

**Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Χημείας**

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης στην Βιοανόργανη Χημεία

**Φασματοσκοπική μελέτη των προϊόντων της
αλληλεπίδρασης των ισομερών συμπλόκων *trans*- και
cis-RuCl₂(DMSO)₄ με το τρινουκλεοτίδιο ApGrA**

**Χριστοφής Πέτρος
Χημικός**

**Αθήνα
2003**

Confirmation

We would like to assure that Professor Dr Dimitra Kovala-Demertzi in the frame of a Socrates Erasmus bilateral agreement between University of Sofia and University of Ioannina visited our University and gave lectures 8 hours in postgraduated students of Faculty of Biology

D.Kovala-Demertzi

Από: "Dodoff" <dodoff@obzor.bio21.bas.bg>
Προς: "D.Kovala-Demertzi" <dkovala@cc.uoi.gr>
Αποστολή: Τετάρτη, 17 Σεπτεμβρίου 2003 5:20 μμ
Θέμα: substances etc.

Dear Professor Kovala-Demertzi,

Thank you for your kind message.

I am sorry, but I have to inform you that until now I have done nothing on our joint work. This is because of health reasons. After I returned, I am spending the time in medical examinations because of the cerebro-vascular and other diseases. Now I am not on work; hopefully I will begin working after October 1. Today I have to depart to my home-town to see my father who is also not in good health. The only telephone I have in Sofia is in the Institute: (+359 2) 979 26 63.

Professor Maria Shopova has not worked in the same Institute as me, and I do not know her personally. She is (was) in the Institute of Organic Chemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Acad, G. Bonchev Street, Block 9, 1113 Sofia. As I just learned, she has retired, but time-to-time comes to her Institute. I found telephone numbers of her: (+359 2) 9606 181 (in the Institute), and (+359 2) 65 98 12 (at home).

According to what we have spoken with you, I have taken most of the substances prepared by me in your Laboratory which have been considered as pure - in order to take their elemental analyses and NMR spectra. Also I have sent crystal specimens of [Pt(PT)(DMSO)] to professor J. Kuduk in Wroclaw; I am awaiting to hear from her. As I have told you previously, according to our appointment, I took the substances in order to characterize them, and after everything is done, to start writing the manuscripts. I have left in the refrigerator a labelled tube with the crystals of the Pt(IV) complex of pyruvic acid thiosemicarbazone (H₂PT), together with the mother liquor. I mean the refrigerator which is nearer to the wall separating the two laboratories. I have not taken any starting compound both by you; everything has been left. For instance, the pyruvic acid should be in the same refrigerator mentioned - down, in the boxes. I kindly ask you to note that I have not taken anything just "for my self" and without your permission.

I have not forgotten about the disk. When setting-up my computer in the Institute (which I have not yet done because of the reasons stated above), I will install the programme and send it back to you.

I will try to fulfill my duties toward you. In case my health status does not permit me this, I will inform you, and if you wish, I will give back all

the substances prepared by me in your Laboratory.

Thanking you I remain yours sincerely,

Nicolay I. Dodoff

----- Original Message -----

From: "D.Kovala-Demertzi" <dkovala@cc.uoi.gr>

To: "Dodoff" <dodoff@obzor.bio21.bas.bg>

Subject: Re: gi'risa

Date: 16/09/03 18:00

Dear Nicolay

i hope everything is o.k. with your work and your health there.

we will be there at the end of this month, i hope i will see you; you would like to give me your phone numbers to communicate with you when i will be there. Also, i would like to see the Professor from your Institute who is dealing with porphyrines; it would be easy?

here, i found, one platinum complex with PtGT(DMSO), K₂Pt(OH)₆ one tube without label, one ependorf with AgDicl and one with AuGT; idid not found something with Pt(pyrouvic) even the starting material, pyrouvic acid; do you remember if you have left somewhere else.

best regards

Dimitra

----- Original Message -----

From: Dodoff

To: D.Kovala-Demertzi

Sent: Sunday, August 31, 2003 12:55 PM

Subject: gi'risa

Kathigi'tria' mou,

Chtes to mesime'ri gi'risa sti So'phia. Echo diakope's tora, alla ypa'rchoun polla pra'gmata na kano prin na archi'so tin doulia' mou sto Institutou'to (apo 1 ootovri'o, nomi'zo). Tha sas gra'pso otan echo kani' kati stous X-ray structures.

Sas euchariro' gia ola. Kali' sas me'ra.

Nicolay

Message sent using Godzilla 1.0.1

Message sent using Godzilla 1.0.1

D.Kovala-Demertzi

Από: "Tatiana Varadinova" <tvaradinova@biofac.uni-sofia.bg>
Προς: "D.Kovala-Demertzi" <dkovala@cc.uoi.gr>
Αποστολή: Τετάρτη, 17 Σεπτεμβρίου 2003 2:46 μμ
Θέμα: Re:

Dear Dimitra,

Give me more information about your visit - arrival time, do you need a hotel, duration of the visit.

My telephones are:

Home: 00359-2-98 665 98;

Office: 00359-2-866 00 91

Regards

Tatiana

----- Original Message -----

From: D.Kovala-Demertzi

To: Tatiana Varadinova

Sent: Tuesday, September 16, 2003 7:41 PM

Dear Tatiana

How are you is everything o.k.?

If everything is o.k. with mavroudis we will be in Sofia at 27th of September.

Your phone numbers are the same?

best regards

Dimitra



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Επικ. Καθηγήτρια Δ. Κόβαλα-Δεμερτζή
Ανόργανη Χημεία

Ιωάννινα 4/9/2003

Πτυχιακές εξετάσεις Ιουνίου στο μάθημα Ανόργανη Χημεία ΙΙΙ

Θέμα 1ον. (α) Εκτιμήστε την αναμενόμενη μ_{eff} (MB), εάν αναμένεται παραμόρφωση Jahn-Teller, τον αριθμό των d-d μεταπτώσεων και εάν κατά πόσο αναμένεται σταθεροποίηση του κρυσταλλικού πεδίου για το σύμπλοκο $[VCl_4L_2]$. (β) Το σύμπλοκο $[Cu(NH_3)_4]^+$ είναι άχρωμο σε αντίθεση με το σύμπλοκο $[Cu(NH_3)_4]^{2+}$ που είναι έντονα μπλέ. Το σύμπλοκο $[Co(H_2O)_6]^{2+}$ είναι πολύ ανοιχτό ροζ, ενώ το σύμπλοκο $[CoCl_4]^{2-}$ είναι βαθύ μπλε. Τα σύμπλοκα $[Au(CN)_4]^-$ και $[Co(CN)_6]^{3-}$ σχηματίζουν λευκούς κρυστάλλους όταν συνδυασθούν με άχρωμα κατιόντα. Αιτιολογείστε.

Θέμα 2^{ον}. Το σύμπλοκο $[CoF_3(H_2O)_3]$ είναι παραμαγνητικό, ενώ το σύμπλοκο $[Co(en)_3]$ είναι διαμαγνητικό. Εξηγήστε την δομή των συμπλόκων αυτών ενώσεων με την θεωρία του κρυσταλλικού πεδίου και την θεωρία των μοριακών τροχιακών. Προβλέψατε τον αριθμό των ισομερών που θα προκύψει για το καθένα από τα δύο αυτά σύμπλοκα.

Θέμα 3^{ον}. (α) Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα φάσματα των συμπλόκων ενώσεων $[MX_6]^{2-}$ όπου $M = Ti(IV)$ και $Zr(IV)$ $X = Cl$ και Br .

Ενώση	Απορρόφηση (A) σε cm^{-1}	Απορρόφηση (A) σε cm^{-1}
$[TiCl_6]^{2-}$	31.850	42.500
$[TiBr_6]^{2-}$	25.200	36.500
$[ZrCl_6]^{2-}$	42.400	
$[ZrBr_6]^{2-}$	38.900	50.000

Που οφείλονται οι απορροφήσεις αυτές; Εξηγήστε τα πειραματικά αυτά δεδομένα με την θεωρία των μοριακών τροχιακών και τις τάσεις που παρατηρούνται στον πίνακα αυτό.

(β) Σχεδιάστε την σύνθεση των *cis*- και *trans*- $[PtCl_2(NO_2)(NH_3)]^-$ από το $[PtCl_4]^{2-}$ ($NH_3 < Cl < NO_2$).

Θέμα 4ον. (α) Σχεδιάστε την μοριακή δομή των ακολούθων συμπλόκων. (α) *Trans*-δισ(τριφένυλφωσφίνη)διβρομολευκόχρυσος(II). τρι- μ -καρβόνυλ-δισ (τρικαρβόνυλ σίδηρος). (β) Ονομάστε τις ενώσεις $[Br_4Re-ReBr_4]^{2-}$, $[CoCl_3(NH_3)_3]$. (γ) Το σπινέλιο $NiFe_2O_4$ έχει κανονική ή ανάστροφη δομή; Αιτιολογείστε

Θέμα 5^{ον}. (α) Οι ενώσεις $[CoCl_2(py)_2]$, $[NiBr_2(Ph_2AsO)_2]$ είναι τετραεδρικές ενώ η ένωση $[NiCl_2(py)_2]$ είναι οκταεδρική. Ονομάστε, σχεδιάστε τις τρεις αυτές ενώσεις και εξηγήστε τις διαφορές στην γεωμετρία τους (β) Ποιο από τα παρακάτω σύμπλοκα $[Ni(H_2O)_6]$, $[Ni(NH_3)_6]$ και $[Ni(Phen)_3]$ περιμένετε να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματική μαγνητική ροπή, μ_{eff} , και γιατί; (Το λ έχει θετικό πρόσημο για διαμορφώσεις d^1-d^4 και αρνητικό για d^6-d^9 διαμορφώσεις).

**Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Χημείας**

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Ειδίκευσης στην Βιοανόργανη Χημεία

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Κεσσίσογλου Δ. – Καθηγητής στο Τμήμα Χημείας του
Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Κόβαλα-Δεμερτζή.Δ – Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος
Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δρ. Ν.Κατσαρός – Ερευνητής Α' ΕΚΕΦΕ 'Δημόκριτος'

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη των προϊόντων της αλληλεπίδρασης των αντικαρκινικών ενώσεων trans- και cis-RuCl₂(DMSO)₄ με το τρινουκλεοτίδιο ApGrA.

Εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοανόργανων Υλικών και Βιομορίων στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» υπό την επίβλεψη του Ερευνητή Α' Δρ.Ν.Κατσαρού. εντάσσεται στα πλαίσια του Διαπανεπιστημιακού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών της Βιανόργανης Χημείας, το οποίο έχει την βάση του στο τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επικεφαλής του προγράμματος σπουδών της Βιοανόργανης Χημείας, κ.Ν.Χατζηλιάδη που με δέχτηκε στο πρόγραμμα. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ.Ν.Κατσαρό που με δέχτηκε στην ερευνητική του ομάδα και μου ανέθεσε το θέμα του μεταπτυχιακού.

Οφείλω ωστόσο πολλές ευχαριστίες σε δυο άτομα που βρίσκονται στον Δημόκριτο. Αφενός θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ.Α.Αναγνωστοπούλου με την οποία είχαμε ιδιαίτερα παραγωγική συνεργασία, αποφασίσαμε την πορεία της ερευνητικής δουλειάς και με την εμπειρία της καθοδήγησε την αρχική πορεία της εργασίας αυτής. Αφετέρου οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Α.Παπακυριακού που ουσιαστικά σήκωσε το μεγαλύτερο βάρος στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Η μεγάλη του εμπειρία στη φασματοσκοπία NMR και η απλόχερη συνεργασία του βοήθησε καταλυτικά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Περιεχόμενα

ΜΕΡΟΣ Α - Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο I	3
Μεταλλικά ιόντα στην Ιατρική Χημεία.....	3
1. Ιστορία μεταλλικών συμπλόκων στην Ιατρική.....	4
2. Σχεδιασμός νέων αντικαρκινικών φαρμάκων Pt.....	6
2.1. Σύμπλοκα Pt(IV).....	7
2.2. Σύμπλοκα Pt trans γεωμετρίας.....	7
2.3. Πολυπυρηνικά σύμπλοκα Pt.....	7
2.4. Κλινική επισκόπηση.....	8
3. Μεταλλικές ενώσεις Ru, με φαρμακολογική δράση.....	8
4. Αντικαρκινικές ενώσεις Ru.....	9
4.1 Σύμπλοκα Ru(II) της μορφής RuX ₂ (DMSO) ₄	10
4.2 Σύμπλοκα Ru(III) με N-ετεροκυκλικές ενώσεις.....	11
4.3 Οργανομεταλλικά σύμπλοκα Ru(II).....	12
Κεφάλαιο II.....	13
Χημειοθεραπεία με μεταλλικά σύμπλοκα- Το παράδειγμα του cisplatin.....	13
1. Μηχανισμός δράσης του cisplatin.....	14
2. Επίδραση του cisplatin στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA.....	16
2.1. Αντιγραφή.....	16
2.2. Μεταγραφή.....	17
2.3. Τελομερή και τελομεράσες.....	17
2.4. Καταστροφή του DNA και απόπτωση.....	18
3. Κυτταρική αντίσταση στο cisplatin- Επιδιόρθωση των adducts.....	18
3.1 Nucleotide excision repair (NER).....	19
3.2 Mismatch repair.....	20
4. Αναγνώριση των adducts από κυτταρικές πρωτεΐνες.....	21
4.1 Πρωτεΐνες επιδιόρθωσης.....	21
4.2 Αρχιτεκτονικές πρωτεΐνες.....	21
5. Συμπεράσματα.....	22
Κεφάλαιο III.....	24
cis και trans - RuCl ₂ (DMSO) ₄	24
1. Εισαγωγή.....	24
2. Χημικές ιδιότητες.....	25
2.1 Σύνθεση και δομή του cis και trans-RuCl ₂ (DMSO) ₄	25
2.2 Χημική συμπεριφορά σε υδατικά διαλύματα.....	25
2.3 Τοξικότητα και αντικαρκινική δράση των συμπλόκων.....	27
2.4 Αλληλεπίδραση των cis- και trans-RuCl ₂ (DMSO) ₄ με DNA <i>in vivo</i>	29
2.5 Αλληλεπίδραση των cis-RuCl ₂ (DMSO) ₄ με DNA <i>in vitro</i>	30
2.6 Αλληλεπίδραση των trans-RuCl ₂ (DMSO) ₄ με DNA <i>in vitro</i>	31
3. Προτεινόμενος μηχανισμό δράσης.....	32
Κεφάλαιο IV.....	34
Η φασματοσκοπία NMR στη μελέτη της δομής και διαμόρφωσης νουκλεοτιδίων και ολιγονουκλεοτιδίων.....	34

1.	Ολιγονουκλεοτίδια.....	34
1.1	Δομικά συστατικά του DNA.....	34
1.2	Δομή και διαμόρφωση νουκλεϊνικών οξέων.....	34
1.3	Γεωμετρικά χαρακτηριστικά νουκλεοτιδίων.....	35
2.	Το NMR στην μελέτη των ολιγονουκλεοτιδίων.....	38
2.1	Χημική μετατόπιση (δ).....	38
2.2	Σταθερά σύζευξης, J.....	39
2.3	T_1 και NOE.....	40
3.	Μελέτη της διαμόρφωσης νουκλεοτιδίων.....	41
3.1	Διαμόρφωση δακτυλίου ριβόζης.....	41
3.2	Διαμόρφωση γλυκοζιτικού δεσμού (χ).....	43

ΜΕΡΟΣ Β - Πειραματικό μέρος

Κεφάλαιο V.....	45
Σκοπός της εργασίας.....	45
Κεφάλαιο VI.....	48
Υλικά και πειραματικές τεχνικές.....	48
1. Χημικά αντιδραστήρια.....	48
2. Μικροσυσκευές και Όργανα.....	48
3. Πειράματα NMR.....	49
3.1 1D Πειράματα NMR.....	49
3.2 2D Πειράματα NMR.....	49
Κεφάλαιο VII.....	51
Αποτελέσματα.....	51
Χαρακτηρισμός του ελεύθερου νουκλεοτιδίου ApGrA.....	51
Κεφάλαιο VIII.....	60
Αλληλεπίδραση του trans-RuCl ₂ (DMSO) ₄ με το ApGrA.....	60
1. Προϊόν I της αντίδρασης του trans-Ru με το ApGrA.....	64
2. Προϊόν II της αντίδρασης του trans-Ru με το ApGrA.....	76
3. Συζήτηση.....	87
ΠΡΟΪΟΝ I.....	87
ΠΡΟΪΟΝ II.....	89
Κεφάλαιο IX.....	91
Αλληλεπίδραση του cis-RuCl ₂ (DMSO) ₄ με το ApGrA.....	91
Κεφάλαιο X.....	96
Συζήτηση.....	96
Συμπεράσματα.....	100
Βιβλιογραφία.....	102

MEROSZA

Κεφάλαιο I

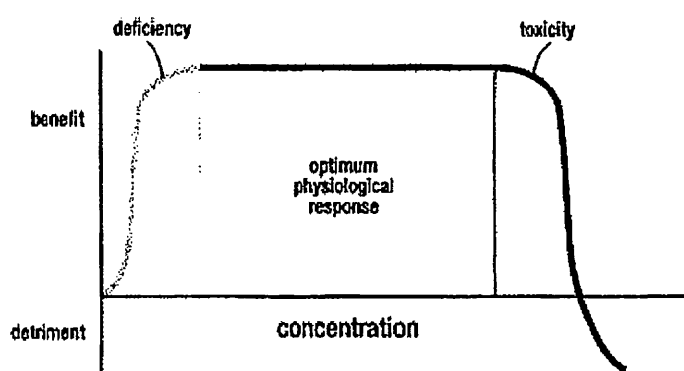
Μεταλλικά ιόντα στην Ιατρική Χημεία¹

Πολλά μεταλλικά στοιχεία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα ζώντα συστήματα. Ένα χαρακτηριστικό των μετάλλων είναι ότι εύκολα χάνουν ηλεκτρόνια από τη μεταλλική τους κατάσταση και σχηματίζουν θετικά φορτισμένα ιόντα που είναι διαλυτά σε βιολογικά υγρά και είναι αυτή η κατιονική μορφή με την οποία συμμετέχουν στην βιολογία. Ενώ τα μέταλλα έχουν έλλειμμα ηλεκτρονίων, τα περισσότερα βιολογικά μόρια, όπως οι πρωτεΐνες και το DNA είναι πλούσια σε ηλεκτρόνια, δίνοντας έτσι την τάση δέσμευσης των μεταλλικών ιόντων και την αλληλεπίδραση τους με βιολογικά μόρια. Η ίδια αρχή εξηγεί και την προτίμηση των μεταλλικών ιόντων για πολλά μικρά μόρια και ιόντα απαραίτητα για τη ζωή, όπως το O₂.

Λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο εύρος αλληλεπιδράσεων των μετάλλων στη βιολογία, δεν πρέπει να είναι έκπληξη ότι η φυσική εξέλιξη έχει ενσωματώσει πολλά μέταλλα σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Τα μέταλλα εκτελούν ένα πλήθος λειτουργιών, όπως μεταφορά οξυγόνου με την αιμογλοβίνη, μια σιδηροπρωτεΐνη που δεσμεύει το οξυγόνο και το μεταφέρει στους κυτταρικούς ιστούς. Μεταλλικά ιόντα όπως ο ψευδάργυρος, διαμορφώνουν ένα δομικό κέλυφος για την δομή zinc-fingers και ρυθμίζουν την λειτουργία των γονιδίων στον κυτταρικό πυρήνα, ενώ παράλληλα είναι ένα φυσικό συστατικό την ινσουλίνης, μιας βασικής στον μεταβολισμό της γλυκόζης ένωσης. Τέλος, μέταλλα όπως χαλκός, σίδηρος και μαγγάνιο ενσωματώνονται σε καταλυτικές πρωτεΐνες, τα μεταλλοένζυμα, που διευκολύνουν μια σειρά από χημικές αντιδράσεις απαραίτητες για τη ζωή.

Εφόσον η φύση έχει κάνει τόσο εκτεταμένη χρήση των μεταλλοϊόντων στα βιολογικά συστήματα, το εύλογο ερώτημα είναι αν αυτά μπορούν να ενσωματωθούν σε σύμπλοκες ενώσεις με ιατρικές προοπτικές. Όταν κάποιος αναφέρεται σε φάρμακα, οι οργανικές ενώσεις βρίσκονται σε πρώτο πλάνο. Ωστόσο τα τελευταία 30 χρόνια υπάρχει μια ραγδαία ανάπτυξη του τομέα της βιολογικής ανόργανης Χημείας και στο πεδίο της ιατρικής και φαρμακευτικής. Η εκούσια εισαγωγή ενός μεταλλικού ιόντος σε ένα βιολογικό σύστημα, είναι είτε για θεραπευτικούς είτε για διαγνωστικούς λόγους. Πριν από μερικά χρόνια ο P.Sadler υποστήριξε ότι τα περισσότερα στοιχεία του περιοδικού πίνακα έχουν πιθανή συμμετοχή στον σχεδιασμό νέων φαρμάκων και διαγνωστικών ενώσεων², ενώ στο πλήθος των εφαρμογών της ανόργανης Χημείας στην ιατρική, περιλαμβάνονται ενεργά σύμπλοκα, ενεργά μεταλλικά ιόντα ή και υποκαταστάτες και πιο συγκεκριμένα αντικαρκινικές ενώσεις, αντιβιοτικά, αντιβακτηριακά, αντιϊικά και αντιαρθρικά. Τέλος στο τομέα της διαγνωστικής έχουμε τα MRI contrast agents.

Κάθε μεταλλικό ιόν ή σύμπλοκο και κατ' επέκταση κάθε χημική ένωση υπόκειται στους περιορισμούς του διαγράμματος Bertrand (σχήμα 1.1), το οποίο εξηγεί την σημασία των στοιχείων³. Η περιοχή της βέλτιστης φυσιολογικής αντίδρασης θα εξαρτάται από το στοιχείο και την οξειδωτική του κατάσταση, επομένως οι περιοχές έλλειψης, τοξικότητας και βέλτιστης φυσιολογικής αντίδρασης ποικίλουν σύμφωνα με το συνδυασμό των μεταβλητών αλλά και από χαρακτηριστικά των υποκαταστατών που ίσως είναι ικανοί να ρυθμίζουν τη μεταφορά του μεταλλικού ιόντος στο βιολογικό σύστημα.



Σχήμα 1.1. Διάγραμμα Bertrand, που παρουσιάζει την σχέση μεταξύ όφελους/κόστους από ένα στοιχείο και τη συγκέντρωσή του. Πολλές σημαντικές διαφοροποιήσεις μπορούν να βρεθούν σε κάθε περιοχή, με εξάρτηση από τη φύση του στοιχείου.

Η ρύθμιση των βιολογικών ιδιοτήτων των μεταλλικών συμπλόκων μέσω της τροποποίησης του υποκαταστάτη, μαζί με το σχεδιασμό υποκαταστατών που αλλάζουν την ομοιότητα ενδογενών μεταλλικών ιόντων, είναι σε θέση να μας παρέχουν νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές ενώσεις και να καταστήσουν την βιολογική ανόργανη χημεία σε επιστήμη κεντρικής σημασίας.

1. Ιστορία μεταλλικών συμπλόκων στην Ιατρική

Η μελέτη της δράσης των ανόργανων ενώσεων και πιο συγκεκριμένα σε ό,τι αφορά τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες για πολλά χρόνια συναντούσε την απροθυμία των επιστημόνων. Πολλές προκαταλήψεις περιέβαλλαν το συγκεκριμένο εγχείρημα, καθώς μεγάλος αριθμός δηλητηριάσεων, κυρίως με βαρέα μέταλλα, δεν ήταν δυνατό να δημιουργήσουν ένα ευνοϊκό περιβάλλον βασικής έρευνας, ενώ δεν επέτρεπαν να συγκροτηθεί η σκέψη ότι τα μέταλλα αυτά σε ένα διαφορετικό

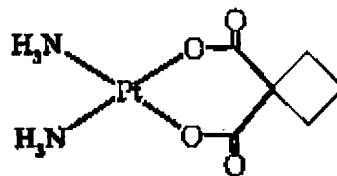
περιβάλλον υποκαταστατών θα μπορούσαν να δώσουν πολύ αποτελεσματικά θεραπευτικά μέσα. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια η έρευνα των ανόργανων συμπλόκων και η εφαρμογή αυτών στην Ιατρική Χημεία, αναπτύσσεται γοργά και συνιστά έναν πολύ ελπιδοφόρο κλάδο με ιδιαίτερες προοπτικές.

Το ερέθισμα που εστίασε το ενδιαφέρον στα μεταλλικά σύμπλοκα, ήταν ουσιαστικά η τυχαία ανακάλυψη από τον Rosenberg⁴, της αναστολής της κυτταρικής διαίρεσης από σύμπλοκα Pt. Μετά από μελέτες διαπίστωσε ότι υπεύθυνος για αυτή τη δράση ήταν ο δίχλωρο διάμμινο λευκόχρυσος ή κοινώς cisplatin. Το cisplatin εισήχθη στην κλινική έρευνα το 1971 και πήρε έγκριση για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών και των όρχεων το 1978. Σήμερα το cisplatin είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα αντικαρκινικά φάρμακα στο κόσμο με ετήσιες πωλήσεις 500 εκ δολαρίων. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στη θεραπεία των τύπων καρκίνου που αναφέρθηκαν πιο πάνω, αλλά παράλληλα συνεισφέρει στην αντιμετώπιση του λυμφώματος, του οστεοσαρκώματος, του μελάνωμα, του καρκινώματος της ουροδόχου κύστης και του νευροβλαστώματος⁵.

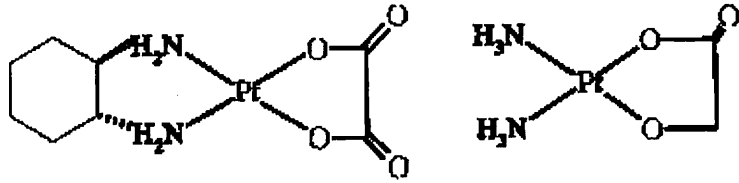
Αν και το cisplatin χρησιμοποιείται για τη θεραπεία πολλών τύπων καρκίνου, η χορήγηση του περιορίζεται σε ένα μικρό εύρος περιπτώσεων κακοήθειας, αφού μερικοί τύποι καρκίνου παρουσιάζουν φυσική ανοχή στο cisplatin, ενώ άλλοι παρουσιάζουν αντίσταση μετά τη χορήγηση. Το cisplatin έχει επιπλέον μειωμένη διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα και χορηγείται ενδοφλεβίως, γεγονός επιβαρυντικό για τον ασθενή. Αυτά τα μειονεκτήματα, παράλληλα με την τοξικότητα, αποτέλεσαν το ερέθισμα για την ανάπτυξη ενός βελτιωμένου αντικαρκινικού φαρμάκου του Pt.

Μετά την εισαγωγή του cisplatin, εκατοντάδες ενώσεις του λευκόχρυσου έχουν συντεθεί και εκτιμηθεί σε ότι αφορά την πιθανή αντικαρκινική δράση τους. Πάνω από 28 ενώσεις έχουν εισαχθεί στις κλινικές δοκιμές⁶ αλλά μόνο το carboplatin (diammine[1,1-cyclobutanedicarboxylato(2-)]-O,O'-platinum(II)), έχει τύχει παγκόσμιας αποδοχής σε ότι αφορά την κλινική χρήση. Το carboplatin είναι λιγότερο τοξικό από το cisplatin και μπορεί να χορηγηθεί σε μεγαλύτερες δόσεις (ως 2000mg/dose). Η χαμηλότερη τοξικότητα του carboplatin σε σύγκριση με το cisplatin, κατέστησε ουσιαστικά δυνατή την παγκόσμια αναγνώριση και χρήση του. Δυστυχώς το carboplatin είναι ενεργό μόνο στο εύρος των τύπων καρκίνου, όπως και το cisplatin και επιπροσθέτως χορηγείται ενδοφλεβίως⁷.

Τα τελευταία χρόνια, δυο ακόμα ενώσεις του λευκόχρυσου έχουν επιτύχει περιορισμένη αποδοχή για χρήση σε ορισμένες χώρες. Συγκεκριμένα το oxaliplatin ή L-OHP (trans-L-diaminocyclohexane oxalato-platinum(II)) έχει λάβει την έγκριση για την θεραπεία μεταστατικού κολοορθικού καρκίνου στην Γαλλία και άλλες Ευρωπαϊκές χώρες⁸. Επίσης το nedaplatin (cis-diammine-glycolato-O,O'-platinum(II)) έχει λάβει έγκριση για χρήση στην Ιαπωνία. Μέχρι τώρα οι προαναφερθείσες ενώσεις δεν έχουν επιδείξει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με το cisplatin και το carboplatin, αν και το



oxaliplatin σε προκλινικές εκτιμήσεις έχει επιδείξει σημαντικές προοπτικές για χρήση σε τύπους καρκίνου όπου το cisplatin έχει επάγει αντίσταση. Επομένως η έρευνα συνεχίζεται για μια βελτιωμένη αντικαρκινική ένωση Pt, με σημαντικό κίνητρο την επιθυμία για σχεδιασμό μιας ένωσης λιγότερο τοξικής, στοματικώς χορηγούμενα, που δεν θα παρουσιάζουν διασταυρωμένη αντίσταση με το cisplatin και carboplatin.



Στα χρόνια που ακολούθησαν την εισαγωγή του cisplatin, η σχεδίαση νέων αντικαρκινικών ενώσεων Pt επικεντρώθηκε κυρίως σε απευθείας ανάλογα του cisplatin, γεγονός που συμβάδιζε με την ιδέα της σχέσης δομής –δραστικότητας που είχε συνοψισθεί από τους Cleare-Hocschele το 1973⁹. Πιο πρόσφατα έχουν γίνει προσπάθειες να σχεδιαστούν νέα σύμπλοκα του Pt βασιζόμενα στην όλο και καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της φαρμακοαντίστασης. Συγκεκριμένα χημικά και δομικά χαρακτηριστικά μπορούν να ενσωματωθούν σε νέες ενώσεις Pt, ώστε να επιτευχθεί ο στόχος της υπερνίκησης του εμποδίου της φαρμακοαντίστασης. Υπήρξαν επίσης και προσπάθειες που στόχευαν στο σχεδιασμό μη συμβατικών συμπλόκων που παραβιάζουν τη σχέση δομής –δραστικότητας, όπως τα διπυρηνικά και τα σύμπλοκα trans γεωμετρίας. Εφόσον η συμπεριφορά τους *in vitro* θα είναι διαφορετική, όπως και ο μηχανισμός δράσης τους, σε σύγκριση με τα cisplatin και carboplatin, υπάρχει η ελπίδα ότι θα υπερνικήσουν την αντίσταση και θα μπορούν να χορηγηθούν σε μεγαλύτερο αριθμό καρκίνων. Τέλος υπήρχε και ενδιαφέρον για σύμπλοκα Pt(IV) για την δυνατότητα τους ως στοματικώς χορηγούμενες ενώσεις.

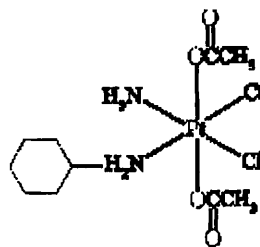
2. Σχεδιασμός νέων αντικαρκινικών φαρμάκων Pt

Από ένα μεγάλο σύνολο ενώσεων του λευκόχρυσου που έχουν εκτιμηθεί σε ότι αφορά την πιθανή αντικαρκινική τους δράση, η πλειονότητα ακολουθεί το δίπτυχο δομή–δράση. Αυτή η σχέση υπαγορεύει ότι για να επιδείξει αντικαρκινική δράση ένα σύμπλοκο Pt(II) ή Pt(IV) θα πρέπει να έχει cis γεωμετρία με γενικό τύπο cis-[PtX₂-(Am)₂] ή cis-[PtX₂Y₂(Am)₂], όπου X είναι μια αποχωρούσα ομάδα και Am είναι μια αδρανής αμίνη με τουλάχιστον μια ομάδα N-H. η αποχωρούσα ομάδα X, θα πρέπει να είναι ανιόν με ενδιάμεση ικανότητα δέσμευσης με τον Pt και ασθενές trans-effect.

Η σχέση δομής–δράσης έχει υπερισχύσει στο σχεδιασμό νέων ενώσεων τα τελευταία χρόνια αφού πρόκειται για συμπεράσματα που προέκυπταν από τις ενώσεις που είχαν ήδη εισαχθεί στην κλινική φάση. Στην συνέχεια θα γίνει μια σύντομη περίληψη των στρατηγικών που έχουν χρησιμοποιηθεί καθώς και των κυριότερων ενώσεων που έχουν προκύψει.

2.1. Σύμπλοκα Pt(IV)

Το πλεονέκτημα αυτής της κατηγορίας είναι ότι πρόκειται για στοματικώς χορηγούμενα. Το ενδιαφέρον γίνεται εντονότερο αφού ένα μέλος, το JM216 βρίσκεται σε κλινική φάση¹⁰, ενώ 2 ακόμα (irproplatin, ornarplatin) δοκιμάστηκαν στην κλινική έρευνα πριν εγκαταλειφθούν λόγω προβλημάτων τοξικότητας.



2.2. Σύμπλοκα Pt trans γεωμετρίας

Σύμφωνα με την αρχική εμπειρική σχέση δομής- δραστηκότητας τα σύμπλοκα trans γεωμετρίας θεωρούνται ανενεργά. Ωστόσο πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν συνθέσει σύμπλοκα που παρουσίασαν δραστηκότητα *in vitro* και *in vivo*. Συγκεκριμένα, επειδή τα σύμπλοκα trans γεωμετρίας σχηματίζουν διαφορετικά DNA adducts, υπήρχε η ελπίδα ότι τα σύμπλοκα αυτά θα μπορούσαν να υπερσχύσουν την φαρμακοαντίσταση σε ορισμένους τύπους καρκίνου, ενώ θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη μνεία στην ανάπτυξη της anti-gene στρατηγικής, όπου κατάλληλα σύμπλοκα trans γεωμετρίας σε ασταθή 1,3 ενδοκλωνικό adduct, μετασχηματίζονται πάνω στο RNA σε σταθερά διακλωνικά, παρεμποδίζοντας τη μετάφραση¹¹.

2.3. Πολυπυρηνικά σύμπλοκα Pt

Η προσέγγιση για τον σχεδιασμό αυτών των συμπλόκων, είναι ότι ενώσεις Pt είναι δυνατόν να παρακάμψουν την φαρμακοαντίσταση αν σχηματίζουν δραστηκά διαφορετικά Pt-DNA adducts. Η ομάδα του Farrell είναι η πλέον ενεργή σε αυτή την κατηγορία και έχουν συνθέσει και μελετήσει διπυρηνικά σύμπλοκα με αλειφατικά linkers. Η δέσμευσή τους είναι για ορισμένα πολύ ταχύτερη σε σχέση με το cisplatin, ενώ σχηματίζουν μια διαφορετική ποικιλία adducts. Το σημαντικότερο από αυτά τα σύμπλοκα είναι ένα τριπυρηνικό σύμπλοκο με τον κωδικό BBR 3464, το οποίο σε προκλινικές δοκιμές και επέδειξε απουσία διασταυρωμένης αντίστασης σε κυτταρικές σειρές που παρουσιάζουν αντίσταση¹². Είναι επίσης σημαντικά πιο δυνατό σε περιπτώσεις οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με το cisplatin, ενώ έχει τροφοδοτήσει τις ελπίδες ότι αυτά τα πολυπυρηνικά σύμπλοκα μπορούν να αποδειχθούν πολύ αποτελεσματικά στο μέλλον.

2.4. Κλινική επισκόπηση

Αν και περίπου 28 ενώσεις του Pt, έχουν δοκιμαστεί κλινικά, τελικά μόνο ένα μικρό σύνολο από αυτές συνεχίζουν να διερευνώνται και μόνο μερικές έχουν πετύχει κλινική αποδοχή. Οι πιο πρόσφατες ενώσεις που έχουν δοκιμαστεί, καθώς και αυτές που έχουν φτάσει σε κλινικό στάδιο παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Κλινική κατάσταση των αντικαρκινικών φαρμάκων λευκόχρυσου

Table 1. Clinical Status of Selected Platinum Antitumor Compounds^a

drug	structure	dose (mg/m ²)	limiting toxicity	clinical status
cisplatin	1	60–120	nephrotoxicity	approved worldwide
carboplatin	3	~900 based on GFR [175–176]	myelosuppression (thrombocytopenia)	approved worldwide
oxaliplatin	4	200	neuropathy	approved in France
nedaplatin	5	80	myelosuppression	approved in Japan
lobaplatin	45	50–70	thrombocytopenia	approved in China phase II
JM-216	14	100–120 (dx5)	myelosuppression	phase II
L-NDDP	46	400	neutropenia, thrombocytopenia	phase II
cycloplatin	42	80–100	myelosuppression	phase II
SKI 2053R	43	360	liver toxicity, myelosuppression, renal toxicity	phase II
ZD0473	6	TBA	TBD	phase I
BBR3464	30	>1.1	neutropenia and nausea and vomiting	phase I
SPI-77		320	TBD	phase I
TRK-710	47	TBA	TBD	phase I
ormaplatin	16	90	unpredictable peripheral neurotoxicity	abandoned
zeniplatin	39	120–145	myelosuppression, nephrotoxicity	abandoned
enloplatin	40	700	nephrotoxicity	abandoned
niboplatin	44	800–1000	myelosuppression	abandoned
CI-973	41	190–300 30 dx5	myelosuppression	abandoned

Είναι προφανές είναι ό,τι η τρίτη γενιά ενώσεων του Pt έχει μετατοπιστεί αρκετά από την εμπειρική σχέση δομής-δραστηριότητας και τη σύνθεση απλών αναλόγων του cisplatin. Αντίθετα οι προσπάθειες επικεντρώνονται στο σχεδιασμό ενώσεων που είναι σε θέση να παρακάμψουν συγκεκριμένους μηχανισμούς αντίστασης καθώς και μη συμβατικών ενώσεων με δραστικά διαφορετικούς τρόπους δράσης.

3. Μεταλλικές ενώσεις Ru, με φαρμακολογική δράση

Ενώ η στατιστική επιτυχία των συμπλόκων ενώσεων μετάλλων, στην εισαγωγή στην κλινική έρευνα, διαμέσου του προγράμματος NIH anticancer screening, είναι περίπου η ίδια σε σύγκριση με τις οργανικές ενώσεις (1 στις 6000 δοκιμαζόμενες ενώσεις), το ρεύμα νέων χημειοθεραπευτικών ενώσεων μετάλλων μετάπτωσης προς την κλινική έρευνα, είναι ουσιαστικά πολύ αργός. Ο Keppler έχει ουσιαστικά αναδείξει την έμφυτη προκατάληψη στις δοκιμές αντικαρκινικών συμπλόκων σε συστήματα κυττάρων και ζώων, που παρουσιάζουν ευαισθησία στο cisplatin, καθώς και την δυσκολία σχηματισμού μεταλλικών συμπλόκων, ιδιαίτερα αυτών με χαμηλή διαλυτότητα¹³.

Η συνθετική χημεία του μετάλλου μετάπτωσης ρουθηνίου είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένη, ειδικότερα με υποκαταστάτες όπως αμίνες, ιμίνες, και παρέχει νέες προσεγγίσεις για νέα και πρωτοποριακά μεταλλοφαρμακευτικά σύμπλοκα. Εξαιτίας της ισχυρής σταθεροποίησης του πεδίου υποκαταστατών, οι πιο κοινές οξειδωτικές καταστάσεις για τα σύμπλοκα Ru είναι II, III και IV, ενώ σε υδατικά διαλύματα τα σύμπλοκα του είναι συνήθως οκταεδρικά και αδρανή σε υποκατάσταση. Η φαρμακολογική δράση του ruthenium red, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως κυτταροτοξικός δείκτης για περισσότερο από έναν αιώνα, είναι πολλά χρόνια γνωστή. Τα πλεονεκτήματα της χρησιμοποίησης συμπλόκων με υποκαταστάτες αμινομάδες στην ανάπτυξη φαρμάκων, είναι η αξιοπιστία στις μεθόδους σύνθεσης σταθερών συμπλόκων με προβλέψιμες δομές, η ικανότητα ρύθμισης της συγγένειας των υποκαταστατών, του ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων και των δυναμικών αναγωγής καθώς τέλος η αυξανόμενη γνώση των βιολογικών επιδράσεων των συμπλόκων ρουθηνίου.

Συνολικά, αυτοί οι λόγοι ανέδειξαν τα σύμπλοκα του ρουθηνίου, σε ενώσεις ικανές να προσεγγίσουν τη θεραπεία από πολλές πλευρές και συγκεκριμένα από το πρίσμα της οξειδοαναγωγικής ενεργοποίησης, της φωτοδυναμικής προσέγγισης, καθώς τέλος και της ραδιοφαρμακευτικής χρήσης¹⁴. Στην συνέχεια θα γίνει μια σύντομη περιήληψη των αντικαρκινικών ιδιοτήτων που έχουν επιδείξει τα σύμπλοκα ρουθηνίου, πριν να επικεντρωθούμε στα σύμπλοκα που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μελέτη.

4. Αντικαρκινικές ενώσεις Ru

Εξαιτίας της οκταεδρικής τους δομής, πιθανώς τα αντικαρκινικά σύμπλοκα Ru(II) και Ru(III) να λειτουργούν με τελείως διαφορετικό τρόπο σε σύγκριση με το cisplatin, το οποίο έχει επίπεδη τετραγωνική δομή και το οποίο δημιουργεί σταυροδεσμούς, κάμπτεται το DNA και επάγει την αναγνώριση του σημείου αυτού από δεσμευτικές πρωτεΐνες DNA (binding proteins). Σε αυτό το σημείο αναδεικνύεται η υπόθεση της «ενεργοποίησης λόγω αναγωγής», όπου θεωρείται ότι τα σύμπλοκα Ru(III), δρουν ουσιαστικά ως προ-φάρμακα και ενεργοποιούνται με αναγωγή *in vivo*, ώστε να συμπλεγθούν γρηγορότερα με βιομόρια¹⁵.

Εφόσον οι όγκοι χρησιμοποιούν το οξυγόνο και άλλα συστατικά και η ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων –διαδικασία γνωστή ως αγγειογένεση– συνήθως πραγματοποιείται με μικρότερο ρυθμό, επικρατούν συνήθως συνθήκες υποξίας στα καρκινικά κύτταρα¹⁶. Συνεπώς τα καρκινικά κύτταρα βασίζονται για την ενέργεια τους στην γλυκόλυση και παράγουν περίσσεια λακτικού οξέος, που χαμηλώνει το pH στα καρκινικά κύτταρα. Εξαιτίας αυτών των μεταβολικών διαφορών, το σχετικό ηλεκτροχημικό δυναμικό στο εσωτερικό του όγκου είναι γενικά χαμηλότερο σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό που τον περιβάλλει, ειδικότερα στο κέντρο του όγκου. Αυτές οι διαφορές

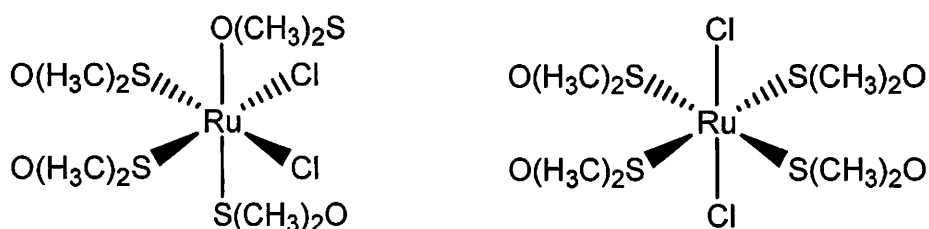
μεταβολισμού στον όγκο σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό, ευνοούν την παραγωγή του Ru(II) σε σχέση με το Ru(III) στα καρκινικά κύτταρα, σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό.

Εν απουσία επιδράσεων π-δεσμών, το χαμηλότερο φορτίο στο Ru(II) το καθιστά περισσότερο ενεργό σε υποκατάσταση σε σχέση με το Ru(III), σε παρόμοιο περιβάλλον συναρμογής. Καθώς κατά την αναγωγή του Ru(III) σε Ru(II) συμπληρώνονται τα $d_{\pi}(t_{2g})$ τροχιακά, οι υποκαταστάτες που είναι π-δότες και συμπλέκονται ισχυρά με το Ru(III) δεν είναι πλέον ικανοί να κάνουν το ίδιο και με το Ru(II) και δεσμεύονται λιγότερο ισχυρά. Η γλουταθειόνη και ένας αριθμός οξειδοαναγωγικών πρωτεϊνών είναι ικανές να ανάγουν τα σύμπλοκα Ru(III) *in vivo*¹⁷, ενώ και πρωτεΐνες μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου, μπορούν να ανάγουν το Ru(III).

Στη συνέχεια θα αναφερθούμε σε ορισμένες κατηγορίες ενώσεων του ρουθηνίου που έχουν επιδείξει αξιοσημείωτες αντικαρκινικές και αντιμεταστατικές ιδιότητες.

4.1 Σύμπλοκα Ru(II) της μορφής $RuX_2(DMSO)_4$

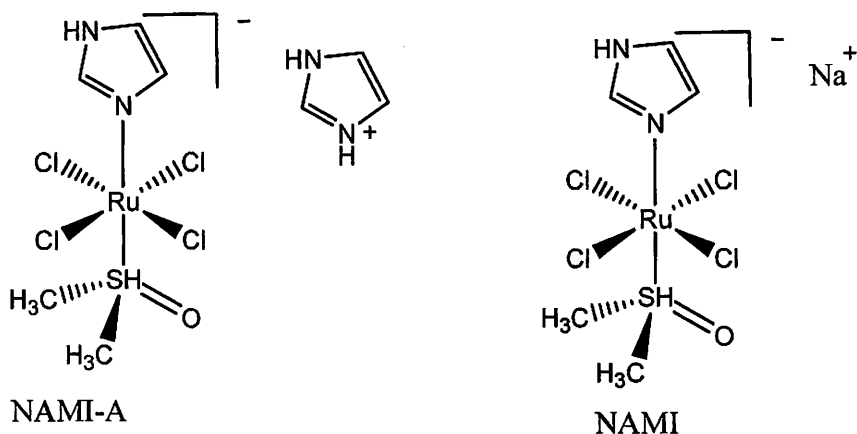
Συγκεκριμένα τα σύμπλοκα του Ru(II) και Ru(III) με DMSO, αποτελούν μια ομάδα αντικαρκινικών ενώσεων που έχει επιδείξει αντιβλαστική δράση συγκρίσιμη με το cisplatin σε ίσες ποσότητες σε μοντέλα ζώων σε μεταστατικούς όγκους, παρουσιάζοντας παράλληλα λιγότερες παρενέργειες. Σύμπλοκα του Ru(II) και Ru(III) με υποκαταστάτες μόρια διμεθυλοσουλφοξειδίου (Me_2SO , DMSO) έχουν επιδείξει σημαντικές αντικαρκινικές και κυρίως αντιμεταστατικές ιδιότητες σε ζωικά μοντέλα καρκίνων. Η αντιμεταστατική δράση είναι το σημείο στο οποίο υστερούν τα περισσότερα χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά. Τα πρώτα σύμπλοκα του Ru(II) τα οποία εξετάστηκαν στο πανεπιστήμιο του Τορίνο και παρουσίασαν αντικαρκινική και αντιμεταστατική δράση, ήταν τα *cis*- και *trans*- $RuCl_2(DMSO)_4$.



Επιπροσθέτως, αυτά τα σύμπλοκα του Ru αναστέλλουν την αντιγραφή του DNA και επάγουν SOS μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Τα κυριότερα μέλη αυτής της ομάδας δεσμεύονται μη αντιστρεπτά στο DNA, έστω και αν ο ρυθμός δέσμευσης είναι σημαντικά χαμηλότερος σε σύγκριση με το cisplatin.

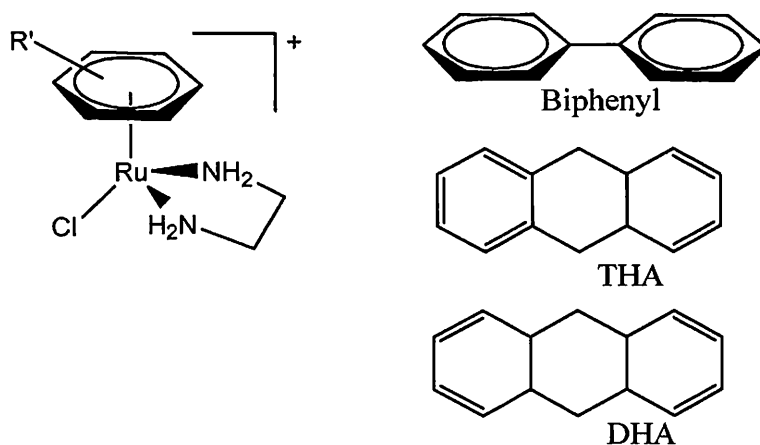
4.2 Σύμπλοκα Ru(III) με N-ετεροκυκλικές ενώσεις.

Μια άλλη οικογένεια ενώσεων του ρουθηνίου που έχει επιδείξει αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα περιλαμβάνει σύμπλοκα του ρουθηνίου(III) και (II) με υποκαταστάτες αμινομάδες, N-ετεροκυκλικές ενώσεις και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Τα σύμπλοκα του Ru(III), NAMI, Na[trans-RuCl₄(DMSO)(Im)] (Im=ιμιδαζόλιο), και NAMI-A, [HIm][trans-RuCl₄(DMSO)(Im)], παρουσιάζουν πολύ καλή αντικαρκινική και κυρίως αντιμεταστατική δράση. Το NAMI-A έχει εισαχθεί με μεγάλη επιτυχία στη φάση I κλινικών δοκιμών ως αντιμεταστατικό, αποτελώντας ένα από τα ελάχιστα σύμπλοκα μετάλλων, εκτός του λευκόχρυσου, και το πρώτο του ρουθηνίου που το πετυχαίνει. Για τα σύμπλοκα του Ru(III), NAMI και NAMI-A ο/οι κυτταρικοί τους στόχοι δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμη και λίγα είναι γνωστά για το μηχανισμό δράσης αυτών. Το DNA ωστόσο αποτελεί ένα πιθανό μόριο-στόχο. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες, η συμπεριφορά σε υδατικά διαλύματα και η σταθερότητα συμπλόκων αναλόγων των NAMI και NAMI-A σχετίζονται με τη βασικότητα των αμινο-υποκαταστατών. Γι' αυτό το λόγο προτείνεται η σύνθεση και φυσικοχημική μελέτη παραγώγων των συμπλόκων αυτών με ποικιλία ετεροκυκλικών αμινο-υποκαταστατών. Σε αυτά τα σύμπλοκα θα μεταβάλλονται και τα αλκυλοσουλφοξείδια.



4.3 Οργανομεταλλικά σύμπλοκα Ru(II)

Αντικαρκινική δράση έχουν επιδείξει επίσης και σύμπλοκα του Ru(II) της μορφής $[n^6\text{-arene)Ru(II)(en)Cl](PF_6)$, τόσο *in vivo*¹⁸, όσο και *in vitro*¹⁹. Πιθανός στόχος για αυτές τις οργανομεταλλικές ενώσεις είναι το DNA και έχει μελετηθεί η αλληλεπίδραση τους με νουκλεοτιδικές βάσεις. Τέτοιου είδους σύμπλοκα παρουσιάζουν «ψευδολειτουργική» συμπεριφορά, αφού συνδυάζουν ομοιοπολική σύμπλεξη με τις βάσεις αλλά και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις.



Κεφάλαιο II

Χημειοθεραπεία με μεταλλικά σύμπλοκα- Το παράδειγμα του cisplatin

Η ανάπτυξη των αντικαρκινικών φαρμάκων που βασίζονται σε μέταλλα, ουσιαστικά δέχτηκε το πρώτο ερέθισμα από την κλινική επιτυχία του cis-διάμμινο δίχλωρο λευκόχρυσος (II) (cisplatin) και των αναλόγων του, όπως επίσης και από κλινικές δοκιμές άλλων συμπλόκων του λευκόχρυσου και του ρουθηνίου, που επέδειξαν δραστηριότητα σε ανθεκτικούς όγκους, παράλληλα με μειωμένη τοξικότητα συμπεριλαμβανομένων στοματικά διαθέσιμες ενώσεις λευκόχρυσου.

Περισσότερα από 30 χρόνια έχουν περάσει από την τυχαία ανακάλυψη των αντικαρκινικών ιδιοτήτων του cisplatin²⁰. Το cisplatin ήταν το πρώτο αμιγώς ανόργανο αντικαρκινικό φάρμακο που εισήχθη στην κλινική έρευνα. Είναι ένα πολύ απλό μόριο που αποτελείται από 11 άτομα, 6 από τα οποία είναι υδρογόνα, ωστόσο παρά την απλότητα του θεωρείται ένα από τα ισχυρότερα διαθέσιμα αντικαρκινικά φάρμακα για τη χημειοθεραπεία. Το cisplatin έχει επιτυχημένη εφαρμογή στη θεραπεία μιας ποικιλίας τύπων ανθρώπινου καρκίνου, και ειδικότερα καρκίνο όρχεων, πνεύμονα, κεφαλής, λαιμού και μήτρας. Παρά την επιτυχία που έχει επιδείξει, το cisplatin παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, καθώς η εφαρμογή του είναι ακόμα περιορισμένη σε έναν σχετικά περιορισμένο αριθμό τύπων καρκίνου, αφού άλλοι εμφανίζουν φυσική ανοχή στο cisplatin, ενώ κάποιοι άλλοι εμφανίζουν αντίσταση μετά τα πρώτα στάδια χορήγησης του φαρμάκου. Το cisplatin έχει επίσης μειωμένη διαλυτότητα, επομένως χορηγείται ενδοφλεβίως, γεγονός ιδιαίτερα επιβαρυντικό για την ποιότητα ζωής των ασθενών. Παράλληλα, οι παράπλευρες επιδράσεις του φαρμάκου είναι σημαντικές και περιλαμβάνουν νεφρικά προβλήματα και έμετο / ναυτία.

Εξαιτίας των μειονεκτημάτων που συνοδεύουν την χρήση του cisplatin, υπάρχει η ανάγκη για σχεδιασμό και ανάπτυξη νέων και βελτιωμένων φαρμάκων λευκόχρυσου. Η διεύρυνση του φάσματος των αντικαρκινικών φαρμάκων, εξαρτάται από την κατανόηση των υπαρχουσών ενώσεων, με την προοπτική ανάπτυξης νέων τρόπων δράσης. Επομένως, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να κατανοήσουμε τις λεπτομέρειες των μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών που καθορίζουν τη βιολογική αποτελεσματικότητα των ενώσεων του λευκόχρυσου, καθώς και άλλων μετάλλων μετάπτωσης.

Το πρώτο βήμα για τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη βιολογική ενεργότητα των χημειοθεραπευτικών, είναι ο καθορισμός του πρωταρχικού κυτταρικού στόχου. Ο φαρμακολογικός στόχος των κυτταροστατικών μπορεί να οριστεί ως το σημείο, το οποίο αλλάζει εξαιτίας του φαρμάκου και η τροποποίηση του οποίου οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Υπάρχει ένας μεγάλος όγκος πειραματικών δεδομένων που υποστηρίζουν την άποψη ότι το DNA είναι ο σημαντικός στόχος της κυτταροστατικής δράσης των ενώσεων του λευκόχρυσου, ενώ η επιτυχία των συμπλόκων λευκόχρυσου

στο θάνατο των καρκινικών κυττάρων απορρέει από την ικανότητα τους να σχηματίζουν πολλούς τύπους ομοιοπολικών ενώσεων με το DNA. Παράλληλα υπάρχουν πολλά και σημαντικά δεδομένα που υποδεικνύουν και άλλα σημεία δέσμευσης, εκτός από το DNA, μέσα στο κύτταρο, τα οποία μπορεί να διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην αντικαρκινική δράση των ενώσεων λευκόχρυσου. Ωστόσο θεωρείται ότι οι αντικαρκινικές ιδιότητες που επιδεικνύουν τα σύμπλοκα του λευκόχρυσου αποδίδονται σε αυτά λόγω της δράσης τους και δη της σύμπλεξης τους με το DNA, επομένως και η μελέτη των αλληλεπιδράσεων των συμπλόκων λευκόχρυσου με το DNA είναι καθοριστική.

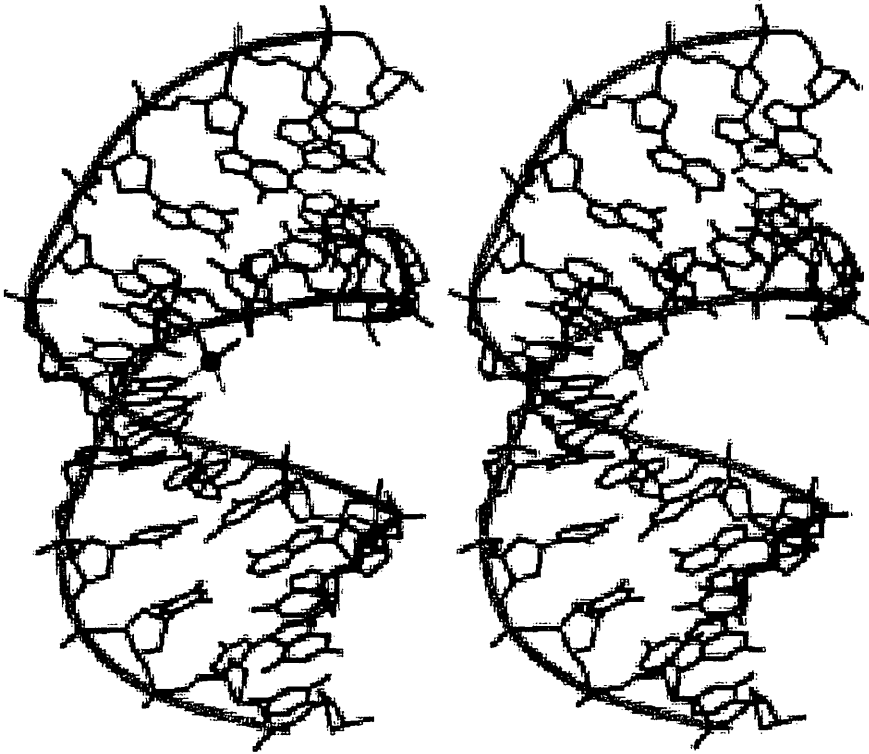
1. Μηχανισμός δράσης του cisplatin

Η χημειοθεραπευτική ένωση cisplatin, μπορεί να σχηματίσει ομοιοπολικά adducts με πολλά ενδοκυτταρικά μακρομόρια, ωστόσο υπάρχουν πειστικά πειραματικά δεδομένα που καταδεικνύουν ότι οι κυτταροτοξικές του ιδιότητες, είναι συνέπεια του σχηματισμού των διλειτουργικών DNA adducts. Ο λευκόχρυσος δεσμεύεται με την θέση N7 των πουρινών, σχηματίζοντας κυρίως 1,2-d(GpG) και 1,2-d(ApG) ενδοκλωνικούς σταυροδεσμούς, αλλά επίσης και 1,3-d(GpNpG) ενδο- και διακλωνικά καθώς τέλος και protein-DNA σταυροδεσμούς²¹. Οι 1,2 ενδοκλωνικοί σταυροδεσμοί, που αποτελούν το 90% περίπου των σχηματιζόμενων adducts, δε σχηματίζονται από το ανενεργό trans παράγωγο, εξαιτίας γεωμετρικών παρεμποδίσεων, επομένως η έρευνα έχει εστιάσει σε αυτά τα adducts, ως τα ενεργά lesions στην αντικαρκινική δραστηριότητα του φαρμάκου.

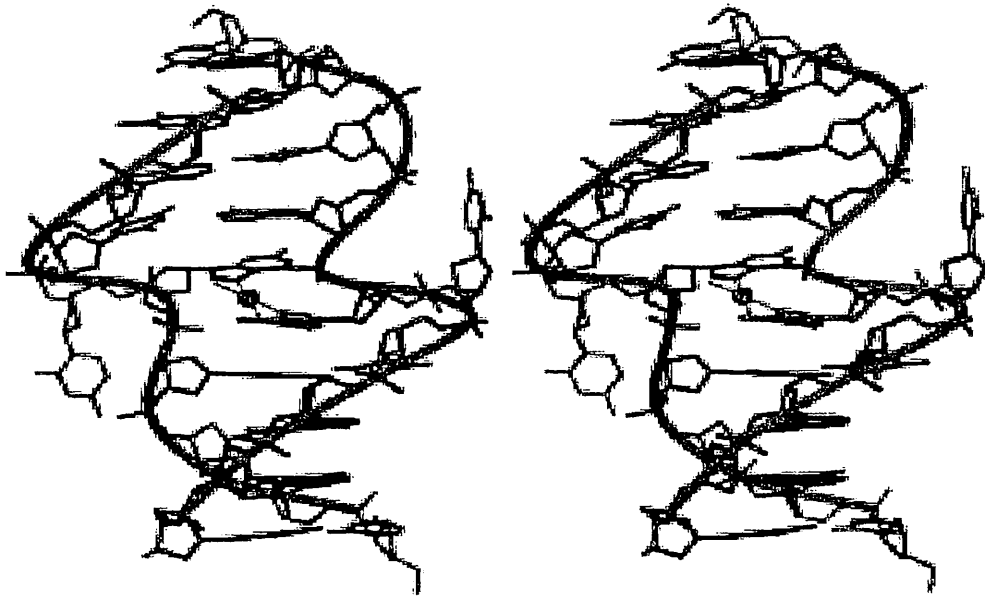
Πολλές έρευνες με σκοπό να καθοριστεί πως επιδρά η σύμπλεξη με τον λευκόχρυσο στην διαμόρφωση και σταθερότητα του κανονικού B-DNA έχουν πραγματοποιηθεί και αποκάλυψαν σημαντική αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας. Επιπλέον, πρόσφατες δομικές αναλύσεις του 1,2-d(GpG) ενδοκλωνικού σταυροδεσμού σε δίκλωνο DNA, που πραγματοποιήθηκαν με κρυσταλλογραφία και NMR²². Αν και οι δυο δομές που προέκυψαν από αυτές τις μελέτες, διαφέρουν σε ορισμένες λεπτομέρειες, αμφότερες αποκαλύπτουν ότι η σύμπλεξη με τον λευκόχρυσο προκαλεί μια κύλιση κατά 26⁰-50⁰ μεταξύ των βάσεων γουανίνης που περιλαμβάνονται στην σύμπλεξη, απομάκρυνση του ατόμου του λευκόχρυσου από τα επίπεδα των δακτυλίων των γουανινών και μια συνολική κάμψη του άξονα της έλικας προς την μεγάλη αύλακα. Επιπλέον οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της 5'-G είναι εξαιρετικά διαταραγμένοι, επιτρέποντας έτσι σε αυξημένη προσβασιμότητα του διαλύτη. Το cisplatin εξάλλου αποελκλώνει την έλικα και επάγει μια διεύρυνση και επιπεδοποίηση της μικρής αύλακας, στην εγγύτητα του adduct.

Οι δομές σε διάλυμα, με τη χρήση NMR, δυο συμπλόκων cisplatin - δεκαμερών με διακλωνικό σταυροδεσμό, κατέδειξαν ότι αυτό το δευτερεύον adduct έχει ιδιαίτερα δομικά χαρακτηριστικά²³.

Συγκεκριμένα το άτομο Pt, βρίσκεται στη μικρή αύλακα, οι συμπληρωματικές κυτοσίνες είναι υπερελικοειδείς, ενώ υπάρχει και αλλαγή στη διπλή έλικα σε αριστερόστροφη μορφή που εντοπίζεται στο σημείο της σύμπλεξης. Αυτές οι δομικές αλλαγές κάμπτουν τον άξονα της έλικας προς την μικρή αύλακα κατά περίπου 20° - 40° και αποελικώνουν κατά 76° - 80° .



Α. Ενδοκλωνικός σταυροδεσμός



Β. Διακλωνικός σταυροδεσμός

Οι ασυνήθιστες διαμορφώσεις που παρατηρούνται στα σημεία της σύμπλεξης υποδεικνύουν ότι μπορούν ουσιαστικά να λειτουργήσουν ως στοιχεία αναγνώρισης για πρωτεΐνες που δεσμεύονται και επεξεργάζονται το κατεστραμμένο DNA. Μελέτες σε cell-free εκχύλισμα, απέδειξαν ότι κάποιοι παράγοντες δεσμεύονται στο τροποποιημένο από το cisplatin, DNA. Η πιθανότητα ότι αυτές οι πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν το τροποποιημένο από το cisplatin DNA, διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην κυτταροτοξική δράση του φαρμάκου, υποστηρίζεται από έρευνες που αποκαλύπτουν ότι μερικές πρωτεΐνες αυτής της τάξης, υπερεκφράζονται σε κυτταρικές σειρές με επίκτητη αντίσταση στο cisplatin. Στην συνέχεια θα γίνει μια σύντομη περίληψη στους τύπους των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν ή ανταποκρίνονται στο cisplatin-damaged DNA, ώστε να αποκαλυφθεί με ποιο τρόπο αυτές οι πρωτεΐνες διαμορφώνουν την κυτταρική ευαισθησία προς το φάρμακο, μέσω της συμμετοχής τους σε ποικίλα βιοχημικά μονοπάτια.

2. Επίδραση του cisplatin στην αντιγραφή και μεταγραφή του DNA.

Η αντιγραφή και μεταγραφή του DNA είναι βασικές διεργασίες σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, επομένως η αναστολή θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα κυτταροστατική δράση. Εφόσον τα διάφορα adducts που σχηματίζονται στο DNA, είναι ικανά να αναστείλουν την αντιγραφή και μεταγραφή του από τα ένζυμα DNA και RNA πολυμεράσες, η επίδραση των adducts λευκόχρυσου σε αυτές τις βιοχημικές διεργασίες έχει εκτεταμένα ερευνηθεί.

2.1. Αντιγραφή

Το cisplatin αναστέλλει την σύνθεση του DNA από προκαρυωτικές και ευκαρυωτικές πολυμεράσες, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*²⁴. Το ότι η αναστολή της σύνθεσης του DNA, πραγματοποιείται κυρίως σε θέσεις GG, είναι απόλυτα συμβατό με το γεγονός ότι αυτές οι θέσεις είναι περισσότερο προτιμητέες από το cisplatin. Τα μονοδοντικά adducts αναστέλλουν σε πολύ μικρό ποσοστό την αντιγραφή. Όπως έχει φανεί και σε μελέτες της αντιγραφής σε DNA τροποποιημένο με cisplatin, η αναστολή δεν είναι πλήρης, αφού οι πολυμεράσες έχουν την ικανότητα να παρακάμπτουν τα adducts, με συχνότητα που εξαρτάται από το είδος της πολυμεράσης. Η ικανότητά τους να παρακάμπτουν το DNA, είναι συμβατή με την άποψη ότι αυτές οι ενώσεις είναι μεταλλαξιογενείς εξαιτίας ατής ακριβώς της παράκαμψης της αντιγραφής.

Οι μεταλλαξιογενείς ιδιότητες των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κλινική έρευνα, είναι ένα πολύ χρήσιμο δεδομένο που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, αφού είναι δυνατόν να αποτελέσουν αιτία ανάπτυξης δευτερογενών όγκων. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον το στοιχείο, ότι ο 1,2-GG

ενδοκλωνικός σταυροδεσμός του cisplatin είναι σημαντικά λιγότερο μεταλλαξιόγόνος από τον 1,2-AG ενδοκλωνικό σταυροδεσμό σε *E.coli*²⁵. Η μεταλλαξιόγένεση που επάγεται από το cisplatin in vivo και in vitro, είναι παρόμοια και δείχνει μια συσχέτιση με τις θέσεις δέσμησης του φαρμάκου στο DNA. Όπως συνάγεται κι από παλαιότερες έρευνες, θα ήταν λογικό να υποθέσουμε ότι η αναστολή της αντιγραφής από μη επιδιορθωμένα από το cisplatin adducts, είναι επαρκής αιτιολόγηση για την κυτταροστατική δράση του cisplatin. Ωστόσο είναι εμφανές ότι η αναστολή της αντιγραφής του DNA δεν μπορεί να εξηγήσει πλήρως την αντικαρκινική δράση του φαρμάκου και ο μηχανισμός είναι περισσότερο πολύπλοκος. Βέβαια, δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι η αναστολή της αντιγραφής του DNA είναι ένα πολύ σημαντικό κομμάτι του μηχανισμού της αντικαρκινικής δράσης του cisplatin.

2.2. Μεταγραφή

Μια άλλη σημαντική λειτουργία του κυτταρικού μεταβολισμού που επηρεάζεται από τα θραύσματα που σχηματίζονται στο DNA από ενώσεις του λευκόχρυσου, είναι η μεταγραφή του DNA. Η μεταγραφή του DNA που έχει τροποποιηθεί από cisplatin, από ευκαρυωτικές και προκαρυωτικές RNA πολυμεράσες (RNA polymerase II και SP7 ή T& RNA polymerases, αντίστοιχα), έχει ερευνηθεί με λεπτομέρεια²⁶. Οι RNA πολυμεράσες αντιδρούν διαφορετικά στα διάφορα platinum adducts. Τα διλειειτουργικά adducts του cisplatin αναστέλλουν την μεταγραφή του συμπλόκου Pt- DNA από τις RNA πολυμεράσες. Έχει προταθεί ότι τα adducts λευκόχρυσου όχι μόνο συνιστούν ένα φυσικό εμπόδιο για την πρόοδο του ενζύμου στο υπόστρωμα, αλλά επιπλέον αλλάζουν τις ιδιότητες των συμπλόκων της μεταγραφής ως συνέπεια των ειδικών αλλαγών στη διαμόρφωση που επάγουν στο υπόστρωμα του DNA.

2.3 Τελομερή και τελομεράσες

Οι τελομερικές περιοχές του DNA αντιπροσωπεύουν έναν ιδιαίτερα ελκυστικό στόχο για το cisplatin. Τα τελομερή βρίσκονται στις άκρες των ευκαρυωτικού χρωμοσώματος και αποτελούνται από μια πλούσια σε γουανίνες επαναλαμβανόμενη αλληλουχία. Στους ανθρώπους αυτή η αλληλουχία είναι 5'-TTAGGG-3'. Μέρος της λειτουργίας τους είναι να προστατεύουν τις άκρες του χρωμοσώματος από αποσύνθεση και να διασφαλίζουν ότι η γενετική πληροφορία κληροδοτείται σωστά κατά την κυτταρική διαίρεση. Κατά την διάρκεια μιας κυτταρικής διαίρεσης, τα τελομερή λιγοστεύουν κατά 50-200 βάσεις. Όταν γίνονται σημαντικά μικρότερα, τα κύτταρα πεθαίνουν. Ένας τρόπος για να γίνουν τα κύτταρα αθάνατα είναι η αντιστροφή της πορείας αυτής από την ριβονουκλεοπρωτεΐνη τελομεράση. Οι τελομεράσες συνθέτουν αυτές τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα άκρα του χρωμοσώματος και θεωρείται ότι διαδραματίζει ρόλο στην ανάπτυξη κακοηθών όγκων.²⁷

Σε κύτταρα στα οποία έχει χορηγηθεί cisplatin, τα τελομερή εμφανίζονται μικρότερα και εκφυλισμένα. Σε άλλες μελέτες, το cisplatin ανέστειλε τη δράση της τελομεράσης σε καρκινικά κύτταρα, ενώ άλλες ενώσεις όπως μπλεομυκίνη και trans-DDP. Το cisplatin δεν έχει μόνο την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την πλούσια σε γουανίνες περιοχή αλλά ίσως να συμπλέκεται με το ριβονουκλεϊνικό ή πρωτεϊνικό τμήμα της τελομεράσης. Ενδεχομένως να επηρεάζει και την έκφραση της τελομεράσης και μπορεί να επεμβαίνει στην φυσιολογική λειτουργία των τελομερών και τελομερασών, υποδεικνύοντας ένα πιθανό ρόλο στον αντικαρκινικό μηχανισμό.

2.4 Καταστροφή του DNA και απόπτωση

Οι μελέτες που αποδεικνύουν την ικανότητα του cisplatin να αλληλεπιδρά με κύτταρα L1210 στην G2 φάση, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το cisplatin μπορεί να εμποδίζει την μεταγραφή, αλλά έδειξε και στοιχεία για τον μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου. Η εμφάνιση DNA με θραύσματα της διπλής έλικας, είναι το πρώτο εμφανές σημάδι του κυτταρικού θανάτου, ενώ φαίνεται ότι αυτά τα θραύσματα εντοπίζονται στην χρωματίνη. Ο μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου φαίνεται ότι είναι η απόπτωση²⁸.

Η απόπτωση ή «προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος χαρακτηρίζεται από μείωση του κυτταρικού όγκου, συμπύκνωση χρωματίνης, αναγνώριση από φαγοκύτταρα και εξάρτηση από ενεργό πρωτεϊνοσύνθεση. Συνολικά φαίνεται ότι το cisplatin μπορεί να επάγει απόπτωση σε κύτταρα και φανερώνει έναν μηχανισμό όπου το φάρμακο σκοτώνει τα κύτταρα.

3. Κυτταρική αντίσταση στο cisplatin- Επιδιόρθωση των adducts

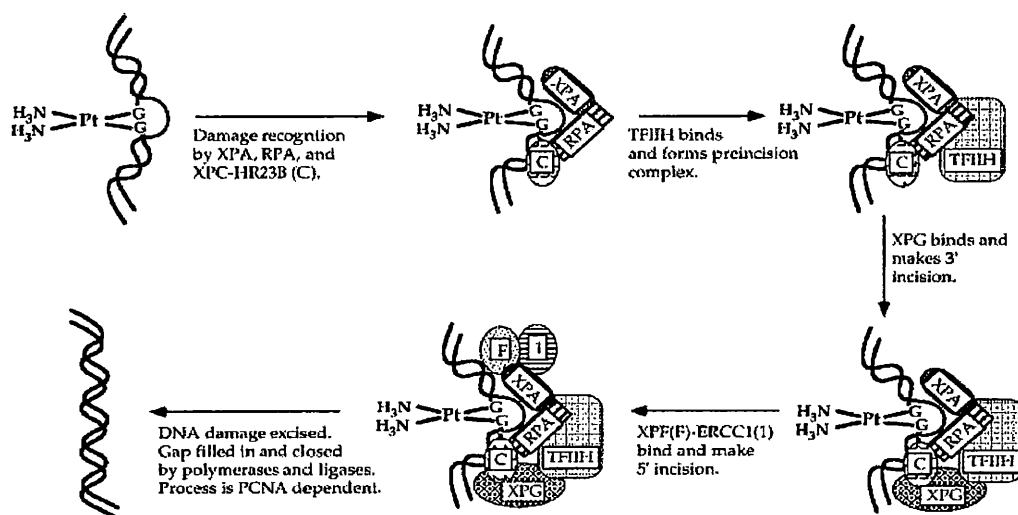
Τα μειονεκτήματα του cisplatin δεν αφορούν μόνο την τοξικότητα που παρουσιάζει αλλά συνδέονται και με την αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στο φάρμακο αυτό. Μερικοί όγκοι έχουν φυσική αντίσταση στο cisplatin, ενώ άλλοι αναπτύσσουν αντίσταση μετά την αρχική θεραπεία. Η αντίσταση στο cisplatin οφείλεται σε πολλούς παράγοντες και γενικά βασίζεται σε μηχανισμούς που είτε περιορίζουν τον σχηματισμό των DNA adducts, είτε /και λειτουργούν ανταγωνιστικά στην αλληλεπίδραση του cisplatin με το DNA ώστε τελικά να επικρατεί η κυτταρική επιβίωση. Ο σχηματισμός των DNA adducts, μπορεί να περιορισθεί από μειωμένη συσσώρευση του φαρμάκου, από αυξημένη εκροή φαρμάκου και απενεργοποίηση του cisplatin λόγω συναρμογής με γλουταθειόνη και άλλες πρωτεΐνες που φέρουν θείο, συμπεριλαμβανομένων μεταλλοθειονών, των οποίων η παραγωγή ίσως αυξάνεται παρουσία του cisplatin. Η δεύτερη ομάδα μηχανισμών δεν περιλαμβάνει μόνο την

αυξημένη επιδιόρθωση των DNA adducts αλλά και αυξημένη ανοχή της καταστροφής του DNA που προκύπτει.

3.1 Nucleotide excision repair (NER)

Τα adducts του cisplatin με το DNA επιδιορθώνονται στα κύτταρα κυρίως μέσω του βιοχημικού μονοπατιού της NER²⁹. Σε αυτή τη διεργασία συμμετέχουν πολλές πρωτεΐνες και χρησιμοποιείται για να επιδιορθωθεί μια μεγάλη ποικιλία από DNA lesions, συμπεριλαμβανομένων και όσων οφείλονται σε ακτινοβολία UV.

Ο μηχανισμός της NER είναι καλά χαρακτηρισμένος. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την αναγνώριση της καταστροφής του DNA, ενώ ακολουθεί η δέσμευση των πρωτεϊνών XPA, RPA, XPC με σειρά που δεν έχει πλήρως διασαφηνισθεί και μετά από μια διαδικασία απομακρύνουν το τμήμα που είχε υποστεί την καταστροφή στο DNA. Συγκεκριμένα σχηματίζεται αρχικά ένα σύμπλοκο προεγκοπής (preincision complex) XPA/RPA που κόβει προς την 3' πλευρά, ενώ αμέσως μετά το σύμπλοκο XPF-ERCC1 δεσμεύεται και δημιουργεί μια δεύτερη τομή κατά 20-26 bp προς την 5' πλευρά. Όταν απομακρύνεται το τμήμα, οι πρωτεΐνες απομακρύνονται και αναλαμβάνουν δράση πολυμεράσες και λιγάσες.



Σχήμα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση της NER των cisplatin-DNA cross-link. Το DNA damage αναγνωρίζεται από τις πρωτεΐνες XPA, RPA και XPC-ERCC1.

Συγκρίνοντας τα διάφορα adducts, παρατηρούμε ότι το cis-GTG επιδιορθώνεται 15-20 φορές καλύτερα από τα 1,2-ενδοκλωνικά adducts. Επίσης, τα διακλωνικά adducts απομακρύνονται

περισσότερο αποτελεσματικά από γονίδια σε σύγκριση με τα ενδοκλωνικά, ενώ τέλος υπάρχουν ενδείξεις ότι η επιδιόρθωση φαίνεται πως είναι μια διαδικασία συνυφασμένη με την μεταγραφή.

3.2 Mismatch repair

Υπάρχουν και άλλοι κυτταρικοί μηχανισμοί, όπως ο ανασυνδυασμός(recombination) ή mismatch repair (MMR), που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του cisplatin. Κύτταρα E.coli που είχαν μεταλλάξεις σε MMR πρωτεΐνες, επέδειξαν ευαισθησία στο cisplatin. Η δράση του μηχανισμού MMR είναι να εξετάζει το νεοσυντιθέμενο DNA και να απομακρύνει τα mismatches που απορρέουν από λάθη ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων από την πολυμεράση του DNA. Πρόσφατες παρατηρήσεις υποστηρίζουν την ιδέα ότι η MMR μεσολαβεί στην κυτταροτοξικότητα³⁰.

Για να δοθεί μια εξήγηση για την ανοχή στο cisplatin, γίνεται η υπόθεση ότι η υπερπήδηση της μεταγραφής στα DNA adducts οδηγεί σε μεταλλάξεις. Κατά την διάρκεια του MMR, ο κλώνος που πρόκειται να επιδιορθωθεί είναι κεκαμμένος, το μικρό τμήμα που φέρει το mismatch απομακρύνεται και ένα νέο τμήμα DNA συντίθεται. Το MMR επιδιορθώνει πάντα το θυγατρικό κλώνο, επομένως είναι δυνατόν το adduct του cisplatin παραμένει άθικτο, ενεργοποιώντας έτσι έναν φαύλο κύκλο, αφού κατά την διάρκεια της σύνθεσης, οι DNA πολυμεράσες θα ενσωμάτωναν ξανά μεταλλάξεις, με συνέπεια να ενεργοποιηθεί τελικά ο κυτταρικός θάνατος. Επομένως, η αναγνώριση των cisplatin adducts από τον μηχανισμό MMR, μπορεί να ενεργοποιήσει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο καθιστώντας τα MMR-proficient cells περισσότερο ευαίσθητα στην τροποποίηση του DNA, σε σχέση με τα MMR-deficient cells. Με άλλα λόγια η απώλεια του μηχανισμού MMR θα αύξανε την ικανότητα του κυττάρου να αντέχει τα cisplatin-DNA lesions. Επίσης είναι σημαντικό να τονιστεί ότι ο MMR είναι δυνατόν να δρα κυρίως κατά την μετα-αντιγραφική φάση, όταν και αναμένεται μεγαλύτερη συγκέντρωση από mispairs στο νεοσυντιθέμενο DNA. Αυτό ίσως να βρίσκεται στον αντίποδα της δράσης του μηχανισμού NER που δρα ανεξαρτήτως του κυτταρικού κύκλου. Επομένως τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, είναι περισσότερο πιθανό να έχουν ανεπιτυχείς απόπειρες επιδιόρθωσης, ικανές να ενεργοποιήσουν τον κυτταρικό θάνατο.

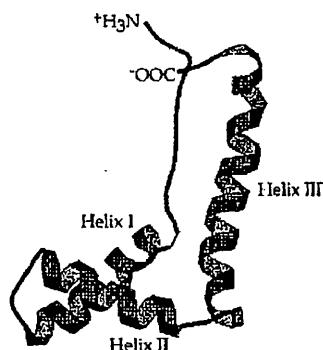
4. Αναγνώριση των adducts από κυτταρικές πρωτεΐνες

4.1 Πρωτεΐνες επιδιόρθωσης

Μια τάξη πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο τροποποιημένο από το cisplatin DNA, εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του, όπως είδαμε και προηγουμένως στο σύστημα NER. Μερικές από αυτές είναι οι XPE, XPA, RPA, XPC-HR23B, XPF-ERCC1 κα. Παράλληλα υπάρχουν και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον μηχανισμό MMR, όπως MutSa.

4.2 Αρχιτεκτονικές πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι κυρίως πυρηνικές ή πρωτεΐνες της χρωματίνης που διαδραματίζουν δομικό ρόλο στην χρωματίνη και γενικότερα έναν αρχιτεκτονικό ρόλο στον σχηματισμό λειτουργικών συμπλόκων πρωτεΐνης/DNA και πρωτεΐνης /πρωτεΐνης ανώτερης τάξης. Η παρατήρηση ότι αυτές οι πρωτεΐνες δεσμεύονται επιλεκτικά με cisplatin-damaged DNA ήταν μια μεγάλη έκπληξη, επομένως συγκέντρωσαν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον. Αυτή η τάξη περιλαμβάνει μέλη από μη-ιστονικές high-mobility group 1 /2 family.



Αυτές οι πρωτεΐνες δεσμεύονται σε δίκλωνο DNA στην μικρή αύλακα, προκαλώντας αποέλιξη της διπλής έλικας και επάγοντας κάμψη, ενώ έχει προταθεί από κρυσταλλογραφική ανάλυση ότι οι διακλωνικοί σταυροδεσμοί του cisplatin προκαλούν τέτοιες παραμορφώσεις και διαμορφώνουν ένα κατάλληλο γεωμετρικό σχήμα για αναγνώριση από τις πρωτεΐνες HMG.

Έχουν γίνει πολλές υποθέσεις σχετικά με τον μηχανισμό ρύθμισης της ευαισθησίας των κυττάρων στο cisplatin με τις HMG-domain πρωτεΐνες, από τις οποίες όμως δυο είναι οι επικρατούσες υποθέσεις. Σύμφωνα με την πρώτη, τα cisplatin-DNA adducts απομακρύνουν αυτές τις πρωτεΐνες από τους φυσιολογικές θέσεις δέσμευσης τους, συνεπώς διαταράσσοντας την κυτταρική λειτουργία. Αφού κάποιες από αυτές είναι μεταγραφικοί παράγοντες, η απομάκρυνση τους από τον προμότορα είναι δυνατόν να αλλάξει δραματικά την κυτταρική βιολογία του καρκίνου. Η άλλη υπόθεση αναφέρεται ως προστασία από την επιδιόρθωση και σύμφωνα με αυτή οι πρωτεΐνες HMG προστατεύουν τα DNA adducts από την αναγνώριση τους από τον μηχανισμό

επιδιόρθωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη επιδιόρθωση και συνεχιζόμενη δράση των συμπλόκων στο DNA και κυτταρικό θάνατο. Αμφότερες οι υποθέσεις δεν είναι αλληλοαποκλειόμενες και μπορούν να εξηγήσουν συνεργιστικά την κυτταροτοξικότητα του cisplatin. (σχήμα 3.3)

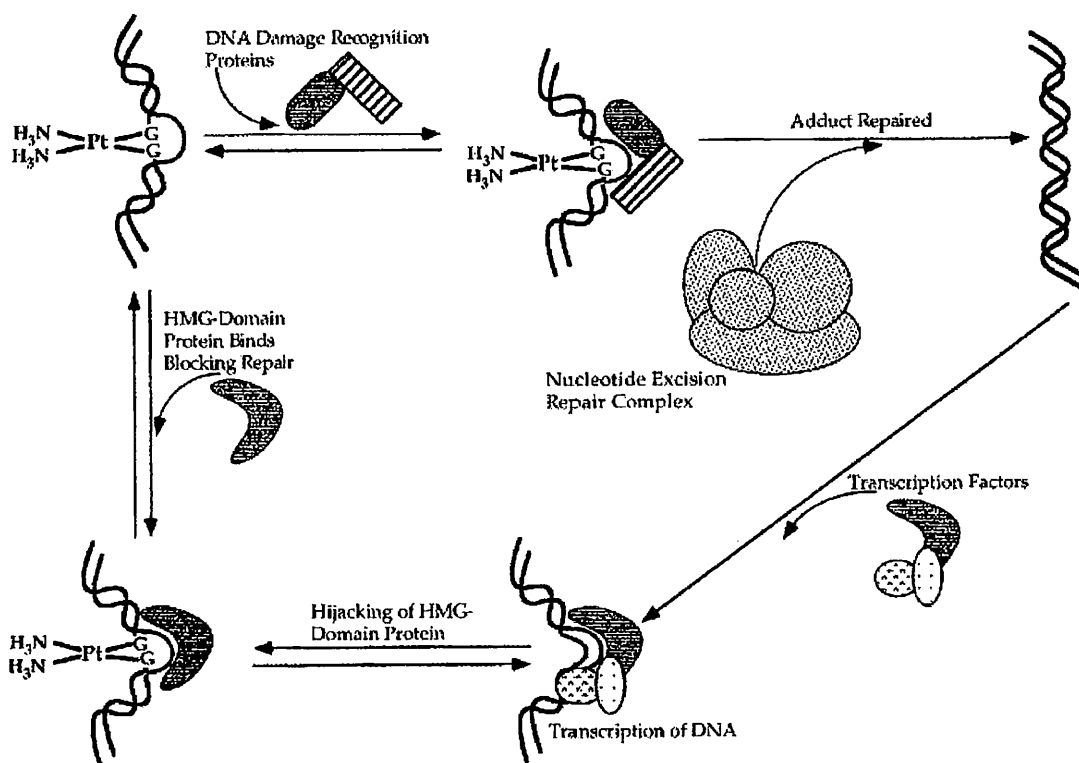


Σχήμα 3.2: Δομή του domain A της HMG1 δεσμευμένη σε 20-mer cisplatin-adduct.

5. Συμπεράσματα

Έχουν μεσολαβήσει 35 χρόνια από την ανακάλυψη της βιολογικής δραστηριότητας του cisplatin και πολλές έρευνες έχουν έρθει στο φως σχετικά με τον τρόπο που αυτό το σύμπλοκο επιδρά στα κύτταρα. Το DNA αναγνωρίζεται ως ο κύριος κυτταρικός στόχος του φαρμάκου και πολλές δομικές μελέτες έχουν δώσει σημαντικές πληροφορίες για τις παραμορφώσεις στο DNA που επάγονται από τα cisplatin lesions. Τα τελευταία 10 χρόνια, υπάρχει μια αποτελεσματική στροφή στην έρευνα των κυτταρικών πρωτεϊνών που δεσμεύονται στερεοειδικά στα cisplatin-DNA adducts. Πολλές πρωτεΐνες έχουν αναγνωρισθεί, ενώ συνεχίζεται η έρευνα σχετικά με το ρόλο τους στις κυτταροτοξικές ιδιότητες του φαρμάκου.

Παρά τις γνώσεις μας μέχρι τώρα για το cisplatin, υπάρχουν ακόμα πτυχές του μηχανισμού δράσης του που παραμένουν αδιευκρίνιστες. Τα βιοχημικά μονοπάτια της αντίστασης δεν είναι πλήρως κατανοητά σε μοριακό επίπεδο, εξαιτίας της πληθώρας των παραγόντων που συμμετέχουν. Επίσης οι εναλλακτικοί στόχοι του φαρμάκου, όπως τα τελομερή και το mtDNA μόλις πρόσφατα έχουν αρχίσει να μελετώνται και ίσως αποδειχθούν σημαντικά. Οι πρωτεΐνες που δεσμεύονται στα adducts, είναι πιθανό να διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό δράσης. Αυτού του είδους οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω για να γίνει περισσότερο κατανοητό πως το cisplatin σκοτώνει τα κύτταρα.



Σχήμα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση της υπόθεσης του μηχανισμού που προτείνεται για το ρόλο των πρωτεϊνών HMG στην αναγνώριση των DNA-adducts.

Τα μέχρι τώρα συμπεράσματα για τον μηχανισμό δράσης, έχουν την δυνατότητα να βελτιώσουν την θεραπεία με αντικαρκινικά φάρμακα του λευκόχρυσου. Η συνεχιζόμενη έρευνα στον μηχανισμό δράσης του cisplatin μας επιτρέπει να κατανοήσουμε γιατί αυτή η ένωση είναι τόσο εξαιρετικά αποτελεσματική σε περιπτώσεις καρκίνου των όρχεων. Με αυτή την γνώση, είναι δυνατόν να σχεδιάσουμε νέα φάρμακα για την θεραπεία πολλών τύπων καρκίνου με μειωμένες παρενέργειες και να περιορίσουμε τα προβλήματα αντίστασης που αντιμετωπίζουμε με τα έως σήμερα αντικαρκινικά σύμπλοκα του λευκόχρυσου.

Κεφάλαιο III

cis και *trans* - $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$

1. Εισαγωγή

Στις αρχές τις δεκαετίας του '70 επιλέχθηκε από την ομάδα του Mestroni μεταξύ άλλων, το γνωστό σύμπλοκο του Ru(II) με διμεθυλοσουλφοξείδιο, το $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ ³¹ για βιολογική και αντινεοπλαστική αξιολόγηση. Παρά την οκταεδρική του γεωμετρία και την έλλειψη άμινο-υποκαταστατών, το παραπάνω σύμπλοκο παρουσιάζει ενδιαφέρουσες ομοιότητες με το κλινικά χρησιμοποιούμενο cisplatin. Είναι ουδέτερο, έχει δυο υποκαταστάτες Cl σε *cis* μεταξύ τους θέσεις, υψηλή σταθερότητα στην οξειδωτική κατάσταση +2 και υψηλή χημική συγγένεια για υποκαταστάτες δότες αζώτου. Επιπλέον το DMSO είναι γνωστό ότι διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και το σύμπλοκο είναι πολύ διαλυτό στο νερό.

Εξετάστηκε πρώτη φορά η δράση του στο βακτήριο E.coli. Το σύμπλοκο του Ru(II) συμπεριφέρθηκε με τρόπο ανάλογο με το cisplatin και τα αποτελέσματα οδήγησαν στην υπόθεση ότι αλληλεπιδρά με το DNA *in vivo*³².

Από τότε το $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ δοκιμάστηκε σε διάφορα μοντέλα καρκίνων με το cisplatin να αποτελεί πάντοτε σημείο αναφοράς. Το $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ παρουσίασε αντικαρκινική δράση σε πειραματόζωα με λευχαιμία L210 καθώς και σε άλλα είδη μεταστατικών καρκίνων³³ και επιπλέον τοξικότητα τρεις τάξεις μεγέθους μικρότερη από το cisplatin. Σε μελέτες με την μεγαλύτερη ανεκτή δόση το $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ επέδειξε δραστηριότητα έναντι στον κύριο όγκο αλλά και στις μεταστάσεις σε ποντίκια με καρκίνωμα πνεύμονα Lewis³⁴ ή καρκίνωμα μαστού Mca. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η δραστηριότητα του είναι συγκρίσιμη με εκείνη του cisplatin ακολουθώντας το ίδιο πρόγραμμα χορήγησης. Τέλος το σύμπλοκο αυτό είχε συνολικά λιγότερο εμφανή τοξικότητα από το cisplatin. Τα παραπάνω αποτελέσματα είχαν ως αποτέλεσμα την εκτενέστερη μελέτη των συμπλόκων του Ru(II) με διμεθυλοσουλφοξείδιο.

2. Χημικές ιδιότητες

2.1 Σύνθεση και δομή του cis και trans-RuCl₂(DMSO)₄

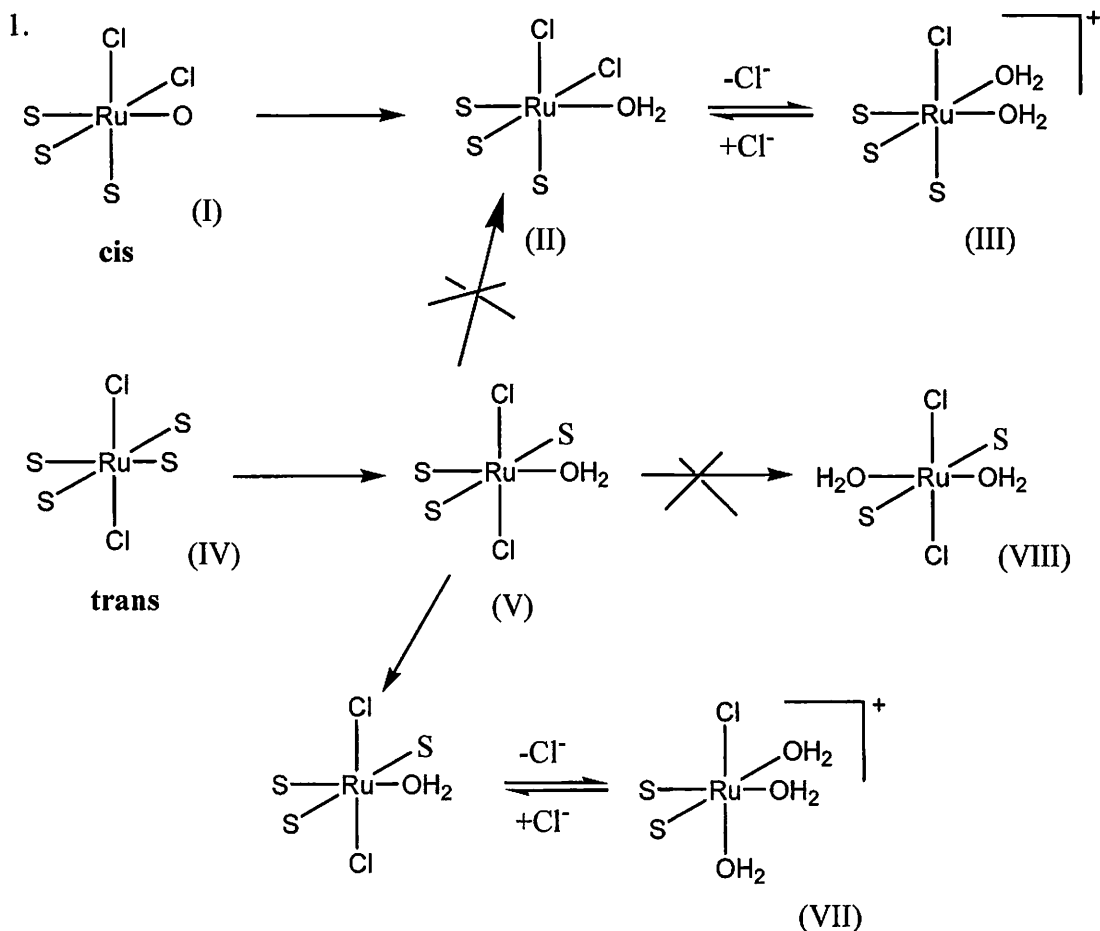
Η σύνθεση καθώς και η κρυσταλλική δομή του cis-RuCl₂(DMSO)₄ (cis-Ru) είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια³⁵. Η σύνθεση επιτυγχάνεται σχετικά εύκολα με θέρμανση του ένυδρου RuCl₃ με DMSO. Το σύμπλοκο έχει οκταεδρική δομή, με τους δυο υποκαταστάτες Cl σε cis θέσεις. Τρία μόρια DMSO είναι συμπλεγμένα μέσω του S στις κορυφές μιας έδρας του οκταέδρου, ενώ το τέταρτο μόριο είναι συμπλεγμένο μέσω του O. (σχήμα 3.1).

Το trans-RuCl₂(DMSO)₄ (trans-Ru) μπορεί να παραχθεί σε υψηλή απόδοση με φωτοχημικό ισομερισμό του cis ισομερούς συμπλόκου σε διάλυμα DMSO σε θερμοκρασία δωματίου³⁶. Εκτός των θέσεων των δυο Cl, το trans ισομερές διαφέρει σημαντικά από το cis και όσο αφορά τον τρόπο σύμπλεξης των μορίων DMSO, αφού και τα τέσσερα μόρια βρίσκονται συμπλεγμένα μέσω του S στις τέσσερις ισημερινές θέσεις του οκταέδρου (σχήμα 3.1). Το αξιοσημείωτα μεγαλύτερο μήκος δεσμού Ru-S στο trans ισομερές είναι ενδεικτικό του ισχυρού ανταγωνισμού μεταξύ της π-οπισθοσύνδεσης των μορίων DMSO και του συνωστισμού αυτών στο ισημερινό επίπεδο.

Οι αξιοσημείωτες διαφορές στη δομή των δυο ισομερών του RuCl₂(DMSO)₄ συνεπάγονται διαφορετική συμπεριφορά σε διάλυμα και κατά συνέπεια διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες³⁷.

2.2 Χημική συμπεριφορά σε υδατικά διαλύματα

Η χημική συμπεριφορά των δυο ισομερών σε υδατικά διαλύματα έχει μελετηθεί με φασματοσκοπία NMR και UV-Vis³⁰ και παρουσιάζεται στο σχήμα 3.1. Διαλυόμενο το cis-RuCl₂(DMSO)₄ (I) αποδεσμεύει αμέσως το DMSO το οποίο είναι συμπλεγμένο μέσω του οξυγόνου δίνοντας το ουδέτερο παράγωγο με ένα μόριο νερού(II). Αυτό το στάδιο ακολουθείται από την αργή αποδέσμευση ενός ανιόντος χλωρίου, το οποίο διαρκεί περίπου 3h στους 37⁰C, σχηματίζοντας το κατιονικό παράγωγο (III) με δυο μόρια νερού σε cis θέσεις. Ενώ η απελευθέρωση του χλωρίου (σε [Ru]= 1mM) είναι σχεδόν πλήρης σε νερό ή σε διάλυμα συγκεντρώσεως 3mM Cl⁻ (που είναι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων χλωρίου), αναστέλλεται πλήρως σε συγκέντρωση ανιόντων χλωρίου 150mM (εξωκυτταρική συγκέντρωση ιόντων χλωρίου). Η ίδια εξάρτηση της υδρόλυσης του χλωρίου έχει βρεθεί και στην περίπτωση του cisplatin.



Σχήμα 3.1: Δομή και χημική συμπεριφορά των συμπλόκων

Αναφέρθηκε παραπάνω ότι το *trans* ισομερές επιδεικνύει διαφορετική συμπεριφορά. Μόλις διαλύεται στο νερό αποδεσμεύει τάχιστα ένα μόριο DMSO δίνοντας το ουδέτερο παράγωγο (V) με ένα μόριο νερού, με τα παραμένοντα μόρια DMSO σε ισημερινές θέσεις. Αυτό το ενδιάμεσο δεν ανιχνεύεται, όντας ασταθές. Ωστόσο δεν ισομερίζεται προς το σταθερό ισομερές (II) αλλά πολύ γρήγορα ελευθερώνει ένα δεύτερο μόριο DMSO. Το δεύτερο στάδιο θα μπορούσε θεωρητικά να δώσει δυο διαφορετικά προϊόντα, τα (VIII), (VI), ανάλογα με το αν το δεύτερο DMSO που ελευθερώνεται είναι *trans* ή *cis* στο μόριο του νερού, αντίστοιχα. Στερεοχημικοί λόγοι εντούτοις ευνοούν το (VIII), ενώ ηλεκτρονιακοί λόγοι, όπως είναι η ισχυρή *trans* επίδραση του S-συμπλεγμένου DMSO, ευνοούν το (VI). Με τη φασματοσκοπία NMR δεν είναι δυνατή η διάκριση των δυο ισομερών αφού και τα δυο διαθέτουν δυο συμπλεγμένα και ισοδύναμα DMSO.

Η δομή του *trans*-RuCl₂(DMSO)₂(NH₃)₂ επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι και στην περίπτωση του παραγώγου (VIII), *trans*-RuCl₂(DMSO)₂(H₂O)₂ μια παρόμοια διάταξη των μορίων DMSO θα είναι προτιμητέα. Το ουδέτερο *trans*-RuCl₂(DMSO)₂(H₂O)₂ ελευθερώνει ένα χλώριο (Cl⁻) δίνοντας το

κατιονικό σύμπλοκο (VII) με τρία μόρια νερού στις κορυφές της έδρας η αποδέσμευση του χλωρίου αναστέλλεται σε διάλυμα 150mM Cl⁻ ([Ru]=1mM). Σε συμφωνία με την χαμηλότερη trans επίδραση του χλωρίου σε σχέση με το DMSO, η αποδέσμευση του χλωρίου στο (VI) είναι πολύ πιο αργή από ότι στο (II) (διαρκεί περίπου 8 ώρες στους 37^oC. Είναι ενδιαφέρον να παρατηρηθεί ότι στις ίδιες πειραματικές συνθήκες, και για τα δυο ισομερή, η ταχύτητα υδρόλυσης του χλωρίου είναι συγκρίσιμη με αυτή του cisplatin.

Υποθέτοντας ότι τα συμπλεγμένα μόρια νερού είναι αρκετά ευκίνητα, τότε ενώ το ουδέτερο παράγωγο (II), του cis-RuCl₂(DMSO)₄ έχει μια μόνο θέση σύμπλεξης, το αντίστοιχο παράγωγο (VI) , του trans-RuCl₂(DMSO)₄ έχει δυο. Μετά την αποδέσμευση του χλωρίου, το (III) έχει τρεις διαθέσιμες θέσεις στις κορυφές μιας έδρας (ουσιαστικά έχει μια διαθέσιμη). Αυξάνοντας το pH, τουλάχιστον ένα από τα συμπλεγμένα μόρια νερού θα πρέπει να υποστεί αποπρωτονίωση δίνοντας ουδέτερα υδρόξυ-ενυδατωμένα παράγωγα. Κατά συνέπεια τα ένυδρα σύμπλοκα (II) και (III) δείχνουν σημαντικά μεγαλύτερη στερική παρεμπόδιση από τα αντίστοιχα (VI), (VII), εξαιτίας της παρουσίας του τρίτου μορίου DMSO.

Σύμφωνα με τους παραπάνω συλλογισμούς, το trans-RuCl₂(DMSO)₄ αναμένεται να έχει σημαντικά υψηλότερη δραστηριότητα από το cis ισομερές σε υδατικά διαλύματα. Πράγματι, όπως θα περιγραφεί και στη συνέχεια, το trans ισομερές παρουσιάζει υψηλότερη δραστηριότητα και τοξικότητα σε σχέση με το cis.

2.3 Τοξικότητα και αντικαρκινική δράση των συμπλόκων

Έχει δειχθεί ότι τα cis- και trans-RuCl₂(DMSO)₄ έχουν αντικαρκινική δράση και κυρίως αντιμεταστατική δράση έναντι μερικών μοντέλων καρκίνου σε πειραματόζωα όπως λευχαιμία P388 και P388/PDD (75), καρκίνωμα πνεύμονα Lewis³⁸, μελάνωμα B16 και καρκίνωμα του μαστού MCa³⁹.

Η επίδραση των cis- και trans-RuCl₂(DMSO)₄ στην ανάπτυξη των πρωτογενών όγκων και στην ανάπτυξη μεταστάσεων στους πνεύμονες μελετήθηκαν σε ποντίκια που έφεραν καρκίνωμα πνεύμονα Lewis³⁷. Η θεραπεία με τα σύμπλοκα του ρουθηνίου δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη του πρωτογενούς όγκου. Σημαντική μείωση έως και 50% στην ανάπτυξη πρωτογενούς όγκου παρατηρήθηκε με το trans ισομερές, όταν μειώθηκε το αρχικό μέγεθος του όγκου που εμφυτεύτηκε.

Αντίθετα, τα σύμπλοκα παρουσίασαν σημαντική αντιμεταστατική δράση. Το cis-RuCl₂(DMSO)₄ μειώνει τον αριθμό και το βάρος της αυτοφυούς μετάστασης κατά 46% και 52% αντίστοιχα. Το trans-

$\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ είναι λίγο πιο ενεργό από το cis αναστέλλοντας κατά 57% και 71% αντίστοιχα. Η αντιμεταστατική δράση του cisplatin είναι ελάχιστα πιο αποτελεσματική από το trans ισομερές.

Οι θεραπευτικές δυνατότητες των cis- και trans- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ συγκρίθηκαν με εκείνες του cisplatin που τους αφαιρέθηκε χειρουργικά ο όγκος. Η μετεγχειρητική θεραπεία με τα cis- και trans- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ παρουσίασε σημαντική αύξηση του χρόνου ζωής σε σχέση με τα ζώα που δεν τους χορηγήθηκε θεραπεία. Η επίδραση του cisplatin δεν ήταν τόσο αποτελεσματική.

Ελέγχθηκε επίσης και η δραστηριότητα των δυο συμπλόκων, σε συνάρτηση με το cisplatin, σε ποντίκια φορείς της λευχαιμίας P388 καθώς και σε συγγενές τύπο ο οποίος αντιστέκεται στο cisplatin (P388/DDP). Τα cis- και trans- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ έδειξαν σημαντική και συγκρίσιμη δράση με αυτήν του cisplatin εναντίον της λευχαιμίας P388 όταν χορηγήθηκαν σε δόσεις με ίδια τοξικότητα. Σε συμφωνία με τη μεγαλύτερη δραστηριότητα το trans- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ είναι 16 φορές πιο τοξικό από το cis ισομερές. Τα δυο ισομερή είναι δραστικά και στην περίπτωση της λευχαιμίας P388/DDP που παρουσιάζει ανοχή στο cisplatin. Συγκεκριμένα, το trans- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ ήταν πιο αποτελεσματικό στην P388/DDP σε σχέση με τη σειρά που παρουσιάζει ευαισθησία στο cisplatin.

Πειράματα με σκοπό να εκτιμηθεί η δραστηριότητα του trans- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ σε σύγκριση με το cisplatin σε μετάσταση στον εγκέφαλο και των δυο τύπων λευχαιμίας που εξετάστηκαν έδειξαν τα ακόλουθα :

- i) Το trans- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ είναι ουσιαστικά απαλλαγμένο άμεσης κυτταροτοξικής δράσης, όπως έδειξε η επίδραση του σε σειρά βιώσιμων κυττάρων του πρωτογενή όγκου.
- ii) Παρά την αμελητέα δραστηριότητα στην ανάπτυξη του πρωτογενή όγκου το trans- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ έχει καλή δράση έναντι της μετάστασης και μάλιστα συγκρίσιμη με αυτήν του cisplatin στην P388
- iii) Το σύμπλοκο του ρουθηνίου διατηρεί την δραστηριότητα του στην πρόληψη της μετάστασης και στην σειρά που παρουσιάζει ανοχή στο cisplatin.

Η χαμηλή κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων του ρουθηνίου που παρατηρήθηκε στα παραπάνω πειράματα είναι σε συμφωνία με *in vitro* πειράματα σε σειρές ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων. Πιθανότατα ένας μηχανισμός διαφορετικός της κυτταροτοξικότητας είναι υπεύθυνος για τη δράση των συμπλόκων του ρουθηνίου³⁵.

Τα παραπάνω δεδομένα στο σύνολο τους δείχνουν μια ενδιαφέρουσα αντικαρκινική δράση των παραγώγων του ρουθηνίου με διμεθυλοσουλφοξείδιο. Σε μοριακή βάση το trans-Ru είναι πιο δραστικό από το cis-Ru. Η υψηλότερη τοξικότητα του trans ισομερούς είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα των *in vitro* δοκιμών των συμπλόκων με DNA. Τα σύμπλοκα του ρουθηνίου παρουσιάζουν αντικαρκινική

δράση συγκρίσιμη με το cisplatin. Ωστόσο σε ορισμένα συστήματα οι διαφορές που παρουσιάζουν, υποδηλώνουν διαφορετικό εν γένει φάσμα δράσης και πιθανότατα διαφέρουν και στον μηχανισμό δράσης.

Όλα τα δεδομένα που έχουν συγκεντρωθεί μέχρι τώρα υποδηλώνουν ότι τα σύμπλοκα του ρουθηνίου μάλλον έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες διαφορετικές από αυτές του cisplatin και αυτό μας παρακινεί σε βαθύτερη διερεύνηση των χημικών-βιολογικών τους αλληλεπιδράσεων όσων αφορά τον ακριβή μηχανισμό της αντικαρκινικής τους δράσης. Ένας μηχανισμός δράσης διαφορετικός από αυτόν του cisplatin θα μπορούσε να αιτιολογήσει το διαφορετικό φάσμα δράσης των συμπλόκων αυτών.

2.4 Αλληλεπίδραση των cis- και trans-RuCl₂(DMSO)₄ με DNA *in vivo*.

Το cis-RuCl₂(DMSO)₄ παρουσιάζει μεταλλαξιογενή δράση σε δυο σειρές βακτηρίων, S.Typhimurium, E.coli. Η δράση του εξαρτάται από την συγκέντρωση των φωσφορικών στην καλλιέργεια. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση των φωσφορικών ή ο χρόνος πριν από την επώαση παρατηρείται μείωση στη μεταλλαξιογόνο δράση και αύξηση των τιμών MIC³⁰. Αυτή η συμπεριφορά δείχνει ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το DNA και ότι η ανόργανος φωσφορική ομάδα δρα ως αναστολέας. Η χαμηλή τοξικότητα του συμπλόκου, οφείλεται εν μέρει στην αλληλεπίδραση του με τη φωσφορική ομάδα.

Το trans-RuCl₂(DMSO)₄ παρουσιάζει πολύ μικρή μεταλλαξιογόνο δράση στα ίδια βακτήρια. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να αποδοθούν στην υψηλότερη χημική δραστηριότητα του trans ισομερούς σε σχέση με το cis. Πράγματι το ουδέτερο σύμπλοκο με τα δυο μόρια νερού (VI), θα πρέπει να αλληλεπιδρά πολύ γρήγορα έξω από τα κύτταρα με μερικές ενώσεις που υπάρχουν εκεί δίνοντας αδρανή σύμπλοκα και κατά συνέπεια μόνο ένα μικρό κλάσμα του αρχικού συμπλόκου μπορεί να πλησιάσει το στόχο στο εσωτερικό του κυττάρου, στο DNA.

Το trans ισομερές ωστόσο παρουσιάζει υψηλότερη κυτταροτοξικότητα και μεταλλαξιογόνο δράση από το cis όταν δοκιμάζονται σε ευκαρυωτικά κύτταρα, όπως σε καλλιέργεια κυττάρων V79(chinese hamster lung cells), όπου ενώ το cis είναι ανενεργό, το trans παρουσιάζει καλή μεταλλαξιογόνο δράση. Παράλληλα όταν προσδιορίστηκε η ποσότητα του ρουθηνίου που ήταν δεσμευμένη στο DNA, βρέθηκε ότι το trans ισομερές ήταν 5 φορές περισσότερο από το cis, ένδειξη σαφούς της εξάρτησης από αυτήν την παράμετρο. Το σύνολο των αποτελεσμάτων υποδηλώνουν ότι και τα δυο ισομερή αλληλεπιδρούν με το DNA *in vivo*.

2.5 Αλληλεπίδραση των $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ με DNA *in vitro*

CT DNA αφέθηκε να αλληλεπιδράσει με $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ σε ισομοριακές ποσότητες σε συνθήκες όμοιες με το εσωτερικό των κυττάρων (3mM NaCl, 1mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH=7.2, 37°C). Το φάσμα UV των διαλυμάτων DNA δείχνει αλλαγές οι οποίες είναι ανάλογες του χρόνου αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο του ρουθηνίου καθώς και της ποσότητας του μετάλλου που συνδέεται ομοιοπολικά στο DNA, όπως προσδιορίζεται με φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης. Η αντίδραση δεν είναι πολύ γρήγορη καθώς ο λόγος ρουθηνίου /DNA είναι μόλις 0.05 μετά από 10 ώρες αλληλεπίδρασης⁴⁰. Σύγκριση της ταχύτητας αποδέσμευσης του χλωρίου με την ταχύτητα σύνδεσης με το DNA υποδηλώνει ότι η κύρια δραστική μορφή είναι το κατιονικό σύμπλοκο (III).

Η σύνδεση του συμπλόκου στην αλυσίδα του DNA αυξάνει την σταθερότητα του στην θερμική μετουσίωση (αυξάνει την θερμοκρασία τήξεως, T_m) ενώ δεν επιδρά σημαντικά στην B-διαμόρφωση, όπως φάνηκε από πειράματα με φασματοσκοπία CD(κυκλικού διχρωισμού). Σε αντίθεση, η ίδια αντίδραση με poly-(dGdC) σε χαμηλή ιοντική ισχύ, επάγει μετάπτωση από την B στην Z διαμόρφωση, η οποία ολοκληρώνεται σε περίπου 10 ώρες. Αυτό το αποτέλεσμα υποστηρίζει ότι ο κύριος στόχος του συμπλόκου είναι το N7 της γουανίνης, της οποίας η syn διαμόρφωση σταθεροποιείται με την παρουσία ογκωδών ομάδων ομοιοπολικά συνδεδεμένων στο N7 ή στο C8. Πράγματι στην αλλαγμένη μορφή, την Z διαμόρφωση στα τμήματα πουρίνης θα πρέπει να προσλάβουν την syn διαμόρφωση στον γλυκοζιτικό δεσμό. Το N7 της αδενίνης μπορεί επίσης να θεωρηθεί πιθανός στόχος του συμπλόκου. Ωστόσο η πειραματικά υψηλότερη δραστηριότητα του συμπλόκου προς το 5'-dGMP σε σχέση με το 5'-AMP η οποία είναι σύμφωνη με την μεγαλύτερη νουκλεοφιλικότητα του N7 της γουανίνης, υπονοεί ότι το τελευταίο είναι ο κύριος στόχος στην διπλή έλικα του DNA.

Το αντίστοιχο μονοάμμιο παράγωγο του $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_3(\text{H}_2\text{O})$, $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_3(\text{NH}_3)$ αλληλεπιδρά με το poly-(dGdC) προκαλώντας και αυτό την αλλαγή από τη B στη Z διαμόρφωση του πολυμερούς αλλά με μικρότερη ταχύτητα. Καθώς τα δυο σύμπλοκα παρουσιάζουν περίπου την ίδια ταχύτητα αποδέσμευσης του Cl^- , η διαφορά στην ταχύτητα σύνδεσης με το πολυμερές θα πρέπει να οφείλεται στη μια λιγότερη θέση σύμπλεξης που έχει το δεύτερο. Η παρόμοια συμπεριφορά του μονάμμιο παραγώγου εμμέσως υποστηρίζει το σχηματισμό ενός μονοσχιδούς παραγώγου κατά την αλληλεπίδραση του cis-Ru με το DNA. Αν και αυτό το συμπέρασμα δεν σημαίνει απαραίτητα ότι το cis-Ru δεν είναι ικανό να σχηματίσει χηλικά σύμπλοκα με την αλυσίδα του DNA, τα πειραματικά δεδομένα που έχουν συγκεντρωθεί μέχρι τώρα συνηγορούν ότι μια τέτοια πιθανότητα δεν είναι σχετική με τον τρόπο αλληλεπίδρασης τουλάχιστον σε ότι αφορά του εξεταζόμενους χρόνους επώασης.

2.6 Αλληλεπίδραση των $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ με DNA *in vitro*

Το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ όταν θερμαίνεται με CT DNA στις ίδιες πειραματικές συνθήκες όπως και το *cis* ισομερές, συνδέεται ομοιοπολικά με αυτό με σημαντικά υψηλότερη ταχύτητα. Όπως αναμενόταν η μετάπτωση από την B στην Z διαμόρφωση του poly(dGdC) είναι επίσης πολύ ταχύτερη, παρουσιάζοντας ένα μέσο σημείο αλληλεπίδρασης στα 50 λεπτά ενώ το *cis* ισομερές στις 4 ώρες. Αμφότερα τα στοιχεία υποδηλώνουν το N7 της γουανίνης ως τον κύριο στόχο.

Στην περίπτωση του $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$, ακόμα και μετά από λίγες ώρες αλληλεπίδρασης, η αντίδραση με το CT DNA δίνει μια σημαντική τροποποίηση στην δομή του DNA όπως αποκαλύπτεται από τη μείωση της έντασης των κορυφών στο CD. Αυτή η φασματική αλλαγή, η οποία μπορεί να αποδοθεί σε μια σταδιακή διαταραχή της δομής του DNA, πιθανό να σχετίζεται με την δημιουργία χηλικών προϊόντων κατά μήκος της αλυσίδας. Η αλληλεπίδραση του διάμμινο συμπλόκου εξετάστηκε επίσης. Η πολύ μικρή ταχύτητα αντίδρασης που παρατηρήθηκε οφείλεται πιθανόν στην αμελητέα ταχύτητα αποδέσμευσης του χλωρίου και την αδράνεια των συμπλεγμένων μορίων αμμωνίας.

Τα παραπάνω δεδομένα για τα δυο ισομερή, συνηγορούν στη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ του ρουθηνίου και του DNA κυρίως στο N7 της γουανίνης στην μεγάλη κοιλότητα (major groove) του DNA. Η προτίμηση για σύμπλεξη στην γουανίνη επιβεβαιώθηκε με μελέτη της αναστολής της δράσης περιοριστικών ενδονουκλεασών στο πλασμίδιο pBR322. Τα δεδομένα της μελέτης αυτής δείχνουν καθαρά ότι το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$, όπως και το *cisplatin*, αναστέλλουν αυτά τα ένζυμα, όπως το BamH I, Ava I, τα οποία αναγνωρίζουν αλληλουχίες οι οποίες περιέχουν δυο ή περισσότερες διαδοχικές γουανίνες. Η ανασταλτική δράση μειώνεται με τη μείωση του αριθμού των βάσεων γουανίνης που υπάρχουν στην αλληλουχία του DNA, μέχρι που εξαφανίζεται τελείως για ένζυμα όπως το Ssp I. Σε συμφωνία με τη χημική συμπεριφορά των δυο ισομερών, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες το $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ είναι σχεδόν τελείως ανενεργό.

Η εκλεκτικότητα του $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ ως προς τη σύνδεση με το DNA, μπορεί να αποδοθεί στον σχηματισμό χηλικών προϊόντων με ταυτόχρονη σύνδεση στα N7 δυο διαδοχικών βάσεων γουανίνης σε αναλογία με το *cisplatin* ή στο σχηματισμό σταθερών μονοσχιδών παραγώγων, η δημιουργία των οποίων ευνοείται από τη παρουσία δυο διαδοχικών βάσεων γουανίνης.

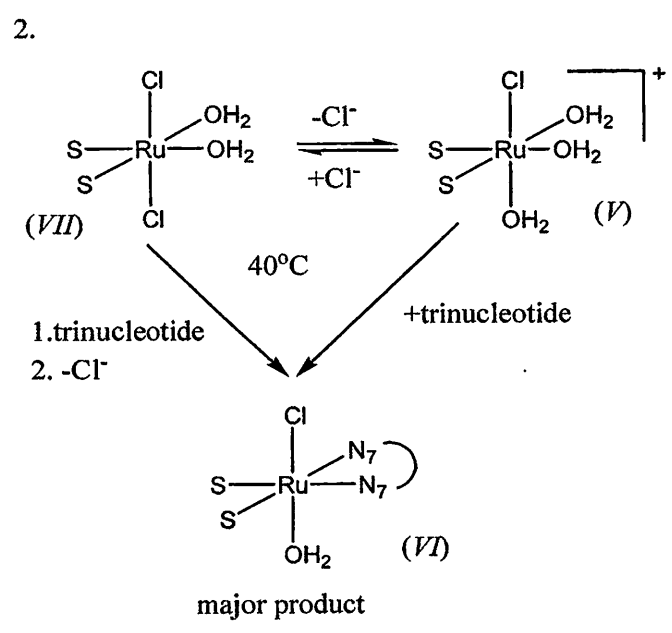
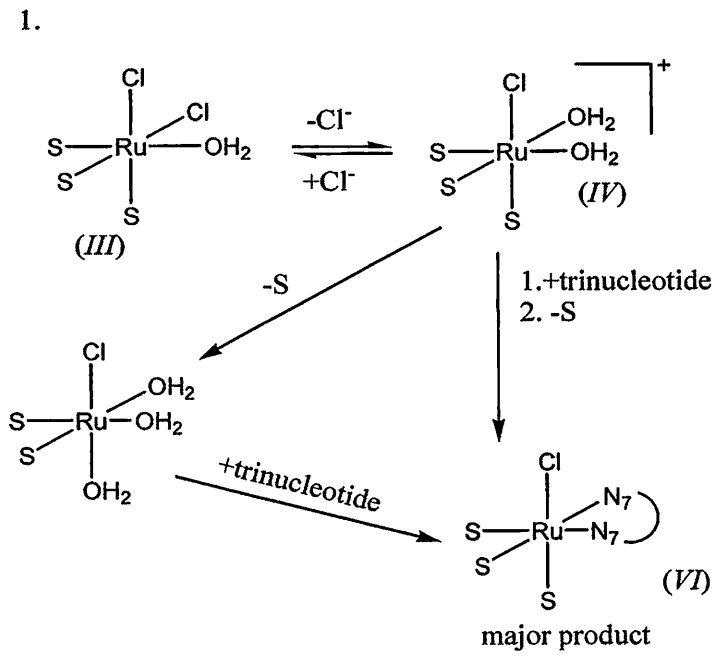
3. Προτεινόμενος μηχανισμός δράσης

Βασιζόμενοι στη χημική συμπεριφορά των *cis*- και *trans*- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ και τις αλληλεπιδράσεις αυτών με ανόργανες φωσφορικές ομάδες, ιμιδαζόλιο και DNA, ένας πρώτος μηχανισμός δράσης τους *in vivo*, προτάθηκε από την ομάδα του G.Mestroni³⁰.

Στο σχήμα 3.2 απεικονίζεται ο μηχανισμός για το *cis*- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$. Εξαιτίας της υψηλής εξωκυτταρικής συγκέντρωσης NaCl , τα κύρια είδη, τα οποία είναι παρόντα έξω από το κύτταρο θα πρέπει να είναι τα ουδέτερα παράγωγα με ένα μόριο νερού. Σε συμφωνία με την προηγουμένως περιγραφείσα συμπεριφορά του, αναμένεται να αντιδράσει αργά με διάφορους υποκαταστάτες *in vivo* για να δώσει «κορεσμένα» ουδέτερα και κατιονικά σύμπλοκα.

Εξαιτίας της σχετικής αδράνειας, το σύμπλοκο του Ru(II) θα πρέπει να είναι σε θέση να πλησιάσει την κυτταρική μεμβράνη και να τη διαπεράσει, πιθανότατα με μηχανισμό παθητικής διάχυσης, σε μεγάλο βαθμό. Μέσα στο κύτταρο πλέον, το σύμπλοκο μπορεί να αποδεσμεύσει ένα ανιόν χλωρίου και να δώσει το ανιονικό παράγωγο με δυο μόρια νερού (III), το οποίο στην συνέχεια αναμένεται να αλληλεπιδράσει αργά με το DNA. Υποθέτοντας ότι ο πρώτος στόχος στο DNA είναι το N7 της γουανίνης και λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το σύμπλοκο έχει δυο πιθανά σημεία σύμπλεξης, τα δυνατά προϊόντα της ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης είναι μονοσχιδή συμπλέγματα μέσω του N7 της γουανίνης, χηλικά σύμπλοκα μέσω N7 και O6 μιας βάσης γουανίνης ή ακόμη και προϊόντα χηλικής υποκατάστασης σε δυο πουρίνες. Το σύμπλοκο μπορεί ακόμη να αντιδράσει και με άλλους υποκαταστάτες μέσα στο κύτταρο συμπεριλαμβανομένης και της ανόργανης φωσφορικής ομάδας.

Το αντίστοιχο μονοάμμινο παράγωγο δεν έχει ελεύθερη θέση σύμπλεξης σε περιβάλλον υψηλής συγκέντρωσης Cl^- και γι' αυτό το λόγο δε θα πρέπει να αντιδράσει όσο βρίσκεται έξω από το κύτταρο. Βάσει των αυστηρών αναλογιών τους, παρόμοια συμπεριφορά στη μεταφορά μέσα από την κυτταρική μεμβράνη στο εσωτερικό των κυττάρων μπορεί λογικά να υποτεθεί και για τα σύμπλοκα (XIII) και (XIV). Μέσα στο κύτταρο το σύμπλοκο (XIII) μπορεί να ελευθερώσει ένα ανιόν χλωρίου και αλληλεπιδράσει με το DNA δίνοντας μόνο προϊόντα με μονοσχιδή σύμπλεξη με το DNA. Ο μηχανισμός που προτείνεται για το *trans*- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ δίνεται στο σχήμα 3.2. Στηριζόμενοι στους ίδιους συλλογισμούς με παραπάνω, σε αυτή την περίπτωση το κύριο είδος έξω από το κύτταρο θα πρέπει να είναι το παράγωγο (VI) με δυο μόρια νερού. Αυτό αναμένεται να αντιδράει εύκολα, πολύ πιο γρήγορα από το αντίστοιχο παράγωγο (II) του *cis*-ισομερούς, με τους υποκαταστάτες οι οποίοι είναι παρόντες έξω από το κύτταρο δίνοντας κορεσμένα ως προς τον αριθμό των υποκαταστατών σύμπλοκα.



Σχήμα 3.2 : Προτεινόμενος μηχανισμός αλληλεπίδρασης των ισομερών συμπλόκων RuCl₂(DMSO)₄.

Κεφάλαιο IV

Η φασματοσκοπία NMR στη μελέτη της δομής και διαμόρφωσης νουκλεοτιδίων και ολιγονουκλεοτιδίων.

1. Ολιγονουκλεοτίδια

1.1 Δομικά συστατικά του DNA

Τα νουκλεϊνικά οξέα (DNA, RNA) αποθηκεύουν, μεταφέρουν και εκφράζουν από τη μια γενιά οργανισμών στην επόμενη, τις πληροφορίες οι οποίες είναι απαραίτητες για την διατήρηση της ζωής. Πρόκειται για βιοπολυμερή με μοναδική δομή. Αποτελούνται από δυο βάσεις πουρινών, την αδενίνη(A) και την γουανίνη (G) και τρεις βάσεις πυριμιδινών, την κυτοσίνη (C), τη θυμίνη(T) για το DNA, και την ουρακίλη (U) για το RNA. Το κύριο σακχαρικό συστατικό των νουκλεϊνικών οξέων είναι η D-ριβόζη στο RNA και η 2'-δεόξυ-D-ριβόζη στο DNA. Και τα δυο αυτά σάκχαρα βρίσκονται σε μια νουκλεοτιδική αλυσίδα υπό την μορφή της β-D-φουρανόζης.

Τα νουκλεοτίδια είναι φωσφορυλιωμένα νουκλεοσίδια (φωσφορικοί μονοεστέρες) στην θέση 3' ή 5' (ή και 2' στα ριβονουκλεοσίδια). Ονομάζονται σαν οξέα από το όνομα της αντίστοιχης βάσης, δηλώνοντας σε παρένθεση τη θέση φωσφορυλίωσης ή σαν υποκατεστημένο νουκλεοσίδιο.

1.2 Δομή και διαμόρφωση νουκλεϊνικών οξέων.

Το 5'-νουκλεοτίδιο αποτελεί το βασικό επαναλαμβανόμενο τμήμα στο δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA) και στο ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA). Η ομάδα του φωσφορικού οξέος της 5'-θέσης ενός νουκλεοτιδίου είναι εστερικά ενωμένη με το 3'-υδροξύλιο ενός άλλου νουκλεοτιδίου με τρόπο ώστε να δημιουργείται αλυσίδα φωσφορικών διεστέρων. Στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα χρησιμοποιούνται τα γράμματα A,G,U,T,C για τον συμβολισμό των αντίστοιχων νουκλεοζιτών. Το γράμμα 'p' δηλώνει ομάδα φωσφορικού οξέος. Όταν γράφεται αριστερά του γράμματος του νουκλεοζίτη δείχνει ότι το φωσφορικό είναι εστεροποιημένο με το 5'-υδροξύλιο της πεντόζης, ενώ όταν η φωσφορική ομάδα γράφεται αριστερά είναι εστεροποιημένη με το 3'-υδροξύλιο. Το 'p' ανάμεσα σε δυο νουκλεοσίδια μπορεί να αντικατασταθεί από μια παύλα.

Ανάλογα με την ιδιαίτερη βιολογική τους λειτουργία, είναι δυνατό τα δυο είδη των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) να υπάρχουν στην μορφή είτε ενός κλώνου είτε δυο κλώνων μαζί σχηματίζοντας δεξιόστροφη ελικοειδή δομή. Οι δυο κλώνοι της έλικας αλληλεπιδρούν με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων, ενώ τα ζεύγη βάσεων είναι αδενίνη-θυμίνη και γουανίνη-κυτοσίνη. Εξαιτίας των ζευγών βάσεων, οι δυο κλώνοι αυτοί είναι υπεύθυνοι για την μεταφορά των βιολογικών πληροφοριών (αντιγραφή) και από νουκλεϊνικό οξύ σε πρωτεΐνη (μεταγραφή-μετάφραση).

Στο DNA οι γλυκοζιτικοί δεσμοί μεταξύ των σακχάρων και των βάσεων ενός ζεύγους βάσεων στη διπλή έλικα, δε βρίσκονται σε θέσεις αντιδιαμετρικά αντίθετες και έτσι σχηματίζονται δυο αύλακες/κοιλότητες διαφορετικού πλάτους στην επιφάνεια του βιοπολυμερούς. Η κοιλότητα με άνοιγμα μεγαλύτερο από 180° λέγεται μεγάλη αύλακα (major groove) ενώ αυτή με άνοιγμα μικρότερο από 180° λέγεται μικρή αύλακα (minor groove). Τέλος ανάλογα με την αλληλουχία των βάσεων, το DNA μπορεί να λάβει διάφορες διαμορφώσεις κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Οι μεταβολές δεν επηρεάζουν το περιεχόμενο των πληροφοριών του DNA αλλά μπορούν να επιδράσουν στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Οι περισσότερες πληροφορίες που υπάρχουν για τη μοριακή δομή του DNA, προέρχονται από μελέτες περίθλασης ακτίνων X σε ίνες DNA γνωστής αλληλουχίας. Οι κύριες διαμορφώσεις της διπλής έλικας που έχουν παρατηρηθεί είναι οι A-, B- και Z-DNA ⁴¹.

1.3 Γεωμετρικά χαρακτηριστικά νουκλεοτιδίων

1.3.1 Σύστημα ρύθμισης ατόμων

Τα νουκλεϊνικά οξέα έχουν τρία κύρια δομικά χαρακτηριστικά :

1. Τον πενταμελή δακτύλιο του σακχάρου, τη ριβόζη για το RNA και την 2'-δεοξυριβόζη για το DNA
2. Τις ετεροκυκλικές βάσεις οι οποίες συνδέονται στον άνθρακα C1' του δακτυλίου του σακχάρου σε β-διαμόρφωση
3. Την 3'-5' φωσφοδιεστερική σύνδεση που συνδέει τα σάκχαρα δυο διαδοχικών νουκλεοτιδίων.

Τα άτομα των σακχάρων διαφοροποιούνται από εκείνα των βάσεων με έναν τόνο ('). Η διεύθυνση αρίθμησης των ατόμων στο σκελετό ενός πολυνουκλεοτιδίου ακολουθεί το σχήμα P-O₅'-C₅'-C₄'-C₃'-O₃'-P. Στον δακτύλιο του σακχάρου η αρίθμηση ακολουθεί τη σειρά C₁'-C₂'-C₃'-C₄'-O₄'-C₁'. Για τα δυο πρωτόνια στον C₅, C₂, διατηρούμε εδώ το συμβολισμό C₅'', C₅''' και C₂'', C₂'''.

1.3.2 Ορισμός γωνιών στρέψης

Η τριών διαστάσεων δομή των μορίων χαρακτηρίζεται από μήκη δεσμών, γωνίες δεσμών και περιστροφές ατόμων ή ομάδων γύρω από δεσμούς. Οι περιστροφές αυτές γίνονται γύρω από ένα κεντρικό δεσμό B-C και περιγράφονται με τις γωνίες στρέψης (torsion angles), οι οποίες αναφέρονται σε τέσσερα διαδοχικά μόρια A-B-C-D. Η γωνία στρέψης θ ορίζεται ως η γωνία που σχηματίζουν οι προβολές των δεσμών A-B και C-D κοιτώντας κατά μήκος του άξονα B-C σε οποιαδήποτε από τις δυο διευθύνσεις. Η γωνία αυτή έχει τιμή 0° όταν οι δεσμοί A-B και C-D βρίσκονται σε εκλειπτική διαμόρφωση (είναι *cis* και βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο). Επιπλέον είναι θετική όταν ο απομακρυσμένος δεσμός στρέφεται σύμφωνα με την φορά των δεικτών του ρολογιού. Η γωνία στρέψης μπορεί επίσης να οριστεί ως η γωνία που σχηματίζει το επίπεδο που περιέχει τα A, B, C με το επίπεδο που περιέχει τα άτομα B, C, D. Επίσης ορίζεται ως διέδρη γωνία Φ , η γωνία που σχηματίζουν οι κάθετες στα επίπεδα A, B, C και B, C, D. Οι γωνίες θ και Φ , στην πράξη είναι γωνίες παραπληρωματικές.

Σε μόρια με ελευθερία περιστροφής γύρω από τους απλούς δεσμούς υπάρχουν στην πράξη συγκεκριμένες, στερεικά επιτρεπτές διαμορφώσεις που προτιμούνται. Στην οργανική χημεία χρησιμοποιούνται συνήθως για αυτές τις διαμορφώσεις οι ονομασίες *syn* ($\sim 0^\circ$), *anti* ($\sim 180^\circ$), \pm *synclinal* ($\sim \pm 60^\circ$), \pm *anticlinal* ($\sim \pm 120^\circ$). Ωστόσο χρησιμοποιείται και η ορολογία *cis* ($\sim 0^\circ$), *trans* ($\sim 180^\circ$) και \pm *gauche* ($\sim \pm 60^\circ$).

1.3.3 Γωνίες στρέψης στα νουκλεοτίδια

Η διαμόρφωση του σακχάρου-φωσφορικής ομάδας στο σκελετό των νουκλεοτιδίων που ακολουθεί την σειρά αρίθμησης των ατόμων P-O₅-C₅-C₄-C₃-O₃-P ορίζεται από τις γωνίες στρέψης α , β , γ , δ , ϵ , ζ αντίστοιχα. Οι ενδοκυκλικές γωνίες στρέψης του σακχάρου συμβολίζονται με ν_0 έως ν_4 . Ο προσανατολισμός της βάσης σε σχέση με το σάκχαρο περιγράφεται από την γωνία χ . Οι γωνίες ν_3 και δ περιγράφουν προσανατολισμούς γύρω από τον ίδιο κεντρικό δεσμό, έναν ενδοκυκλικό και έναν εξωκυκλικό.

1.3.4 Τρόποι διαμόρφωσης του σακχάρου

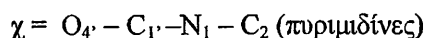
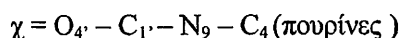
Εν γένει ο πενταμελής δακτύλιος της φουρανόζης δεν είναι επίπεδος. Μπορεί να πτυχωθεί είτε σε διαμόρφωση φακέλου (envelope, E) στην οποία τα τέσσερα άτομα του δακτυλίου ανήκουν στο ίδιο επίπεδο και το πέμπτο εξέχει είτε σε μια περισσότερο πτυχωμένη διαμόρφωση (twist, T) όπου δυο διαδοχικά άτομα εξέχουν προς αντίθετες πλευρές, από το επίπεδο των υπολοίπων τριών ατόμων. Άτομα

τα οποία είναι εκτός του επιπέδου των υπολοίπων τεσσάρων ή τριών και προς την πλευρά του C₅ καλούνται endo και αυτά προς την αντίθετη πλευρά, καλούνται exo. Η πτύχωση του δακτυλίου χαρακτηρίζεται κατά αντίστοιχο τρόπο. Η μετάπτωση από την E στην Ta διαμόρφωση είναι σχετικά εύκολη, συνήθως τα άτομα που ορίζουν το επίπεδο των τεσσάρων ατόμων δεν είναι ακριβώς ομοεπίπεδα, ενώ οι αποκλίσεις των δυο ατόμων από το επίπεδο των τριών σε μια Ta διαμόρφωση είναι συμμετρικές μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις. Γι' αυτό το λόγο η μεγαλύτερη απόκλιση από το επίπεδο καλείται κύρια πτύχωση (major puckering) και η μικρότερη, 'δευτερεύουσα' (minor puckering).

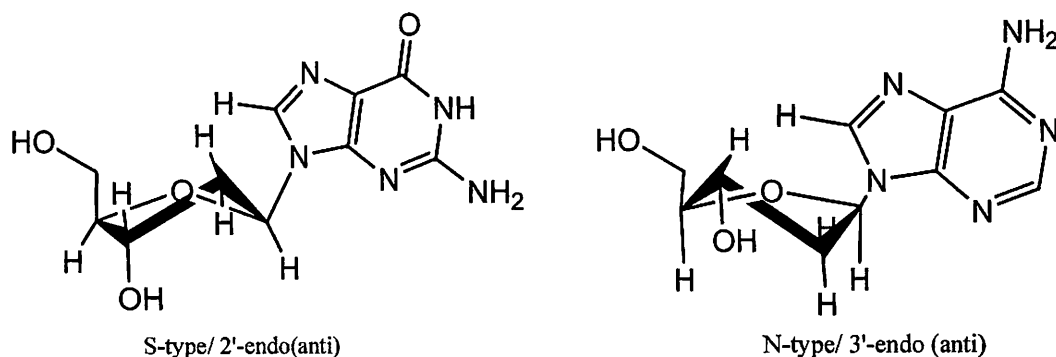
Οι διάφορες πτυχώσεις περιγράφονται με τα γράμματα E και Ta και συνοδεύονται από δείκτες. Ο άνω δείκτης δηλώνει το endo άτομο και ο κάτω το exo. Αν ο δείκτης προηγείται του γράμματος τότε αναφέρεται σε 'κύρια' πτύχωση, ενώ αν ακολουθεί ως 'δευτερεύουσα'.

1.3.5 *Syn/anti* διαμορφώσεις στο γλυκοζιτικό δεσμό

Η βάση μπορεί να υιοθετήσει δυο βασικούς προσανατολισμούς γύρω από τον γλυκοζιτικό δεσμό, που ονομάζονται *syn* και *anti* και περιγράφονται από την γωνία στρέψης χ , και ορίζονται ως :



Στην *anti* διαμόρφωση ο ογκώδης ετεροκυκλικός δακτύλιος της βάσης στρέφεται σε αντίθετη κατεύθυνση από το σάκχαρο ενώ στην *syn* είναι στραμμένος προς το σάκχαρο και ουσιαστικά βρίσκεται πάνω από αυτόν. (σχήμα 4.1)



Σχήμα 4.1: Νουκλεοσίδια γουανίνης και αδενίνης αντίστοιχα σε διαφορετικές διαμορφώσεις του σακχάρου με ίδια διαμόρφωση βάσης.

2. Το NMR στην μελέτη των ολιγονουκλεοτιδίων

Η υψηλής ανάλυσης φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) παρέχει πληροφορίες για τη γεωμετρία και τη δυναμική μοριακών συστημάτων σε διάλυμα και έχει εφαρμοσθεί σε μόνο-, ολίγο- και πολυνουκλεοτίδια, με τεχνικές διαφόρων πυρήνων και κυρίως ^1H , ^{13}C , ^{15}N και ^{31}P , ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται και πυρήνες μετάλλων. Τρεις βασικές παράμετροι του NMR μεταφράζονται σε δομικά δεδομένα, η χημική μετατόπιση (δ), η spin-spin σύζευξη (J) και ο χρόνος χαλάρωσης spin-πλέγματος (T_1) και με τον ίδιο μηχανισμό η ανάπτυξη του φαινομένου NOE (Nuclear Overhauser Effect). Στην συνέχεια θα περιγραφούν σύντομα αυτές οι παράμετροι, με έμφαση στα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των μορίων.

2.1 Χημική μετατόπιση (δ)

Η συχνότητα ενός πυρήνα στο NMR εξαρτάται από το γυρομαγνητικό λόγο γ του πυρήνα και την ένταση του μαγνητικού πεδίου B που νιώθει ο πυρήνας, σύμφωνα με την σχέση : $\nu = \gamma B/2\pi$. Ο γυρομαγνητικός λόγος έχει την ίδια τιμή για κάθε πυρήνα του ίδιου είδους ατόμων, αλλά η ένταση του μαγνητικού πεδίου που αισθάνεται κάθε πυρήνας σε ένα μόριο εξαρτάται κυρίως από την ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου B_0 που εφαρμόζουμε, αλλά υπόκειται και σε μια μικρή διαφοροποίηση εξαιτίας της συνεισφοράς της τοπικής κατανομής ηλεκτρονίων γύρω από το άτομο καθώς και της αλληλεπίδρασης με το περιβάλλον. Αυτή η επίδραση προκαλεί διαφορετική χημική μετατόπιση στους πυρήνες ενός μορίου με διαφορετικό χημικό περιβάλλον και καλείται προάσπιση του πυρήνα (σ). Η σχέση που δίνει την προάσπιση είναι :

$$\sigma = \sigma_{\text{dia}}^{\text{local}} + \sigma_{\text{para}}^{\text{local}} + \sigma_{\text{N}} + \sigma_{\text{R}} + \sigma_{\text{e}} + \sigma_{\text{i}}$$

Όπως φαίνεται, η προάσπιση διαμορφώνεται από την συνεισφορά διαφόρων παραγόντων :

- Το μαγνητικό πεδίο μπορεί να επάγει δυο ειδών ρεύματα ηλεκτρονίων σε ένα μόριο, το διαμαγνητικό και το παραμαγνητικό. Το διαμαγνητικό οφείλεται στην σφαιρική κατανομή του φορτίου γύρω από τον πυρήνα (diamagnetic shielding effect) και το παραμαγνητικό στην μη σφαιρική (paramagnetic shielding effect).
- Την επίδραση της μαγνητικής ανισοτροπίας γειτονικών ομάδων, όπου σ_{N} οι χημικοί δεσμοί που είναι εν γένει μαγνητικά ανισότροποι, έχουν δηλαδή διαφορετική μαγνητική επιδεκτικότητα κατά μήκος των τριών διευθύνσεων στο χώρο. Κατά συνέπεια οι μαγνητικές ροπές που επάγονται από την εφαρμογή του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου

δεν είναι ίσες για διαφορετικές διευθύνσεις, επομένως η προάσπιση που μπορεί ο δεσμός να προκαλεί σε άλλους πυρήνες θα εξαρτάται από τη γεωμετρική θέση του δεσμού σε σχέση με το υπόλοιπο μόριο.

- Την επίδραση του ρεύματος δακτυλίου (ring current effect, σ_R). Όταν στο μόριο με απεντοπισμένα π -ηλεκτρόνια ασκηθεί εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, τότε επάγεται ρεύμα δακτυλίου (ring current), το οποίο με τη σειρά του δημιουργεί ένα μαγνητικό πεδίο που παρουσιάζει ανισοτροπία στο χώρο με αποτέλεσμα κι εδώ η επίδραση στα γειτονικά άτομα να εξαρτάται από τη γεωμετρία του μορίου.
- Την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, σ_e , που παρουσιάζεται σε μόριο που περιέχει πολικές ομάδες, τότε δημιουργείται ένα ενδομοριακό ηλεκτρικό πεδίο το οποίο επηρεάζει την κατανομή των ηλεκτρονίων στο μόριο.
- Τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, σ_i , κυριότερες των οποίων είναι οι δεσμοί υδρογόνου και η αλληλεπίδραση με μόρια διαλύτη.

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό 'το η χημική μετατόπιση κάθε πυρήνα εμπεριέχει πληροφορίες τόσο για το χημικό του περιβάλλον όσο και για τη γεωμετρία του μορίου γύρω από τον πυρήνα αυτό.

2.2 Σταθερά σύζευξης, J

Μια ακόμα εξαιρετικά πολύτιμη πηγή πληροφοριών στα φάσματα NMR αποτελούν οι μαγνητικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες είναι γνωστές ως spin-spin συζεύξεις (couplings) ή βαθμωτές συζεύξεις (scalar couplings) ή απλώς J-couplings και αναπτύσσονται μέσω των χημικών δεσμών. Μεταξύ άλλων, οι spin-spin συζεύξεις προκαλούν διάσχιση των κορυφών του φάσματος διατηρώντας σταθερό το ολικό εμβαδόν. Το μέγεθος της διάσχισης, μετρούμενο σε Hz, καλείται σταθερά σύζευξης J. Ο αριθμός που μπαίνει ως δείκτης πάνω και αριστερά από το J, δηλώνει τον αριθμό των δεσμών που μεσολαβούν μεταξύ των οποίων εκδηλώνεται η σύζευξη σημειώνονται κάτω δεξιά ($^nJ_{AX}$).

Η κύρια αιτία του φαινομένου της σύζευξης, είναι η έμμεση αλληλεπίδραση των πυρήνων μέσω των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στους χημικούς δεσμούς. Το μέγεθος των σταθερών σύζευξης μειώνεται καθώς αυξάνεται ο αριθμός των δεσμών μεταξύ των ατόμων. Μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν τις σταθερές σύζευξης είναι οι ακόλουθοι :

- Ο υβριδισμός των ατόμων που συμμετέχουν στην σύζευξη
- Οι γωνίες δεσμών και γωνίες στρέψης

- Τα μήκη δεσμών
- Η παρουσία γειτονικών π-δεσμών
- Η επίδραση γειτονικών μη δεσμικών ζευγών ηλεκτρονίων
- Η επίδραση υποκαταστατών

Οι πιο χρήσιμες για την ανάλυση των δομών είναι οι συζεύξεις spin-spin τριών δεσμών. Συγκεκριμένα, η $^3J_{HH}$ σύζευξη μεταξύ υδρογόνων σε δυο διαδοχικούς άνθρακες, H-C-C-H. Η χρησιμότητα αυτών των συζεύξεων εστιάζεται στην εξάρτηση των σταθερών από τη δίεδρη γωνία φ , που σχηματίζουν τα δυο επίπεδα, H-C-C και C-C-H σύμφωνα με τη σχέση του Karplus ⁴² :

$$^3J = A\cos^2\varphi + B\cos\varphi + C$$

Η σχέση Karplus έχει βρει σημαντική εφαρμογή στην ανάλυση της διαμόρφωσης βιομορίων, όπως τα πεπτίδια και τα νουκλεοτίδια. Στην περίπτωση που έχουμε διαμορφώσεις γύρω από ένα κεντρικό δεσμό που εναλλάσσονται πολύ γρήγορα τότε η σταθερά σύζευξης που υπολογίζεται μέσω του NMR αντιστοιχεί στην μέση τιμή των σταθερών που αντιστοιχούν στην κάθε διαμόρφωση, λαμβάνοντας υπόψη και το ποσοστό συμμετοχής της κάθε μιας ⁴³.

2.3 T_1 και NOE

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου τα spin μεταπίπτουν στις ενεργειακές καταστάσεις μέχρι να φθάσουν στην ισορροπία (κατανομή Boltzmann), είναι ο μηχανισμός της χαλάρωσης spin-πλέγματος (spin-lattice relaxation), ο οποίος είναι και ο βασικός μηχανισμός αποδιέγερσης του πυρήνα μετά τον παλμό στη φασματοσκοπία NMR. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται από τον χρόνο T_1 . Οι τυπικές τιμές του χρόνου αυτού για πυρήνες με $I = 1/2$ σε διάλυμα δεν ξεπερνούν τα μερικά δευτερόλεπτα⁴⁴.

Οι μηχανισμοί χαλάρωσης που βρίσκουν εφαρμογή σε άλλα είδη φασματοσκοπίας δεν είναι δυνατοί στο NMR. Η αποδιέγερση μέσω εκπομπής ακτινοβολίας είναι πάρα πολύ αργή καθώς η ταχύτητα είναι ανάλογη του κύβου της συχνότητας της ακτινοβολίας. Επίσης αποδιέγερση μέσω συγκρούσεων με άλλα μόρια δεν είναι εφικτή καθώς οι πυρήνες των ατόμων υπόκεινται σε πολύ ασθενείς αλληλεπιδράσεις με τον υπόλοιπο κόσμο. Έτσι μένουν μόνο οι μαγνητικές αλληλεπιδράσεις.

Σε πυρήνες με $I = 1/2$ δυο είναι οι βασικοί μηχανισμοί χαλάρωσης μέσω μαγνητικών αλληλεπιδράσεων :

- Χαλάρωση spin-πλέγματος (spin-lattice), κατά την κατεύθυνση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου z , και σχετίζεται με την μεταφορά ενέργειας στο περιβάλλον.
- Spin-spin χαλάρωση (spin-spin relaxation), στον κάθετο στον άξονα z επίπεδο. Περιγράφεται από τον χρόνο χαλάρωσης T_2 ή με την ταχύτητα / ρυθμό χαλάρωσης R_2 ($R_2 = 1 / T_2$). Η διαδικασία χαλάρωσης περιλαμβάνει την ανακατανομή της ενέργειας μεταξύ των spin.

Μεταξύ των δυο πυρήνων, I και S, που χαλαρώνουν ο ένας τον άλλο, αναπτύσσεται το φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Effect). Κατά την εκλεκτική ακτινοβολήση ενός εκ των δυο πυρήνων, έστω του S, μέσω του μηχανισμού spin-lattice, μεταφέρεται μαγνήτιση στο δεύτερο πυρήνα I, μεταβάλλοντας τους πληθυσμούς στις ενεργειακές καταστάσεις και κατά συνέπεια και στην ένταση των σημάτων. Αναπτύσσεται έτσι το φαινόμενο NOE, το οποίο μπορεί να είναι θετικό (δηλαδή αύξηση της έντασης της κορυφής I σε σχέση με ότι παρατηρείται κανονικά) ή αρνητικό (μείωση της έντασης) ανάλογα με τις συνθήκες.

Η τιμή του αναπτυσσόμενου NOE δε δίνει πληροφορίες για τις αποστάσεις των πυρήνων. Το μέγεθος που εμπεριέχει αυτές τις πληροφορίες είναι ο ρυθμός ανάπτυξης του NOE, ρ_{IS} , όταν αρχίζει η ακτινοβολία και ο ρυθμός που εξασθενίζει όταν κλείνει ο παλμός⁴⁵.

$$\rho_{IS} = K \gamma_I^2 \gamma_S^2 \tau_C r_{IS}^{-6}$$

3. Μελέτη της διαμόρφωσης νουκλεοτιδίων

Τα νουκλεϊνικά οξέα, όπως είδαμε έχουν τρία δομικά χαρακτηριστικά, τον πενταμελή δακτύλιο, τις ετεροκυκλικές βάσεις και το φωσφοδιεστερικό δεσμό. Η εξίσωση Karplus έχει χρησιμοποιηθεί στον υπολογισμό δίδρωνων γωνιών, τόσο για τον δακτύλιο όσο για τους δεσμούς του σκελετού, αρκεί να υπάρχει η κατάλληλη σταθερά 3J , ωστόσο υπάρχουν αρκετοί περιοριστικοί παράγοντες που οδηγούν σε περισσότερο πολύπλοκες εξισώσεις.

3.1 Διαμόρφωση δακτυλίου ριβόζης

Το NMR έχει αποδειχθεί η μόνη ικανή φασματοσκοπική τεχνική να προσδιορίσει τις διαμορφώσεις του δακτυλίου της φουρανόζης νουκλεοτιδίων σε διάλυμα. Στη θεωρία είναι δυνατό να

εξαχθεί η πλήρης διαμόρφωση του δακτυλίου των σακχάρων με τη γνώση όλων των σταθερών σύζευξης γειτονικών πρωτονίων (vicinal proton spin coupling). Αυτό είναι δυνατό για παράγωγα νουκλεϊνικών οξέων όπου το σάκχαρο είναι άκαμπτο, όχι όμως και σε νουκλεοτίδια για ποικίλους λόγους ⁴⁶.

Τα δεδομένα δείχνουν ότι ο δακτύλιος της φουρανόζης δεν έχει μια μοναδική, άκαμπτη δομή σε διάλυμα αλλά βρίσκεται σε δυναμική ισορροπία δυο τουλάχιστον διαμορφώσεων οι οποίες ευνοούνται ενεργειακά ⁴⁷ με μικρό ενεργειακό φράγμα να τις χωρίζει. Εάν η αλληλομετατροπή μεταξύ των δυο διαμορφώσεων είναι αρκετά γρήγορη τότε οι παρατηρούμενες σταθερές σύζευξης αποτελούν έναν μέσο όρο σταθερών της κάθε διαμόρφωσης. Στον προσδιορισμό της τελικής τιμής η σταθερά από τη κάθε διαμόρφωση συμμετέχει ανάλογα με το ποσοστό που το μόριο υιοθετεί τη διαμόρφωση αυτή.

Η διαμόρφωση των σακχάρων περιγράφεται συνήθως σαν ισορροπία μεταξύ δυο βασικών περιοχών διαμορφώσεων ⁴⁸, την C₂-endo (S) και την C₃-endo(N). (Σχήμα 4.1)

Γίνεται φανερό ότι οι γωνίες στρέψης διαφέρουν σημαντικά στις δυο διαμορφώσεις και κατά συνέπεια θα διαφοροποιούνται σε ανάλογο βαθμό και οι σταθερές σύζευξης ³J_{1,2} και ³J_{3,4}, αντίστοιχα. Η διαφοροποίηση αυτή οδήγησε σε μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού των ποσοστών των βασικών διαμορφώσεων N, S.

Φασματοσκοπικά δεδομένα δείχνουν ταχεία μετατροπή N-S. Αυτό φαίνεται και από τα δεδομένα NMR και μπορεί να προσδιορισθεί από τις σταθερές σύζευξης ³J_{1,2} και ³J_{3,4}, επομένως τις χρησιμοποιούμε για τον προσδιορισμό της σταθεράς ισορροπίας. Γενικά οι πυριμιδίνες ευνοούν την C₃-endo (N) διαμόρφωση, ενώ οι πουρίνες προτιμούν την C₂-endo (S) ⁴⁹.

Οι σταθερές σύζευξης μπορούν να ερμηνευτούν βάσει της ισορροπίας N-S και να δώσουν ποιοτικά τα ποσοστά πληθυσμού για κάθε διαμόρφωση ⁵⁰. Υπάρχει ένας κανόνας που δίνει τα ποσοστά των πληθυσμών από τις σταθερές σύζευξης ³J_{1,2} και ³J_{3,4} και συγκεκριμένα ισχύει:

$$\%S = 10 \times {}^3J_{1,2}, \quad \%N = 10 \times {}^3J_{3,4}$$

Η σταθερά της ισορροπίας δίνεται με ικανοποιητική ακρίβεια από τη σχέση :

$$K_{eq} = {}^3J_{1,2} / {}^3J_{3,4}$$

Ο κανόνας αυτός που περιγράφηκε για τον υπολογισμό των δυο δομών, δίνει ποιοτικά αποτελέσματα και θα χρησιμοποιηθεί στην παρούσα εργασία όσον αφορά τη μελέτη των ριβονουκλεοτιδίων. Για πιο λεπτομερείς αναλυτικές μεθόδους απαιτείται η χρήση τριών σταθερών σύζευξης ³J_{1,2}, ³J_{2,3}, ³J_{3,4}.

3.2 Διαμόρφωση γλυκοζιτικού δεσμού (χ)

Η περιστροφή της βάσης σε σχέση με το σάκχαρο, γύρω από τον γλυκοζιτικό δεσμό δεν είναι ελεύθερη αλλά υπόκειται σε στερική παρεμπόδιση κυρίως από το H₂-endo πρωτόνιο⁵¹. Δυο είναι οι βασικές περιοχές διαμορφώσεων που προτιμώνται, η *syn* αν το N3 στις πουρίνες και το O2 στις πυριμιδίνες βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του σακχάρου ή μακριά από αυτό ή διαφορετικά, στην *anti* διαμόρφωση όταν το H8 των πουρινών ή το H6 των πυριμιδινών βρίσκεται πάνω από το σάκχαρο⁵². Η πλειοψηφία των νουκλεϊνικών οξέων σε στερεά κατάσταση επιδεικνύουν την *anti* διαμόρφωση⁵³.

Στην *anti* διαμόρφωση δεν υπάρχει ιδιαίτερη στερική παρεμπόδιση ανάμεσα στο σάκχαρο και τη βάση, ενώ στην *syn*, το ογκώδες κομμάτι της βάσης βρίσκεται πάνω από το σάκχαρο δημιουργώντας στενές διατομικές επαφές. Η κατάσταση μπορεί να αποσυμφορηθεί αν το σάκχαρο υιοθετήσει την C₂-endo(S) διαμόρφωση, όπως διαπιστώνετε και από κρυσταλλογραφικά δεδομένα⁵⁴. Σε περιπτώσεις πουρινών με C₂-endo(S) διαμόρφωση, μπορεί να έχουν τη βάση με *syn* και *anti* προσανατολισμό, ενώ η C₃-endo(N) διαμόρφωση του σακχάρου μετατοπίζει την ισορροπία στην *anti* θέση της βάσης. Στις πυριμιδίνες και οι δυο διαμορφώσεις των σακχάρων μπορούν να συνδυαστούν. Φασματοσκοπικά δεδομένα δείχνουν ότι σε διάλυμα, τα νουκλεοτίδια υπόκεινται σε γρήγορη ισορροπία *syn-anti*⁵⁵.

Η σχέση μεταξύ του ανωμερικού πρωτονίου H1' και των H8 και H6 των πουρινών και πυριμιδινών αντίστοιχα και κατά συνέπεια και η *syn/anti* διαμόρφωση της βάσης, μπορεί να μελετηθεί μέσω του χρόνου χαλάρωσης T₁ (spin lattice relaxation time)⁵⁶ καθώς και την ανάπτυξη NOE μιας και δυο διαστάσεων.

Εν γένει, η μελέτη τοπικής μοριακής κίνησης σε διάλυμα είναι εφικτή χρησιμοποιώντας τους χρόνους T₁ των διαφόρων ατόμων. Συγκεκριμένα για τις πουρίνες η τιμή του λόγου T₁(H8) / T₁(H1') δείχνει την προτίμηση στην *anti* ή την *syn* διαμόρφωση της βάσης. Η *syn* προτιμάται όταν T₁(H8)/T₁(H1') > 1 και η *anti* όταν T₁(H8)/T₁(H1') < 1. Τα παραπάνω στηρίζονται στο γεγονός ότι στην *syn* διαμόρφωση, η «χαλάρωση» του H8, T₁(H8) καθορίζεται σχεδόν εξ'ολοκλήρου από τις αλληλεπιδράσεις διπόλου με το H1', ενώ του H1' δεν εξαρτάται μόνο από την αλληλεπίδραση με το H8 αλλά και από τα υπόλοιπα πρωτόνια του σακχάρου και η τιμή του T₁(H1') γίνεται μικρότερη από αυτήν του H8. Αντίθετα στην *anti* διαμόρφωση το T₁(H8) μπορεί να γίνει εύκολα μικρότερο από το T₁(H1') καθώς το H8 αλληλεπιδρά περισσότερο ή λιγότερο με όλα τα πρωτόνια της ριβόζης. Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις που καθορίζουν τον χρόνο χαλάρωσης προκαλούν και την ανάπτυξη φαινομένου NOE μεταξύ των πρωτονίων που έρχονται κοντά στο χώρο, η μελέτη του οποίου μας δίνει πληροφορίες για τις αποστάσεις των πρωτονίων.

Η ισορροπία ανάμεσα στις δυο διαμορφώσεις μελετάται και με την επίδραση της υποκατάστασης πρωτονίου με δευτέριο στο χρόνο χαλάρωσης γειτονικών πυρήνων. Η υποκατάσταση αυτή επιδρά με

ένα τρόπο που εξαρτάται αυστηρά από τη διαμόρφωση του μορίου στο διάλυμα⁵⁷. Το φαινόμενο αυτό είναι αποτέλεσμα των σχεδόν ασήμαντων διπολικών αλληλεπιδράσεων του δευτερίου με άλλους πυρήνες σε σχέση με το πρωτόνιο, κατά συνέπεια δε συνεισφέρει ουσιαστικά στη χαλάρωση των πυρήνων που βρίσκονται κοντά του.

Εξαγωγή συμπερασμάτων για τη θέση της *syn* – *anti* μπορεί να γίνει και με την μελέτη των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων των βάσεων υπό την επίδραση της φορτισμένης φωσφορικής ομάδας καθώς και με μεταβολή του pH και αντίστροφα την μελέτη των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του σακχάρου υπό την επίδραση των αρωματικών ηλεκτρονίων των δακτυλίων των βάσεων. Τέλος, χρήσιμες μπορούν να φανούν, εφόσον μπορούν να εξαχθούν, οι σταθερές σύζευξης 3J τριών δεσμών πρωτονίου άνθρακα. Συγκεκριμένα των $^3J_{C_4H_1}$ ή $^3J_{C_8H_1}$, για τις πουρίνες και $^3J_{C_2H_1}$ για τις πυριμιδίνες.

ΜΕΡΟΣ Β'

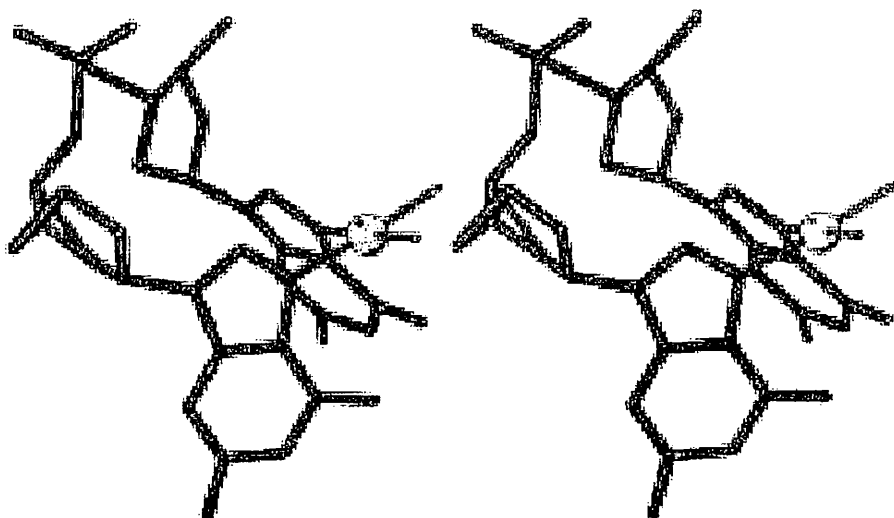
Κεφάλαιο V

Σκοπός της εργασίας

Το πρώτο βήμα των μελετών των μοριακών μηχανισμών που καθορίζουν την βιολογική δράση των χημειοθεραπευτικών συμπλόκων είναι ο καθορισμός του κυρίου στόχου στα κύτταρα. Αν ο κυτταρικός στόχος είναι το DNA, τότε το ενδιαφέρον της μελέτης μετατοπίζεται στο είδος των adducts που σχηματίζονται πάνω στην δίκλωνη αλυσίδα, στοιχείο που μπορεί να συσχετιστεί με την αντικαρκινική δράση της εξεταζόμενης ένωσης.

Στον μηχανισμό δράσης του αντικαρκινικού φαρμάκου cisplatin, αναφερθήκαμε λεπτομερώς και με δομές X-ray και NMR, για δίκλιωνα τμήματα DNA με μέγεθος 8-12 ζευγών βάσεων. Ωστόσο η έρευνα που αφορά τα είδη των σχηματιζόμενων adducts ξεκίνησε με μικρά oligονουκλεοτίδια, με την βοήθεια των οποίων αναδείχτηκαν οι δομικές λεπτομέρειες αυτών των adducts.

Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που μπορούμε να διακρίνουμε σε ενδοκλωνικό 1,2-adduct στο δινουκλεοτίδιο d(pGpG), με δεδομένα από κρυσταλλογραφία⁵⁸ (σχήμα 5.1) είναι ότι πως οι δυο δακτύλιοι της γουανίνης είναι προσανατολισμένοι σε διαμόρφωση 'head-to head' με τα δυο άτομα O₆ στην ίδια πλευρά του επιπέδου συναρμογής του Pt. Η δίεδρη γωνία μεταξύ των δακτυλίων είναι 76°-87°, αποκαλύπτοντας αποστοίβαξη των βάσεων.



Σχήμα 5.1: Κρυσταλλική δομή του cis-[Pt(NH₃)₂{d(pGpG)}]

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που αποκαλύπτεται είναι η παρουσία δεσμού υδρογόνου της αμμίνης του συμπλόκου με το άτομο οξυγόνου στην 5' φωσφορική ομάδα. Αυτή ακριβώς η αλληλεπίδραση ίσως είναι ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό, που σταθεροποιεί αυτά τα DNA adducts. Παράλληλα μελέτες NMR, σε συνδυασμό με υπολογισμούς μοριακής μηχανικής υπολογίστηκε η γωνία κάμψης κατά την σύμπλεξη κατά περίπου 60° προς την μεγάλη άδλακα.

Ενώ υπάρχουν πολλές δομικές πληροφορίες για το σύμπλεξη του cisplatin, εντούτοις η αλληλεπίδραση οκταεδρικών μεταλλικών συμπλόκων έχει διερευνηθεί λιγότερο. Ιδιαίτερη προσοχή έχει προσελκύσει το σύμπλοκο $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$, στο οποίο όπως αναφέραμε και στο κεφάλαιο 2 παρουσιάζει ιδιαίτερη αντιβλαστική δράση και αντιδρά *in vitro* και *in vivo* με το DNA. Αυτό το οκταεδρικό σύμπλοκο μετάλλου μετάπτωσης παρουσιάζει μηχανισμό δράσης παρόμοιο με αυτόν του cisplatin καθώς και προτίμηση στο άτομο N7 των γουανινών, παρά την διαφορετική τους γεωμετρία.

Βιοφυσικές μελέτες της αλληλεπίδρασης του trans και cis ισομερούς με το DNA αποκάλυψαν σημαντικά χαρακτηριστικά δράσης αυτών των συμπλόκων⁵⁹. Συγκεκριμένα ο ρυθμός δέσμευσης και των δυο στο DNA είναι σημαντικά μικρότερος σε σύγκριση με το cisplatin, με το trans ισομερές να είναι πιο αποτελεσματικό, ενώ οι αντιδράσεις αλληλεπίδρασης κατέληξαν σε μη-αντιστρεπτό σχηματισμό adducts με το DNA, όπου όμως, όπως έδειξαν πειράματα transcription mapping, για το μεν trans ισομερές έδειξαν πιθανά σημεία δισχιδούς σύμπλεξης τα GG,AG –σημαντικά ασθενέστερα σε σχέση με το cisplatin- και αποτελέσματα μονοσχιδούς σύμπλεξης, ενώ για το cis ισομερές η σύμπλεξη είναι ασθενέστερη και κυρίως μονοσχιδής. Επίσης το ποσοστό διακλωνικής σύμπλεξης για το trans είναι σημαντικά μικρότερο (6 φορές) σε σχέση με το cisplatin, με το cis να παρουσιάζει ακόμα μικρότερα ποσοστά. Τέλος η γωνία αποέλιξης (unwinding angle) του DNA, υπολογίστηκε για το trans ισομερές στις $7 \pm 1^\circ$. Συνολικά ο χαρακτήρας των τροποποιήσεων που επάγουν στο DNA αυτά τα σύμπλοκα είναι όμοιος με αυτόν του cisplatin και τελείως διαφορετικός από το κλινικά ανενεργό transplatin, ενώ βέβαια το εύρος των επαγόμενων αλλαγών είναι σημαντικότερο για το trans.

Στο πεδίο της δομικής μελέτης με φασματοσκοπία NMR, όπως είδαμε η πρώτη εργασία αφορούσε την μελέτη της αλληλεπίδρασης με το 5'-dGMP⁶⁰, το οποίο έδινε δυο διαστερεοϊσομερή όπου το τμήμα της γουανίνης και η α-φωσφορική ομάδα σχηματίζουν χηλικό σύμπλοκο με αντίθετη χειρικότητα. Σημαντική ήταν η εργασία του δομικού χαρακτηρισμού των προϊόντων της αντίδρασης του trans συμπλόκου με τη d(GpG), διότι ανέδειξε σημαντικά στοιχεία. Πιο συγκεκριμένα, η δομή του adduct, είναι πολύ όμοια με την δομή με το cisplatin. Ο δακτύλιος G1 είναι σχετικά άκαμπτος σε N-διαμόρφωση και ο G2 είναι πιο ευέλικτος και σε διαμόρφωση 85% S, 15% N. Παράλληλα με μελέτες MM, φαίνεται ότι οι βάσεις είναι σε διαμόρφωση “head-to-head” με τους δακτυλίους σε αντί θέση και με διαμόρφωση δακτυλίου 3'-endo για το 5'G και κυρίως 2'-endo για τον 3'-G. Οι δυο βάσεις είναι ισχυρά αποστοιβαγμένες, γεγονός που σημαίνει ότι αν διατηρηθεί αυτό το χαρακτηριστικό σε δίκλωνο DNA θα παρατηρηθεί σχετική κάμψη. Τέλος ένα πολύ σημαντικό συμπέρασμα είναι ότι δεν

παρατηρήθηκε κανένα προϊόν μονοσχιδούς σύμπλεξης, αλλά σχηματιζόταν αμέσως προϊόν δισχιδούς σύμπλεξης.

Η πλέον πρόσφατη μελέτη του οκταεδρικού συμπλόκου του Ru(II) αφορούσε την αλληλεπίδραση του με μια σειρά από ριβο- και δεοξυ-δινουκλεοτίδια και δη τα AG και GA⁶¹. Η εργασία αυτή που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Δρ. Ν.Κατσαρού στον Δημόκριτο επέκτεινε την εργασία του καθηγητή Alessio αλλά παράλληλα απάντησε με σαφή τρόπο σε ερωτήματα που αφορούσαν τον τρόπο σύμπλεξης αυτών των ενώσεων. Συγκεκριμένα επαληθεύτηκε το γεγονός ότι ακόμα και σε σύμπλεξη που περιλαμβάνει αδενίνη και γουανίνη, η αντίδραση προχωρεί χωρίς την εμφάνιση προϊόντων μονοσχιδούς σύμπλεξης. Παράλληλα παρατηρείται μεγαλύτερη ταχύτητα αντίδρασης για το δινουκλεοτίδιο GrA (για αμφοτέρα ρίβο και δεόξυ-), σε σχέση με το AG, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις το trans ισομερές αντιδρά σημαντικά γρηγορότερα και σε μεγαλύτερο ποσοστό από το cis.

Παρά τις δομικές ομοιότητες των προϊόντων σύμπλεξης δινουκλεοτιδίων με trans και cis-Ru με το cisplatin, προέκυψαν κάποιες αξιοσημείωτες διαφορές στο μοτίβο αλληλεπίδρασης. Για παράδειγμα όταν τα δινουκλεοτίδια ArG ή GrA, για το μεν ArG υπάρχει 1 προϊόν(σε anti-anti διαμόρφωση) αλλά 4 προϊόντα για την αλληλεπίδραση με το GA. Στην περίπτωση του trans και cis-Ru υπάρχει ένα κύριο προϊόν δισχιδούς σύμπλεξης με το N7 των βάσεων, ενώ η διαμόρφωση των βάσεων είναι anti. Τέλος δεν παρατηρείται κάποιο ενδιάμεσο προϊόν δισχιδούς σύμπλεξης όπως στην περίπτωση της μελέτης του Alessio.

Το επόμενο βήμα που επιχειρήθηκε και θα παρουσιαστεί στο δεύτερο μέρος, αφορά την μελέτη της αλληλεπίδρασης των παραπάνω συμπλόκων του ρουθηνίου με το ριβοτρινουκλεοτίδιο ArGrA. Αποτελεί συνέχεια της εργασίας, τα αποτελέσματα της οποίας αναλύθηκαν πριν και έρχεται να λειτουργήσει συμπληρωματικά και ενισχυτικά αυτών των αποτελεσμάτων. Η επιλογή της συγκεκριμένης αλληλουχίας έγινε για να διαπιστωθούν τα ακόλουθα σημεία :

- Υπάρχει μονοβασική σύμπλεξη;
- Ποια είναι η χρονική εξέλιξη σχηματισμού προϊόντων
- Ποιο είναι το σταθερότερο προϊόν που σχηματίζεται;
- Υπάρχουν ενδιάμεσα προϊόντα;
- Ποια είναι τα δομικά στοιχεία που δικαιολογούν και κατευθύνουν την σύμπλεξη προς τις αδενίνες στο 3' και 5' άκρο;
- Ποια είναι η δομή των προϊόντων που σχηματίζονται;
- Είναι η ίδια για το cis και trans παράγωγο;

Στα επόμενα κεφάλαια θα προσπαθήσουμε με την βοήθεια των δεδομένων NMR, να προσεγγίσουμε και να απαντήσουμε αυτά τα ερωτήματα με τρόπο σαφή και επεξηγηματικό.

Κεφαλαίο VI

Υλικά και πειραματικές τεχνικές

1. Χημικά αντιδραστήρια

cis και trans-RuCl₂(DMSO)₄ : τα δυο σύμπλοκα συντέθηκαν και ανακρυσταλλώθηκαν σύμφωνα με μεθόδους που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία⁶². Το cis-RuCl₂(DMSO)₄ παρασκευάστηκε με θέρμανση RuCl₃ (Sigma, RuCl₃·3H₂O) σε DMSO και ανακρυσταλλώθηκε από DMSO/ακετόνη 1:3. στην συνέχεια το trans ισομερές σχηματίστηκε με φωτοχημική ισομερείωση του cis προϊόντος, με έκθεση σε ηλιακό φως υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα DMSO. Τέλος το trans ισομερές ανακρυσταλλώθηκε από διάλυμα χλωροφορμίου/ διαιθυλαιθέρα³². Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν φρέσκα υδατικά διαλύματα των ανακρυσταλλωμένων συμπλόκων.

Δευτεριωμένο νερό, D₂O: Χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης σε όλα τα πειράματα NMR. Χρησιμοποιήθηκε D₂O 99.9% από τη Fluorochem.

Δευτεριωμένο υδροχλωρικό οξύ, DCl: 38% σε D₂O , από την Stohler Isotope Chemicals 99%.

Δευτεριωμένο καυστικό νάτριο, NaOD: 40% σε D₂O από τη Fluka.

ArGrA, ριβο-μονοφωσφορική αδένυλο(3'-5') γουανιδύλο (3'-5') αδενοσίνη: Αγοράστηκε από την Oswell DNA Service, με καθαρότητα HPLC 94%. Ο μοριακός τύπος είναι C₃₀H₃₈N₁₅O₁₄P₂ και μοριακό βάρος 941 για το ελεύθερο οξύ.

2. Μικροσυσκευές και Όργανα

Όργανο NMR: για τα πειράματα μιας και δυο διαστάσεων χρησιμοποιήθηκε το όργανο Bruker Avance στα 500MHz.

Σωληνάκια NMR: Χρησιμοποιήθηκαν σωληνάκια τύπου RMN NE-ML5-8 από την Cortec.

pH- μετρα : συνδυασμένο ηλεκτρόδιο μέτρησης pH ειδικό για μετρήσεις σε σωληνάκια NMR, τύπου CMAW711/3.7/180 (διάμετρος 3.7 mm – μήκος 180mm και βύσμα τύπου BNC)

3. Πειράματα NMR

3.1 1D Πειράματα NMR

Οι συνήθεις παράμετροι στα φάσματα 1D NMR είναι :

Μέγεθος φασμάτων 32K-64K (TD= 32K-64K), χρόνος μεταξύ σαρώσεων (D1 ή RD) = 2-4 sec, εύρος φάσματος SW = 10KHz και αριθμός σαρώσεων, NS = 64-128. Τα φάσματα επεξεργάστηκαν είτε με τη βοήθεια του προγράμματος XWIN-NMR (Bruker) , είτε σε PC με την χρήση του προγράμματος MestreC-2.3.

Κινητικές

Μετά την ανάμειξη των αντιδραστηρίων (νουκλεοτιδίων και cis/trans- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$) σε D_2O και ρύθμιση του pH σε περιοχή 5.5-5.9 γινόταν παρακολούθηση της αντίδρασης με λήψη φασμάτων NMR μετά από ορισμένα χρονικά διαστήματα θέρμανσης στους 40°C . Η λήψη των φασμάτων NMR γινόταν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

3.2 2D Πειράματα NMR

Τα πειράματα δυο διαστάσεων στα προϊόντα γινόταν στο μείγμα της αντίδρασης μετά το τέλος της κινητικής μελέτης και πριν την τιτλοδότηση.

DQF-COSY (Double Quantum Filter Correlation Spectroscopy) :

Τα πειράματα αυτά αποτελούν μια κατηγορία 2D ^1H NMR όπου τα πρωτόνια τα οποία συζεύγγονται και διασταυρώνονται με κορυφές εκτός της διαγωνίου (cross-peaks). Η ύπαρξη των cross-peaks και μόνο συνεισφέρει στην απόδοση των κορυφών των μορίων καθώς αποτελεί χάρτη για το ποια πρωτόνια βρίσκονται σε γειτονικές θέσεις. Ο σχηματισμός των cross-peaks στο DQF-COSY είναι ευαίσθητος στη φάση των κορυφών. Από τη δομή και τη φάση των διάφορων συστατικών μιας cross-peak μπορούμε να προσδιορίσουμε το μέγεθος των σταθερών σύζευξης⁶³. Σε κάθε cross-peak υπάρχουν πληροφορίες για την σύζευξη μεταξύ των δυο πρωτονίων τα οποία διασταυρώνει η κορυφή και είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό της κορυφής. Η σύζευξη αυτή καλείται «ενεργός σύζευξη» της κορυφής. Επιπλέον, η κάθε κορυφή εμπεριέχει πληροφορίες και για τις υπόλοιπες συζεύξεις στις οποίες παίρνει μέρος το καθένα από τα δυο πρωτόνια. Κάθε τέτοια σύζευξη λέγεται «παθητική σύζευξη» της κορυφής.

Η ικανότητα του DQF-COSY (phase-sensitive) να αναγνωρίζει την ενεργό σύζευξη αλλά και να αποκαλύπτει πολλές κορυφές οι οποίες μπορεί να είναι κρυμμένες σε πολύπλοκα 1D φάσματα ,είναι πολύ χρήσιμη στη μελέτη οργανικών μορίων. Το πρόγραμμα παλμών που χρησιμοποιήθηκε για το

DQF-COSY , ήταν το cosydfesgpph26.rak της Bruker. Το μέγεθος των δυο διαστάσεων F1,F2 ήταν 256x 4K. Ο αριθμός σαρώσεων στην F2 ήταν 64K με χρόνο μεταξύ των σαρώσεων 64 με d1 1-2 s. Το εύρος του φάσματος ήταν SW=2500-3000Hz, αφού δε συμπεριλήφθηκε η αρωματική περιοχή. Στα δεδομένα της F1 εφαρμόστηκε «γραμμική πρόβλεψη» αυξάνοντας τον αριθμό των σημείων από 256 σε 1K και με zero filling στα 2K. Τα δεδομένα πολλαπλασιάστηκαν με εκθετική συνάρτηση, συνήθως με LB=0.3, έτσι ώστε να είναι δυνατό να εξαχθούν οι σταθερές σύζευξης. Τα δεδομένα της F1 πολλαπλασιάστηκαν με ημιτονοειδή συνάρτηση (square cosine, qsine, ssb=2) ώστε να αυξηθεί η ανάλυση. Με αυτή την επεξεργασία δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν σταθερές σύζευξης από την F1 διάσταση του φάσματος.

ROESY (Rotating Overhauser Effect Spectroscopy):

Τα πειράματα ROESY ανήκουν στην κατηγορία πειραμάτων δυο διαστάσεων, τα οποία «διασταυρώνουν» με κορυφές (cross-peaks) , τα πρωτόνια των οποίων αλληλεπιδρούν, επειδή είναι κοντά στο χώρο, με ανάπτυξη NOE μεταξύ τους. Χρησιμοποιείται αντί του NOE για μόρια με μοριακά βάρη στην περιοχή (1000-3000 περίπου), όπου το NOE ανάλογα με την κίνηση των μορίων αλλάζει πρόσημο, οπότε μπορεί να έχει πολύ μικρές ή μηδενικές τιμές και ο σχηματισμός των κορυφών στα δυο διαστάσεων NOESY να είναι αμελητέος.

Η ένταση των cross-peaks είναι αντιστρόφως ανάλογη της 6^{ης} δύναμης της απόστασης μεταξύ των πυρήνων. Ολοκληρώνοντας τις κορυφές και παίρνοντας ως δεδομένη την απόσταση δυο πρωτονίων η οποία θεωρείται γνωστή, είναι δυνατόν να εκτιμηθούν συγκριτικά οι αποστάσεις μεταξύ των πρωτονίων. Στα φάσματα μας, χρησιμοποιήθηκαν και μελετήθηκαν τόσο τα φάσματα του τρινοκυκλοεπιδίου, όσο και των προϊόντων με τα σύμπλοκα, ώστε αφενός να γίνει χαρακτηρισμός των προϊόντων, αφετέρου συγκριτική μελέτη των δομικών αλλαγών κατά την σύμπλεξη.

Το πρόγραμμα παλμών που χρησιμοποιήθηκε για τα φάσματα ROESY, ήταν το roesyegpph26.rak της Bruker. Το μέγεθος των δυο διαστάσεων F1, F2 ήταν 256 x 2K. Ο αριθμός σαρώσεων στην F2 ήταν 32-64 για κάθε μεταβολή του χρόνου t₁. Το εύρος φάσματος, SW, ήταν περίπου 5500 Hz σε κάθε φάσμα. Ο χρόνος μεταξύ των σαρώσεων ήταν 1-2s. Εφαρμόστηκε linear prediction ως το 1K ενώ η ανάλυση αυξήθηκε με ημιτονοειδή συνάρτηση (qsine, ssb=2). Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος States-TPPI.

T1-Μετρήσεις.

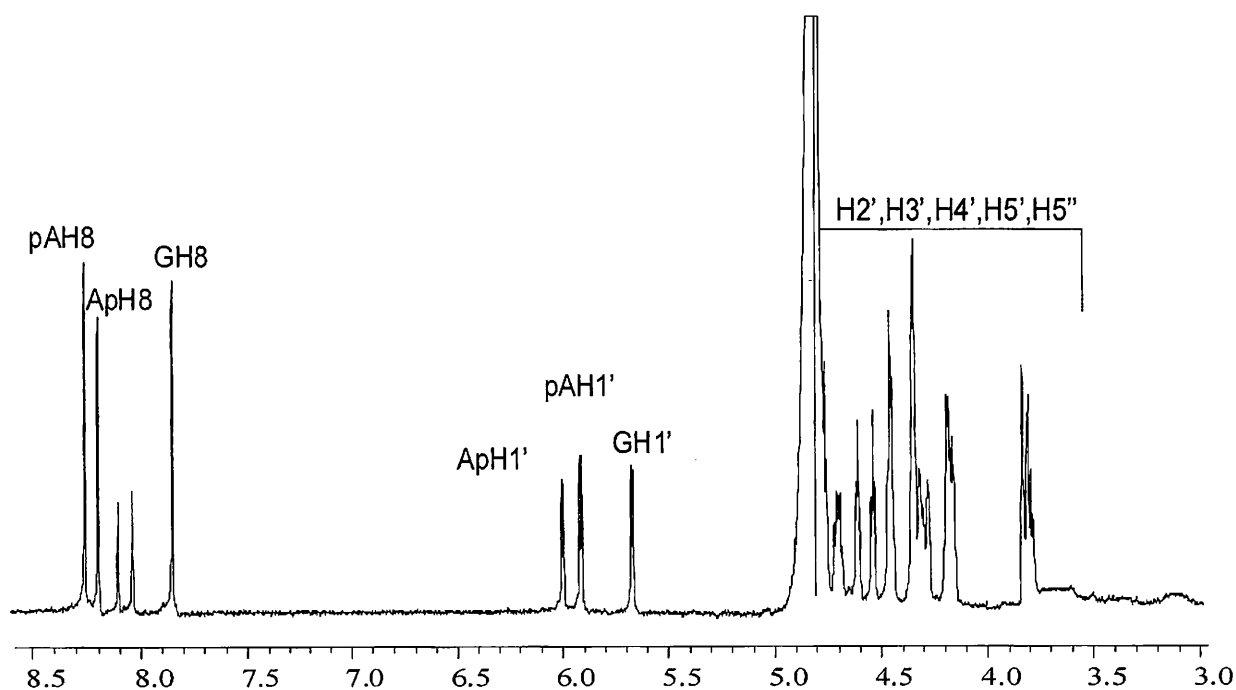
Οι χρόνοι χαλάρωσης, T₁, κυρίως για τα πρωτόνια των βάσεων, οι οποίοι παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην ανάλυση δομής, προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της παρατήρησης με τον χρόνο της χαλάρωσης της μαγνήτισης στο επίπεδο xy μετά από παλμό 180° (Inversion Recovery Method). Χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα t1ir της Bruker με χρόνους αναμονής 0.001-20s. Τα δεδομένα επεξεργάστηκαν για την εξαγωγή τιμών T₁, με το αντίστοιχο πρόγραμμα XWIN-NMR της Bruker.

Κεφάλαιο VII

Αποτελέσματα

Χαρακτηρισμός του ελεύθερου νουκλεοτιδίου ApGrA.

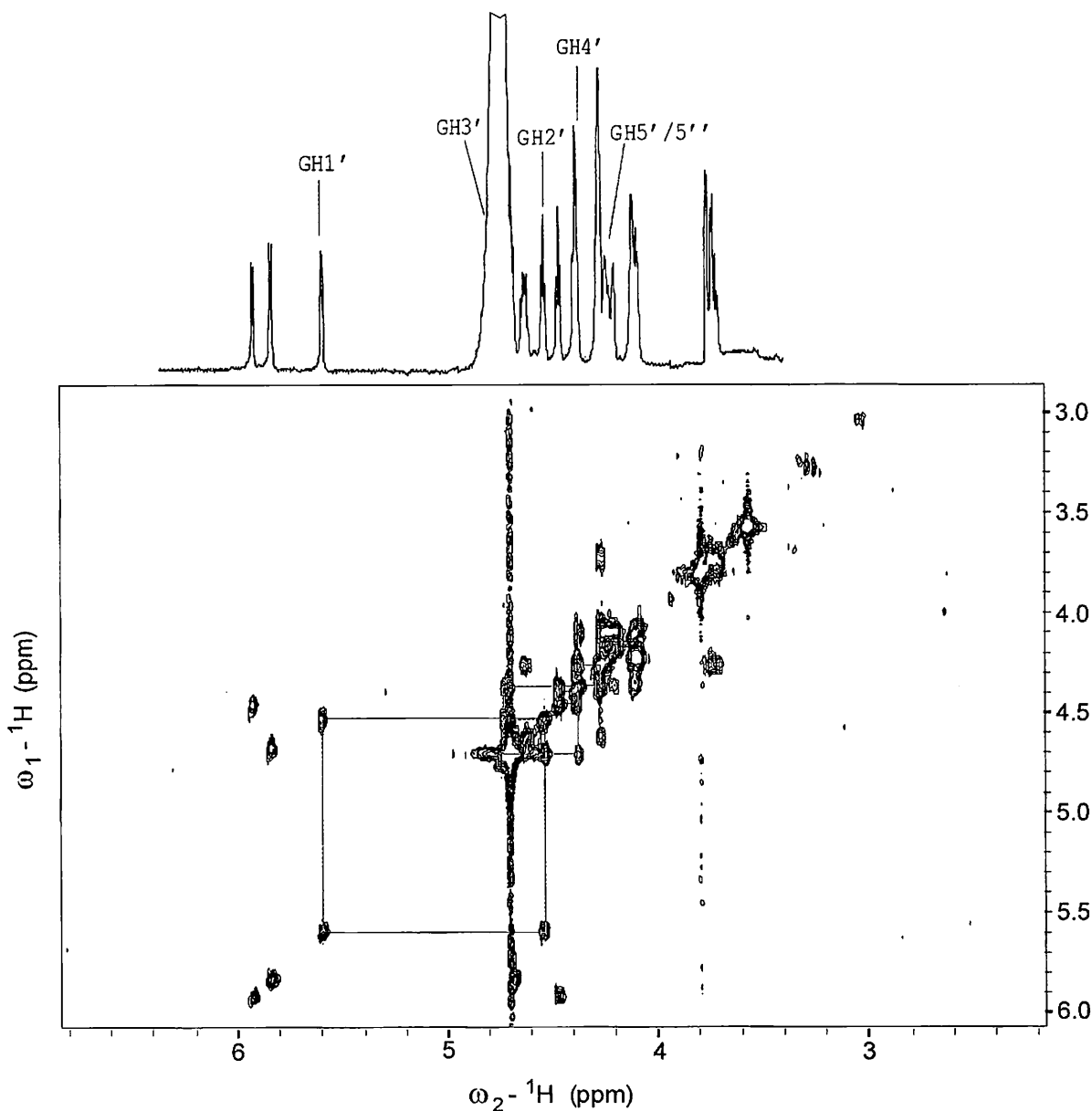
Πριν προχωρήσουμε στη μελέτη της αλληλεπίδρασης του τρινουκλεοτιδίου ApGrA με τα σύμπλοκα του Ru(II), cis- και trans-RuCl₂(DMSO)₄, είναι απαραίτητο να μελετήσουμε το ελεύθερο νουκλεοτίδιο και να επιχειρήσουμε να αποδώσουμε όλες τις κορυφές στο φάσμα NMR. Ακολούθως παρουσιάζεται το φάσμα ¹H NMR του τρινουκλεοτιδίου ApGrA σε D₂O (99.95%), 3mM και pH=5.7 σε θερμοκρασία 298 K. Σημειώνονται στο σχήμα 7.1 τα αρωματικά πρωτόνια της κάθε βάσης καθώς και τα H1' πρωτόνια των σακχάρων.



Σχήμα 7.1 Φάσμα ¹H NMR του τρινουκλεοτιδίου ApGrA σε D₂O (99.95%), 3mM και pH=5.7 σε θερμοκρασία 298 K. Σημειώνονται τα αρωματικά πρωτόνια της κάθε βάσης καθώς και τα H1' πρωτόνια των σακχάρων.

Η απόδοση των κορυφών στο τρινουκλεοτίδιο ApGrA, πραγματοποιήθηκε με τον συνδυασμό τεχνικών NMR μιας και δυο διαστάσεων και ειδικότερα με τις τεχνικές COSY-90 και ROESY. Συγκεκριμένα, με την βοήθεια του φάσματος COSY-90 μπορέσαμε να αποσαφηνίσουμε τα πρωτόνια που συνθέτουν τον δακτύλιο του σακχάρου, δηλαδή από το H1' έως τα H5' και H5'' ξεχωριστά

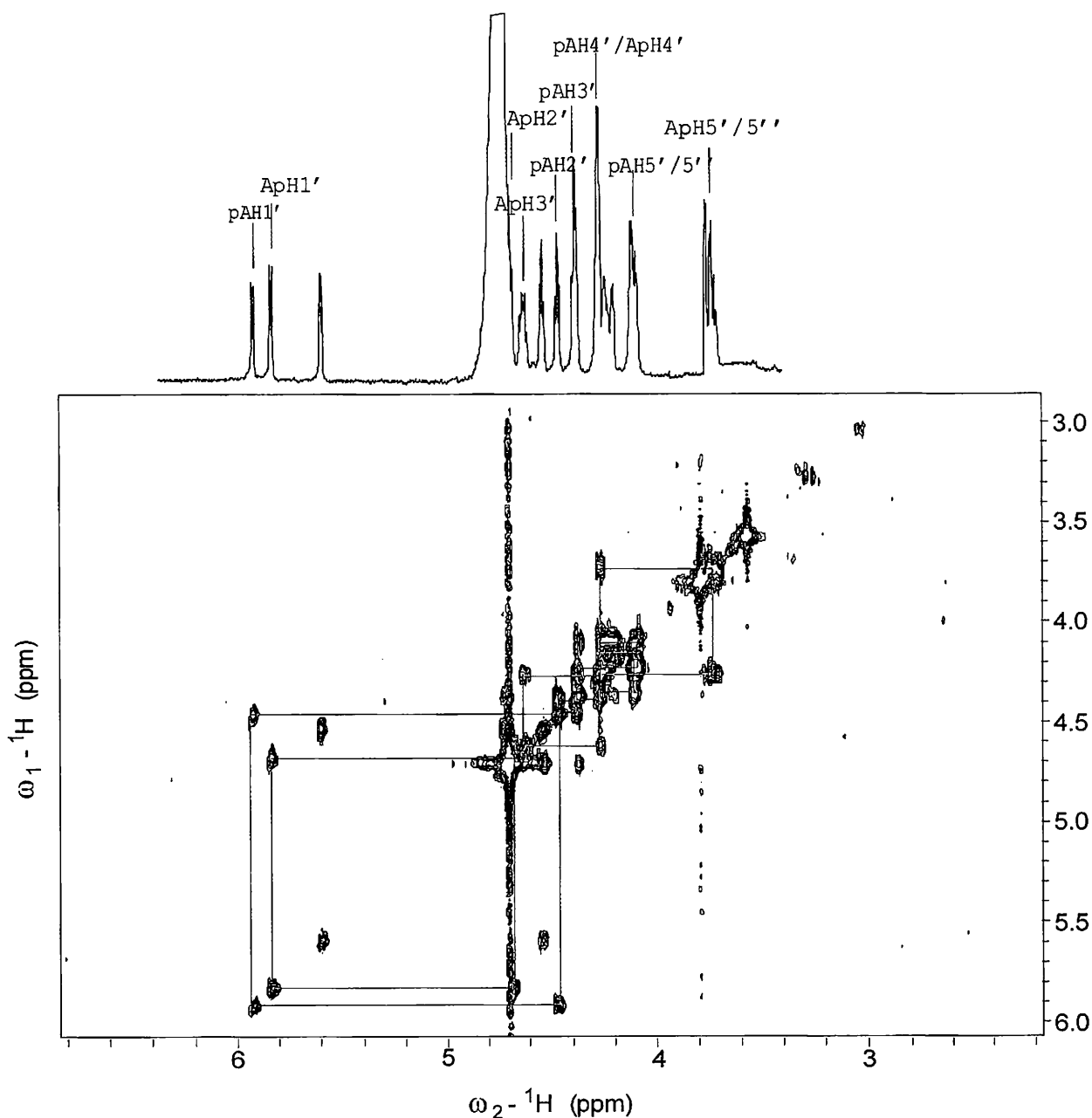
(σχήματα 7.2 και 7.3) και στην συνέχεια με φάσματα ROESY μπορέσαμε να αντιστοιχήσουμε το σάκχαρο με την αντίστοιχη βάση, λόγω αλληλεπιδράσεων μέσω χώρου των πρωτονίων H8 με τα πρωτόνια των βάσεων H1', H2'.



Σχήμα 7.2 Φάσμα COSY-90 του τρινουκλεοτιδίου ApGrA, όπου φαίνονται τα πρωτόνια του σακχάρου της κεντρικής γουανίνης.

Στην περιοχή 5.60-6 ppm βρίσκονται τα πρωτόνια H1' των πουργινών. Αυτά τα πρωτόνια συσχετίζονται με τα πρωτόνια H8 των αντίστοιχων βάσεων με φάσματα ROESY λόγω αλληλεπιδράσεων μέσω χώρου(σχήμα 7.4), ενώ όπως περιγράψαμε και στην αρχή αποτελούν και την αφετηρία για να βρούμε και όλα τα άλλα πρωτόνια του σακχάρου. Θα πρέπει μόνο να προσθέσουμε ότι

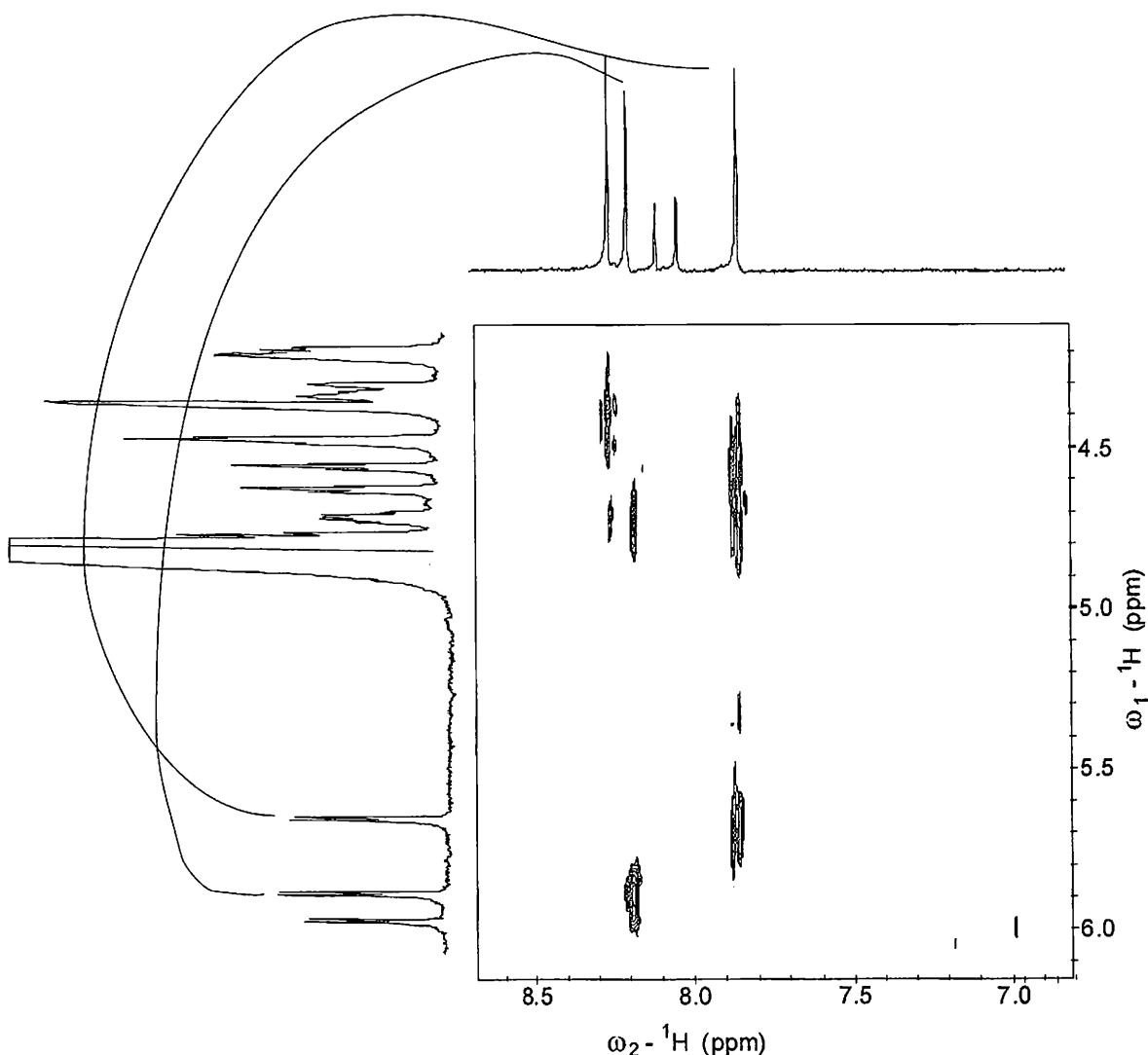
για να αποδώσουμε τα πρωτόνια 5'/5'' καταφύγαμε σε βιβλιογραφία⁶⁴, και καταλήξαμε ότι το 5' πρωτόνιο βρίσκεται σε μεγαλύτερη τιμή ppm σε σχέση με το 5'' πρωτόνιο κάθε σακχάρου.



Σχήμα 7.3 Φάσμα COSY-90 του τρινουκλεοτιδίου ApGpA, όπου φαίνονται τα πρωτόνια των σακχάρων της 3' και 5' αδενίνης.

Οι κορυφές που εμφανίζονται στην αρωματική περιοχή γνωρίζουμε ότι ανήκουν στα πρωτόνια H8 των πουρινών αλλά και στα H2 των αδενινών. Από τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι το H8 της γουανίνης παρουσιάζει χημική μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές δ (ppm) σε σχέση με τα αντίστοιχα H8 πρωτόνια των αδενινών⁶⁵. Ωστόσο έπρεπε να αποδώσουμε και τις δυο κορυφές των αδενινών και δη

των H8 πρωτονίων τους. Σε αυτήν την περίπτωση, η παρουσία της φωσφορικής ομάδας (3'-5') είναι καθοριστική αφού αποπροστατεύει το πρωτόνιο H8 της 3' φωσφορικής ομάδας -pA, επομένως το πρωτόνιο έχει χημική μετατόπιση σε υψηλότερη τιμή δ (ppm), επομένως το H8 της Ap- βάσης σε χαμηλότερη τιμή ppm. Τέλος, σε ότι αφορά τις κορυφές των AH2, αυτές ξεχωρίζουν αμέσως αφού είναι μικρότερες, γεγονός που οφείλεται αφενός στην αργή ανταλλαγή που παρουσιάζουν σε υδατικό διάλυμα, αλλά παράλληλα και στον υψηλότερο χρόνο χαλάρωσης T1 που παρουσιάζουν (Πίνακας 7.4). Η απόδοση τους στην αντίστοιχη αδενίνη, πραγματοποιείται με την βοήθεια φάσματος ROESY και αλληλεπιδράσεων μέσω χώρου με τα πρωτόνια του αντίστοιχου σακχάρου (σχήμα 7.4). Στον πίνακα 7.1 σημειώνονται αναλυτικότερα οι τιμές χημικής μετατόπισης δ (ppm), όλων των πρωτονίων του τρινουκλεοτιδίου.



Σχήμα 7.4 Φάσμα ROESY του ελεύθερου τρινουκλεοτιδίου, όπου φαίνονται κορυφές σύζευξης μέσω χώρου (rOe) πρωτονίων H8 των βάσεων με τα πρωτόνια H1' των σακχάρων του νουκλεοτιδίου.

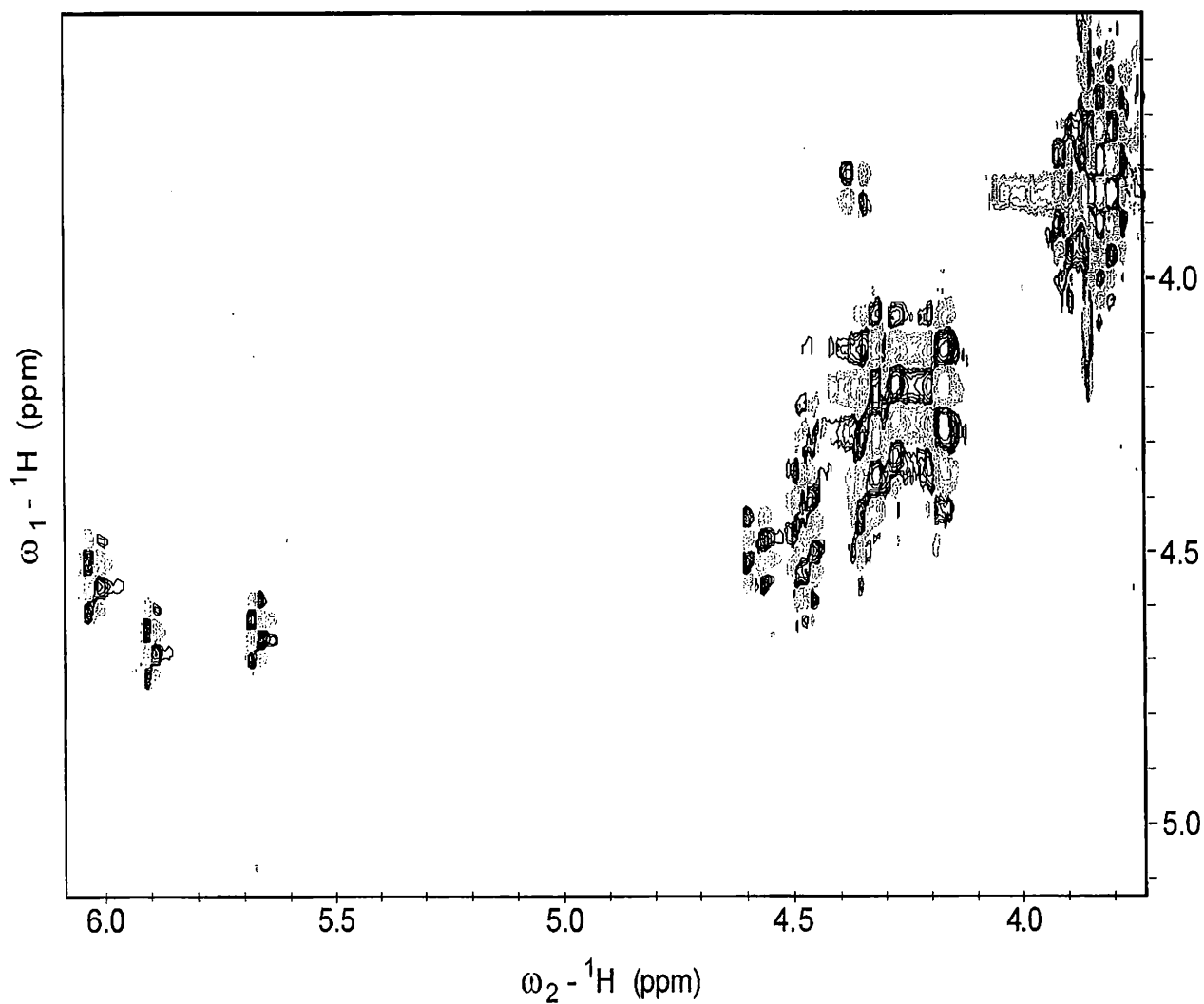
Πίνακας 7.1: Χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων του ApGrA σε D₂O(99.95%), pH = 5.7

	Α	Β	Γ
8	8.198	7.870	8.261
2	8.040	-	8.100
1'	5.913	5.678	6.002
2'	4.755	4.613	4.545
3'	4.712	4.809	4.446
4'	4.341	4.451	4.346
5'	3.829	4.31	4.191
5''	3.804	4.274	4.184

Ο υπολογισμός των τιμών σταθερών σύζευξης, βασίστηκε στα φάσμα μιας διάστασης αλλά και στο φάσμα δυο διαστάσεων DQF-COSY που παρατίθεται στη συνέχεια.(Σχήμα 7.5), ενώ στο πίνακα 7.2 παρουσιάζονται οι τιμές των σταθερών σύζευξης. Κάποιες τιμές προέρχονται και από την βιβλιογραφία. Επίσης στον πίνακα 7.3 δίνονται οι τιμές T₁ των πρωτονίων H8, H2 και H1'.

Πίνακας 7.2 : Σταθερές σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων του ApGrA σε D₂O (99.95%), pH = 5,7. Συμπεριλαμβάνονται και τιμές από βιβλιογραφία.

	Α	Β	Γ	Δ	Ε	Ζ
Ap	4.9	4.9	4.7	2.5	3.4	-12
pGr	4.6	5.1	5	2.8	3.8	-12.5
pA	4.3	5.4	5.3	2.3	3	-13

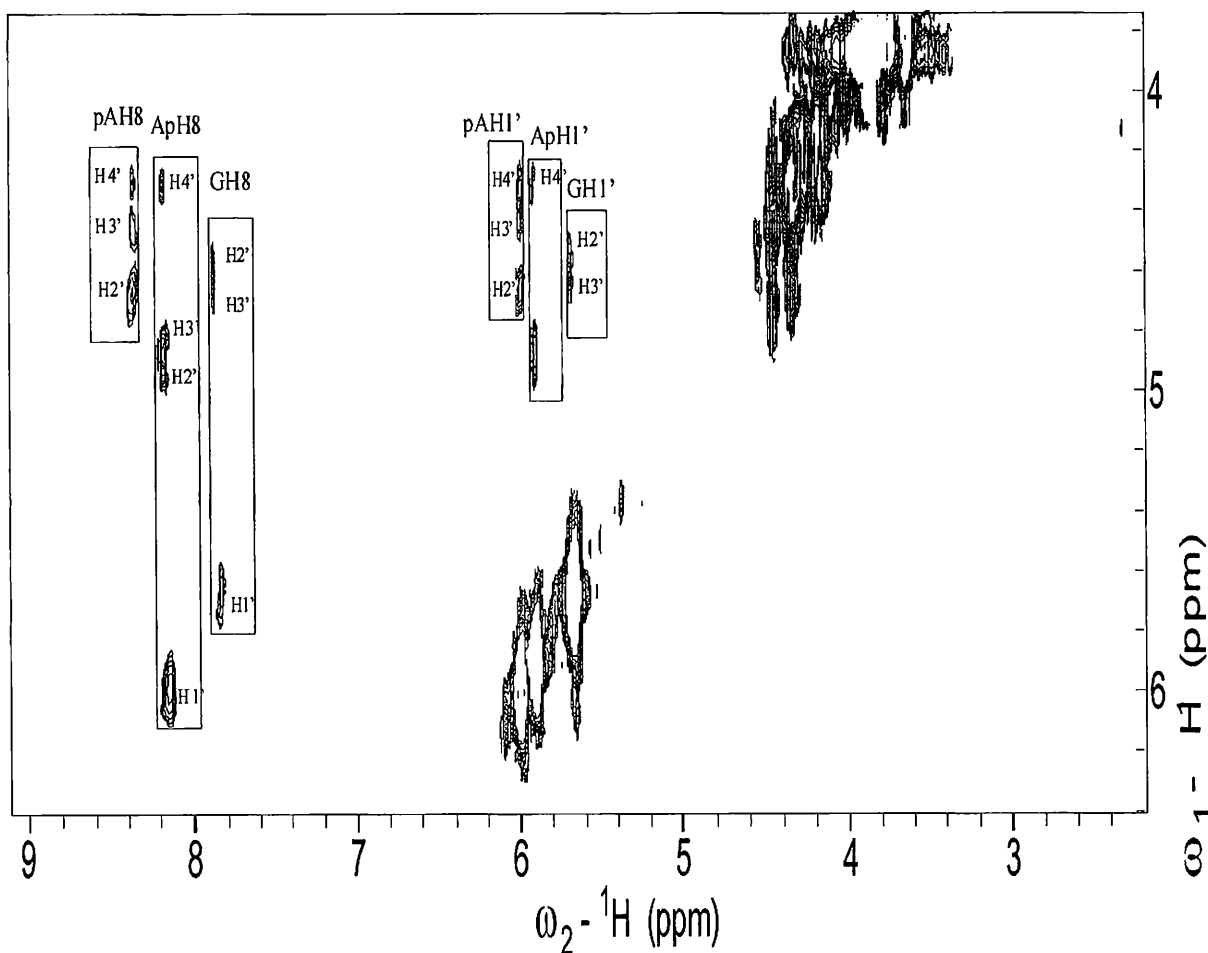


Σχήμα 7.5 Φάσμα DQF-COSY του ελεύθερου νουκλεοτιδίου ApGrA. Παρουσιάζεται η περιοχή 4-6 ppm.

Πίνακας 7.3 : Τιμές T_1 των πρωτονίων του τρινουκλεοτιδίου ApGrA.

	Ap	G	pA
8	2.44	1.864	1.673
2	7.6	-	9.66
1'	2.423	2.633	3.164

Παράλληλα, σε φάσματα ROESY που ελήφθησαν για το ελεύθερο τρινουκλεοτίδιο, έγινε ολοκλήρωση στις κορυφές σύζευξης λόγω χώρου, που λάβαμε. Το φάσμα παρατίθεται ακολούθως (σχήμα 7.6), ενώ στους πίνακες 7.4, 7.5 και 7.6 παρουσιάζονται οι σχετικές ολοκληρώσεις των κορυφών. Οι πίνακες με τα ολοκληρώματα που απορρέουν από το φάσμα ROESY σε συνδυασμό με τις τιμές των σταθερών σύζευξης αλλά και με την μέτρηση των χρόνων T_1 , αφενός μας δίνουν πληροφορίες για την δομή του ελεύθερου νουκλεοτιδίου, αλλά κυρίως επιτρέπουν την σύγκριση με τα προϊόντα της αλληλεπίδρασης του τρινουκλεοτιδίου με τα σύμπλοκα *trans*- και *cis*- $\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ και βεβαίως τις αλλαγές στην δομή που προκύπτει από την σύμπλεξη.



Σχήμα 7.6 Φάσμα ROESY του ελεύθερου νουκλεοτιδίου ArGpA. Παρουσιάζεται η περιοχή 4-6 ppm.

Πίνακας 7.4 : Πίνακας σχετικών τιμών των ολοκληρωμάτων των κορυφών των πρωτονίων του νουκλεοτιδίου της 5'-αδενοσίνης, στο φάσμα ROESY του ApGpA (X=5x)

	H8	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''	H2
H8		xxxx	xx	xx		w		
H1'	xxxx		xx	xx	xxxx			
H2'	xx	xx				xx	xx	
H3'	xx	xx				xxx	X	
H4'		xxxx				XX	XX	
H5'	w		xx	xxx				
H5''	w		xx	xxx	XX			
H2					XX			

Πίνακας 7.5 : Πίνακας σχετικών τιμών των ολοκληρωμάτων των κορυφών των πρωτονίων του νουκλεοτιδίου της γουανίνης, στο φάσμα ROESY του ApGpA (X=5x)

	H8	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''
H8		xxxx	X	xxx	x		
H1'	xxxx		xxxx	xx	X		
H2'	X	xxxx					
H3'	xxx	xx					
H4'	x	X				Xx	
H5'							
H5''					Xx		
ApH2'	x						
ApH3'	x						

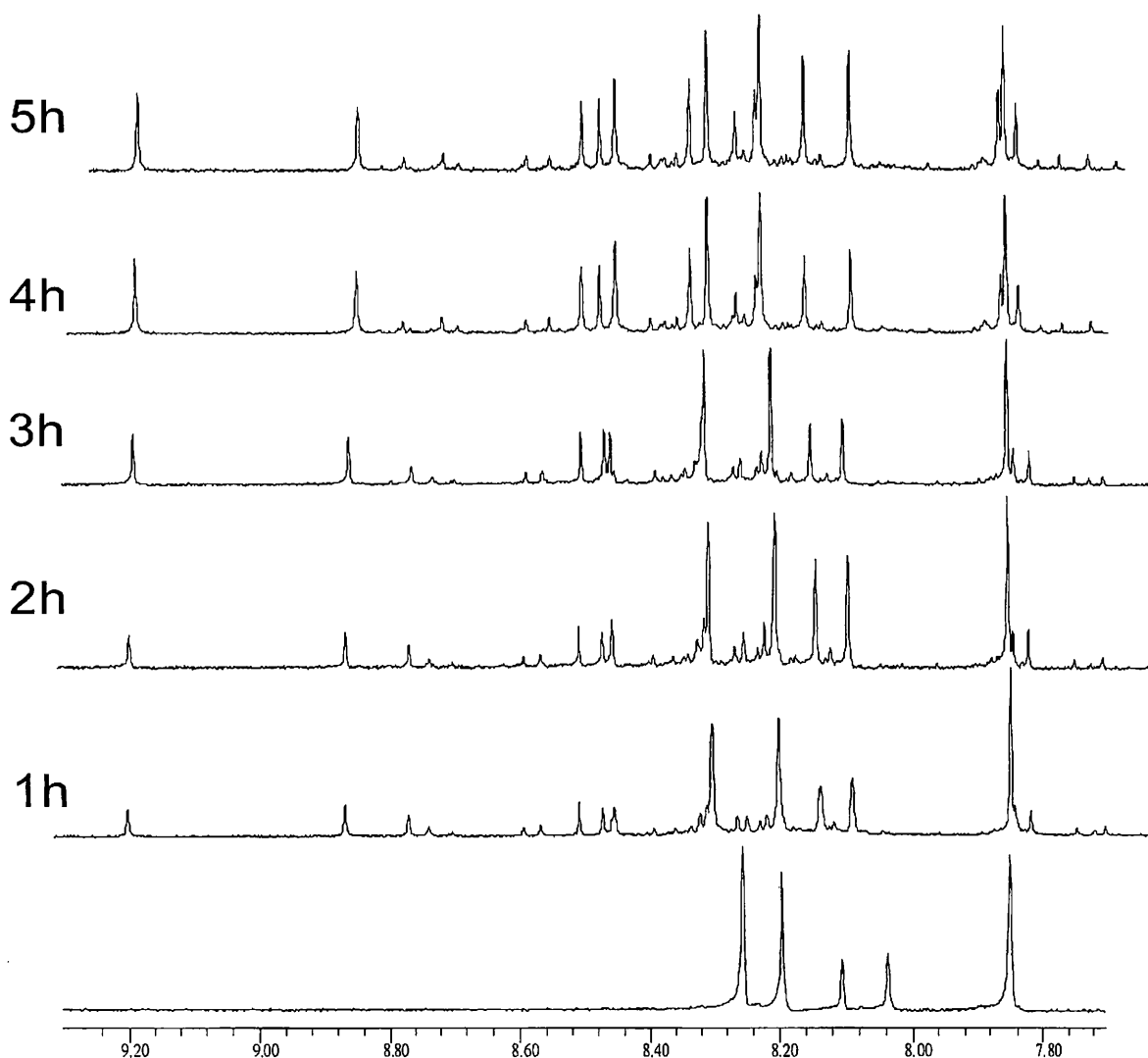
Πίνακας 7.6 : Πίνακας σχετικών τιμών των ολοκληρωμάτων των κορυφών των πρωτονίων του νουκλεοτιδίου της 3'-αδενοσίνης, στο φάσμα ROESY του ApGrA (X=5x)

	H8	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''	GH3'	GH1'
H8		xxxx	xxxXX	xxxX	xx	x	x	xxxx	x
H1'	xxxx		xxxX	X	X				
H2'	xxxXX	XX					xxxX		
H3'	XX	X					xxxxX		
H4'	xX	xX							
H5'	x						XXXXX XXXXX		
H5''	x		xxxX	xxxxX		XXXXX XXXXX			
GH3'	xxxx								
GH1'	w								

Κεφαλαίο VIII

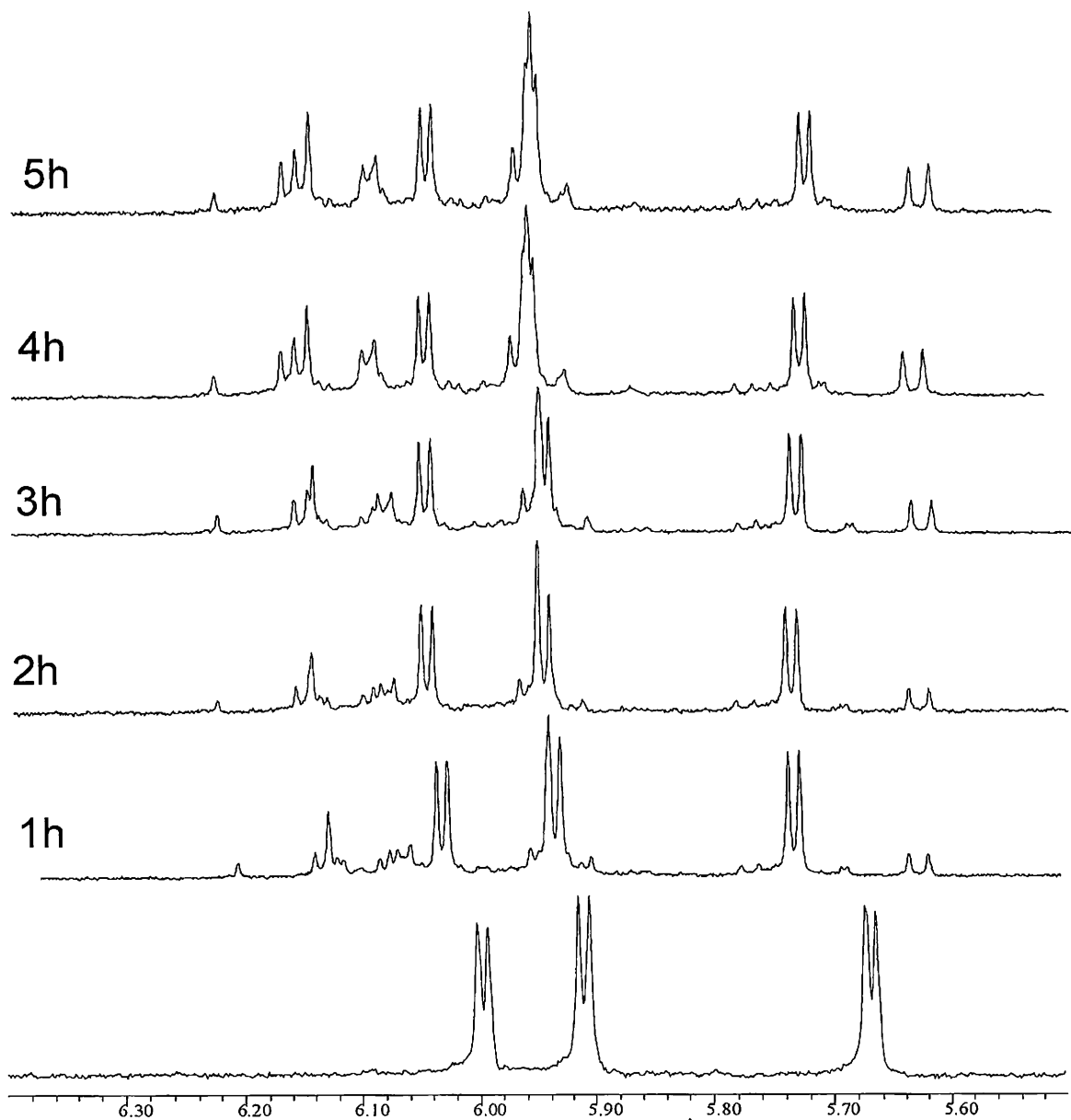
Αλληλεπίδραση του $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ με το ArGrA

Το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ αφήνεται να αλληλεπιδράσει με το ArGrA σε D_2O , με θέρμανση στους 40°C , υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε μετά την ανάμειξη στην τιμή 5,6. Η πορεία της αντίδρασης καταγράφηκε με λήψη φασμάτων ^1H ανά μια ώρα περίπου. Ακολούθως παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη των κορυφών στην αρωματική περιοχή (σχήμα 8.1),



Σχήμα 8.1: Αρωματική περιοχή των ^1H NMR φασμάτων κατά την αλληλεπίδραση του ArGrA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$. Αναγράφεται ο χρόνος θέρμανσης.

ενώ στις επόμενες σελίδες θα παρουσιαστούν οι περιοχές των σακχάρων και των μεθυλίων του DMSO αντίστοιχα. (Σχήματα 8.2 και 8.3 αντίστοιχα)

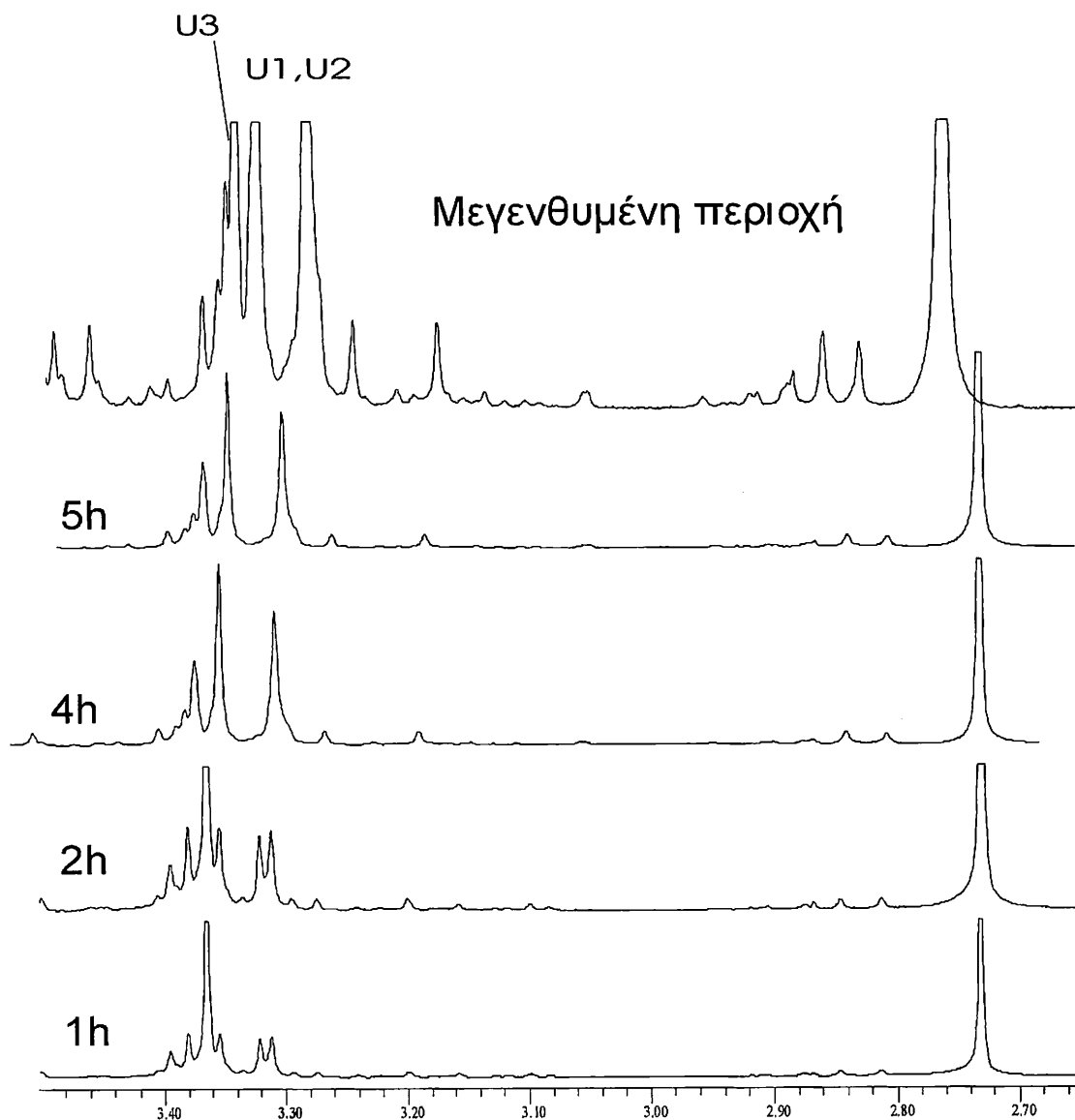


Σχήμα 8.2: Φάσματα ¹H NMR της περιοχής που εμφανίζονται τα H1' των σακχάρων, κατά την εξέλιξη της αντίδρασης του ApGrA με το trans-RuCl₂(DMSO)₄. Αναγράφεται ο χρόνος θέρμανσης.

Αυτό που διακρίνεται στα φάσματα χρονικής εξέλιξης των προϊόντων είναι πως αφενός μεγάλο ποσοστό από το αρχικό μας νουκλεοτίδιο δεν αντιδρά με το σύμπλοκο, ενώ παράλληλα έχουμε περισσότερα από ένα κύρια προϊόντα και κάποια παραπροϊόντα. Επίσης φαίνεται ότι μετά από τις 5h

υπάρχει μια σταθεροποίηση των προϊόντων της αντίδρασης, με το προφίλ να διαφοροποιείται ελάχιστα έστω και μετά από 24h στις ίδιες συνθήκες.

Πριν προχωρήσουμε όμως στην ανάλυση των φασμάτων, θα πρέπει να σταθούμε για λίγο στην αρωματική περιοχή διότι μπορούν να εξαχθούν ορισμένα συμπεράσματα σχετικά με το πλήθος των προϊόντων, που στην συνέχεια θα κατευθύνουν σε σημαντικό βαθμό την ανάλυση των φασμάτων.



Σχήμα 8.3: Φάσματα ¹H NMR της περιοχής των μεθυλίων των μορίων DMSO κατά την εξέλιξη της αντίδρασης. Σημειώνονται οι κορυφές των συμπλόκων $\text{trans-}[\text{RuCl}_2(\text{DMSO})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (U1) και $\text{trans-}[\text{RuCl}(\text{DMSO})_2(\text{H}_2\text{O})_3]$ (U2 και U3) τα οποία δεν έχουν αντιδράσει. Σημειώνεται ο χρόνος θέρμανσης. Στο μεγενθυμένο φάσμα φαίνονται τα μεθύλια των δυο συμπλόκων που έχουν σχηματισθεί.

Η πιο χαρακτηριστική αλλαγή στο φάσμα ^1H NMR των ολιγονουκλεοτιδίων κατά την σύμπλεξη τους με σύμπλοκες ενώσεις Pt(II) ή Ru(II) είναι η μετατόπιση του σήματος του πρωτονίου H8 των πουρινών σε υψηλότερες τιμές δ (ppm), χαρακτηριστικό της σύμπλεξης στην θέση N7. Παράλληλα σε ότι αφορά σύμπλοκα Pt και Ru υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν την χημική μετατόπιση H8 πουρινών κατά την σύμπλεξη και εξάρτηση τους από της θέση τους ως προς το 5' ή το 3' άκρο του νουκλεοτιδίου⁶⁶. Στην αρωματική περιοχή και συγκεκριμένα μετά τα 8.60ppm παρακολουθούμε την εμφάνιση δυο κορυφών που με το χρόνο είναι μεγαλύτερες και είναι σίγουρα ενδεικτικές δυο κυρίως προϊόντων σύμπλεξης και συγκεκριμένα πρόκειται για κορυφές H8 των αδενινών, ενώ και στην περιοχή 8.35-8.55 ppm, δηλαδή μετά την περιοχή που βρίσκονται οι κορυφές του νουκλεοτιδίου που δεν έχει αντιδράσει – και είναι βεβαίως προφανείς λόγω του μεγάλου ποσοστού που δεν έχει αντιδράσει-, βρίσκονται 4 νέες κορυφές με εξέλιξη παρόμοια με τις 2 προαναφερθείσες κορυφές, γεγονός που ενισχύει και επιβεβαιώνει την υπόθεση μας περί 2 κύριων προϊόντων.

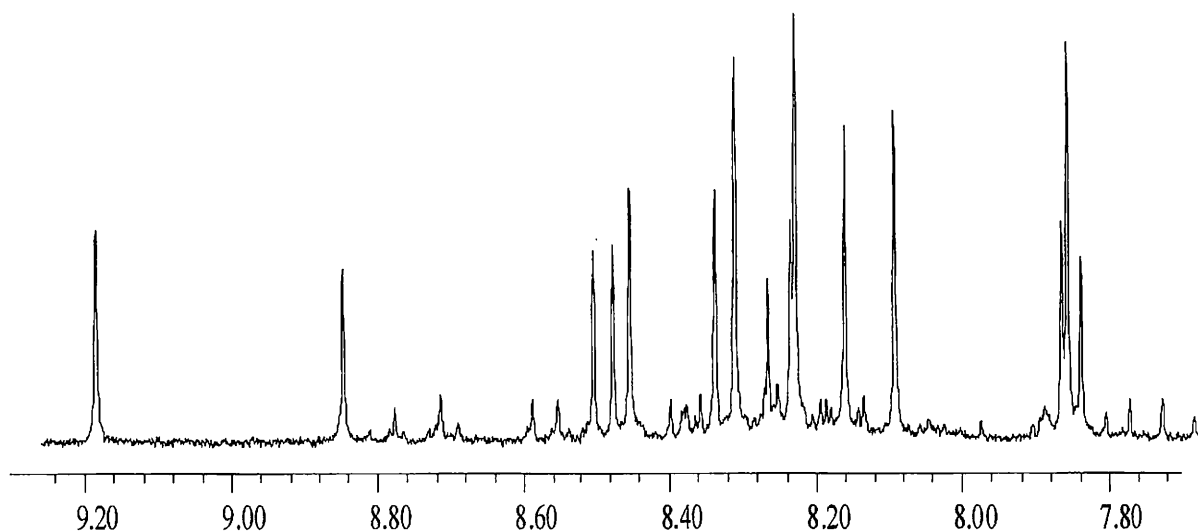
Στην συνέχεια θα επιχειρήσουμε να αναλύσουμε τα δυο κύρια προϊόντα της αντίδρασης του trans-RuCl₂(DMSO)₄ με το ολιγονουκλεοτίδιο ApGrA αφού πρώτα εντοπίσουμε τις κορυφές του νουκλεοτιδίου που δεν έχει αντιδράσει. Η απόδοση των κορυφών για τα προϊόντα βασίζεται στο σκεπτικό που αναπτύχθηκε και για την απόδοση των κορυφών στο ελεύθερο νουκλεοτίδιο. Συγκεκριμένα η απόδοση των πρωτονίων κάθε σακχάρου πραγματοποιείται με την βοήθεια των φασμάτων TOCSY και COSY-90, ενώ στην συνέχεια το κάθε σάκχαρο συνδέεται με την αντίστοιχη βάση τους μέσω των φασμάτων ROESY, καθώς τα πρωτόνια αυτά δεν παρουσιάζουν σύζευξη με άλλα πρωτόνια. Ωστόσο, μπορούμε να προχωρήσουμε στην απόδοση των κορυφών στην περιοχή του DMSO που έγινε με συνδυασμό τόσο του φάσματος COSY-90 και TOCSY, όσο και του φάσματος ROESY. Συγκεκριμένα από το φάσμα COSY-90 είδαμε ποια μεθύλια ανήκουν στο ίδιο μόριο DMSO καθώς παρουσιάζουν μικρή σύζευξη η οποία να και δεν γίνεται φανερή στα φάσματα 1D, δίνει κορυφή στο COSY. Η σταθερά σύζευξης είναι μικρή ($^4J_{\text{HH}} \sim 1-1.5\text{Hz}$) και η κάθε κορυφή των μεθυλίων θα έπρεπε να είναι τετραπλή κορυφή. Λόγω της μικρής τιμής της σταθεράς η κορυφή εμφανίζεται ως απλή και σχετικά φαρδιά, κάτι που μπορούμε να το δούμε με κατάλληλη επεξεργασία του φάσματος (LB=-2). Επιπλέον στο φάσμα ROESY παρατηρούνται κορυφές μεταξύ των πρωτονίων που βρίσκονται στην αρωματική περιοχή – και δη >8.6 ppm) και των δυο μεθυλίων του DMSO, στο οποίο ήταν κοντά η αντίστοιχη βάση. Ωστόσο η ακριβής απόδοση τους θα ολοκληρωθεί μετά την ανάλυση των δυο κύριων προϊόντων της αντίδρασης.

Τέλος, σε ότι αφορά τις τρεις κορυφές που αντιστοιχούν στο σύμπλοκο που δεν έχει αντιδράσει σημειώνονται ως U1 για το trans-[RuCl₂(DMSO)₂(H₂O)₂] και U2 και U3 αντίστοιχα για τα trans-[RuCl(DMSO)₂(H₂O)₃] στο σχήμα 7.3 και η απόδοση τους βασίστηκε σε μελέτες υδρόλυσης του συμπλόκου trans-RuCl₂(DMSO)₄ στις ίδιες συνθήκες.

1. Προϊόν I της αντίδρασης του trans-Ru με το ApGrA

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, οι κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή με $\delta > 8.50$ ppm αποτελούν και με βάση την βιβλιογραφία⁶⁷ ένδειξη προϊόντων σύμπλεξης με τις νουκλεοτιδικές βάσεις και ειδικότερα σύμπλεξη του N7 των πουρινών στο μεταλλικό κέντρο⁶⁸. Για το προϊόν I θα εστιάσουμε τη μελέτη στην κορυφή που βρίσκεται στα 9.226 ppm. Πρόκειται για κορυφή που αντιστοιχεί σε H8 αδενίνης αλλά εφόσον το νουκλεοτίδιο που μελετάται φέρει δυο αδενίνες, 3' και 5', είναι σημαντικό να καταλήξουμε αφενός στο ποια αδενίνη αντιστοιχεί στο προϊόν I και II, και αφετέρου αν πρόκειται για προϊόντα μονοσχιδούς ή δισχιδούς σύμπλεξης που περιλαμβάνουν και τη σύμπλεξη με τη μεσαία γουανίνη.

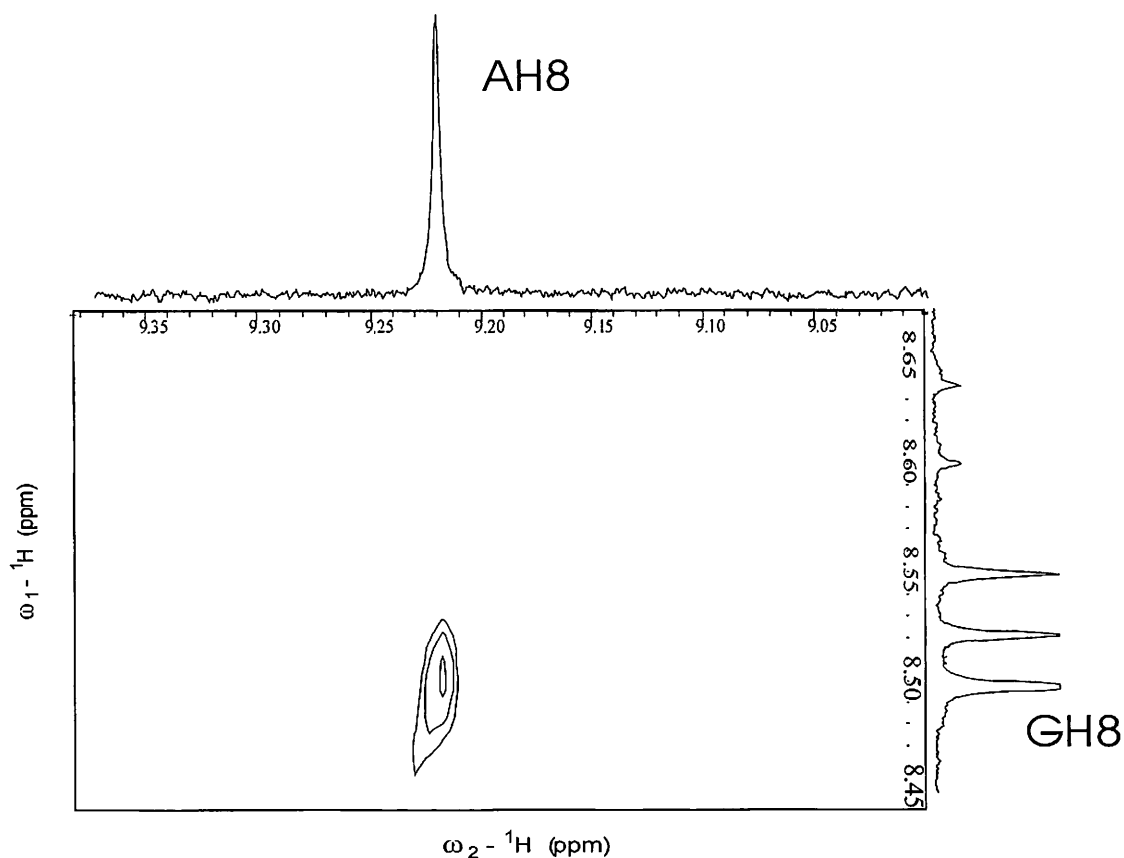
Μπορούμε να καταλήξουμε σχετικά με την αδενίνη βασιζόμενοι στις μετατοπίσεις των κορυφών κατά τη μελέτη σύμπλεξης των νουκλεοτιδίων ApG και GrA με το σύμπλοκο trans-Ru⁷¹, οπότε καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι αυτή η μετατόπιση στα 9.226 ppm αντιστοιχεί στην 3' αδενίνη, ενώ η αμέσως επόμενη κορυφή στα 8.886 ppm αντιστοιχεί σε σύμπλεξη της 5' αδενίνης. Επομένως το πρώτο προϊόν το οποίο θα μελετήσουμε παρουσιάζει σύμπλεξη με την 3'-αδενίνη ενώ αν και βεβαίως υποθέτουμε ότι πρόκειται για δισχιδή σύμπλεξη θα δείξουμε ότι πράγματι και η κεντρική γουανίνη είναι συμπλεγμένη (σχήμα 8.4).



Σχήμα 8.4 Αρωματική περιοχή του φάσματος ¹H, της αλληλεπίδρασης trans-Ru με ApGrA, μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης.

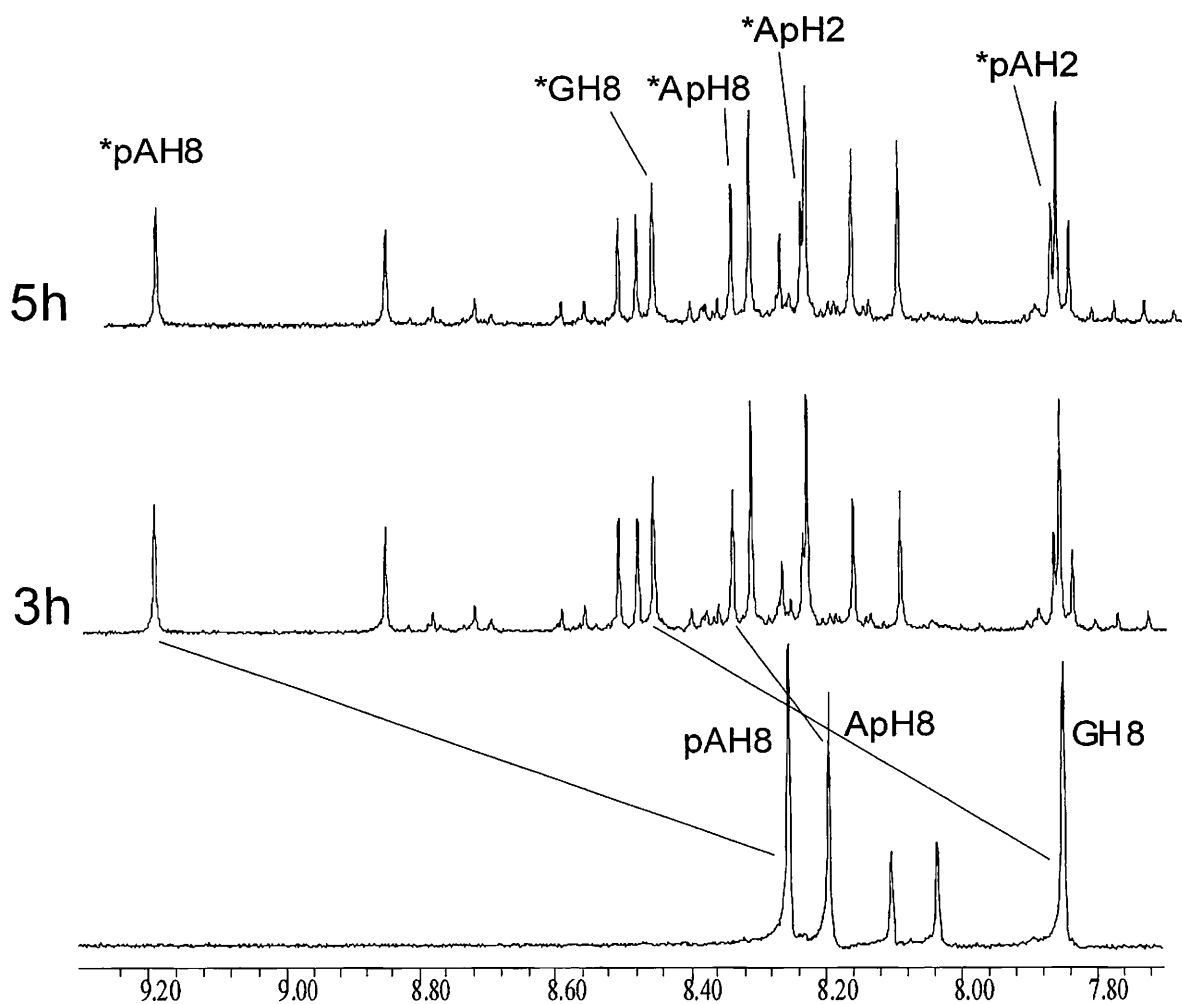
Στην συγκεκριμένη περίπτωση καθοριστικές για την απόδοση των κορυφών που αντιστοιχούν στο προϊόν I, αποτέλεσαν κορυφές σύζευξης μέσω χώρου, rOe του πρωτονίου H8 της αδενίνης και κορυφής

που βρίσκεται ομοίως στην αρωματική περιοχή και ευλόγως αποδίδεται σε πρωτόνιο H8 της γουανίνης(σχήμα 8.5).



Σχήμα 8.5 : Τμήμα από το φάσμα ROESY, όπου φαίνεται η διασταύρωση μέσω χώρου των πρωτονίων H8 της 3'-αδενίνης και της γουανίνης για το προϊόν I.

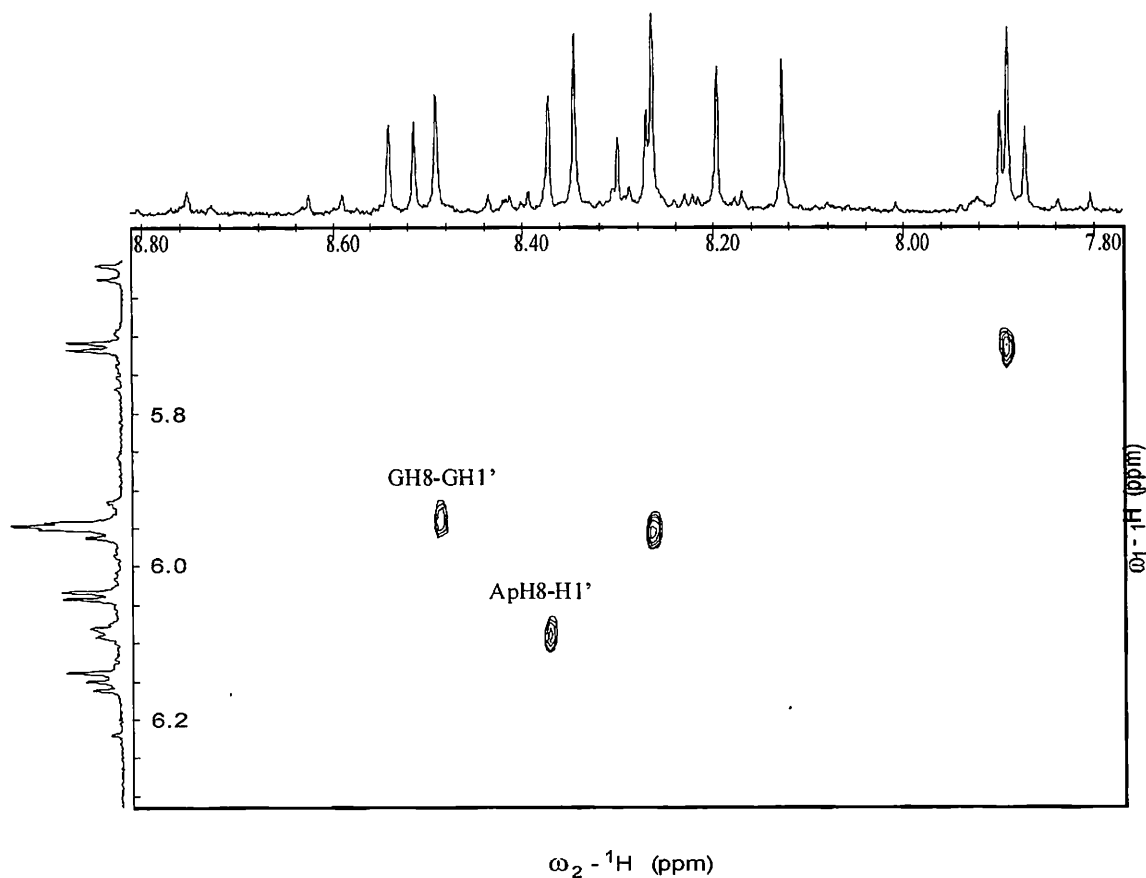
Η κορυφή αυτή στα 8.49ppm βρίσκεται σε μεγαλύτερη τιμή δ (ppm) από την αρχική ασύμπλεκτη γουανίνη (+ 0.62ppm) γεγονός που επιβεβαιώνει δισχιδή σύμπλεξη του συμπλόκου στο τρινουκλεοτίδιο και συγκεκριμένα στις βάσεις γουανίνης και 3'-αδενίνης. Το πρωτόνιο της 5'-αδενίνης που παραμένει ελεύθερο δεν παρουσίασε κάποια κορυφή διασταύρωσης στο χώρο (rOe) με κάποιο πρωτόνιο είτε της γειτονικής βάσης γουανίνης είτε με το H8 αυτής, ωστόσο μπορεί να εξαχθεί από την παρατήρηση της χρονικής εξέλιξης των κορυφών (σχήμα 8.1), από την ίδια ολοκλήρωση και από το ότι παραμένει σε παρόμοια τιμή δ σε σχέση με το ελεύθερο νουκλεοτίδιο. Στο σχήμα 8.7 δίδεται η απόδοση για τα πρωτόνια του προϊόντος I στην αρωματική περιοχή.



Σχήμα 8.7 : Αρωματική περιοχή των ¹H NMR φασμάτων κατά την αλληλεπίδραση του ArGrA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$. Σημειώνονται τα πρωτόνια του αντιδρώντος (ArH8, GH8 και pAH8) και τα αντίστοιχα του συμπλόκου I, τα οποία σημειώνονται με (*) (*ArH8, *GH8, *pAH8, *ArH2 και *pAH2). Αναγράφεται ο χρόνος θέρμανσης ενώ σημειώνεται η μετατόπιση των κορυφών.

Στο προηγούμενο κεφάλαιο περιγράψαμε τον σκεπτικό που χρησιμοποιείται για την δομική μελέτη της σύμπλεξης, αλλά από αυτό το κεφάλαιο θα αναφερόμαστε περισσότερο διεξοδικά στα βήματα που ακολουθήσαμε ώστε να καταλήξουμε σε συμπεράσματα σε ότι αφορά τα προϊόντα σύμπλεξης. Βεβαίως πρόκειται για συνδυασμό μελέτης των φασμάτων μιας και δυο διαστάσεων αλλά και ενδελεχούς παρατήρησης της εμφάνισης των κορυφών

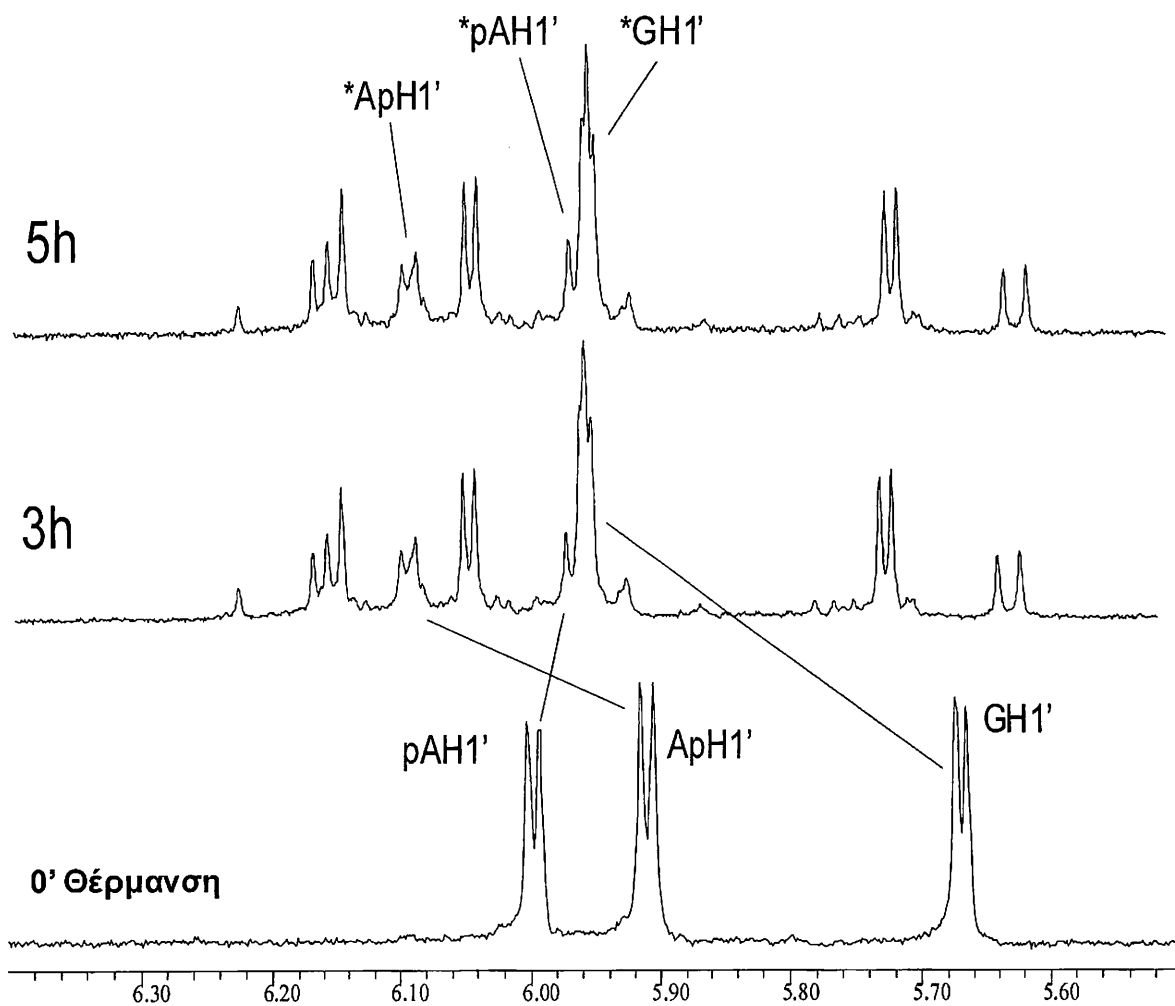
Με την βοήθεια του ROESY ήταν δυνατό να αποδοθούν οι κορυφές των πρωτονίων H1' των βάσεων που μας βοηθούν πολύ στην συνέχεια να βρούμε τα υπόλοιπα πρωτόνια των βάσεων. Στο σχήμα 8.6 φαίνονται οι κορυφές διασταύρωσης rOe των πρωτονίων H8 – H1'.



Σχήμα 8.6 : Τμήμα από το φάσμα ROESY, όπου φαίνεται η διασταύρωση μέσω χώρου των πρωτονίων H8 της γουανίνης και της 5'-αδενίνης, με τα πρωτόνια H1' των αντίστοιχων βάσεων.

Στο σχήμα 8.7 παρουσιάζεται η εξέλιξη των πρωτονίων της αρωματικής περιοχής για το προϊόν I, ενώ παράλληλα στο σχήμα 8.8 φαίνεται η περιοχή όπου εμφανίζονται τα H1' των σακχάρων του προϊόντος I. Αυτά που μπορούμε να παρατηρήσουμε είναι τα εξής : Στο σάκχαρο της 3'-αδενίνης στο προϊόν I, το πρωτόνιο ρAH1' μετατοπίζεται προς μικρότερη τιμή δ (ppm) και παραμένει διπλή κορυφή με την διάσχιση της να αυξάνεται, ενώ αντίθετα το GH1' μετατοπίζεται σε μεγαλύτερες τιμές δ και από διπλή κορυφή γίνεται απλή. Η διάσχιση οφείλεται στα H2' πρωτόνια , επομένως στην συγκεκριμένη περίπτωση φαίνεται ότι η σταθερά σύζευξης $^3J_{1,2}$, μειώνεται στην περίπτωση της γουανίνης και αυξάνεται στην περίπτωση της αδενίνης.

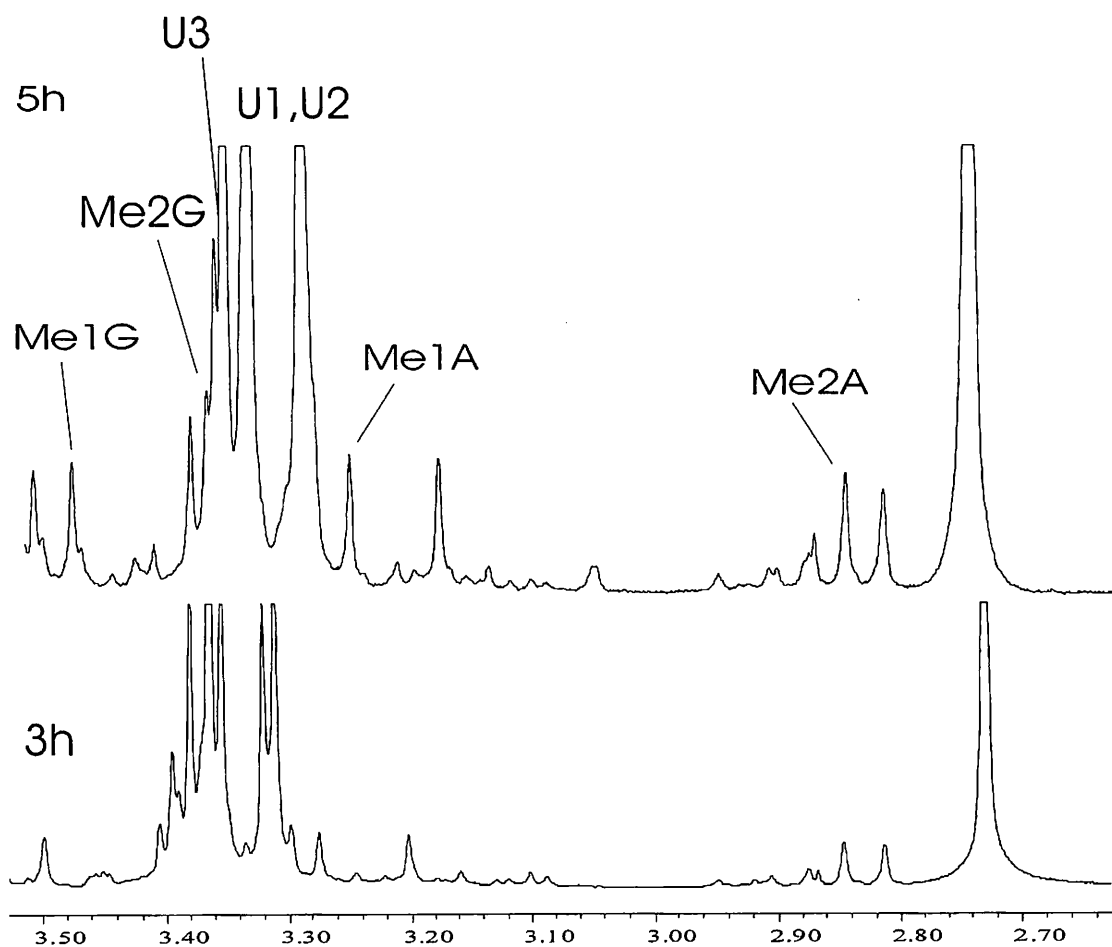
Στην συνέχεια, με την βοήθεια των φασμάτων COSY-90 και TOCSY αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις DQF-COSY και ROESY μπορέσαμε να βρούμε τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των αντίστοιχων σακχάρων των νουκλεοτιδίων. Η παρουσία 2 προϊόντων αλλά και σε μεγάλο ποσοστό του ελεύθερου νουκλεοτιδίου εμπόδιζε αρκετά την σαφή αποτίμηση των φασμάτων μιας και δυο διαστάσεων και δεν ήταν αρκετά ξεκάθαρη η απόδοση των κορυφών.



Σχήμα 8.8 : ¹H NMR φάσματα της περιοχής όπου εμφανίζονται τα H1' των σακχάρων, κατά την εξέλιξη της αντίδρασης του ApGrA με το trans-RuCl₂(DMSO)₄. Σημειώνονται τα πρωτόνια του αντιδρώντος (ApH1', GH1' και pAH1'), καθώς και τα πρωτόνια του προϊόντος Ι με (*) (*ApH1', *GH1' και *pAH1'). Σε κάθε φάσμα σημειώνεται ο χρόνος θέρμανσης, ενώ υποδεικνύεται η εξέλιξη των κορυφών.

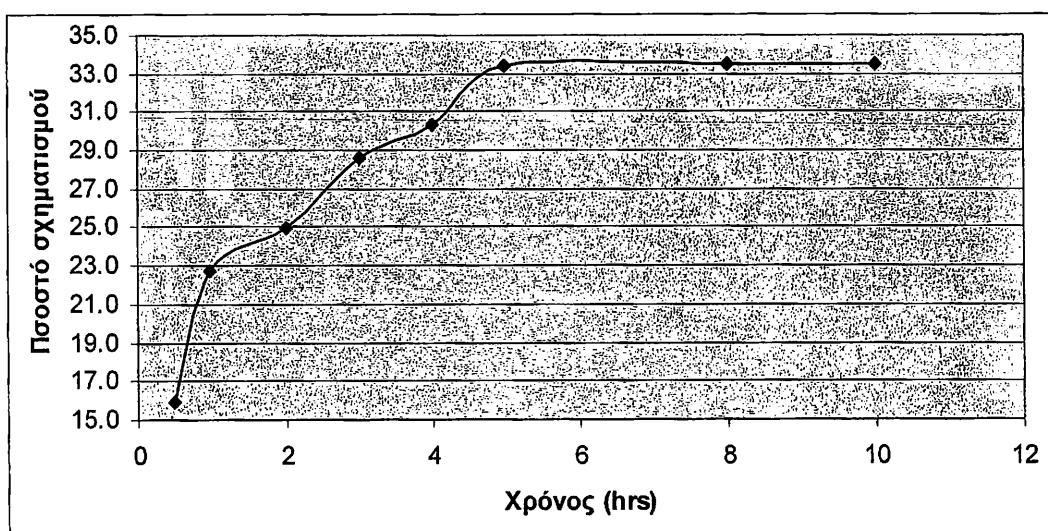
Η απόδοση των κορυφών στην περιοχή των DMSO έγινε με συνδυασμό τόσο του φάσματος COSY όσο και του φάσματος ROESY. Συγκεκριμένα από το φάσμα COSY είδαμε ποια μεθύλια ανήκουν στο ίδιο μόριο DMSO καθώς παρουσιάζουν μικρή σύζευξη ($^4J_{HH}$) η οποία αν και δεν φαίνεται στο φάσμα μιας διάστασης, δίνει κορυφή στο COSY. Η σταθερά σύζευξης υπολογίστηκε περίπου στα 1-1.5Hz και η κάθε κορυφή των μεθυλίων θα έπρεπε να είναι μια τετραπλή αλλά λόγω της μικρής τιμής της σταθεράς σύζευξης εμφανίζεται ως απλή και σχετικά φαρδιά.

Παράλληλα από το φάσμα ROESY παρατηρήθηκαν κορυφές μεταξύ των πρωτονίων AH8 και GH8 και των δυο μεθυλίων του μορίου DMSO στο οποίο είναι κοντά η αντίστοιχη βάση. Έτσι τα δυο σήματα μεθυλίων του DMSO κοντά στη γουανίνη ονομάστηκαν MeG1, MeG2 και αντίστοιχα της αδενίνης MeA1 και MeA2. Οι τρεις κορυφές που αντιστοιχούν στο σύμπλοκο που δεν έχει αντιδράσει σημειώνονται ως U1,U2 και U3



Σχήμα 8.9 : ^1H NMR φάσμα της περιοχής των μεθυλίων του DMSO κατά την διάρκεια της θέρμανσης του ApGrA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$. Σημειώνονται οι κορυφές των συμπλόκων τα οποία δεν έχουν αντιδράσει και οι κορυφές του προϊόντος I, Me1A, Me2A, Me1G και Me2G. Σημειώνεται ο χρόνος θέρμανσης

Στο σχήμα 8.10 δίνεται το διάγραμμα της πορείας σχηματισμού του κυρίως προϊόντος της αλληλεπίδρασης του $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ με το ArGrA. Το ποσοστό σχηματισμού του προϊόντος υπολογίζεται από τα 1D ^1H φάσματα NMR ολοκληρώνοντας τις κορυφές των πρωτονίων στην αρωματική περιοχή. Ως ποσοστό παίρνουμε τον μέσο όρο της σχετικής τιμής των ολοκληρωμάτων των H8 των βάσεων, ως προς το άθροισμα του ολοκληρώματος της αντίστοιχης κορυφής του τρινοκλεοτιδίου που δεν έχει αντιδράσει, των κύριων προϊόντων I και II και των παραπροϊόντων. Από το διάγραμμα φαίνεται ότι η αντίδραση φτάνει το ποσοστό 25% στις πρώτες 5 ώρες ενώ μετά δεν παρατηρούμε σημαντική μεταβολή καθώς σταθεροποιείται, ενώ δεν αλλάζει ακόμα και μετά τις 24 ώρες.



Σχήμα 8.10: Διάγραμμα του ποσοστού σχηματισμού του προϊόντος I, συναρτήσει του χρόνου θέρμανσης στους 40°C .

Στον πίνακα 8.1 δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις βάσει της απόδοσης των κορυφών, με την βοήθεια από τα φάσματα COSY, TOCSY και ROESY για τα πρωτόνια των βάσεων, ενώ σημειώνονται οι διαφορές σε σχέση με το ελεύθερο νουκλεοτίδιο.

Πίνακας 8.1 : Χημικές μετατοπίσεις του κυρίως προϊόντος I που σχηματίζεται κατά την αλληλεπίδραση του trans-RuCl₂(DMSO)₄ με το νουκλεοτίδιο ApGrA. Ως κορυφή αναφοράς χρησιμοποιείται το DMSO (2.73ppm)

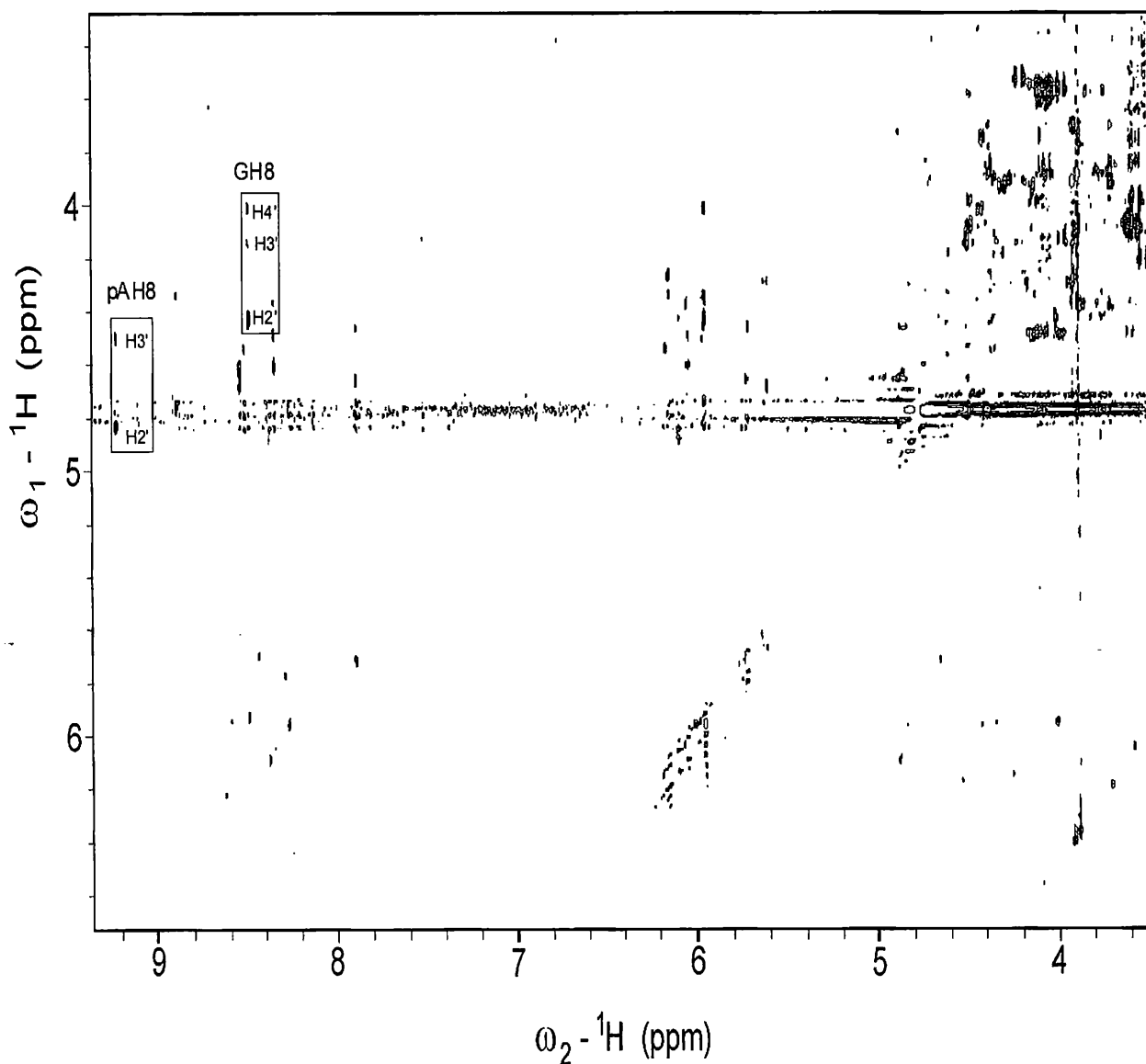
πρωτόνιο	χημική μετατόπιση (ppm)	χημική μετατόπιση (ppm)	χημική μετατόπιση (ppm)
8	8.376	8.496(+0.626)	9.226(+0.955)
2	8.27	-	7.90
1'	6.091	5.955	5.96
2'	4.875	4.766	4.842
3'	4.516	4.428	4.755
4'	4.420	4.014	4.500
5'	4.147	3.96	4.353
5''	3.815	3.885	4.01
Me1A/G		3.51	3.27
Me2A/G		3.38	2.84

Υπολογίστηκαν οι χρόνοι χαλάρωσης T1 για τα πρωτόνια του προϊόντος I με την μέθοδο ‘inversion recovery’ και τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 8.1. Παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρόνων χαλάρωσης των διαφόρων πρωτονίων σε σχέση με το ελεύθερο νουκλεοτίδιο.

Πίνακας 8.1: Χρόνοι χαλάρωσης T1 για τα πρωτόνια του προϊόντος II στο μείγμα της αντίδρασης, μετά την ολοκλήρωση της

	G	pA
8	1.42	1.32
2	-	4.8
1'	2.95	3.34

Στο φάσμα ROESY του προϊόντος I (σχήμα 8.11) δεν διακρίνονται καθαρά όλες οι κορυφές που αναφέρονται στους πίνακες με τα ολοκληρώματα, καθώς η μεγαλύτερη ένταση του φάσματος αλλοιώνει την εικόνα λόγω αύξησης του θορύβου. Πάνω στο φάσμα ROESY σημειώνονται οι κορυφές των πρωτονίων H8 των βάσεων.



Σχήμα 8.11 : Φάσμα 2D ROESY του συμπλόκου I, το οποίο σχηματίζεται κατά την θέρμανση του τρινουκλεοτιδίου ApGpA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ σε D_2O 99.95%. Η λήψη του φάσματος έγινε μετά το τέλος της θέρμανσης στο μείγμα της αντίδρασης (ελεύθερο DMSO = 2.73 ppm).

Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών στο φάσμα ROESY, όπως προέκυψαν από τις ολοκληρώσεις των κορυφών, δίνονται στους πίνακες 8.3 και 8.4 για το νουκλεοσίδιο της γουανίνης και της αδενίνης που σχηματίζουν την ένωση I. Διαπιστώνονται σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με το φάσμα του ελεύθερου νουκλεοτιδίου. Σημειώνουμε την εμφάνιση της κορυφής ανάμεσα στο AH8 και GH8 και την μείωση της έντασης της κορυφής ανάμεσα στο H8 και H1' των νουκλεοτιδίων και την αύξηση της έντασης των κορυφών μεταξύ των H8 και H3', ενώ τέλος κάποιες συζεύξεις που είχαν παρατηρηθεί στο ελεύθερο νουκλεοτίδιο, έχουν εξαλειφθεί στο προϊόν

Πίνακας 8.3 : Πίνακας σχετικών τιμών των ολοκληρωμάτων των κορυφών των πρωτονίων του νουκλεοτιδίου της γουανίνης στο φάσμα ROESY του ApGpA (X=5x)

	H8	H1'	H2'	H3'	H4	H5'	H5''	G1	G2
H8		xxxx	xxxXX	xxxX	xx	x	x	xxxx	x
H1'	xxxx		xxxX	X	X				
H2'	xxxXX	XX					xxxX		
H3'	XX	X					xxxxX		
H4'	xX	xX							
H5'	x						XXXXX XXXXX		
H5''	x		xxxX	xxxxX		XXXXX XXXXX			
G1	xxxx								
G2	w								

Πίνακας 8.4 : Πίνακας σχετικών τιμών των ολοκληρωμάτων των κορυφών των πρωτονίων του νουκλεοτιδίου της 3'-αδενοσίνης, στο φάσμα ROESY του ApGpA (X=5x)

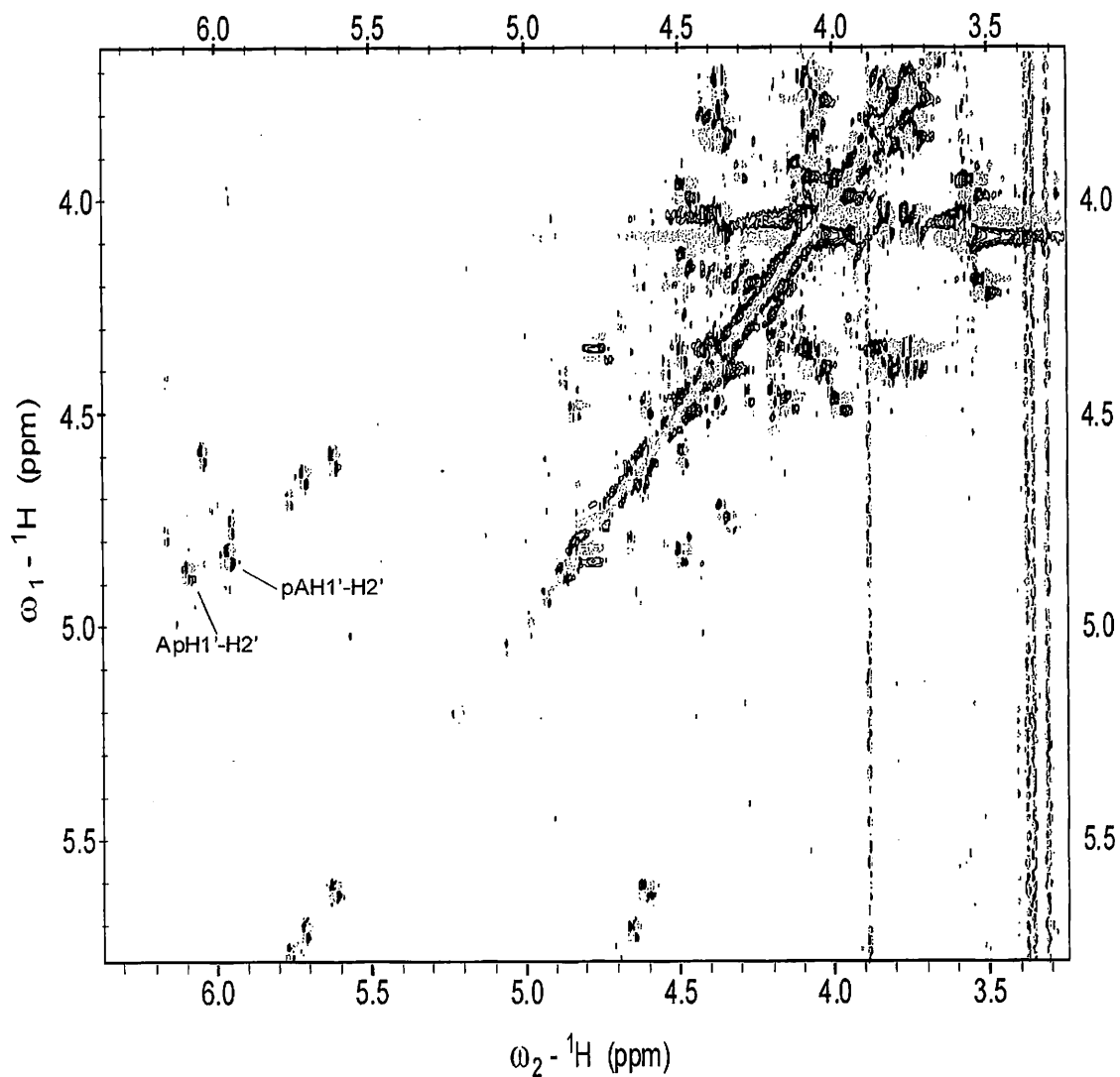
	H8	H1'	H2'	H3'	H4	H5'	H5''	A1	A2
H8		xxxx	xxxXX	xxxX	xx	x	x	xxxx	x
H1'	xxxx		xxxX	X	X				

H2'	xxxXX	XX					xxxX		
H3'	XX	X					xxxxX		
H4'	xX	xX							
H5'	x						XXXXXX		
							XXXXXX		
H5''	x		xxxX	xxxxX		XXXXXX			
						XXXXXX			
A1'	xxxx								
A2	w								

Ολόκληρο το φάσμα DQF-COSY για το προϊόν I, δίνεται στο σχήμα 8.10. Στο φάσμα σημειώνεται η κορυφή του AH1' με το AH2'. Το GH1' δεν παρουσιάζει σύζευξη με το H2' καθώς η τιμή $J_{1'2'}$, έχει σχεδόν μηδενιστεί. Στον πίνακα 8.5 παρατίθενται οι σταθερές σύζευξης που μπορέσαμε να υπολογίσουμε.

Πίνακας 8.5: Σταθερές σύζευξης (Hz) των πρωτονίων των σακχάρων του προϊόντος I της αλληλεπίδρασης του νουκλεοτιδίου ApGpA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$.

	G	A
$J_{1'2'}$	s	7.8
$J_{2'3'}$	5.2	5.4
$J_{3'4'}$	9.2	1.8
$J_{4'5'}$	1.6	2
$J_{4'5''}$	2.5	3.5
$J_{5'5''}$	-13.1	-11.7

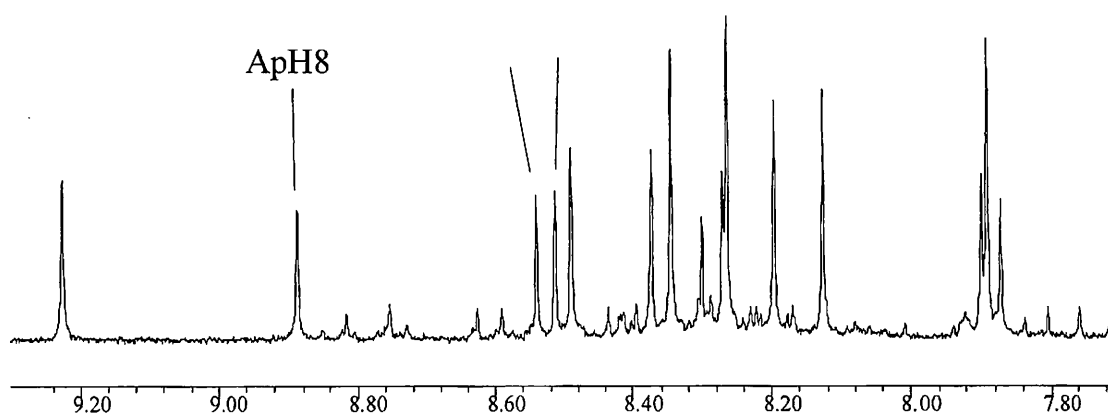


Σχήμα 8.10 : Φάσμα 2D DQF-COSY των προϊόντων της αντίδρασης μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Σημειώνεται η cross-peak του ApH1' με το AH2' για το προϊόν I, λόγω της μεταξύ τους σύζευξης, όπως αντίστοιχα τα πρωτόνια H1' και H2' της συζευγμένης αδερίνης pA. Αντίστοιχη κορυφή για την κεντρική γουανίνη δεν παρατηρείται.

2. Προϊόν II της αντίδρασης του trans-Ru με το ApGrA

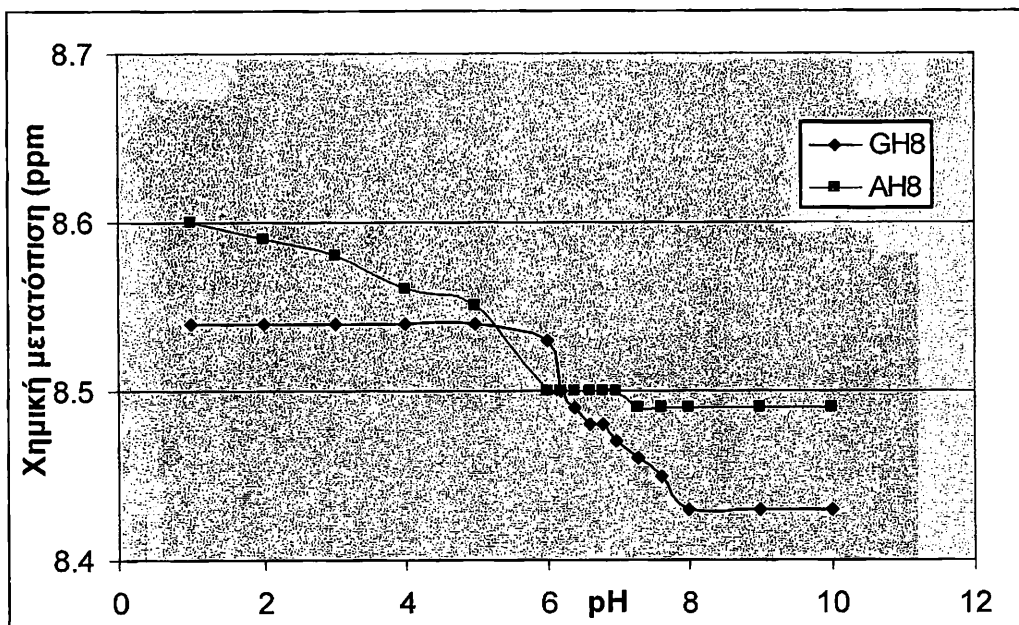
Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, οι κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή >8.50 ppm αποτελούν και με βάση την βιβλιογραφία ένδειξη προϊόντων σύμπλεξης με τις νουκλεοτιδικές βάσεις και ειδικότερα σύμπλεξη του N7 των πουρινών στο μεταλλικό κέντρο⁷⁶. Για το προϊόν I εστίασαμε στην κορυφή που βρίσκεται στα 9.226 ppm. Πρόκειται για κορυφή που αντιστοιχεί σε H8 αδενίνης, ενώ όπως δείξαμε πρόκειται για προϊόν δισχιδούς σύμπλεξης με την 3' - αδενίνη και την κεντρική γουανίνη.

Ωστόσο η κορυφή στα 8.887 ppm αποτελεί σαφή ένδειξη του κύριου προϊόντος II της αντίδρασης σύμπλεξης του συμπλόκου trans-Ru με το τρινουκλεοτίδιο ApGrA και πρόκειται για κορυφή της αδενίνης ApH8 που είναι συμπλεγμένη με τη μια θέση σύμπλεξης του συμπλόκου ρουθηνίου. Παράλληλα αν παρατηρήσουμε τη χρονική εξέλιξη της αντίδρασης του συμπλόκου με το τρινουκλεοτίδιο σε ό,τι αφορά την αρωματική περιοχή θα παρατηρήσουμε την εμφάνιση δυο νέων κορυφών με ταυτόχρονη εξέλιξη και παραπλήσιο ολοκλήρωμα, που υποδεικνύουν σύμπλεξη σε βάση γουανίνης ή αδενίνης.



Σχήμα 8.12 Αρωματική περιοχή του φάσματος ^1H , της αλληλεπίδρασης trans-Ru με το τρινουκλεοτίδιο ApGrA, μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Σημειώνεται το πρωτόνιο H8 της συμπλεγμένης 5' - αδενίνης, ενώ φαίνονται και οι δυο κορυφές που αποδίδουμε στο προϊόν II.

Στην περίπτωση του προϊόντος II δε διαπιστώσαμε σε φάσμα ROESY κάποιο γOsε μεταξύ των πρωτονίων H8 της συμπλεγμένης αδενίνης με το αντίστοιχο της γουανίνης όπως στην περίπτωση του προϊόντος I, ωστόσο είναι δυνατόν να διαπιστώσουμε αν υπάρχει δισχιδής σύμπλεξη με την γουανίνη από την τιτλοδότηση pH στο τελικό προϊόν (σχήμα 8.11).

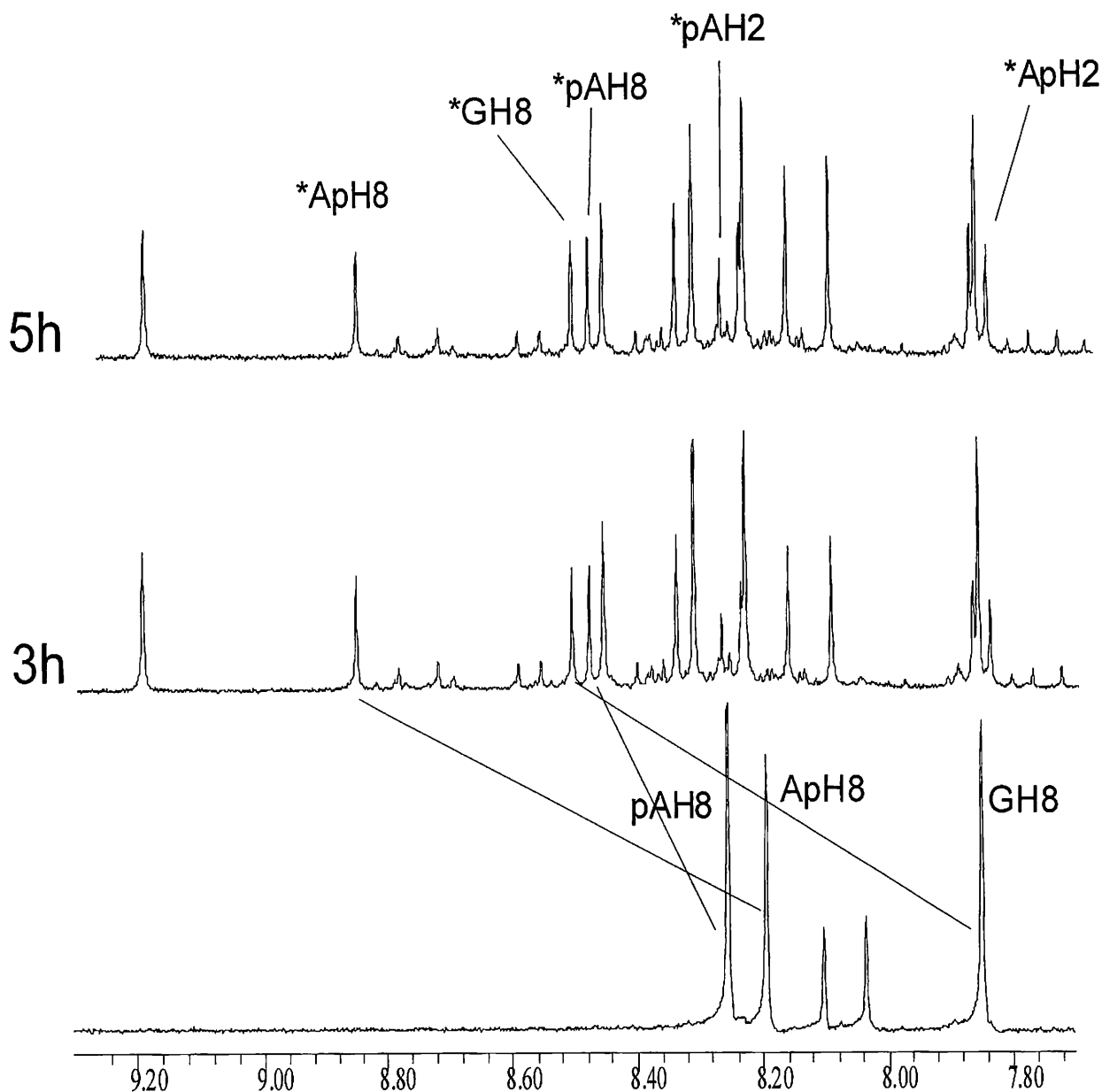


Σχήμα 8.11: Διάγραμμα μεταβολής της χημικής μετατόπισης των αρωματικών πρωτονίων GH8 και AH8 συναρτήσει του pH.

Με βάση αυτήν την τιτλοδότηση παρατηρούμε ότι σε pH κάτω από 4, οι χημικές μετατοπίσεις για το πρωτόνιο H8 που έχει συμπλεχθεί, παραμένουν σταθερές, σε αντίθεση με το ασύμπλεκτο πρωτόνιο H8 όπου οι χημικές μετατοπίσεις μεταβάλλονται, ενώ σε τιμές pH στην βασική περιοχή, οι σχετικές αλλαγές που παρατηρούνται σχετίζονται με την μείωση του pK_a του N1H. Με αυτό τον τρόπο διαπιστώνουμε ότι η κορυφή στα 8.541ppm αντιστοιχεί στο GH8 και είναι συμπλεγμένη με το μέταλλο και σε σχέση με την ασύμπλεκτη γουανίνη έχει μετατοπιστεί σε μεγαλύτερη τιμή κατά + 0.671 ppm.

Επομένως, η δεύτερη κορυφή που παρατηρούσαμε ότι είχε όμοιο κινητικό προφίλ, μπορεί να αποδοθεί στο pAH8 και σε σχέση με την αρχική κορυφή παρουσιάζει μετατόπιση σε μεγαλύτερη τιμή (+0.229 ppm). Η αρωματική περιοχή φαίνεται στο σχήμα 8.13, όπου σημειώνονται τα πρωτόνια H8 και H2 του προϊόντος II και η μεταβολή σε σχέση με το ελεύθερο τρινοκλεοτίδιο.

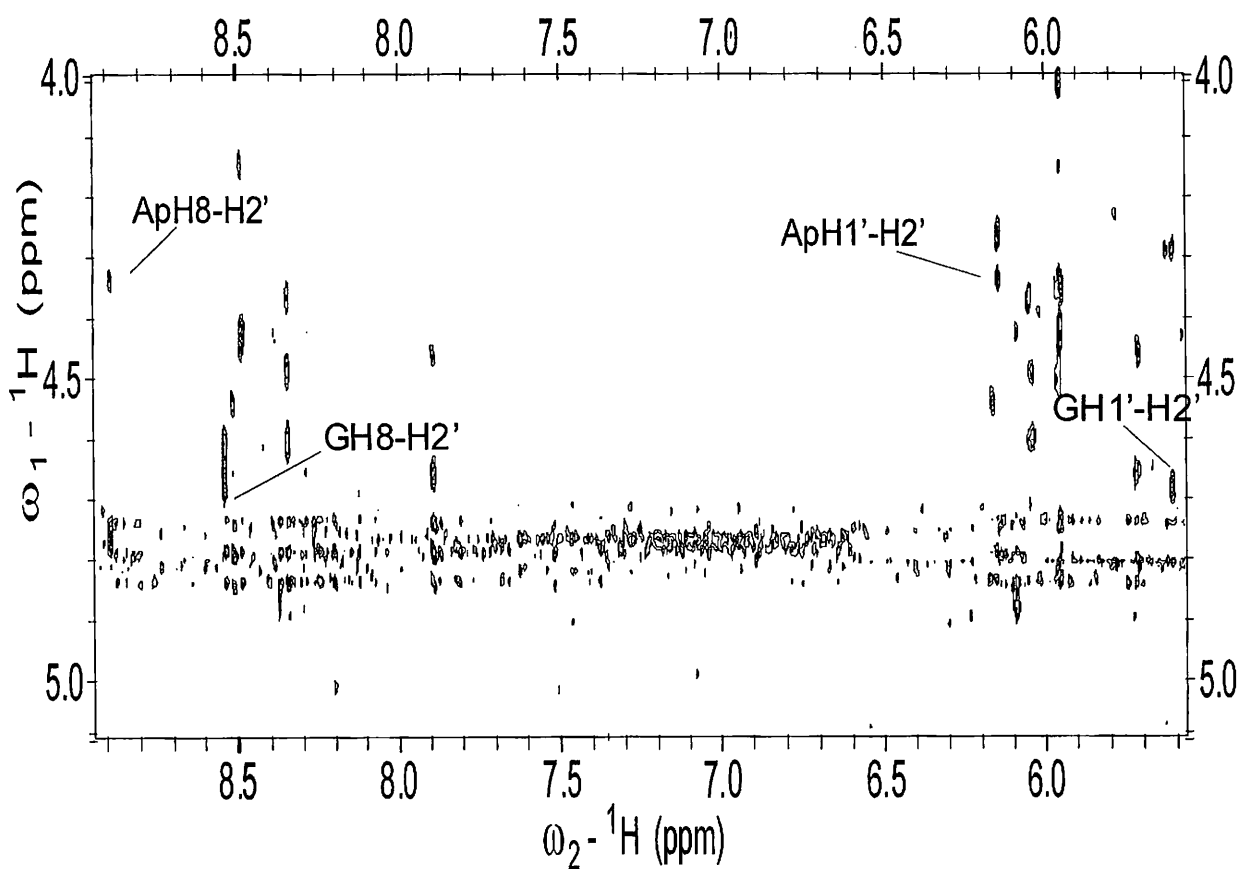
Στο προηγούμενο κεφάλαιο περιγράψαμε τον σκεπτικό που χρησιμοποιείται για την δομική μελέτη της σύμπλεξης, αλλά από αυτό το κεφάλαιο θα αναφερόμαστε περισσότερο διεξοδικά στα βήματα που ακολουθήσαμε ώστε να καταλήξουμε σε συμπεράσματα σε ότι αφορά τα προϊόντα σύμπλεξης. Βεβαίως πρόκειται για συνδυασμό μελέτης των φασμάτων μιας και δυο διαστάσεων αλλά και ενδελεχούς παρατήρησης της εμφάνισης των κορυφών.



Σχήμα 8.14 : Αρωματική περιοχή των φασμάτων ^1H NMR κατά την αλληλεπίδραση του ArGrA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$. Σημειώνονται τα πρωτόνια του αντιδρώντος (ArH8, GH8 και pAH8) και τα αντίστοιχα του συμπλόκου II, τα οποία σημειώνονται με (*) (*ArH8, *GH8, *pAH8, *ArH2 και *pAH2). Αναγράφεται ο χρόνος θέρμανσης ενώ σημειώνεται η μετατόπιση των κορυφών.

Με την βοήθεια του ROESY ήταν δυνατό να αποδοθούν οι κορυφές των πρωτονίων H1' των βάσεων που μας βοηθούν πολύ στην συνέχεια να βρούμε τα υπόλοιπα πρωτόνια των βάσεων. Στην περίπτωση ωστόσο του προϊόντος II, και σε αντίθεση με το προϊόν I, δεν παρατηρούμε κορυφές αλληλεπίδρασης διπόλου-διπόλου μεταξύ των πρωτονίων H8 και H1' άμεσα, τουλάχιστον στην

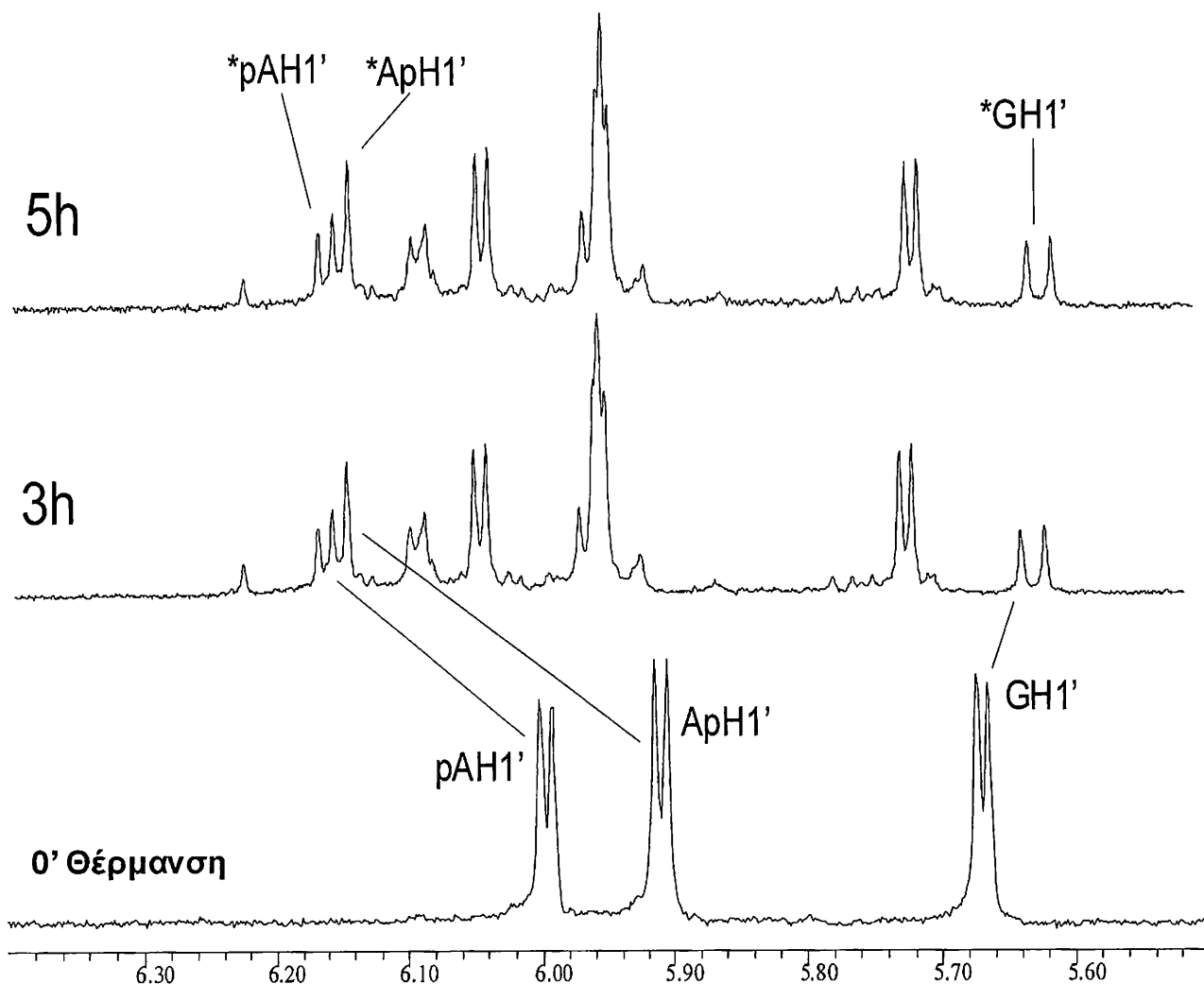
περίπτωση της 5'-αδενίνης, αλλά οδηγούμαστε τελικά στην ταυτοποίηση των πρωτονίων H1' διότι παρατηρούνται rOe μεταξύ H8 και H2' και στην συνέχεια H2' και H1'. Στο σχήμα 8.13 φαίνονται οι κορυφές διασταύρωσης rOe των πρωτονίων H8 – H2', καθώς και μεταξύ των πρωτονίων H1' – H2', πάνω στα οποία βασιστήκαμε τελικά για να συσχετίσουμε τα πρωτόνια H8 και H1'. Σε ότι αφορά την κεντρική γουανίνη που συμπλέκεται με το σύμπλοκο του ρουθηνίου, υπάρχει μόνο μια πολύ ασθενής κορυφή διασταύρωσης με το H1', που βεβαίως επιβεβαιώνεται και με τον τρόπο που αναφέρθηκε πιο πάνω για την 5' – αδενίνη.



Σχήμα 8.14 : Τμήμα από το φάσμα ROESY, όπου φαίνεται η διασταύρωση μέσω χώρου των πρωτονίων H8 της γουανίνης και της 5'-αδενίνης, με τα πρωτόνια H2' των αντίστοιχων βάσεων, καθώς και μεταξύ των πρωτονίων H1' και H2'.

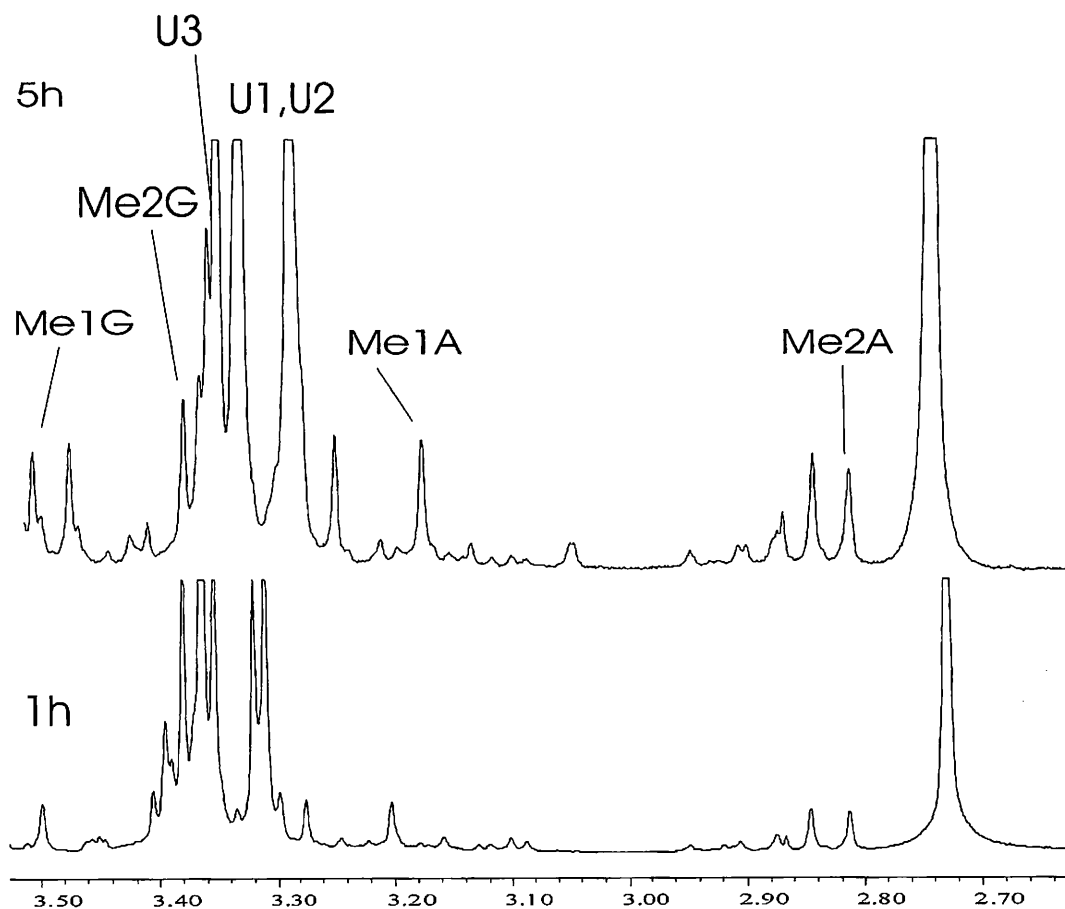
Στην συνέχεια, με την βοήθεια των φασμάτων COSY-90 και TOCSY αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις DQF-COSY και ROESY μπορέσαμε να βρούμε τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των αντίστοιχων σακχάρων των νουκλεοτιδίων. Στο σχήμα 8.15 παρουσιάζονται οι κορυφές στην αρωματική περιοχή αλλά και στην περιοχή των πρωτονίων H1' για το προϊόν Π.

Η παρουσία 2 προϊόντων αλλά και σε μεγάλο ποσοστό του ελεύθερου νουκλεοτιδίου εμπόδιζε αρκετά την σαφή αποτίμηση των φασμάτων μας και δυο διαστάσεων και δεν ήταν αρκετά ξεκάθαρη η απόδοση των κορυφών. Αυτά που μπορούμε να παρατηρήσουμε στην περιοχή των σακχάρων (σχήμα 8.15) είναι τα εξής : Στο σάκχαρο της 5'-αδενίνης στο προϊόν II, το πρωτόνιο ApH1' μετατοπίζεται προς μικρότερη τιμή δ και παραμένει διπλή κορυφή με την διάσχιση της να αυξάνεται, ενώ αντίθετα το GH1' μετατοπίζεται σε μεγαλύτερες τιμές δ και από διπλή κορυφή γίνεται απλή. Η διάσχιση οφείλεται στα H2' πρωτόνια , επομένως στην συγκεκριμένη περίπτωση φαίνεται ότι η σταθερά σύζευξης $^3J_{1,2'}$ μειώνεται στην περίπτωση της γουανίνης και αυξάνεται στην περίπτωση της αδενίνης.



Σχήμα 8.15 : Φάσματα ^1H NMR της περιοχής όπου εμφανίζονται τα H1' των σακχάρων, κατά την εξέλιξη της αντίδρασης του ApGpA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$. Σημειώνονται τα πρωτόνια του αντιδρώντος (ApH1', GH1' και pAH1'), καθώς και τα πρωτόνια του προϊόντος II με (*) (*ApH1', *GH1' και *pAH1'). Σε κάθε φάσμα σημειώνεται ο χρόνος θέρμανσης, ενώ υποδεικνύεται η εξέλιξη των κορυφών.

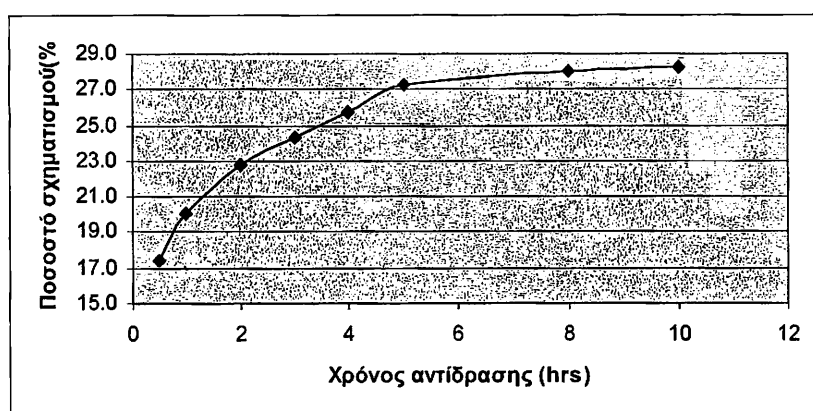
Η απόδοση των κορυφών στην περιοχή των DMSO έγινε με συνδυασμό τόσο του φάσματος COSY όσο και του φάσματος ROESY. Συγκεκριμένα, όπως περιγράψαμε και στην περίπτωση του προϊόντος I, από το φάσμα COSY είδαμε ποια μεθύλια ανήκουν στο ίδιο μόριο DMSO καθώς παρουσιάζουν μικρή σύζευξη ($^4J_{HH}$) η οποία αν και δεν φαίνεται στο φάσμα μιας διάστασης, δίνει κορυφή στο COSY.



Σχήμα 8.16 : Φάσμα ^1H NMR της περιοχής των μεθυλίων του DMSO κατά την διάρκεια της θέρμανσης του ArGrA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$. Σημειώνονται οι κορυφές των συμπλόκων τα οποία δεν έχουν αντιδράσει και οι κορυφές του προϊόντος I, Me1A, Me2A, Me1G και Me2G. Σημειώνεται ο χρόνος θέρμανσης

Παράλληλα στο φάσμα ROESY παρατηρήθηκαν κορυφές μεταξύ των πρωτονίων AH8 και GH8 και των δυο μεθυλίων του μορίου DMSO στο οποίο είναι κοντά η αντίστοιχη βάση. Έτσι τα δυο σήματα μεθυλίων του DMSO κοντά στη γουανίνη ονομάστηκαν MeG1, MeG2 και αντίστοιχα της αδερίνης MeA1 και MeA2. Οι τρεις κορυφές που αντιστοιχούν στα σύμπλοκα που δεν έχουν αντιδράσει σημειώνονται ως U1,U2 και U3

Στο σχήμα 8.17 δίνεται το διάγραμμα της πορείας σχηματισμού του κυρίως προϊόντος της αλληλεπίδρασης του $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ με το ApGrA. Το ποσοστό σχηματισμού του προϊόντος υπολογίζεται από τα 1D ^1H φάσματα NMR ολοκληρώνοντας τις κορυφές των πρωτονίων στην αρωματική περιοχή. Ως ποσοστό παίρνουμε τον μέσο όρο της σχετικής τιμής των ολοκληρωμάτων των H8 των βάσεων, ως προς το άθροισμα του ολοκληρώματος της αντίστοιχης κορυφής του τρινοκλεοτιδίου που δεν έχει αντιδράσει, των κύριων προϊόντων I και II και των παραπροϊόντων. Από το διάγραμμα φαίνεται ότι η αντίδραση φτάνει το ποσοστό 28% στις πρώτες 5 ώρες ενώ μετά δεν παρατηρούμε σημαντική μεταβολή. Στον πίνακα 8.6 δίνονται οι χημικές μετατοπίσεις βάσει της απόδοσης των κορυφών από τα φάσματα ROESY, TOCSY και COSY



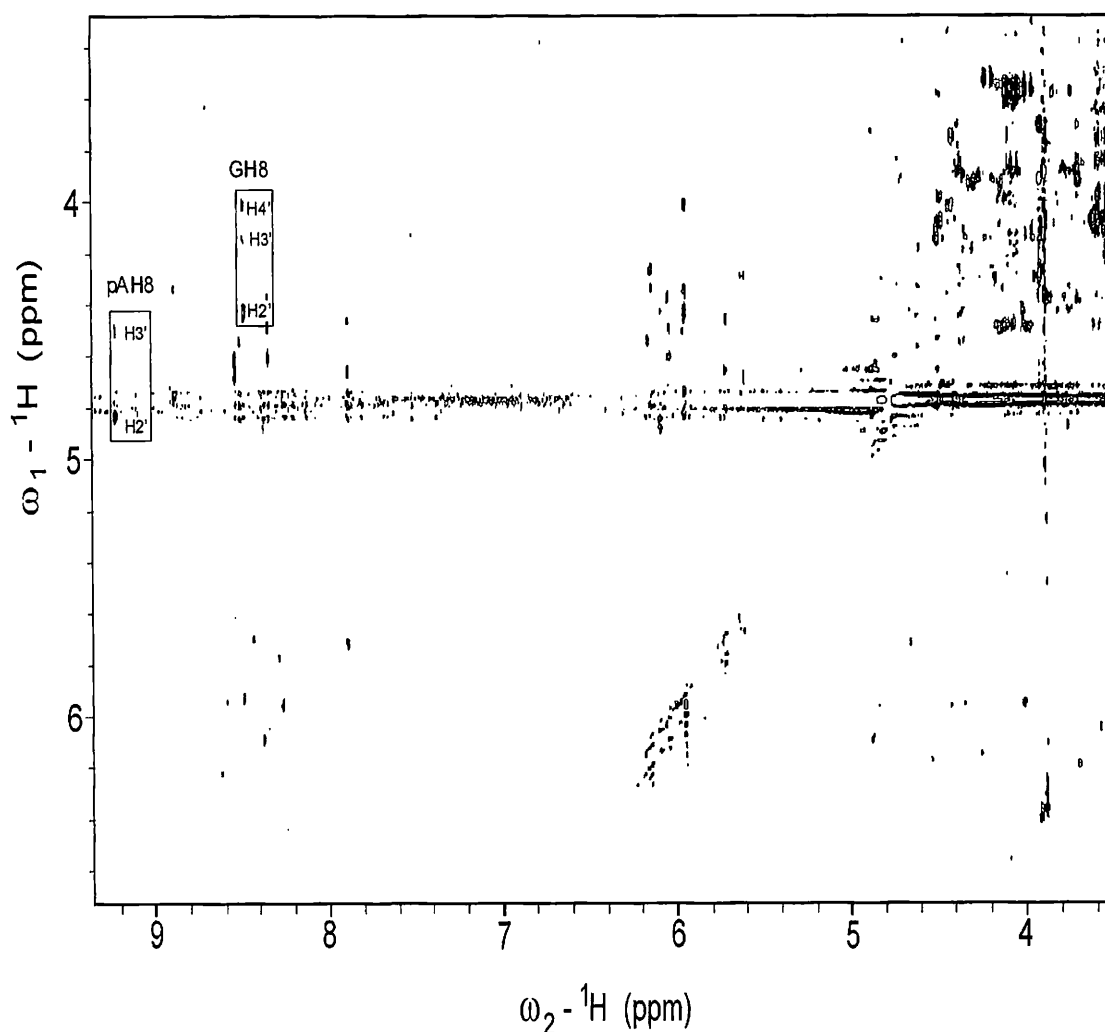
Σχήμα 8.17: Διάγραμμα του ποσοστού σχηματισμού του προϊόντος I, συναρτήσει του χρόνου θέρμανσης στους 40°C

Πίνακας 8.6: Χημικές μετατοπίσεις του κυρίως προϊόντος II που σχηματίζεται κατά την αλληλεπίδραση του $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ με το νουκλεοτίδιο ApGrA. Ως κορυφή αναφοράς χρησιμοποιείται το DMSO (2.73ppm)

	A'(Δδ') (ppm)	G'(Δδ) (ppm)	A'(Δδ') (ppm)
8	8.887(+0.689)	8.541(+0.671)	8.516
2	7.87		8.30
1'	6.146(+0.233)	5.622(-0.056)	6.165
2'	4.762	4.681	4.537
3'	4.338	4.614	4.393
4'	4.124	4.566	4.204

5'	4.033	3.989	4.068
5''	3.976	3.866	4.015
Me1A/G	3.27	3.54	
Me2A/G	2.815	3.41	

Στο φάσμα ROESY του προϊόντος II (σχήμα 8.18) δεν διακρίνονται καθαρά όλες οι κορυφές που αναφέρονται στους πίνακες με τα ολοκληρώματα, καθώς η μεγαλύτερη ένταση του φάσματος αλλοιώνει την εικόνα λόγω αύξησης του θορύβου. Πάνω στο φάσμα ROESY σημειώνονται οι κορυφές διασταύρωσης των πρωτονίων H8 των συμπλεγμένων βάσεων.



Σχήμα 8.18 : Φάσμα 2D ROESY του συμπλόκου I, το οποίο σχηματίζεται κατά την θέρμανση του τρινοκλεοτιδίου ApGrA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ σε D_2O 99.95%. Η λήψη του φάσματος έγινε μετά το τέλος της θέρμανσης στο μείγμα της αντίδρασης (ελεύθερο DMSO = 2.73 ppm).

Πίνακας 8.8 : Πίνακας σχετικών τιμών των ολοκληρωμάτων των κορυφών των πρωτονίων του νουκλεοτιδίου της γουανίνης στο φάσμα ROESY του ApGrA (X=5x)

	H8	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''	G1	G2
H8		xxxx	xxxXX	xxxX	xx	x	x	xxxx	x
H1'	xxxx		xxxX	X	X				
H2'	xxxXX	XX					xxxX		
H3'	XX	X					xxxxX		
H4'	xX	xX							
H5'	x						XXXXXX XXXXXX		
H5''	x		xxxX	xxxxX		XXXXXX XXXXXX			
G1	xxxx								
G2	w								

Πίνακας 8.9 : Πίνακας σχετικών τιμών των ολοκληρωμάτων των κορυφών των πρωτονίων του νουκλεοτιδίου της 3'-αδενοσίνης, στο φάσμα ROESY του ApGrA (X=5x)

	H8	H1'	H2'	H3'	H4'	H5'	H5''	A1	A2
H8		xxxx	xxxXX	xxxX	xx	x	x	xxxx	x
H1'	xxxx		xxxX	X	X				
H2'	xxxXX	XX					xxxX		
H3'	XX	X					xxxxX		
H4'	xX	xX							
H5'	x						XXXXXX XXXXXX		

Πίνακας 8.10: Σταθερές σύζευξης (Hz) των πρωτονίων των σακχάρων του προϊόντος II της αλληλεπίδρασης του νουκλεοτιδίου ApGpA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$.

	A	G
$J_{1'2'}$	s	8.5
$J_{2'3'}$	4.6	6.4
$J_{3'4'}$	9.6	3.3
$J_{4'5'}$	1.7	4.6
$J_{4'5''}$	2.9	1.6
$J_{5'5''}$	-13.3	-11.6

Υπολογίστηκαν οι χρόνοι χαλάρωσης T1 για τα πρωτόνια του προϊόντος I με την μέθοδο ‘inversion recovery’ και τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 8.11. Παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρόνων χαλάρωσης των διαφόρων πρωτονίων.

Πίνακας 8.11: Χρόνοι χαλάρωσης T1 για τα πρωτόνια του προϊόντος II στο μείγμα της αντίδρασης, μετά την ολοκλήρωση της

	Ap	G
8	1.37	1.624
2	4.68	-
1'	2.823	2.53

3. Συζήτηση

Όταν το τρινουκλεοτίδιο ApGrA θερμαίνεται με το trans ισομερές σε υδατικό διάλυμα (D₂O 99.9%) σχηματίζονται δυο κύρια προϊόντα και κάποια παραπροϊόντα. Η αντίδραση ουσιαστικά ολοκληρώνεται μετά τις 5 ώρες θέρμανσης..

Με βάση τα αποτελέσματα που λαμβάνουμε από τα φάσματα ROESY, από το ελεύθερο τρινουκλεοτίδιο αλλά και από τα προϊόντα της αλληλεπίδρασης με το σύμπλοκο του ρουθηνίου, μπορούμε να καταλήξουμε σε ορισμένα συμπεράσματα που να αφορούν την δομή των προϊόντων και τις παρατηρούμενες αλλαγές κατά την σύμπλεξη στο μεταλλικό κέντρο. Στην συνέχεια αναλύεται περισσότερο διεξοδικά η δομή των προϊόντων όπως συνάγεται από τα δεδομένα ROESY και T₁ χρόνων κυρίως.

ΠΡΟΪΟΝ Ι

Θα ξεκινήσουμε την ανάλυση της διαμόρφωσης από το προϊόν Ι της αντίδρασης του trans-RuCl₂(DMSO)₄ με το τρινουκλεοτίδιο ApGrA, το οποίο αφορά την δισχιδή σύμπλεξη του μεταλλικού κέντρου με την γουανίνη και την 3' – αδενίνη. Από τα φάσματα ROESY αλλά και από τους πίνακες με τις ολοκληρώσεις των κορυφών διασταύρωσης μπορούμε να καταλήξουμε σε ορισμένα συμπεράσματα. Συγκεκριμένα οι πολύ ασθενείς κορυφές διασταύρωσης rOe ρAH8-H1', σε συνδυασμό με τις ισχυρές ρAH8 – H2' και ρAH8 – H3' για την βάση της αδενίνης, βρίσκονται σε συμφωνία με την χ – γωνία του γλυκοσιδικού δεσμού στην αντί περιοχή (-90° / -170°). Παράλληλα η μεγάλη τιμή T₁ για το AH2 της 3'-αδενίνης ενισχύει αυτό το συμπέρασμα, της παρουσίας δηλαδή του πρωτονίου H8 της αδενίνης πάνω από το επίπεδο του σακχαρικού δακτυλίου.

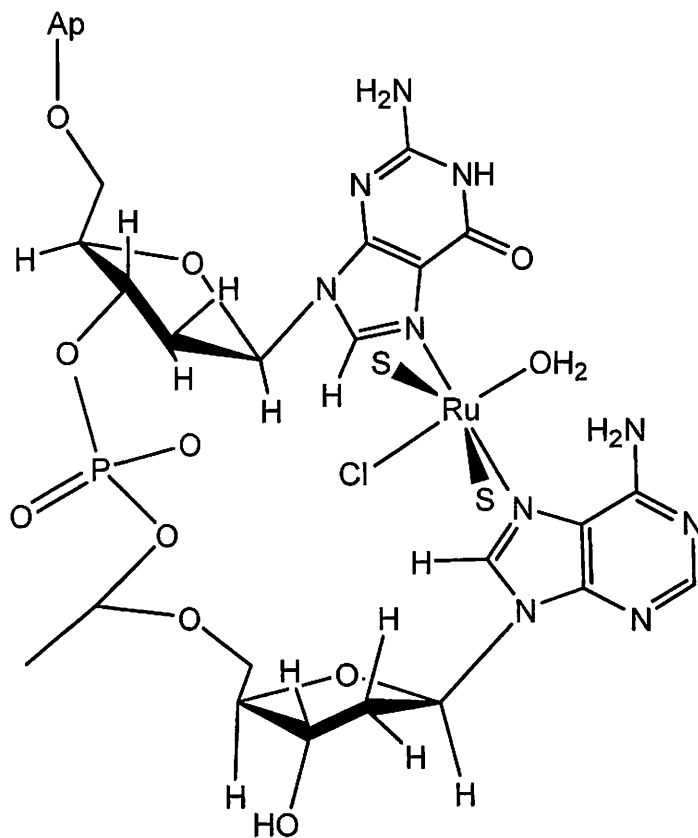
Σε ότι αφορά την βάση της συμπλεγμένης γουανίνης, παρατηρούμε ότι οι εντάσεις των κορυφών διασταύρωσης rOe, μεταξύ H8 – H3' και H1'-H2' δεν αυξάνονται σημαντικά για την βάση της γουανίνης, σε σχέση με το ελεύθερο ασύμπλεκτο νουκλεοσίδιο, ενώ το σχετικό ολοκλήρωμα της κορυφής διασταύρωσης H8-H1' είναι σχετικά μεγάλο. Επομένως μπορούμε να υποστηρίξουμε ότι η διαμόρφωση της βάσης γύρω από τον γλυκοζιτικό δεσμό είναι syn.

Η σύζευξη μέσω 3 δεσμών, ³J, μας παρέχει τις πληροφορίες για την διαμόρφωση γύρω από απλούς δεσμούς σε δομές νουκλεϊνικών οξέων. Η διαμόρφωση των σακχάρων –όπως εξάλλου αναλύσαμε στο πρώτο μέρος της θεωρίας- περιγράφεται συνήθως ως ισορροπία μεταξύ S-type (3'-exo) και N-type(3'-endo). Στην περίπτωση της γουανίνης, όπου δεν παρατηρείται σύζευξη μεταξύ H1' και H2', η διαμόρφωση που προκύπτει είναι N-type, ενώ σε ότι αφορά την 3'-αδενίνη, με βάση την τιμή

$^3J_{1,2}=8\text{Hz}$ που λαμβάνουμε από την ανάλυση του φάσματος DQF-COSY, η διαμόρφωση που προκύπτει είναι κατά 80% S-type.

Τέλος η εμφάνιση rOe μεταξύ GH8 και AH8, υποδηλώνει μια head-to-head διαμόρφωση των δυο βάσεων που είναι συμπλεγμένες με το μεταλλικό κέντρο, μέσω N7,N7. Φαίνεται πως κατά την σύμπλεξη, το Ru βρίσκεται σε ισημερινή synclinal θέση, απέναντι από τους υποκαταστάτες να καταλαμβάνονται από τα μόρια H_2O και Cl^- .

Συμπερασματικά, η δομή που προκύπτει για το προϊόν I, παρουσιάζει ομοιότητα με την δομή που απορρέει από την σύμπλεξη με το διουκλεοτίδιο GrA και $d(\text{GrA})^{64}$, αλλά και με το διουκλεοτίδιο GrG⁶⁹.



Δομή προϊόντος I

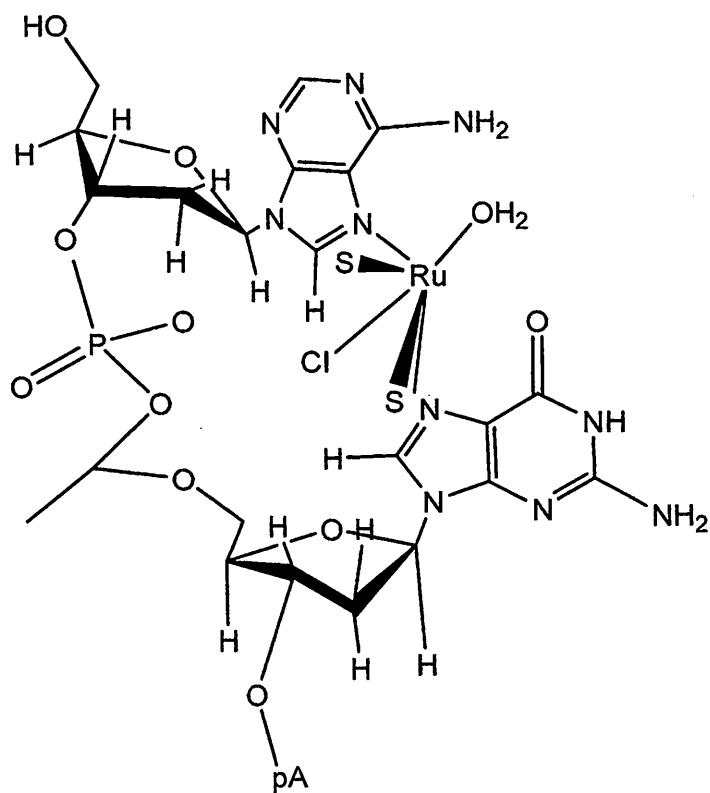
ΠΡΟΪΟΝ II

Θα συνεχίσουμε την ανάλυση της διαμόρφωσης για το προϊόν II της αντίδρασης του trans-RuCl₂(DMSO)₄ με το τρινουκλεοτίδιο ApGrA, το οποίο αφορά την δισχιδή σύμπλεξη του μεταλλικού κέντρου με την γουανίνη και την 5' – αδενίνη. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των φασμάτων ROESY και την σύγκριση των πινάκων των ολοκληρωμάτων των κορυφών διασταύρωσης του ελεύθερου τρινουκλεοτιδίου παράλληλα με τις αντίστοιχες κορυφές προϊόν II, μπορούμε να καταλήξουμε σε σημαντικά συμπεράσματα που αφορούν την δομή. Συγκεκριμένα για την συμπλεγμένη βάση της γουανίνης, η πολύ ασθενής κορυφή διασταύρωσης rOe pAH8-H1', σε συνδυασμό με τις ισχυρές pAH8 – H2' και AH8 – H3', που παρουσιάζουν αύξηση σε σχέση με το ασύμπλεκτο νουκλεοσίδιο, βρίσκονται σε συμφωνία με την χ – γωνία του γλυκοσιδικού δεσμού στην αντί περιοχή (-90° / -170°). Από το DQF-CGSY και συγκεκριμένα την σταθερά σύζευξης ³J_{1,2}' =9Hz που λαμβάνουμε, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η γουανίνη έχει διαμόρφωση σακχάρου κατά 90% S-type (C2'-endo).

Σχετικά με την βάση της συμπλεγμένης αδενίνης, δεν παρατηρούμε σημαντική διαφοροποίηση σε ότι αφορά τις εντάσεις των κορυφών διασταύρωσης rOe, μεταξύ H8 – H3' και H1' -H2', σε σύγκριση με το ελεύθερο ασύμπλεκτο νουκλεοσίδιο, ωστόσο δεν παρατηρείται και έντονο rOe μεταξύ H8-H1'. Παράλληλα, σε αντίθεση με το προϊόν I, δεν παρατηρείται κορυφή διασταύρωσης AH8 –GH8, επομένως στην περίπτωση αυτή οι βάσεις δεν βρίσκονται σε διαμόρφωση “head-to-head” η μια ως προς την άλλη. Στην περίπτωση αυτή φαίνεται ότι η διαμόρφωση γύρω από τον γλυκοζιτικό δεσμό είναι syn, ενώ το σημαντικότερο συμπέρασμα είναι ότι οι νουκλεοτιδικές βάσεις δεν είναι παράλληλες, αλλά τα επίπεδα τους σχηματίζουν γωνία, που με τα παρόντα πειραματικά δεδομένα δεν είμαστε σε θέση να προσδιορίσουμε.

Σε ότι αφορά την διαμόρφωση του σακχάρου, εφόσον η διπλή κορυφή του πρωτονίου H1' της 5'-αδενίνης, μετά την σύμπλεξη γίνεται απλή, τότε και η τιμή της σταθεράς σύζευξης ³J_{1,2}' μηδενίζεται, οπότε πρόκειται για διαμόρφωση τύπου N(C3'-endo).

Η προτεινόμενη δομή με βάση τον συλλογισμό και τα συμπεράσματα που αναλύσαμε προηγουμένως ακολουθεί παρακάτω. Παρατηρούνται ασφαλώς ομοιότητες με την δομή του προϊόντος I ενώ παράλληλα υπάρχει σημαντική συμφωνία με τα δεδομένα που απορρέουν από το προϊόν σύμπλεξης του trans-Ru με τα δινουκλεοτίδια ApG και d(ApG). Ωστόσο υπάρχει μια σημαντική διαφοροποίηση που αφορά την σχετική θέση των βάσεων μεταξύ τους, αφού φαίνεται ότι τα επίπεδα τους δεν είναι παράλληλα και δεν είναι προσανατολισμένες οι βάσεις η μια απέναντι στην άλλη.

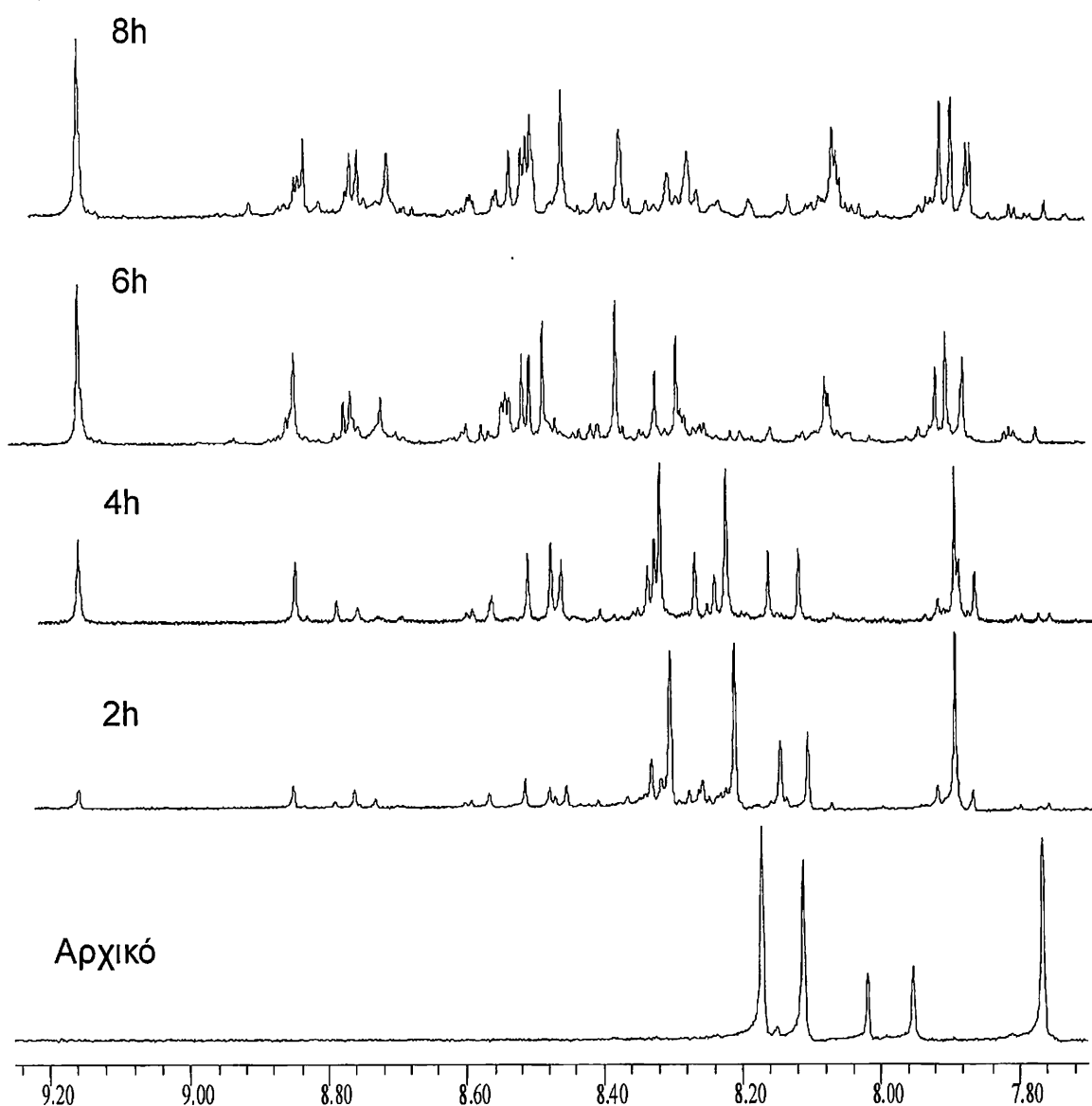


Δομή προϊόντος II

Κεφαλαίο IX

Αλληλεπίδραση του $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ με το ArGrA

Το $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ αφήνεται να αλληλεπιδράσει με το ArGrA σε D_2O , αρχικά σε αναλογία 1:1, με θέρμανση στους 40°C , υπό αδρανή ατμόσφαιρα αργού. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε μετά την ανάμειξη στην τιμή 5,6. Η πορεία της αντίδρασης καταγράφηκε με λήψη φασμάτων ^1H ανά μια ώρα περίπου. Ακολούθως παρουσιάζεται η χρονική εξέλιξη των κορυφών στην αρωματική περιοχή (σχήμα 9.1)



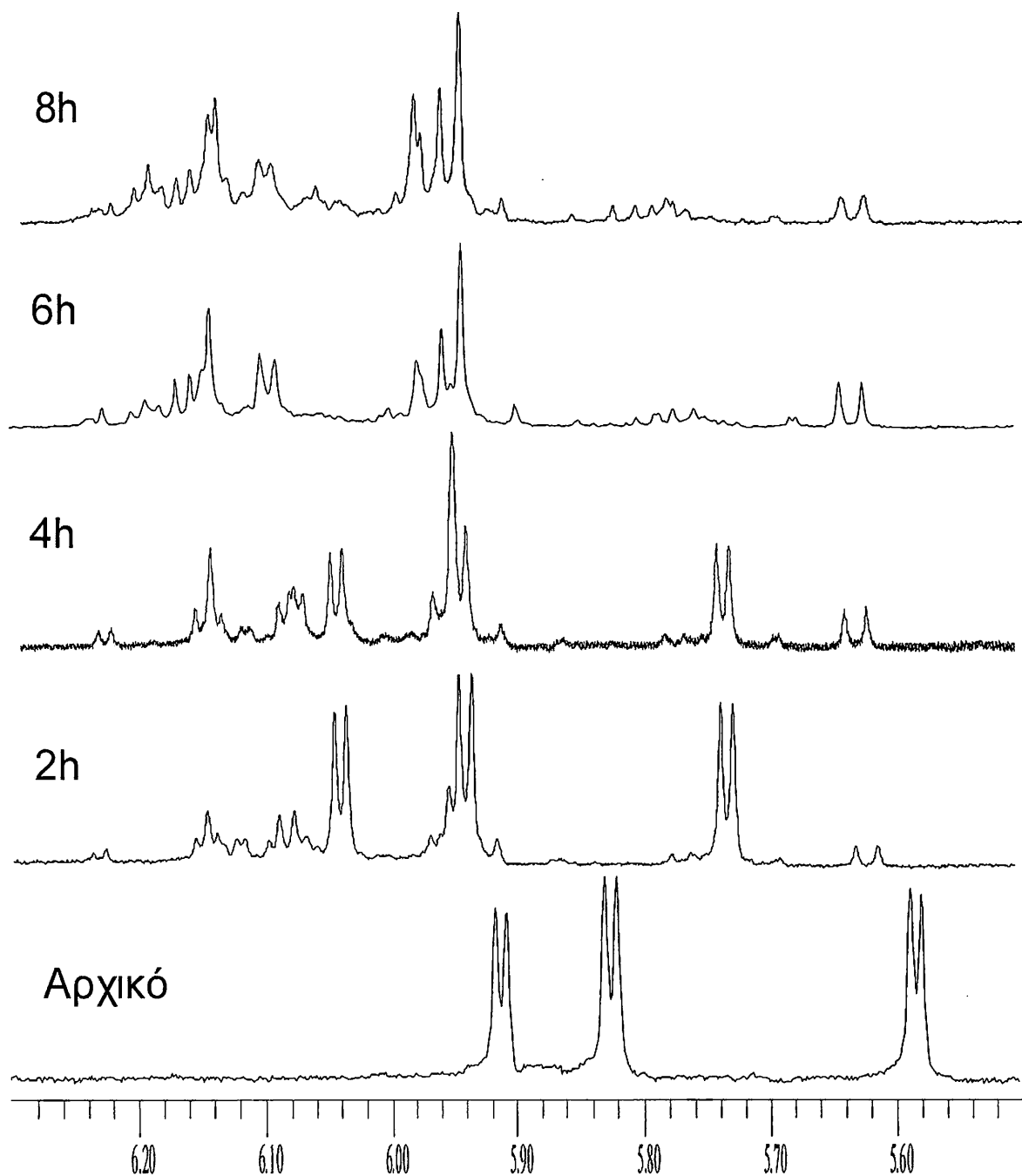
Σχήμα 9.1: Αρωματική περιοχή των φασμάτων ^1H NMR κατά την αλληλεπίδραση του ArGrA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$. Αναγράφεται ο χρόνος θέρμανσης.

Όπως φαίνεται μετά τις 4 πρώτες ώρες έχουν σχηματιστεί προϊόντα σε πάρα πολύ μικρό ποσοστό, επομένως αλλάζουμε την αναλογία συμπλόκου:νουκλεοτιδίου σε 1.7:1 για να επιταχυνθεί η αντίδραση. Το προφίλ των φασμάτων που παίρνουμε μοιάζει αρκετά με το αντίστοιχο που ελήφθη για το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$, ωστόσο παρατηρούνται και κάποιες άλλες σημαντικές αλλαγές που θα επιχειρήσουμε να προσεγγίσουμε.

Παρατηρείται και εδώ η εμφάνιση κορυφών σε μεγαλύτερες τιμές δ , που είναι ενδεικτικές σύμπλεξης με το N7 πουρινών. Πρόκειται λοιπόν πάλι για περίπτωση δυο προϊόντων δισχιδούς σύμπλεξης του συμπλόκου με το τρινουκλεοτίδιο και συγκεκριμένα με την κεντρική γουανίνη κάθε φορά και την 3' ή 5' αδενίνη. Οι χημικές μετατοπίσεις είναι σχεδόν ίδιες τουλάχιστον για τα πρωτόνια της αρωματικής περιοχής καθώς και για τα πρωτόνια H1' και H2' τα οποία μπορέσαμε να διασταυρώσουμε με την βοήθεια των φασμάτων COSY-90, TOCSY και ROESY, με τις τιμές που λάβαμε για το trans-παράγωγο .

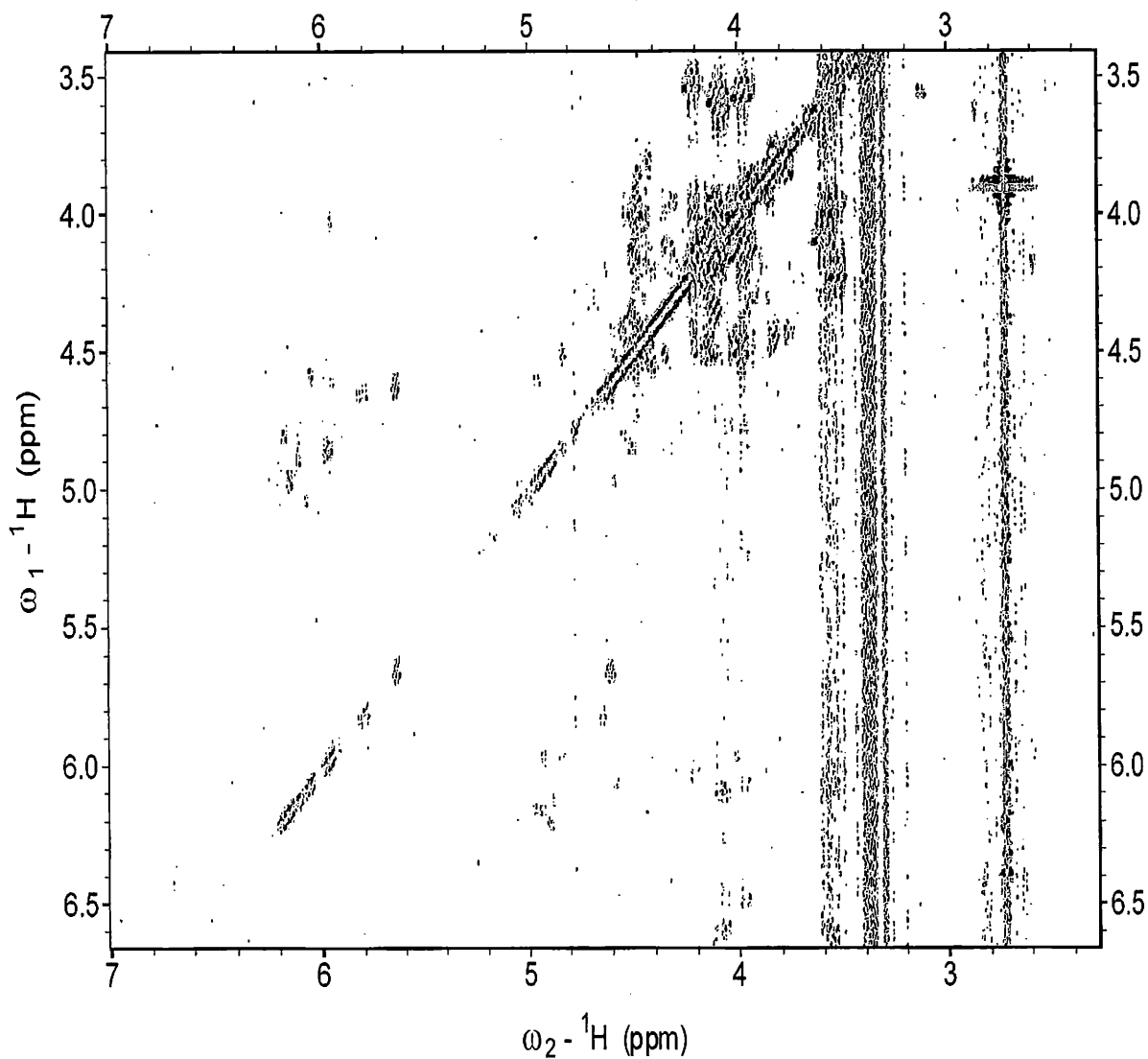
Ωστόσο η διαφορά έγκειται στην παρουσία νέων κορυφών στα ~ 8.80 ppm που εμφανίζεται μεν και στις πρώτες ώρες της θέρμανσης αλλά κυρίως γίνεται ιδιαίτερα σημαντικό μετά την αλλαγή της αναλογίας και μετά από αρκετές ώρες θέρμανσης. Αυτές οι νέες κορυφές είναι ενδεικτικές προϊόντων σύμπλεξης που αφορούν αδενίνη, ωστόσο ο τρόπος σύμπλεξης τους με το μέταλλο καθώς και η δομή τους δεν ήταν δυνατό να διερευνηθεί περαιτέρω, δεδομένων των δυσκολιών που έχει μια τέτοια μελέτη σε ένα τέτοιο μείγμα προϊόντων. Ένα πιθανό ενδεχόμενο το οποίο ενισχύεται από βιοφυσικές μελέτες⁵⁹ είναι πως πρόκειται και για προϊόν μονοσχιδούς σύμπλεξης. Η μονοσχιδής σύμπλεξη, ενώ έχει αποκλειστεί στις περιπτώσεις μελέτης με NMR της σύμπλεξης των συμπλόκων Ru με δινουκλεοτιδίων⁷¹ ωστόσο έχει αποδειχθεί σε μελέτες με τμήματα 221 bp. Με τις παρούσες συνθήκες, δεν μπορούμε να υποστηρίξουμε την μονοσχιδή σύμπλεξη.

Στο σχήμα 9.2 δίνεται η περιοχή του φάσματος στην περιοχή των πρωτονίων των σακχάρων, όπου μπορεί να γίνει σύγκριση με την αντίστοιχη χρονική εξέλιξη για την αντίδραση του τρινουκλεοτιδίου με το trans παράγωγο. Διαπιστώνονται ασφαλώς ομοιότητες που παραπέμπουν στα δυο προϊόντα, αλλά ασφαλώς το φάσμα είναι περισσότερο πολύπλοκο και δικαιολογεί την παρουσία τρίτου κύριου προϊόντος.



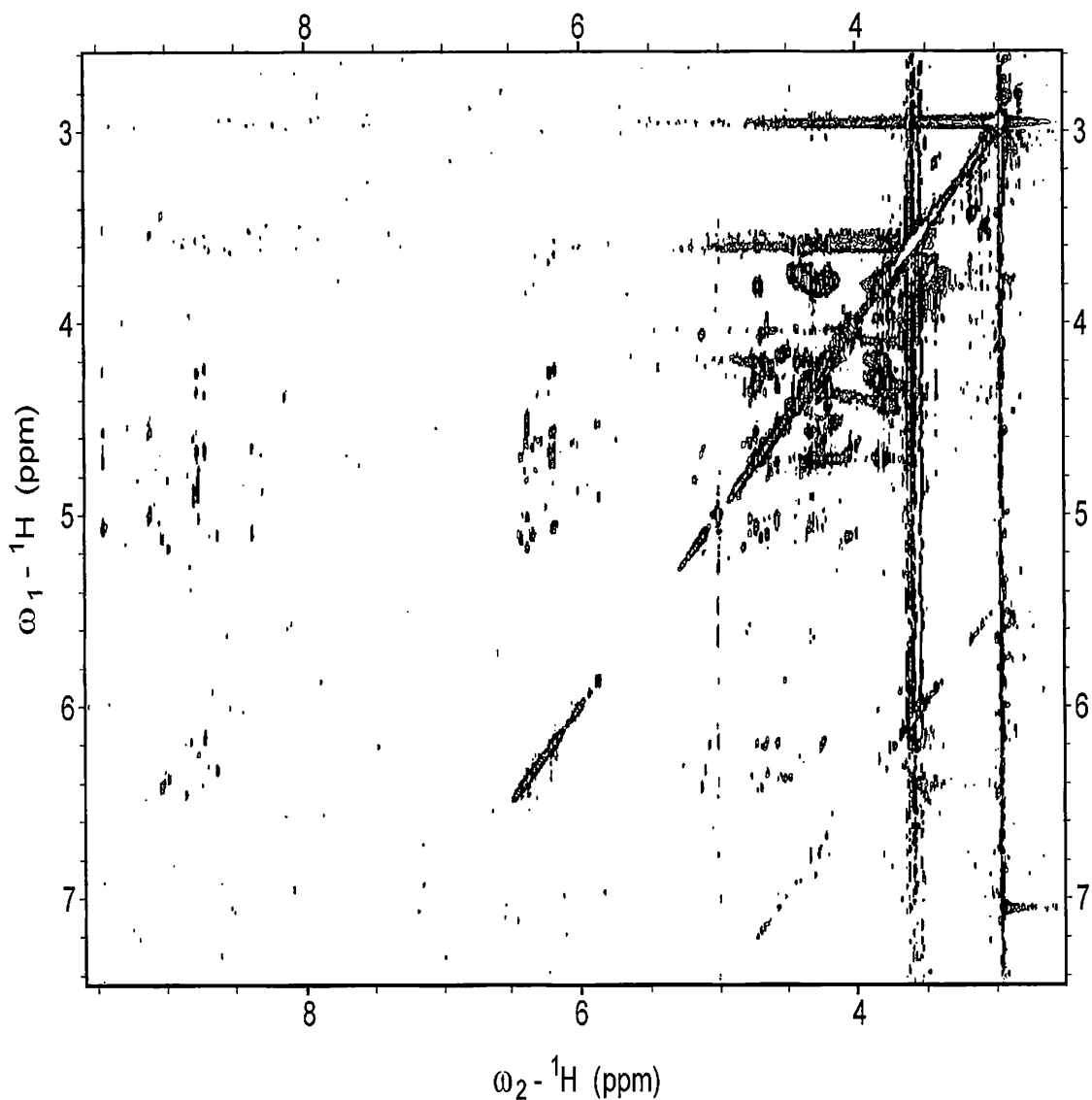
Σχήμα 9.2: Φάσματα ^1H NMR της περιοχής που εμφανίζονται τα $\text{H1}'$ των σακχάρων, κατά την εξέλιξη της αντίδρασης του ArGpA με το $\text{trans-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$. Αναγράφεται ο χρόνος θέρμανσης.

Προκειμένου να πιστοποιηθεί περαιτέρω η ομοιότητα των προϊόντων από το *trans* και το *cis* ισομερές με το τρινοκλεοτίδιο, ελήφθησαν φάσματα DQF-COSY και ROESY που δίνονται στα σχήματα 9.3 και 9.4. Τα φάσματα ελήφθησαν μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης και αφού είχε προηγηθεί η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας μετάλλου.



Σχήμα 9.3 : Φάσμα 2D DQF-COSY των προϊόντων της αντίδρασης μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης.

Τα 2D φάσματα δεν είναι ευκρινή, αφενός γιατί έχουμε την παρουσία περισσότερων των δυο κύριων προϊόντων αλλά παράλληλα και αρκετά παραπροϊόντα που οφείλονται στην παρατεταμένη θέρμανση αλλά και στην παρουσία περισσειας μετάλλου στο μείγμα της αντίδρασης.



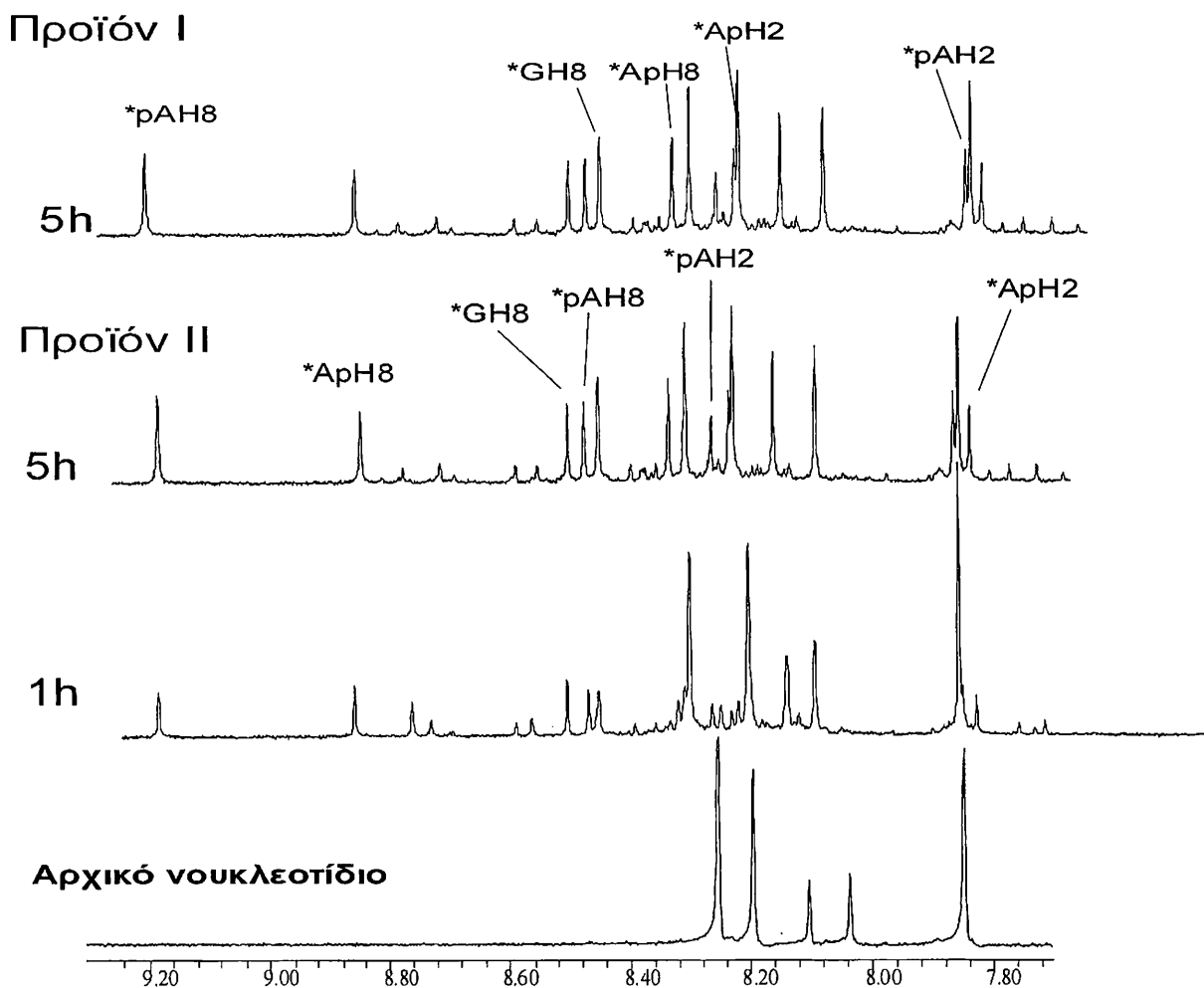
Σχήμα 9.3 : Φάσμα 2D ROESY το οποίο ελήφθη κατά τη θέρμανση του τρινουκλεοτιδίου ArGrA με το $\text{cis-RuCl}_2(\text{DMSO})_4$ σε D_2O 99.95%. Η λήψη του φάσματος έγινε μετά το τέλος της θέρμανσης στο μείγμα της αντίδρασης (ελεύθερο DMSO = 2.73 ppm).

Συμπερασματικά το *cis* ισομερές αλληλεπιδρά με το παραπάνω τρινουκλεοτίδιο στις ίδιες συνθήκες όπως και το *trans* ισομερές. Προϊόντα της αντίδρασης αρχίζουν να εμφανίζονται μετά τις 2 ώρες θέρμανσης. Φαίνεται ότι σχηματίζονται δυο κύρια προϊόντα, όμοια με αυτά του *trans* ισομερούς, γεγονός που μας επιτρέπει να συμπεράνουμε ότι αμφότερα τα ισομερή δίνουν τα ίδια προϊόντα. Ωστόσο αφού αλλάξαμε την στοιχειομετρία της αντίδρασης αυξήθηκαν και τα παραπροϊόντα, επομένως ήταν ιδιαίτερα δύσκολη η περισσότερο λεπτομερής αξιολόγηση της δομής των σχηματιζόμενων προϊόντων.

Κεφάλαιο X

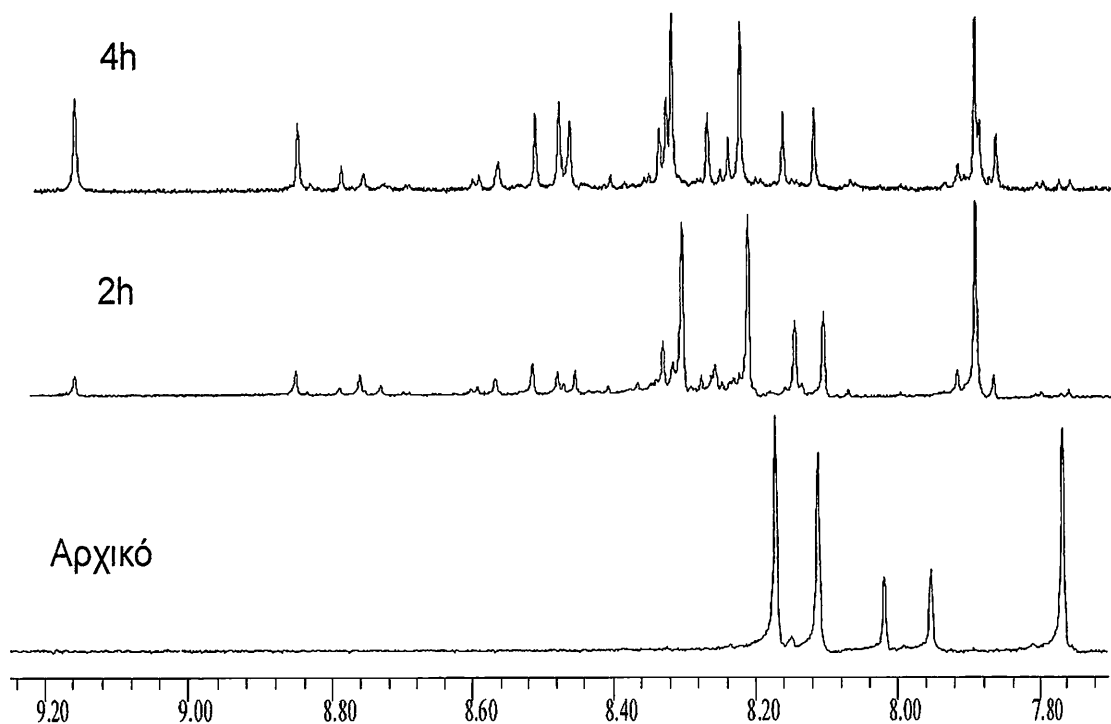
Συζήτηση

Όταν τα ισομερή σύμπλοκα *trans*- και *cis*-RuCl₂(DMSO)₄ αλληλεπιδρούν με το τρινοκλεοτίδιο ArGrA παρατηρείται ο σχηματισμός 2 κύριων προϊόντων στα οποία οι βάσεις συμπλεκονται μέσω του N7 και ορισμένων παραπροϊόντων. Σε κανένα από τα παραπάνω συστήματα δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κάποιου ενδιάμεσου προϊόντος σε σημαντικό ποσοστό, αντίθετα με την μελέτη για το d(GpG) σε παρόμοιες συνθήκες, όπου είχε παρατηρηθεί σχετικά μεγάλη ποσότητα ενός ενδιάμεσου το οποίο έδωσε τελικά το κύριο προϊόν. Στο σχήμα 9.1 δίνεται η χρονική εξέλιξη για το *trans* ισομερές όπου σημειώνονται τα αρωματικά πρωτόνια των δυο προϊόντων και μπορεί να διαπιστωθεί η απουσία κάποιου ενδιάμεσου προϊόντος.



Σχήμα 10.2 : Χρονική εξέλιξη στην αρωματική περιοχή για την αλληλεπίδραση του *trans*-ισομερούς. Παρατηρούμε ότι δεν σχηματίζεται κάποιο ενδιάμεσο προϊόν, αλλά τα δυο κύρια προϊόντα.

Παράλληλα στο σχήμα 10.2 δίνεται η χρονική εξέλιξη για το *cis* ισομερές όπου διακρίνονται οι ομοιότητες με τα προϊόντα του *trans* ισομερούς.



Σχήμα 10.3 : Χρονική εξέλιξη στην αρωματική περιοχή για την αλληλεπίδραση του *cis*-ισομερούς. Παρατηρούμε ότι δεν σχηματίζεται κάποιο ενδιάμεσο προϊόν, αλλά τα δυο κύρια προϊόντα τα οποία παρουσιάζονται όμοια με τα αντίστοιχα του *trans* ισομερούς

Για τα δυο προϊόντα παρατηρούνται μεγάλες μετατοπίσεις των αρωματικών πρωτονίων AH8 και GH8 σε μεγαλύτερες τιμές ppm(0.625-0.95). Οι μετατοπίσεις αυτές είναι χαρακτηριστικές της σύνδεσης των πουρινών μέσω του N7 σε ένα μεταλλικό κέντρο. Ανάλογες μετατοπίσεις έχουν παρατηρηθεί κατά την αλληλεπίδραση του *trans* ισομερούς με το d(GpG) (0.65-0.88ppm), καθώς και με το 5'dGMP, αλλά βεβαίως και με τα δινουκλεοτίδια ApG, GpA, d(ApG) και d(GpA), στα αποτελέσματα των οποίων βασιστήκαμε σε μεγάλο βαθμό για να αποδώσουμε με μεγαλύτερη σιγουριά τις μετατοπίσεις των κορυφών μας. Οι αντιδράσεις με το *cis*-ισομερές εξελίσσεται αρκετά πιο αργά σε σχέση με το *trans* και επίσης βρίσκεται σε συμφωνία με τα δεδομένα για τα δινουκλεοτίδια αδερίνης – γουανίνης.

Η παρατήρηση των σταθερών σύζευξης στους πίνακες , δείχνουν μια εν γένει ομοιότητα μεταξύ των προϊόντων της αντίδρασης. Στα προϊόντα I και II δεν παρατηρείται σταθερά σύζευξης μεταξύ των

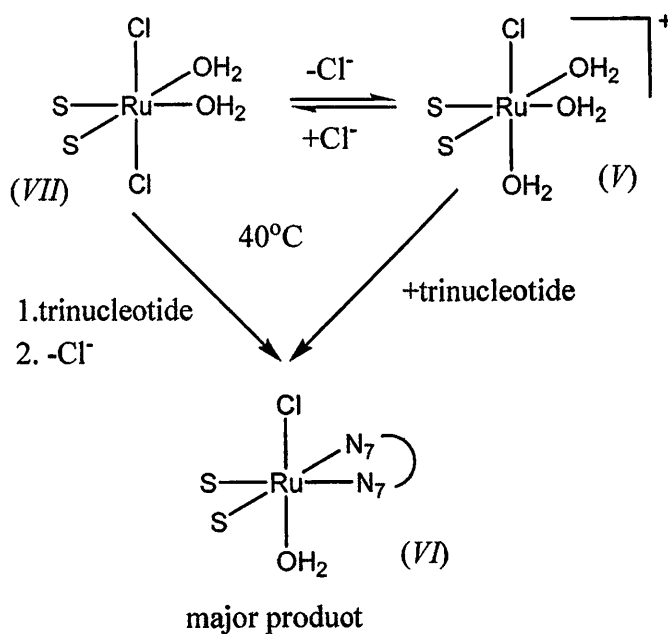
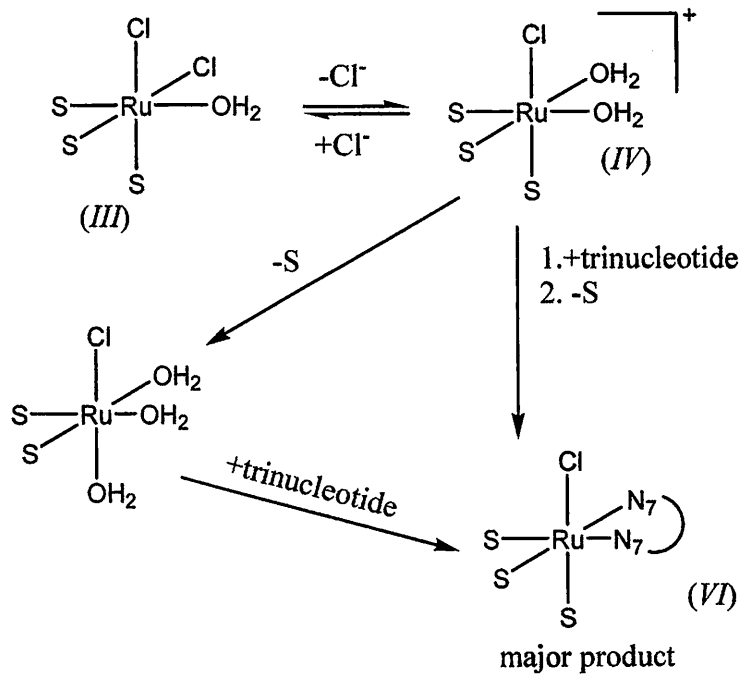
H1' και H2' για την αδενίνη και την γουανίνη αντίστοιχα, γεγονός που μας επιτρέπει να θεωρήσουμε ότι το αντίστοιχο σάκχαρο υιοθετεί μια ουσιαστικά καθαρή N-διαμόρφωση.

	Προϊόν Ι		Προϊόν ΙΙ	
	G	A	A	G
J _{1'2'}	8	7.8	8	8.5
J _{2'3'}	5.2	5.4	4.6	6.4
J _{3'4'}	9.2	1.8	9.6	3.3
J _{4'5'}	1.6	2	1.7	4.6
J _{4'5''}	2.5	3.5	2.9	1.6
J _{5'5''}	-13.1	-11.7	-13.3	-11.6

Πίνακας 10.1: Σταθερές σύζευξης (Hz) των πρωτονίων των σακχάρων του προϊόντος Ι της αλληλεπίδρασης του νουκλεοτιδίου ApGpA με το trans-RuCl₂(DMSO)₄.

Τα όμοια προϊόντα των δυο ισομερών θα μπορούσαν να δώσουν νέα στοιχεία για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης σε βιολογικά συστήματα. Τα δυο σύμπλοκα του ρουθηνίου, όταν διαλυτοποιούνται σε νερό, εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά. Το cis-Ru αμέσως απελευθερώνει το O-bonded DMSO και ακολουθεί η αργή αποδέσμευση του Cl⁻ και ολοκληρώνεται στις 3h στους 37^oC, ώστε τελικά να πάρουμε το κατιονικό παράγωγο IV. Αντίθετα το trans-Ru έχει διαφορετική συμπεριφορά, αφού αποδεσμεύει 2 μόρια DMSO αμέσως μετά την διάλυση του στο νερό σχηματίζοντας το ουδέτερο παράγωγο VII, που στη συνέχεια απελευθερώνει αργά ένα Cl⁻ ώστε να δώσει το κατιονικό παράγωγο V, με τρία μόρια νερού σε διαμόρφωση fac.

Παρά τις διαφορετικές δραστικές μορφές των δυο ισομερών και τα δυο δίνουν στο τέλος όμοια προϊόντα αν και παρατηρείται σημαντική διαφορά στην ταχύτητα της αντίδρασης. Επίσης σημαντικό είναι το γεγονός ότι δεν παρατηρείται ενδιάμεσο προϊόν ή αν σχηματίζεται έχει πολύ μικρό χρόνο ζωής και μετατρέπεται γρήγορα δίνοντας σύμπλοκα με δισχιδή σύμπλεξη. Η ομοιότητα των φασμάτων στα δυο ισομερή υποδηλώνει ότι το περιβάλλον σύμπλεξης είναι το ίδιο και στα δυο ισομερή και μπορεί να δικαιολογηθεί με την αποδέσμευση ενός δεύτερου μορίου DMSO από το παράγωγο (III) του cis ισομερούς, προς σχηματισμό του παραγώγου (VII), όπως και το trans ισομερές. Εναλλακτικά η αποδέσμευση DMSO έχει ήδη παρατηρηθεί ότι ευνοείται με την σύμπλεξη N-υποκαταστάτη στο μεταλλικό κέντρο⁶⁴. Αν η σύμπλεξη της πρώτης βάσης προηγείται της υδρόλυσης του DMSO τότε η ταχύτητα ελέγχεται από λόγους στερεοχημικής παρεμπόδισης καθώς το παράγωγο III έχει δυο θέσεις για σύμπλεξη σε αντίθεση με το παράγωγο VII του trans, που έχει τρεις. Στο σχήμα 9.3 δίνεται ο προτεινόμενος μηχανισμός αλληλεπίδρασης των δυο ισομερών συμπλόκων.



Σχήμα 10.4: Προτεινόμενος μηχανισμός αλληλεπίδρασης των ισομερών συμπλόκων με το τρινοικλεοτίδο ApGpA.

Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα στα οποία μπορούμε να καταλήξουμε, σε ότι αφορά την αλληλεπίδραση του τρινουκλεοτιδίου ApGrA με το cis και trans-RuCl₂(DMSO)₄, είναι τα ακόλουθα:

- Κατά την αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε η εμφάνιση δυο κύριων προϊόντων και αρκετών παραπροϊόντων. Το κυριότερο χαρακτηριστικό είναι το μικρό ποσοστό σχηματισμού προϊόντων, αφού μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης στις 24h, μόνο ένα ποσοστό ~60% από το αρχικό νουκλεοτίδιο έχει αντιδράσει με το σύμπλοκο.
- Τα δυο κύρια προϊόντα που εμφανίζονται, είναι προϊόντα δισχιδούς σύμπλεξης μεταξύ της κεντρικής γουανίνης και διαδοχικά της 5' και 3' αδενίνης, στις θέσεις N7. Δεν παρατηρήθηκε ωστόσο, ακόμα και στα πρώτα στάδια της αντίδρασης προϊόν μονοσχιδούς σύμπλεξης, αλλά όπως βλέπουμε στο σχήμα 9.1, τα προϊόντα δισχιδούς σύμπλεξης εμφανίζονται από την αρχή.
- Επίσης το κύριο προϊόν I, μοιάζει πάρα πολύ σε ότι αφορά την διαμόρφωση κατά την σύμπλεξη, με το προϊόν της αλληλεπίδρασης του δινουκλεοτιδίου GrA και d(GrA) με το σύμπλοκο του ρουθηνίου. Ωστόσο το προϊόν II της αντίδρασης, ενώ έχει αρκετές ομοιότητες με το προϊόν της αντίδρασης του συμπλόκου ρουθηνίου με το ApG, ωστόσο δεν είναι ακριβώς το ίδιο. Το trans-RuCl₂(DMSO)₄ είναι δυνατό να σχηματίζει σταυροδεσμούς στις βάσεις μιας αλυσίδας του DNA, όχι μόνο με δυο διαδοχικές γουανίνες αλλά και με τις αλληλουχίες GA και AG. Το ίδιο συμπέρασμα απορρέει και για το cis ισομερές
- Η διαφορά στον σχηματισμό των δυο προϊόντων κατά την αλληλεπίδραση εντοπίζεται στην ταχύτητα και το ποσοστό της αντίδρασης. Το προϊόν I σχηματίζεται σε λίγο μεγαλύτερο ποσοστό αλλά υπάρχουν αρκετές δομικές ομοιότητες αφού η διαμόρφωση των βάσεων κατά την σύμπλεξη και στα δυο προϊόντα είναι ίδια (κεφαλή-κεφαλή), ενώ και η διαμόρφωση στα σάκχαρα είναι παρόμοια.
- Σε σύγκριση με την χημική συμπεριφορά του cisplatin, επιβεβαιώνονται χαρακτηριστικές διαφορές. Καταρχήν η παρουσία μόνο δυο κύριων προϊόντων σε αντίθεση με το cisplatin όπου παρατηρούνται περισσότερα. Η μεγαλύτερη εκλεκτικότητα που παρατηρείται στην αλληλεπίδραση με το τρινουκλεοτίδιο επιβεβαιώνει την διαφοροποίηση και ενισχύει την υπόθεση για ποιοτικά διαφορετικό μηχανισμό δράσης. Ωστόσο η μεγαλύτερη

διαφοροποίηση έγκειται στο γεγονός ότι στην περίπτωση του συμπλόκου του ρουθηνίου, υπάρχει μια μεγαλύτερη προτίμηση για αλληλεπίδραση με την αδείνη που βρίσκεται προς το 3'-ακρο του νουκλεοτιδίου σε σύγκριση με εκείνη του 5'-άκρου. Δεν ήταν δυνατό να εξακριβώσουμε την παρουσία κάποιου δεσμού υδρογόνου που να ερμηνεύει αυτήν την προτίμηση, ωστόσο είναι ένα συμπέρασμα που μπορεί να κατευθύνει την σύνθεση νέων αντικαρκινικών ενώσεων του ρουθηνίου που να μπορούν να αλληλεπιδρούν εξειδικευμένα με το DNA και να προκαλούν συγκεκριμένη αλλαγή στην διαμόρφωση κατά τον σχηματισμό ενώσεων με αυτό.

- Σε σύγκριση με το cis ισομερές, η διαφορά στον τρόπο αλληλεπίδρασης εντοπίζεται στην ταχύτητα και το ποσοστό της αντίδρασης. Η διαφορά στην ταχύτητα της αντίδρασης συμφωνεί με την διαφορά στην δραστηριότητα και την τοξικότητα των συμπλόκων. Επομένως η αυξημένη δραστηριότητα του trans ισομερούς, πιθανόν να οφείλεται στην μικρότερη στερεοχημική παρεμπόδιση γύρω από το μέταλλο σε σχέση με το cis.

Βιβλιογραφία

- ¹ Orvig, C, Abrams M.J., *Chemical Reviews*, **1999**, 99, 2202-2203
- ² Sadler P.J. *J. Adv. Inorg. Chem.* **1991**, 36, 1-48
- ³ Bertrand, G., *8th Int. Conf. Appl. Chem.* **1912**, 28, 30
- ⁴ Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature* **1965**, 205, 698.
- ⁵ Weiss, R. B.; Christian, M. C. *Drugs* **1993**, 46, 360.
- ⁶ Lebwohl, D.; Canetta, R. *Eur. J. Cancer* **1998**, 34, 1522.
- ⁷ Reedijk, J. *Chem. Commun.* **1996**, 801
- ⁸ Lebwohl, D.; Canetta, R. *Eur. J. Cancer* **1998**, 34, 1522.
- ⁹ Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D. *Plat. Met. Rev.* **1973**, 17, 3, Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D. *Bioinorg. Chem.* **1973**, 2, 187
- ¹⁰ Giandomenico, C. M.; Abrams, M. J.; Murrer, B. A.; Vollano, J.F.; Barnard, C. F. J.; Harrap, K. R.; Goddard, P. M.; Kelland, L. R.; Morgan, S. E. In *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*; Howell, S. B., Ed.; Plenum Press: New York, 1991; p 93, Orr, R. M.; G'Neill, C. F.; Nicolson, M. C.; Barnard, C. F. J.; Murrer, B. A.; Giandomenico, C. M.; J Vollano, F. K.; Harrap, R. *Br. J. Cancer* **1994**, 70, 415, Harrap, K. R.; Murrer, B. A.; Giandomenico, C. M.; Morgan, S.E.; Kelland, L. R.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Schurig, J. In *Platinum and other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*; Howell, S. B., Ed.; Plenum Press: New York, 1991; p 391.
- ¹¹ Dalbies, R.; Payet, D.; Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci* **1994**, 91, 8147
- ¹² Giuliani, F. C.; Beggolin, G.; Piazzoni, L.; Formento, M. L.; Di Blasi, P.; Farrell, N.; Kelland, L. R.; Caserini, C.; Perego, P.; Supino, R.; Zunino, F. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* **1997**, 38, 310. Qu, Y.; Farrell, N.; Kasparkova, J.; Brabeo, V. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, 67, 174.; Di Blasi, P.; Bernareggi, A.; Beggolin, G.; Piazzoni, L.; Menta, E.; Formento, M. L. *Anticancer Res.* **1998**, 18, 3113.
- ¹³ T. Pieper, K. Borsky, B.K. Keppler, *Top. Bioinorg. Chem.* **1(1999)** 171.
- ¹⁴ M. Hartmann, B.K. Kepler, *Comm. Inorg. Chem.* **1995**, 16 339; N. Farrell, *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents*, Kluwer Academic, Boston, **1989**; B.K. Keppler, *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, Weinheim, Germany, **1993**; M.J. Clarke, *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, **1989**; M.J. Clarke, S. Limauro, in: G. Berthon (Ed.), *Handbook on Metal_Ligand Interactions in Biological Fluids*, Marcel Dekker, New York, **1995**, pp. 1010-1018; M.J. Clarke, M. Stubbs, *Met. Ions Biol. Syst.* **1996**, 32, 727; M.J. Clarke, in: S.J. Isied (Ed.), *Electron Transfer Reactions*, American Chemical Society Symposium Series, Washington, D.C., **1997**, pp. 349-365; H. Ali, J.E. van Lier, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2379; J.M. Kelly, C.-M. Moucheron, A. Kirsoh-De Mesmaeker, *Struct. Bond.* **1999**, 92, 163.
- ¹⁵ M.J. Clarke, F. Zhu, D. Frasca, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2511; A.D. Kelman, M.J. Clarke, S.D. Edmonds, H.J. Peresie, *J. Clin. Hematol. Oncol.* **1977**, 7, 274; M.J. Clarke, in: B.K. Keppler (Ed.), *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, VCH, Weinheim, **1993**, pp. 129-157.
- ¹⁶ B.D. Palmer, W.R. Wilson, S.M. Pullen, *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 112; G.K. Snyder, *J. Appl. Physiol.* **1988**, 65, 2332; R.G. Steen, *Am. J. Roentgenol.* **1999**, 157, 243; P. Okunieff, E.P. Dunphy, P. Vaupel, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1994**, 345, 485; J.E. Blskupiak, K.A. Krohn, *J. Nucl. Med.* **1993**, 411.
- ¹⁷ J. Michl, J.A. Gladysz, K.L. Rowlen M.J. Clarke, S. Bitler, D. Rennert, M. Buchbinder, A.D. Kelman, *J. Inorg. Biochem.* **1980**, 12, 79.
- ¹⁸ Cummings, J; Aird, R.E; Chen, H; Murdoch, P; Sadler, P; Jodrell, D; *Clin. Can. Res.* **2000**, 6, 142
- ¹⁹ Aird, R; Cummings, J; Morris, R; Sadler, P; Jodrell, D; *Br. J. Cancer*, **2001**, 85, 101
- ²⁰ Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature* **1965**, 205, 698
- ²¹ Fichtinger-Schepman, A. M. J.; van der Veer, J. L.; den Hartog, J. H. J.; Lohman, P. H. M.; Reedijk, J. *Biochemistry* **1985**, 24, 707-713.
- ²² Sherman, S. E.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1153-1181.

- ²³ Takahara, P. M.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12309-12321.
- ²⁴ Brabec, V. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **2002**, *71*, 2
- ²⁵ Burnouf, D.; Daune, M.; Fuchs, R.P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 3758
- ²⁶ Lemaire, M.A.; Schwartz, A.; Rahmouni, A.R.; Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 1982; Brabec, V.; Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 5345
- ²⁷ Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L. C.; Covillo, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. *Science* **1994**, *266*, 2011-2015; Bednarek, A.; Budunova, I.; Slaga, T. J.; Aldaz, C. M. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4566-4569; Chadeneau, C.; Hay, K.; Hirte, H. W.; Gallinger, S.; Bacchetti, S. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2533-2536.
- ²⁸ Sorenson, C. M.; Barry, M. A.; Eastman, A. J. *Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 749-755.
- ²⁹ Chu, G. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 787-790.
- ³⁰ Fink, D.; Nebel, S.; Aebi, S.; Howell, S.B. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4881
- ³¹ Giraldi, T.; Sava, G.; Mestroni, G.; Zassinovich, G. *Cancer Res.* **1977**, *37*, 2662
- ³² Mestroni, G.; Alessio, A.; Calligaris, M.; Attia, W.M.; Quadrifoglio, F.; Cauci, S.; Sava, G.; Pacor, S.; Tamaro, M.; Dolzani, L. *Progress in Clinical Biochemistry and Medicine*, **1989**, *10*, 72
- ³³ Sava, G.; Zorzet, S.; Mestroni, G.; Zassinovich, G. *Cancer Res.* **1977**, *37*, 2662; Sava, G.; Zorzet, S.; Mestroni, G.; Zassinovich, G. *Chem. Biol. Interact.*, **1983**, *45*, 1
- ³⁴ Sava, G.; Zorzet, S.; Mestroni, G.; Zassinovich, G. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **1984**, *20*, 841
- ³⁵ Evans, I.P.; Spencer, A.; Wilkinson, G. *J. Chem. Soc. Dalton*, **1973**, 204; Mercer, A.; Trotter, J.; *J. Chem. Soc. Dalton*, **1975**, 2480; Bora, T.; Singh, M.M. *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **1975**, *38*, 1815
- ³⁶ Alesio, E.; Mestroni, G.; Nardin, G.; Calligaris, M.; Sava, G.; Zorzet, S. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 4099
- ³⁷ Alesio, E.; Mestroni, G.; Sava, G.; Pacor, S.; Colluioia, M. *Metal complexes in Cancer Chemotherapy*, Keppler B.K(ed) Weinheim, VCH, **1993**, pp159-185
- ³⁸ Sava, G.; Zorzet, S.; Giraldi, T.; Mestroni, G.; Zassinovich, G. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1984**, *20*, 841
- ³⁹ Sava, G.; Zorzet, S.; Giraldi, T.; Mestroni, G.; Zassinovich, G. *Chem. Biol. Interact.* **1983**, *45*, 1
- ⁴⁰ Cauci, S.; Alessio, E.; Mestroni, G.; Quadrifoglio, F. *Inorg. Chim. Acta*, **1987**, *137*, 19
- ⁴¹ Dickerson, R.E.; Drew, H.R.; Conner, B.N.; Wing, R.M.; Kopka, M.L. *Scienca*, **1982**, *216*, 475
- ⁴² Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1969**, *33*, 1842
- ⁴³ Howe, P.J. *Nuclear Magnetic Resonance*, OCP, Oxford University Press, **1978**
- ⁴⁴ Friebolin, H. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, 2nd Edition, VCH, **1993**
- ⁴⁵ Sanders, J.K.; Hunter, B.K. *Modern NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, NY, 2nd Edition, **1997**
- ⁴⁶ Davies, D.B. *Progress in NMR spectroscopy*, **1978**, *12*, 135
- ⁴⁷ Altona, C. *Recl. Trav. Chim. Rays-Bas*, **1982**, *101*, 413; Hruska, F.E. *Conformations of Biological Molecules and Polymers*, Academic Press, **1973**, pp345
- ⁴⁸ Schleich, T.; Smith, B.J. *Biochemistry*, **1972**, *11*, 137; Sarma, R.H.; Mynott, R.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1641; Hall, L.D.; Steiner, R.J.; Pederson, C. *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 1155; Petzold, D.R.; Swartz, D. *Stud. Biophys.* **1976**, *55*, 93; Rinkel, L.J.; Altona, C., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1987**, *4*, 621
- ⁴⁹ Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205; Davies, D.B.; Danyluk, S.S. *Biochemistry*. **1974**, *13*, 4417; Hart, P.A.; Davies, J.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *93*, 753
- ⁵⁰ Davies, D.B. *Prog. NMR Spectrosc.* **1978**, *12*, 135; Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2333; Dhingra, M.M.; Sharma, R.H. *Sterodynamics of Molecular systems*, Pergamon, NY, **1979**, pp 3-38
- ⁵¹ Davies, D.B. *Prog. NMR Spectrosc.* **1978**, *12*, 135; Haschemeyer, A.E.V.; Rich, A. *J. Mol. Biol.*, **1967**, *27*, 369
- ⁵² Donbue, J.; Trueblood, K.N.; *J. Mol. Biol.*, **1960**, *2*, 263; Borfield, M.; Spear, R.J.; Sterneill, S. *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 5322
- ⁵³ Sundaralingam, M., *Blopolymers*, **1969**, *7*, 821; Sundaralingam, M., in *Conformations of Biological Molecules and Polymers*, Eds Bergmann, Academic Press, NY, **1973**, p 417
- ⁵⁴ Duck, D.; Saenger, W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 6520; Rao, S.T.; Sundaralingam, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 4963

-
- ⁵⁵ Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2333 ; Rinkel, L.J.; Altona, C., *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1987**, *4*, 621
- ⁵⁶ Cahchaty, C.; Zemb, T.; Langlet, G.; Moragne, M., *Eur. J. Biochem.*, **1976**, *62*, 45
- ⁵⁷ Akasaka, K.; Imoto, T.; Shibato, S., Hatna, H., *J. Magn. Reson.*, **1975**, *18*, 328
- ⁵⁸ Sherman, S. E.; Gibson, D.; Wang, A. H.-J.; Lippard, S. J. *Science* **1985**, *230*, 412-417. (76)
- Sherman, S. E.; Gibson, D.; Wang, A. H.-J.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7368-7381. **1993**, *32*, 841-848.
- ⁵⁹ Novakova O.; Hofr C.; Brabec V.; *Biochemical Pharmacology*, v.60, **2000**, 1761-1771
- ⁶⁰ Esposito, G.; Cauci, S.; Fogolari, F.; Alessio, E.; Vigiino., *Biochemistry*, **31**, 7094-7103
- ⁶¹ Anagnostopoulou A.; Morhdheim, E.; Katsaros, N.; Sletten, E., *JBIC*, v. , 2000,
- ⁶² Evans, I.P.; Spencer, A. Wilkinson, G., *J. Chem. Soc. Dalton*, **1973**, 204
- ⁶³ Richardson, J.M.; Titman, J.J.; Keeler, J., *J. Magn. Reson.*, **1991**, *93*, 533
- ⁶⁴ Anagnostopoulou, A., Mordheim, E., Katsaros, N., Sletten, E., *J. Biol. Inorg. Chem*, **1999**, *4*, 199-208
- ⁶⁵ Dhingra, M.M., Sangra, R.H; *Stereodynamics of Molecular Systems* , Pergamon, NY, **1979**, pp 3-38
- ⁶⁶ Kozelka, J.; Fouchet, M.; Chottard, J.C., *Eur. J. Biochem*, **205**, **1992**, 895-906
- ⁶⁷ Esposito, G., Cauci, S., Alessio, E., Socchi, M.; Vigiino, P.; *Biochemistry*, **31**, **1992**, 7094-7103
- ⁶⁸ Alessio, E.; Xu, Y.; Cauoi, S.; Mestroni, G.; Giordano, G.; Marzilli, L.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, **111**, 7068-
- ⁶⁹ Esposito, G.; Cauci, S.; Fogolari, F.; Alessio, E.; Viglino., *Biochemistry*, **31**, 7094-7107
- ⁷⁰ Cauci, S., Alessio, E., Socchi, M.; Vigiino, P.; *Biochemistry*, **31**, **1992**, 7094-7103