R. A. Speranzini, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 1111.
253. R. Beyerle-Pfnur, H. Schollhorn, U. Thewalt and B. Lippert, *J. Chem. Commun.*, (1985) 1510.
254. L. J. Bellamy "The infrared spectra of Complex Molecules", 3rd Edition, Chapman and Hall, (1975), p. 109.
255. L. J. Bellamy "The infrared spectra of Complex Molecules", 3rd Edition, Chapman and Hall, (1975), p. 279,281.
256. L. J. Bellamy "The infrared spectra of Complex Molecules", 3rd Edition, Chapman and Hall, (1975), p. 315.
257. U. Taubald, U. Nagel and W. Back, *Chem. Ber.*, 117 (1984) 1003.
258. L. E. Nance and H. G. Frye, *Inorg. Nucl. Chem.*, 38 (1976) 637.
259. C. L. Angell, *J. Chem. Soc.*, (1961) 504.

- 3679.
277. M. D. Reily, K. Wilkowski, K. Shinozuka and L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.*, 24 (1985) 37.
278. P.-C. Kong and T. Theophanides, *Inorg. Chem.*, 13 (1974) 1981.
279. A. Eastman, *Biochemistry*, 21 (1982) 6732.
280. O. Krizanovic, F. J. Pesch and B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta*, 165 (1989) 145.
281. J. D. Orbell, L. G. Marzilli and T. J. Kistenmacher, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 5126.
282. B. Song, G. Feldmann, M. Bastian, B. Lippert and H. Sigel, *Inorg. Chim. Acta*, 235 (1995) 99.
283. Ν. Αλεξάνδρου: "Γενική Οργανική Χημεία", Τεύχος Β, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσ/νίκη 1985, σελ. 83-134.
284. C. Altona and M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.*, 95 (1973) 2333.
285. C. D. Jardetzky, *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (1962) 62.
286. C. D. Jardetzky, *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 229.
287. D. B. Davies and S. S. Danyluk, *Biochemistry*, 13 (1974) 4417.
288. C. H. Kim and R. H. Sarma, *J. Am. Chem. Soc.*, 100 (1978) 1571.
289. J.-M. Neumann, S. Tran-Dinh, J.- P. Girault, J.-C. Chottard, T. Huynh-Dinh and J. Igolen, *Eur. J. Biochem.*, 141 (1984) 465.
290. C.-H. Lee and R. H. Sarma, *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 3541.
291. F. S. Ezra, C.-H. Lee, N. S. Kondo, S. S. Danyluk and R. H. Sarma, *Biochem.*, 16 (1977) 1977.
292. C.-H. Lee, F. S. Ezra, N. S. Kondo, R. H. Sarma and S.S. Danyluk, *Biochem.*, 15 (1976) 3627.
293. K. Okamoto, V. Behnam, M. T. Phan Viet, M. Polissiou, J. Y. Gauthier, S. Hanessian and T. Theophanides, *Inorg. Chim.*

312. L. Dudycz, R. Stolarski, R. Pless and D. Shugar, *Z. Naturforsch., Teil C*, 34 (1979) 354.
313. S. -H. Kim and R. B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 1707.
314. O. P. Slyudkin, *Sov. J. Coord. Chem.*, 12 (1986) 156.
315. A. R. Khokhar, G. J. Lumetta, R. A. Newman and S. L. Doran, *Inorg. Chim. Acta*, 151 (1988) 249.
316. A. R. Khokhar, G. J. Lumetta and S. L. Doran, *Inorg. Chim. Acta*, 153 (1988) 129.
317. F. Taddei and L. Pratt, *J. Chem. Soc.*, (1964) 1553.
318. G. Trovo, G. Valle and B. Longato, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1993) 669.
319. L. G. Marzilli, B. de Castro and C. Solorzano, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 461.
320. L. G. Marzilli and P. Chalilpoyil, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 873.
321. M. D. Reily, K. Wilkowski, K. Shinozuka and L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.*, 24 (1985) 37.
322. E. Katsarou, A. Troganis and N. Hadjiliadis, *Inorg. Chim. Acta*, 256 (1997) 21.
323. B. E. Fisher and H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 2999.
324. H. Sigel, B. E. Fisher and E. Farkas, *Inorg. Chem.*, 22 (1983) 925.
325. T. G. Appleton, J. R. Hailand, S. F. Ralph, *Inorg. Chem.*, 24 (1985) 673.
326. P. S. Pregosin, *Coord. Chem. Revs.*, 44 (1982) 247.
327. E. Katsarou, C. Charalampopoulos and N. Hadjiliadis, *Metal Based Drugs*, 4 (1997) 57.
328. J. Kozelka and J. C. Chottard, *Biophys. Chem.*, 35 (1990) 165.
329. J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 198-200 (1992) 873.
330. M. Sip, A. Schwartz, A. Vovelle, M. Ptak and M. Leng,

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή περιγράφει καταρχήν την απομόνωση και τη μελέτη τριαδικών συμπλόκων, cis-γεωμετρίας, του Pt(II) με αμινοξέα-πεπτιδία και με νουκλεοζίτες. Απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τα εξής σύμπλοκα:



όπου guo, cyd ήταν οι νουκλεοζίτες γουανοσίνη και κυτιδίνη, dipeptideester ήταν οι εστέρες των διπεπτιδίων γλυκυλ-γλυκίνη (glyglyOEt), γλυκυλ-L-αλανίνη (glyalaOMe), γλυκυλ-L-2-αμινοβουτυρικό οξύ (gly-2-abaOMe), γλυκυλ-L-νορβαλίνη (glynvalOMe), γλυκυλ-L-νορλευκίνη (glynleuOMe) και amac ήταν τα αμινοξέα γλυκίνη (gly), L-αλανίνη (ala), L-2-αμινοβουτυρικό οξύ (2-Aba), L-νορβαλίνη (nval) και L-νορλευκίνη (nleu).

Επίσης στη διατριβή αυτή μελετάται η αλληλεπίδραση μεταξύ δυο συμπλόκων του Pd(II) με διπεπτιδία, trans-γεωμετρίας, των trans-Cl₂Pd(glyglyOH)₂ και trans-Cl₂Pd(glynvalOH)₂ με το ολιγονουκλεοτίδιο [d(CGCGAATTCGCG)]₂ σε υδατικά διαλύματα.

Η διατριβή περιλαμβάνει τρία μέρη.

Στο πρώτο μέρος (ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ) γίνεται ιστορική αναδρομή στην ανακάλυψη της αντικαρκινικής δράσης του cis-DDP καθώς και των παραγώγων του δεύτερης γενιάς και γίνεται ακόμη αναφορά στις σχετικές μελέτες για τον πιθανό μηχανισμό δράσης του φαρμάκου. Στη συνέχεια, επιχειρείται μια ανασκόπηση στην εργασία πάνω στα τριαδικά συστήματα Pd(II) και Pt(II) με αμινοξέα-πεπτιδία και νουκλεοβάσεις-νουκλεοτίδια. Τέλος, παρουσιάζονται δεδομένα για την αλληλεπίδραση διαφόρων μεταλλικών ιόντων και κυρίως Pd(II) και Pt(II) με

^{13}C -NMR και ^{195}Pt -NMR. Και για αυτή τη σειρά των συμπλόκων διαπιστώθηκε ότι οι θέσεις δεσμού είναι η τελική αμινομάδα των αμινοξέων και τα άζωτα N7 και N3 για τους νουκλεοζίτες γουανοσίνη και κυτιδίνη αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση η ύπαρξη ισομερών εκ περιστροφής γύρω από το δεσμό Pt-N3 για τα σύμπλοκα της κυτιδίνης. Οι ενδομοριακές υδρόφοβες αλειφατικές-αρωματικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών αυξάνονται με την αύξηση της πλευρικής αλειφατικής αλυσίδας του αμινοξέος, ενώ ελαττώνονται καθώς απομακρυνόμαστε από το σημείο δεσμού. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ισχυρότερες για τα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη από ό,τι για τα τριαδικά με κυτιδίνη. Τέλος, το ποσοστό της ^3E διαμόρφωσης της γουανοσίνης αυξάνεται στα τριαδικά σύμπλοκα.

Στο τέταρτο κεφάλαιο περιγράφεται η αλληλεπίδραση του ολιγονουκλεοτιδίου $[\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$ με τα σύμπλοκα trans- $\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{glyglyOH})_2$ και trans- $\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{glynvalOH})_2$, με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας ^1H -NMR, μιας και δυο διαστάσεων (NOESY). Παρουσιάζονται τα στάδια των δυο σειρών τιτλοδοτήσεων και εξάγονται συμπεράσματα σχετικά με την εκλεκτική δέσμευση του μετάλλου από το ολιγομερές, τη μεταβολή που επιφέρει η συμπλοκοποίηση στη δομή της διπλής έλικας του ολιγομερούς καθώς και την αλληλεπίδραση στο χώρο μεταξύ των υποκαταστατών.

Στο τρίτο μέρος της διατριβής (ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ) αναφέρονται οι μέθοδοι σύνθεσης των δυαδικών και τριαδικών συμπλόκων με αμινοξέα και διπεπτίδια, περιγράφονται τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν και δίνονται αναλυτικά οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν κατά τη λήψη των φασμάτων NMR.

Τέλος, παρουσιάζεται σχετική με το θέμα βιβλιογραφία.

starting binary complexes of Pt(II) with the dipeptide esters is described. The elemental analysis and the $^1\text{H-NMR}$ data are reported.

In the second chapter the synthesis of the ternary complexes of Pt(II) with the dipeptide esters and the nucleosides guanosine and cytidine is described. Data of the elemental analysis, the IR, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra are presented, helping us to come to conclusions about the bonding sites of the ligands, their conformation and the existence of hydrophobic interactions between them. Thus, we conclude that the dipeptides are monocoordinated to the metal via their terminal amino group, while the nucleosides are coordinated via N7 (guanosine) and N3 (cytidine). The ternary cytidine complexes exist in the aqueous solution as a mixture of two diastereomers. There are hydrophobic ligand-ligand interactions, which become weaker as the distance from the bonding site becomes bigger. The percentages of the conformers ^3E and anti are higher for the guanosine ternary complexes, while the percentage of the gg conformer is reduced compared to the free ligand. Also, for the guanosine ternary complexes, the percentage of the h isomer of the dipeptides is reduced as the aliphatic side chain of the second amino acid becomes longer.

In the third chapter the synthesis of the ternary complexes of Pt(II) with amino acids and the nucleosides guanosine and cytidine is described, as well as the data of the IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and $^{195}\text{Pt-NMR}$ spectra. Here also these data show that the binding site is the terminal amino group for the amino acids and the atoms N7 and N3 for the nucleosides guanosine and cytidine respectively. In this case also, we observe the existence of rotamers for the cytidine ternary complexes. The hydrophobic ligand-ligand interactions become stronger as the aliphatic side chain becomes longer, while they become weaker as the distance from the bonding site becomes bigger. Those interactions are stronger for the guanosine ternary complexes than for

the cytidine ones. Finally, the percentage of the ³E conformer of guanosine is increased in the ternary complexes.

In the fourth chapter, the interaction between the oligonucleotide [d(CGCGAATTCGCG)]₂ and the complexes trans-Cl₂Pd(glyglyOH)₂ and trans-Cl₂Pd(glylnvalOH)₂ is described, using the ¹H-NMR spectroscopy, 1D and NOESY. The steps of the two series of titration are presented and some conclusions are redrawn on the selective binding of the metal on the oligo, on the influence of the coordination on the double helical structure and on the ligand-ligand interactions.

In the third part of the thesis (EXPERIMENTAL) the methods of synthesis of the binary and the ternary complexes are described, as well as the instruments used and the detailed methods of recording the NMR spectra.

At the end, literature references relevant to the thesis are presented.

SUMMARY

This thesis describes the isolation and study of ternary complexes of Pt(II) with cis-geometry, with aminoacids-peptides and nucleosides. The complexes isolated and characterized were:

- a) cis-[(guo)₂Pt(dipeptideester)₂]Cl₂
- b) cis-[(cyd)₂Pt(dipeptideester)₂]Cl₂
- c) cis-[(NH₃)₂Pt(guo)(amac)]NO₃
- d) cis-[(NH₃)₂Pt(cyd)(amac)]NO₃

where guo, cyd were the nucleosides guanosine and cytidine, dipeptideesters were the esters of the dipeptides glycyl-glycine (glyglyOEt), glycyl-L-alanine (glyalaOMe), glycyl-L-2-aminobutyric acid (gly-2-abaOMe), glycyl-L-norvaline (glynvalOMe) and glycyl-L-norleucine (glynleuOMe) and amac were the aminoacids glycine (gly), L-alanine (ala), L-2-aminobutyric acid (2-aba), L-norvaline (nval) and L-norleucine (nleu).

In addition, in this thesis, the interaction between the two complexes of Pd(II), trans-Cl₂Pd(glyglyOH)₂ and trans-Cl₂Pd(glynvalOH)₂ with the oligonucleotide [d(CGCGAATTCGCG)]₂ are studied in aqueous solutions.

The thesis is composed of three parts.

In the first part (GENERAL INTRODUCTION) a historical review is given, on the discovery of the anticancer activity of cis-DDP, as well as of its second generation derivatives. Also a report is given on the possible mechanism of action of the drug. Next there is a review on the studies concerning ternary systems of Pd(II) and Pt(II) with aminoacids-peptides and nucleobases-nucleosides. Finally, data are presented on the interaction of various metal ions, especially Pt(II) and Pd(II) with di-, tri- and oligonucleotides. At the end the aim of this study is presented.

The second part (RESULTS-DISCUSSION) consists of four chapters. In the first one the synthesis and the characterization of the

δινουκλεοτίδια, τρινουκλεοτίδια και ολιγονουκλεοτίδια. Το πρώτο μέρος της διατριβής κλείνει παρουσιάζοντας το σκοπό αυτής.

Το δεύτερο μέρος (ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ) αποτελείται από τέσσερα κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο περιγράφεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός των αρχικών cis δυαδικών συμπλόκων του Pt(II) με τους εστέρες των διπεπτιδίων. Παρουσιάζονται οι στοιχειακές αναλύσεις των συμπλόκων και δεδομένα από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$.

Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφεται η σύνθεση των τριαδικών συμπλόκων του Pt(II) με διπεπτίδια και τους νουκλεοζίτες γουανοσίνη και κυτιδίνη. Δίνονται οι στοιχειακές αναλύσεις των συμπλόκων και δεδομένα από τα φάσματα IR, $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$, τα οποία βοηθούν στο να διαπιστώσουμε τον τρόπο ένταξης των υποκαταστατών και να έρθουμε σε συμπεράσματα σχετικά με τη διαμόρφωσή τους στο χώρο καθώς και την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους. Συμπεραίνουμε ότι τα διπεπτίδια είναι μονοδοντικά συμπλεγμένα με το μέταλλο, μέσω της τελικής τους αμινομάδας, ενώ οι νουκλεοζίτες μέσω του αζώτου N7 η γουανοσίνη και μέσω του αζώτου N3 η κυτιδίνη. Τα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη βρίσκονται στο διάλυμα με τη μορφή μίγματος δυο διαμορφωμένων. Μεταξύ των υποκαταστατών ανιχνεύονται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες μειώνονται με την αύξηση της απόστασης από το σημείο δεσμού. Τα ποσοστά των διαμορφώσεων ^3E και anti είναι αυξημένα για τα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη, ενώ το ποσοστό της gg διαμόρφωσης παρουσιάζεται μειωμένο σε σχέση με αυτό του ελεύθερου υποκαταστάτη. Επίσης, το ποσοστό του h ισομερούς για τα διπεπτίδια στα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη εμφανίζεται μειωμένο σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δυαδικά, ενώ αυξάνεται καθώς αυξάνεται η πλευρική αλειφατική αλυσίδα του δεύτερου αμινοξέος των διπεπτιδίων.

Στο τρίτο κεφάλαιο εξετάζεται η σύνθεση των τριαδικών συμπλόκων του Pt(II) με αμινοξέα και τους νουκλεοζίτες γουανοσίνη και κυτιδίνη και παρουσιάζονται δεδομένα από τα φάσματα IR, $^1\text{H-NMR}$,

- Biochemistry*, 31 (1992) 2508.
331. R. E. Dickerson, H. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini and M. L. Kopka, *Science*, 216 (1982) 475.
332. N. A. Froystein, Dr. Scient. Dissertation, University of Bergen, 1993.
333. R. E. Dickerson and H. R. Drew, *J. Mol. Biol.*, 149 (1981) 76.
334. S. Arnott and D. W. L. Hukins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47 (1972) 1504.
335. D. J. Patel, S. A. Kozlowski, A. Makryl, C. Broka, J. A. Rice, K. Itakura and K. J. Breslauer, *Biochemistry*, 21 (1982) 428.
336. E. Katsarou, N. Hadjiliadis and E. Sletten, *J. Inorg. Biochemistry*, in press.
337. N. Sole, J. L. Torres, J. M. Garcia Anton, G. Vaiencia and F. Reis, *Tetrahedron*, 42 (1986) 193.
338. M. Bodansky: "*Principles of Peptide Synthesis*", eds. Springer-Verlag, Berlin, 1984.
339. M. Bodansky and A. Bodansky: "*Practise of Peptide Synthesis*", eds. Springer-Verlag, Berlin, 1984.
340. M. Brenner and W. Huber, *Helv. Chim. Acta*, 136 (1953) 1109.
341. α) J. C. Dhara, *Indian J. Chem.*, 8 (1970) 193.
β) C. J. Boreham, J. A. Broomhead and D. P. Fairlie, *Aust. J. Chem.*, 34 (1981) 659.
342. H. Pivcova, V. Saudek, D. Noskova and J. Drobnik, *J. Inorg. Biochem.*, 23 (1985) 13.
343. A. Iakovidis, N. Hadjiliadis, H. Schollhorn, U. Thewalt and G. Trotscher, *Inorg. Chim. Acta*, 164 (1989) 221.
344. P. N. Borer, In G. D. Fasman, Ed. "*Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*", 3rd ed., CRC, Cleveland 1975, pp. 589-590.

- Acta*, 123 (1986) L3.
294. M. Polissiou and T. Theophanides, *Inorg. Chim. Acta*, 137 (1987) 195.
295. M. Polissiou, M. T. Phan Viet, M. St-Jacques and T. Theophanides, *Can. J. Chem.*, 59 (1981) 3297.
296. H. A. Tajmir-Riahi, M. J. Bertrand and T. Theophanides, *Can. J. Chem.*, 64 (1986) 960.
297. R. B. Martin, *J. Phys. Chem.*, 83 (1979) 2404.
298. A. T. M. Marcelis, C. G. van Kralingen and J. Reedijk, *J. Inorg. Biochem.*, 13 (1980) 213.
299. C. Altona and M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (1972) 8205.
300. D. J. Wood, F. E. Hruska, R. J. Mynott and R. H. Sarma, *Can. J. Chem.*, 51 (1973) 2571.
301. J. Donohue and K. N. Trueblood, *J. Mol. Biol.*, 2 (1960) 363.
302. A. E. V. Haschemeyer and A. Rich, *J. Mol. Biol.*, 27 (1967) 369.
303. E. Westhof, O. Roder, I. Croneiss and H.-D. Ludemann, *Z. Naturforsch., Teil C*, 30 (1975) 131.
304. S. Uesugi and M. Ikehara, *Chem. Pharm. Bull.*, 26 (1978) 3040.
305. S. Uesugi and M. Ikehara, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 3250.
306. F. Jordan and H. Niv., *Biochem. Biophys. Acta*, 476 (1977) 265.
307. F. E. Evans, D. W. Miller and R. A. Levin, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 396.
308. B. Hingerty and S. Broyde, *Biochemistry*, 21 (1982) 3243.
309. R. Pless, L. Dudycz, R. Stolarski and D. Shugar, *Z. Naturforsch., Teil C*, 33 (1978) 902.
310. D. A. Lappi, F. E. Evans and N. O. Kaplan, *Biochemistry*, 19 (1980) 3841.
311. A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, T. Hakoshima, G. van der Morel, J. H. van Boom and A. Rich, *Science*, 225 (1984) 1115.

260. N. Hadjiliadis and T. Theophanides, *Can. J. Spectry*, 16 (1971) 135.
261. N. Hadjiliadis, P. Kourounakis and T. Theophanides, *Inorg. Chim. Acta*, 7 (1973) 226.
262. A. Terzis, N. Hadjiliadis, R. Rivest and T. Theophanides, *Inorg. Chim. Acta*, 12 (1975) L5.
263. W. M. Beck, J. C. Calabrese and N. D. Kottmair, *Inorg. Chem.*, 18 (1979) 176.
264. J. Dehand and J. Jordanov, *J. C. S. Chem. Comm.*, (1976) 598.
265. K. Okamoto, V. Behnam, J. Y. Gauthier, S. Hanessian and T. Theophanides, *Inorg. Chim. Acta*, 123 (1986) L1.
266. G. Pneumatikakis, N. Hadjiliadis and T. Theophanides, *Inorg. Chem.*, 17 (1978) 915.
267. G. Pneumatikakis, N. Hadjiliadis and T. Theophanides, *Inorg. Chim. Acta*, 22 (1977) L1.
268. G. Pneumatikakis, *Inorg. Chim. Acta*, 66 (1982) 131.
269. N. Hadjiliadis and T. Theophanides, *Inorg. Chim. Acta*, 16 (1976) 77.
270. K. H. Puthraya, T. S. Srivastava, A. J. Amonkar, M. K. Adwankar and M. P. Chitnis, *J. Inorg. Biochem.*, 25 (1985) 207.
271. M. Polissiou, M. T. Phan Viet, M. St. Jaques and T. Theophanides, *Inorg. Chim. Acta*, 107 (1985) 203.
272. M. Gulloti, G. Pacchioni, A. Pasini and R. Ugo, *Inorg. Chem.*, 21 (1982) 2006.
273. R. E. Cramer and P. L. Dahlstrom, *Inorg. Chem.*, 24 (1985) 3420.
274. A. T. M. Marcelis, J. L. Van der Veer, J. C. M. Zwetsloot and J. Reedijk, *Inorg. Chim. Acta*, 78 (1983) 195.
275. A. Pasini and E. Bersanetti, *Inorg. Chim. Acta*, 107 (1985) 259.
276. R. E. Cramer, P. L. Dahlstrom, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (1979)

225. G. W. Andersen, J. E. Zimmerman and F. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, 89 (1967) 5012.
226. N. Sole, J. L. Torres, J. M. Garcia Anton, G. Valencia and F. Reig, *Tetrahedron*, 42 (1986) 193.
227. M. A. Tilak, *Tetrahedron Letters*, 11 (1970) 849.
228. H. C. Beyerman, E. W. B. De Leer and J. Floor, *Recueil*, 92 (1973) 481.
229. W. Clark Still, M. Kahn and A. Mitra, *J. Org. Chem.*, 43 (1978) 2923.
230. L. G. Marzilli, *Progr. Inorg. Chem.*, 23 (1977) 255.
231. P. C. Kong and T. Theophanides, *Inorg. Chem.*, 13 (1974) 1167.
232. B. de Castro, T. J. Kistenmacher and L. G. Marzilli, *Trace Elements in the Pathogenesis and Treatment of Inflammatory Conditions*, K.D. Rainsford, K. Brune and M. W. Whitehouse, Eds., Agents and Actions, Basel, 1981.
233. R. W. Gellert and R. Bau, *Met. Ions Biol. Syst.*, 8 (1979) 1.
234. H. Basch, M. Krauss, W. J. Stevens and D. Cohen, *Inorg. Chem.*, 25 (1986) 684.
235. L. G. Purnell and D. J. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 4759.
236. R. Faggiani, B. Lippert, C. J. L. Look and R. A. Speranzini, *Inorg. Chem.*, 21 (1982) 3216.
237. G. Raudaschl-Sieber, H. Schollhorn, U. Thewalt and B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 3591.
238. G. Y. H. Chu, S. Mansy, R. E. Dunoan and R. S. Tobias, *J. Am. Chem. Soc.*, 100 (1978) 593.
239. J. H. J. Hartog, M. L. Salm and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 23 (1984) 2001.
240. B. Lippert, *Progr. Inorg. Chem.*, 37 (1989) 1.
241. S. Mansy, B. Rosenberg and A. J. Thomson, *J. Am. Chem.*

190. S. Steinkopf, A. Garoufis, W. Nerdal and E. Sletten, *Acta Chem. Scandinavica*, 49 (1995) 495.
191. A. Johnson, Y. Qu, B. van Houten and N. Farell, *Nucl. Acids Res.*, 20 (1992) 1697.
192. Y. Zou, B. van Houten and N. Farell, *Biochemistry*, 33 (1994) 5404.
193. J. Kasparkova, K. J. Mellish, Y. Qu, V. Brabec and N. Farell, *Biochemistry*, 35 (1996) 16705.
194. X. Jia, G. Zon and L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.*, 30 (1991) 228.
195. N. A. Froystein and E. Sletten, *Acta Chem. Scand.*, 45 (1991) 219.
196. N. A. Froystein, J. T. Davis, B. R. Reid and E. Sletten, *Acta Chem. Scand.*, 47 (1993) 649.
197. G. W. Buchanan and J. B. Stothers, *Can. J. Chem.*, 60 (1982) 787.
198. G. W. Buchanan and M. J. Bell, *Can. J. Chem.*, 61 (1983) 2445.
199. S. Steinkopf, W. Nerdal, A. Kolstad and E. Sletten, *Acta Chem. Scand.*, submitted for publication.
200. S. Steinkopf and E. Sletten, *Acta Chem. Scand.*, 48 (1994) 388.
201. S. Limmer, H. P. Hofmann, G. Ott and M. Sprinzel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (1993) 6199.
202. G. Ott, L. Arnold and S. Limmer, *Nucl. Acid. Res.*, 21 (1993) 5859.

203. H. Sigel and R. B. Martin, *Chem. Rev.*, 82 (1982) 385.
204. E. W. Wilson and R. B. Martin, *Inorg. Chem.*, 9 (1970) 528 and 10 (1971) 1197.
205. M. C. Lim, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1977) 15 και 1398 (1978) 726.
206. E. A. Sullivan, *Can. J. Chem.*, 57 (1979) 62.
207. T. Komorita, J. Hidaki and Y. Shimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*,

161. J.-P. Girault, J.-C. Chottard, E. R. Guittet, J.-Y. Lallemand, T. Huynh-Dinh and J. Igolen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 109 (1982) 1157.
162. J. P. Caradona and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 5793.
163. B. Van Hemelryck, E. Guttet, G. Chottard, J.-P. Girault, T. Huynh-Dinh, J.-Y. Lallemand, J. Igolen and J.-C. Chottard, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 3037.
164. A. T. M. Marcelis, J. H. den Hartog, G. A. der Marel, G. Wille and J. Reedijk, *Eur. J. Biochem.*, 135 (1983) 343.
165. K. Inagaki and Y. Kidani, *Inorg. Chim. Acta*, 92 (1984) L9.
166. J. H. J. den Hartog, C. Altona, J. H. van Boom, G. A. der Marel, C. A. G. Haasnoot and J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 1528.
167. J. H. J. den Hartog, C. Altona, H. van den Elst, G. A. van der Marel and J. Reedijk, *Inorg. Chemistry*, 24 (1985) 983.
168. B. Van Hemelryck, E. Guittet, G. Chottard, J.-P. Girault, F. Herman, T. Huynh-Dinh, J.-Y. Lallemand, J. Igolen and J.-C. Chottard, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138 (1986) 758.
169. J. H. J. den Hartog, C. Altona, J. H. van Boom, G. A. der Marel, C. A. G. Haasnoot and J. Reedijk, *J. Biomol. Struct. Dynamics*, 2 (1985) 1137.
170. C. Spellmeyer Fouts, L. G. Marzilli, R. A. Byrd, M. F. Summers, G. Zon and K. Shinozuka, *Inorg. Chem.*, 27 (1988) 366.
171. M. D. Reily and L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 4916.
172. C. Spellmeyer Fouts, M. D. Reily and L. G. Marzilli, *Inorg. Chim. Acta*, 137 (1987) 1.
173. J. H. J. den Hartog, C. Altona, J. H. van Boom and J. Reedijk, *FEBS Letters*, 176 (1984) 393.
174. T. Page Kline, L. G. Marzilli, D. Live and G. Zon, *J. Am. Chem.*

130. G. L. Eichhorn, *Inorganic Biochemistry*, Elsevier/North Holland, New York, 1973, Chap. 34.
131. C. J. van Garderen, C. Altona and J. Reedijk, *Inorg. Chem.*, 29 (1990) 1481.
132. K. M. Comess, C. E. Costello and S. J. Lippard, *Biochemistry*, 29 (1990) 2102.
133. I. A. G. Roos, A. J. Thomson and S. Mansy, *J. Am. Chem. Soc.*, (1974) 6484.
134. J. C. Chottard, J. P. Girault, G. Chottard, J. Y. Lallemand and D. Mansuy, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 5565.
135. K. Inagaki and Y. Kidani, *J. Inorganic Biochemistry*, 11(1979) 39.
136. J. P. Girault, G. Chottard, J. Y. Lailemand, F. Huguenin and J. C. Chottard, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 7227.
137. J. P. Girault, G. Chottard, J. Y. Lallemand and J. C. Chottard, *Biochemistry*, 21 (1982) 1352.
138. J. H. J. den Hartog, C. Altona, J. C. Chottard, J. P. Girault, J. Y. Lallemand, F. A. A. M. de Leeuw, A. T. M. Marcellis and J. Reedijk, *Nucl. Acids Res.*, 10 (1982) 4715.
139. M. Coll, S. E. Sherman, D. Gibson, S. J. Lippard and A. H. J. Wang, *J. Biomol. Struct. Dynamics*, 8 (1990) 315.
140. B. van Hemelryck, J. P. Girault, G. Chottard, P. Valadon, A. Laoui and J. C. Chottard, *Inorg. Chem.*, 26 (1987) 787.
141. M. Alink, H. Nakahara, T. Hirano, K. Inagaki, M. Nakanishi, Y. Kidani and J. Reedijk, *Inorg. Chemistry*, 30 (1991) 1236.
142. A. L. Pinto and S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 (1985) 4616.
143. Y. Q. Marieke, J. Bloemink, J. Reedijk, T. W. Hambley and N. Farrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (1996) 9307.
144. N. Farrell, Y. Qu, M. P. Hacker, *J. Med. Chem.*, 33 (1990) 2179.
145. A. T. M. Marcellis, J. den Hartog and J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 2664.

- Subirana, *Biochemistry*, 35 (1996) 11589.
100. Z. Shakked, D. Rabinovich, W. B. T. Cruse, E. Egert, O. Kennard, G. Sala, S. A. Salisbury and M. A. Vlsواميترا, *Proc. R. Soc. Lond.*, B 213 (1981) 479.
101. S. L. Beaucage and R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 48 (1992) 2223.
102. E. Sletten and N. A. Froystein, "Metal Ions in Biological Systems", A. Sigel and H. Sigel (eds.), 1996, Vol. 32, pp. 397-417.
103. M. Rance, O. W. Sorensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R. R. Ernst and K. Wuthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117 (1983) 479.
104. L. Emsley, T. J. Dwyer, H. P. Spelmann and D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 7765-7771.
105. A. Derome, "Modern NMR Techniques for Chemistry Research", J. E. Baldwin (ed.), Pergamon Press.
106. R. V. Hosur, G. Govil and H. T. Miles, *Magn. Res. Chem.*, 26 (1988) 927.
107. M. Karplus, *J. Chem. Phys.*, 30 (1959) 11.
108. R. M. Scheek, R. Boelens, N. Russo, J. H. van Boom and R. Kaptein, *Biochemistry*, 23 (1984) 1371.
109. R. M. Scheek, N. Russo, R. Boelens and R. Kaptein, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 2914.
110. W. Nerdal, D. R. Hare and B. R. Reid, *Biochemistry*, 28 (1989) 10008.
111. D. R. Hare, D. E. Wemmer, S.-H. Chou and G. Drobny, *J. Mol. Biol.*, 171 (1983) 319.
112. J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann and R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 71 (1979) 4546.
113. N. A. Froystein and E. Sletten, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 3240.
114. D. J. Patel, S. Ikuta, S. Kozlowski and K. Itakura, *Proc. Natl.*

67. H. Kozlowski, *Inorg. Chim. Acta*, 24 (1977) 215.
68. H. Kozlowski, S. Wolowiec and B. Jezowska-Trzebiatowska, *Biochim. Biophys. Acta*, 562 (1979) 1.
69. H. Kozlowski and E. Matczak-Jon, *Inorg. Chim. Acta*, 32 (1979) 143.
70. G. Pneumatikakis, *Polyedron*, 3 (1984) 9.
71. B. Jezowska-Trzebiatowska and S. Wolowiec, *Biochim. Biophys. Acta*, 708 (1982) 12.
72. M. Sabat, K. A. Satyshur and M. Sundaraiingam, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 976.
73. E. Matczak-Jon, B. Jezowska-Trzebiatowska and H. Kozlowski, *J. Inorg. Biochemistry*, 12 (1980) 143.
74. P. I. Vestues and R. B. Martin, *Inorg. Chim. Acta*, 55 (1981) 99.
75. V. Scheller-Krattiger, K. H. Scheller and R. B. Martin, *Inorg. Chim. Acta*, 59 (1982) 281.
76. J. P. Laussac, M. Padeloup and N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 30 (1987) 227.
77. S. Kasselouri, J. P. Laussac and N. Hadjiliadis, *Inorg. Chim. Acta*, 166 (1989) 239.
78. S. Kasselouri and N. Hadjiliadis, *Inorg. Chim. Acta*, 168 (1990) 15.
79. M. Wienken, E. Zangrando, L. Randaccio, S. Menzer and B. Lippert, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1993) 3349.
80. N. Hadjiliadis and G. Pneumatikakis, *Inorg. Chim. Acta*, 46 (1980) 255.
81. V. Theodorou and N. Hadjiliadis, *Polyedron*, 4 (1985) 1283.
82. A. Garoufis, R. Haran, M. Padeloup, J. P. Laussac and N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 31 (1987) 65.
83. A. Garoufis, J. Hatiris and N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 41 (1991) 195.
84. A. Iakovidis, N. Hadjiliadis, J. F. Britten, I. S. Butler, F. Schwarz

- Hartog, P. H. M. Lohman and J. Reedijk, *Biochemistry*, 24 (1985) 707.
30. A. Eastman, *Biochemistry*, 25 (1986) 3912.
 31. A. M. J. Fiohtinger-Schepman, A. T. van Oosterom, P. H. M. Lohman and F. Berends, *Cancer Res.*, 47 (1987) 3000.
 32. C. A. Lepre, K. G. Strothkamp and S. J. Lippard, *Biochemistry*, 26 (1987) 5651.
 33. M. J. Cleare, P. C. Hydes, D. R. Hepborn and B. W. Malerbi, in : "CISPLATIN: Current Status and New Developments", A.W. Prestayko, S.T. Crooke and S.K. Carter eds, N.Y. Academic Press, pages 149-170 (1980).
 34. A. Arrick and C. F. Nathan, *Cancer Res.*, 44 (1984) 4224.
 35. A. Eastman, *Chem.-Biol. Interactions*, 61 (1987) 241.
 36. B. J. Corden, *Inorg. Chim. Acta*, 137 (1987) 125.
 37. B. Odenheimer and W. Wolf, *Inorg. Chim. Acta*, 66 (1982) L41.
 38. J. Filipski, K. W. Kohn and W. M. Bonner, *FEBS Letters*, 152 (1983) 105.
 39. Z. M. Banjar, L. S. Hnilica, R. C. Briggs, J. Stein and G. Stein, *Biochemistry*, 23 (1984) 1921.
 40. R. B. Ciccarelli, M. J. Soiomon, A. Varsavsky and S. J. Lippard, *Biochemistry*, 24 (1985) 7533.
 41. L. A. Zwelling, J. Filipski and K. W. Kohn, *Cancer Res.*, 39 (1979) 4989.
 42. L. A. Zwelling, T. Anderson and K. W. Kohn, *Cancer Res.*, 39 (1979) 365.
 43. A. C. M. Plooy, A. van Dijk and P. H. M Lohman, *Cancer Res.*, 44 (1984) 2043.
 44. J. H. Toney, B. A. Donahue, P. J. Kellet, S. L. Bruhn, J. M. Essigman and S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) 8328.
 45. B. A. Donahue, M. Augot, S. F. Bellon, D. K. Treiber, J. H.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. B. Rosenberg, L. Van Camp and T. Krigas, *Nature*, 205 (1965) 698.
2. B. Rosenberg, E. Reinshaw, L. Van Camp, J. Hartwick and J. Drobnik, *J. Bacteriol.*, 93 (1967) 716.
3. B. Rosenberg, L. Van Camp, E. B. Grimley and A. J. Thomson, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 1347.
4. α) A. Werner, *Z. Anorg. Chem.*, 3 (1893) 267.
β) M. Peyrcne, *Ann. Chem. Pharm.*, 51 (1845) 1.
5. B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko and V. H. Mansoure, *Nature*, 222 (1969) 385.
6. B. Rosenberg, *Plat. Met. Rev.*, 15 (1971) 42.
7. I. H. Krakoff and A. J. Lippman, *Recent Results Cancer Res.*, 48 (1974) 167.
8. R. F. Borch and M. Markman, *Pharmac. Ther.*, 41 (1989) 371.
9. D. Glover, S. Grabelsky, K. Fox, C. Weiler, L. Cannon and J. Glick, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 16 (1989) 1201.
10. O. R. Leeuwenkamp, W. J. F. van der Vijgh, J. P. Neijt and H. M. Pinedo, *Biochem. Pharmacol.*, 27 (1990) 111.
11. J. M. Hill, E. Loeb, A. S. Maclellan, N. A. Hill, A. Khan and J. Kogler, *Recent Results Cancer Res.*, 48 (1974) 145.
12. J. M. Hill, E. Loeb, A. S. Maclellan, N. G. Hill, A. Khan and J. J. King, *Cancer Chemother. Rep.*, 59 (1975) 647.
13. B. Rosenberg, *Biochimie*, 60 (1978) 859.
14. (α) W. J. F. Van der Vijgh, *Clin. Pharmacokinet.*, 21 (1991) 242.
(β) L. R. Keliand, C. F. J. Bernard, I. G. Evans, B. A. Murrer, O. J. Vaughan, S. B. Wyer, P. M. Goddard, M. Jones, M. Valenti, A. Bryant, P. M. Rogers and K. R. Harrap, *J. Med. Chem.*, 38 (1995) 3016.
(γ) M. Coluccia, A. Boccarelli, M. A. Mariggio, N. Cardellicchio, P.

του DNA και μετά τη διάλυση της ποσότητας αυτής, το pH του διαλύματος ρυθμιζόταν εκ νέου στην τιμή 4.5, με την προσθήκη διαλύματος NaOD, 0.01 M. Μετά το τέλος των πειραμάτων που απαιτούσαν D₂O ως διαλύτη τα δείγματα λυοφιλοποιούνταν και επαναδιαλύονταν σε μίγμα 90% H₂O και 10% D₂O.

2.2. Φασματοσκοπία ¹H-NMR

Τα πειράματα ¹H-NMR πραγματοποιήθηκαν στα 600.13 MHz, σε όργανο Bruker DRX-600 στο Παν/μιο του Bergen Νορβηγίας. Η θερμοκρασία ήταν 300 K σε όλα τα πειράματα, εκτός αυτών που έγιναν σε H₂O, όπου η θερμοκρασία ήταν 295 K.

Στα φάσματα μιας διάστασης σε D₂O, το εύρος συχνοτήτων ήταν 6009 Hz, έγιναν 256 σαρώσεις και συλλέχθηκαν 32768 σημεία, με διάρκεια παλμού 11.5 μsec και χρόνο αποδιέγερσης (relaxation delay) 3 sec. Κατά τη διάρκεια της αποδιέγερσης, η ένταση του σήματος του νερού μειώθηκε με ένα παλμό 50 dB. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα XWIN-NMR σε ένα SGI/INDY computer. Το σήμα του νερού τοποθετήθηκε στα 4.7 ppm και τα υπόλοιπα σήματα αναφέρονταν σε αυτό το σήμα. Τα FIDS πολλαπλασιάστηκαν με μια εκθετική συνάρτηση, αυξάνοντας το εύρος των γραμμών κατά 0.3 Hz και ακολούθησε μετασχηματισμός Fourier.

Τα φάσματα μιας διάστασης σε H₂O ήταν χρήσιμα για να παρατηρήσουμε την επίδραση της μεταλλοποίησης στα ίμινο πρωτόνια, που συμμετέχουν στους Watson-Crick δεσμούς υδρογόνου. Στα φάσματα αυτά η ένταση του σήματος του νερού μειώθηκε χρησιμοποιώντας την 3-9-19 κλιμακωτή (gradient) ακολουθία παλμών. Το εύρος συχνοτήτων ήταν 12019 Hz, ο χρόνος αποδιέγερσης 3 sec, συλλέχθηκαν 32769 σημεία και έγιναν 256 σαρώσεις. Ο παλμός διέγερσης είχε διάρκεια 24.75 μsec. Τα FIDS πολλαπλασιάστηκαν με

διαλύματος NaOH 10^{-2} M. Ακολούθησε ψύξη στους 0°C και διήθηση της καταβυθιζόμενης γουανοσίνης. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε μέχρι μικρού όγκου και διαβιβάστηκε σε στήλη Sephadex G-15 της Pharmacia, διαστάσεων 60×1.5 cm, όπως αναφέρεται παραπάνω. Οι αποδόσεις ήταν 15-30%.

(Σε μια εναλλακτική μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν σαν αρχικά αντιδραστήρια, τα εφυδατωμένα παράγωγα των συμπλόκων των διπεπτιδεστέρων, τα οποία παρασκευάστηκαν στο διάλυμα πριν την αντίδραση με τη γουανοσίνη, με την προσθήκη 0.29 mmoles AgNO_3).

(ii) Τα σύμπλοκα αυτά παρασκευάστηκαν με τρόπο ανάλογο με τον προηγούμενο, χρησιμοποιώντας 0.30 mmoles κυτιδίνης και θερμοκρασία αντίδρασης τους 60°C . Η απομόνωσή τους έγινε και σε αυτή την περίπτωση με χρήση χρωματογραφίας πηκτής (Sephadex G-15) και οι αποδόσεις ήταν 15-30%.

1.5. Παρασκευή των δευτεριωμένων αναλόγων των συμπλόκων

10 mg του στερεού συμπλόκου διαλύθηκαν σε περίπου 0.5 ml D_2O και το διάλυμα που προέκυψε ξηράνθηκε με λυοφιλοποίηση, δίνοντας το δευτεριωμένο σύμπλοκο. Αν ήταν απαραίτητο, η διαδικασία της διάλυσης σε D_2O και της ξήρανσης επαναλαμβανόταν.

2. $^1\text{H-NMR}$ μελέτη της αλληλεπίδρασης συμπλόκων παλλαδίου με διπεπτίδια με το δωδεκανουκλεοτίδιο [d(CGCGAATTCGCG)]₂

2.1. Αντιδραστήρια

Τα σύμπλοκα trans- $\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{dipeptide})_2$ παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Beek et al. [257], χρησιμοποιώντας σαν αντιδραστήρια το άλας Na_2PdCl_4 και τα διπεπτίδια glygly και glylval, τα οποία αγοράστηκαν από τη Sigma Chemical Company.

1.3. Παρασκευή των αρχικών δυαδικών συμπλόκων

1.3.1. cis-[(NH₃)₂Pt(amac)]NO₃

Για τη σύνθεση του συμπλόκου της γλυκίνης ακολουθήθηκε η μέθοδος των Pincova et al. [342], ενώ για τα υπόλοιπα αμινοξέα χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη μέθοδος των Iakovidis et al. [343] και η απομόνωση των προϊόντων έγινε με χρωματογραφία πηκτής (gel filtration).

1.3.2. cis-Cl₂Pt(dipeptidester)₂

Τα σύμπλοκα των διπεπτιδίων με το λευκόχρυσο παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Beck et al. [217], κατά την αντίδραση του άλατος K₂PtCl₄ με τους υδροχλωρικούς διπεπτιδεστέρες σε αναλογία 1:2, σε υδατικό διάλυμα. Το προϊόν απομονώνεται σαν υποκίτρινο στερεό ύστερα από διήθηση.

1.4. Παρασκευή των τριαδικών συμπλόκων

1.4.1. Σύμπλοκα του τύπου cis-[(NH₃)₂Pt(nucl)(amac)]NO₃, όπου nucl=γουανοσίνη (i) ή κυτιδίνη (ii) και amac=glyO⁻, L-alaO⁻, L-2-abaO⁻, L-nvalO⁻, L-nleuO⁻.

(i) 1.5 mmoles γουανοσίνης διαλύθηκαν σε 100 ml νερού, υπό ανάδευση στους 60°C. Στο διάλυμα προστέθηκε 1 mmole του κατάλληλου χηλικού συμπλόκου cis-[(NH₃)₂Pt(amac)]NO₃ και το μίγμα θερμάνθηκε στους 60°C για 2 μέρες, απουσία φωτός. Το pH διατηρήθηκε στην τιμή 5.0 με την περιοδική προσθήκη μικρής ποσότητας διαλύματος HNO₃ 10⁻¹ M. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχθηκε σε παγόλουτρο και η γουανοσίνη που καταβυθίστηκε απομονώθηκε με διήθηση. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

1. Σύνθεση και μελέτη δυαδικών και τριαδικών συμπλόκων του λευκοχρύσου, Pt(II)

1.1. Αντιδραστήρια

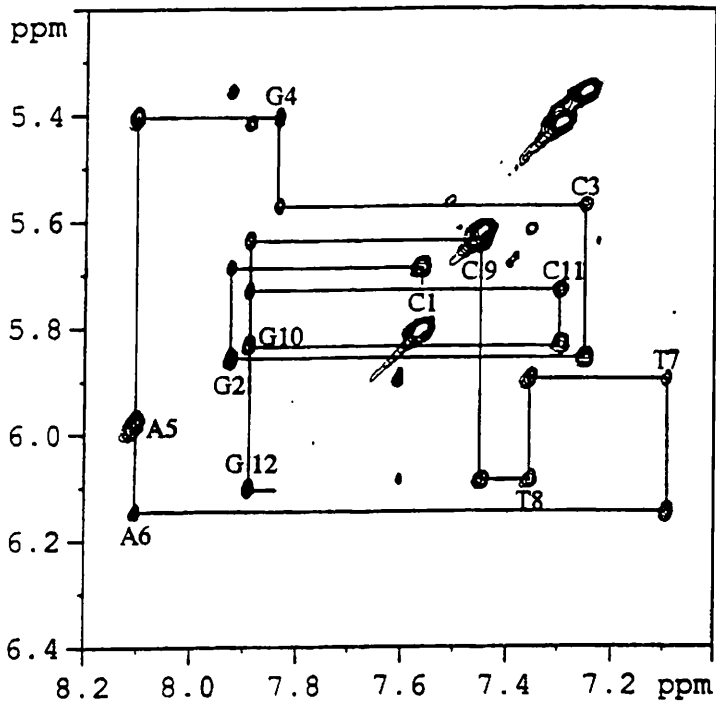
Τα αντιδραστήρια: γλυκίνη (gly), L-αλανίνη (ala), L-2-αμινοβουτυρικό οξύ (2-aba), L-νορβαλίνη (nval), L-νορλευκίνη (nleu), N-Boc-γλυκίνη (N-Boc-gly), HCl.glyglyOEt, γουανοσίνη (guo) και κυτιδίνη (cyd) αγοράστηκαν από τις εταιρίες Fluka A.G. ή/και Sigma Chemical Company και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Οι εστέρες των διπεπτιδίων HCl.glyalaOMe, HCl.gly-2-abaOMe, HCl.glynvalOMe και HCl.glynleuOMe παρασκευάστηκαν στην υγρή φάση, σύμφωνα με τη μέθοδο των μικτών ανυδριτών [337-339], ξεκινώντας από το N-Boc-gly και τους μεθυλεστέρες των αμινοξέων HCl.alaOMe, HCl.2-abaOMe, HCl.nvalOMe και HCl.nleuOMe, που συντέθηκαν σύμφωνα με τη γνωστή μέθοδο του θειονυλοχλωριδίου από τα ελεύθερα αμινοξέα [340]. Ο καθαρισμός των εστέρων των διπεπτιδίων έγινε με τη βοήθεια flash χρωματογραφίας [229] και η καθαρότητά τους επιβεβαιώθηκε με TLC και φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$.

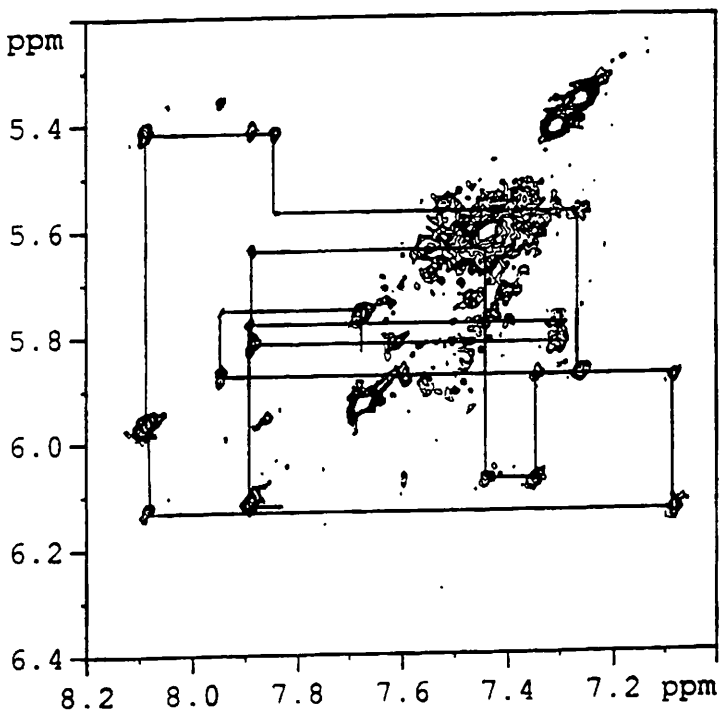
Το cis-DDP (cis-(NH_3) $_2$ PtCl $_2$) παρασκευάστηκε από το K $_2$ PtCl $_4$ (Degussa A.A., Germany) σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στη βιβλιογραφία [341].

1.2. Όργανα

Οι αγωγιμότητες των συμπλόκων μετρήθηκαν με αγωγιμόμετρο E365B, Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland. Οι στοιχειακές αναλύσεις (C, H, N) των συμπλόκων έγιναν σε στοιχειακό αναλυτή EA-1108 Carlo Erba. Τα φάσματα υπέρυθρου λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Perkin-

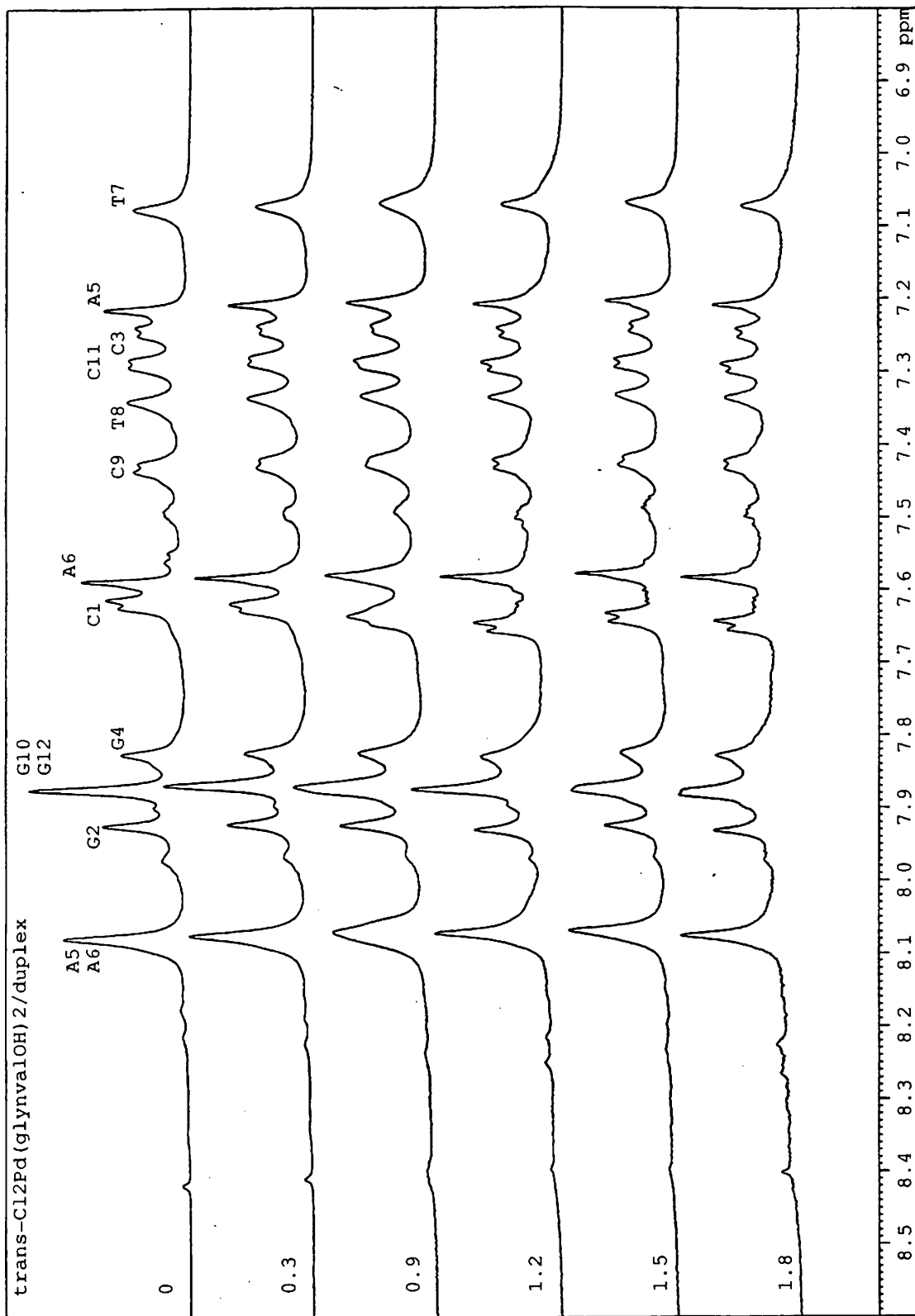


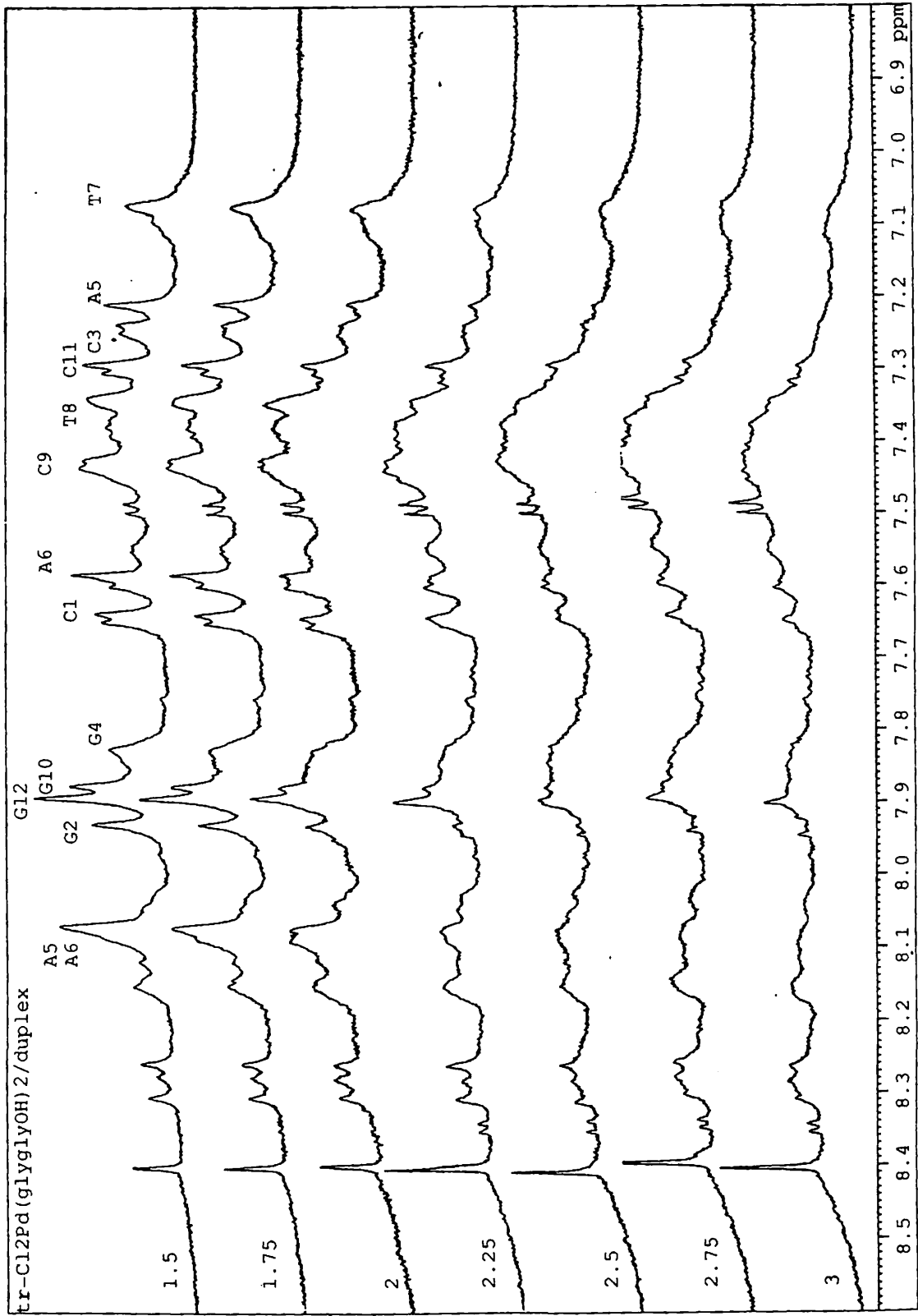
(α)



(β)

Σχήμα 55: 600 MHz $^1\text{H-NMR}$ NOESY φάσμα στους 300 K της αρωματικής- $\text{H1}'$ περιοχής του δωδεκαμερούς $[\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$, σε διάλυμα αυτού 3 mM: α) πριν την προσθήκη συμπλόκου του μετάλλου, β) μετά την προσθήκη $\text{trans-Cl}_2\text{Pd}(\text{glynhaiOH})_2$ σε αναλογία Pd(II) /διπλή έλικα ίση με 2.4.





Σχήμα 52: 600 MHz $^1\text{H-NMR}$ φάσμα της αρωματικής περιοχής του δωδεκαμερούς $[\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$, στο οποίο φαίνονται τα αποτελέσματα της διαδοχικής προσθήκης του συμπλόκου $\text{trans-Cl}_2\text{Pd}(\text{glyglyOH})_2$.

$\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{glynvalOH})_2$, η αλληλεπίδραση με το δωδεκαμερές γίνεται σε πιο αργούς ρυθμούς, αφού στη δεύτερη περίπτωση απαιτείται η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας του συμπλόκου του Pd(II), ώστε να έχουμε αποσύνθεση της διπλής έλικας. Η εισαγωγή του ογκωδέστερου υποκαταστάτη glynvalOH σε σχέση με τον glyglyOH έχει σαν αποτέλεσμα τη στερεοχημική παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης. Στην περίπτωση της τιτλοδότησης του δωδεκαμερούς με το σύμπλοκο trans- $\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{glynvalOH})_2$ παρατηρήθηκαν NOE συσχετίσεις μεταξύ πρωτονίων του διπεπτιδίου και πρωτονίων των νουκλεοτιδίων, δείχνοντας μια αλληλεπίδραση των υποκαταστατών μέσω του χώρου. Βέβαια, οι πληροφορίες που λήφθηκαν από τα NMR φάσματα δεν ήταν αρκετές ώστε να οδηγηθούμε σε συμπεράσματα σχετικά με τη δομή του περίπλοκου αυτού συστήματος [336].

Σε ανάλογα συστήματα μονομερών του τύπου (νουκλεοβάση-νουκλεοζίτης-νουκλεοτίδιο)M(αμινοξύ-πεπτιδίο), όπου M=Pd(II), Pt(II) [78,84,88,89], παρατηρήθηκαν ανάλογες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις υποκαταστατών, οι οποίες αυξάνονταν καθώς αυξανόταν η πλευρική αλειφατική αλυσίδα του αμινοξέος ή του πεπτιδίου (βλ. επίσης σελ. 98,154). Σε κανένα από τα παραπάνω συστήματα δεν παρατηρήθηκαν τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις όταν ο υποκαταστάτης ήταν η γλυκίνη ή το πεπτιδίο glyglyOH [78,84,86,88,89], αντίστοιχα με ό,τι παρατηρούμε στο σύστημα του ολιγομερούς που μελετάμε. Ίσως αυτή είναι η αιτία της ισχυρότερης αλληλεπίδρασης μεταξύ Pd(II)-διπλής έλικας με το σύμπλοκο trans- $\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{glyglyOH})_2$ παρά με το trans- $\text{Cl}_2\text{Pd}(\text{glynvalOH})_2$. Μια πιο συστηματική μελέτη, χρησιμοποιώντας μεγαλύτερα πεπτιδία με αυξανόμενη πλευρική αλειφατική αλυσίδα και ίσως ακόμα αρωματικά πεπτιδία, θα ήταν πολύ ενδιαφέρουσα, καθώς θα βοηθούσε στη διευκρίνιση της φύσης και της ισχύος των πολύ σημαντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υποκαταστατών στα τριαδικά συστήματα, μοντέλα των δεσμών του τύπου DNA-Pt-πρωτεΐνη.

έχουν σχεδόν εξαφανιστεί. Συνεπώς, δεν είναι δυνατό να συμπληρωθεί το μονοπάτι της ακολουθίας στην περιοχή αυτή (Σχήμα 56).

Επίσης, στην παραπάνω περιοχή του φάσματος παρατηρούνται νέα σήματα NOE, που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H8 των τεσσάρων γουανινών, που όπως αναφέρθηκε επηρεάζονται περισσότερο από τη συμπλοκοποίηση με το μέταλλο. Επίσης παρατηρούνται νέα σήματα NOE μεταξύ των $-CH_2-$ πρωτονίων της νορβαλίνης (τα οποία εμφανίζονται στα 1.65, 1.73 και 1.32 ppm) και των πρωτονίων των βάσεων του δωδεκαμερούς. Συγκεκριμένα υπάρχουν NOE συσχετίσεις μεταξύ των $-CH_2-$ πρωτονίων στα 1.73 ppm (β πρωτόνια νορβαλίνης) και των πρωτονίων C3H6, G4H8, A5H8 και C11H6, με πιο ισχυρές τις δυο πρώτες. Επίσης, παρατηρούνται NOE συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων $-CH_2-$ στα 1.32 ppm (γ πρωτόνια νορβαλίνης) και των πρωτονίων T7H6, C9H6 και C1H6. Άλλα NOE σήματα, που υποδηλώνουν αλληλεπίδραση διπεπτιδίου-δωδεκαμερούς παρατηρούνται μεταξύ των β-πρωτονίων της νορβαλίνης και του πρωτονίου του σακχάρου C9H1', καθώς και μεταξύ των γ-πρωτονίων της νορβαλίνης και του G4H1' πρωτονίου του σακχάρου της γουανίνης.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι στη αναλογία Pd(II)/διπλή έλικα=3.3, στο διάλυμα υπάρχει μίγμα δυο δομών του ολιγομερούς: διπλής έλικας-φουρκέτας (hairpin), όπως διαπιστώνουμε από το 1H -NMR φάσμα σε H_2O , στην περιοχή των ίμινο πρωτονίων (11-14 ppm), όπου νέες ευρείες ταινίες εμφανίζονται σε μεγαλύτερες τιμές πεδίου (11-11.5 ppm). Η συμπλοκοποίηση με το μέταλλο φαίνεται να επιφέρει αλλαγές στη διαμόρφωση στο χώρο του ολιγομερούς.

Α6 καθώς και στα πρωτόνια H6 των T7 και T8 επηρεάζονται (γίνονται πιο ευρεία ή μετατοπίζονται) περισσότερο. Με την προσθήκη περαιτέρω ποσότητας συμπλόκου Pd(II) και μάλιστα όταν η αναλογία Pd(II)/διπλή έλικα γίνεται ίση με 3, όλα σχεδόν τα σήματα των πρωτονίων επηρεάζονται σημαντικά. Εξαιρέση αποτελούν τα αρχικά σήματα που αντιστοιχούν στα πρωτόνια H8 της G12 και H6 της C1, τα οποία ανήκουν σε βάσεις που βρίσκονται στα άκρα της διπλής έλικας και τα οποία συνεχίζουν να παρατηρούνται στο φάσμα του μίγματος.

Φάσματα NOESY λήφθηκαν σε αναλογίες Pd(II)/διπλή έλικα 0.75 και 2. Ακόμα και όταν η αναλογία αυτή ήταν ίση με 2, τα φάσματα έδωσαν και τα τέσσερα στοιχεία που αναφέρονται στην παράγραφο 4.2., ως προϋποθέσεις για να θεωρηθεί ότι το ολιγομερές διατηρεί τη δομή της διπλής έλικας του B-DNA. Στο Σχήμα 53 φαίνεται η H6/H8-H1' περιοχή του NOESY φάσματος, όταν Pd(II)/διπλή έλικα=2, όπου το μονοπάτι της ακολουθίας είναι πλήρες. Στα φάσματα NOESY δεν παρατηρήθηκε η εμφάνιση νέων σημάτων οφειλόμενων σε αλληλεπίδραση του ολιγονουκλεοτιδίου με το διπεπτίδιο glyglygOH μέσω του χώρου. Τέλος η προσπάθεια λήψης φάσματος NOESY για την αναλογία Pd(II)/διπλή έλικα=3 στάθηκε αποτυχημένη, λόγω της ολικής καταστροφής της διπλής έλικας στην αναλογία αυτή.

4.3.2. Αλληλεπίδραση του δωδεκανουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο trans-Cl₂Pd(gly_nvalOH)₂

Στο Σχήμα 54 φαίνεται η αρωματική περιοχή των φασμάτων ¹H-NMR για τα βήματα της τιτλοδότησης του δωδεκανουκλεοτιδίου [d(CGCGAATTCGCG)]₂ με το σύμπλοκο trans-Cl₂Pd(gly_nvalOH)₂. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, έτσι και σε αυτή παρατηρείται η εμφάνιση νέων σημάτων στα 8.16, 8.27, 8.32 και 8.36 ppm, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια H8 των τεσσάρων γουανινών G4, G2, G12 και G10 αντίστοιχα. Τα νέα σήματα είναι μετατοπισμένα σε μικρότερες

Γενικά, για να μπορούμε να διαπιστώσουμε με σιγουριά αν το ολιγομερές που μελετάμε έχει κανονική δομή δεξιόστροφης έλικας τύπου B-DNA, πρέπει το NOESY φάσμα αυτού να μας δίνει τα εξής στοιχεία:

1. Υπάρχει ένα πλήρες “μονοπάτι” ακολουθίας στην περιοχή H6/H8-H1’.
2. Παρατηρούνται τρία σήματα μεταξύ των πρωτονίων AH2-H1’: α) ένα ενδονουκλεοτιδικό β) ένα ενδοκλωνικό και γ) ένα διακλωνικό σήμα τύπου (n)AH2-(m+1)H1’ (όπου n και m είναι συμπληρωματικές μονάδες). Οι αποστάσεις αυτές βρίσκονται στην περιοχή 3.5-5 Å, ανάλογα με την ακολουθία των βάσεων [335].
3. Στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων παρατηρούνται όλα τα σήματα (n)H6/H8- (n+1)H6/H8.
4. Παρουσιάζονται σήματα μεταξύ του πρωτονίου της κυτοσίνης (n)H5 και των (n+1) πρωτονίων των βάσεων.

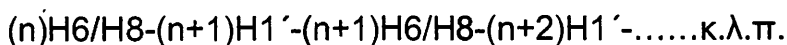
4.3. Αποτελέσματα

4.3.1. Αλληλεπίδραση του δωδεκανουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο $\text{trans-Cl}_2\text{Pd}(\text{glyglyOH})_2$

Στο Σχήμα 52 φαίνεται η αρωματική περιοχή των $^1\text{H-NMR}$ φασμάτων κατά τα διάφορα στάδια τιτλοδότησης του δωδεκαμερούς $[\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$ με το σύμπλοκο $\text{trans-Cl}_2\text{Pd}(\text{glyglyOH})_2$. Οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις σε αυτή την περιοχή παρατηρούνται για τα πρωτόνια H8 των τεσσάρων γουανινών. Συγκεκριμένα, εμφανίζονται τέσσερα νέα σήματα σε χαμηλότερες τιμές πεδίου (8.30, 8.27, 8.25 και 8.14 ppm). Η ένταση των νέων σημάτων αυξάνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του συμπλόκου του Pd(II) στο διάλυμα.

Σε αναλογία Pd(II)/διπλή έλικα ίση με 2, στο διάλυμα υπάρχει ένα μίγμα συμπλοκοποιημένου και ελεύθερου υποκαταστάτη (δωδεκανουκλεοτιδίου), αφού ταυτόχρονα με τα νέα σήματα

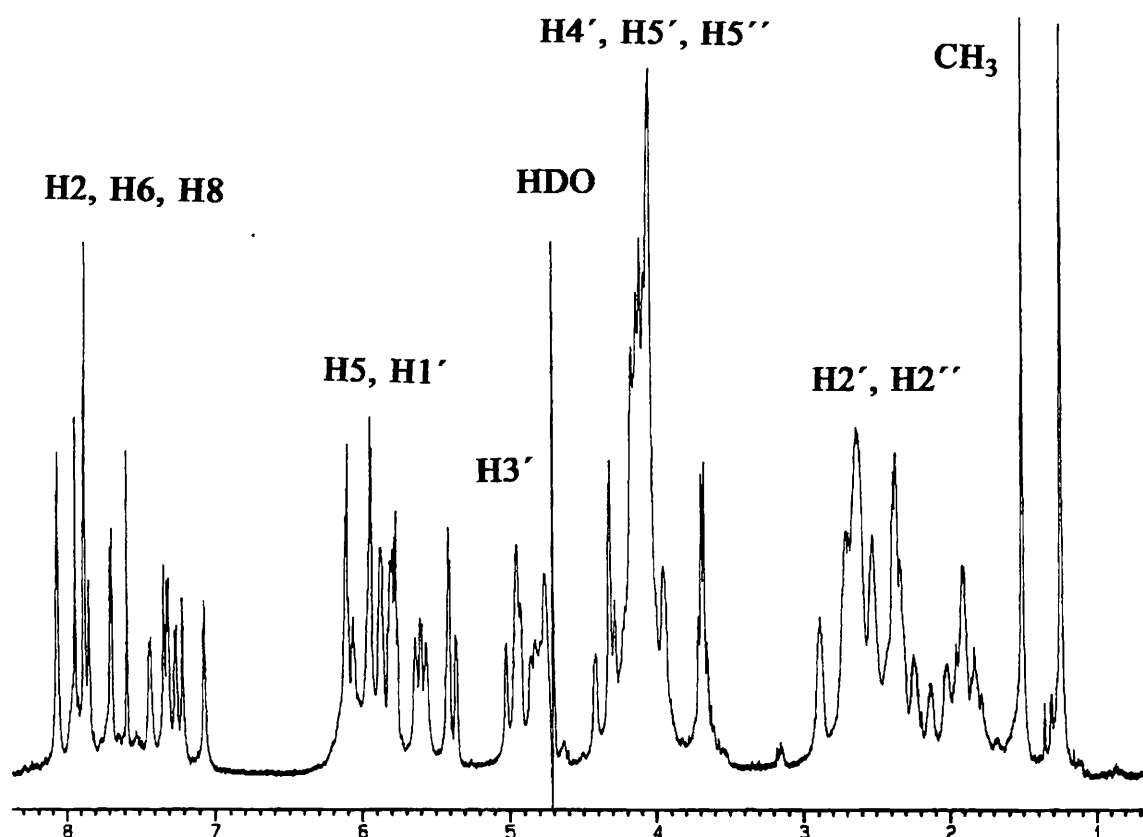
γενικά να διακρίνουμε τρεις τύπους μικρών αποστάσεων ($r < 5 \text{ \AA}$) μεταξύ πρωτονίων γειτονικών νουκλεοτιδίων, που παράγουν ισχυρά σήματα NOESY: 1) $(n)H6/H8-(n+1)H6/H8$ 2) $(n)H6/H8-(n+1)H1'$ (Σχήμα 50) 3) $(n)H6/H8-(n+1)H2''$. Δεδομένου ότι οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των βάσεων H6/H8, των H1' και των H2'' είναι πολύ διαφορετικές, οι τρεις τύποι σημάτων εμφανίζονται σε ξεχωριστές περιοχές του NOESY φάσματος και μπορούν εύκολα να μελετηθούν. Ενώ οι συσχετίσεις τύπου 1 βοηθούν στην απόδοση της ακολουθίας μόνο των πρωτονίων των βάσεων, οι τύποι 2 και 3 δίνουν τη δυνατότητα απόδοσης των πρωτονίων και των βάσεων και των σακχάρων. Η απόδοση ακολουθίας τύπου 2 ακολουθεί τη σειρά:



Ανάλογα, η απόδοση ακολουθίας μέσω του συσχετισμού τύπου 3 ακολουθεί τη σειρά: $(n)H6/H8-(n+1)H2''-(n+1)H6/H8-(n+2)H2''-\dots\dots\kappa.\lambda.\pi.$, όπως φαίνεται στο Σχήμα 51. Μερικές φορές, σε φάσματα που λαμβάνονται με μεγαλύτερους χρόνους μίξης (τ_m), μπορούμε επίσης να παρατηρήσουμε συσχετίσεις μέσω των πρωτονίων H2' και H3'. Όταν τα σήματα NOE $(n)H6/H8-(n+1)H2''$ δεν παρατηρούνται, τότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα τα πρωτόνια H2' και H2''. Στην περίπτωση αυτή η απόδοση ακολουθεί τη σειρά: $(n)H6/H8-(n+1)H2''-(n+1)H2'-(n+1)H6/H8-(n+2)H2''-\dots\dots\kappa.\lambda.\pi.$

Στερεοεκλεκτική απόδοση των πρωτονίων H2' και H2'' μπορεί να γίνει παρατηρώντας ότι στο NOESY φάσμα τα σήματα H1'-H2'' είναι πάντα πιο ισχυρά από τα σήματα H1'-H2', λόγω της μικρότερης διαπρωτονιακής απόστασης στην πρώτη περίπτωση ($r(H1'-H2'')=2.3 \text{ \AA}$, $r(H1'-H2')=3 \text{ \AA}$ για το B-DNA). Αντίθετα, τα σήματα H6/H8-H2' ($r=2.2 \text{ \AA}$) είναι πιο ισχυρά από τα H6/H8-H2'' ($r=3.6 \text{ \AA}$) [334].

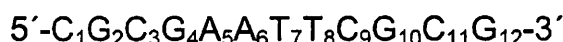
Pd(II), προκαλεί χημική μετατόπιση των σημάτων των πρωτονίων κοντά στις θέσεις δεσμού. Ο συνωστισμός όμως των σημάτων καθώς και η αλληλεπικάλυψη αυτών στα φάσματα μιας διάστασης, οδηγεί στη χρήση πειραμάτων COSY και NOESY, με τη βοήθεια των οποίων γίνεται η απόδοση των σημάτων συντονισμού.



Σχήμα 48: $^1\text{H-NMR}$ φάσμα του δωδεκανουκλεοτιδίου $[\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$ σε D_2O .

Τα NOESY φάσματα εξαρτώνται από την τρισδιάσταστατη δομή του ολιγομερούς. Ζεύγη πρωτονίων που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους ($<5 \text{ \AA}$) παράγουν ισχυρά NOE σήματα. Στο Σχήμα 49 φαίνονται οι διάφορες περιοχές σε ένα NOESY φάσμα του δωδεκαμερούς $[\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$. Το φάσμα δείχνει ένα αριθμό σημάτων μεταξύ των πρωτονίων των βάσεων και αυτών των σακχάρων. Τα σήματα αυτά μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες: α) σε εκείνα

αυτοσυμπληρωματικό ή παλινδρομικό, δηλαδή και οι δυο κλώνοι του DNA είναι ταυτόσημοι. Έτσι, λόγω συμμετρίας της διπλής έλικας, τα NMR φάσματα απλοποιούνται και η ένταση των σημάτων συντονισμού αυξάνεται. Στη συνέχεια, για να γίνεται κατανοητή η αναφορά σε διάφορες νουκλεοβάσεις και νουκλεοζίτες της ακολουθίας, είναι ανάγκη να υιοθετήσουμε το παρακάτω σχήμα αρίθμησης:



Επίσης, αφού η παραπάνω ακολουθία είναι παλινδρομική, συχνά θα γίνεται αναφορά μόνο στον ένα κλώνο. Για να τονίσουμε το γεγονός ότι το ολιγονουκλεοτίδιο υιοθετεί δομή διπλής έλικας, το συμβολίζουμε ως $[d(CGCGAATTCGCG)]_2$.

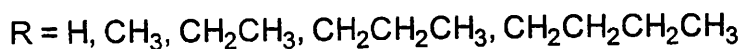
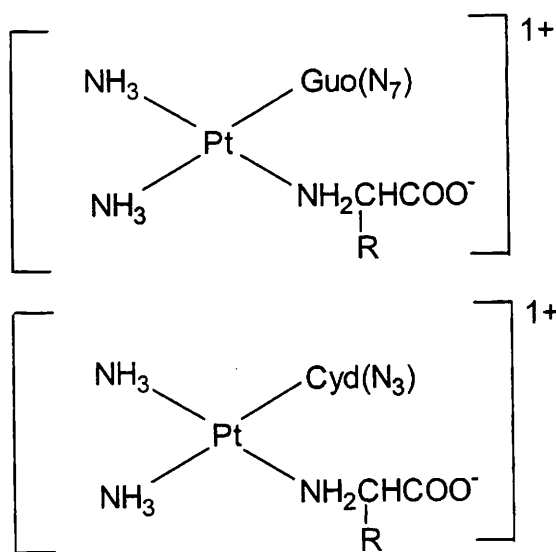
4.2. Η μέθοδος NMR

Τα πρωτόνια των νουκλεϊκών οξέων μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες: α) τα ανταλασσόμενα ίμινο πρωτόνια NH των βάσεων, τα οποία συντονίζονται μεταξύ 10-16 ppm συγκριτικά με το TSP, β) τα ανταλασσόμενα άμινο πρωτόνια NH και τα μη ανταλασσόμενα πρωτόνια των βάσεων (αρωματικά), τα οποία συντονίζονται μεταξύ 7-9 ppm, γ) τα μη ανταλασσόμενα πρωτόνια του σακχάρου, τα οποία συντονίζονται μεταξύ 2-6.5 ppm και δ) τα μέθυλο πρωτόνια των θυμινών τα οποία συντονίζονται μεταξύ 0.5-2 ppm [106].

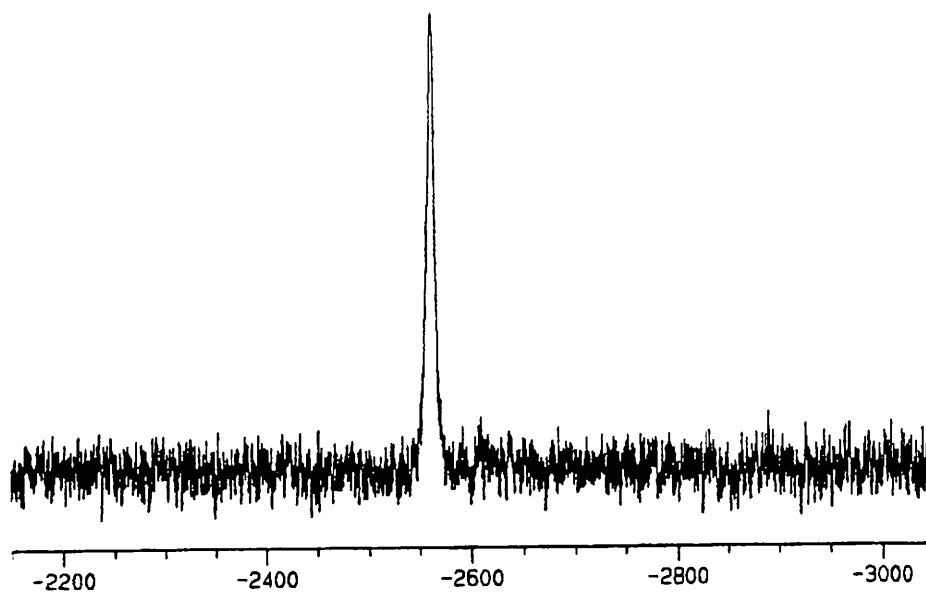
Για να παρατηρήσουμε τα σήματα συντονισμού των πρωτονίων NH, που συμμετέχουν σε Watson-Crick δεσμούς υδρογόνου (Σχήμα 15), πραγματοποιούμε πειράματα σε H₂O, ενώ τα υπόλοιπα πρωτόνια μπορούν να παρατηρηθούν σε D₂O διαλύματα. Για παράδειγμα, στο παλινδρομικό δωδεκαμερές $[d(CGCGAATTCGCG)]_2$ έχουμε 84 σήματα συντονισμού για τα πρωτόνια του σακχάρου, 18 σήματα συντονισμού για τα μη ανταλασσόμενα πρωτόνια των βάσεων (αρωματικά) και 2

μπορούμε να έχουμε για το σύστημα DNA-Pt-πρωτεΐνη [322,327].
Γι'αυτό το λόγο συνεχίσαμε τη μελέτη μας εξετάζοντας ένα σύστημα στο οποίο αντικαταστήσαμε τους απλούς νουκλεοζίτες με ένα πιο ρεαλιστικό μοντέλο του DNA, ένα ολιγονουκλεοτίδιο

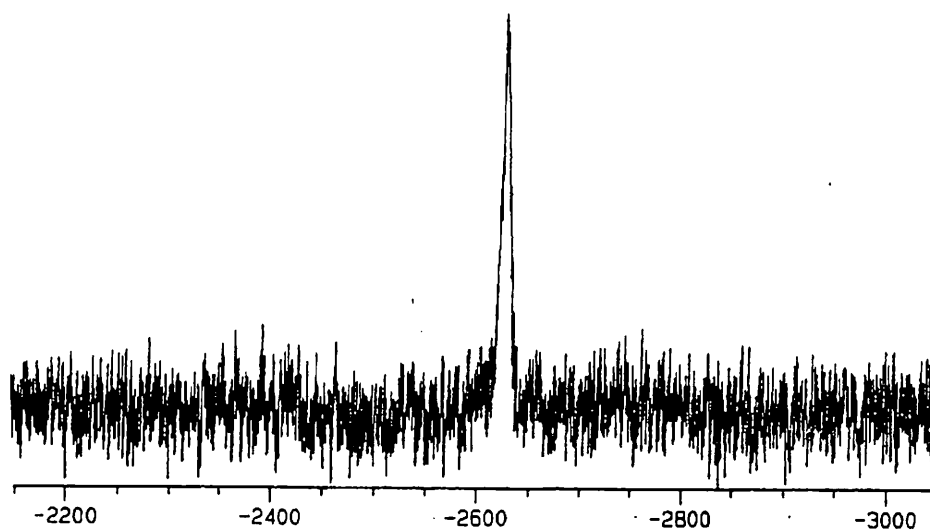
Τριαδικά σύμπλοκα Pt(II) με γουανοσίνη/κυτιδίνη και αμινοξέα

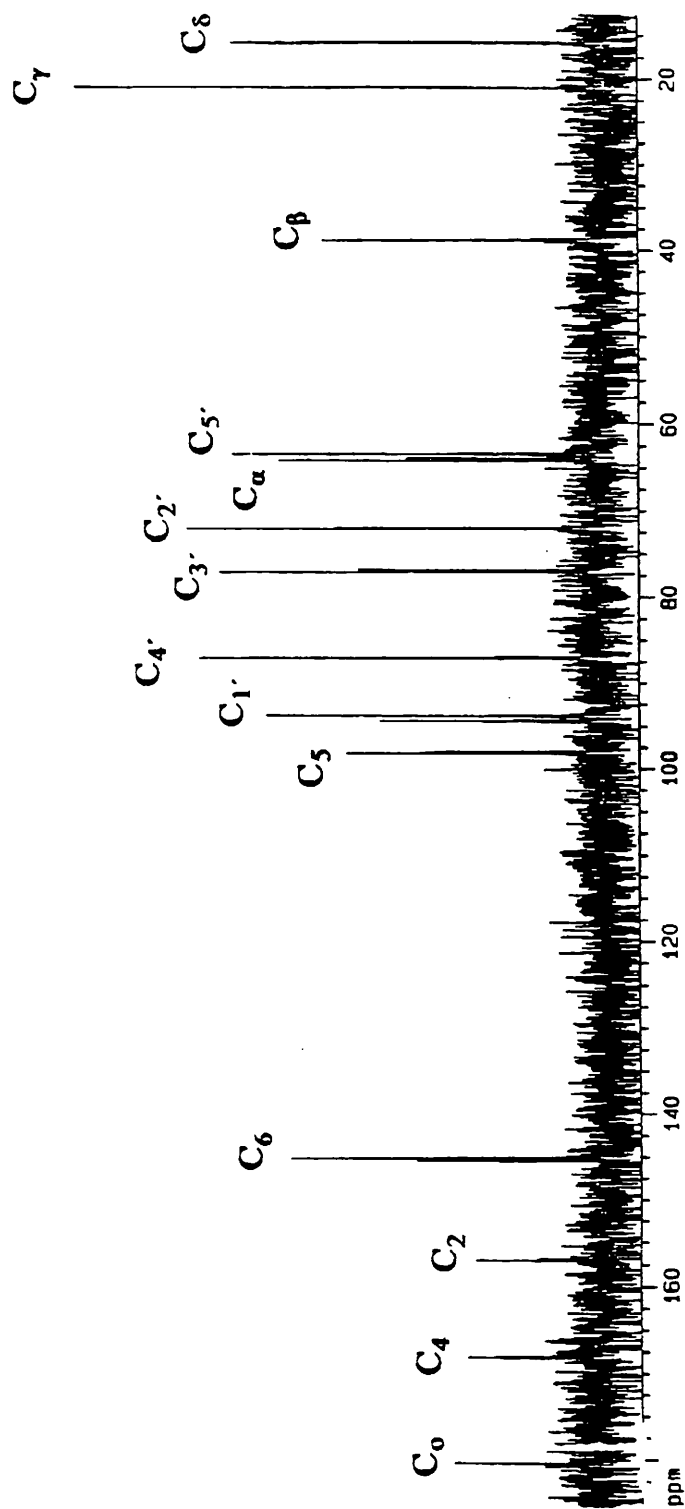


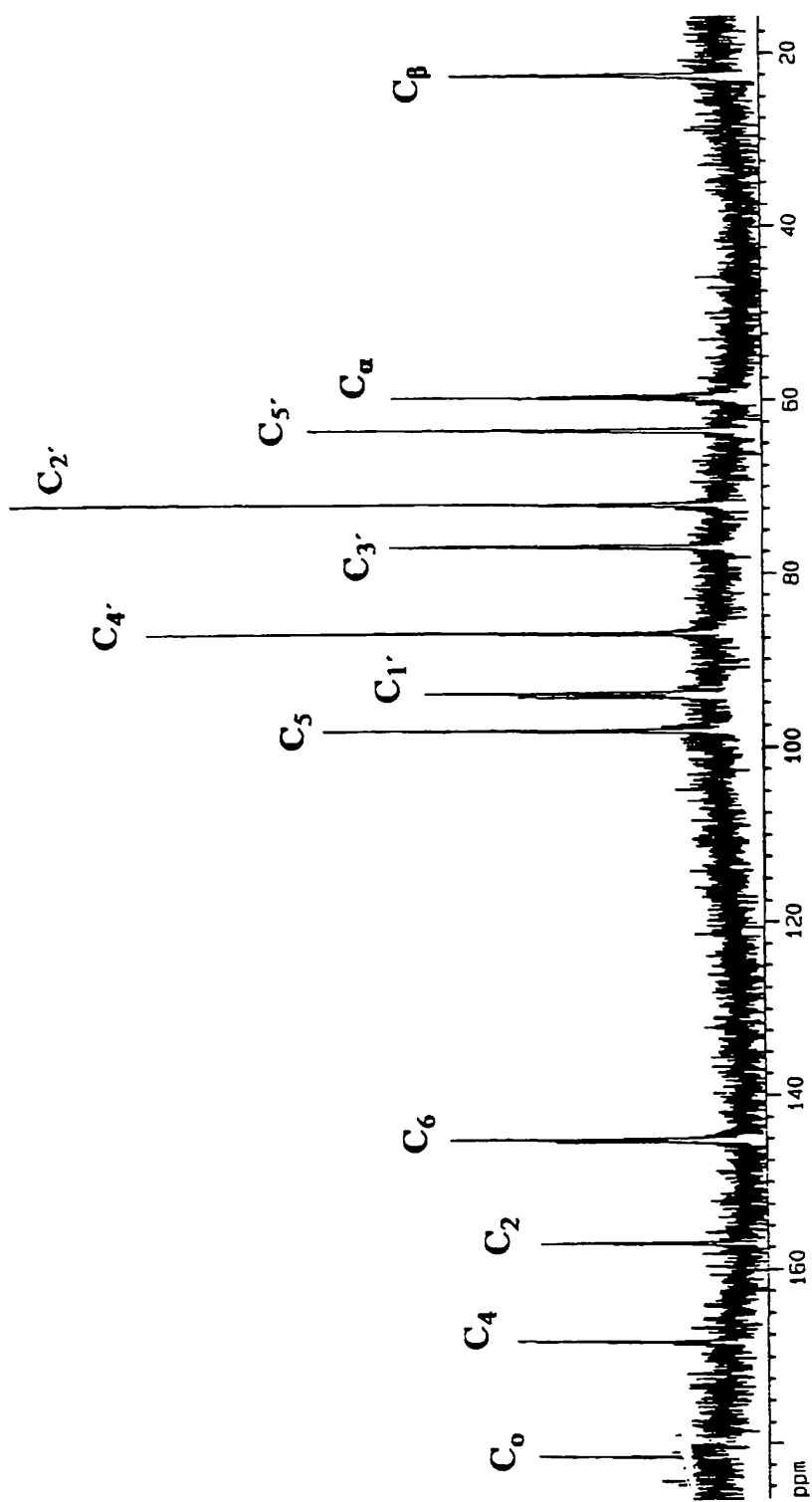
^{195}Pt -NMR φάσμα του cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{gly})]\text{NO}_3$

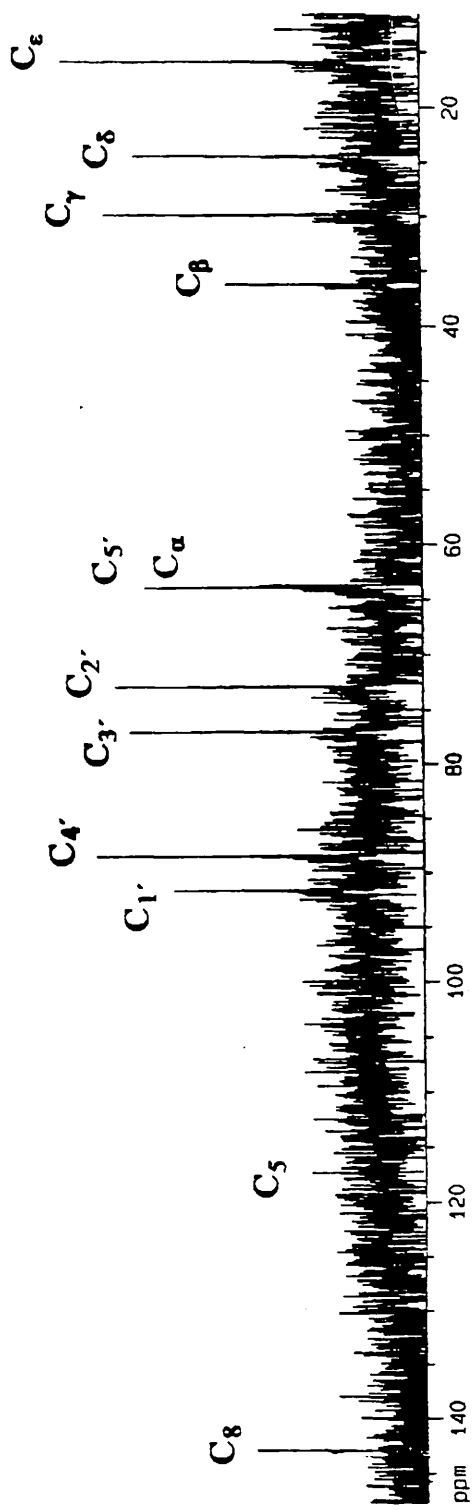


^{195}Pt -NMR φάσμα του cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{gly})]\text{NO}_3$

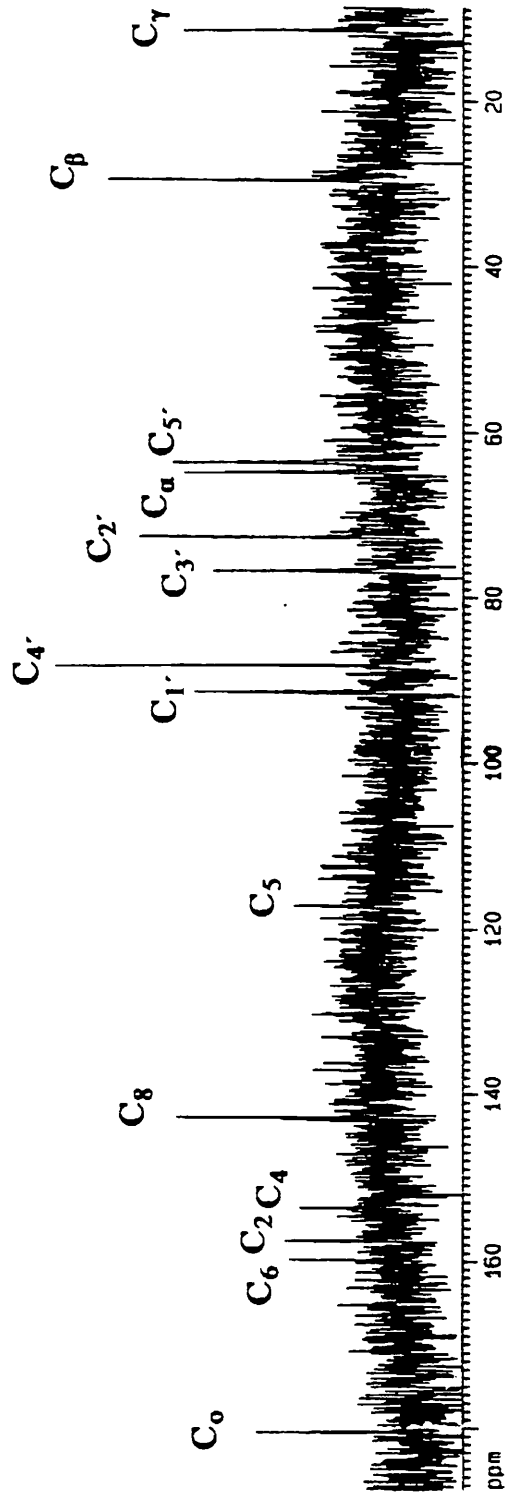


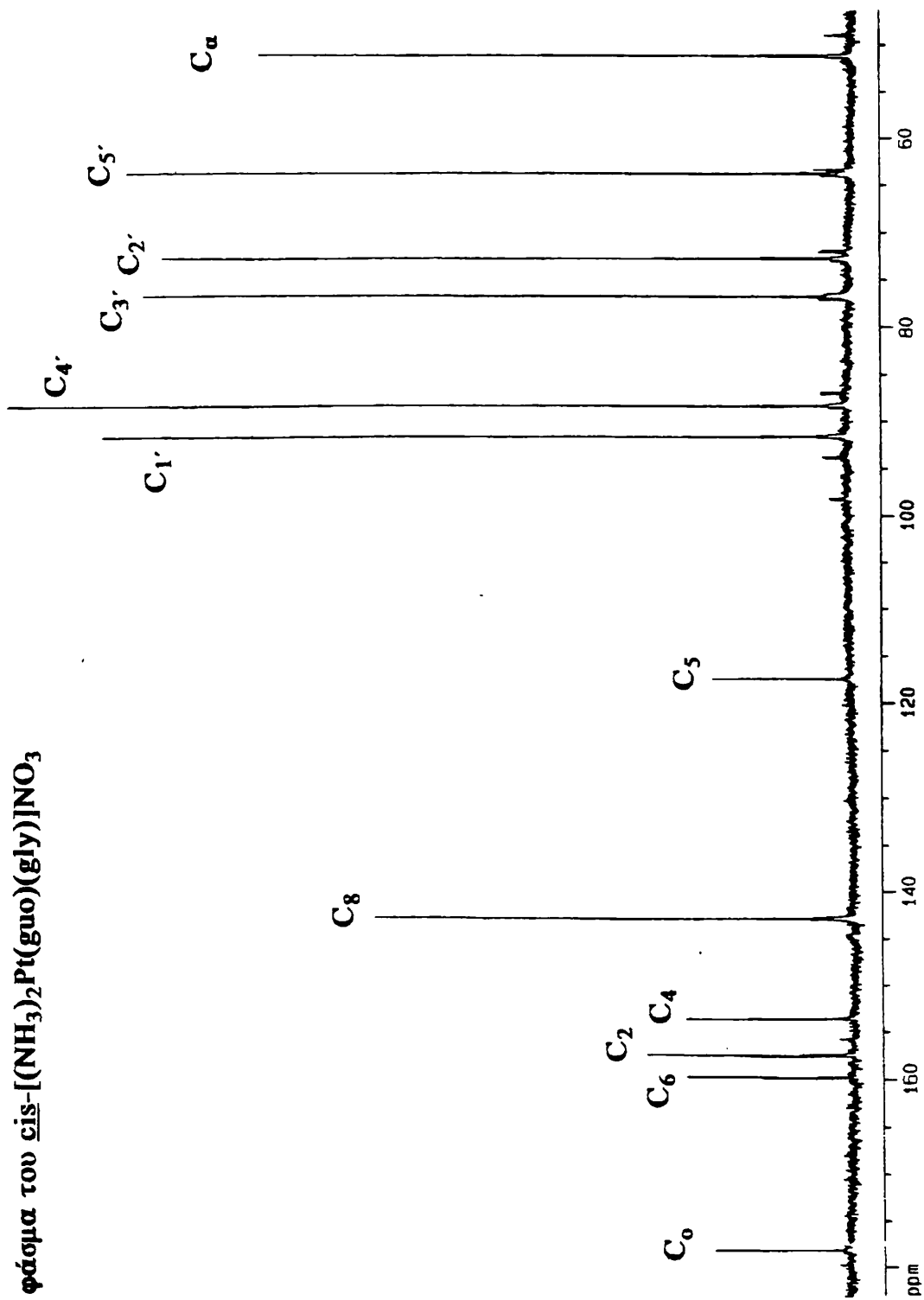
^{13}C -NMR φάσμα του cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{pval})]\text{NO}_3$ 

^{13}C -NMR φάσμα του cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{ala})]\text{NO}_3$ 

^{13}C -NMR φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nieu})]\text{NO}_3$ 

^{13}C -NMR φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(2\text{-aba})]\text{NO}_3$



^{13}C -NMR φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{gly})]\text{NO}_3$ 

ένταξη με το μέταλλο. Για το άτομο αυτό παρατηρείται μια μετατόπιση κατά περίπου 3 ppm προς χαμηλότερα πεδία για τα σύμπλοκα με γουανοσίνη και κατά περίπου 4 ppm προς χαμηλότερα πεδία για τα σύμπλοκα με κυτιδίνη σε σχέση με τα δυαδικά σύμπλοκα και κατά περίπου 6-7 ppm σε σχέση με τα ελεύθερα αμινοξέα (Πίνακας 17).

Τέλος, ενώ ο άνθρακας της καρβοξυλικής ομάδας μετατοπίζεται κατά περίπου 10-16 ppm σε χαμηλότερα πεδία περνώντας από τα ελεύθερα αμινοξέα στα δυαδικά σύμπλοκα (ενδεικτικό του χηλικά συνδεδεμένου αμινοξέος με τα μέταλλο), στα τριαδικά σύμπλοκα τόσο με γουανοσίνη όσο και με κυτιδίνη η μετατόπιση αυτή μειώνεται στα 3 ppm περίπου. Επιβεβαιώνεται με αυτό τον τρόπο σε όλες τις περιπτώσεις η μη ύπαρξη δεσμού Pt-O στα τριαδικά σύμπλοκα και η ένταξη του αμινοξέος μόνο μέσω της αμινομάδας του.

Συμπερασματικά, τα φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ επιβεβαιώνουν τις πληροφορίες που πήραμε καταρχήν από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ για τις θέσεις δεσμού των υποκαταστατών: τα άτομα N7 και N3 για τους νουκλεοζίτες γουανοσίνη και κυτιδίνη αντίστοιχα και η αμινομάδα ($-\text{NH}_2$) για τα αμινοξέα.

3.6. Φασματοσκοπία $^{195}\text{Pt-NMR}$

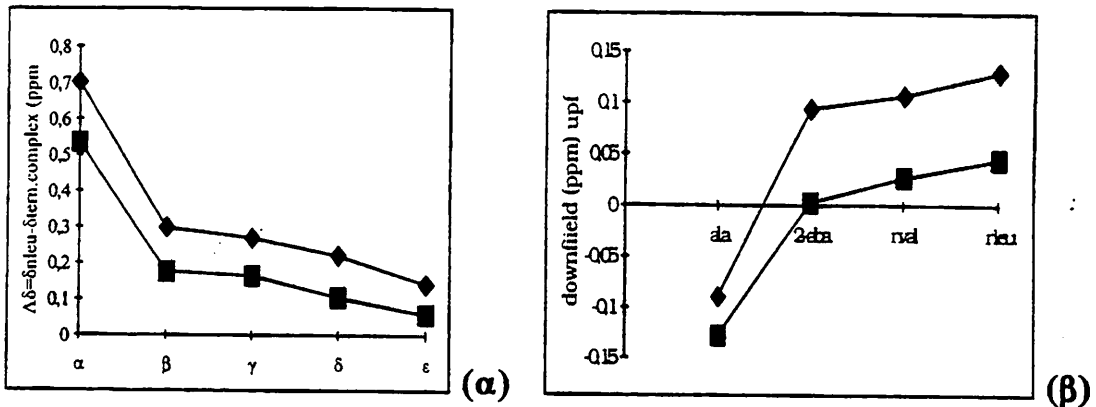
Τα φάσματα $^{195}\text{Pt-NMR}$ του δυαδικού συμπλόκου cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{gly})]\text{NO}_3$ και των τριαδικών cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{gly})]\text{NO}_3$ και cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{gly})]\text{NO}_3$ ελήφθησαν σε D_2O και φαίνονται στη σελίδα 181. Σε όλα τα φάσματα υπάρχει μόνο μια απλή ταινία στα -2128, -2560 και -2625 ppm αντίστοιχα. Η πρώτη αντιστοιχεί σε ένταξη του τύπου PtN_3O [325], ενώ οι άλλες δυο σε ένταξη του τύπου PtN_4 [326], όπως αναμενόταν. Όπως και η φασματοσκοπία $^{13}\text{C-NMR}$, έτσι και η φασματοσκοπία $^{195}\text{Pt-NMR}$ επιβεβαιώνει τις αρχικές μας προβλέψεις για τις θέσεις δεσμού των υποκαταστατών.

γουανοσίνη οι σταθερές σύζευξης δεν ήταν δυνατό να υπολογιστούν λόγω αλληλεπικάλυψης των σημάτων των πρωτονίων του αμινοξέος με τα πρωτόνια του σακχάρου).

Πίνακας 16: Σταθερές σύζευξης και κατανομή των διαμορφωμερών εκ περιστροφής γύρω από το δεσμό του αμινοξέος στα τριαδικά σύμπλοκα με Cyt.

Ένωση	J_{AB+BC} (Hz)	h(%)	t+g(%)
2-abaH	11.74	36.4	63.6
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(2-aba)]NO ₃	10.11	51.3	48.7
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(2-aba)]NO ₃	12.29	31.3	68.7
nvalH	12.24	31.8	68.2
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(nval)]NO ₃	10.02	52.1	47.9
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(nval)]NO ₃	12.59	28.5	71.5
nleuH	11.64	37.2	62.8
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(nleu)]NO ₃	10.50	47.4	52.6
cis-[(NH ₃) ₂ Pt(cyd)(nleu)]NO ₃	12.64	28.1	71.9

Όπως αναμενόταν [84,86], το ποσοστό του h διαμορφωμερούς μειώνεται καθώς περνάμε από τα δυαδικά στα τριαδικά σύμπλοκα κατά 19-24% και παίρνει τιμές ακόμα μικρότερες από αυτές στα ελεύθερα αμινοξέα. Κάτι τέτοιο δείχνει ότι με την εισαγωγή του νουκλεοζίτη στα δυαδικά συστήματα, η πλευρική αλυσίδα του αμινοξέος απομακρύνεται από το μεταλλοϊόν, ίσως λόγω της καταστροφής του χηλικού και της μονοένταξης πια του αμινοξέος ή ακόμα λόγω της δημιουργίας διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υποκαταστατών στο διάλυμα. Το ποσοστό h είναι ακόμα μικρότερο από το αντίστοιχο στα cis συστήματα με νουκλεοβάσεις [84], αλλά είναι σαφώς μεγαλύτερο από αυτό στα ανάλογα trans συστήματα [86], οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι αλληλεπιδράσεις των υποκαταστατών είναι μεγαλύτερες γενικά στα cis από ό,τι στα trans τριαδικά συστήματα.



Σχήμα 45: (α) Μεταβολή της χημικής μετατόπισης ($\Delta\delta$, ppm) των πρωτονίων των διαφόρων θέσεων της νορλευκίνης στα τριαδικά σύμπλοκα ως προς το ελεύθερο αμινοξύ: $\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nleu})]\text{NO}_3$ (\blacklozenge) και $\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{oyd})(\text{nleu})]\text{NO}_3$ (\blacksquare) (β) Μεταβολή της χημικής μετατόπισης ($\Delta\delta$, ppm) της μεθυλομάδας των ενταγμένων αμινοξέων ως προς τα ελεύθερα ανιόντα, για τα διάφορα αμινοξέα, αυξανόμενου του μεγέθους της πλευρικής αλυσίδας: $\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{amac})]\text{NO}_3$ (\blacklozenge) και $\text{cis}-[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{amac})]\text{NO}_3$ (\blacksquare).

3.4.3. Διαμόρφωση του σακχάρου

Υπολογίζοντας τις σταθερές σύζευξης $^3J_{\text{HH}}$ από τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$, μπορέσαμε να βρούμε τα ποσοστά των διαμορφώσεων ^3E και ^2E του δακτυλίου της ριβόζης των νουκλεοζιτών, τα ποσοστά των διαμορφώσεων gg , gt και tg γύρω από το δεσμό $\text{C}_4-\text{C}_5'$ και τα ποσοστά των διαμορφωμένων syn και anti γύρω από το γλυκοζιτικό δεσμό, σύμφωνα με τις σχέσεις στις σελίδες. Οι σταθερές σύζευξης $^3J_{\text{HH}}$ καθώς και τα παραπάνω ποσοστά, όπου ήταν δυνατός ο υπολογισμός τους συγκεντρώνονται στον Πίνακα 13.

Έτσι το ποσοστό της ^3E διαμόρφωσης στα τριαδικά σύμπλοκα αυξάνεται κατά 5-7% περίπου από την τιμή 38% για την ελεύθερη γουανοσίνη [84] και μάλιστα η αύξηση αυτή δε φαίνεται να εξαρτάται από το αμινοξύ. Η αύξηση στο ποσοστό της ^3E διαμόρφωσης βρέθηκε ίση με 8-10% για τα σύμπλοκα με διπεπτιδία $\text{cis}-[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{dipeptidester})_2]\text{Cl}_2$ και 9-10% για τα $\text{trans}-[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{amacH})_2]\text{Cl}_2$ [83]. Η αύξηση ήταν λίγο μεγαλύτερη για τα σύμπλοκα του Pd(II): $\text{cis}-[(\text{guo})_2\text{Pd}(\text{amac})]\text{Cl}$ [78] και $\text{trans}-$

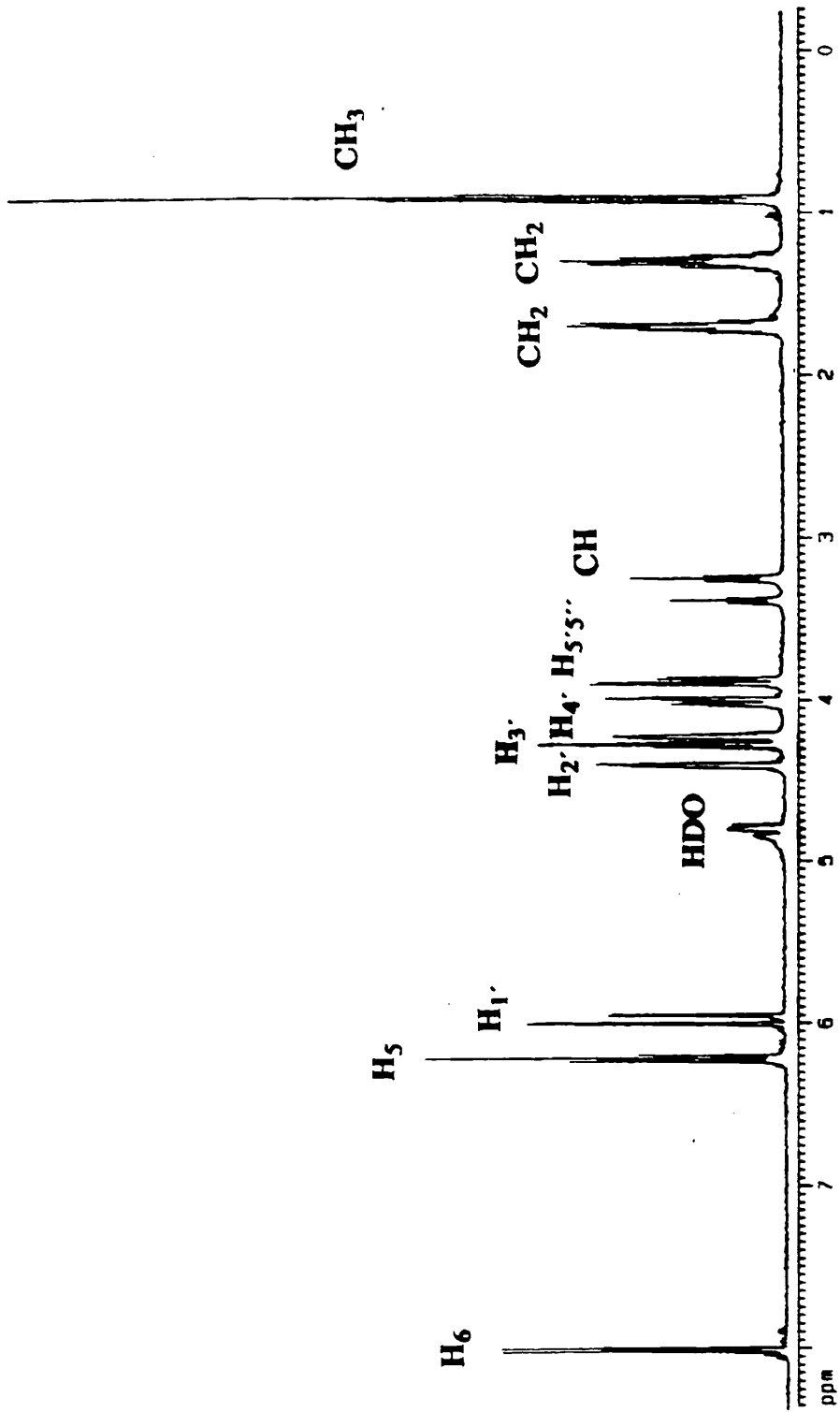
3.4.2. Υδρόφοβες αλειφατικές-αρωματικές αλληλεπιδράσεις

Ενδομοριακές υδρόφοβες αλειφατικές-αρωματικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών σε τριαδικά συστήματα νουκλεοβάσεων/νουκλεοζιτών-λευκοχρύσου-αμινοξέων/πεπτιδίων έχουν ανιχνευτεί και σε προηγούμενες σχετικές μελέτες. Η ύπαρξη των αλληλεπιδράσεων αυτών έχει σαν αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των τριαδικών συμπλόκων σε σχέση με τα πρόδρομα αυτών δυαδικά σύμπλοκα.

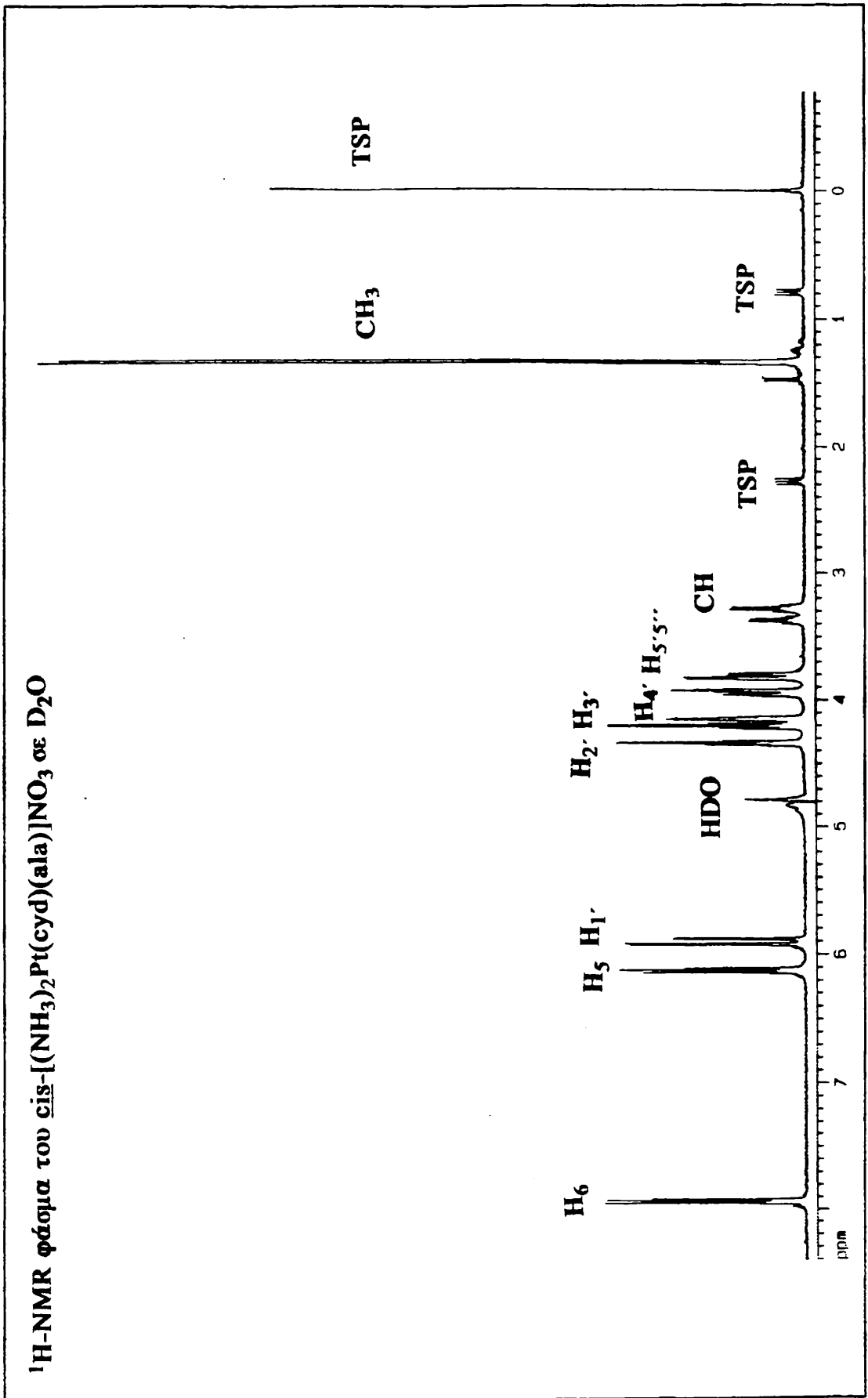
Η διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις της τελικής μεθυλομάδας των αμινοξέων μεταξύ της ανιονικής τους μορφής και των τριαδικών συμπλόκων τους με μέταλλα ($\Delta\delta = \delta_{\text{amac}} - \delta_{\text{tern.complex}}$) χρησιμοποιείται για την ανίχνευση τέτοιων αλληλεπιδράσεων [323,324]. Αν η διαφορά αυτή είναι θετική τότε έχουμε αλληλεπιδράσεις στα σύμπλοκα, ενώ το αντίθετο συμβαίνει αν είναι αρνητική. Στον Πίνακα 14 δίνονται οι τιμές της $\Delta\delta$ για όλα τα αμινοξέα εκτός της γλυκίνης. Η γλυκίνη δεν διαθέτει πλευρική μεθυλομάδα και έτσι δεν αναμένονται γι'αυτήν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αλειφατικού-αρωματικού χαρακτήρα. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 14 και το Διάγραμμα του Σχήματος 45, η διαφορά $\Delta\delta$ ενώ είναι αρνητική για τα σύμπλοκα της αλανίνης τόσο με γουανοσίνη όσο και με κυτιδίνη, γίνεται θετική και αυξάνεται σταδιακά, καθώς αυξάνεται η πλευρική αλυσίδα των αμινοξέων. Επιπλέον, η διαφορά $\Delta\delta$ έχει γενικά μεγαλύτερες τιμές στα σύμπλοκα της γουανοσίνης σε σχέση με τα αντίστοιχα της κυτιδίνης.

Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αυξάνονται καθώς αυξάνεται η πλευρική αλειφατική αλυσίδα του αμινοξέος και το μέγεθος του Pt(II) δε δείχνει να τις εμποδίζει. Το μέγεθος των αλληλεπιδράσεων είναι ανάλογο του μεγέθους στα αντίστοιχα cis-συστήματα με τις νουκλεοβάσεις 1-MeC και 9-MeG [84], ενώ είναι σαφώς μεγαλύτερο από αυτό στα αντίστοιχα trans-συστήματα [86,88]. Επίσης, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

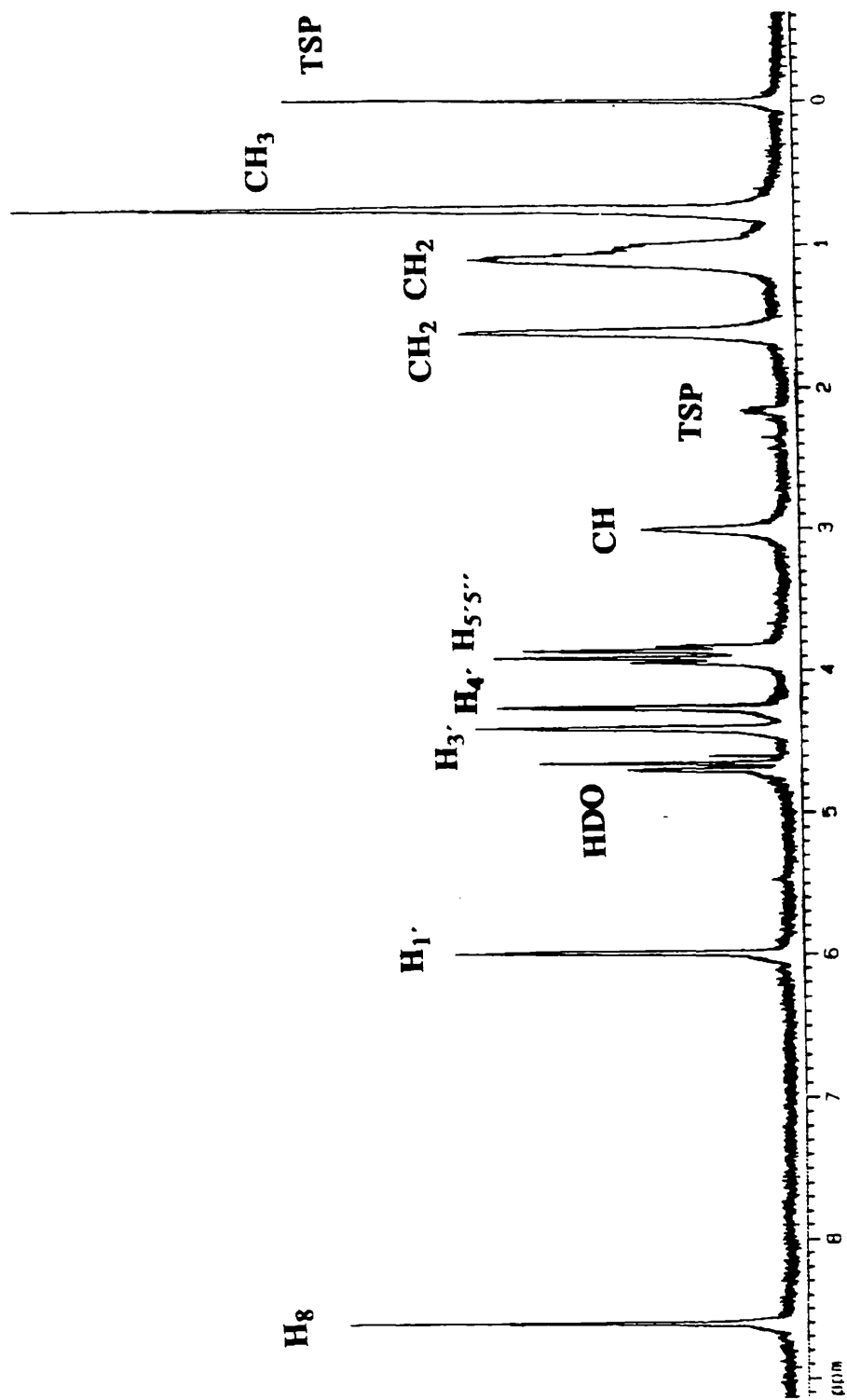
$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{nval})]\text{NO}_3$ σε D_2O



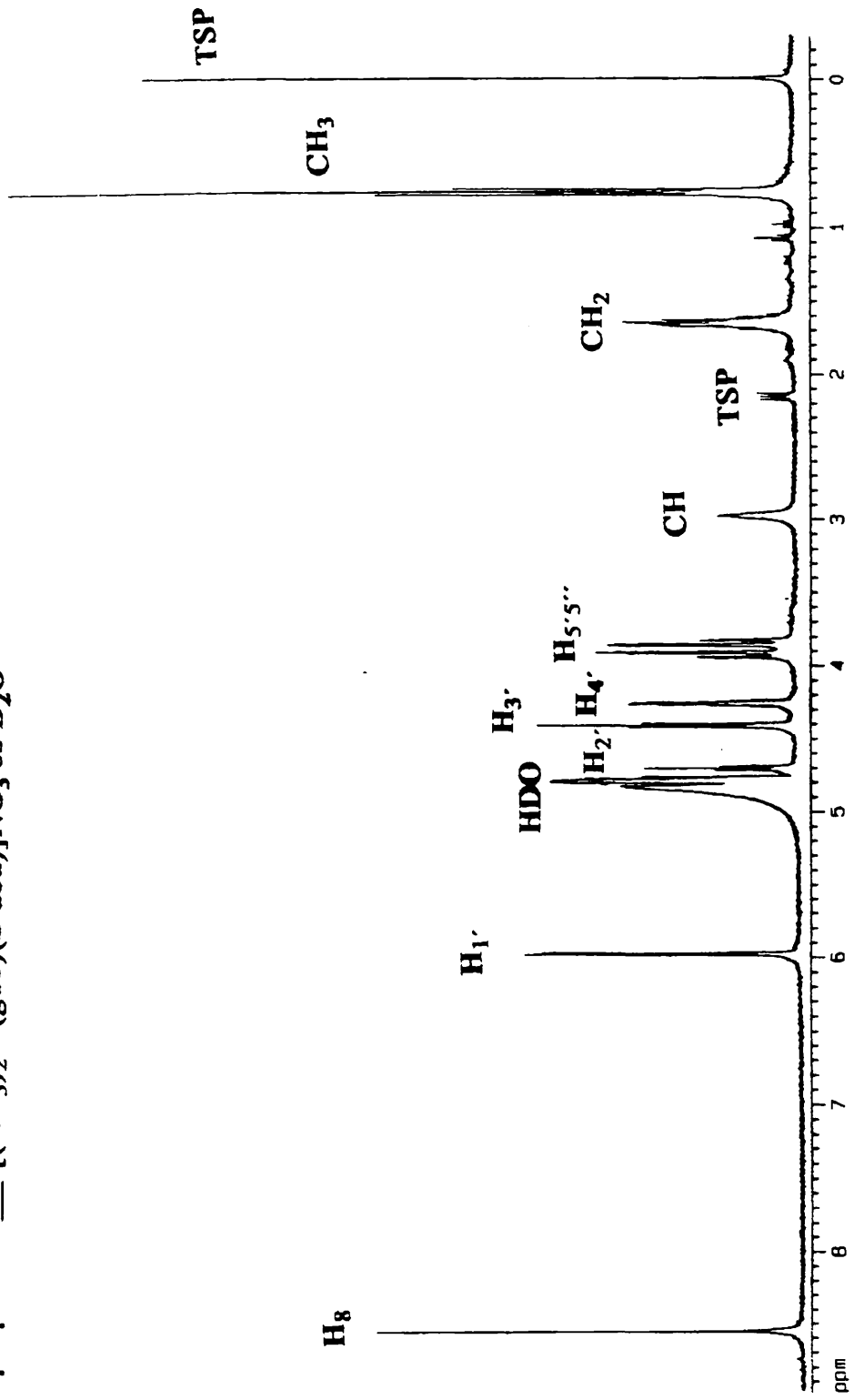
$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyc})(\text{ala})]\text{NO}_3$ σε D_2O



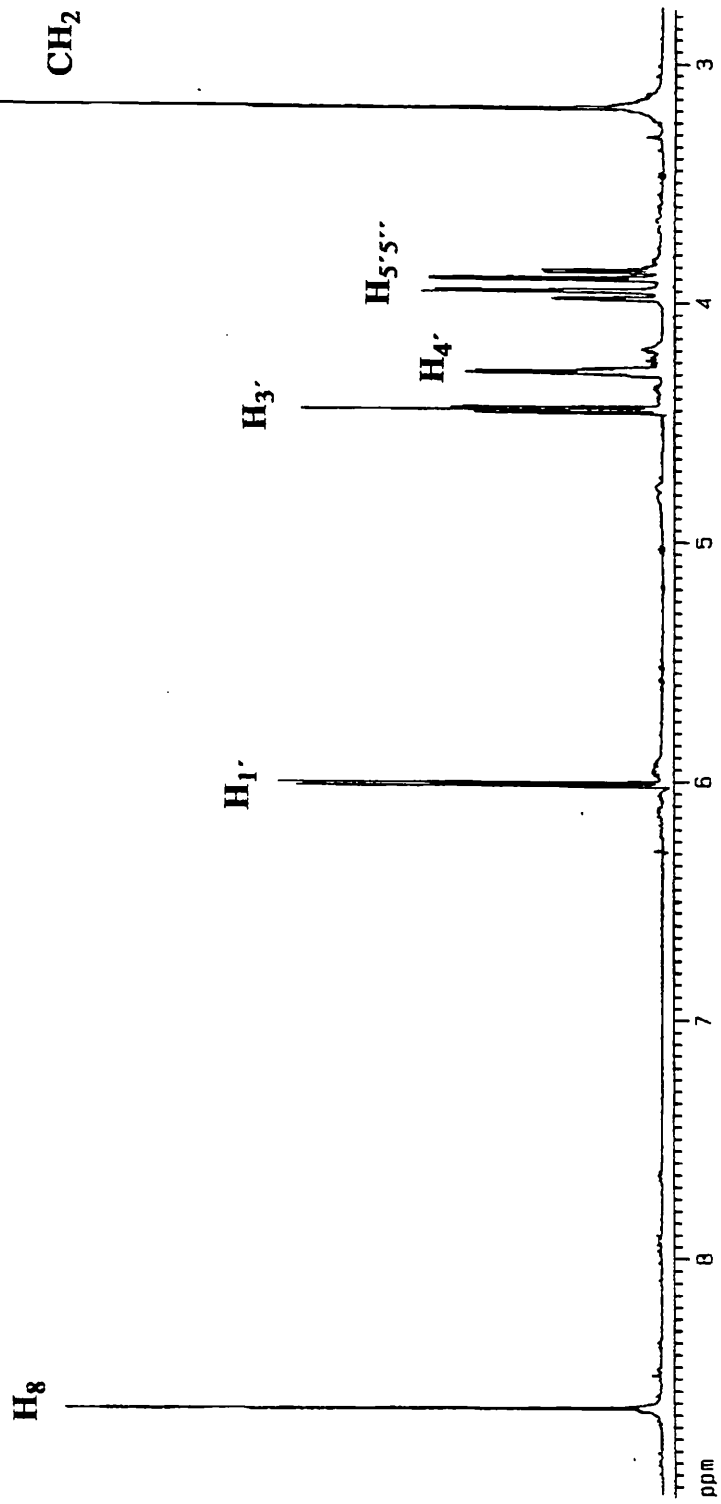
$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nleu})]\text{NO}_3$ σε D_2O



$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(2\text{-aba})]\text{NO}_3$ σε D_2O



$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{gly})]\text{NO}_3$ σε D_2O



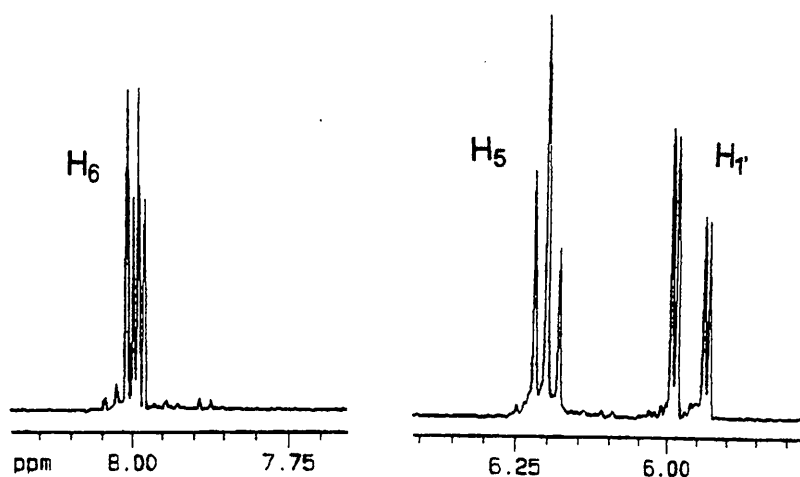
Πίνακας 12: Χημικές μετατοπίσεις, δ (ppm), των πρωτονίων των $^1\text{H-NMR}$ φασμάτων των διαδικιών και τραδικών συμπλόκων σε D_2O (TSP).

Σύμπλοκα	ρD	H_b	H_c	H_d	$\alpha\text{-CH}$	$\beta\text{-CH}$	$\gamma\text{-CH}$	$\delta\text{-CH}$	$\epsilon\text{-CH}$
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{gly})]\text{NO}_3$	5.5				3.642(s)				
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{ala})]\text{NO}_3$	5.5				3.778(q)	1.475(t)			
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(2\text{-aba})]\text{NO}_3$	5.5				3.649(t)	1.902(m)	1.093(t)		
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{nval})]\text{NO}_3$	5.5				3.733(t)	1.865(m)	1.573(m)	1.003(t)	
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{nleu})]\text{NO}_3$	5.5				3.704(t)	1.893(m)	1.588(m)	1.427(m)	0.968(t)
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{gly})]\text{NO}_3$	5.6	8.604(s)			3.145(s)				
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{ala})]\text{NO}_3$	5.6	8.573(s)			3.128(q)	1.311(d)			
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(2\text{-aba})]\text{NO}_3$	5.6	8.574(s)			2.999(s,br)	1.663(m)	0.818(t)		
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nval})]\text{NO}_3$	5.6	8.589(s)			3.036(t)	1.560(m)	1.156(m)	0.796(t)	
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nleu})]\text{NO}_3$	5.6	8.599(s)			3.025(s,br)	1.552(m)	1.035(m)	1.035(m)	0.757(t)
guo		7.987(s)							
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{gly})]\text{NO}_3$	5.5	7.966, 7.953, 7.937(t)		6.154, 6.142(d)	3.258(t)				
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{ala})]\text{NO}_3$	5.5	7.953, 7.944, 7.940, 7.931(dd)		6.156, 6.142, 6.128(t)	3.378(q)	1.348(d)			
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(2\text{-aba})]\text{NO}_3$	5.5	7.957, 7.948, 7.945, 7.936(dd)		6.166, 6.153, 6.145, 6.132(dd)	3.314(t)	1.692(m)	0.909(t)		
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{oyd})(\text{nval})]\text{NO}_3$	5.5	7.965, 7.955, 7.953, 7.943(dd)		6.168, 6.155, 6.147, 6.135(dd)	3.334(t)	1.637(m)	1.237(m)	0.876(t)	
$\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{nleu})]\text{NO}_3$	5.5	7.974, 7.967, 7.955, 7.948(dd)		6.177, 6.156, 6.142(t)	3.199(t)	1.673(m)	1.250(m)	1.250(m)	0.842(t)
cyd	5.5	7.864(d)		6.073(d)	3.193(t)				

(ii) Τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη

Στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των τριαδικών συμπλόκων με κυτιδίνη, παρατηρείται μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων H6 και H5 προς χαμηλότερα πεδία σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη κατά 0.07-0.1 ppm, ενδεικτικό της συμπλοκοποίησης του μετάλλου μέσω του αζώτου N3 [243,277-279]. Τα σήματα συντονισμού των υπόλοιπων πρωτονίων του νουκλεοζίτη δεν επηρεάζονται από τη συμπλοκοποίηση, όπως αναμενόταν.

Σημαντική είναι και σε αυτή την περίπτωση η παρατήρηση ότι οι διπλές κορυφές που κανονικά αντιστοιχούν στα σήματα των πρωτονίων H6, H5 και H1' εμφανίζονται ως δυο ομάδες διπλών κορυφών ίδιας περίπου έντασης (Σχήμα 44). Επίσης δυο ομάδες κορυφών παρατηρούνται για τα α-πρωτόνια των αμινοξέων, εκτός της γλυκίνης. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι ενδεικτικές της παρουσίας διαμορφωμένων στο διάλυμα, λόγω της παρεμποδισμένης περιστροφής γύρω από το δεσμό Pt-N3, όπως και στη περίπτωση των τριαδικών συμπλόκων με κυτιδίνη και διπεπτίδια.



Σχήμα 44: Σχάση των σημάτων των πρωτονίων H6, H5 και H1' της κυτιδίνης, όπως φαίνεται στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπλόκου $\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{nval})]\text{NO}_3$

3.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων (¹H-NMR)

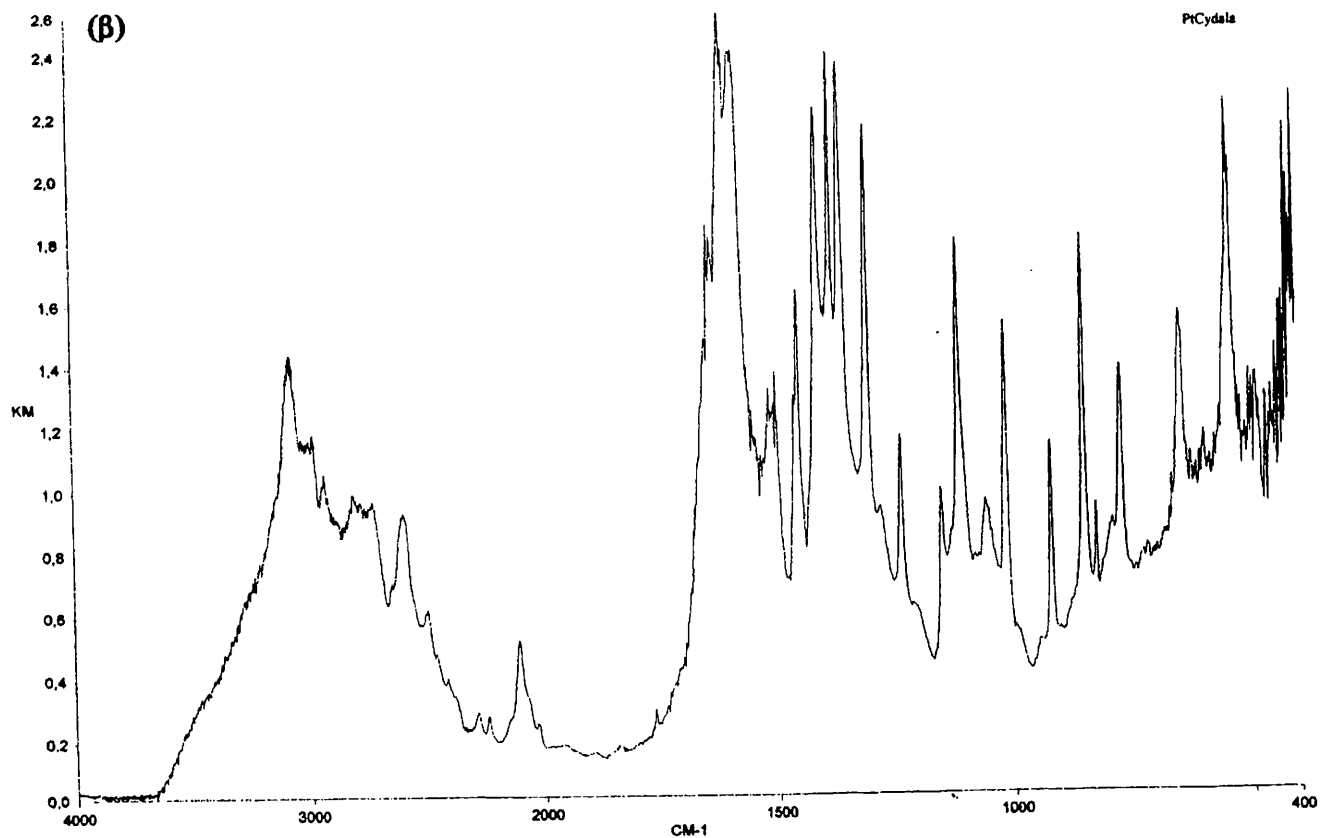
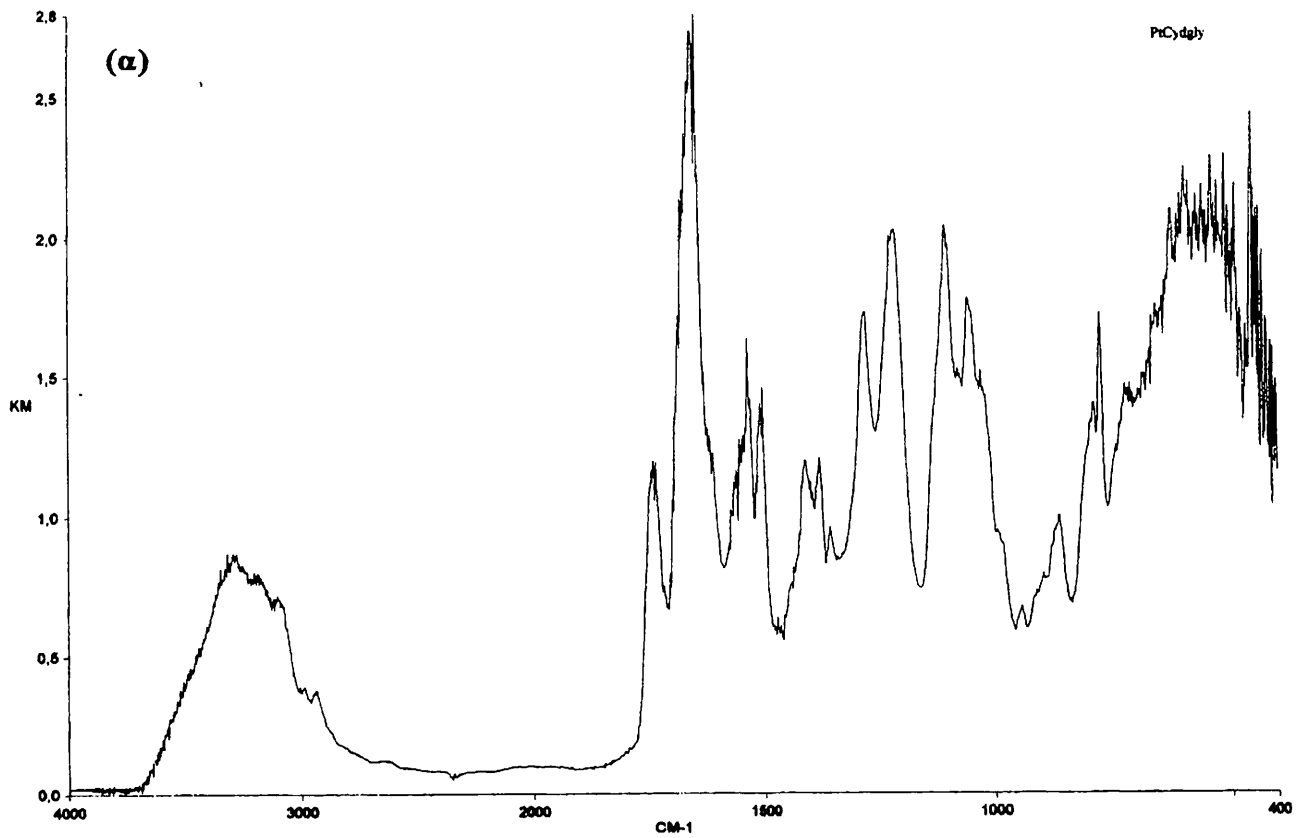
Τα φάσματα ¹H-NMR των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν ελήφθησαν σε D₂O (pD=5.5-5.6) και φαίνονται στις σελίδες 152-161. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ, ppm) και οι σταθερές σύζευξης (J, Hz) των πρωτονίων δίνονται στους Πίνακες 12 και 13. Τα αποτελέσματα που έδωσε η μελέτη των φασμάτων παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια.

3.4.1. Θέσεις δεσμού των υποκαταστατών

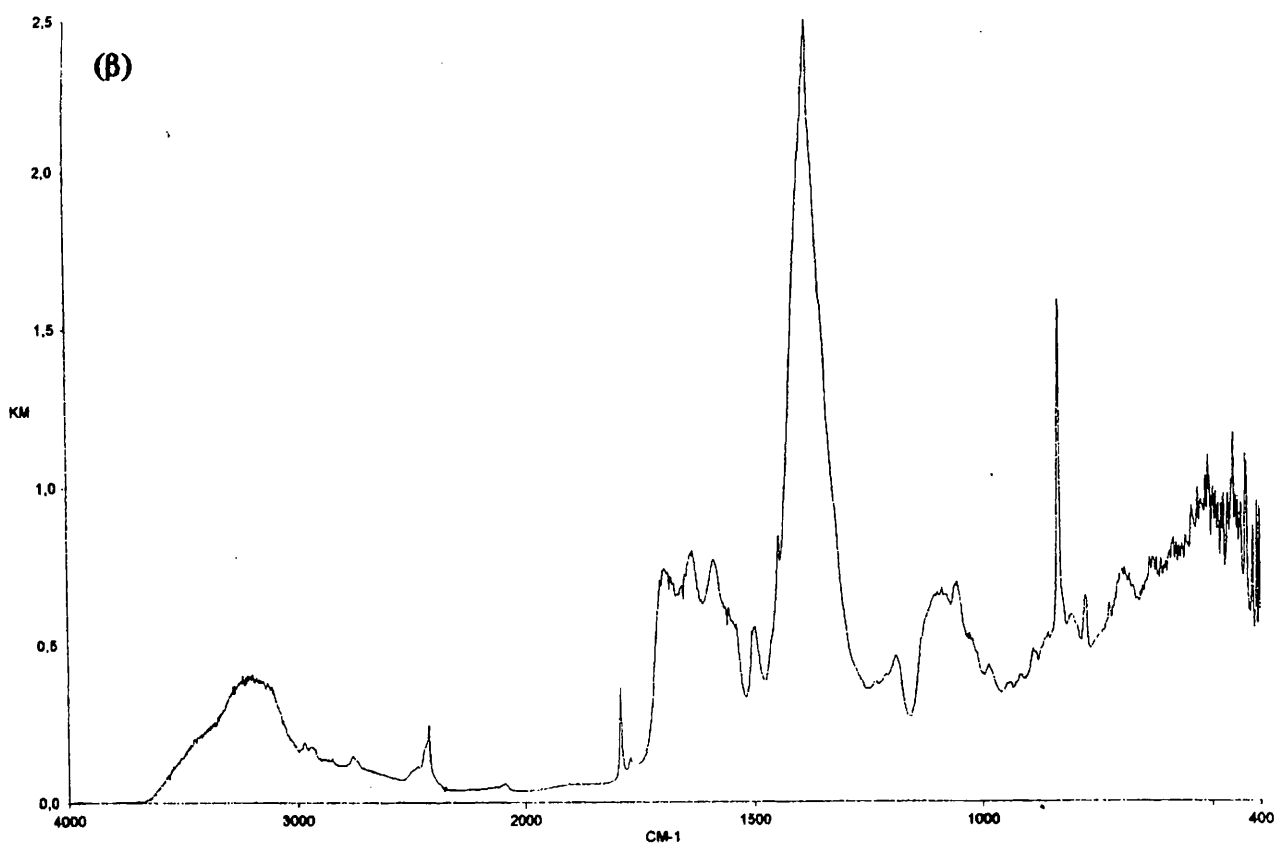
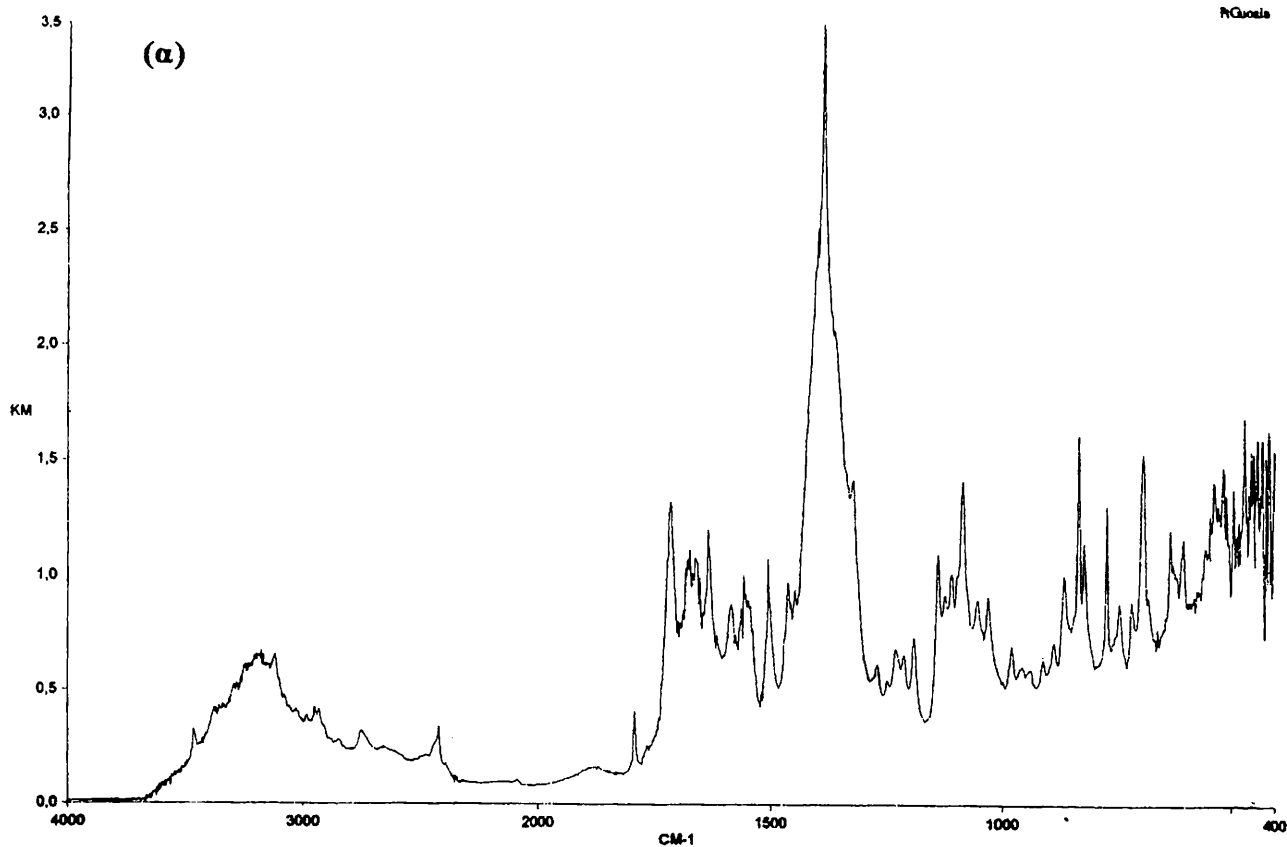
(i) Τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη

Σε όλα τα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη παρατηρείται μια μετατόπιση του σήματος συντονισμού του πρωτονίου H8 σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη κατά περίπου 0.6 ppm. Η παρατήρηση αυτή είναι ενδεικτική του δεσμού του μετάλλου με το άζωτο N7 της γουανοσίνης [117,266-269]. Η μετατόπιση αυτή είναι μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρήθηκε στην περίπτωση των αντίστοιχων τριαδικών συμπλόκων με διπεπτίδια κατά 0.45 ppm (Πίνακας 5). Η διαφορά δείχνει ότι στα τριαδικά σύμπλοκα με αμινοξέα η ένταση των διαμοριακών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (stacking interactions) είναι μικρότερη από ό,τι στην περίπτωση των αντίστοιχων με τα διπεπτίδια. Τα σήματα συντονισμού των υπόλοιπων πρωτονίων του νουκλεοζίτη μένουν σχεδόν ανεπηρέαστα από τη συμπλοκοποίηση με εξαίρεση ίσως το σήμα του πρωτονίου H1', το οποίο μετατοπίζεται κατά 0.1 ppm περίπου προς χαμηλότερα πεδία.

Όπως και στην περίπτωση των προηγούμενων τριαδικών συμπλόκων με γουανοσίνη, τα φάσματα ¹H-NMR έδωσαν ένα μόνο σήμα συντονισμού για τα πρωτόνια H8, σε συνηθισμένη θερμοκρασία, γεγονός που δείχνει πως η περιστροφή γύρω από το δεσμό Pt-N7 πραγματοποιείται ελεύθερα.

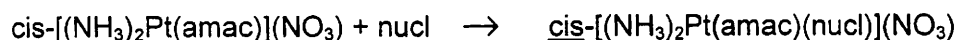


FT-IR φάσματα των συμπλόκων: (α) $\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{gly})]\text{NO}_3$ και
 (β) $\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{ala})]\text{NO}_3$



FT-IR φάσματα των συμπλόκων: (α) $\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{ala})]\text{NO}_3$ και
(β) $\text{cis-}[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(2\text{-aba})]\text{NO}_3$

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν τα τριαδικά σύμπλοκα με τους νουκλεοζίτες, σύμφωνα με το σχήμα:



όπου nucl= guo, cyd.

Απομονώθηκαν δέκα τριαδικά σύμπλοκα σε μορφή άσπρης σκόνης, ύστερα από υγρή χρωματογραφία (Sephadex G-10) και εξάτμιση του διαλύτη. Η μοριακή αγωγιμότητα σε υδατικά διαλύματα, συγκέντρωσης 10^{-3} M, είχε σε όλες τις περιπτώσεις τιμή ίση με $100\text{-}110 \text{ ohm}^{-1}\text{cm}^2/\text{mole}$ περίπου, τιμή που συμφωνεί με την υπόθεση δομής 1:1 ηλεκτρολύτη. Οι στοιχειακές αναλύσεις των συμπλόκων παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 και όπως φαίνεται συμφωνούν με τους προτεινόμενους μοριακούς τύπους.

Πίνακας 10: Στοιχειακές αναλύσεις των συμπλόκων.

Σύμπλοκα	C%	H%	N%
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{gly})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	21.42(21.05)	3.75(3.94)	18.70(18.42)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{ala})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	22.12(22.35)	4.30(4.16)	18.34(18.05)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(2\text{-aba})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	23.35(23.59)	4.20(4.35)	17.45(17.69)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nval})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24.94(24.79)	4.32(4.54)	17.39(17.35)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{guo})(\text{nleu})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25.50(25.94)	4.46(4.73)	16.91(17.03)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{gly})]\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	21.36(21.08)	4.13(3.99)	15.54(15.65)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{ala})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	21.60(21.88)	4.26(4.40)	14.73(14.89)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(2\text{-aba})]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	22.20(22.60)	4.35(4.78)	14.80(14.20)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{nval})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	24.01(24.49)	4.17(4.81)	14.48(14.28)
cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{cyd})(\text{nleu})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25.52(25.71)	4.88(5.00)	14.26(14.00)

Οι τιμές σε παρένθεση είναι οι θεωρητικές τιμές.

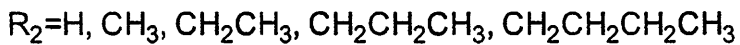
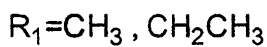
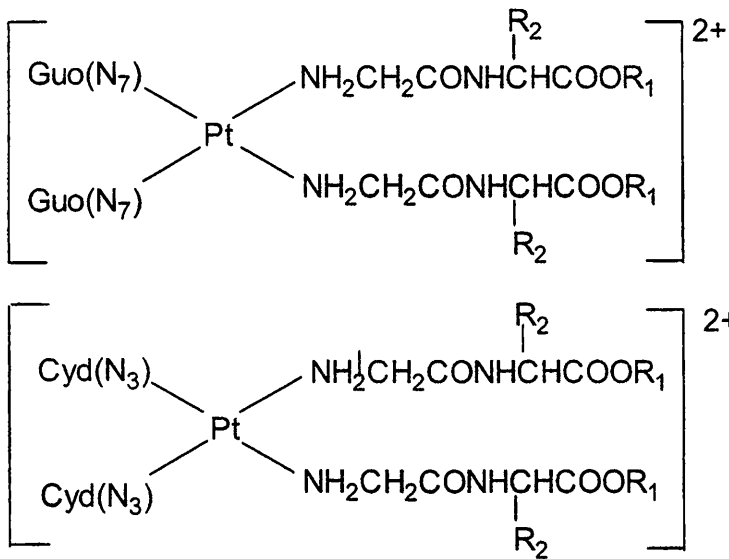
3.3. Φασματοσκοπία υπερώθρου (FT-IR)

Τα φάσματα FT-IR των συμπλόκων ελήφθησαν στην περιοχή $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ και ενδεικτικά παρουσιάζονται στις σελίδες 142-145, ενώ στον Πίνακα 11 συγκεντρώνονται οι τιμές των πιο χαρακτηριστικών ταινιών.

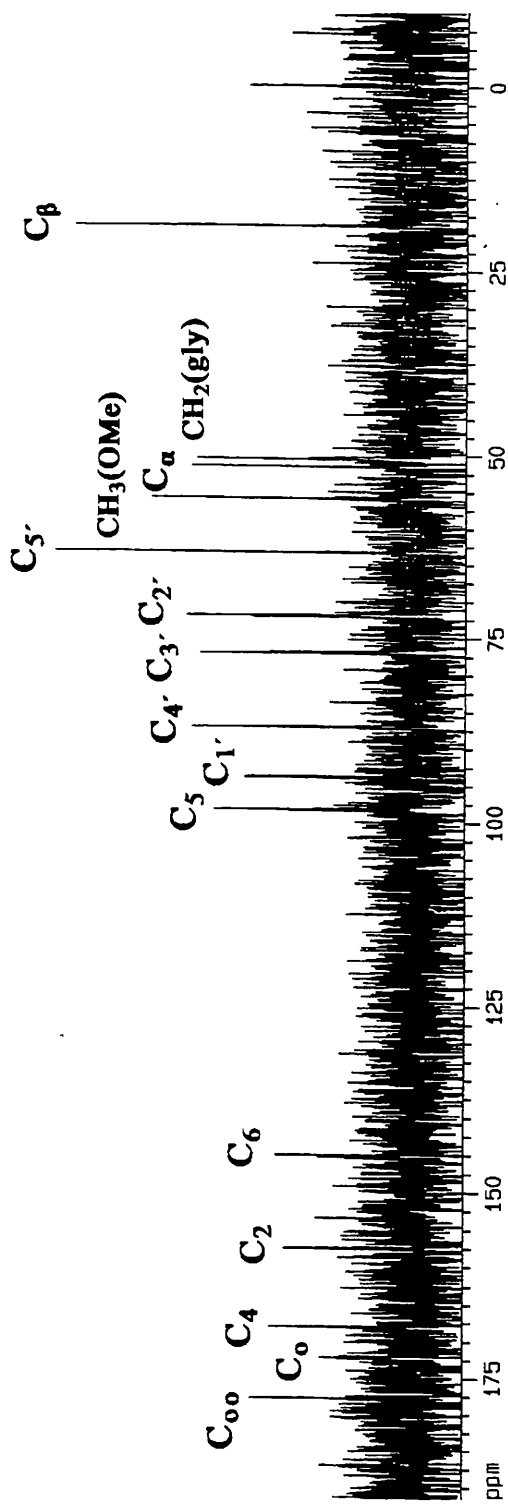
Στην περιοχή $4000\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$ εμφανίζεται μια ευρεία ταινία, στην οποία συνυπάρχουν οι δονήσεις τάσης των ομάδων υδροξυλίου του C-

ελαττώνοντας για παράδειγμα το ποσοστό της *gg* διαμόρφωσης και αυξάνοντας το ποσοστό της *anti* διαμόρφωσης της γουανοσίνης. Είναι δυνατό λοιπόν η τοξικότητα του προτύπου να σχετίζεται με τις μεταβολές αυτές που επιφέρει η πρωτεΐνη στη δομή του DNA [322].

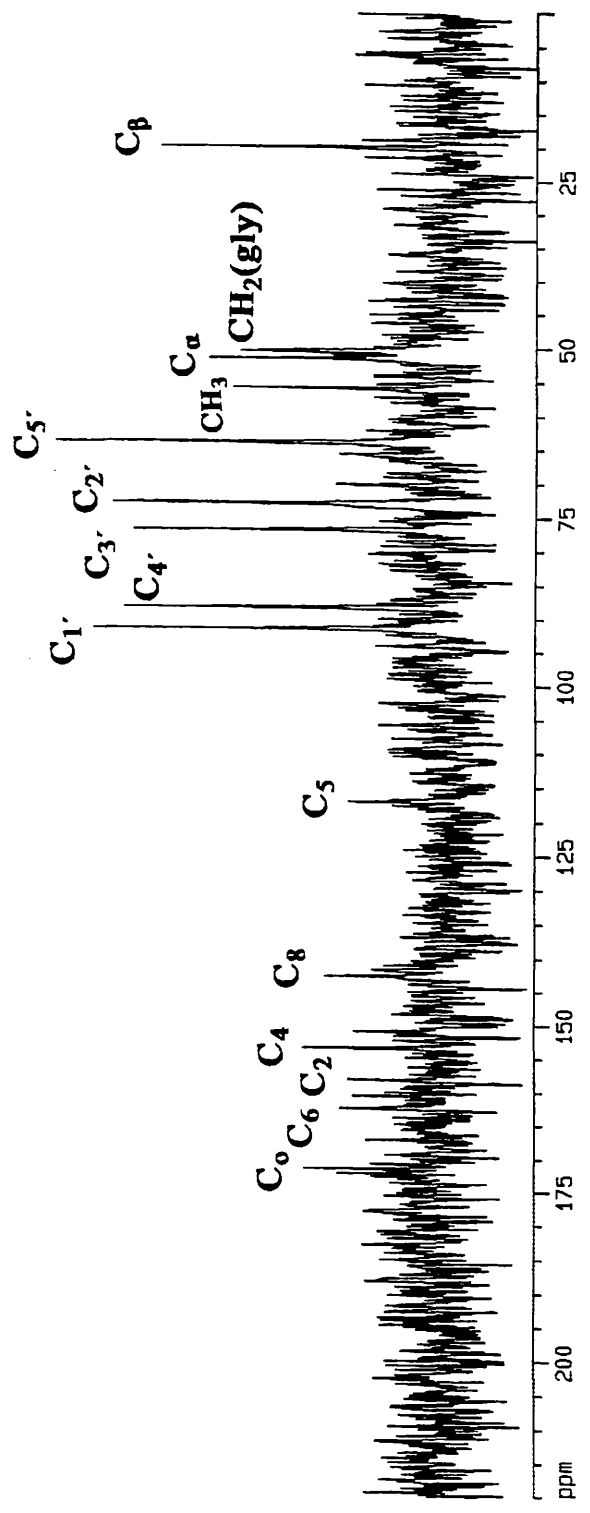
Τριαδικά σύμπλοκα Pt(II) με γουανοσίνη/κυτιδίνη και εστέρες
διπεπτιδίων



^{13}C -NMR φάσμα του *cis*-[(*cyd*)₂Pt(*glyalaOMe*)₂]Cl₂



^{13}C -NMR φάσμα του *cis*- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glyalaOMe})_2]\text{Cl}_2$



περίπου 7 ppm προς χαμηλότερες τιμές πεδίου σε όλα τα τριαδικά σύμπλοκα είτε με γουανοσίνη είτε με κυτιδίνη. Για άλλη μια φορά επιβεβαιώνεται έτσι η σύνδεση του μετάλλου με τα διπεπτίδια μέσω της τελικής τους αμινομάδας. Οι μετατοπίσεις για τα υπόλοιπα άτομα άνθρακα, συμπεριλαμβανομένων των ατόμων άνθρακα του αμιδικού δεσμού C_o και της εστερικής ομάδας C_{oo}, είναι αμελητέες, ενδεικτικό του ότι τα διπεπτίδια δεν συνδέονται με το Pt(II) μέσω κανενός άλλου ατόμου τους.

Συμπερασματικά, οι πληροφορίες που μας δίνουν τα φάσματα ¹³C-NMR επιβεβαιώνουν τα σημεία δεσμού των υποκαταστατών με το μέταλλο και για τις δυο σειρές των τριαδικών συμπλόκων.

Πίνακας 9: Χημικές μετατοπίσεις, δ(ppm), των πρωτονίων των ¹³C-NMR φασμάτων των εστέρων των διπεπτιδίων GlyGly και GlyAla και των τριαδικών συμπλόκων τους (Διαλύτης D₂O (TSP)).

Ένωση	C ₂	C ₄	C ₅	C ₆	C ₈	C _{1'}	C _{2'}	C _{3'}	C _{4'}	C _{5'}
cis-[(guo) ₂ Pt(GlyGlyOEt) ₂]Cl ₂	157.4	153.4	116.9	159.3	142.7	91.6	72.9	76.8	88.4	63.9
cis-[(guo) ₂ Pt(GlyAlaOMe) ₂]Cl ₂	158.0	153.3	117.0	162.3	142.6	91.5	72.9	76.9	88.4	63.9
Guo	153.6	151.3	116.6	156.8	135.7	87.0	70.6	74.0	85.5	61.8
ois-[(cyd) ₂ Pt(GlyGlyOEt) ₂]Cl ₂	157.3	167.9	98.3	144.8		93.8	71.9	77.1	87.0	63.3
cis-[(cyd) ₂ Pt(GlyAlaOMe) ₂]Cl ₂	157.4	167.9	98.3	144.9		93.8	71.9	77.0	87.0	63.3
Cyd	159.8	168.6	98.9	144.6		93.2	72.1	76.8	86.6	63.6
HCl.GlyGlyOEt										
HCl.GlyAlaOMe										

Ένωση	CH ₂ (gly)	C _α	C _β	CH ₂ ester	CH ₃ ester	C _{oo}	C _o
cis-[(guo) ₂ Pt(GlyGlyOEt) ₂]Cl ₂	50.3	44.1		65.5	16.1	174.2	172.8
cis-[(guo) ₂ Pt(GlyAlaOMe) ₂]Cl ₂	50.5	51.5	20.0		55.9		171.3
Guo							
cis-[(cyd) ₂ Pt(GlyGlyOEt) ₂]Cl ₂	50.5	44.1		65.5	16.1	174.3	172.9
cis-[(cyd) ₂ Pt(GlyAlaOMe) ₂]Cl ₂	50.5	51.5	19.0		55.9	177.6	172.5
Cyd							
HCl.GlyGlyOEt	43.3	44.3		65.6	16.2	174.4	170.5
HCl.GlyAlaOMe	43.3	51.7	18.9		55.9	177.7	169.7

δεύτερου αμινοξέος του πεπτιδίου κατευθύνεται κατά προτίμηση μακριά από το μεταλλοϊόν [314-316,84]. Στην περίπτωση αυτή των *cis*-συστημάτων συμπεραίνουμε ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών δεν είναι πολύ ισχυρές, αλλά είναι σαφώς ισχυρότερες από ό,τι στην περίπτωση *trans*-τριαδικών συστημάτων [88], όπου οι τιμές των ποσοστών των διαμορφωμερών t+g είναι μεγαλύτερες. Επίσης από τον Πίνακα 8 παρατηρούμε ότι καθώς αυξάνεται η πλευρική αλειφατική αλυσίδα του δεύτερου αμινοξέος των πεπτιδίων, μειώνεται το ποσοστό των t+g διαμορφωμερών (από 63.9% για το τριαδικό σύμπλοκο με το διπεπτίδιο GlyAlaOMe σε 56.5% για το αντίστοιχο με το διπεπτίδιο GlyLeuOMe), παρατήρηση που οδηγεί στο συμπέρασμα πως αυξανόμενη της αλειφατικής πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος αυξάνονται και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών στα συστήματα αυτά.

Η σταθερά σύζευξης $^3J_{\alpha\beta}$ για τα πρωτόνια της αλανίνης δε μεταβάλλεται κατά το σχηματισμό των τριαδικών συμπλόκων και είναι πάντα στα 7.3 Hz. Αυτή η τιμή δείχνει ισοκατανομή των τριών αντίστοιχων διαμορφωμερών λόγω ελεύθερης περιστροφής της μεθυλομάδας γύρω από το δεσμό C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ όπως αναμένεται [317].

Για τα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός των τιμών των σταθερών σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων α - και β - θέσης, συνεπώς και των παραπάνω διαμορφωμερών, λόγω της αλληλεπικάλυψης των σημάτων στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των ενώσεων.

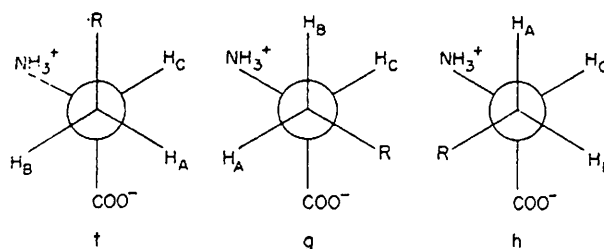
2.5. Φασματοσκοπία $^{13}\text{C-NMR}$

Τα φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ ελήφθησαν σε διαλύματα D $_2$ O για τα σύμπλοκα: *cis*-[(guo) $_2$ Pt(GlyGlyOEt) $_2$]Cl $_2$, *cis*-[(guo) $_2$ Pt(GlyAlaOMe) $_2$]Cl $_2$, *cis*-[(cyd) $_2$ Pt(GlyGlyOEt) $_2$]Cl $_2$ και *cis*-[(cyd) $_2$ Pt(GlyAlaOMe) $_2$]Cl $_2$ και φαίνονται στις σελίδες 133-136. Οι χημικές μετατοπίσεις των

όπου P είναι τα σχετικά ποσοστά % των δυο τύπων και δ οι τιμές των σταθερών χημικών μετατοπίσεων για τους τύπους syn και anti αντίστοιχα (η δ_{syn} αντιστοιχεί σε τύπο με 100% syn διαμόρφωση και η δ_{anti} σε τύπο με 100% anti διαμόρφωση [312]). Για τη γουανοσίνη υποτέθηκε ότι σε ποσοστό 100% syn αντιστοιχεί η t-Bu⁸guo με $\delta=5.073$ ppm και το 0% syn αντιστοιχεί στο cis-Pt⁷(Gr^{5'})₂²⁺ με $\delta=4.608$ ppm [271]. Αργότερα βρέθηκε ότι οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων που παρατηρήθηκαν για τα πρωτόνια H₂ στα σύμπλοκα cis-[(guo)₂Pd(amac)]Cl σε διαλύματα D₂O, είναι μετατοπισμένες σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με το δ του cis-Pt⁷(Gr^{5'})₂²⁺ [78]. Έτσι, η περισσότερο μετατοπισμένη τιμή βρέθηκε να είναι στα 4.37 ppm. Θεωρώντας ότι αυτή είναι η σωστή τιμή δ_{anti} , υπολογίσαμε το ποσοστό της anti διαμόρφωσης για τα σύμπλοκα του τύπου cis-[(guo)₂Pt(dipeptidester)₂]Cl₂ (Πίνακας 6). Βρέθηκε ότι το ποσοστό της anti διαμόρφωσης είναι για όλα τα σύμπλοκα αυξημένο κατά περίπου 15% σε σχέση με αυτό στην ελεύθερη γουανοσίνη.

2.4.3. Διαμόρφωση γύρω από το δεσμό C_α-C_β των διπεπτιδίων

Αμινοξέα που διαθέτουν ένα άτομο υδρογόνου στο α-άτομο άνθρακα και δυο άτομα υδρογόνου στο β-άτομο άνθρακα μπορούν να βρεθούν σε τρία πιθανά ισομερή εκ περιστροφής γύρω από τον άξονα C_α-C_β: τα g, h και t (Σχήμα 43).



Σχήμα 43: Τα ισομερή εκ περιστροφής γύρω από το δεσμό C_α-C_β.

$$\%gg = \frac{13.7 - \Sigma}{9.7} \times 100 \quad (4), \quad \text{όπου } \Sigma = J_{4'5'} + J_{4'5''}$$

Με βάση τις εξισώσεις αυτές υπολογίστηκαν τα ποσοστά των gg και gt+tg ισομερών για τα σύμπλοκα του τύπου cis-[(guo)₂Pt(dipeptidester)₂]Cl₂ (Πίνακας 6). Το ποσοστό της διαμόρφωσης gg, μειώνεται στα σύμπλοκα αυτά στην τιμή 60% σε σχέση με αυτό της ελεύθερης γουανοσίνης (69%). Εξαιρέση αποτελεί η περίπτωση του συμπλόκου cis-[(guo)₂Pt(glynalOMe)₂]Cl₂, όπου το ποσοστό αυτό είναι 67%. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα είναι παρόμοιο με εκείνο στην περίπτωση των συμπλόκων trans-[(guo)₂Pt(amach)₂]Cl₂ [83] και cis-[(ino)₂Pt(amac)]Cl [82]. Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι το ποσοστό gg βρέθηκε μεγαλύτερο για τα σύμπλοκα trans-[(NH₃)₂Pt(guo)₂]²⁺ από ό,τι για τα cis-[(NH₃)₂Pt(guo)₂]²⁺. Επίσης το ποσοστό αυτό μειώνεται σημαντικά όταν η γουανοσίνη αντιδρά με το ισχυρά καρκινογόνο AAF [294].

(iii) Διαμόρφωση γύρω από τον γλυκοζιτικό δεσμό

Η διαμόρφωση γύρω από τον γλυκοζιτικό δεσμό εξαρτάται από τη σχετική θέση του δακτυλίου του σακχάρου ως προς τη βάση του νουκλεοζίτη. Διακρίνουμε δυο αντίθετες διαμορφώσεις: την anti, όπου ο δακτύλιος της ριβόζης βρίσκεται μακριά από τη νουκλεϊνική βάση και τη syn, όπου ο δακτύλιος του σακχάρου βρίσκεται στο κάτω μέρος της βάσης [301,302] (Σχήμα 42).

Μεταξύ των μορφών anti-syn υπάρχει μια ισορροπία και το ποια θα είναι η επικρατέστερη μορφή εξαρτάται από τον τύπο του νουκλεοζίτη, τη σκελετική διαμόρφωση του σακχάρου, το διαλύτη και το pH του διαλύματος. Η γωνία στροφής X_{CN} παίρνει όλες τις θεωρητικές τιμές και ορίζεται στις πουρίνες σαν η δίεδρη γωνία μεταξύ των

συμπλοκοποίησή του σε μικτά συστήματα, όπου υπάρχει υποκαταστάτης αμινοξύ ή πεπτιδίο. Στην περίπτωση αυτή τίθεται το ερώτημα αν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος και του αρωματικού δακτυλίου του νουκλεοζίτη επηρεάζουν τη διαμόρφωση του σακχάρου. Στα σύμπλοκα του τύπου *cis*-[(guo)₂Pd(amac)Cl] παρατηρήθηκε ελάττωση της ³E διαμόρφωσης του σακχάρου της γουανοσίνης αυξανόμενης της αλειφατικής αλυσίδας του αμινοξέος, από 55% στη γλυκίνη σε 49% στην ισολευκίνη για τον “ανοιχτό” τύπο του συμπλόκου [78]. Κάτι ανάλογο, αλλά σε μικρότερη έκταση παρατηρείται και στα σύμπλοκα του τύπου *cis*-[(ino)₂Pt(amac)]Cl [82], όπου το ποσοστό της ³E διαμόρφωσης κυμαίνεται μεταξύ 50-59 %. Στα *trans* ανάλογα το ποσοστό αυτό είναι ελαφρά μειωμένο σε σχέση με τα *cis*: 47-48% για τα σύμπλοκα του τύπου *trans*-[(guo)₂Pt(amacH)₂]Cl₂ [83] *trans*-[(nucl)₂Pd(dipeptide)₂]Cl₂ [77].

Στα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη υπολογίστηκε το ποσοστό της ³E διαμόρφωσης του νουκλεοζίτη και βρέθηκε ότι η τιμή της είναι σχεδόν σταθερή και ανεξάρτητη από το μέγεθος της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος (~46%). Όπως βέβαια αναμενόταν η τιμή της είναι αυξημένη σε σχέση με αυτή του ελεύθερου υποκαταστάτη σε ποσοστό 8-10 % (Πίνακας 6).

Στα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη το ποσοστό της ³E διαμόρφωσης δεν ήταν δυνατό να υπολογιστεί, λόγω της αλληλεπικάλυψης των σημάτων στα φάσματα των συμπλόκων.

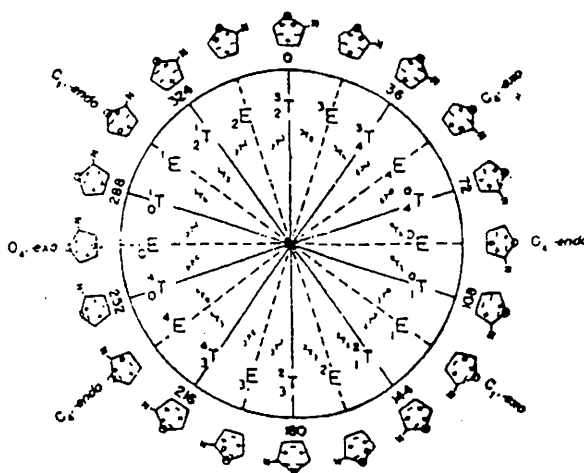
(ii) Διαμόρφωση γύρω από το δεσμό C₄'-C₅'

Εκτός από τη διαμόρφωση του πενταμελούς φουρανοζικού δακτυλίου υπάρχει και άλλη διαμόρφωση πάνω στο δακτύλιο, ιδιαίτερης βιολογικής σημασίας. Είναι η διαμόρφωση γύρω από το δεσμό C₄'-C₅'. Η εξωκυκλική ομάδα -CH₂OH μπορεί να κινείται με μεγάλη ευκολία

τη γνώση της γωνίας στροφής ϕ_{HH} , μεταξύ των δεσμών C-H της ριβόζης και συγκεκριμένα της ισορροπίας ανάμεσα σε δυο κυρίως καταστάσεις, την N [C_3 -endo] και την S [C_2 -endo]. N είναι εκείνες οι διαμορφώσεις που καταλαμβάνουν το βόρειο (north) μισό του κύκλου ψευδοπεριστροφής (Σχήμα 40), ενώ S είναι εκείνες που καταλαμβάνουν το νότιο (south) μισό του ίδιου κύκλου. Η μέθοδος αυτή στηρίχτηκε στον υπολογισμό των γωνιών στροφής ϕ_{HH} από τις σταθερές σύζευξης 3J , σύμφωνα με τις εξισώσεις του Karplus [107] και της Jardetzky [285,286]. Βρέθηκε ότι η σταθερά ισορροπίας των δυο διαμορφώσεων σε διάλυμα είναι [287]:

$$K_{eq} = \frac{X_S}{X_N} = \frac{J_{1'2'}}{J_{3'4'}} \quad (1)$$

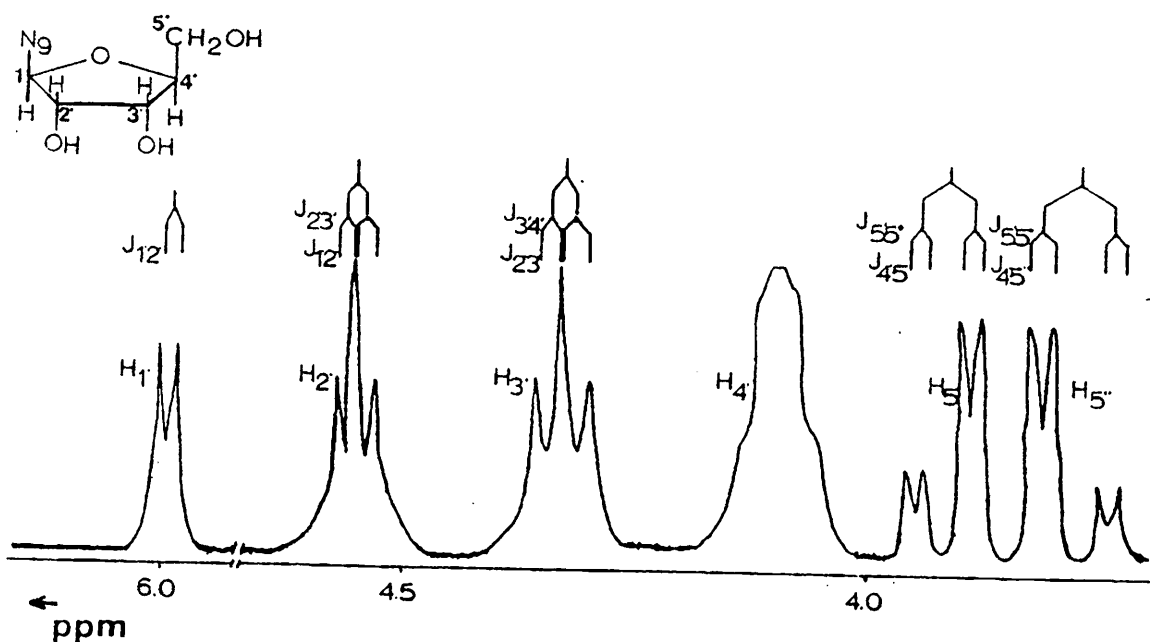
όπου X_S και X_N τα ποσοστά των διαμορφώσεων S και N αντίστοιχα.



Σχήμα 40: Κύκλος ψευδοπεριστροφής των Altona και Sundaralingam.

Η σχέση αυτή εφαρμόστηκε για μια σειρά από νουκλεοζίτες και παράγωγά τους σε συνδυασμό με τεχνική περίθλασης ακτίνων X της δομής τους. Έτσι, από τις τιμές των σταθερών σύζευξης 3J υπολογίστηκαν τα ποσοστά των διαμορφωμάτων τους [287-292].

τα πρωτόνια $H_{2'}$ και $H_{4'}$ και ο υπολογισμός της $J_{3'4'}$ είναι ανάλογος εκείνου της $J_{2'3'}$. Η ταινία συντονισμού του $H_{4'}$ αναμένεται τετραπλή, αλλά αυτό δεν είναι πάντα ευκρινές στα 1H NMR φάσματα που μελετάμε, είτε λόγω της μικρής διαχωριστικής ικανότητας του οργάνου είτε λόγω της αλληλεπικάλυψής της από άλλες ταινίες. Έτσι, όπου χρειαζόταν οι σταθερές σύζευξης $J_{4'5'}$ και $J_{4'5''}$ υπολογίστηκαν από τις ταινίες συντονισμού των πρωτονίων $H_{5'}$ και $H_{5''}$.



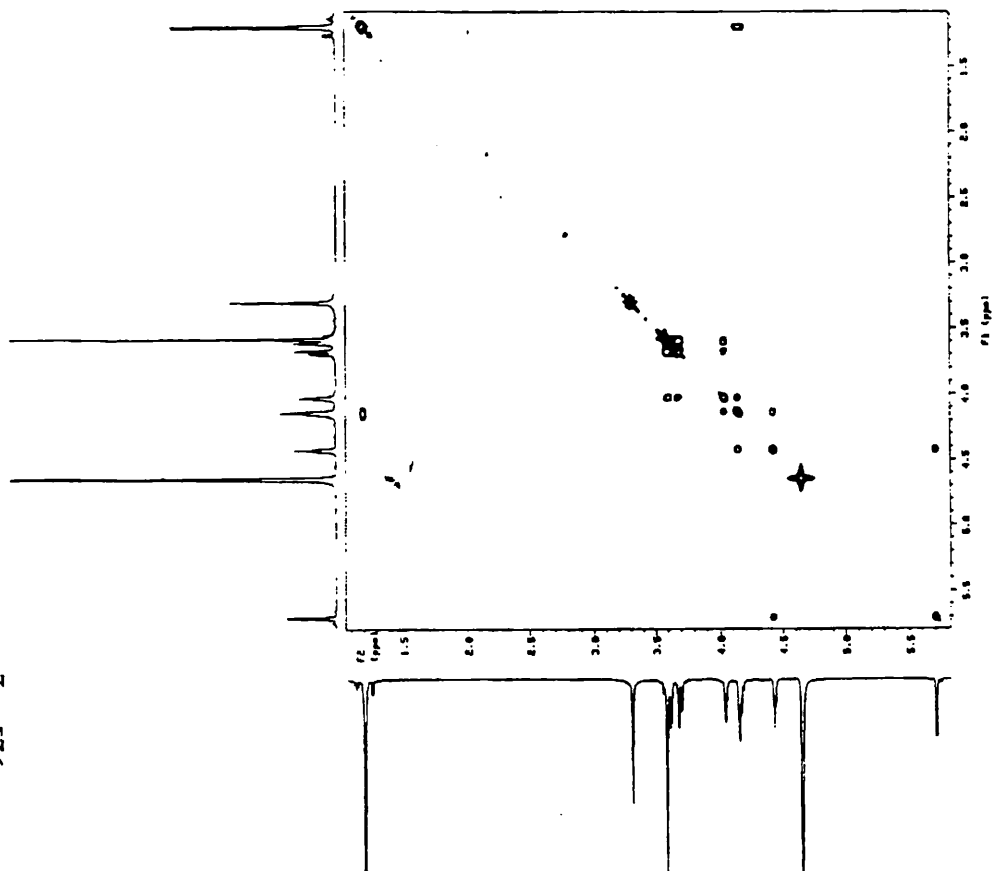
Σχήμα 37: 1H -NMR φάσμα του σακχάρου σε D_2O και σταθερές σύζευξης των πρωτονίων του.

Οι τιμές των σταθερών σύζευξης στα τριαδικά σύμπλοκα, όπου ήταν δυνατό να υπολογιστούν φαίνονται στον Πίνακα 6.

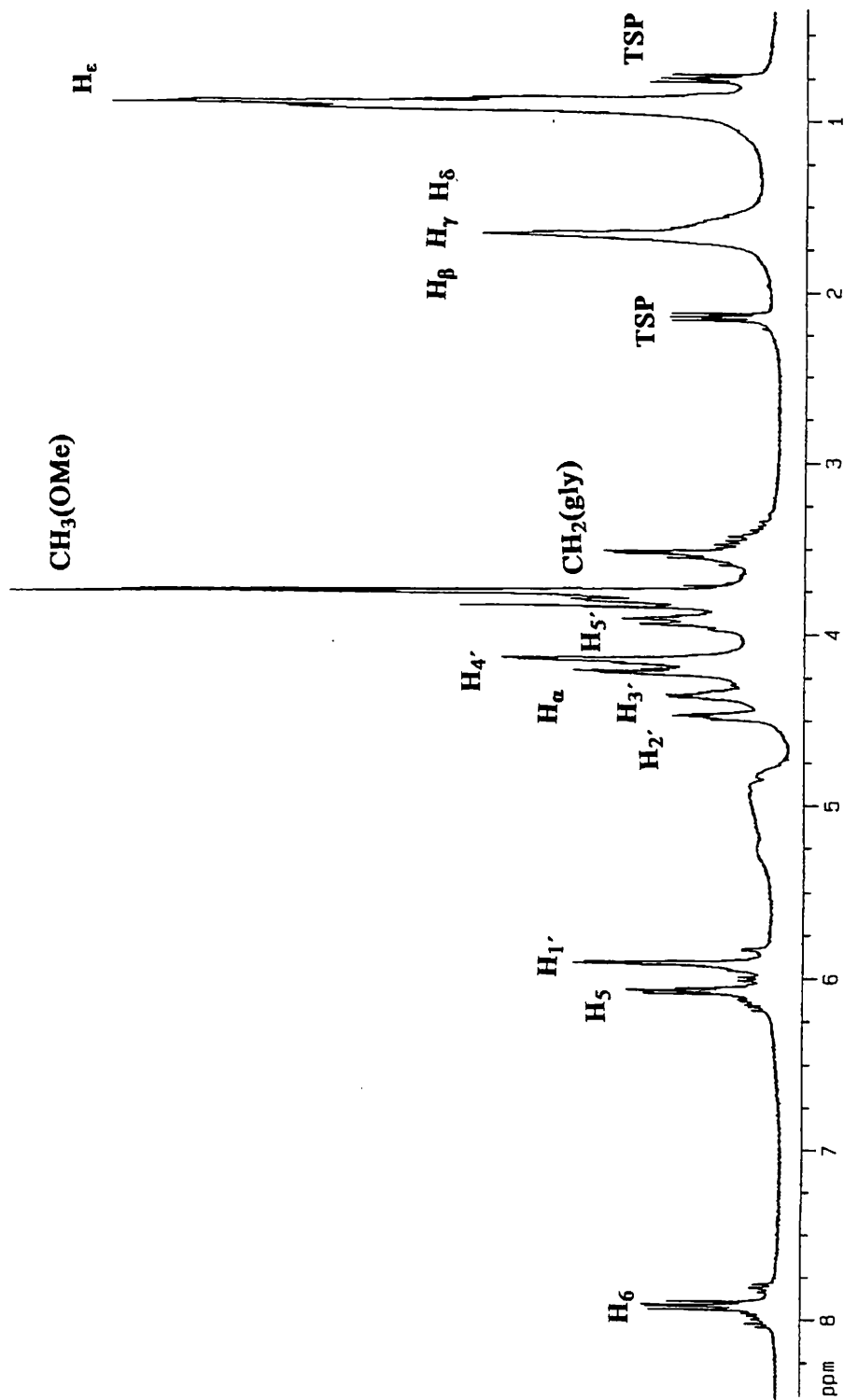
(i) Διαμόρφωση του δακτυλίου της ριβόζης του νουκλεοζίτη

Ο πενταμελής δακτύλιος της ριβόζης μπορεί να έχει τις εξής διαμορφώσεις: τη διαμόρφωση φακέλλου (E, envelope) και τη λικνιζόμενη (T, twisting). Στην πρώτη, τέσσερα άτομα βρίσκονται σε ένα επίπεδο και το πέμπτο άτομο βρίσκεται πάνω ή κάτω από το επίπεδο

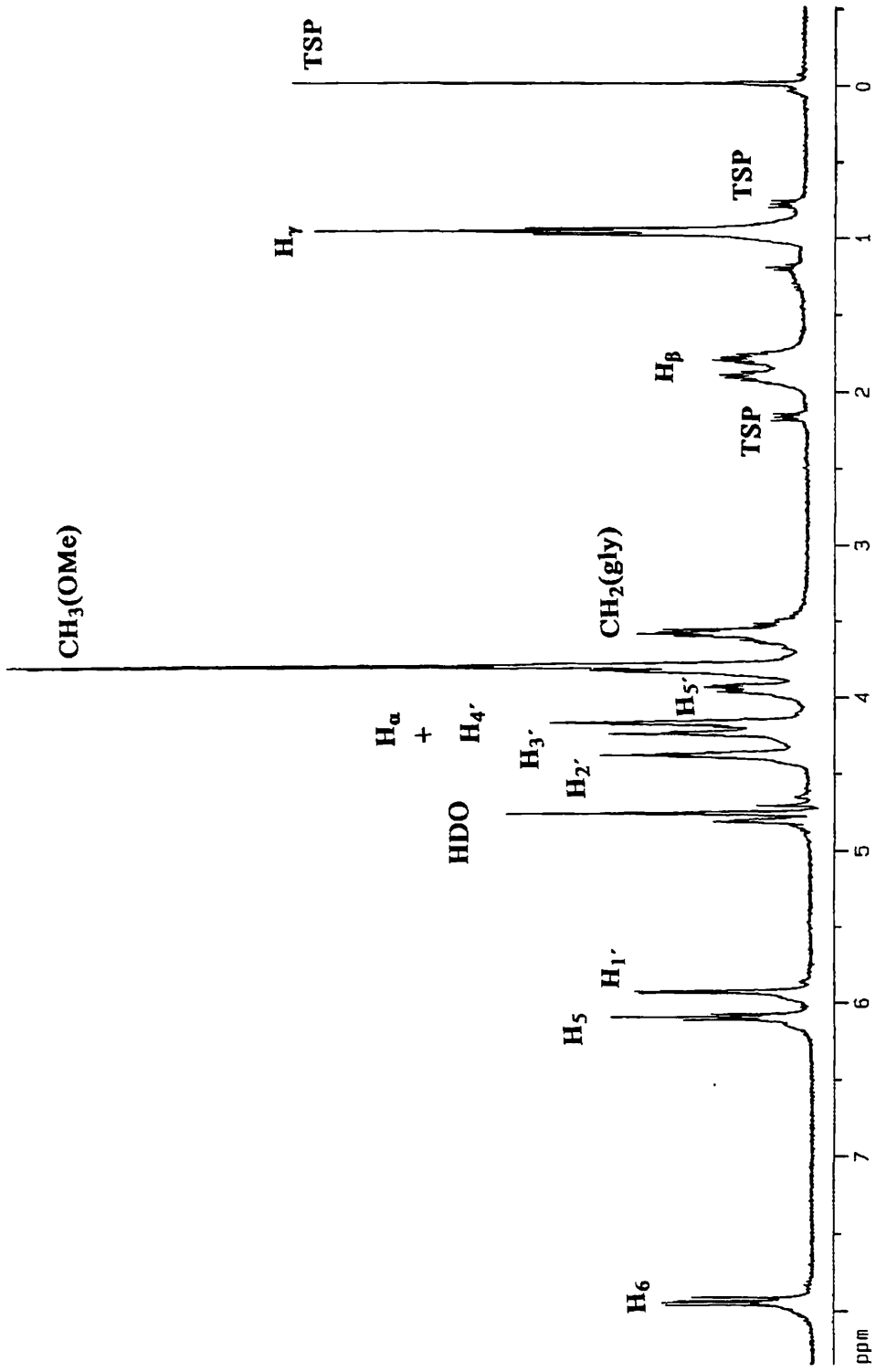
^1H , ^1H COSY NMR φάσμα του $\text{cis-}[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glyalaOMe})_2]\text{Cl}_2$

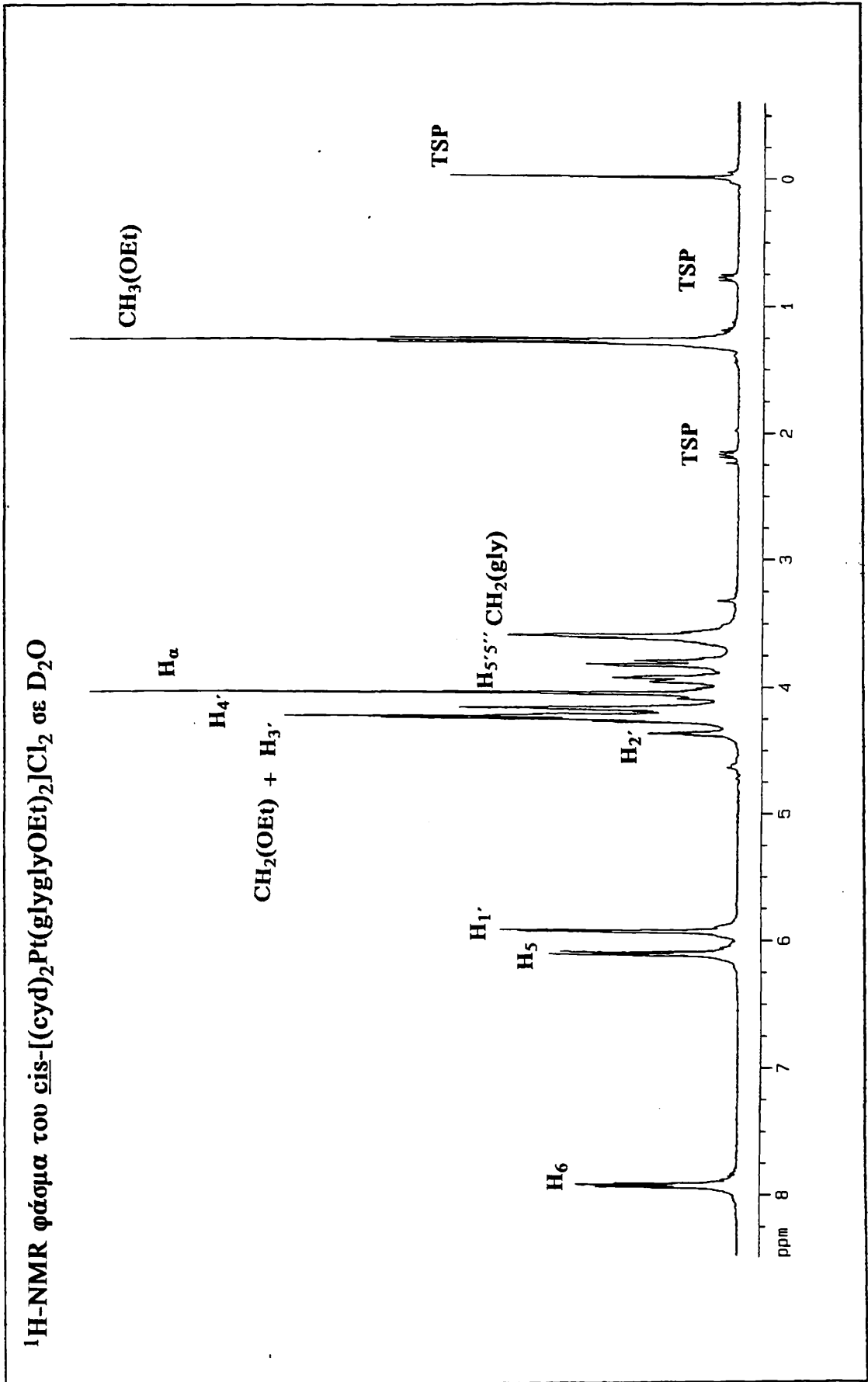


$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του cis- $[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{glynleuOMe})_2]\text{Cl}_2$ σε D_2O

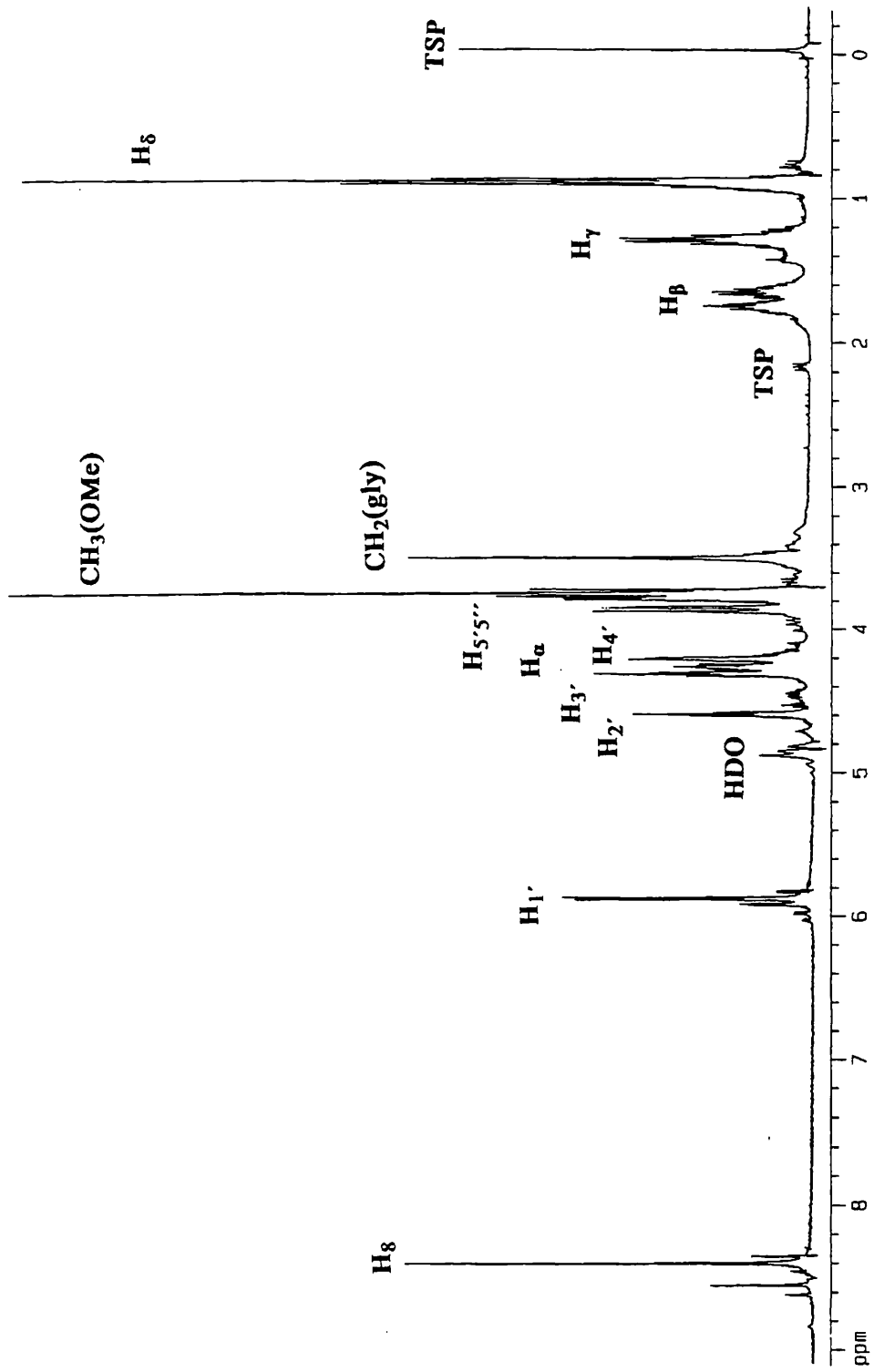


$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του cis- $[(\text{cycd})_2\text{Pt}(\text{gly-2-abaOMe})_2]\text{Cl}_2$ σε D_2O

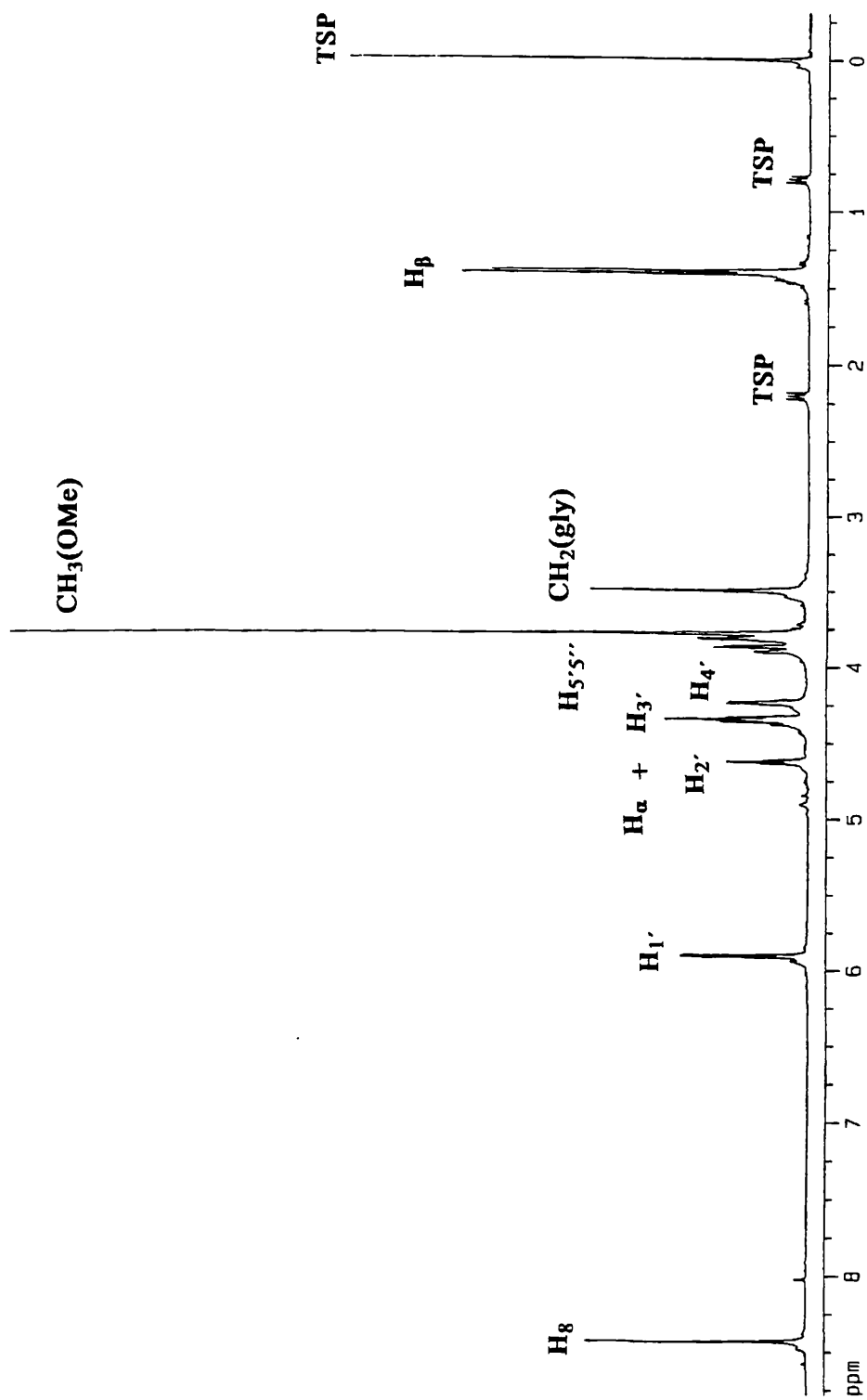


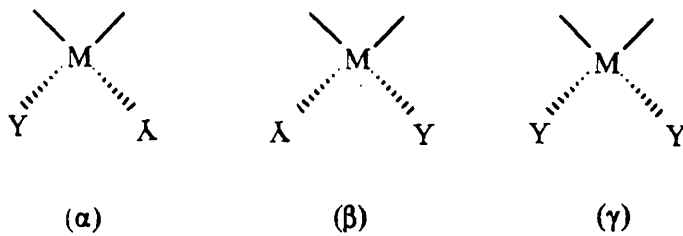


$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glynalOMe})_2]\text{Cl}_2$ σε D_2O



$^1\text{H-NMR}$ φάσμα του *cis*- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glyalaOMe})_2]\text{Cl}_2$ σε D_2O





Σχήμα 36: Ισομερή (α) “κεφαλής προς ουρά”, (β) κεφαλής προς ουρά”, (γ) “κεφαλής προς κεφαλή” (Y=νουκλεοζίτης).

Όπως και στην περίπτωση των τριαδικών συστημάτων με γουανοσίνη και στην περίπτωση αυτών με κυτιδίνη, παρατηρείται η ύπαρξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου της κυτιδίνης και της πλευρικής αλειφατικής αλυσίδας των διπεπτιδίων, οι οποίες και σε αυτή την περίπτωση γενικά μειώνονται καθώς αυξάνεται η απόσταση από το σημείο δεσμού. Η παρατήρηση αυτή στηρίζεται στις μετατοπίσεις των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων των διπεπτιδίων σε υψηλότερες τιμές πεδίου (upfield) στα τριαδικά απ’ό,τι στα δυαδικά συστήματα (Πίνακας 7).

Πίνακας 7: Διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των συμπλόκων.

Πρωτόνια	$\delta_{\text{pept}} - \delta_{\text{bin}}$	$\delta_{\text{bin}} - \delta_{\text{ter(quo)}}$	$\delta_{\text{bin}} - \delta_{\text{ter(cyd)}}$
GlyGlyOEt : CH ₂ (gly)	+0.52	-0.06	-0.16
α-CH	+0.26	-0.13	-0.20
GlyAlaOMe: CH ₂ (gly)	+0.05	+0.13	+0.05
α-CH	-0.17	+0.15	+0.21
β-CH	-0.20	+0.04	-0.01
Gly-2-AbuOMe: CH ₂ (gly)	+0.06	+0.11	+0.05
α-CH	-0.17	+0.13	+0.22
β-CH	-0.20	+0.07	-0.01
γ-CH	-0.21	+0.03	+0.01
Gly _n ValOMe: CH ₂ (gly)	+0.06	+0.11	+0.04
α-CH	-0.19	+0.19	+0.20
β-CH	-0.22	+0.08	0
γ-CH	-0.25	+0.13	+0.02
δ-CH	-0.21	+0.02	-0.03
Gly _n LeuOMe: CH ₂ (gly)	+0.05	+0.10	+0.12
α-CH	-0.19	+0.18	+0.26
β-CH	---	-0.16	-0.06
γ-CH	-0.03	+0.28	-0.06
δ-CH	-0.25	+0.11	-0.23
ε-CH	-0.21	+0.03	+0.01

Πίνακας 5: Χημικές μετατοπίσεις, δ (ppm), των πρωτονίων των $^1\text{H-NMR}$ φασμάτων των εστέρων των διπεπτιδίων και των δυαδικών και τριαδικών συμπλόκων τους (Διαλύματα 10^{-2} M σε D_2O (TSP)).

Ένωση	H_8	H_6	H_5	$\text{CH}_2(\text{gly})$	H_α	H_β	H_γ	H_δ	H_ϵ	CH_3 (OMe)
HCl.GlyGlyOEt				3.98(s)	4.13(s)					
cis- $\text{Cl}_2\text{Pt}(\text{GlyGIOEt})_2$				3.46(s)	3.87(s)					
cis- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{GlyGlyOEt})_2]\text{Cl}_2$	8.42			3.52(s)	4.00(s)					
cis- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{GlyGlyOEt})_2]\text{Cl}_2$		7.95, 7.94 7.93, 7.92	6.13, 6.11	3.62(t)	4.07(s)					
HCl.GlyAlaOMe				3.67(s)	4.30(q)	1.24(d)				3.58(s)
cis- $\text{Cl}_2\text{Pt}(\text{GlyAlaOMe})_2$				3.62(s)	4.47(q)	1.44(d)				3.77(s)
cis- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{GlyAlaOMe})_2]\text{Cl}_2$	8.43			3.49(s)	4.32(q)	1.40(d)				3.78(s)
cis- $[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{GlyAlaOMe})_2]\text{Cl}_2$		7.97, 7.95 7.94, 7.92	6.14, 6.13 6.12, 6.11	3.57(t)	4.26(q)	1.45(d)				3.82(s)
HCl.Gly-2-AbaOMe				3.69(s)	4.22(q)	1.65(m)	0.75(t)			3.58(s)
cis- $\text{Cl}_2\text{Pt}(\text{Gly-2-AbaOMe})_2$				3.63(s)	4.39(q)	1.85(m)	0.94(t)			3.77(s)
cis- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{Gly-2-AbaOMe})_2]\text{Cl}_2$	8.42			3.52(s)	4.26(m)	1.78(m)	0.91(t)			3.78(s)
cis- $[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{Gly-2-AbaOMe})_2]\text{Cl}_2$		7.96, 7.95 7.93, 7.91	6.11, 6.10 6.08	3.58(q)	4.17(m)	1.86(m)	0.93(t)			3.81(d)
HCl.Gly-nValOMe				3.69(s)	4.28(q)	1.60(m)	1.19(m)	0.73(t)		3.59(s)
cis- $\text{Cl}_2\text{Pt}(\text{GlyValOMe})_2$				3.63(s)	4.47(q)	1.82(m)	1.44(m)	0.94(t)		3.79(s)
cis- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{GlyValOMe})_2]\text{Cl}_2$	8.42			3.52(s)	4.28(q)	1.74(m)	1.31(m)	0.92(t)		3.77(s)
cis- $[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{GlyValOMe})_2]\text{Cl}_2$		7.98, 7.96 7.95, 7.88	6.15, 6.14 6.13, 6.11	3.59(t)	4.27(t)	1.82(m)	1.42(m)	0.97(t)		3.83(d)
HCl.GlyLeuOMe				3.68(s)	4.27(q)	-----				3.58(s)
cis- $\text{Cl}_2\text{Pt}(\text{GlyLeuOMe})_2$				3.63(s)	4.46(q)	1.60(m)	1.60(m)	1.43(m)	0.92(s)	3.77(s)
cis- $[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{GlyLeuOMe})_2]\text{Cl}_2$	8.43			3.53(s)	4.28(m)	1.76(m)	1.32(m)	1.32(m)	0.89(t)	3.78(s)
cis- $[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{GlyLeuOMe})_2]\text{Cl}_2$		7.92, 7.90 7.89, 7.88	6.08, 6.06 6.04	3.51(d)	4.20(t)	1.66(m)	1.66(m)	1.66(m)	0.91(t)	3.76(d)

s: απλή, d: διπλή, t: τριπλή, q: τετραπλή, m: πολλαπλή.

Επίσης, στα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη παρατηρούμε μια μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων της γλυκίνης ($-CH_2-$), καθώς και των α -πρωτονίων του δεύτερου αμινοξέος κάθε διπεπτιδίου, σε υψηλότερες τιμές πεδίου (upfield) κατά 0.1-0.2 ppm σε σχέση με τα δυαδικά σύμπλοκα, εκτός από την περίπτωση του συμπλόκου με το GlyGlyOEt (Πίνακας 7). Και τα υπόλοιπα πρωτόνια των διπεπτιδίων δίνουν επίσης σήματα μετατοπισμένα upfield, αλλά σε μικρότερη έκταση. Μάλιστα, η έκταση του φαινομένου αυτού μειώνεται καθώς αυξάνεται η απόστασή τους από το σημείο δεσμού και φτάνει να έχει μηδενική τιμή για τα πρωτόνια της τελικής μεθυλομάδας ($-CH_3$). Το φαινόμενο αυτό είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου της γουανοσίνης και της αλειφατικής αλυσίδας των διπεπτιδίων και έχει παρατηρηθεί και στο παρελθόν σε ανάλογα τριαδικά σύμπλοκα [77,78,86,88]. Το συγκεκριμένο σύστημα είναι ανάλογο του συστήματος trans- $[(\text{nucl})_2\text{Pd}(\text{dipeptide})_2]\text{Cl}_2$ [77], όπου οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών επίσης μειώνονται με την αύξηση της απόστασης από το σημείο δεσμού.

(ii) Τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη

Στα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των τριαδικών συμπλόκων με κυτιδίνη παρατηρείται μετατόπιση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων H6 και H5 προς μικρότερες τιμές πεδίου (downfield) κατά 0.5-0.1 ppm, ενδεικτικό της συμπλοκοποίησης του Pt(II) μέσω του αζώτου N3 [243,277-279].

Στα τριαδικά αυτά σύμπλοκα, αντίθετα με ό,τι παρατηρήθηκε στα αντίστοιχα με γουανοσίνη, παρατηρούμε ότι η διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο σήμα των H6 πρωτονίων της ελεύθερης κυτιδίνης, εμφανίζεται ως δύο ομάδες διπλών κορυφών ίδιας περίπου έντασης. Το ίδιο συμβαίνει και με το σήμα των πρωτονίων H5, το οποίο εκτός από

2.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων (¹H-NMR)

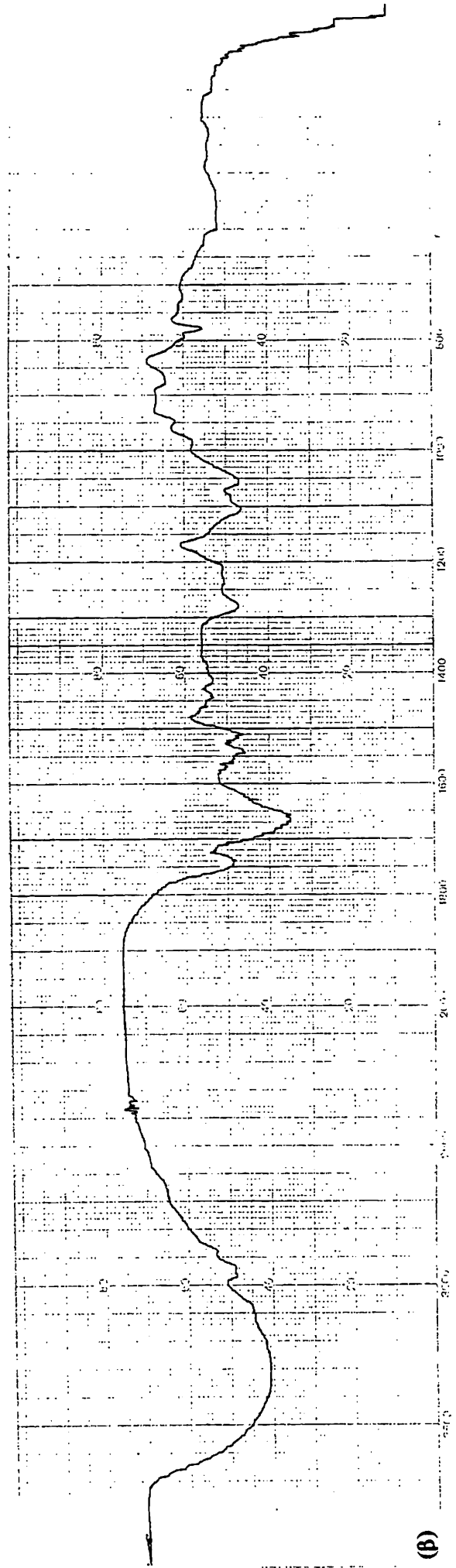
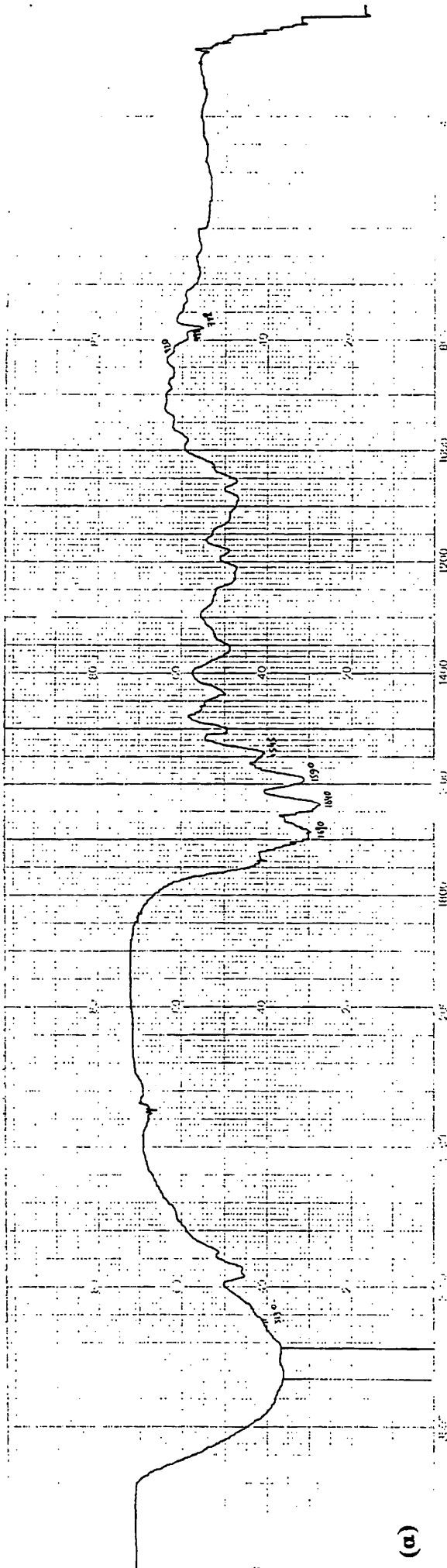
Τα φάσματα ¹H-NMR των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν, ελήφθησαν σε D₂O (συγκέντρωση 10⁻² M) και φαίνονται στις σελίδες 107-118. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ, ppm) και οι σταθερές σύζευξης (J, Hz) των πρωτονίων των συμπλόκων δίνονται στους Πίνακες 5 και 6. Η απόδοση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων έγινε σε μερικές περιπτώσεις με τη βοήθεια φασματοσκοπίας δύο διαστάσεων ¹H, ¹H COSY.

Η φασματοσκοπία ¹H-NMR πέρα από τον βασικό της ρόλο που είναι η ταυτοποίηση του προϊόντος και ο έλεγχος της καθαρότητάς του, αποτελεί ένα σπουδαίο εργαλείο για την ανίχνευση και ποσοτική μελέτη αλληλεπιδράσεων υποκαταστατών σε τριαδικά σύμπλοκα. Επίσης παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικές με τη διαμόρφωση των μορίων στο διάλυμα. Οι πληροφορίες που μας έδωσαν τα φάσματα ¹H-NMR των νέων συμπλόκων, παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια.

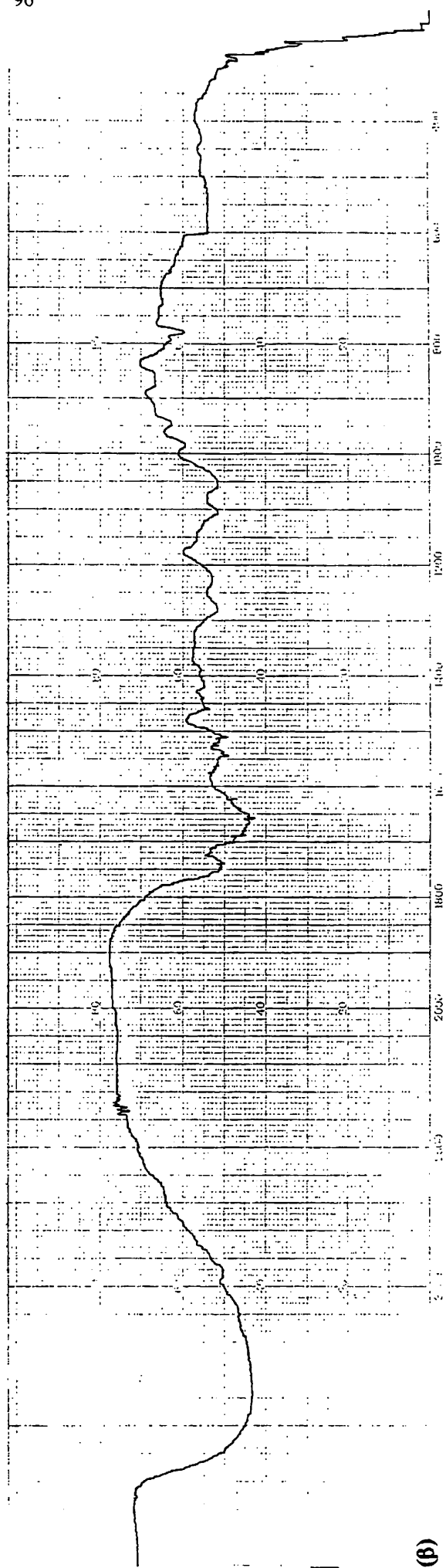
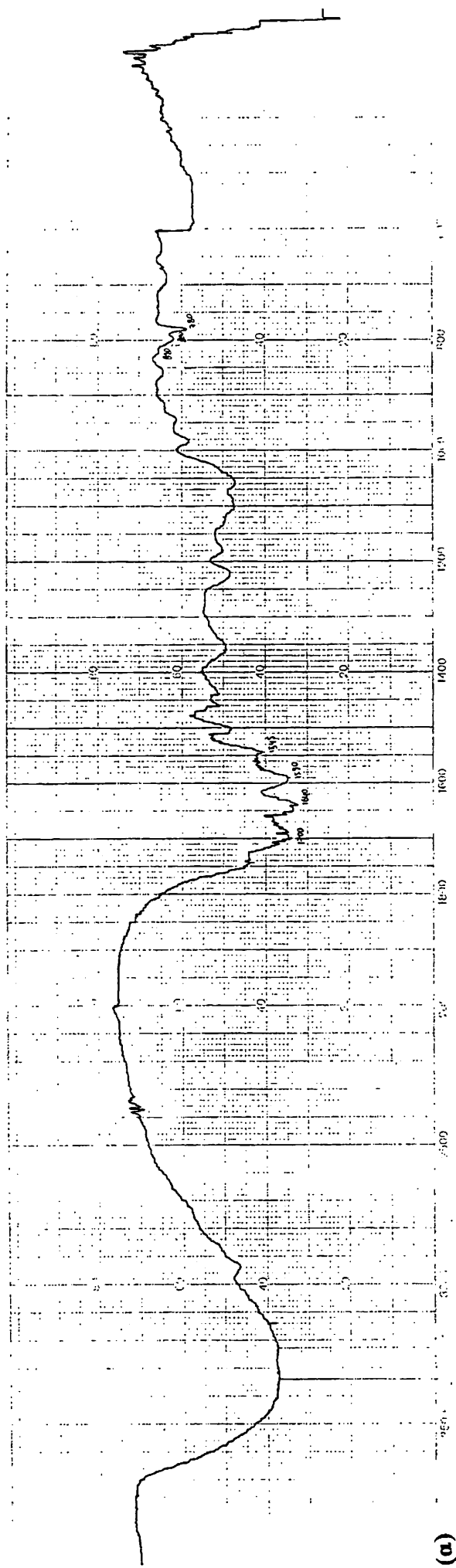
2.4.1. Θέσεις δεσμού των υποκαταστατών

(i) Τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη

Σε όλα τα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη παρατηρείται μια μετατόπιση του σήματος του πρωτονίου H8 σε χαμηλότερα πεδία (downfield) κατά 0.45 ppm, σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη. Η παρατήρηση αυτή είναι ενδεικτική του δεσμού του μετάλλου με το άζωτο N7 του δακτυλίου της πουρίνης [80,266-269]. Αυτό συμβαίνει γιατί σκελετικά πρωτόνια που βρίσκονται κοντά σε θέσεις δεσμού ή πρωτονίωσης είναι συνήθως εκείνα που επηρεάζονται περισσότερο με τη συμπλοκοποίηση ή την πρωτονίωση. Η μετατόπιση στη συγκεκριμένη περίπτωση προς χαμηλότερα πεδία, συμβαίνει λόγω



IR φάσματα των συμπλόκων: (α) $\text{cis-}[(\text{guo})_2\text{Pt}(\text{glynaIOMe})_2]\text{Cl}_2$ και (β) $\text{cis-}[(\text{cyd})_2\text{Pt}(\text{glynaIOMe})_2]\text{Cl}_2$



IR φάσματα των συμπλόκων: (α) $\text{cis-[Pt(glyalaOMe)}_2\text{]Cl}_2$ και (β) $\text{cis-[(cyd)}_2\text{Pt(glyalaOMe)}_2\text{]Cl}_2$

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικές IR ταινίες των συμπλόκων (cm⁻¹)

Σύμπλοκα	$\nu(\text{C}=\text{O})$ Ester	$\nu(\text{C}=\text{O})$ nucl + δNH_2 nucl	$\nu(\text{C}=\text{O})$ Amide	δNH_2 , $\delta(\text{NH})_{\text{amide}}$	Sugar conformation	Pt-Cl
cis-Cl₂Pt(glyglyOEt)₂	1745(s) 1732(s)		1683(s) 1654(s)	1595(m) 1562(m) 1532(s) 1570(s) 1545 (s) 1550(s,br) 1540(s,br) 1550(s,br) 1589(s) 1541(m) 1590(s,br) 1545(m) 1590(s,br) 1540(m) 1590(s,br) 1545(m) 1590(s,br) 1545(m)		330(m) 320(m)
cis-Cl₂Pt(glyalaOMe)₂	1745(s,br)		1655(s)	1570(s) 1545 (s) 1550(s,br)		340(s,br)
cis-Cl₂Pt(gly-2-abaOMe)₂	1740(s) 1730(s)		1660(s)	1550(s,br)		328(m) 318(m)
cis-Cl₂Pt(glylnalOMe)₂	1745(s,br)		1660(s,br)	1540(s,br)		330(sh) 322(m)
cis-Cl₂Pt(glylnleuOMe)₂	1745(s,br)		1670(s,br)	1550(s,br)		332(m) 325(m)
cis-[(guo)₂Pt(glyglyOEt)₂]Cl₂	1733(m)	1691(s) (1660 ^o)	1635(s)	1589(s)	833(sh) 797(w)	
cis-[(guo)₂Pt(glyalaOMe)₂]Cl₂	1745(w,br)	1700(s,br) (1660 ^o)	1640(s,br)	1541(m) 1590(s,br)	820(sh) 800(w)	
cis-[(guo)₂Pt(gly-2-abaOMe)₂](NO₃)₂	1740(w,br)	1700(s,br)	1640(s,br)	1545(m) 1590(s,br)	825(w) 800(w)	
cis-[(guo)₂Pt(glylnalOMe)₂]Cl₂	1740(w,br)	1690(s,br)	1640(s,br)	1540(m) 1590(s,br)	826(sh) 798(w)	
cis-[(guo)₂Pt(glylnleuOMe)₂](NO₃)₂	1745(w,br)	1700(s,br)	1640(s,br)	1545(m) 1590(s,br)	825(w) 800(w,br)	
Guo				1545(m)		
cis-[(cyd)₂Pt(glyglyOEt)₂]Cl₂	1738(m)	1730(s) 1656(s) (1630 ^o)	1645(s,br) 1615(sh)	1637(m) 1535(m) 1560(sh)	824(m) 801(w)	
cis-[(cyd)₂Pt(glyalaOMe)₂]Cl₂	1745(m,br)	1670(s,br) (1630 ^o)	1625(sh)	1545(m) 1565(sh)		
cis-[(oyd)₂Pt(gly-2-abuOMe)₂]Cl₂	1745(m,br)	1668(s,br)	1630(sh)	1545(m) 1564(sh)		
cis-[(cyd)₂Pt(glylnalOMe)₂]Cl₂	1745(m,br)	1665(s,br)	1630(sh)	1545(m)		
cis-[(cyd)₂Pt(glylnleuOMe)₂]Cl₂	1740(m,br)	1665(s,br)	1620(sh)	1540(m) 1560(sh) 1543(m)		
Cyd		1653(s)				

α: Δευτεριωμένα σύμπλοκα

των αρωματικών και αλειφατικών CH ομάδων των νουκλεοζιτών και των αμινοξέων [256]. Η αλληλεπικάλυψη των ταινιών αυτών καθιστά αδύνατη την απόδοσή τους σε συγκεκριμένη ομάδα.

Στην περιοχή $1800-1000\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται ταινίες, οι οποίες είναι χρήσιμες στην εξαγωγή συμπερασμάτων για τον τρόπο δέσμευσης των υποκαταστατών. Η απόδοση των ταινιών έγινε με βάση κυρίως βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς και με πειράματα δευτερίωσης. Και σε αυτή την περιοχή βέβαια τα φάσματα των τριαδικών συμπλόκων και κυρίως αυτών με κυτιδίνη εμφανίζουν ευρείες και αλληλοεπικαλυπτόμενες ταινίες, μικρής γενικά έντασης, που δεν επιτρέπουν την αναλυτική τους μελέτη.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά στον τρόπο συμπλοκοποίησης των διπεπτιδίων, έχουμε να παρατηρήσουμε τα εξής: Μονοδοντική ένταξη μέσω της -NH_2 ομάδας έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατόπιση της ταινίας κάμψης $\delta(\text{NH}_2)$ σε περιοχή $<1600\text{ cm}^{-1}$ [221,257], την παρουσία της ταινίας του αμιδίου $\delta(\text{NH})$ γύρω στα 1550 cm^{-1} [221,257] και την παρουσία της ταινίας της εστερικής ομάδας $\nu(\text{C=O})$ στα 1745 cm^{-1} περίπου, όπως στους ελεύθερους εστέρες των διπεπτιδίων. Απουσία της ταινίας στα 1550 cm^{-1} περίπου, σημαίνει αποπρωτονίωση του αμιδικού αζώτου [258] και πιθανόν και σύνταξη αυτού με το μέταλλο. Πραγματικά, στα τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη, η ταινία $\delta(\text{NH}_2)$ του πεπτιδίου εμφανίζεται στα 1590 cm^{-1} , η ταινία $\delta(\text{NH})$ του αμιδίου στα 1545 cm^{-1} περίπου και η ταινία $\nu(\text{C=O})$ της εστερικής ομάδας γύρω στα 1740 cm^{-1} . Στα τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη οι παραπάνω ταινίες εμφανίζονται στα 1565 , 1545 και 1745 cm^{-1} περίπου αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας την μονοδοντική ένταξη των διπεπτιδίων μέσω της τελικής τους αμινομάδας.

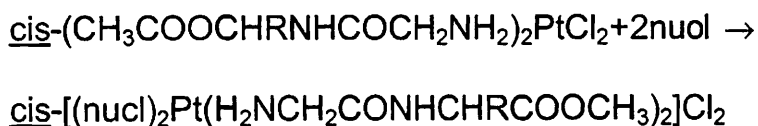
Η εμφάνιση της ταινίας στα 1700 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης της εξωκυκλικής C=O ομάδας της γουανοσίνης, επιβεβαιώνει τη συμπλοκοποίηση μέσω του ατόμου N7. Η ταινία αυτή εμφανίζεται στα 1730 cm^{-1} για το ελεύθερο υποκαταστάτη [259] και

και σίγουρα δεν ευσταθεί στην περίπτωση ουδέτερων υδατικών διαλυμάτων [240].

Για την κυτιδίνη/κυτοσίνη η συνήθης θέση δεσμού με το λευκόχρυσο(II) είναι το άζωτο N3 ($pK_a(N3)=4.2$), όπως διαπιστώθηκε με ποικιλία μεθόδων, όπως με φασματοσκοπία UV συναρτήσεως του pH [241], φασματοσκοπία ^1H-NMR [242], $^{13}C-NMR$ [243], $^{15}N-NMR$ [244], Raman φασματοσκοπία [243] και κυρίως με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Τα περισσότερα σύμπλοκα του λευκοχρύσου με νουκλεοβάσεις που έχουν χαρακτηριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X είναι σύμπλοκα κυτοσίνης [234,245-249]. Σε καμιά περίπτωση δεν παρατηρήθηκε συμπλοκοποίηση με το γειτονικό οξυγόνο O2. Συμπλοκοποίηση του λευκοχρύσου(II) με το N3 και με το N1 παρατηρήθηκε με φασματοσκοπία ^1H-NMR κατά την αντίδραση του $[(NH_3)_3Pt(C-N3)]^{2+}$ με περίσσεια $\{(dien)Pt(II)\}$ [250]. Επίσης έχει παρατηρηθεί ταυτόχρονη συμπλοκοποίηση με τα N3 και N4 ($pK_a(N(4)H_2)=16.97$ [251]) σε δύο περιπτώσεις, είτε με σχηματισμό γέφυρας είτε με σχηματισμό χηλικού συμπλόκου [252,253], όπου οι συνθήκες δεν ήταν αλκαλικές, αλλά μάλλον ουδέτερες έως ελαφρά όξινες.

2.2. Σύνθεση των τριαδικών συμπλόκων

Η γενική πορεία σύνθεσης των τριαδικών συμπλόκων συνοψίζεται στο παρακάτω σχήμα:

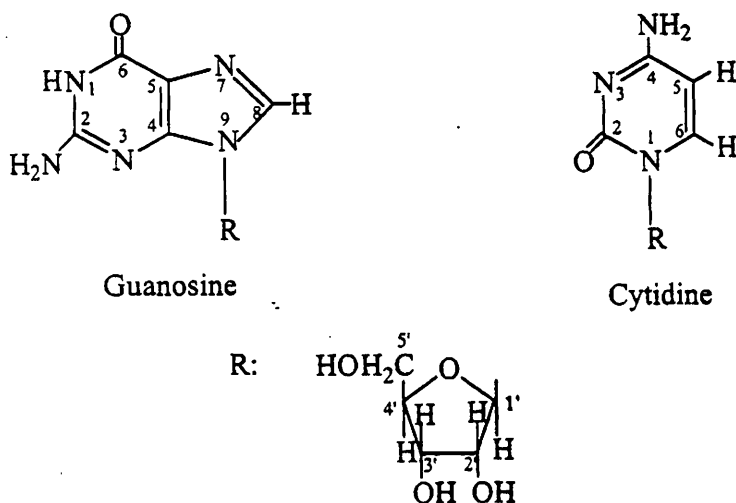


Απομονώθηκαν δέκα τριαδικά σύμπλοκα με τη μορφή άσπρης σκόνης, ύστερα από υγρή χρωματογραφία (Sephadex G-15) και εξάτμιση του διαλύτη. Η μοριακή αγωγιμότητα σε υδατικά διαλύματα,

2. ΤΡΙΑΔΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΛΕΥΚΟΧΡΥΣΘΥ(II) ΜΕ ΤΟΥΣ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΓΟΥΑΝΟΣΙΝΗ ΚΑΙ ΚΥΤΙΔΙΝΗ ΚΑΙ ΔΙΠΕΠΤΙΔΕΣΤΕΡΕΣ

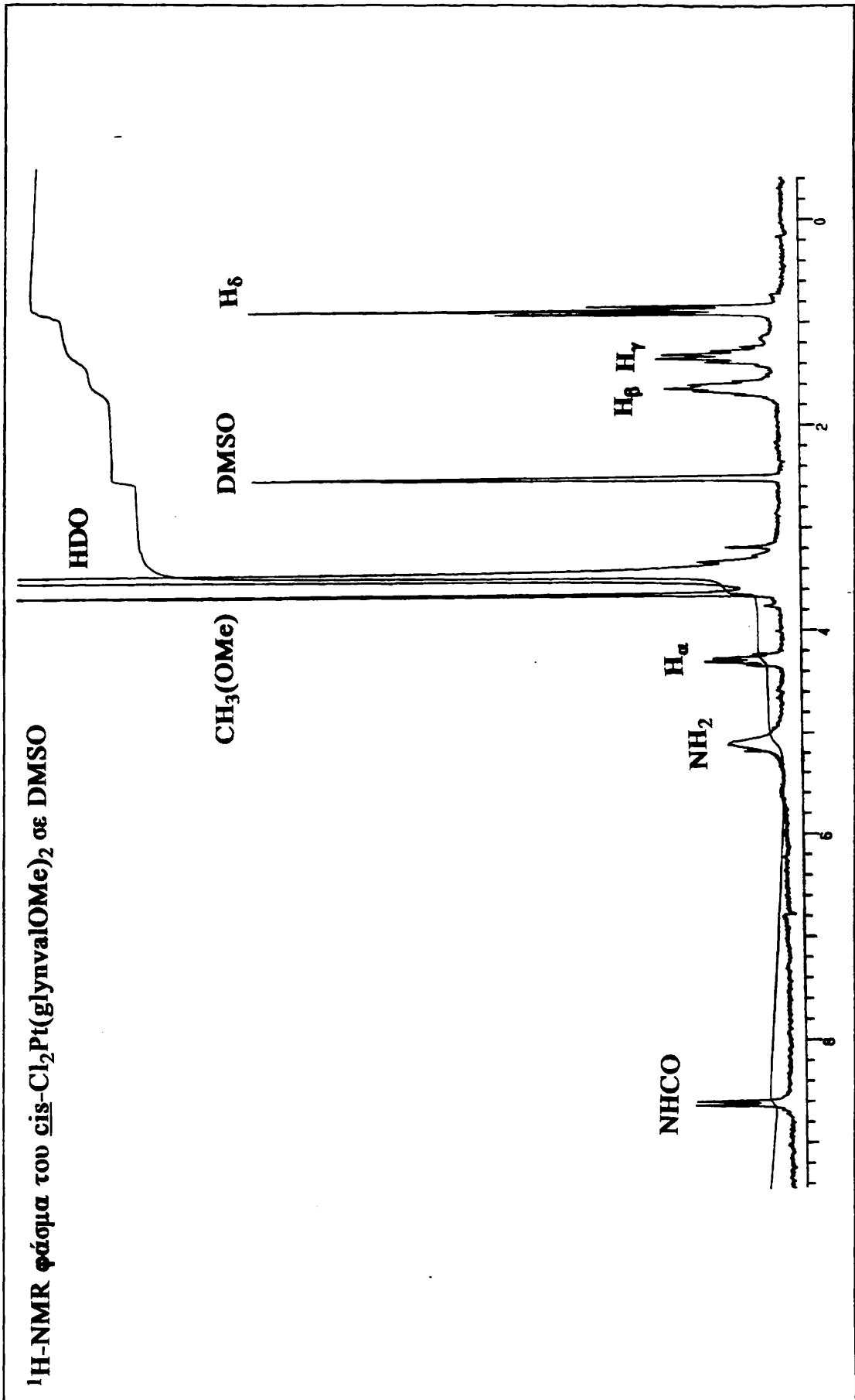
2.1. Εισαγωγή

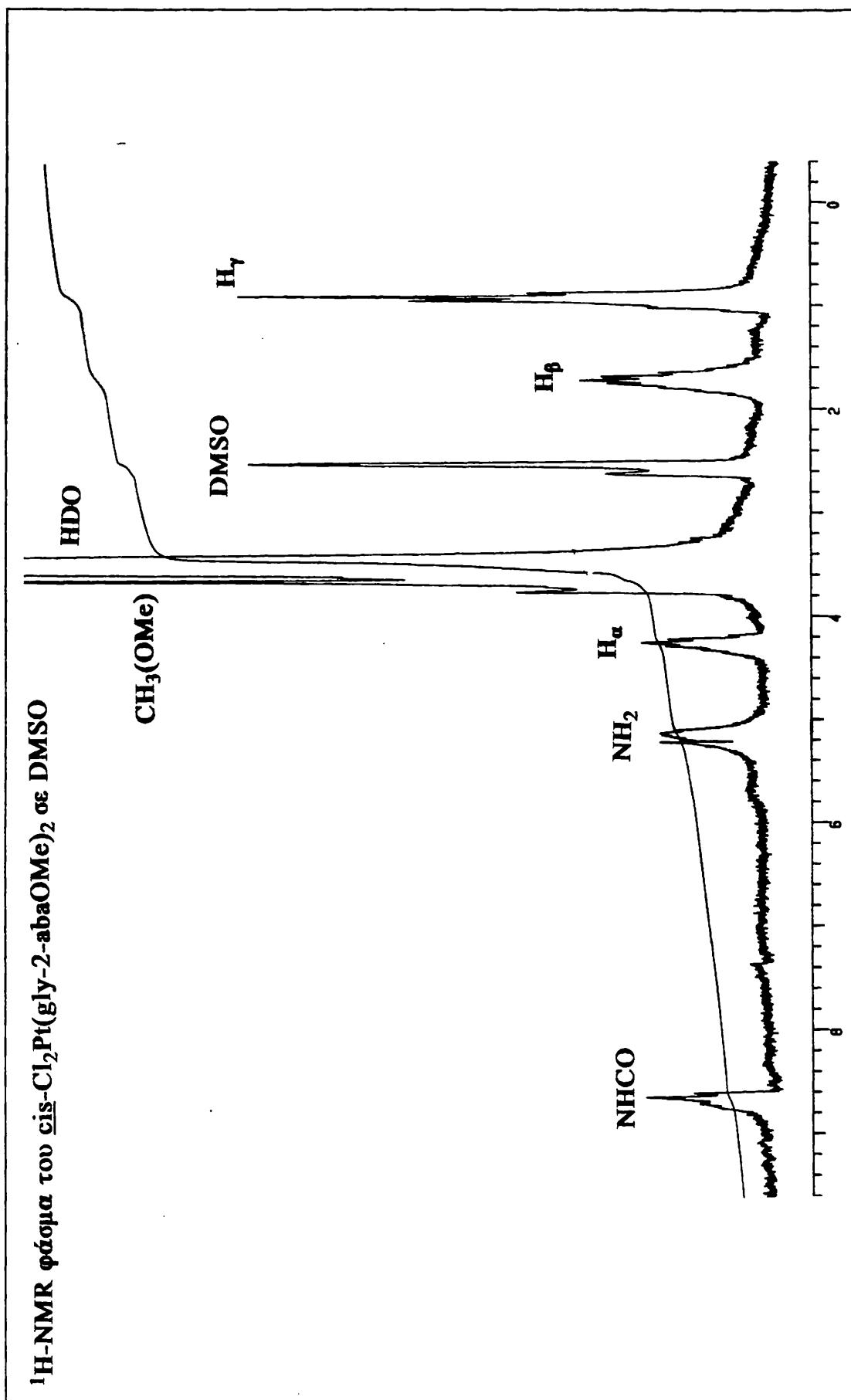
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι μελέτες οι σχετικές με τριαδικά συστήματα λευκοχρύσου (II), ως μοντέλων της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-Pt-DNA, είναι περιορισμένες στον αριθμό [65,66]. Ακόμα πιο περιορισμένες είναι αυτές, που αναφέρονται σε τριαδικά συστήματα στα οποία συμμετέχουν νουκλεοζίτες και όχι νουκλεοβάσεις ή υποκατεστημένες νουκλεοβάσεις. Στα τριαδικά σύμπλοκα που παρασκευάσαμε συμμετέχουν οι νουκλεοζίτες γουανοσίνη (Guo) και κυτιδίνη (Cyd), οι μοριακοί τύποι καθώς και η αρίθμηση των ατόμων των οποίων φαίνονται στο Σχήμα 35.

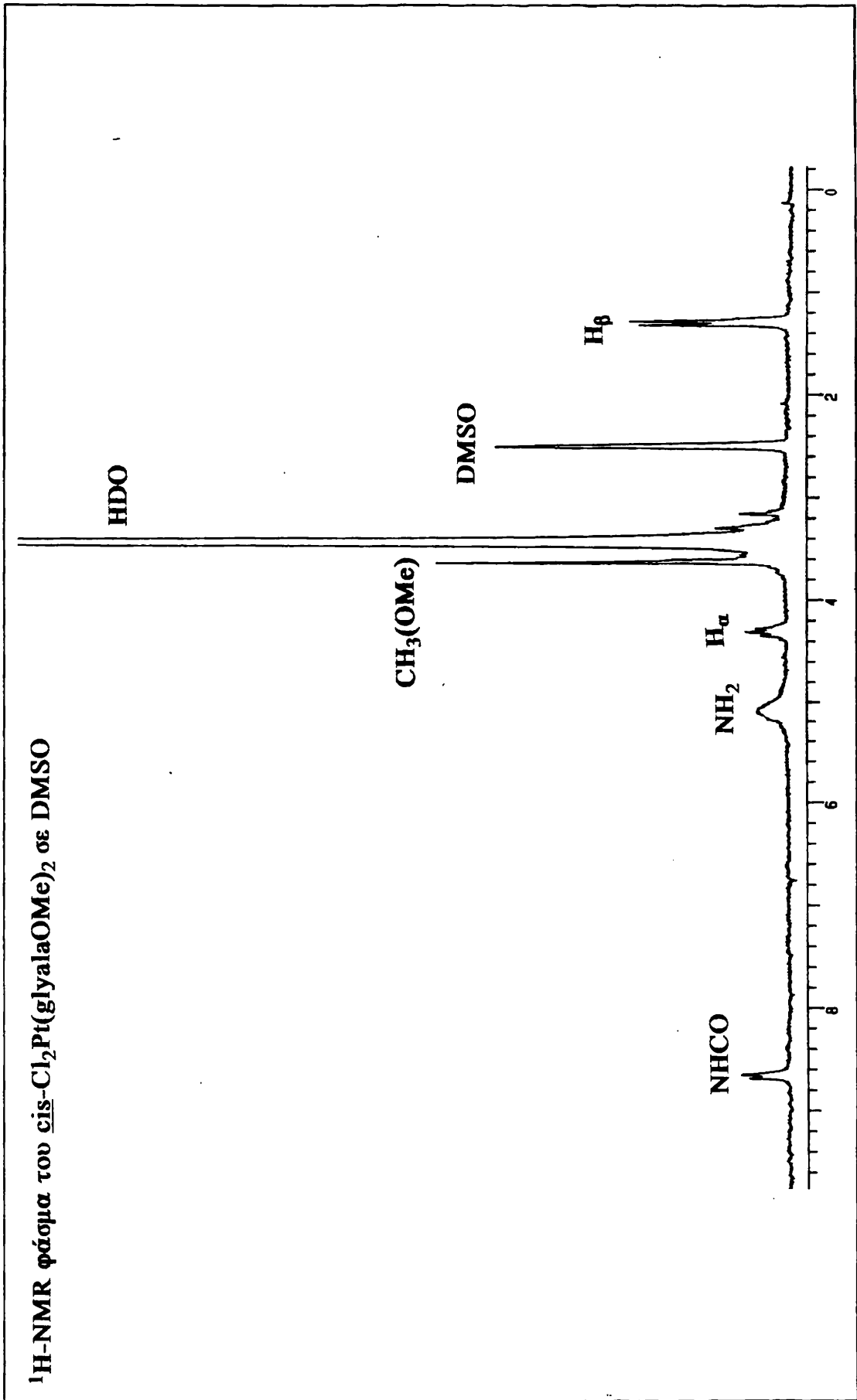


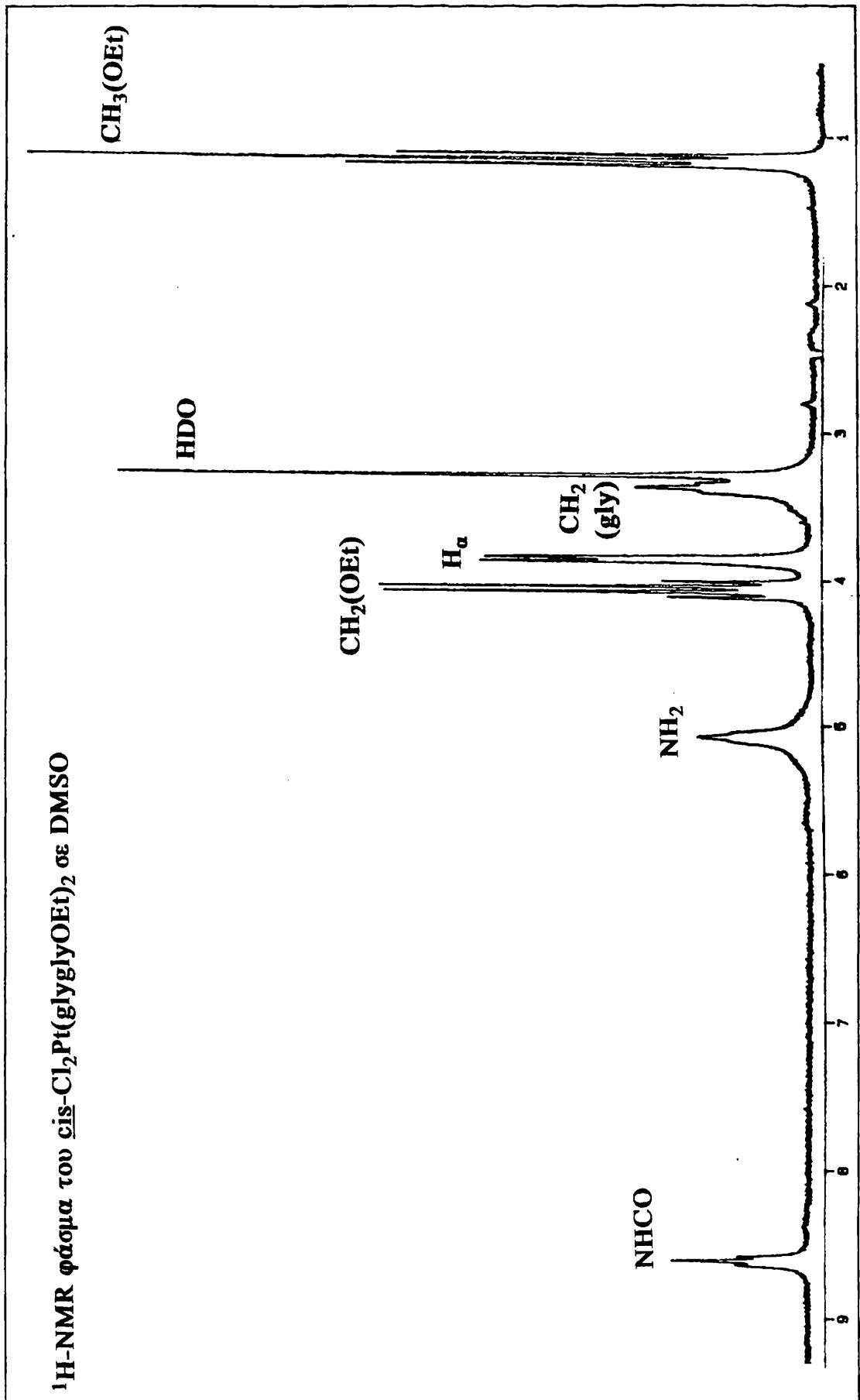
Σχήμα 35: Μοριακοί τύποι Γουανοσίνης (Guanosine) και Κυτιδίνης (Cytidine)

Η γουανοσίνη αποτελείται από μια πουρινική βάση, ενώ αντίθετα η κυτιδίνη από μια πυριμιδινική. Η πιθανότητα ταυτομερισμού για τις









Πίνακας 2: Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των εστέρων των διπεπτιδίων, στην υδροχλωρική τους μορφή και στα διαδικά τους σύμπλοκα με το Pt(II).

Ένωση	CH ₂ (gly)	α-CH	β-CH	γ-CH	δ-CH	ε-CH	NH	NH ₂	CH ₂ (ester)	CH ₃ (ester)	Διαλύτης
HCl. GlyGlyOEt	3.98(s)	4.13(s)							4.28(q)	1.31(t)	D ₂ O
<u>cis</u> -Cl ₂ Pt(GlyGlyOEt) ₂	3.46(s)	3.89(d)					8.64(t)	5.11(t)	4.10(q)	1.19(t)	DMSO
	3.46(s)	3.87(s)							4.03(q)	1.07(t)	D ₂ O
HCl. GlyAlaOMe	3.68(s)	4.45(m)	1.42(d)				8.77(d)	8.28(s,br)		3.75(s)	DMSO
	3.67(s)	4.30(q)	1.24(d)							3.58(s)	D ₂ O
<u>cis</u> -Cl ₂ Pt(GlyAlaOMe) ₂	3.43(s)	4.44(m)	1.42(d)				8.70(d)	5.17(s,br)		3.75(s)	DMSO
		4.28(q)	1.25(d)							3.58(s)	D ₂ O
HCl. Gly-2-AbaOMe	3.69(s)	4.33(m)	1.80(m)	0.99(t)			8.77(d)	8.24(s,br)		3.58(s)	DMSO
		4.22(q)	1.65(m)	0.75(t)						3.75(s)	D ₂ O
<u>cis</u> -Cl ₂ Pt(Gly2-AbaOMe) ₂	3.57(s)	4.36(m)	1.79(m)	1.01(t)			8.70(d)	5.17(s,br)		3.58(s)	DMSO
		4.19(q)	1.68(m)	0.75(t)						3.58(s)	D ₂ O
HCl. GlynValOMe	3.65(s)	4.35(q)	1.65(m)	1.33(m)	0.87(t)		8.88(d)	8.15(s,br)		3.60(s)	DMSO
	3.69(s)	4.26(q)	1.60(m)	1.17(m)	0.73(t)					3.59(s)	D ₂ O
<u>cis</u> -Cl ₂ Pt(GlynValOMe) ₂	3.47(s)	4.42(q)	1.74(m)	1.43(m)	0.99(t)		8.71(d)	5.21(s,br)		3.76(s)	DMSO
	3.43(s)	4.26(q)	1.64(m)	1.25(m)	0.74(t)					3.58(s)	D ₂ O
HCl. GlynLeuOMe	3.65(s)	4.31(q)	1.65(m)	1.65(m)	1.33(m)	0.87(t)	8.88(d)	8.15(s,br)		3.60(s)	DMSO
	3.68(s)	4.27(q)	1.57(m)	1.57(m)	1.18(m)	0.71(t)				3.58(s)	D ₂ O
<u>cis</u> -Cl ₂ Pt(GlynLeuOMe) ₂	3.43(s)	4.25(d)	1.65(s,br)	1.65(m)	1.30(m)	0.90(t)	8.60(d)	5.10(s,br)		3.60(s)	DMSO
		4.26(q)	1.60(m)	1.60(m)	1.23(m)	0.72(t)				3.58(s)	D ₂ O

1.3. Σύνθεση των δυαδικών συμπλόκων του λευκοχρύσου (II) με τους εστέρες των διπεπτιδίων

Τα δυαδικά σύμπλοκα συντέθηκαν με απευθείας αντίδραση του άλατος K_2PtCl_4 με τους υδροχλωρικούς εστέρες των διπεπτιδίων, ακολουθώντας τη μέθοδο του Beok [217], σύμφωνα με το Σχήμα 32.

Τα σύμπλοκα με τους διπεπτιδεστέρες glyglyOEt και glyalaOMe, συντέθηκαν επίσης και με τη μέθοδο της πεπτιδικής σύνθεσης πάνω στο μέταλλο [219]. Η χρήση των εστέρων των διπεπτιδίων στην παραπάνω σύνθεση επιτρέπει τη συμπλοκοποίηση μόνο μέσω της Ν-τελικής αμινομάδας και όχι μέσω της καρβοξυλομάδας του διπεπτιδίου, η οποία στην παρούσα περίπτωση είναι δεσμευμένη και έχει σαν αποτέλεσμα την καταβύθιση των δυαδικών συμπλόκων στο υδατικό διάλυμα, ως υποκίτρινων στερεών, με cis-γεωμετρία, λόγω της μειωμένης σε σχέση με τα αλογόνα trans-ισχύος του αζώτου ατόμου-δότη.

Παρασκευάστηκαν τα παρακάτω σύμπλοκα:

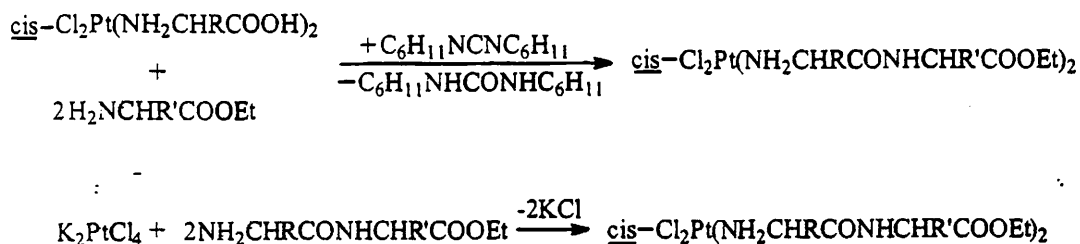
cis- $Cl_2Pt(glyglyOEt)_2$, cis- $Cl_2Pt(glyalaOMe)_2$, cis- $Cl_2Pt(gly-2-abaOMe)_2$, cis- $Cl_2Pt(glynvalOMe)_2$ και cis- $Cl_2Pt(glynleuOMe)_2$

Οι στοιχειακές αναλύσεις όλων των συμπλόκων (Πίνακας 1) συμφωνούν με τους προτεινόμενους μοριακούς τύπους.

Πίνακας 1: Στοιχειακές αναλύσεις των δυαδικών συμπλόκων

Σύμπλοκα	C%	H%	N%	Απόδοση%
<u>cis</u> -(glyglyOEt) ₂ PtCl ₂	24.20 (24.57)	4.10 (4.09)	9.30 (9.55)	60
<u>cis</u> -(glyalaOMe) ₂ PtCl ₂	24.54 (24.57)	4.10 (4.09)	9.41 (9.55)	37
<u>cis</u> -(gly-2-abaOMe) ₂ PtCl ₂	27.40 (27.36)	4.10 (4.56)	9.52 (9.12)	38
<u>cis</u> -(glynvalOMe) ₂ PtCl ₂	29.28 (29.90)	5.10 (4.98)	8.05 (8.72)	49
<u>cis</u> -(glynleuOMe) ₂ PtCl ₂	31.96 (32.24)	5.55 (5.37)	8.22 (8.36)	65

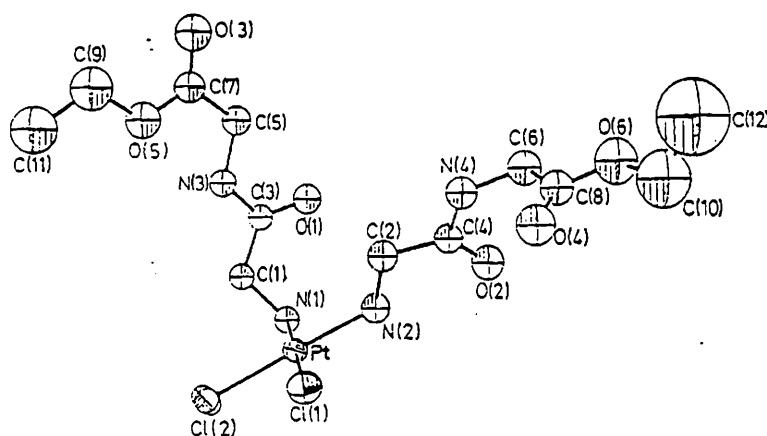
*Σε παρένθεση είναι οι θεωρητικές τιμές.



Σχήμα 32: Γενική πορεία αντιδράσεων σχηματισμού δυαδικών συμπλόκων λευκοχρύσου με διπεπτιδία

Στις παραπάνω περιπτώσεις, δεν παρατηρήθηκε συμπλοκοποίηση μέσω του αμιδικού αζώτου και η δομή των συμπλόκων αυτών επιβεβαιώθηκε από την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $\text{cis-Cl}_2\text{Pt}(\text{glyglyOEt})_2$ (Σχήμα 33) [217]. Το σύμπλοκο αυτό έδειξε να παρουσιάζει υποσχόμενη αντικαρκινική δράση, με μικρότερη τοξικότητα από το cisplatin [222]. Ο Beck και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι οι πεπτιδικοί υποκαταστάτες μπορούν να δράσουν σαν μέσα μεταφοράς μέσω των κυτταρικών μεμβρανών της αντικαρκινικής ομάδας $\text{cis-Cl}_2\text{Pt}$.

Οι εργασίες ανασκόπησης πάνω στα σύμπλοκα Pt(II) και Pd(II) με αμινοξέα-πεπτιδία έχουν γίνει σχετικά πρόσφατα [65,223,224].



Σχήμα 33: Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $\text{cis-Cl}_2\text{Pt}(\text{glyglyOEt})_2$

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΔΥΑΔΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΛΕΥΚΟΧΡΥΣΟΥ ΜΕ ΕΣΤΕΡΕΣ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

1.1. Εισαγωγή

Η συμπύκνωση των αμινοξέων οδηγεί στο σχηματισμό των πεπτιδίων, που αποτελούν σημαντικούς υποκαταστάτες για το σχηματισμό συμπλόκων με τα μεταλλικά ιόντα. Οι θέσεις που διατίθενται για δέσμευση από τα μεταλλικά ιόντα είναι: το άζωτο της αμινομάδας του N-τελικού αμινοξέος, το άζωτο του πεπτιδικού δεσμού, το οξυγόνο του πεπτιδικού δεσμού και το οξυγόνο της καρβοξυλομάδας του C-τελικού αμινοξέος. Στην περίπτωση πεπτιδίων που διαθέτουν άτομα δότες στην πλευρική τους αλυσίδα (π.χ. ιστιδίνη, λυσίνη, μεθειονίνη κ.α.), οι θέσεις που διατίθενται για δέσμευση αυξάνονται. Η αμιδική ομάδα προσφέρει δύο άτομα δότες για συμπλοκοποίηση με τα μέταλλα, αν και γενικά είναι ουδέτερη ηλεκτρικά σε όλη την κλίμακα του pH, αφού συνήθως η αποπρωτονίωση και η πρωτονίωσή της συμβαίνουν αντίστοιχα σε $\text{pH} > 15$ ή $\text{pH} < 0$. (Σχήμα 31). Βέβαια, παρουσία μεταλλικών ιόντων, το pK_a της αμιδικής ομάδας μπορεί να μειωθεί δραστικά, οπότε συμβαίνει εύκολη αποπρωτονίωση αυτής και συμπλοκοποίηση του μετάλλου μέσω του αμιδικού αζώτου. Ο Pt(II) καθώς και το Pd(II) αποπρωτονιώνουν πολύ εύκολα το αμιδικό άζωτο των πεπτιδίων και σχηματίζουν δεσμούς M-N [203]. Για παράδειγμα, οι τιμές pK_a της αποπρωτονίωσης της γλυκυλ-γλυκίνης και του γλυκιναμιδίου, παρουσία Pd(II), είναι μικρότερες του 4.0 [204,205]. Η εύκολη αποπρωτονίωση παρουσία των δύο αυτών μετάλλων, είναι αποτέλεσμα της μεγάλης σταθερότητας του σχηματιζόμενου M-N δεσμού, παρέχοντας 4N συναρμοσμένα δις-σύμπλοκα σε σχετικά χαμηλό pH [206]. Τα συνήθη σχηματιζόμενα ισομερή είναι τύπου cis [207,208]. Σε μονομερή

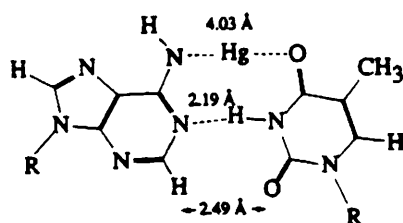
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην εισαγωγή, στα κεφάλαια 1 και 2, αναφέραμε τη σπουδαιότητα του σχηματισμού διασταυρούμενων δεσμών μετάλλου-DNA-πρωτεΐνης, ιδιαίτερα στην περίπτωση που το μέταλλο είναι ο λευκόχρυσος, Pt(II). Η βιολογική σημασία του σχηματισμού αυτού του είδους των δεσμών παραμένει ανεξακρίβωτη. Για πολλές δεκαετίες το ενδιαφέρον των ερευνητών είχε εστιαστεί στην αλληλεπίδραση του cisplatin με το DNA. Τα τελευταία χρόνια όμως και ιδίως μετά την ανακάλυψη των πρωτεϊνών DRP's (Damage Recognition Proteins), οι οποίες αναγνωρίζουν εκλεκτικά τους 1,2 ενδοκλωνικά διασταυρούμενους δεσμούς του τύπου d(GpG) και d(ApG), το ενδιαφέρον των ερευνητών άρχισε να στρέφεται στη μελέτη τριαδικών συστημάτων DNA-Pt-πρωτεΐνης. Παρόλα αυτά, ο αριθμός των μελετών αυτών είναι ακόμα σχετικά περιορισμένος.

Η συστηματική μελέτη τέτοιων συστημάτων Pt(II) και Pd(II) από την ομάδα του καθ. κ. Ν. Χατζηλιάδη στα Ιωάννινα, σε συνεργασία με την ομάδα του καθ. κ. Β. Lippert στο Dortmund της Γερμανίας, καθώς και άλλες ομάδες, οδήγησε σε κάποια συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο του μετάλλου στην αλληλεπίδραση DNA-πρωτεΐνης και η διατριβή αυτή αποτελεί μέρος της υπό εξέλιξη έρευνας.

Σκοπός λοιπόν της διατριβής είναι η σύνθεση και μελέτη cis-τριαδικών συμπλόκων Pt(II) με αμινοξέα και διπεπτίδια ως δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών και με νουκλεοζίτες, ως δομικές μονάδες του DNA, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο το απλούστερο μοντέλο των διασταυρούμενων δεσμών DNA-Pt-πρωτεΐνης. Επίσης, στην προσπάθεια να δημιουργήσουμε ένα πιο σύνθετο και ρεαλιστικό μοντέλο των παραπάνω δεσμών, μελετήσαμε σε δάλυμα, με φασματοσκοπία NMR, την αλληλεπίδραση μεταξύ ενός δίκλωνου δωδεκανουκλεοτιδίου και δύο συμπλόκων Pd(II) με διπεπτίδια. Είναι η

αντίθετες κατευθύνσεις. Τα στοιχεία αυτά, καθώς και δεδομένα φασμάτων ^1H - ^{15}N HMQC NMR δείχνουν εκλεκτική σύνδεση του Hg(II) στην περιοχή AT και υποστηρίζουν το μοντέλο, στο οποίο το μέταλλο συνδέεται με την αποπρωτονιωμένη αμινομάδα της αδενίνης (A NH_2) και το ενολικό οξυγόνο O4 της θυμίνης (Σχήμα 30). Κατά την τιτλοδότηση του δωδεκανουκλεοτιδίου $[\text{d}(\text{GCGCATATGCGC})]_2$ με το άλας $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ παρατηρήθηκε μετατόπιση προς υψηλότερα πεδία για το σήμα του T8 ίμινο-πρωτονίου, ενώ το T6 ίμινο-πρωτόνιο μένει ανεπηρέαστο, γεγονός που δηλώνει εκλεκτικότητα προς τη θυμίνη T8 σε σχέση με την T6. Και σε αυτή την περίπτωση δεν υπάρχει δεσμός με το N3 άζωτο των θυμινών, αφού όλα τα ίμινο σήματα υπάρχουν στο φάσμα.



Σχήμα 30: Σχηματική παράσταση ενός μοντέλου για ενδοκλωνικούς A-Hg-T διασταυρούμενους δεσμούς, το οποίο περιλαμβάνει την απελευθέρωση ενός πρωτονίου για κάθε ιόν Hg(II) .

3.3.4. Μαγγάνιο, Mn(II)

Το ιόν του Mn(II) έχει παραμαγνητικές ιδιότητες, με αποτέλεσμα να αναμένεται αύξηση του εύρους των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων κοντά στις θέσεις δεσμού του μετάλλου. Πραγματικά, κατά την τιτλοδότηση του ολιγονουκλεοτιδίου $[\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$ με άλας του Mn(II) , παρατηρήθηκε εκλεκτική αύξηση του εύρους του σήματος για το G4-H8 πρωτόνιο, με αποτέλεσμα να υποθεθεί ότι το Mn(II) συνδέεται εκλεκτικά με τη γουανίνη G4 [199]. Σε μια δεύτερη τιτλοδότηση, με το ολιγονουκλεοτίδιο $[\text{d}(\text{GCCGATATCGGC})]_2$ διαπιστώθηκε διαφορετική αύξηση του εύρους των σημάτων για τα H8

δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ζευγών βάσεων είναι δυνατός ακόμα και μετά την πλατινίωση, όπως φαίνεται από την ύπαρξη σημάτων συντονισμού των ίμινο-πρωτονίων. (Για το κεντρικό τμήμα GG τα σήματα αυτά παρατηρούνται μόνο σε χαμηλές θερμοκρασίες).

4) Η 5'-φωσφορική ομάδα του χηλικά συδεδεμένου τμήματος GG σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με μια αμμωνία του συμπλόκου του λευκοχρύσου, σταθεροποιώντας ή/και προκαλώντας την παραμόρφωση του DNA, συμμετέχοντας έτσι στη διαδικασία της αντιγραφής του. Αυτή είναι ίσως η αιτία για την παρατήρηση πως σύμπλοκα του λευκοχρύσου χρειάζεται να διαθέτουν μια όξινη ομάδα N-H, προκειμένου να παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση.

5) Επίσης, τα σύμπλοκα trans-DDP με τροποποιημένα ολιγονουκλεοτίδια (που περιέχουν 1,3 ενδοκλωνικούς διασταυρούμενους δεσμούς) είναι ικανά να σχηματίζουν διπλή έλικα, παρόλο που η θερμοκρασία τήξεως αυτής μειώνεται κατά περίπου 15°.

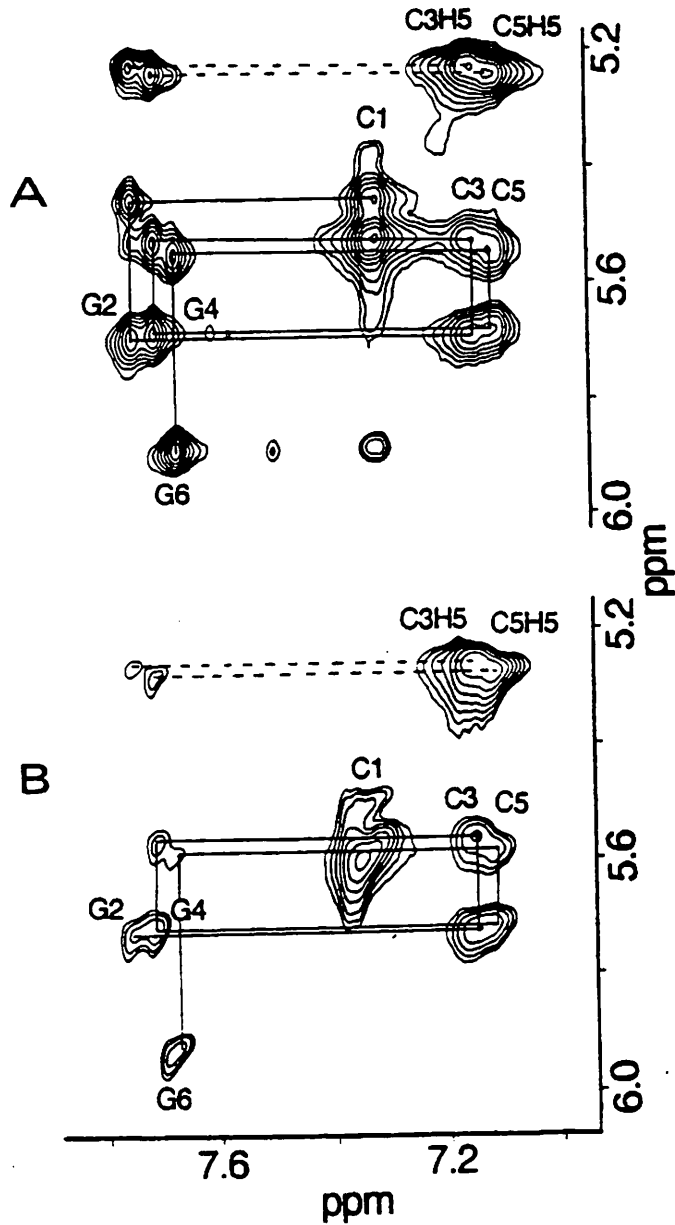
6) Ακόμα και στην περίπτωση σχηματισμού 1,3 -GNG- προϊόντων προσθήκης από το cis-DDP, είναι δυνατό να έχουμε διαμόρφωση διπλής έλικας, αν και με μειωμένη θερμοκρασία τήξεως. Στην περίπτωση αυτή η ενδιάμεση μη πλατινιωμένη βάση τοποθετείται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να εξασφαλίζεται η καλύτερη αλληλεπίδραση στο σύνολο της διπλής έλικας. Έτσι, η παραμόρφωση του DNA στην περίπτωση της 1,3 σύνδεσης είναι διαφορετική από την αντίστοιχη της 1,2 σύνδεσης.

3.3. Αλληλεπιδράσεις ολιγονουκλεοτιδίων με άλλα μεταλλικά ιόντα.

3.3.1. Μαγνήσιο, Mg(II)

Τα ιόντα του μαγνησίου βρέθηκε να αυξάνουν τη θερμοκρασία τήξης του DNA, σταθεροποιώντας τη δομή της διπλής έλικας, συνδεόμενα κυρίως με τις φωσφορικές ομάδες [130]. Το αποτέλεσμα

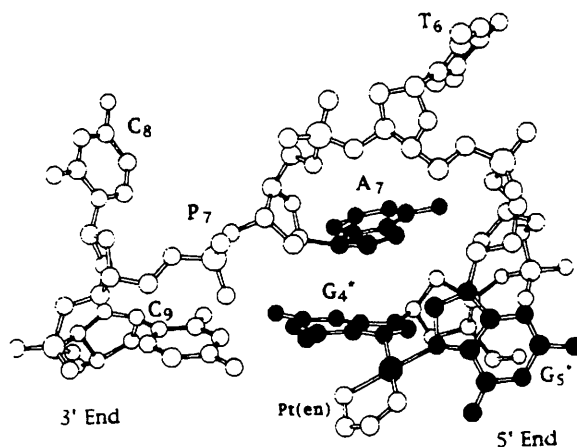
προϊόντων του *cis*-DDP, ίσως να εξηγούν και τις διαφορές στη βιολογική τους δραστηριότητα.



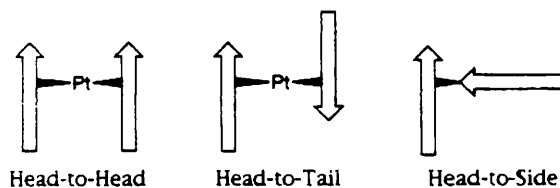
Σχήμα 28: Χάρτης της H6/H8-H1'/H5 περιοχής του 400 MHz φάσματος NOESY του $[d(CGCGCG)]_2$ (400 ms χρόνος μίξης). (A) χωρίς *cis*-DDP (B) με αναλογία *cis*-DDP/duplex ίση με 0.14.

A6H2 στο δεύτερο δωδεκανουκλεοτίδιο. Τα πρωτόνια της μεγάλης αύλακας δεν παρουσιάζουν μετατοπισμένα σήματα συντονισμού. Επίσης, παρατηρήθηκαν NOE σήματα μεταξύ των πρωτονίων μικρής αύλακας, AH2, AH1' και TH1' και των πρωτονίων των μεθυλενομάδων του συμπλόκου του λευκοχρύσου. Αυτά τα στοιχεία οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο του μετάλλου ήταν συνδεδεμένο με τις ακολουθίες A3T4 και A9T10 στο πρώτο και με την ακολουθία A6T7 στο δεύτερο ολιγονουκλεοτίδιο. Η σταθερότητα της δομής οφείλεται σε κοντινές αλληλεπιδράσεις van der Waals μέσα στην αύλακα και σε σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ατόμων N3 των αδενινών ή των ατόμων O2 των θυμινών.

Εκλεκτικές αλληλεπιδράσεις ολιγονουκλεοτιδίων και *cis*-DDP ή συμπλόκων Pd²⁺, μελετήθηκαν με φασματοσκοπία 1D ¹H-NMR NOESY [190]. Η αντίδραση μεταξύ του δίκλωνου εξαμερούς d(CGCGCG)₂ και *cis*-DDP σε φυσιολογικό pH (pH=7) ήταν πολύ αργή. Κατά τη διάρκεια της τιτλοδότησης, δεν παρατηρήθηκαν ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις του μετάλλου με το άτομο N7 της γουανίνης. Παρόλα αυτά ο NOESY χάρτης δείχνει ελάττωση της έντασης των σημάτων στην περιοχή H6/H8-H1' (Σχήμα 28), ενδεικτική αλλαγής της διαμόρφωσης που προκαλείται από το *cis*-DDP, καθώς και αύξηση διαφόρων διατμηματικών αποστάσεων. Αυτή η αλλαγή της διαμόρφωσης φαίνεται να σταθεροποιείται με σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ μιας αμμωνίας του συμπλόκου και του ατόμου O6 της γουανίνης G2 και στη συνέχεια με ένα δεύτερο δεσμό υδρογόνου μεταξύ της άλλης αμμωνίας και του ατόμου O2 της κυτιδίνης C1. Η τιτλοδότηση του δίκλωνου δωδεκανουκλεοτιδίου d(CGCGAATTCGCG)₂ με το μονοδοντικό σύμπλοκο του παλλαδίου Pd(dien)⁺ έδειξε να υπάρχει μια εκλεκτικότητα για δεσμό στην περιοχή AT, ενώ τα εξωτερικά ζεύγη βάσεων GC, που αντιπροσωπεύονται από τα ίμινο σήματα των G2 και G10 φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο από το εσωτερικό σήμα G4, γεγονός που δείχνει ότι τα ογκώδη τμήματα Pd-dien προσβάλλουν τη διπλή έλικα



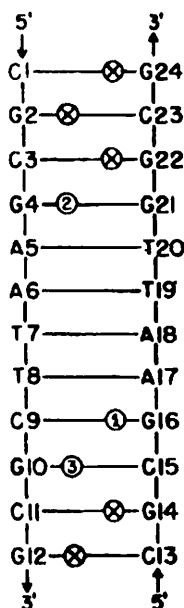
Σχήμα 26: 1,2 G(4)G(5) χηλικό προϊόν της αντίδρασης του cis-PtA₂Cl₂ με το ολιγονουκλεοτίδιο d(ATGGGTACCCAT)₂.



Σχήμα 27: Σύγκριση της νέας διαμόρφωσης head-to-side με τις γνωστές διαμορφώσεις head-to head και head-to tail.

Η μελέτη της διαμόρφωσης του διπλόκλωνου δεκανουκλεοτιδίου d(GCCG*G*ATCGC).d(GCGATCCGGC) με τις G* γουανίνες να συνδέονται χηλικά με το τμήμα cis-Pt(NH₃)₂, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικές τεχνικές ¹H και ³¹P-NMR και μοριακή μηχανική [186]. Διαπιστώθηκε μια ισορροπία μεταξύ διαφόρων στραμμένων (kinked) διαμορφώσεων. Η παραμόρφωση του DNA εντοπίζεται στο τρινουκλεοτίδιο CG*G*.CCG, όπου η έλικα στρέφεται κατά 60° προς τη μεγάλη αύλακα (άλλες μελέτες δίνουν τιμές 32-40° [187,188]) και ξεδιπλώνεται κατά 12-19° (σε συμφωνία με την τιμή που δίνει και η ομάδα του Lippard [187]). Η κυτοσίνη, η συμπληρωματική προς την 5'-γουανίνη, διαθέτει μια αυξημένη κινητικότητα, συσσωρευόμενη είτε προς το 5'-τμήμα είτε προς το 3'-τμήμα του

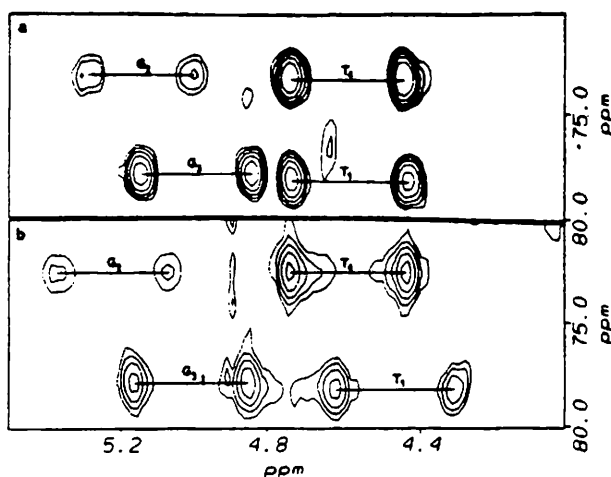
exo (Σχήμα 25), 3) Στα μοντέλα τύπου B-DNA ο σχηματισμός δεσμού μεταξύ του cis-DDP και της μονάδας d(ρGρG) μετατρέπει τη διαμόρφωση του σακχάρου της 5'-γουανοσίνης σε C3'-endo (N) [182].



Σχήμα 24: Διάγραμμα της μεγάλης αύλακας του B-DNA CGCGAATTCGCG δωδεκαμερούς, το οποίο δείχνει με κύκλους τις οκτώ πιθανές θέσεις δεσμού του cis-DDP. Οι αριθμημένες 1-3 θέσεις είναι οι παρατηρούμενες θέσεις δεσμού, με σειρά ελαττούμενης συχνότητας.

Ο σχηματισμός μιας ασυνήθιστης δομής “φουρκέτας” (hairpin) της διπλής έλικας παρατηρήθηκε κατά την αντίδραση του φαρμάκου cis-PtA₂Cl₂ (A = (NH₃)₂, en) με το δωδεκανουκλεοτίδιο [d(A(1)T(2)G(3)G(4)G(5)T(6)A(7)C(8)C(9)C(10)A(11)T(12))₂, στην οποία το τμήμα G(4)G(5)T(6)A(7)C(8)C(9) αποτελεί τη “θηλειά” (loop) αυτής και τα τμήματα A(1)T(2)G(3) και C(10)A(11)T(12) το μίσχο της [183,184]. Αρχικές ενδείξεις φασματοσκοπίας NMR υποστήριζαν το σχηματισμό προϊόντος, στο οποίο ο Pt συνδέεται με τη γουανίνη G(4) και την αδενίνη A(7) [183]. Περαιτέρω όμως μελέτες ενζυματικής πέψης και ηλεκτροφόρησης πηκτής, σε συνδυασμό με στοιχεία NMR, έδειξαν πως το κύριο προϊόν είναι το 1,2 χηλικό, μέσω των G(4)G(5) (Σχήμα 26), ενώ το προϊόν 1,2 G(3)G(4) σχηματίζεται μόνο σε πολύ μικρό ποσοστό [184]. Υπολογισμοί γεωμετρικών αποστάσεων (DG) στο

συγκέντρωσης, με αποτέλεσμα όλα τα ενδιάμεσα προϊόντα να μπορούν να ανιχνευτούν. Ανιχνεύτηκαν δύο μονοδοντικά ενδιάμεσα προϊόντα και το ένα υπερείχε του άλλου (αναλογία περίπου 2:1), γεγονός που δείχνει είτε προτίμηση της προσβολής της 5' ή της 3' στο GG είτε προτίμηση ως προς το κλείσιμο του δακτυλίου. Όπως αναμενόταν, η αρχική προσβολή καθώς και το κλείσιμο του δακτυλίου φάνηκε να καθορίζονται από το ρυθμό υδρόλυσης του δεσμού Pt-Cl. Τέλος, τα σήματα συντονισμού των ομάδων NH₃ ήταν πολύ ευαίσθητα στην τήξη της πλατινωμένης διπλής έλικας, παρατήρηση που υποδηλώνει ότι οι πλατινωμένες μονόκλωνες περιοχές διαθέτουν δευτεροταγή δομή.



Σχήμα 23: Μεγενθύσεις της περιοχής H3' - C3' του φάσματος HMQC του d(TGGT)-Pt(en) στους (a) 40 °C και (b) 12 °C, όπου φαίνεται η μετατόπιση προς μικρότερες τιμές πεδίου του σήματος του C3' της G2. Το σήμα T4 C3' είναι επίσης μετατοπισμένο, όπως αναμενόταν, λόγω του ότι ανήκει σε τμήμα του 3'-άκρου.

Ένα πρώιμο μοντέλο αλληλεπίδρασης του cisplatin με ένα B-DNA δωδεκαμερές, το d(CGCGAATTCGCG)₂ δημοσιεύτηκε το 1984 [180]. Ύστερα από διάχυση του cisplatin σε κρυστάλλους του ολιγομερούς, έγινε διερεύνηση της δομής του μερικώς υποκατεστημένου κρυστάλλου. Αν και το υπό μελέτη τμήμα του DNA διαθέτει οκτώ γουανίνες, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν θέσεις δεσμού για το λευκόχρυσο, μόνο

[32,132,175,176]. Το μονόκλωνο 1,3 χηλικό προϊόν trans-[Pt(NH₃)₂d(CCTCGAGTCTCC)-G(5)N7,G(7)N7], και το τύπου διπλής έλικας ανάλογό του χαρακτηρίστηκαν με τεχνικές φασματοσκοπίας ¹H-, ³¹P-NMR και UV, και τεχνικές ενζυματικής αποικοδόμησης. Η σύνδεση του trans-DDP δεν μεταβάλλει ουσιαστικά τις γωνίες στροφής γύρω από το δεσμό O-P-O και δεν επηρεάζει σημαντικά τη θερμοκρασία τήξης της έλικας. Μοντέλα μοριακής δυναμικής συμφωνούν πως στο προϊόν του trans-DDP υπάρχει μια μόνο τοπική παραμόρφωση της έλικας και η μεγάλη θερμική της σταθερότητα οφείλεται σε σχηματισμό δεσμών υδρογόνου στους οποίους συμμετέχουν οι αμμωνίες του συμπλόκου “γεφυρώνοντας” τους δύο κλώνους. Παραδόξως, η αντίδραση του trans-DDP με το ολιγονουκλεοτίδιο d(TCTACGCGTTCT), ενώ αρχικά μας δίνει το 1,3 χηλικό προϊόν G(6)N7,G(8)N7, αυτό είναι ασταθές σε συνηθισμένο pH και μετατρέπεται στο ισομερές του 1,4 χηλικό, το οποίο ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στην παραπάνω αντίδραση. Τέλος, το μονόκλωνο 1,3 προϊόν trans-[Pt(NH₃)₂d(ApGpGpCpCpT)-A(1)N7,G(3)N7] μελετήθηκε με φασματοσκοπικές τεχνικές, 1D ¹H-NMR, COSY και NOESY. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το σάκχαρο της αδενοσίνης A(1) υιοθετεί διαμόρφωση C3'-endo,anti, ενώ τα σάκχαρα των υπόλοιπων νουκλεοτιδίων διατηρούν την C2'-endo (S) διαμόρφωση, με την ενδιάμεση γουανίνη G(2), να βρίσκεται εκτός της συσσώρευσης των γειτονικών της βάσεων (Σχήμα 22).

Αντίθετα, η αντίδραση του cis-ισομερούς με το παραπάνω εξανουκλεοτίδιο, d(ApGpGpCpCpT) έδωσε ως μοναδικό προϊόν το μονόκλωνο 1,2 GN7,GN7 χηλικό σύμπλοκο, στο οποίο παρατηρήθηκε αποσυσσώρευση των βάσεων και δομή σπείρας, παρά ελικοειδής [177]. Στην περίπτωση αυτή δεν βρέθηκαν στοιχεία που να υποστηρίζουν ύπαρξη του ApG προϊόντος.

συσσώρευσης μεταξύ των βάσεων 5'-T και 5'-G έχει διαταραχθεί. Για τα προϊόντα $d(\text{TGGT})\text{Pt}(\text{en})$ και $d(\text{TGGT})\text{-cisPt}(\text{MeNH}_2)_2$, εφαρμόστηκαν πολλές τεχνικές NMR, όπως NOE, HMQC, HOHAHA και COSY. Πειράματα $^1\text{H}\text{-}^{31}\text{P}$ HMQC, καθώς και πειράματα ^{31}P μιας διάστασης με ιχνηθέτηση ^{17}O , βοήθησαν στην ταυτοποίηση των σημάτων συντονισμού των πυρήνων ^{31}P . Το μετατοπισμένο κατά 1 ppm περίπου σήμα ^{31}P σε μικρότερες τιμές πεδίου, αποδόθηκε στο άτομο φωσφόρου της ομάδας GpG, που συμμετέχει στον 1,2 ενδόκλωνο δεσμό με τον Pt, σε αναλογία με προηγούμενες παρατηρήσεις [171]. Η μετατόπιση αυτή φαίνεται να σχετίζεται με τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμού υδρογόνου μεταξύ μιας 5'-φωσφορικής ομάδας και ενός αμινο-υποκαταστάτη του συμπλόκου του Pt. Έτσι, η μετατόπιση αυτή μειώνεται με τη σειρά $\text{en} > \text{N,N-Me}_2\text{en} > (\text{NH}_3)_2 > \text{Me}_2\text{tn} > \text{tn} > (\text{MeNH}_2)_2$. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι αυτή η μετατόπιση προς μικρότερες τιμές πεδίου δεν παρατηρείται στην περίπτωση του trans- $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ ή άλλων αντικαρκινικά αδρανών ενώσεων ούτε σε περιπτώσεις όπου το ολιγονουκλεοτίδιο δεν περιέχει την ακολουθία GG [172].

Το φάσμα ^{31}P -NMR της ένωσης cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2 d(\text{TCTCGGTCTC})\text{-N7(5),N7(6)}]$ δείχνει επίσης την ύπαρξη σημάτων συντονισμού εκτός της κανονικής περιοχής (-4.0 μέχρι -4.4 ppm σε σχέση με το TMP). Το μοντέλο αυτό δηλώνει μια παραμορφωμένη δομή. Πειράματα ιχνηθέτησης ^{17}O και $\text{H}^3\text{-}^{31}\text{P}$ εκλεκτικής διέγερσης [173,174], έδειξαν ότι το σήμα μετατοπισμένο στις μικρότερες τιμές πεδίου (-2.60 ppm) αντιστοιχεί στη φωσφορική ομάδα G5pG6, ενδεικτικό της ύπαρξης δεσμού υδρογόνου που σχηματίζεται από μια αμμωνία, ενώ το σήμα μετατοπισμένο σε μεγαλύτερες τιμές πεδίου (-4.77 ppm) αντιστοιχεί στην ομάδα C_{4p}G_5 . Ύστερα από το σχηματισμό διπλής έλικας με το συμπληρωματικό κλώνο, παρατηρούνται περίπου οι ίδιες αποκλίσεις για τα σήματα ^{31}P των δύο παραπάνω ομάδων, καθώς και παρόμοιες τιμές $^3J_{\text{HCO P}}$ για τα G5p και C_{4p} , γεγονός που δείχνει πως κατά το σχηματισμό διπλής έλικας η δομή της περιοχής CpGpG δεν αλλάζει σημαντικά. Τα

NMR του προϊόντος με ένα άτομο Pt ανά μόριο δείχνει ότι σχηματίζεται μόνο ένα είδος δεσμού, παρόλο που υπάρχουν δύο γουανίνες, γεγονός που δηλώνει προτίμηση για το ένα από τα άτομα N7 του μορίου.

Μελέτη των προϊόντων της αντίδρασης του cisplatin με το ολιγονουκλεοτίδιο d(GpCrGpC) με φασματοσκοπία UV συναρτήσε του pH και μεθόδους ενζυματικής αποικοδόμησης, έδειξε ότι το κύριο προϊόν είναι και σε αυτή την περίπτωση το 1,3 χηλικό, μέσω των ατόμων N7 των δύο γουανινών [165].

Όταν στο GN7(5)-GN7(6) χηλικά πλατινωμένο δεκανουκλεοτίδιο d(TCTCGGTCTC) γίνει προσθήκη του συμπληρωματικού κλώνου d(GAGACCGAGA), σχηματίζεται το δίκλωνο προϊόν [166]. Τα ίμινο-πρωτόνια που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου μπορούν να παρατηρηθούν σε διαλύματα H₂O σε χαμηλές θερμοκρασίες, αν και μετατοπισμένα downfield σε σχέση με αυτά της μη πλατινωμένης διπλής έλικας, γεγονός ενδεικτικό αλλαγής του χημικού τους περιβάλλοντος, που προκαλείται από το δεσμό με το μέταλλο. Πραγματικά, λόγω πλατινίωσης οι γουανίνες G(5) και G(6) δεν μπορούν να διατηρήσουν τον παράλληλο προσανατολισμό τους, με αποτέλεσμα να ελλαττωθεί η συσσώρευση μεταξύ διαδοχικών ζευγών βάσεων και να αλλάξει ο βαθμός προστασίας που ασκούν μεταξύ τους.

Πειράματα ¹H-NMR, συνδυασμένα με παρατήρηση 1D NGE σημάτων, έδειξαν ότι στο σύμπλοκο cis-[Pt(NH₃)₂d(TCTCGTGTCTC)-GN7(5),GN7(7)] η μία γουανίνη έχει διαμόρφωση syn, ενώ η άλλη anti. Όταν στο σύμπλοκο αυτό προστεθεί ο συμπληρωματικός κλώνος του εντεκαμερούς, d(GAGACACGAGA), τότε σχηματίζεται το προϊόν της πλατινωμένης διπλής έλικας. Στο προϊόν αυτό η θυμίνη μεταξύ των θέσεων δεσμού του λευκοχρύσου βρίσκεται εκτός της διευθέτησης συσσώρευσης, με αποτέλεσμα το πρωτόνιο H3 αυτής να μη συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου και το σήμα συντονισμού αυτού να παρατηρείται στην περιοχή μεταξύ 10-11 ppm. Εκτός του δεσμού υδρογόνου T(6)-A(22) διακόπτεται επίσης και ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ ενός

πλατινωμένο συμπληρωματικό κλώνο προς σχηματισμό διπλής έλικας. Σε αντιδράσεις μεταξύ του *cis*-platin και ακέραιων ολιγονουκλεοτιδίων διπλής έλικας, η δίκλωνη δομή αλλοιώνεται κάτω από τις συνθήκες της αντίδρασης [27].

Το 1973 ο Sigler και οι συνεργάτες του μελέτησαν την αντίδραση μεταξύ των *cis*- και *trans*-Pt(NH₃)₂Cl₂ με το πολυνουκλεοτίδιο poly(A) σε αραιά υδατικά διαλύματα. Σε αναλογία Pt/poly(A) μεγαλύτερη του 0.5, η αντίδραση οδηγεί σε σχηματισμό ιζήματος πολυμερούς, που οφείλεται στη δημιουργία διαμοριακών διασταυρούμενων δεσμών, ενώ σε μικρότερες αναλογίες επικρατούν οι ενδομοριακοί διασταυρούμενοι δεσμοί με δύο βάσεις του πολυμερούς [159]. Η ομοιότητα στην αντίδραση των δύο ισομερών οδήγησε στην υπόθεση ότι η διαφορά στη βιολογική τους εκλεκτικότητα δεν οφείλεται στη δημιουργία διασταυρούμενων δεσμών.

Κινητική μελέτη της αντίδρασης του *cis*-platin με τα πολυνουκλεοτίδια poly(rA), poly(rC) και poly(rG) έδειξε ότι η δεσμική συγγένεια του *cis*-platin ως προς τα ομοπολυνουκλεοτίδια είναι μεγαλύτερη από αυτή ως προς τα μονονουκλεοτίδια και ότι το μέγεθος της σταθεράς σχηματισμού δεσμού αυξάνεται με τη σειρά: poly(rC) < poly(rA) < poly(rG). Σε κάθε περίπτωση ένα μόνο μόριο *cis*-platin είναι συνδεδεμένο με ένα νουκλεοτίδιο του πολυμερούς [160].

Η στοιχειομετρική αντίδραση του μονόκλωνου εξανουκλεοτιδίου d(TGGCCA) με το *cis*-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂](NO₃)₂, σε pH=5.5-6, όπως μελετήθηκε με χρωματογραφία πηκτής υψηλής πίεσης και φασματοσκοπία NMR, δίνει ένα μόνο προϊόν, το χηλικό GN7-GN7. Η σταθερά σύζευξης J_{1,2} για ένα από τα σάκχαρα των γουανοσινών είναι σχεδόν ίση με το μηδέν, δηλαδή η γουανοσίνη αυτή, που προφανώς είναι η 5'-γουανοσίνη, έχει διαμόρφωση τύπου N. Σημαντική είναι η παρατήρηση πως ακόμα και σε συνθήκες που το εξανουκλεοτίδιο έχει δομή διπλής έλικας, το μόνο μονομερές σύμπλοκο του λευκοχρύσου που σχηματίζεται είναι το παραπάνω μονόκλωνο χηλικό [161]. Ανάλογη

δύο άλλων βάσεων, οι οποίες σχηματίζουν μεταξύ τους γωνία 180° για το trans-ισομερές και 90° για το cis-ισομερές. Στο προϊόν προσθήκης του cis-ισομερούς οι δύο γουανοσίνες αποκτούν δαμόρφωση N σε ποσοστό 50%, λόγω της πλατινίωσής τους, ενώ στο trans-ισομερές η G(1) αποκτά δαμόρφωση σχεδόν 100% N και η G(3) 50% N. Η μεγάλη διαφορά από την ισοροπία, που παρατηρείται για τη γουανοσίνη G(1) οφείλεται κυρίως στο σχηματισμό ενός “τεντωμένου” χηλικού δακτυλίου με το trans-ισομερές. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των δύο ισομερών πρέπει να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των προϊόντων προσθήκης από τις πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν βλάβες στο DNA [152].

Όταν το cisplatin αντιδρά με το τρινουκλεοτίδιο d(GpApG) δύο κύρια προϊόντα ανιχνεύονται, το cis-Pt(NH₃)₂[d(GpApG)-N7(1),N7(3)] (80%) και το cis-Pt(NH₃)₂[d(GpApG)-N7(2),N7(3)] (20%). Η αναλογία των προϊόντων ήταν ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία ή το βαθμό υδρόλυσης του cisplatin. Η παρατήρηση ότι σχηματίζεται μόνο το χηλικό AG και όχι το GA συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες και μπορεί να εξηγηθεί με βάση τη γεωμετρία του τρινουκλεοτιδίου [153]. Μελέτες μοριακής μηχανικής έδειξαν ότι η δημιουργία δεσμού στην ακολουθία ApG ευνοείται κατά 28 kJ mol^{-1} έναντι του δεσμού στην ακολουθία GrA, λόγω ευνοϊκού σχηματισμού δεσμού υδρογόνου μεταξύ μιας αμμωνίας και του οξυγόνου O6 της 3'-γουανίνης στην πρώτη περίπτωση και μη ευνοϊκής αλληλεπίδρασης μεταξύ του μορίου της αμμωνίας και μιας αμινομάδας της 3'-αδενίνης στη δεύτερη περίπτωση [154].

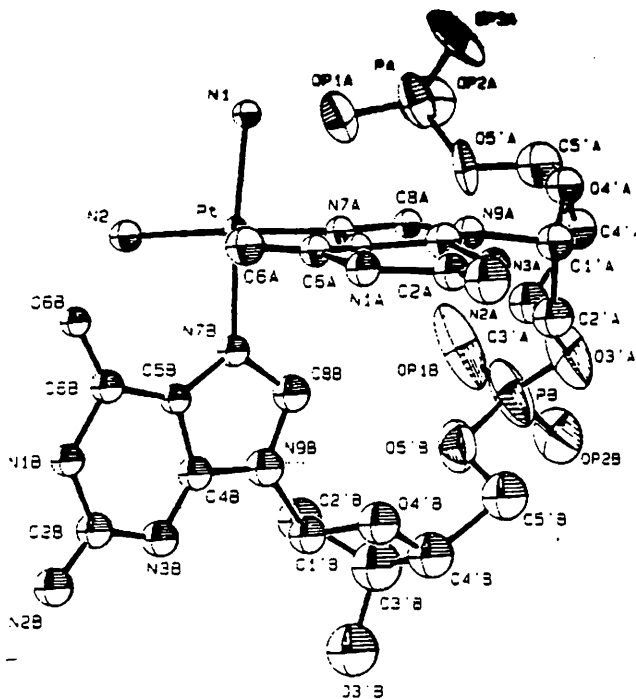
Το προϊόν προσθήκης μεταξύ του μονοδοντικού συμπλόκου Pt(dien)²⁺ και του τρινουκλεοτιδίου d(ApGrA), cis-Pt(dien)[d(ApGrA)-N7(2)], αντιπροσωπεύει ένα μοντέλο του ενδιάμεσου προϊόντος (πρώτο βήμα) της αντίδρασης του cisplatin με το DNA. Η δομή του προϊόντος αυτού μελετήθηκε στη στερεά φάση και σε διάλυμα, με τεχνικές περίθλασης ακτίνων-X και με φασματοσκοπία NMR αντίστοιχα [155]. Σε διάλυμα, οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της γουανίνης και της

μελέτη ($^1\text{H-NMR}$ σε 500 MHz) του προϊόντος αυτού έδωσε στοιχεία για τη διαμόρφωση και τη δομή του [146]. Το ποσοστό της διαμόρφωσης N γύρω από το γλυκοζιτικό δεσμό αυξάνει για τις δύο γουανοσίνες, ενώ μένει σχεδόν σταθερό για τη μη ενταγμένη κυτιδίνη. Οι δύο γουανοσίνες αποκτούν διαμόρφωση *syn* ή *anti* και έρχονται κοντά η μία με την άλλη (αυξημένη συσσώρευση) με αποτέλεσμα η κυτιδίνη να μην αποτελεί πια τμήμα της συσσωρευμένης διευθέτησης των βάσεων και έτσι η έλικα να μικραίνει στο μήκος κατά μια βάση. Αυτό προκαλεί τοπική παραμόρφωση του DNA.

Και η αντίδραση του trans- $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}$ με το $d(\text{GpCpG})$ μελετήθηκε με φασματοσκοπία NMR [147]. Το κύριο προϊόν είναι το χηλικό trans- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{d(\text{GpCpG})\}]$, στο οποίο το μέταλλο συνδέεται με το άτομο N7 των δύο γουανινών, σχηματίζοντας έναν 1,3-ενδοκλωνικά διασταυρούμενο δεσμό. Η κυτιδίνη βρίσκεται εκτός συσσώρευσης των βάσεων. Η διαμόρφωση του 5'-σακχάρου είναι τύπου N ($\text{C}3'\text{-endo}$), φαινόμενο που δεν παρατηρείται στην αντίδραση του cis-ισομερούς με το ίδιο τρινουκλεοτίδιο και η πληροφορία αυτή σχετίστηκε με την απουσία αντικαρκινικής δράσης του trans-ισομερούς.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντίδραση του cisplatin με το τρινουκλεοτίδιο $d(\text{CpGpG})$ με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ($^1\text{H-}$, $^{13}\text{C-}$, $^{31}\text{P-NMR}$) [148]. Απομονώθηκε το χηλικό προϊόν cis- $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{d(\text{CpGpG})\}$, στο οποίο οι θέσεις δεσμού του μετάλλου είναι τα άτομα αζώτου N7 των δύο γουανινών, αφού δεν ήταν δυνατό να παρατηρηθεί πρωτονίωση του αζώτου N7 μετά την πλατινίωση, ενώ το ρKa του αζώτου N1 μειώθηκε στο 8.5 από 9.2 για το μη πλατινιωμένο ανάλογο. Το 5'-σάκχαρο είχε διαμόρφωση τύπου N (100%), σε αντίθεση με τη διαμόρφωση S τύπου για το ελεύθερο DNA. Οι δύο γουανοσίνες είχαν διαμόρφωση *anti* και ήταν σχεδόν κάθετες μεταξύ τους, λόγω της επίπεδης τετραγωνικής γεωμετρίας γύρω από το κέντρο του λευκοχρύσου. Στο σχήμα 20 φαίνεται η δομή του συμπλόκου, όπως διευκρινίστηκε ύστερα από κρυσταλλογραφία

αντίδρασης τόσο στο πρώτο όσο και στο δεύτερο βήμα της. Ειδικά στην περίπτωση των δευτεροταγών αμινών, παρατηρείται μικρή ταχύτητα. Βρέθηκε ότι η ταχύτητα της αντίδρασης μειώνεται με τη σειρά $\text{NH}_3 > \text{RNH}_2 > \text{R}_2\text{NH}$. Η δημιουργία δεσμού υδρογόνου μεταξύ της αμινομάδας και της φωσφορικής ομάδας φαίνεται και σε αυτή την περίπτωση να παίζει σημαντικό ρόλο στην ταχύτητα της αντίδρασης τόσο στο πρώτο όσο και στο δεύτερο βήμα. Είναι πιθανό, υποκατεστημένα παράγωγα του cisplatin, τα οποία παρουσιάζουν πολύ μικρές ταχύτητες στο σχηματισμό χηλικών συμπλόκων, να μη διαθέτουν αντικαρκινική δράση (όπως για παράδειγμα το $[\text{Pt}(\text{dlen})\text{Cl}]\text{Cl}$ [142]) και είναι ακόμα πιθανό η ύπαρξη ογκωδών υποκαταστατών να σχετίζεται με τη μειωμένη δραστηριότητα των παραγώγων αυτών.



Σχήμα 19: Κρυσταλλική δομή του μορίου του συμπλόκου cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}\{\text{d}(\text{pGrG})\}]$.

Τέλος, πρέπει να αναφέρουμε μια πρόσφατη μελέτη που αφορά στην κινητική και στη δομή των προϊόντων της αντίδρασης διπυρηνικών ενώσεων λευκοχρύσου του τύπου $[\{\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\{\mu\text{-H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2\}]^{2+}$ ($n=2-6$), με το δινουκλεοτίδιο $\text{d}(\text{GrG})$ [143]. Τα

Εντατική φασματοσκοπική ($^1\text{H-NMR}$) μελέτη της παραπάνω αλληλεπίδρασης $\text{d}(\text{GrG})$ με cis-DDP, οδήγησε στον ακριβή υπολογισμό των σταθερών σύζευξης (J-couplings) μεταξύ πρωτονίων και πρωτονίου-φωσφόρου. Η ανάλυσή τους έδειξε ότι ο δακτύλιος της δεοξυριβόζης στο 5'-άκρο του συμπλόκου του δινουκλεοτιδίου έχει διαμόρφωση 100% N ($\text{C3}'\text{-endo}$). Αντίθετα, το 3'-άκρο έχει τη συνήθη διαμόρφωση για τις δεοξυριβόζες, δηλαδή περίπου 70% S ($\text{C2}'\text{-endo}$) διαμόρφωση. Η παρατήρηση αυτή φαίνεται να συμπληρώνει τα προηγούμενα αποτελέσματα και οδηγεί ακόμα στο συμπέρασμα ότι ο σχηματισμός χηλικού συμπλόκου από τον Pt(II) σε μια ακολουθία - dGrpdG - απαιτεί αλλαγή διαμόρφωσης μιας δεοξυριβόζης και συνεπώς μια παραμόρφωση στον ένα κλώνο της διπλής έλικας του DNA [138].

Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\rho\text{GrG})\}]$, το οποίο φαίνεται να είναι το επικρατέστερο προϊόν της αντίδρασης του cisplatin με το DNA, έδωσε πιο συγκεκριμένη μορφή στις παραπάνω παρατηρήσεις και συμπεράσματα [125,139]. Το μόριο κρυσταλλώθηκε σε δύο τύπους, όπου το μέταλλο συνδέεται με επίπεδο τετραγωνικό τρόπο με δύο μόρια αμμωνίας σε θέση cis και δύο άτομα N7 γουανίνης του ίδιου δινουκλεοτιδίου, αναγκάζοντας τις δύο βάσεις να αποσυσσωρευτούν, με αποτέλεσμα οι δίεδρες γωνίες μεταξύ τους να έχουν τιμές από 76.2° μέχρι 86.8° . Παρόλα αυτά, οι βάσεις συνεχίζουν να έχουν προσανατολισμό head-to-head και anti-anti. Ο δακτύλιος του σακχάρου της βάσης στο 5'-άκρο του δινουκλεοτιδίου υιοθετεί διαμόρφωση $\text{C3}'\text{-endo}$, χαρακτηριστική του A-DNA, ενώ ο δακτύλιος στο 3'-άκρο έχει διαμόρφωση $\text{C2}'\text{-endo}$ χαρακτηριστική του B-DNA. Σημαντικό στοιχείο είναι ότι το σύμπλοκο σταθεροποιείται με το σχηματισμό ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου μεταξύ ενός πρωτονίου της αμμωνίας και ενός ατόμου οξυγόνου της τελικής 5'-φωσφορικής ομάδας ή ενός ατόμου O6 της γειτονικής γουανίνης (Σχήμα 19).

Προκειμένου να εξακριβωθεί ο λόγος για την απουσία χηλικού προϊόντος λευκοχρύσου και GrA σε αντίθεση με την ύπαρξη τέτοιου

3.2. Αλληλεπίδρασεις Pt(II) και Pd(II) με ολιγονουκλεοτίδια

3.2.1. Δινουκλεοτίδια

Από τις πρώτες μελέτες αλληλεπίδρασης Pt(II) με δινουκλεοτίδια ήταν αυτή της αντίδρασης των cis, trans-Pt(NH₃)₂Cl₂ και cis, trans-Pt(enim)₂Cl₂ (enim=αιθυλενιμίνη) με A3'p5'A, A2'p5'A, A3'p5'C, A2'p5'C και A3'p5'U, με τη βοήθεια της τεχνικής κυκλικού διχρωϊσμού (CD) συναρτήσεως της θερμοκρασίας και του pH [133]. Ανιχνεύτηκαν προϊόντα, όπου το μέταλλο ήταν χηλικά συνδεδεμένο (1,2-ΕΔΔ) με τις δύο βάσεις του δινουκλεοτιδίου, στα οποία διατηρόταν η συσσωρευση των βάσεων, μόνο για τα cis-ισομερή και μόνο για τα δινουκλεοτίδια A3'p5'A και A3'p5'C. Τα trans-ισομερή λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης δεν μπορούσαν να σχηματίσουν τέτοιους 1,2 δεσμούς.

Πειράματα ¹H-NMR και κυκλικού διχρωϊσμού κατά την αλληλεπίδραση cis-[Pt(NH₃)₂(H₂O)₂](NO₃)₂ με τα δινουκλεοτίδια IρI, GrG, ApA, GrC και ApC, έδειξαν ότι τα τρία πρώτα ομοδινουκλεοτίδια σχηματίζουν N(7)-N(7) χηλικά σύμπλοκα με το Pt(II). Τα IρI και GrG δίνουν μόνο ένα χηλικό προϊόν, ενώ το ApA δίνει περισσότερα προϊόντα, λόγω της ανταγωνιστικής δράσης του αζώτου N1 [134]. Στα παραπάνω χηλικά σύμπλοκα η συσσωρευση των βάσεων είναι μεγάλη και φαίνεται ότι ο σχηματισμός χηλικού συμπλόκου μεταξύ δύο γειτονικών γουανινών προϋποθέτει αποσύνθεση (παραμόρφωση) του DNA. Στην αντίδραση με GrC παίρνουμε μίγμα τριών προϊόντων και η κυτοσίνη αν και δεν αναμενόταν, φαίνεται να έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τον Pt(II) από τη γουανίνη, αφού και στα τρία προϊόντα παρατηρείται σχηματισμός δεσμού μετάλλου-κυτοσίνης μέσω του αζώτου N3 αυτής. Τα δυο προϊόντα είναι ισομερή του τύπου [Pt(NH₃)₂(GrC)Cl]⁺, συσσωρευμένης διαμόρφωσης anti-anti, όπου το μέταλλο συνδέεται μόνο με την κυτοσίνη. Το τρίτο προϊόν είναι το χηλικό N(7)G-N(3)C, στο οποίο ο δακτύλιος της γουανοσίνης έχει διαμόρφωση syn, με

3.1.4. Φασματοσκοπία ετεροπυρήνων, X-NMR (X= ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P)

Πειράματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού με ετεροπυρήνες μπορούν να διευκολύνουν την απόδοση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων και συγχρόνως να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή των νουκλεϊνικών οξέων, μέσω των ετεροπυρηνικών σταθερών σύζευξης. Για μεγαλύτερα ολιγομερή του DNA και ειδικά του RNA δεν είναι δυνατό να βασιστούμε μόνο σε ομοπυρηνικές τεχνικές, λόγω του ότι πολλά σήματα συντονισμού των πρωτονίων αλληλεπικαλύπτονται. Επίσης, για ασυνήθιστες δομές νουκλεϊνικών οξέων (πχ. τριπλή έλικα, τετραπλή, ιδιαιτερότητες της δομής του RNA, αλλαγές που προκαλούνται από μεταλλικά ιόντα), η συνηθισμένη τεχνική αλληλοδιαδοχικής ταυτοποίησης με χρήση του αποτελέσματος Overhauser, μπορεί να αποδειχτεί ανεπαρκής, λόγω της απουσίας συγκεκριμένων NOE σημάτων. Ευτυχώς, υπάρχουν αρκετές εναλλακτικές τεχνικές, οι οποίες βασίζονται σε ετεροπυρηνικές, μέσω δεσμών (J-coupling), συζεύξεις με μεγαλύτερη διασπορά των χημικών μετατοπίσεων (^{13}C και ^{15}N), έτσι ώστε να αντιμετωπίσουμε το πρόβλημα της αλληλεπικάλυψης και οι οποίες προσφέρουν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουμε διαδοχική ταυτοποίηση (^1H , ^{13}C , ^{15}N και ^{31}P) μη βασιζόμενη στο φαινόμενο NOE και συνεπώς μη εξαρτώμενη τόσο από συγκεκριμένες παραδοχές δομής.

Εφαρμόζοντας τις αντίστροφες (^1H -ανίχνευσης) παραλλαγές των ετεροπυρηνικών πειραμάτων, μπορούμε να ξεπεράσουμε το πρόβλημα της μικρής περιεκτικότητας σε πυρήνες (^{13}C και ^{15}N). Πολλά πειράματα ετεροπυρηνικής συσχέτισης με ^1H -ανίχνευση, όπως ετεροπυρηνικής πολυκβαντικής συνοχής (heteronuclear multiple quantum coherence, HMQC) [115-117], ετεροπυρηνικής μονοκβαντικής συνοχής (heteronuclear simple-quantum coherence, HSQC) [118] και ετεροπυρηνικής συσχέτισης πολλαπλών δεσμών (heteronuclear multiple bond correlation, HMBC) [119] έχουν εφαρμοστεί για ολιγομερή

ολιγομερούς, στο οποίο ανήκει [108-111]. Η ενίσχυση του σήματος λόγω του φαινομένου Overhauser, οφείλεται σε αποδιέγερση διπόλου-διπόλου (μέσω του χώρου) μεταξύ των πυρήνων. Η σχέση μεταξύ των ρυθμών ανάπτυξης των NOE σημάτων σ_{ij} είναι αντιστρόφως ανάλογη των διαπυρηνικών αποστάσεων μεταξύ των πυρήνων i και j (r_{ij}) και μάλιστα, $\sigma_{ij} \propto r_{ij}^{-6}$. Η πολύ ισχυρή εξάρτηση του ρυθμού ανάπτυξης των NOESY σημάτων από τη διαπυρηνική απόσταση κάνει σχεδόν αδύνατη την παρατήρηση σήματος για ένα ζεύγος πυρήνων σε απόσταση μεταξύ τους μεγαλύτερη των 5 Å [110,112].

Κανονικά, η αλληλοδιαδοχική ταυτοποίηση ενός ολιγονουκλεοτιδίου βασίζεται σε συγκεκριμένες παραδοχές δομής, εκείνες της διαμόρφωσης μιας διπλής έλικας τύπου B-DNA [108,111]: μια νουκλεοβάση σε ένα περιβάλλον B-DNA, υιοθετεί έναν προσανατολισμό αντί ως προς το δακτύλιο του σακχάρου, ενώ η διαμόρφωση της ριβόζης είναι C2'-endo. Το κρίσιμο σημείο της στρατηγικής της αλληλοδιαδοχικής ταυτοποίησης είναι ότι υπό τις παραπάνω παραδοχές δομής, υπάρχουν μικρές (<5 Å) διανουκλεοτιδικές αποστάσεις πρωτονίων.

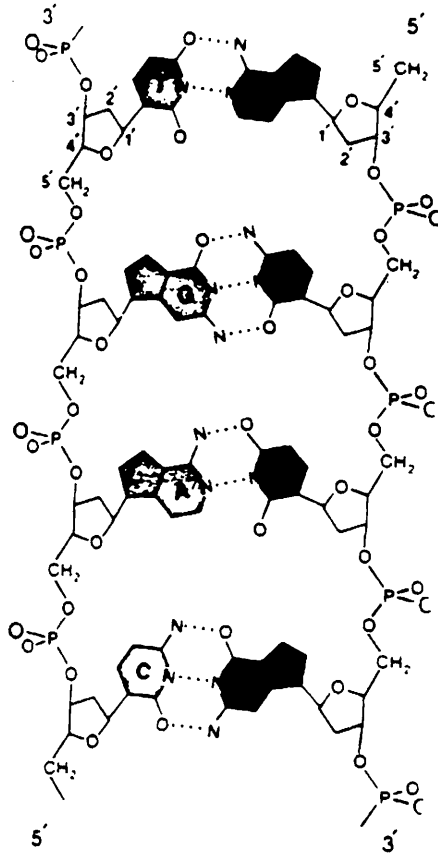
Όλα τα πρωτόνια των ριβοζών και των βάσεων μπορούν να αποδοθούν στο σωστό νουκλεοτίδιο του ολιγομερούς, συνδέοντας δια-και ενδο-κλωνικά H6/H8-H1' NOESY σήματα. Το "μονοπάτι" που διατρέχει ένα ολιγονουκλεοτίδιο συναντά κάθε πρωτόνιο H1'. Εναλλακτικά, τα σήματα που αφορούν στα πρωτόνια H2' και H2'' μπορούν εξίσου να χρησιμοποιηθούν και συχνά παρέχουν πολύτιμες συμπληρωματικές πληροφορίες. Η πορεία της αλληλοδιαδοχικής ταυτοποίησης φαίνεται στο σχήμα 18 για το δωδεκαμερές [d(CGCGAATTCGCG)]₂ και το σύμπλοκό του με Hg(II) [113].

3.1. Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Η μελέτη της δομής των ολιγονουκλεοτιδίων, καθώς και των αλληλεπιδράσεών τους με μεταλλικά ιόντα έχει πραγματοποιηθεί κυρίως με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η διαθέσιμη τεχνολογία σήμερα μας παρέχει “εξεζητημένες” μεθόδους πολυδιάστατης και πολυπυρηνικής φασματοσκοπίας, χρήσιμες στις μελέτες αυτές και αφορούν κυρίως: τον προσδιορισμό των θέσεων δεσμού ενός μεταλλοϊόντος στα ολιγομερή του DNA, την επίδραση του δεσμού του μεταλλοϊόντος στη δομή της διπλής έλικας του DNA και τη σχέση μεταξύ της σύνθεσης των βάσεων και του τρόπου σύνδεσης του μετάλλου [102].

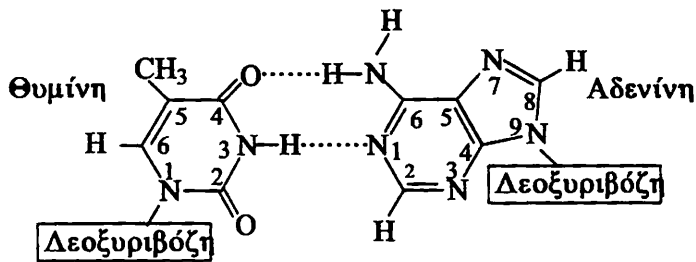
Το πρώτο βήμα για να πάρουμε ποιοτικές όπως και ποσοτικές πληροφορίες από τα NMR φάσματα ενός ολιγονουκλεοτιδίου είναι να ταυτοποιήσουμε τα σήματα συντονισμού. Για παράδειγμα, το δωδεκανουκλεοτίδιο $[d(\text{CGCGAATTCGCG})]_2$, το οποίο έχει μορφή διπλής έλικας, παρουσιάζει 84 σήματα συντονισμού για τα πρωτόνια των ριβοζών, 18 σήματα συντονισμού για τα πρωτόνια των βάσεων και 2 σήματα συντονισμού για τα πρωτόνια των μεθυλικών ομάδων των θυμινών, τα οποία παρατηρούνται όταν το δωδεκαμερές διαλυθεί σε διαλύματα D_2O . Επίσης, αλλάζοντας το D_2O με H_2O , μπορούμε να παρατηρήσουμε τα 6 σήματα συντονισμού για τα ίμινο πρωτόνια, που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου της Watson-Crick διπλής έλικας, καθώς και μερικά από τα 20 σήματα συντονισμού για τα πρωτόνια των αμινομάδων.

Η εξάρτηση από το pH των σημάτων συντονισμού των μη ανταλλασσομένων πρωτονίων των βάσεων χρησιμοποιείται για να διευκρινήσουμε τις θέσεις δεσμού του μετάλλου (λευκοχρύσου), αφού ύστερα από την πλατινίωση δεν είναι δυνατό να παρατηρηθεί πρωτονίωση της βάσης στη θέση που αυτή συνδέεται με το λευκόχρυσο. Επίσης, οι τιμές pK_a των άλλων πρωτονίων της βάσης

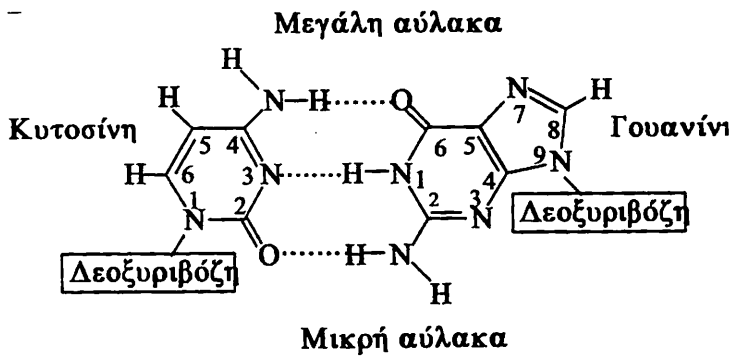


Σχήμα 14: Η ραχοκοκκαλιά ενός πολυνουκλεοτιδίου, που δείχνει τα ζεύγη βάσεων και τη σύνδεσή τους με τις φωσφορικές ομάδες και τα σάκχαρα.

Μεγάλη αύλακα



Μικρή αύλακα



Σχήμα 15: Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ζευγών βάσεων στο DNA.

3. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ΜΕ ΟΛΙΓΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ

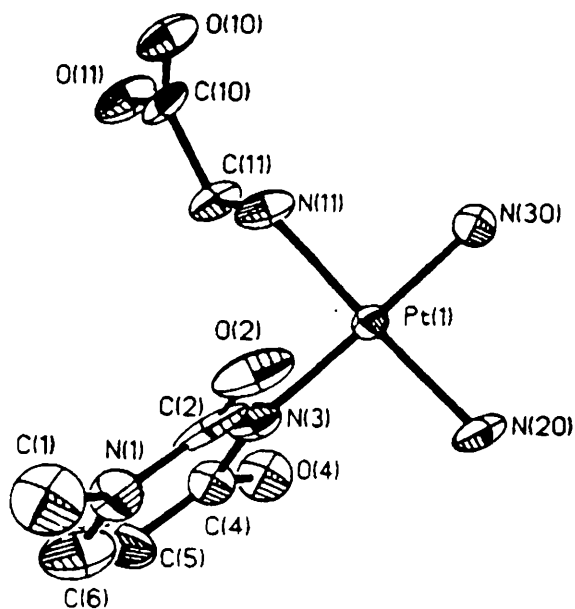
Το 1953 οι J. D. Watson και F. Crick πρότειναν τη δομή της διπλής έλικας για το DNA, στηριζόμενοι σε φωτογραφίες ινών DNA, με τεχνικές περίθλασης ακτίνων-Χ [94]. Η ραχοκοκκαλιά του κάθε κλώνου της έλικας αποτελείται από διαδοχικά μόρια φωσφορικού οξέος και δεοξυριβόζης, προς το εσωτερικό δε του μορφώματος προεξέχουν οι αζωτούχες βάσεις έτσι ώστε απέναντι από κάθε αδενίνη να βρίσκεται μια θυμίνη και απέναντι από κάθε γουανίνη μια κυτοσίνη (Σχήμα 14). Μεταξύ των βάσεων κάθε ζεύγους αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου, δύο στο ζεύγος αδενίνης-θυμίνης και τρεις στο ζεύγος γουανίνης-κυτοσίνης (Σχήμα 15). Οι δύο κλώνοι της έλικας είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και αντιπαράλληλοι, δηλαδή η 3'-5' κατεύθυνση των φωσφοδιεστερικών δεσμών είναι αντίθετη στους δύο κλώνους. Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι της διπλής έλικας: η Β-μορφή, η οποία είναι σταθερή σε συνθήκες υψηλής υγρασίας (92%) και η Α-μορφή, η οποία επικρατεί όταν η υγρασία πέφτει στο 75%. Και οι δύο μορφές είναι δεξιόστροφες (Σχήμα 16). Στη μορφή Β-DNA υπάρχουν 10 βάσεις ανά στροφή της έλικας, σε απόσταση 3.4 Å μεταξύ δύο ζευγών της έλικας (βήμα της έλικας), ενώ στο Α-DNA υπάρχουν 11 βάσεις ανά στροφή της έλικας και το βήμα αυτής είναι 2.9 Å. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στο Β-DNA η κλίση (γωνία) του επίπεδου των βάσεων με το επίπεδο κάθετο στον άξονα της έλικας είναι σχεδόν 0°, ενώ στο Α-DNA η κλίση είναι μεταξύ 13-19°.

Τα δύο σημεία επαφής ενός ζεύγους βάσεων με τους δακτυλίους των σακχάρων δεν βρίσκονται ακριβώς απέναντι το ένα στο άλλο επί μήκους του ζεύγους και αυτό είναι σημαντικό για τη γεωμετρία της διπλής έλικας του DNA. Η περιοχή του ζεύγους των βάσεων κατά μήκος της οποίας η γωνία μεταξύ των επαφών τους είναι μικρότερη από 180° ονομάζεται μικρή αύλακα και αυτή κατά μήκος της οποίας σχηματίζεται γωνία μεγαλύτερη των 180° ονομάζεται μεγάλη αύλακα (Σχήματα 15,

το μέταλλο μέσω αμινομάδας και καρβοξυλομάδας, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα χηλικά συνδεδεμένα αυτά αμινοξέα μπορούσαν να αντικατασταθούν σε πολλές περιπτώσεις, με αποτέλεσμα την απομόνωση συμπλόκων 1:2 του τύπου cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(\text{nucleobase})_2](\text{NO}_3)_2$. Έτσι, το σύμπλοκο cis- $[(\text{NH}_3)_2\text{Pt}(9\text{-MeA})_2](\text{NO}_3)_2$ με τους δύο αδενινικούς δακτυλίους να συνδέονται μέσω αζώτου N7, απομονώθηκε για πρώτη φορά και έγινε εφικτή η λύση της δομής του [89].

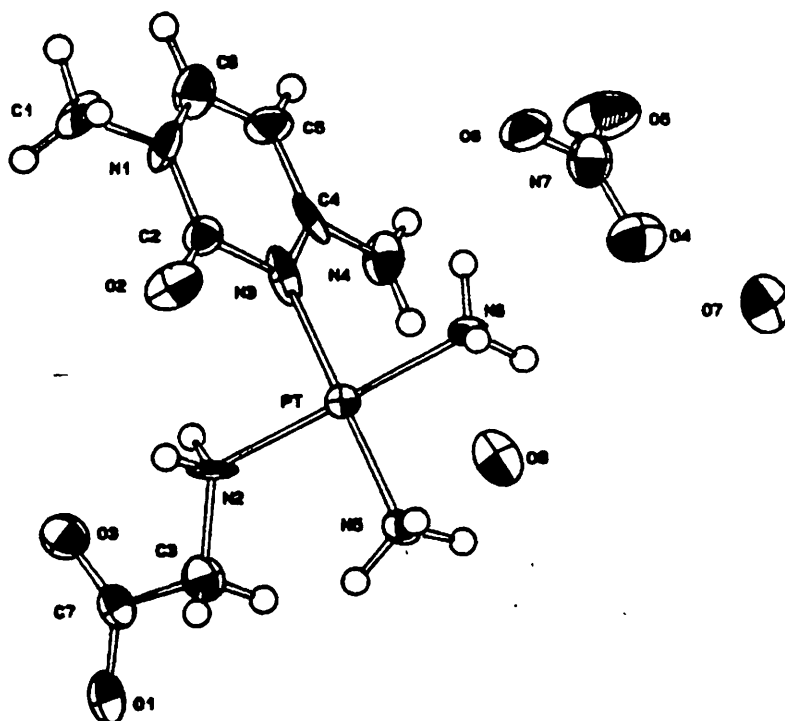
Ο Khan και οι συνεργάτες του συνέθεσαν cis-τριαδικά σύμπλοκα Pt(II) με διάφορα αμινοξέα και τους νουκλεοζίτες αδενοσίνη, γουανοσίνη, ινσοσίνη, κυτιδίνη και ουριδίνη. Και πάλι έδειξαν ότι η γουανοσίνη και η αδενοσίνη συνδέονται μέσω του αζώτου N7, ενώ η ινσοσίνη μέσω του αζώτου N1. Οι πυριμιδινικοί νουκλεοζίτες συνδέονταν μέσω του αζώτου N3 και τα αμινοξέα μονοδοντικά μέσω της αμινομάδας τους [90,91].

Πρόσφατα, ο Gibson και οι συνεργάτες του μελέτησαν κινητικά το σχηματισμό τριαδικών συμπλόκων Pt(II) με τα μονονουκλεοτίδια 5'-GMP, 3'-GMP και 5'-dGMP και τα αμινοξέα N_α -BOC-L-ιστιδίνη, N_α -BOC-L-μεθειονίνη και 1-μεθυλιμιδαζόλιο (1-Melm) [92]. Τα σύμπλοκα του τύπου $[\text{PtAm}_2(\text{L})\text{Cl}]^+$, όπου $\text{Am}_2 = \text{cis-}$ ή trans- $(\text{NH}_3)_2$ ή αιθυλενοδιαμίνη (en) και L = 1-Melm ή N_α -BOC-L-his-N3, αντιδρούν με τα μονονουκλεοτίδια προς σχηματισμό συμπλόκων του τύπου $\text{PtAm}_2(\text{L})(\text{nucleotide})$. Τα 5' νουκλεοτίδια αντιδρούν πιο γρήγορα από τα αντίστοιχα 3'. Το cis- $[\text{PtAm}_2(1\text{-Melm-N3})\text{Cl}]^+$ αντιδρά ταχύτερα από το trans

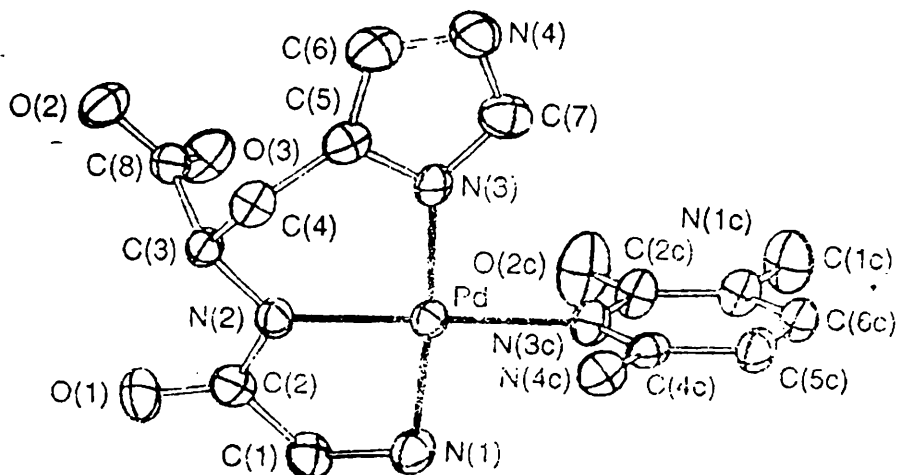


Σχήμα 13: Κρυσταλλική δομή του μορίου του συμπλόκου cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(1\text{-MeU})(\text{gly-N})]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

συνδέονταν με το άζωτο N3, η πυριμιδινική και με το άζωτο N7 η πουρινική. Τα αμινοξέα ήταν μονοδοντικά συνδεδεμένα μέσω της αμινομάδας τους. Στην περίπτωση των συμπλόκων με 1-μεθυλοκυτοσίνη (1-MeC), παρατηρήθηκε η ύπαρξη ισομερών εκ περιστροφής γύρω από το δεσμό Pt-N3, τα οποία παρέμεναν στο διάλυμα ακόμα και σε θερμοκρασία 90°C. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αλειφατικής αλυσίδας των αμινοξέων και του δακτυλίου της νουκλεοβάσης παρουσιάζονταν αυξημένες καθώς αυξανόταν η πλευρική αλυσίδα των αμινοξέων. Παρόλα αυτά ήταν μικρότερης έντασης από αυτές που παρατηρήθηκαν σε ανάλογα τριαδικά συστήματα Pt(II) και Pd(II). Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου cis-[(NH₃)₂Pt(1-MeC)(Gly)]NO₃ μελετήθηκε με την τεχνική περίθλασης ακτίνων-X (Σχήμα 11). Η δομή δεν έδειξε την ύπαρξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στην περίπτωση αυτή, γεγονός που αναμενόταν, εφόσον υποκαταστάτης ήταν η γλυκίνη. Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν και με την κρυσταλλική δομή του συμπλόκου trans-[(CH₃NH₂)₂Pt(1-MeC)(Gly)]NO₃ [85] (Σχήμα 12).



Σχήμα 11: Κρυσταλλική δομή του μορίου του συμπλόκου cis-[(NH₃)₂Pt(1-MeC)(Gly)]NO₃.



Σχήμα 10: Κρυσταλλική δομή του μορίου του συμπλόκου [Pd(gly-L-his)(mcyt)].

2.2. Τριαδικά συμπλοκα λευκοχρύσου

Τα τελευταία χρόνια, ο Χατζηλιάδης και οι συνεργάτες του μελέτησαν αρκετά τριαδικά συστήματα του Pt(II) με αμινοξέα-πεπτιδία και νουκλεοβάσεις-νουκλεοζίτες, τα οποία αναφέρονται παρακάτω:

Η μελέτη της επίδρασης διαφόρων νουκλεοζιτών στο διπυρηνικό σύμπλοκο του Pt(II) με τον μεθυλεστέρα της κυστεΐνης του τύπου [Pt(CysOMe)Cl]₂ έδειξε ότι οι πουρίνες συνδέονται με το μέταλλο μέσω του αζώτου N7 ή N1, όταν και οι δύο θέσεις είναι διαθέσιμες (σε μεγάλες τιμές pH) ενώ η κυτιδίνη συνδέεται μέσω του αζώτου N3 [80]. Σε όλες τις περιπτώσεις, ο δεσμός Pt-N ήταν ασθενής, λόγω του ισχυρού trans-φαινομένου του απέναντι με αυτόν δεσμού Pt-S. Αντιδράσεις του συμπλόκου PtCl₂, όπου L = Cys(Et) ή Cys(Me), με τους νουκλεοζίτες ινοσίνη και γουανοσίνη, οδήγησαν σε προϊόντα του τύπου [Pt(L)(nucl)₂]Cl₂, στα οποία οι βάσεις συνδέονται με το μέταλλο πάλι μέσω του αζώτου N7 [81].

Η αντίδραση του δυαδικού συμπλόκου *cis*-Pt(ino)₂Cl₂ με τα αμινοξέα Gly, L-ala, L-Val, L-Ileu, L-Phe και L-Pro μελετήθηκε σε

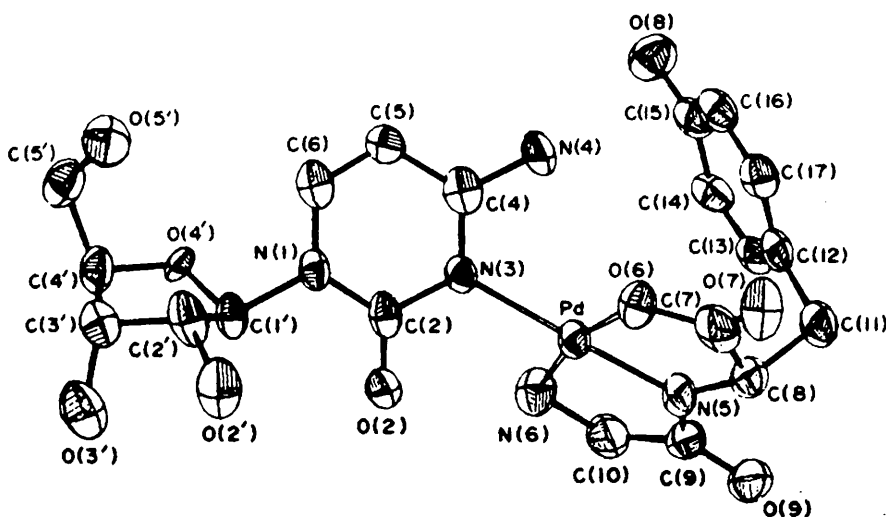
γουανοσίνη (guo) και ινοσίνη (ino) και dipeptide=gly-gly, gly-L-ala, gly-L-val, gly-L-leu [77]. Τα πεπτιδία συνδέονται με το μέταλλο μονοδοντικά μέσω της τελικής αμινομάδας και οι νουκλεοζίτες μέσω του αζώτου N7. Παρατήρησαν ότι σε διάλυμα D₂O υπάρχουν δύο ισομερή, το “ανοιχτού” και το “κλειστού” τύπου, με ασθενείς και ισχυρές αλληλεπιδράσεις υποκαταστατών (ligand-ligand interactions) αντίστοιχα (Σχήμα 9). Σε διάλυμα DMSO-d₆ ευνοείται ο ανοιχτός τύπος. Ο “κλειστός” τύπος συμπλόκου αυξάνει σε ποσοστό καθώς αυξάνεται η πλευρική αλυσίδα του διπεπτιδίου. Επίσης, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων της αλειφατικής αλυσίδας των διπεπτιδίων και του αρωματικού δακτυλίου της γουανοσίνης, σε υδατικά διαλύματα, μειώνονται καθώς απομακρυνόμαστε από τη θέση δεσμού.

Ανάλογα ισομερή “ανοιχτού” και “κλειστού” τύπου παρατηρήθηκαν και στη μελέτη τριαδικών συμπλόκων του τύπου *cis*-Pd(guo)₂(amac)Cl, όπου amac= τα ανιόντα των αμινοξέων γλυκίνης (glyH), L-αλανίνης (alaH), L-προλίνης (proH), L-βαλίνης (valH), L-ισολευκίνης (ileH) και L-φαινυλαλανίνης (pheH), τα οποία είναι χηλικά συνδεδεμένα με το μέταλλο μέσω της αμινομάδας και της καρβοξυλομάδας τους [78]. Σε αυτή τη σειρά των συμπλόκων, αντίθετα από ό,τι στην προηγούμενη, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων της αλειφατικής αλυσίδας των αμινοξέων και του αρωματικού δακτυλίου της γουανοσίνης, αυξάνονται καθώς απομακρυνόμαστε από τη θέση δεσμού.

Ο Lippert και οι συνεργάτες του μελέτησαν φασματοσκοπικά την αντίδραση του δυαδικού συμπλόκου [Pd(gly-L-his)Cl].1.5 H₂O με τις βάσεις 1-μεθυλοουρακίλη (Hmura), 1-μεθυλοκυτοσίνη (mcyt), 9-μεθυλοαδενίνη (made), 9-αιθυλογουανίνη (Hegua) και 6-μεθοξυ-9-μεθυλογουανίνη (momgua) σε διάλυμα [79]. Όλες οι βάσεις συνδέονταν με το μέταλλο μέσω ατόμων αζώτου. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός ισομερών εκ περιστροφής καθώς και ισομερών σύνδεσης, ειδικά για της πουρινικές βάσεις (N7, N1 και N1/N7 σύνδεση). Διαπιστώθηκε ότι το

είναι C_2 -endo-anti και ευνοούνταν η διαμόρφωση gg γύρω από τον εξωκυκλικό δεσμό $C_\alpha-C_\beta$.

Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου Pd(II)-GlyHis με κυτιδίνη και GMP μελετήθηκε με φασματοσκοπία 1H και ^{13}C -NMR [73]. Ο νουκλεοζίτης Cyt ενώνεται με το μέταλλο μέσω του αζώτου N3, ενώ το νουκλεοτίδιο GMP μέσω του αζώτου N7. Ανάλυση της επίδρασης του αρωματικού δακτυλίου της κυτιδίνης και του GMP στη χημική μετατόπιση του πρωτονίου H2 ή του άνθρακα C2 του ιμιδαζολικού δακτυλίου ενίσχυσε προηγούμενες υποθέσεις [69] ότι τα επίπεδα της βάσης του νουκλεοζίτη ή του νουκλεοτιδίου και του ιμιδαζολικού δακτυλίου είναι σχεδόν κάθετα μεταξύ τους.



Σχήμα 8: Κρυσταλλική δομή του μορίου του συμπλόκου Pd(Gly-L-Tyr)(Cyd).

Τριαδικά σύμπλοκα των ATP και AMP με σύμπλοκα του Pd(II) με τα διπεπτίδια Gly-L-Ala, Gly-L-Phe και Gly-L-Tyr, μελετήθηκαν σε υδατικά διαλύματα με φασματοσκοπία 1H -NMR [74]. Τα νουκλεοτίδια ενώνονται με το μέταλλο είτε μονοδοντικά μέσω του αζώτου N1 ή του αζώτου N7 είτε διδοντικά μέσω και των δύο αζώτων N1 και N7. Η συμπλοκοποίηση του νουκλεοτιδίου πραγματοποιείται στη τέταρτη θέση του επιπέδου τετραγωνικού συμπλόκου του Pd(II), ενώ οι άλλες τρεις

Επίσης στο μονομερές σύμπλοκο του τύπου Pd-N1 παρατηρούνται ισχυρές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις συσσώρευσης μεταξύ του σχηματιζόμενου μονομερούς συμπλόκου και του αρχικού συμπλόκου Gly-Tyr-Pd(II). Ο δακτύλιος της πουρίνης είναι σχεδόν κάθετος προς το ισημερινό επίπεδο του συμπλόκου του Pd(II), παρόλο που ο αρωματικός δακτύλιος της αλυσίδας του διπεπτιδίου είναι αρκετά ογκώδης.

Μελέτες φασματοσκοπίας μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού του συστήματος Pd(II)glycyl-L-histidine και ATP [69], οδήγησαν στα εξής συμπεράσματα: Το διπεπτίδιο είναι ενταγμένο στο μέταλλο τριδοντικά, μέσω του N1 αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστοδίνης, του πεπτιδικού αζώτου (N⁻) και της αμινομάδας (-NH₂) της γλυκίνης σε pH>4. Μετά την προσθήκη ATP στο διάλυμα σε αναλογίες 1:1 ή 1:2 ως προς το αρχικό δυαδικό σύμπλοκο, ανιχνεύονται δυο κυρίως προϊόντα: ένα μονομερές, στο οποίο το μέταλλο συνδέεται μονοδοντικά μέσω του αζώτου N1 του νουκλεοτιδίου Pd-N1 και ένα διμερές Pd-N1+Pd-N7. Ο σχηματισμός του διμερούς πραγματοποιείται πιο δύσκολα, σε σχέση με τα προηγούμενα δυο συστήματα, λόγω της δυσκολίας σχηματισμού του δεσμού Pd-N7, εξαιτίας της ύπαρξης ογκώδους υποκαταστάτη. Σημαντικές παρατηρήσεις στο εν λόγω σύστημα ήταν η σχεδόν κάθετη θέση του επιπέδου του πουρινικού δακτυλίου με το επίπεδο του συμπλόκου, καθώς και η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων συσσώρευσης μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου της ιστοδίνης και των μορίων του νουκλεοτιδίου, οι οποίες ίσως να συμβάλλουν επίσης στην αλλαγή των συνθηκών συμπλοκοποίησης.

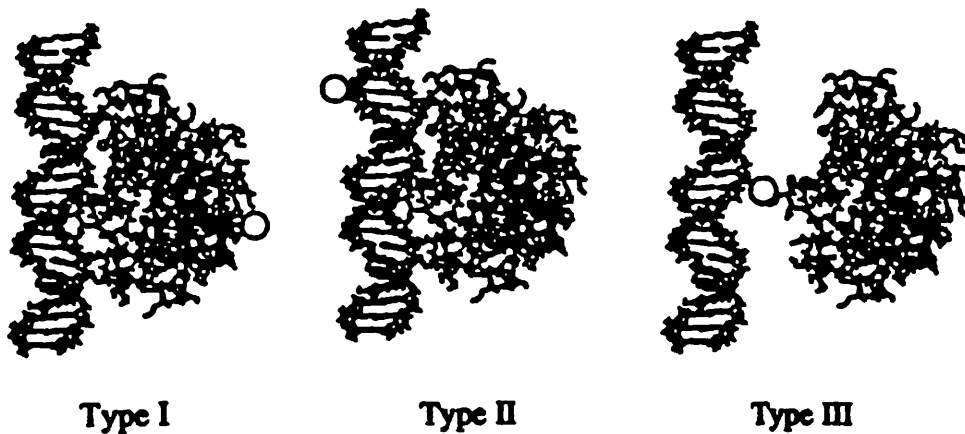
Η αντίδραση μεταξύ του διπυρηνικού συμπλόκου {Pd(Pro)O}₂ με τους νουκλεοζίτες ινοσίνη και γουανοσίνη (Nucl) σε υδατικό διάλυμα, έδωσε τριαδικά σύμπλοκα του τύπου {Pd(Pro)(Nucl-H⁺)}, τα οποία έχουν μάλλον πολυμερή δομή, στην οποία ο νουκλεοζίτης δρα ως γέφυρα μεταξύ των δυο γειτονικών ατόμων Pd, μέσω του αζώτου N7 και του εξωκυκλικού οξυγόνου O6. Η ίδια αντίδραση σε διαλύματα DMSO

το κεντρικό μεταλλικό ιόν, όπως [61,62]: 1) δεσμοί υδρογόνου μεταξύ πολικών ή φορτισμένων ομάδων, 2) ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντίθετα φορτισμένων ομάδων, 3) υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μη⁻ πολικών αλειφατικών και αρωματικών ομάδων, 4) αλληλεπιδράσεις συσσώρευσης (stacking) μεταξύ αρωματικών δακτυλίων και 5) μέσω μετάλλου ηλεκτρονικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός π-δότη και ενός π-δέκτη, ενταγμένους στο μέταλλο. Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις είναι πιθανόν να συμβάλλουν στη σταθερότητα των τριαδικών αυτών συμπλόκων, και ιδιαίτερα σε αυτά του τύπου III, των οποίων η σταθερότητα παρουσιάζεται αυξημένη [63].

Το 0.15% της συνολικής δράσης του cis-DDP αφορά στο σχηματισμό διασταυρούμενων δεσμών, του τύπου DNA-Pt-πρωτεϊνών, που είναι σύμπλοκα τύπου III [27]. Το trans-DDP, το οποίο δεν παρουσιάζει αντικαρκινική δράση και έχει μεγαλύτερη τοξικότητα από το cis ανάλογο, αντιδρά πιο εύκολα για το σχηματισμό συμπλόκων DNA-Pt-πρωτεϊνών [64]. Κατά συνέπεια, ο σχηματισμός των τριαδικών αυτών συμπλόκων από το cis-DDP, έχει συνδεθεί με την τοξικότητα του φαρμάκου.

Η βιβλιογραφία η σχετική με τη σύνθεση και μελέτη τριαδικών συμπλόκων Pt(II) με αμινοξέα-πεπτίδια και νουκλεοβάσεις-νουκλεοζίδες-νουκλεοτίδια, ως μοντέλα για τα βιολογικά συστήματα τύπου DNA-Pt-πρωτεϊνών δεν είναι πλούσια [65,66]. Αρκετά τριαδικά σύμπλοκα έχουν συντεθεί, χρησιμοποιώντας παλλάδιο Pd(II) αντί λευκοχρύσου Pt(II). Αυτό γιατί το Pd(II) αντιδρά 10^5 φορές ταχύτερα από το Pt(II), ενώ και τα δύο μέταλλα έχουν την ίδια περίπου ιονική ακτίνα, προτιμούν ως δότες άτομα αζώτου από άτομα οξυγόνου και σχηματίζουν επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα.

ένα νουκλεϊνικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια συνδέεται με μια πρωτεΐνη, σχηματίζοντας τριαδικά σύμπλοκα τύπου II. Τέλος, μεταλλικά ιόντα μπορούν να δράσουν σαν γέφυρες, σε διασταυρούμενους δεσμούς μεταξύ πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων, σχηματίζοντας τριαδικά σύμπλοκα τύπου III.



Σχήμα 7: Βασικοί τύποι συμπλόκων μεταλλικού ιόντος-DNA-πρωτεΐνης. Οι κύκλοι αντιπροσωπεύουν μεταλλικά ιόντα.

Κρυσταλλογραφική ανάλυση ακτίνων-Χ του συμπλόκου Zif268-DNA, το οποίο περιέχει πρωτεΐνες δακτύλων ψευδαργύρου (zinc fingers proteins) [52], παρέχει ένα ενδιαφέρον παράδειγμα συστήματος τύπου I. Στη δομή αυτή, οι περιοχές δεσμού με το DNA μιας πρωτεΐνης ποντικού, η οποία ονομάζεται Zif268, βρίσκονται στη μεγάλη αύλακα της έλικας του B-DNA. Σε κάθε μια από αυτές τις περιοχές, το κεντρικό ιόν ψευδαργύρου σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με δυο κυστεϊνικά και δυο ιστιδινικά τμήματα. Τρεις από αυτές τις πρωτεΐνες δακτύλων ψευδαργύρου σχηματίζουν ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου με τις βάσεις της μεγάλης αύλακας του B-DNA.

Ένα σύμπλοκο τύπου II σχηματίζεται κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ της κίνησης των διφωσφορικών οξέων και του συμπλόκου MgADP [53]. Το οκταεδρικό ιόν $Mg(II)$ ενώνεται με τα άτομα οξυγόνου

νεφροτοξικότητα του φαρμάκου σε σύγκριση με τα ανάλογα του proplatin και Paraplatin [36].

Το trans-DDP δεσμεύεται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το cis-DDP στις πρωτεΐνες ιστόνης [37], ενώ το cis-DDP αντιδρά ταχύτερα με μη ιστονικές πρωτεΐνες [38].

Οι διασταυρούμενοι δεσμοί DNA-Pt-πρωτεϊνών σχηματίζονται και από τα δυο ισομερή με τις μη ιστονικές πρωτεΐνες κυττάρων HeLa, αν και σε μεγαλύτερο ποσοστό για το trans-DDP. Και τα δυο ισομερή δεσμεύονται σε αυτές σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τις ιστονικές πρωτεΐνες, λόγω μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε μεθειονίνη των τελευταίων [39,40]. Τέτοιοι διασταυρούμενοι δεσμοί είχαν συσχετιστεί με την αντικαρκινική ή την κυττοτοξική δράση του φαρμάκου [41-43], κάτι που σήμερα δε θεωρείται πιθανό, λόγω του πολύ μικρού ποσοστού σχηματισμού τους [27].

Σημαντικές είναι επίσης οι αλληλεπιδράσεις DNA-πρωτεϊνών, όταν σχηματιστούν οι 1,2-τύπου διασταυρούμενοι δεσμοί με το cis-DDP. DNA πολυμεράσες διαφόρων προελεύσεων μπλοκάρονται από τα προϊόντα προσθήκης που σχηματίζονται από το cis-DDP, αναμιγνυόμενες έτσι με τη διαδικασία της αντιγραφής. Είναι γνωστό ότι αντίδραση πρωτεϊνών με πλατινιωμένο DNA συμβαίνει για τις πρωτεΐνες που πρόσφατα ανακάλυψε η ομάδα του S. J. Lippard, τις ονομαζόμενες Πρωτεΐνες Αναγνώρισης Βλαβών του DNA (DNA Damage Recognition Proteins-DRPs) [44]. Οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζουν, δηλαδή συμπλοκοποιούνται εκλεκτικά, μόνο με τους 1,2-d(GpG) και 1,2-d(ApG) ενδοκλωνικούς δεσμούς του cis-DDP με το DNA [45] και όχι με άλλους τύπους συμπλόκων του λευκοχρύσου με το DNA ή με σύμπλοκα που δημιουργούνται κάτω από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Μια και είναι απίθανο βιολογικά συστήματα να αναπτύξουν μια πρωτεΐνη, με σκοπό αυτή να αλληλεπιδράσει ειδικά με τα σύμπλοκα DNA-cisplatin, οι πρωτεΐνες αυτές πρέπει να αναγνωρίζουν μια αλλαγή στη διαμόρφωση του DNA, η οποία είναι κοινή και σε περιοχές DNA-Pt αλλά και σε

ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ [29]. Οι σχετικές αναλογίες των προϊόντων προσθήκης ήταν: cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{GpG})\}]$, 47-50%, cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{ApG})\}]$, 23-28% (ΕΔΔ με γειτονικές βάσεις), cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{GMP})_2\}]$, 8-10% (το σύνολο ΕΔΔ μεταξύ μη γειτονικών βάσεων και ΔΔΔ) και $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_3\{\text{d}(\text{GMP})\}]$ 2-3% (μονοδοντικά προϊόντα). Μια άλλη μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ανάλογες μέθοδοι, έδωσε το παρακάτω φάσμα προϊόντων προσθήκης: cis- $[\text{Pt}(\text{en})\{\text{d}(\text{GpG})\}]$, 65%, cis- $[\text{Pt}(\text{en})\{\text{d}(\text{ApG})\}]$, 25% και cis- $[\text{Pt}(\text{en})\{\text{d}(\text{GpNpG})\}]$, 6%, για την ένωση $[\text{cis-}[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}_2]$ [30].

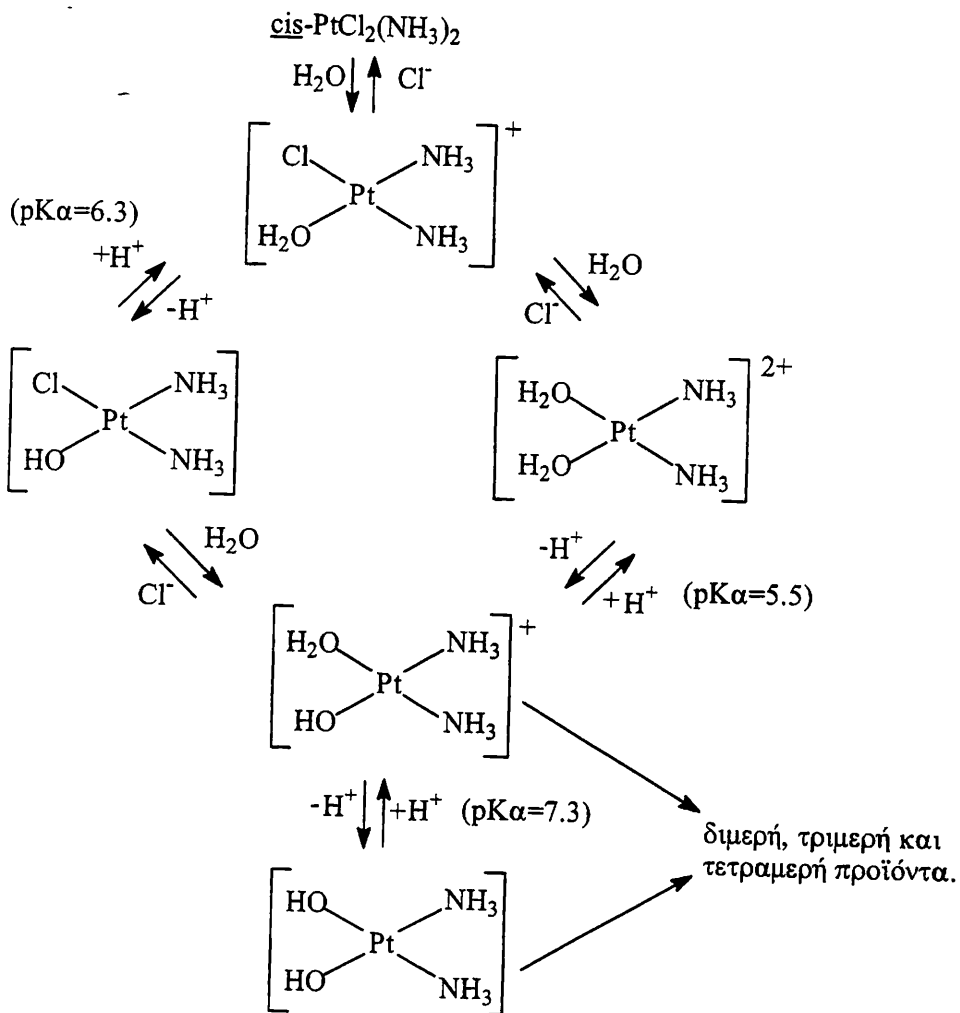
Σε μελέτες *in vivo* επίσης, κατά τις οποίες χορηγήθηκε cisplatin σε 7 καρκινοπαθείς για πρώτη φορά και στη συνέχεια συλλέχθηκαν λευκά αιμοσφαίρια από αυτούς, παρατηρήθηκαν ανάλογα προϊόντα [31]. Ύστερα από απομόνωση του DNA, ενζυματική αποικοδόμησή του και χρωματογραφικό διαχωρισμό των προϊόντων και με τη χρήση αντισωμάτων που δημιουργούνται εναντίον των cis-DDP-DNA προϊόντων προσθήκης, το φάσμα προϊόντων που ελήφθη για έναν ασθενή ήταν το εξής:

cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{GpG})\}]$, 65%, %, cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{ApG})\}]$, 22%, cis- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{d}(\text{GMP})_2\}]$, 13% και $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_3\{\text{d}(\text{GMP})\}]$, 0.7%.

Παρόλη την ύπαρξη σημαντικών διαφορών στο συνολικό επίπεδο των προϊόντων προσθήκης μεταξύ των ασθενών, οι σχετικές ποσότητες αυτών παρέμεναν σταθερές σ'όλους τους ασθενείς.

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια θετική σχέση μεταξύ της αντίδρασης της ασθένειας και του σχηματισμού ενδοκλωνικών διασταυρούμενων δεσμών για τον καρκίνο των όρχεων καθώς και τον καρκίνο των ωοθηκών.

Δυστυχώς πολύ λιγότερες πληροφορίες έχουμε για το κλινικά ανενεργό trans ισομερές. Σημαντικό στοιχείο είναι πάντως το ότι, αντίθετα με το cis ισομερές, το trans-DDP είναι αδύνατο στερεοχημικά να σχηματίσει 1,2-ενδοκλωνικά διασταυρούμενους δεσμούς (ΕΔΔ) μεταξύ γειτονικών νουκλεοβάσεων [32].

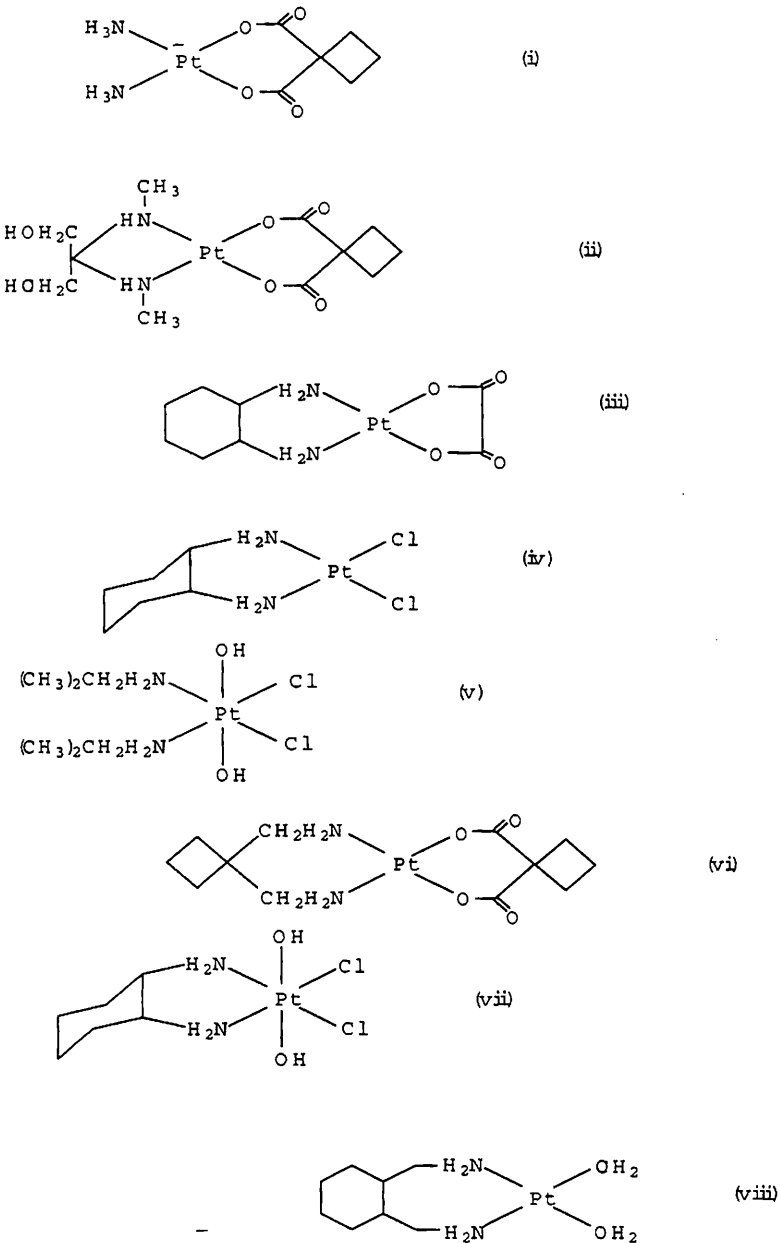


Σχήμα 5: Αντιδράσεις υδρόλυσης του cisplatin.

Μόρια που περιέχουν θείο ή άζωτο ως άτομα δότες μπορούν να δράσουν σαν υποκαταστάτες, ώστε να σχηματίσουν σταθερά σύμπλοκα με το σχετικά αδρανές μέταλλο Pt(II) (“μαλακό” ή b τάξης οξύ) [20α]. Το cisplatin αντιδρά επομένως με πολλά συστατικά του κυττάρου, γεγονός που ερμηνεύει την τοξικότητά του. Είναι όμως πιθανότερο η αντικαρκινική του δράση να σχετίζεται με την αντίδρασή του με ετεροκυκλικά άτομα αζώτου των βάσεων του DNA [20β].

Σήμερα είναι γενικά αποδεκτό ότι το DNA είναι ο πρωταρχικός στόχος του cis-DDP στα καρκινικά κύτταρα in vivo, επειδή το φάρμακο έχει τις παρακάτω βιολογικές ιδιότητες: Προκαλεί: α) νηματώδη

cisplatin, μηχανισμού που αν εξιχνιαστεί θα μας επιτρέψει τη σύνθεση νέων φαρμάκων σαφώς πιο αποτελεσματικών.



Σχήμα 3: Μερικά νεότερα αντικαρκινικά σύμπλοκα των Pt(II) και Pt(IV):

(i) Carboplatin ή Paraplatin ή JM-18 ή CBDA ή cis-διάμινο-[O,O'-1,1-κυκλοβουτανο-δικορβοξυλάτο]λευκόχρυσος(II), (ii) Zenoiplatin ή CL86,558 ή [N,N'-2,2-δισ(αμινομεθυλ)-1,3-προπανοδιόλη][O,O'-1,1-κυκλοβουτανο-δικορβοξυλάτο] λευκόχρυσος (II), (iii) Oxaloplatin ή Oxaloplatinum ή cis-(N,N-1,2-διαμινοκυκλοεξάνιο)-(trans-1)-οξαλατο-λευκόχρυσος (II) ή 1-OHP, (iv) DACH-Pt ή cis-(N,N-1,2-διαμινοκυκλοεξάνιο)-(trans-1)-διχλωρο-λευκόχρυσος (IV), (v) Irproplatin ή CHIP ή cis-(δισ-ισοπροπυλαμίνη)-(trans-1)-διυδροξο-cis-διχλωρο-λευκόχρυσος (IV), (vi) Enloplatin ή CL287,110 ή [O,O'-1,1-κυκλοβουτανο-δικορβοξυλάτο][N,N-τετραυδρο-4H-πυραν-4,4-διμεθαναμίνη] λευκόχρυσος (II), (vii) Tetraplatin ή Ormaplatin ή NSC 363812 ή Τετραχλωρο-[N,N-(d,1-trans)-1,2-διαμινοκυκλο-εξάνιο] λευκόχρυσος (II), (viii) Spiroplatin ή TNO-6 ή [N,N-(1,1-δισ-αμινομεθυλ)-κυκλοεξάνιο](σουλφατο)(υδατο) λευκόχρυσος (II).

Η ικανότητα της ένωσης αυτής (cisplatin) να αναστέλλει την κυτταρική διαίρεση των βακτηριδίων, χωρίς να τα καταστρέφει, οδήγησε στην υπόθεση ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινική ουσία. Πράγματι, έρευνες της επίδρασής του σε γοργά διαιρούμενα καρκινικά κύτταρα θηλαστικών έδειξε σημαντική αντικαρκινική δράση του συμπλόκου εναντίον των καρκινωμάτων Sarcoma 180 και Leukemia L1210 σε λευκά ελβετικά ποντίκια [5,6].

Σύντομα επιχειρήθηκαν κλινικές δοκιμές, οι οποίες έδειξαν πολύ καλή αντικαρκινική δράση του cis-DDP [7]. Παρατηρήθηκαν όμως διάφορες παρενέργειες όπως ναυτία, έμετος και κυρίως νεφροτοξικότητα. Το πρόβλημα της νεφροτοξικότητας αντιμετωπίστηκε με την υπερενυδάτωση του ασθενούς και χορήγηση διουρητικών, συνήθως διαλύματος μανιτόλης [8], καθώς και με την ταυτόχρονη χορήγηση νουκλεοφιλικών θειολών και θειεστέρων, με αποτέλεσμα να είναι δυνατό να χορηγηθούν μεγαλύτερες δόσεις φαρμάκου (cisplatin) [9,10]. Παράλληλα εφαρμόστηκε συνδυαστική θεραπεία, δηλαδή ταυτόχρονη χορήγηση άλλων αντικαρκινικών φαρμάκων π.χ. 5-Fluorouracil [7], arabinofuranosylcytosine [11] ή arbidicolin και hydroxyourea [12].

Η ουσία cis-Pt(NH₃)₂Cl₂ (άλας του Peyron) εγκρίθηκε για κλινική χρήση ως φάρμακο στις ΗΠΑ το Δεκέμβριο του 1978 από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (F.D.A.), με το όνομα "Platinol" και στη Μεγάλη Βρετανία το Μάρτιο του 1979 από το Τμήμα Συστήματος Υγείας και Ασφάλειας με το όνομα "Neoplatin".

Από το 1983 και μετά, γίνεται πρώτα στις ΗΠΑ και κατόπιν παγκόσμια το πρώτο σε πωλήσεις αντικαρκινικό φάρμακο. Στην ελληνική αγορά κυκλοφορεί με τις ονομασίες: "Platinol" από τις SQIBB-Bristol Myers Co. και "Platamine" από την Pharmitalia Carlo Erba.

1.2.	Όργανα	204
1.3.	Παρασκευή των αρχικών δυαδικών συμπλόκων	206
1.3.1.	cis-[(NH ₃) ₂ Pt(amac)]NO ₃	206
1.3.2	cis-Cl ₂ Pt(dipeptidester) ₂	206
1.4.	Παρασκευή των τριαδικών συμπλόκων	206
1.4.1.	Σύμπλοκα του τύπου cis-[(NH ₃) ₂ Pt(nucl)(amac)]NO ₃ , όπου nucl=γουανοσίνη (i) ή κυτιδίνη (ii) και amac=glyO ⁻ , L-alao ⁻ , L-2-abao ⁻ , L-nvalO ⁻ , L-nleuo ⁻ .	206
1.4.2.	Σύμπλοκα του τύπου cis-[(nucl) ₂ Pt(dipeptidester)]Cl ₂ , όπου nucl=γουανοσίνη (i), κυτιδίνη (ii) και dipeptidester=glyglyOEt, glyalaOMe, gly-2-aboMe, glynvalOMe, glynleuoMe.	207
1.5.	Παρασκευή των δευτεριωμένων αναλόγων των συμπλόκων	208
2.	¹H-NMR μελέτη της αλληλεπίδρασης συμπλόκων παλλαδίου με διπεπτίδια με το δωδεκανουκλεοτίδιο d(CGCGAATTCGCG)₂	208
2.1.	Αντιδραστήρια	208
2.2.	Φασματοσκοπία ¹ H-NMR	210
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	212
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	233

4.	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	70
	ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
1.	ΔΥΑΔΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΛΕΥΚΟΧΡΥΣΟΥ ΜΕ ΕΣΤΕΡΕΣ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΩΝ	72
1.1.	Εισαγωγή	72
1.2.	Σύνθεση εστέρων των διπεπτιδίων	75
1.3.	Σύνθεση των δυαδικών συμπλόκων του λευκοχρύσου (II) με τους εστέρες των διπεπτιδίων	76
1.4.	Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$	77
2.	ΤΡΙΑΔΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΛΕΥΚΟΧΡΥΣΟΥ(II) ΜΕ ΤΟΥΣ ΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ ΓΟΥΑΝΟΣΙΝΗ ΚΑΙ ΚΥΤΙΔΙΝΗ ΚΑΙ ΔΙΠΕΠΤΙΔΕΣΤΕΡΕΣ	88
2.1.	Εισαγωγή	88
2.2.	Σύνθεση των τριαδικών συμπλόκων	90
2.3.	Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	91
2.4.	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων ($^1\text{H-NMR}$)	100
2.4.1.	Θέσεις δεσμών των υποκαταστατών	100
(i)	Τριαδικά σύμπλοκα με γουανοσίνη	100
(ii)	Τριαδικά σύμπλοκα με κυτιδίνη	102
2.4.2.	Διαμόρφωση του σακχάρου	119
(i)	Διαμόρφωση του δακτυλίου της ριβόζης του νουκλεοζίτη	120
(ii)	Διαμόρφωση γύρω από το δεσμό $\text{C}_4\text{-C}_5$	124
(iii)	Διαμόρφωση γύρω από τον γλυκοζιτικό δεσμό	126
2.4.3.	Διαμόρφωση γύρω από το δεσμό $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ των διπεπτιδίων	128
2.5.	Φασματοσκοπία $^{13}\text{C-NMR}$	130
2.6.	Συμπεράσματα	137
3.	ΤΡΙΑΔΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΛΕΥΚΟΧΡΥΣΟΥ(II) ΜΕ ΤΟΥΣ	139

Η διάρκειας τριών χρόνων υποτροφία που μου παρείχε το ίδρυμα Μποδοσάκη, με βοήθησε σημαντικά ώστε να αφοσιωθώ πιο εύκολα στην εργασία που απαιτούσε η διατριβή μου. Ευχαριστώ το ίδρυμα Μποδοσάκη για τη βοήθεια αυτή.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και στο σύζυγό μου, που ήταν πάντα δίπλα μου και με ενθάρρυναν στην προσπάθεια αυτή.

