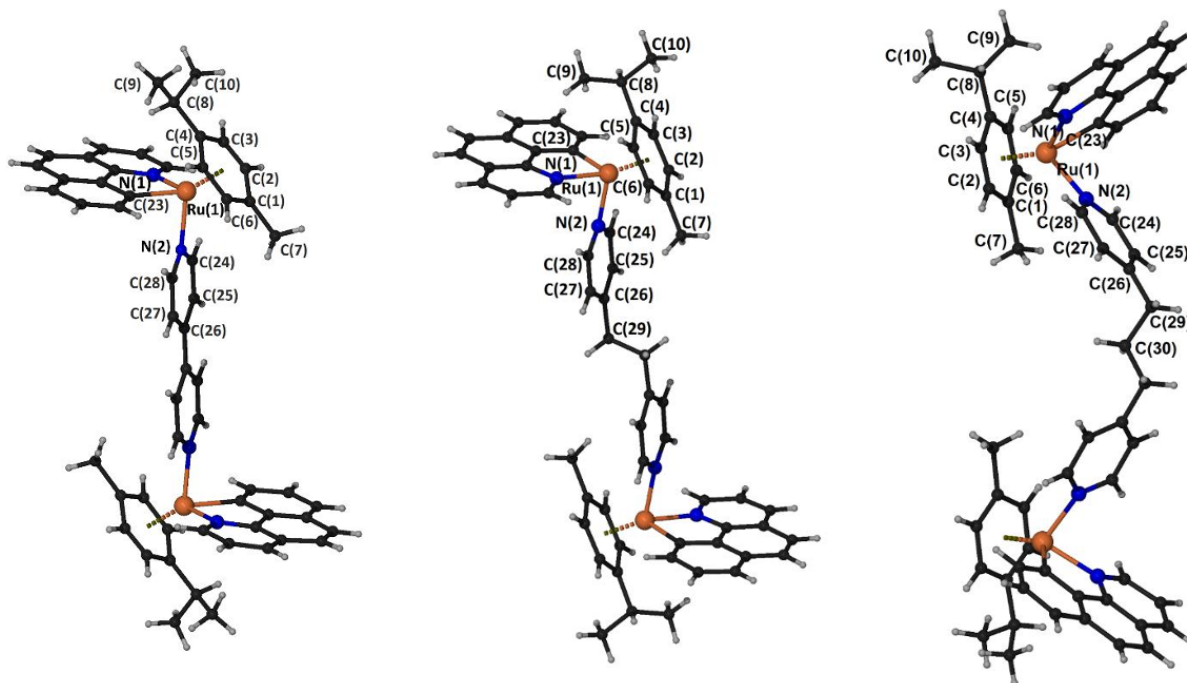




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σύνθεση, χαρακτηρισμός και μελέτη της βιολογικής  
δραστηρότητας πολυπυρηνικών οργανομεταλλικών συμπλόκων  
του ρουθηνίου



Θώμος Δημήτριος  
Χημικός, MSc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

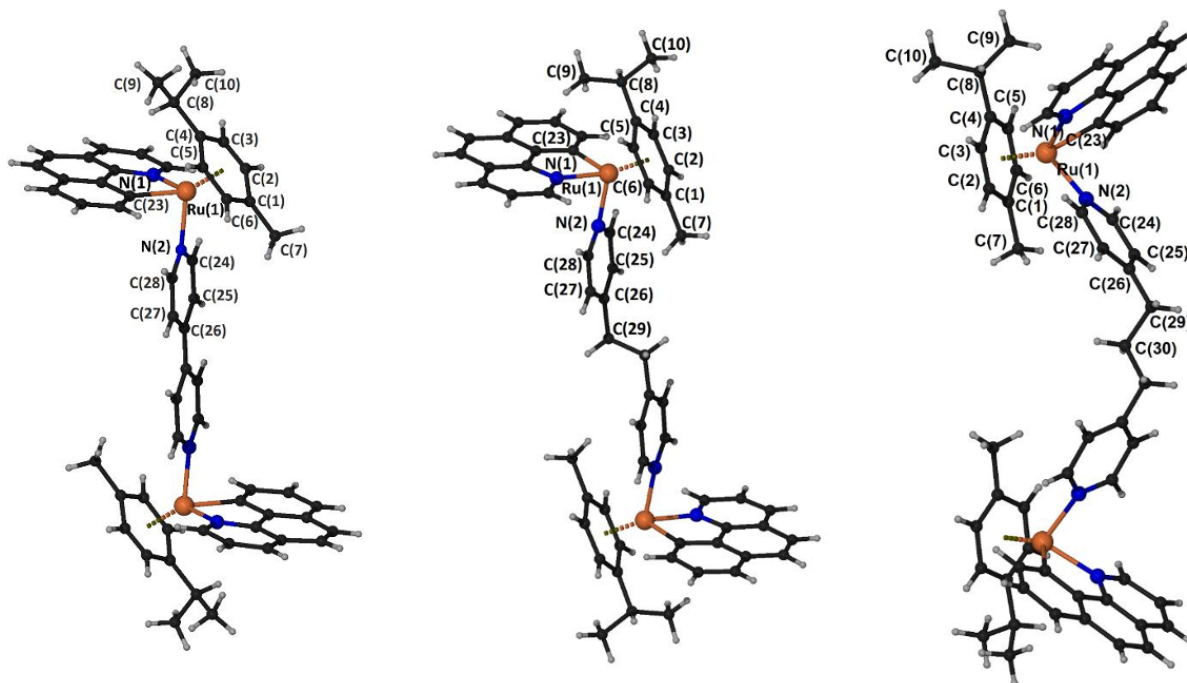
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

# Σύνθεση, χαρακτηρισμός και μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας πολυπυρηνικών οργανομεταλλικών συμπλόκων του ρουθηνίου



Θώμος Δημήτριος  
Χημικός, MSc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026



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



## **Πρόλογος:**

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τη χρονική περίοδο Μάρτιος 2022 - Απρίλιος 2026. Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθρων τον επιβλέποντά μου, καθηγητή κ. Αχιλλέα Γαρούφη, για την υποστήριξη και την κατανόησή του όλα αυτά τα χρόνια. Η καθοδήγησή του, από όταν ξεκίνησα την πτυχιακή μου υπό την επίβλεψή του, μέχρι και σήμερα ήταν κομβικής σημασίας σε όλη μου την πορεία.

Ακολούθως, ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον καθηγητή κ. Γεράσιμο Μαλανδρίνο και τον καθηγητή κ. Ιωάννη Πλακατούρα, για την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχαν και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους οι οποίες με βοήθησαν στην ουσιαστική βελτίωση της διατριβής μου.

Ειδική αναφορά θα ήθελα να κάνω στους συναδέλφους και φίλους μου από το εργαστήριο του καθηγητή κ. Αχιλλέα Γαρούφη. Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Κωνσταντίνο Υψηλάντη και Δρ. Θοδωρή Τσώλη για τη βοήθειά τους και την καθοδήγησή τους σε στιγμές που χρειάστηκε. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες και συναδέλφους μου Δρ. Αντωνία Γαρυπίδου και υποψήφια διδάκτωρ Ευαγγελία Σιφναίου με τις οποίες είχαμε άψογη συνεργασία και σε δύσκολες στιγμές αποτέλεσαν στήριγμα για εμένα στην προσπάθεια αυτή.

Ακόμη ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στους υπόλοιπους συναδέλφους του τομέα Ανόργανης Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με τους οποίους είχαμε μία άψογη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια με πνεύμα συνεργατικότητας και αλληλοκατανόησης. Ειδικότερα θέλω να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Νικόλα Αναστασιάδη και Δημήτριο Γλυκό, και την Δρ. Δήμητρα Κυριάκου.

Θα ήθελα, επιπλέον, να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στο Κέντρο NMR, τη Μονάδα Περίθλασης Ακτίνων-Χ (XRD Μονοκρυστάλλου) και τη Μονάδα Περιβαλλοντικής, Βιολογικής και Βιοχημικής Ανάλυσης υψηλής ανάλυσης ORBITRAP-LC-MS του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την παροχή πρόσβασης στις εγκαταστάσεις. Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής, κα. Αγγελική Μαγκλάρια και την ερευνητική της ομάδα για την εξαιρετική συνεργασία μας.

Συνεχίζοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, εκτός του πανεπιστημιακού χώρου, οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου, όσο μακριά και να ήμασταν ο ένας από τον άλλο.

Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τον πατέρα, την μητέρα και τον αδερφό μου για την αμέριστη αγάπη, υποστήριξη και ενθάρρυνσή τους στο εγχείρημά μου αυτό. Από την αρχή ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα δίνοντας νόημα στη λέξη οικογένεια.

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον άνθρωπό μου, τη σύζυγό μου (πλέον) Αθανασία Ντρούλια η οποία ήταν ο άνθρωπος που με ώθησε, δείχνοντάς μου την ειλικρινή της στήριξη, να ξεκινήσω την παρούσα διατριβή και ήταν εκεί για εμένα σε κάθε βήμα αυτής της δύσκολης πορείας, πιστεύοντας σε εμένα ακόμη και σε στιγμές που ούτε εγώ ο ίδιος δεν πίστευα. Της οφείλω τα πάντα.



### **Σκοπός:**

Αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός διπυρηνικών και μονοπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II) με αρένια και ολιγοπυριδινικούς υποκαταστάτες με κορεσμένη σφαίρα ένταξης, καθώς επίσης και η μελέτη της βιολογικής τους δραστηριότητας.

Αρχικά, στόχος της εργασίας είναι σύνθεση διπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II) με αρένια και ολιγοπυριδινικούς υποκαταστάτες με κορεσμένη σφαίρα ένταξης με διαφορετικούς γεφυρωτικούς υποκαταστάτες (BL), οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μήκος και την ευκαμψία τους, προσδίδοντας έτσι διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά στα σύμπλοκα. Ακόμη τα σύμπλοκα που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν διαφέρουν μεταξύ τους και ως προς το συνολικό φορτίο. Για λόγους σύγκρισης έγινε η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός και των μονοπυρηνικών αναλόγων τους. Τα δομικά χαρακτηριστικά των παραπάνω συμπλόκων μελετήθηκαν με διάφορες τεχνικές.

Ακολούθως, η παρούσα εργασία στοχεύει στη μελέτη του τρόπου αλληλεπίδρασης των συμπλόκων αυτών με μοντέλα DNA μέσω διαφόρων τεχνικών. Σκοπός είναι να συσχετιστούν τα δομικά τους χαρακτηριστικά (μήκος και ευκαμψία BL, φορτίο, χηλικός υποκαταστάτης) με την ισχύ αλλά και τους τρόπους δέσμευσης, σε σύγκριση και με τα μονοπυρηνικά ανάλογά τους. Ακόμη, μέσω των μελετών αυτών θα διευκρινιστεί η ύπαρξη πιθανής «προτίμησης» ως προς την αλληλουχία και των είδος των βάσεων του DNA. Τέλος, σκοπός είναι η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των συμπλόκων, έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών, η σύγκρισή τους με γνωστά κυτταροτοξικά σύμπλοκα της βιβλιογραφίας και ο έλεγχος της ύπαρξης πιθανής εκλεκτικότητας ως προς τα καρκινικά έναντι των υγιών κυττάρων.



## Πίνακας περιεχομένων:

Πρόλογος.....	I
Σκοπός.....	III
Περίληψη.....	IX
Abstract.....	XI
Συντομογραφίες (Abbreviation).....	XIII
<b>Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή.....</b>	<b>1</b>
1.1. Σύμπλοκες ενώσεις μετάλλων οι οποίες αλληλεπιδρούν ομοιοπολικά με το DNA σχηματίζοντας προϊόντα προσθήκης.....	3
1.2. Μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το DNA.....	13
1.2.1. Σύμπλοκα μετάλλων της 1 <sup>ης</sup> σειράς των στοιχείων μετάπτωσης που αλληλεπιδρούν μη ομοιοπολικά με το DNA.....	17
1.2.2. Σύμπλοκα του ρηνίου, του οσμίου και του ιριδίου.....	22
1.2.3. Σύμπλοκα του παλλαδίου και του λευκοχρύσου.....	24
1.2.4. Σύμπλοκα του ρουθηνίου.....	25
1.2.4.1. Οκταεδρικά σύμπλοκα του Ru(II) με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες.....	25
1.2.4.2. Σύμπλοκα Ru(II) με αρένια.....	27
1.3. Αλληλεπίδραση με το DNA και FBA.....	29
1.3.1. Οργανικά διλειτουργικά μόρια.....	30
1.3.2. Πολυπυρηνικά διλειτουργικά σύμπλοκα.....	33
1.3.2.1. Πολυπυρηνικά διλειτουργικά σύμπλοκα που δρουν μη-ομοιοπολικά.....	34
<b>Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: Πειραματικό Μέρος.....</b>	<b>40</b>
2.1. Αντιδραστήρια.....	42
2.2. Οργανολογία & μέθοδοι.....	42
2.2.1. Φασματοσκοπία NMR.....	42
2.2.2. Φασματομετρία μάζας.....	43
2.2.3. Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ μονοκρυστάλλου.....	43
2.2.4. Φασματοσκοπία φθορισμού.....	44
2.4. Υπολογισμός σταθερών πρόσδεσης.....	45
2.5. Απόδοση των σημάτων NMR στα ελεύθερα ολιγονουκλεοτίδια.....	45
2.6. Σύνθεση πρόδρομων συμπλόκων του Ru(II).....	46
2.6.1. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου [(cym)Ru(μ-Cl)Cl] <sub>2</sub> (Π1).....	46
2.6.2. Σύνθεση του συμπλόκου [(cym)Ru(phen)Cl]PF <sub>6</sub> (Π2).....	46
2.6.3. Σύνθεση του συμπλόκου [(cym)Ru(ppg)Cl] (Π3).....	47
2.6.4. Σύνθεση του συμπλόκου [(cym)Ru(bzq)Cl] (Π4).....	47
2.7. Σύνθεση υποκαταστατών.....	48
2.7.1. Σύνθεση του 1,4-βενζυλ-διβορονικού πινακολικού εστέρα.....	48
2.7.2. Σύνθεση του 4,4'-διφαινυλο-διβορονικού πινακολικού εστέρα.....	48

2.7.3. Σύνθεση του 1,4-δισ(4-πυριδυλο)βενζόλιο (dprbz).....	48
2.7.4. Σύνθεση του 4,4'-δισ(4-πυριδυλο)-1,1'-διφαινύλιο (dprbph).....	49
2.8. Σύνθεση συμπλόκων του Ru(II).....	49
2.8.1. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{ppy})]_2(\mu\text{-BL1})\}(\text{PF}_6)_2$ , (1).....	49
2.8.2. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{ppy})]_2(\mu\text{-BL2})\}(\text{PF}_6)_2$ , (2).....	49
2.8.3. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{ppy})]_2(\mu\text{-BL3})\}(\text{PF}_6)_2$ , (3).....	50
2.8.4. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{ppy})]_2(\mu\text{-BL4})\}(\text{PF}_6)_2$ , (4).....	50
2.8.5. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})]_2(\mu\text{-BL1})\}(\text{PF}_6)_2$ , (5).....	50
2.8.6. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})]_2(\mu\text{-BL2})\}(\text{PF}_6)_2$ , (6).....	51
2.8.7. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})]_2(\mu\text{-BL3})\}(\text{PF}_6)_2$ , (7).....	51
2.8.8. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})]_2(\mu\text{-BL4})\}(\text{PF}_6)_2$ , (8).....	51
2.8.9. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})][(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})](\mu\text{-BL1})\}(\text{PF}_6)_3$ , (9).....	52
2.8.10. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})][(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})](\mu\text{-BL2})\}(\text{PF}_6)_3$ , (10).....	52
2.8.11. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})][(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})](\mu\text{-BL3})\}(\text{PF}_6)_3$ , (11).....	53
2.8.12. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})]_2(\mu\text{-BL4})\}(\text{PF}_6)_4$ , (12).....	53
2.8.13. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})]_2(\mu\text{-BL5})\}\text{Cl}_4$ , (13).....	54
2.8.14. Σύνθεση του μονομερούς συμπλόκου $[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})(4,4'\text{-bpy})](\text{PF}_6)_2$ , (14).....	54
2.8.15. Σύνθεση του μονομερούς συμπλόκου $[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})(\text{bpe})](\text{PF}_6)_2$ , (15).....	55
2.8.16. Σύνθεση του μονομερούς συμπλόκου $[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})(\text{bpp})](\text{PF}_6)_2$ , (16).....	55
<b>Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση</b> .....	57
3.1. Σύνθεση υποκαταστατών και συμπλόκων.....	59
3.1.1. Σύνθεση υποκαταστών.....	59
3.1.2. Σύνθεση των συμπλόκων του Ru(II).....	60
3.1.2.1. Σύνθεση των διπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II) με φορτίο 2+.....	61
3.1.2.2. Σύνθεση διπυρηνικών συμπλόκων φορτίου 3+.....	61
3.1.2.3. Σύνθεση διπυρηνικών συμπλόκων φορτίου 4+.....	62
3.2. Μελέτη των συμπλόκων του Ru(II) (1) - (16) με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού <sup>1</sup> H NMR.....	64
3.2.1. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{ppy})]_2(\mu\text{-BL1})\}(\text{PF}_6)_2$ , (1).....	64
3.2.2. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{ppy})]_2(\mu\text{-BL2})\}(\text{PF}_6)_2$ , (2).....	66
3.2.3. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{ppy})]_2(\mu\text{-BL3})\}(\text{PF}_6)_2$ , (3).....	68
3.2.4. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{ppy})]_2(\mu\text{-BL4})\}(\text{PF}_6)_2$ , (4).....	69
3.2.5. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})]_2(\mu\text{-BL1})\}(\text{PF}_6)_2$ , (5).....	71
3.2.6. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})]_2(\mu\text{-BL2})\}(\text{PF}_6)_2$ , (6).....	73
3.2.7. Χαρακτηρισμός με <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})]_2(\mu\text{-BL3})\}(\text{PF}_6)_2$ , (7).....	74
3.2.8. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup> H NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})]_2(\mu\text{-BL4})\}(\text{PF}_6)_2$ , (8).....	76

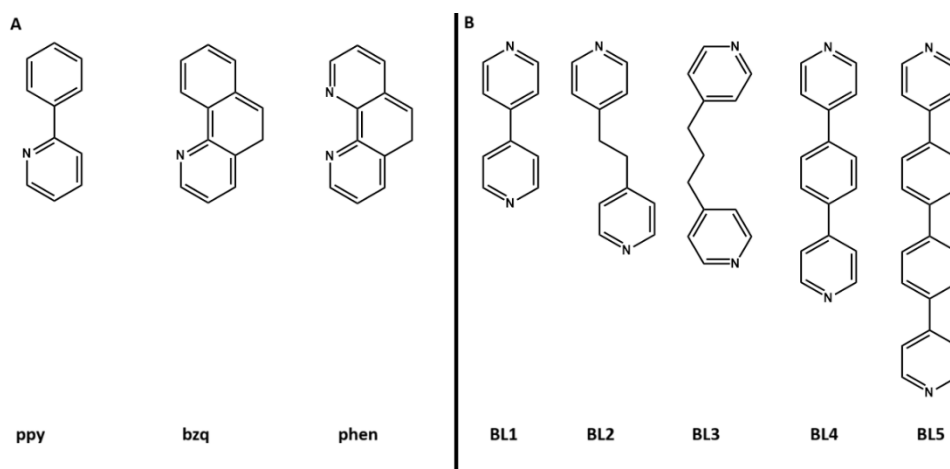
3.2.9. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})][(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})](\mu\text{-BL1})\}(\text{PF}_6)_3$ , (9).....	78
3.2.10. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})][(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})](\mu\text{-BL2})\}(\text{PF}_6)_3$ , (10).....	80
3.2.11. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})][(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})](\mu\text{-BL3})\}(\text{PF}_6)_3$ , (11).....	83
3.2.12. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})](\text{BL4})\}(\text{PF}_6)_4$ , (12).....	85
3.2.13. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})](\text{BL5})\}\text{Cl}_4$ , (13).....	87
3.2.14. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})(4,4'\text{-bpy})](\text{PF}_6)_2$ , (14).....	89
3.2.15. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})(\text{bpe})](\text{PF}_6)_2$ , (15).....	90
3.2.16. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})(\text{bpp})](\text{PF}_6)_2$ , (16).....	92
3.3. Κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων (5) - (7).....	93
3.4. Μελέτες αλληλεπίδρασης διμερών συμπλόκων του Ru(II) με ολιγονουκλεοτίδια με NMR.....	95
3.4.1. Απόδοση των σημάτων NMR των ελεύθερων ολιγονουκλεοτιδίων.....	95
3.4.2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων (A) - (C) με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(5'\text{-CGCGCG-3}')_2$ με φασματοσκοπία NMR.....	102
3.4.2.1. Αλληλεπίδραση του (A) με το $d(5'\text{-CGCGCG-3}')_2$ .....	103
3.4.2.2. Αλληλεπίδραση του (B) με το $d(5'\text{-CGCGCG-3}')_2$ .....	106
3.4.2.3. Αλληλεπίδραση του (C) με το $d(5'\text{-CGCGCG-3}')_2$ .....	108
3.4.3. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων (A) - (C) με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(5'\text{-CTTTGCAAAAAG-3}')_2$ με φασματοσκοπία NMR.....	112
3.4.3.1. Αλληλεπίδραση του (A) με το $d(5'\text{-CTTTGCAAAAAG-3}')_2$ .....	112
3.4.3.2. Αλληλεπίδραση του (B) με το $d(5'\text{-CTTTGCAAAAAG-3}')_2$ .....	114
3.4.3.3. Αλληλεπίδραση του (C) με το $d(5'\text{-CTTTGCAAAAAG-3}')_2$ .....	117
3.4.4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων (9) - (11) με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(5'\text{-CGCGAATTCGCG-3}')_2$ με φασματοσκοπία NMR.....	121
3.4.4.1. Αλληλεπίδραση του (9) με το $d(5'\text{-CGCGAATTCGCG-3}')_2$ .....	121
3.4.4.2. Αλληλεπίδραση του (10) με το $d(5'\text{-CGCGAATTCGCG-3}')_2$ .....	124
3.4.4.3. Αλληλεπίδραση του (11) με το $d(5'\text{-CGCGAATTCGCG-3}')_2$ .....	127
3.5. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων (A) - (C) και (1) - (16) με μοντέλα DNA μέσω πειραμάτων ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεση φθορισμού με βρωμιούχο αιθίδιο.....	133
3.5.1. Πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με βρωμιούχο αιθίδιο των συμπλόκων (A) - (C).....	133
3.5.2. Πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με βρωμιούχο αιθίδιο των συμπλόκων (1) - (16).....	134
3.6. Κυτταροτοξικές μελέτες των συμπλόκων (5) - (7) και (9) - (11).....	136
<b>Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>: Συμπεράσματα</b> .....	139
4.1. Συμπεράσματα.....	141
<b>Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: Βιβλιογραφία</b> .....	145



### Περίληψη:

Η χημειοθεραπεία βασίζεται εν πολλοίς στην αλληλεπίδραση μορίων με το DNA, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η δέσμευση των ενώσεων αυτών στο DNA μπορεί να είναι ομοιοπολική ή μη ομοιοπολική. Στο συγκεκριμένο πεδίο έχουν βρει εφαρμογή πολλές σύμπλοκες ενώσεις, με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα το cisplatin, το οποίο είναι το πρώτο εγκεκριμένο αντικαρκινικό φάρμακο βασισμένο σε μέταλλο (metal based drug), ήδη από το 1974. Η δέσμευσή του στο DNA είναι ομοιοπολική, μετά από υδρόλυσή του και σχηματισμό προϊόντος προσθήκης με το N7 της γουανίνης, και έχει ως συνέπεια την απόπτωση του κυττάρου. Παρά την ευρεία του χρήση, και αναλόγων του, δεν έχει στόχευση προς τα καρκινικά κύτταρα, προκαλώντας σοβαρές παρενέργειες. Επίσης, μεγάλο ποσοστό των ασθενών στους οποίους χορηγείται cisplatin αναπτύσσουν ανθεκτικότητα έναντι του φαρμάκου, με αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Ως εκ τούτου, έχει προκύψει η ανάγκη για νέα χημειοθεραπευτικά, με διαφορετικό τρόπο δράσης, τα οποία θα ξεπερνούν τα παραπάνω ζητήματα. Μια εναλλακτική των συμπλόκων που δεσμεύονται ομοιοπολικά στο DNA, είναι αυτά που δρουν μη ομοιοπολικά. Δύο από τους κυριότερους τρόπους μη ομοιοπολικής δέσμευσης στο DNA είναι η παρεμβολή μεταξύ δύο γειτονικών βάσεων (intercalation) και η δέσμευση στις αύλακες (groove binding) μέσω υδρόφοβων ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δεσμών υδρογόνου ή με συνδυασμό των παραπάνω. Αποτέλεσμα των παραπάνω αλληλεπιδράσεων είναι η μεταβολή της δομής της διπλής έλικας του DNA και η κατά συνέπεια κυτταρική απόπτωση, διεργασία η οποία είναι ωφέλιμη στην καταπολέμηση του καρκίνου. Οι πρώτες ενώσεις που δρουν μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων ήταν οργανικά μόρια, ωστόσο σημαντικό ενδιαφέρον έχουν προσελκύσει και τα σύμπλοκα, καθώς προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως για παράδειγμα ότι το μεταλλικό κέντρο συγκρατεί τους υποκαταστάτες του σε θέσεις πιθανώς ευνοϊκές για την αλληλεπίδραση με το DNA. Στο πλαίσιο αυτό, μεγάλο ενδιαφέρον έχουν συγκεντρώσει τα σύμπλοκα του Ru(II). Επιπροσθέτως, έχει αποδειχθεί ότι η ικανότητα δέσμευσης μικρών μορίων με το DNA, μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά από την εισαγωγή μιας δεύτερης λειτουργικής μονάδας, ικανή για αλληλεπίδραση με το DNA, οδηγώντας έτσι σε αυξημένη κυτταροτοξικότητα.

Με βάση τα παραπάνω, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν νέα διπυρηνικά και μονοπυρηνικά σύμπλοκα του Ru(II) με *p*-cymene και ολιγοπυριδινικούς υποκαταστάτες με κορεσμένη σφαίρα ένταξης με τους εξής γενικούς τύπους:  $\{[Ru(cym)(L1)]_2(\mu-BLi)\}^{2+}$ ,  $\{[Ru_2(cym)_2(L1)(L2)](\mu-BLi)\}^{3+}$ ,  $\{[Ru(cym)(L1)]_2(\mu-BLi)\}^{4+}$  και  $[Ru(cym)(L1)(BLi)]^{2+}$  (cym = *p*-cymene, L1 ή L2 = *ppy*-H<sup>+</sup> ή *bzq*-H<sup>+</sup> ή *phen* (Εικόνα I) και BLi = BL1 - BL5 (Εικόνα I)). Οι χηλικοί υποκαταστάτες L1 και L2 είναι αυτοί που καθαρίζουν και το συνολικό φορτίο του συμπλόκου. Μέσω 2D NMR (NOESY) εξάχθηκαν συμπεράσματα σχετικά με τη χωρική διεύθυνση των υποκαταστατών των συμπλόκων. Επιπλέον, για τα  $\{[Ru(cym)(bzq-H^+)]_2(\mu-BLi)\}(PF_6)_2$  (όπου BLi = BL1, BL2, BL3) ήταν εφικτή η απομόνωση κατάλληλων κρυστάλλων για τη μελέτη τους με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.



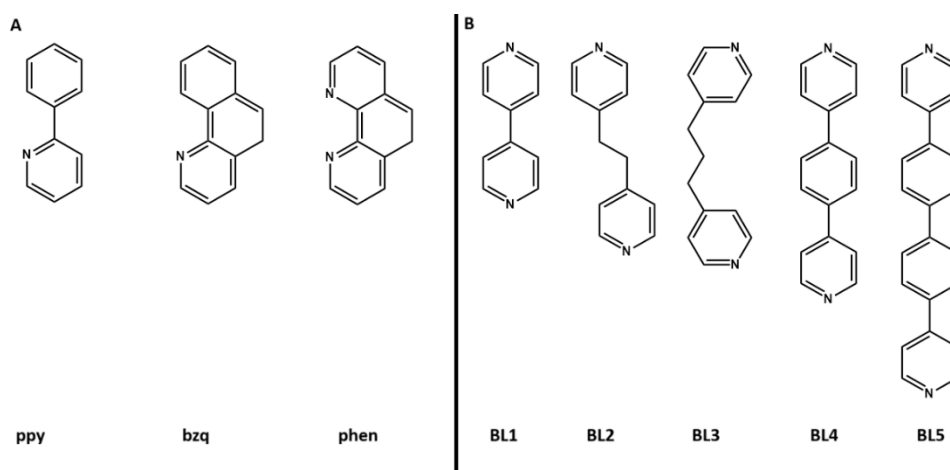
Εικόνα I: A) Χηλικοί υποκαταστάτες L1 και L2 B) Γεφυρωτικοί υποκαταστάτες BL1 - BL5.

Όλα τα παραπάνω σύμπλοκα μελετήθηκαν ως προς την αλληλεπίδρασή τους με τα αλληλοσυμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια Β τύπου  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ ,  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  και  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , καθώς επίσης και με Calf Thymus DNA (CT DNA), μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και μέσω πειραμάτων ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με βρωμιούχο αιθίδιο (EB), από όπου αντλήθηκαν συμπεράσματα ως προς τον τρόπο και την ισχύ της δέσμευσης τους στο DNA, καθώς επίσης και συσχετισμός αυτής με το μήκος και την ευκαμψία του BL αλλά και με το συνολικό φορτίο του συμπλόκου. Τα σύμπλοκα βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν μη ομοιοπολικά με το DNA μέσω διαφόρων τρόπων, όπως παρεμβολή, δέσμευση στις άλακες και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ενώ υπολογίστηκαν και οι σταθερές Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) και πρόσδεσης ( $K_b$ ). Επίσης, πραγματοποιήθηκαν και κυτταροτοξικές μελέτες έναντι των κυτταρικών σειρών MCF-7, A2780, A2780cis-res, από όπου βρέθηκαν τα  $IC_{50}$  και αποδείχθηκε η ύπαρξη ενδιάμεσης εκλεκτικότητας προς τα καρκινικά κύτταρα έναντι των υγιών.

### Abstract:

Chemotherapy is largely based on the interaction of molecules with DNA, inhibiting cell proliferation. The binding of these compounds to DNA can be covalent or non-covalent. Many complex compounds have been applied in this context, with the most notable example being cisplatin, which was the first approved metal-based anticancer drug back in 1974. Cisplatin's binding to DNA takes place covalently, after the hydrolysis of the complex and the formation of an adduct with N7 of guanine, resulting in cell apoptosis. Despite its widespread use, and that of its derivatives, cisplatin does not target cancer cells, causing serious side effects. In addition, a large percentage of patients who are given cisplatin develop drug-resistance, resulting in reduced effectiveness. Therefore, there is a need for new chemotherapeutic agents, possibly with a different mode of action in order to overcome these issues. An alternative to complexes that bind covalently to DNA are those that act non-covalently. The two main ways of non-covalent binding with DNA are intercalation, which includes the insertion of a molecule between two adjacent DNA bases, and groove binding. These interactions result in a change of the structure of the DNA double helix and, consequently, cell apoptosis, a process that is beneficial in the fight against cancer. The first non-covalent DNA binders were organic molecules, but inorganic complexes have also attracted significant interest, as they offer important advantages, such as the fact that the metal center holds the ligands, that are the ones binding with DNA, in possibly favorable positions. In this context, Ru(II) complexes have attracted considerable interest. In addition, it has been shown that small molecules' ability to bind to DNA can be significantly improved by introducing a second functional unit capable of interacting with DNA, thus leading to increased cytotoxicity.

Based on the above, new dinuclear and mononuclear Ru(II)-arene complexes with oligopyridine ligands and saturated coordination sphere were synthesized and characterized with the following general formulas:  $\{[Ru(cym)(L1)]_2(\mu-BLi)\}^{2+}$ ,  $\{[Ru_2(cym)_2(L1)(L2)](\mu-BLi)\}^{3+}$ ,  $\{[Ru(cym)(L1)]_2(\mu-BLi)\}^{4+}$  and  $[Ru(cym)(L1)(BLi)]^{2+}$  (cym = p-cymene, L1 or L2 = ppy-H<sup>+</sup> or bzq-H<sup>+</sup> or phen (Image I) and BLi = BL1 - BL5 (Image I)). The chelating ligands determine the overall charge of the complex. 2D NMR (NOESY) was used to study the structural characteristics of the complexes. Furthermore, for  $\{[Ru(cym)(bzq-H^+)]_2(\mu-BLi)\}(PF_6)_2$  (where BLi = BL1, BL2, BL3), suitable crystals for X-ray crystallography were isolated and studied.



**Image I:** A) Chelating ligands. B) Bridging ligands BL1 - BL5.

The above complexes interactions with B type oligonucleotides  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ ,  $d(5'-CTTTTGCAAAG-3')_2$  and  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , as well as with Calf Thymus DNA (CT DNA), were studied the nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and through fluorescence quenching experiments with ethidium bromide (EB). Using these techniques, it was possible to draw conclusions about the complexes' binding strength towards DNA, and also to correlate this with the total charge and also with the rigidity and the length of the BL. All complexes were found to bind non-covalently with DNA, through a mix of binding modes, such as intercalation, groove binding, electrostatic interactions. The Stern-Volmer constant ( $K_{SV}$ ) and binding constant ( $K_b$ ) were also calculated. Finally, cytotoxic assessment studies were also conducted,

against the cell lines MCF-7, A2780 and A2780cis-res, from which the  $IC_{50}$  values were calculated. These studies proved a moderate selectivity for cancer cells for the studied complexes.

**Abbreviations (συντομογραφίες):**

<b>phen</b>	1,10-φαινανθρολίνη (1,10-phenanthroline)
<b>ppy</b>	2-φαινυλπυριδίνη (2-phenylpyridine)
<b>bzq</b>	Βενζο[h]κινολίνη (Benzo[h]quinoline)
<b>4,4'-bpy</b>	4,4'-διπυριδίνη (4,4'-bipyridine)
<b>2,2'-bpy</b>	2,2'-διπυριδίνη (2,2'-bipyridine)
<b>bpe</b>	1,2-δις(4-πυριδιλ)αιθάνιο (1,2-Bis(4-pyridyl)ethane)
<b>bpp</b>	1,3-δις(4-πυριδουλ)προπάνιο (1,3-Bis(4-pyridyl)propane)
<b>BL</b>	Γεφυρωτικός υποκαταστάτης - bridging ligand
<b>dpbz</b>	1,4-δις(4-πυριδουλ)βενζόλιο (1,4-bis(4-pyridyl)benzene)
<b>dpbph</b>	4,4'-δις(4-πυριδουλ)διφαινύλιο (4,4'-Di(4-pyridyl)biphenyl)
<b>cisplatin</b>	<i>cis</i> -Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
<b>EB</b>	Βρωμιούχο αιθίδιο - ethidium bromide
<b>phendione</b>	1,10-φαινανθρολίνη-5,6-διόνη (1,10-phenanthroline-5,6-dione)
<b>dach</b>	Διαμινοκυκλοεξάνιο (Diaminocyclohexane)
<b>trpy</b>	2,2',2''-τερπυριδίνη (2,2',2''-terpyridine)
<b>dn</b>	1,8-διαμινοναφθαλένιο (1,8-diaminonaphthalene)
<b>en</b>	αιθυλενοδιαμίνη (ethylenediamine)
<b>rqn</b>	2(2'-πυριδουλ)κινολίνη (2-(2'-pyridyl)quinoline)
<b>rqx</b>	2(2'-πυριδουλ)κινόξαλίνη (2-(2'-pyridyl)quinoline)
<b>rbqx</b>	2-(2'-πυριδουλ)βενζο[g]κινόξαλίνη (2-(2'-pyridyl)benzo[g]quinoxaline)
<b>dppz</b>	διπυριδο[3,2-a:2',3'-c]φαιναζίνη (dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine)
<b>pdto</b>	1(πυριδιν-2-υλο)-3,6-διθειοκτάνιο (1-(pyridin-2-yl)-3,6-dithiooctane)
<b>IP</b>	ιμιδαζο[4,5-f][1,10]φαινανθρολίνη (imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline)
<b>PIP</b>	2-φαινυλοϊμιδαζο[4,5-f][1,10]φαινανθρολίνη (2-phenylimidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline)
<b>dprq</b>	διπυριδο[3,2-f:2',3'-h]κινόξαλίνη (dipyrido[3,2-f:2',3'-h]quinoxaline)
<b>dmdppz</b>	11,12-διμεθυλδιπυριδο[3,2-a:2',3'-c]φαιναζίνη (11,12-dimethyldipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine)
<b>phenpip</b>	1-φαινυλοπιπεραζίνη (1-phenylpiperazine)
<b>crip</b>	4-(1-ιμιδαζο[4,5-f][1,10]φαινανθρολιν-2-υλο)βενζονιτρίλιο (4-(1-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline-2-yl)benzotrile)
<b>frip</b>	2-(4-φορμυλοφαινυλο)ιμιδαζο[4,5-f][1,10]φαινανθρολίνη (2-(4-formylphenyl)imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline)
<b>brip</b>	2-(4-βρωμοφαινυλο)ιμιδαζο[4,5-f][1,10]φαινανθρολίνη (2-(4-bromophenyl)imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline)
<b>nrip</b>	2-(4-νιτροφαινυλο)ιμιδαζο[4,5-f][1,10]φαινανθρολίνη (2-(4-nitrophenyl)imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline)
<b>btppz</b>	βενζο[h]τριπυριδο[3,2-a:2',3'-c:2'',3''-j]φαιναζίνη (benzo[h]tripyrdo[3,2-a:2',3'-c:2'',3''-j]phenazine)
<b>THA</b>	Τετραϋδροανθρακένιο (tetrahydroanthracene)
<b>didppz</b>	11,11-δις(διπυριδο[3,2-a:2',3'-c]φαιναζινύλιο (11,11-bis(dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazinyl))
<b>dppe</b>	4-[(E)-2-(πυριδιν-4-υλο)αιθενυλ]πυριδίνη (4-[(E)-2-(pyridin-4-yl)ethenyl]pyridine)
<b>dpey</b>	4-[2-(πυριδιν-4-υλο)αιθινυλ]πυριδίνη (4-[2-(pyridin-4-yl)ethenyl]pyridine)
<b>dpeb</b>	4-δι[2-(πυριδιν-4-υλο)αιθινυλ]βενζόλιο (4-di[2-(pyridin-4-yl)ethenyl]benzene)
<b>CT-DNA</b>	Calf Thymus DNA
<b>IC<sub>50</sub></b>	Half Maximal Inhibitory Concentration
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species

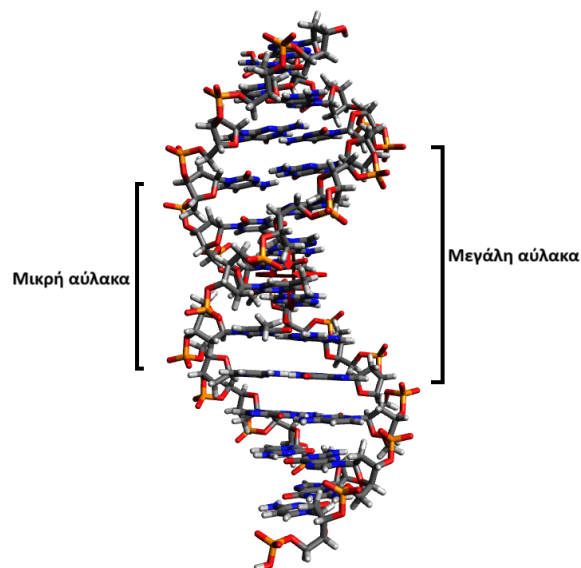


# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

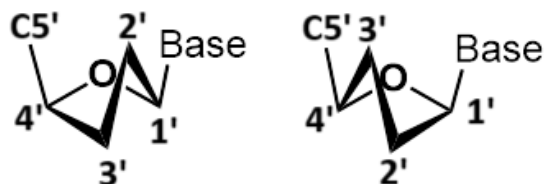


**1.1. Σύμπλοκες ενώσεις μετάλλων οι οποίες αλληλεπιδρούν ομοιοπολικά με το DNA σχηματίζοντας προϊόντα προσθήκης:**

Όπως είναι γνωστό, το DNA παίζει κομβικό ρόλο στην ύπαρξη και τη διατήρηση της ζωής, καθώς είναι αυτό που αποθηκεύει και μεταφέρει, μέσω της μεταγραφής κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την γενετική πληροφορία [1]. Για τον λόγο αυτό, η χημειοθεραπεία του καρκίνου βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε μόρια που στοχεύουν και προκαλούν βλάβες στο DNA, επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό υγιών και καρκινικών κυττάρων [2]. Το DNA απαντάται σε τρεις κυρίως τύπους, το A-DNA, το B-DNA και το Z-DNA. Και στις τρεις μορφές του DNA η δομή της διπλής έλικας σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των ζευγών αζωτούχων βάσεων αδενίνης (A) - θυμίνης (T) και γουανίνης (G) - κυτοσίνης (C). Ακόμη, στη δομή της διπλής έλικας οι αζωτούχες βάσεις συγκρατούνται παράλληλα από τις π - π αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των αρωματικών τους δακτυλίων. Με αυτόν τον τρόπο το DNA αποκτά τη μορφή μίας διπλής περιστρεφόμενης έλικας. Στο A- και στο B-DNA η έλικα αυτή είναι δεξιόστροφη, ενώ στο Z-DNA είναι αριστερόστροφη. Αποτέλεσμα της διπλής έλικας αυτής είναι η ύπαρξη μιας μεγάλης και μιας μικρής αύλακας, οι οποίες μπορεί να αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους με μικρά μόρια (groove binders), διαταράσσοντας τη δομή και τη λειτουργία του DNA. Η μεγάλη και η μικρή αύλακα διαφέρουν σημαντικά στο μέγεθος, στο σχήμα, στην παρουσία μορίων νερού, στο ηλεκτροστατικό δυναμικό και στα πιθανά σημεία σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Όλα αυτά οδηγούν σε διαφορετικά χαρακτηριστικά μορίων που να είναι ικανά να δεσμευτούν. Μεταξύ των τριών μορφών DNA που αναφέρθηκαν, η διαμόρφωση του Z-DNA είναι σπάνια, ενώ συνήθως ακόμη και οι μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες σχηματίζουν B- ή A- τύπου DNA. Οι δομικές διαφορές μεταξύ των τριών τύπων DNA οφείλονται κυρίως στη διαμόρφωση των σακχάρων του μορίου, καθώς η απόσταση μεταξύ των γειτονικών βάσεων του DNA και ο βαθμός περιστροφής της έλικας εξαρτάται από τη σχετική διαμόρφωσή τους. Στο A- τύπου DNA τα σάκχαρα υιοθετούν διαμόρφωση του πενταμελούς δακτυλίου C3'-endo, στο B- τύπου DNA C2'-endo, ενώ στο Z-DNA η διαμόρφωση εναλλάσσεται από C3' σε C2'-endo [3,4].

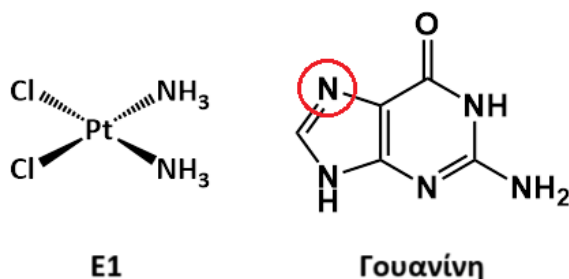


**Εικόνα 1.1.** Τρισδιάστατη απεικόνιση του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, όπου φαίνεται η μεγάλη και η μικρή αύλακα.



**Εικόνα 1.2.** Οι διαμορφώσεις C2'-endo και C3'-endo που μπορούν να υιοθετήσουν οι πενταμελείς δακτύλιοι του σακχάρου στο DNA.

Οι χημειοθεραπευτικές ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA μπορούν είτε να το «τεμαχίσουν» (DNA cleavage) προκαλώντας αναχαίτηση του πολλαπλασιασμού του κυττάρου, ή εναλλακτικά να δεσμευτούν στο DNA, μεταβάλλοντας τη δομή και τη λειτουργία του. Ο πρώτος τρόπος αλληλεπίδρασης πραγματοποιείται συνήθως μέσω διάσπασης των φωσφοδιεστερικών δεσμών μέσω ελευθέρων ριζών. Η δέσμευση με το DNA μπορεί να είναι μη αντιστρεπτή, η οποία περιλαμβάνει την ομοιοπολική δέσμευση ενός μορίου, πχ αλκυλιωτικά αντιδραστήρια, ή ένταξη στο μεταλλικό κέντρο ενός ατόμου δότη κυρίως από τις νουκλεϊκές βάσεις του DNA, ή αντιστρεπτή, η οποία μπορεί να επιτευχθεί από απλά οργανικά μόρια ή τους υποκαταστάτες συμπλόκων με διάφορους τρόπους και θα αναπτυχθεί περισσότερο παρακάτω [5].



**Εικόνα 1.3.** Το αντικαρκινικό φάρμακο cisplatin (E1) καθώς και η δομή της αζωτούχας βάσης της γουανίνης με σημειωμένο το άζωτο της θέσης 7, το οποίο αποτελεί το κύριο σημείο ένταξης του λευκοχρύσου.

Το cisplatin (cis-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος(II)) είναι το πρώτο αντικαρκινικό φάρμακο που εγκρίθηκε το 1974 βασισμένο σε μέταλλο (metal based drug) και χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα. Είναι αποτελεσματικό έναντι διαφορετικών τύπων καρκίνων, όπως των όρχεων, των ωοθηκών, του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, καθώς και αρκετών ακόμα άλλων [6]. Το cisplatin είναι ένα επίπεδο τετραγωνικό διαμαγνητικό σύμπλοκο του Pt(II), κίτρινου χρώματος. Αυτό, εισέρχεται στα κύτταρα τόσο μέσω ενεργής πρόσληψης (active uptake) όσο και μέσω παθητικής διάχυσης (passive diffusion) [7]. Κατά την ενδοφλέβια χορήγηση του cisplatin και μέχρι αυτό να εισέλθει στα κύτταρα, προστατεύεται από φαινόμενα υδρόλυσης και διατηρεί ακέραιη τη δομή του εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης ιόντων χλωρίου στο αίμα (100 mM) [8]. Όταν το σύμπλοκο περάσει στον ενδοκυττάριο χώρο, ενεργοποιείται μέσω της αντικατάστασης των χλωρίων από μόρια νερού εξαιτίας της μικρής συγκέντρωσης ιόντων χλωρίου στον ενδοκυττάριο χώρο (4-12 mM). Το εφυδατωμένο σύμπλοκο δημιουργεί προϊόντα προσθήκης (adducts) μέσω του N7 της γουανίνης αλλά και της αδενίνης. Με τον τρόπο εμποδίζει τις ελικάσες στο ξετύλιγμα του DNA και την μεταγραφή με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο [9]. Το ενεργοποιημένο cisplatin σχηματίζει προϊόντα προσθήκης τόσο με το πυρηνικό DNA των κυττάρων όσο και με το DNA που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια [10]. Ωστόσο, το cisplatin δεν έχει κάποιον τρόπο να «αναγνωρίζει» τα μόρια DNA και να

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

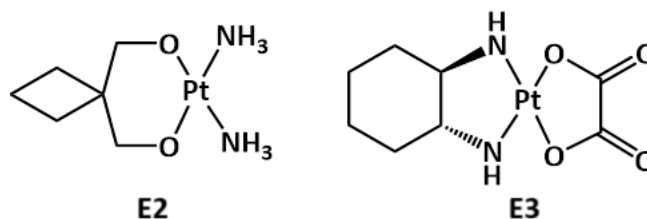
δημιουργεί προϊόντα προσθήκης αποκλειστικά με αυτά. Έτσι μπορεί να συνδέεται, αφού πρώτα ενεργοποιηθεί μέσω υδρόλυσης, και με άλλα ενδοκυτταρικά μόρια, όπως το RNA και οι πρωτεΐνες, οδηγώντας σε σοβαρές παρενέργειες. Μετά την υδρόλυση των υποκαταστατών χλωρίου, το μεταλλικό κέντρο λευκοχρύσου έχει δύο πιθανές θέσεις ένταξης που μπορούν να καταληφθούν από πυρηνόφιλα κέντρα. Έτσι το cisplatin έχει τη δυνατότητα να συνδέεται σε δύο σημεία του ίδιου κλώνου της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA. Με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζει την ομαλή διεκπεραίωση βασικών διαδικασιών του κύκλου ζωής του κυττάρου, όπως η μεταγραφή, γεγονός που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Ο λόγος που το cisplatin εμφανίζει τόσο καλά κυτταροτοξικά αποτελέσματα απέναντι στα καρκινικά κύτταρα είναι η μεγάλη βιοδιαθεσιμότητά του και το γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται πολύ πιο γρήγορα από ότι τα υγιή. Κατά συνέπεια, το cisplatin έχει τη δυνατότητα να προκαλεί ευκολότερα βλάβες και κυτταρικό θάνατο σε καρκινικά κύτταρα [11].

Ωστόσο, το 50% των ασθενών που υπόκεινται σε θεραπεία με cisplatin αναπτύσσουν ανθεκτικότητα έναντι του φαρμάκου με αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας [12]. Οι μηχανισμοί που οδηγούν στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας απέναντι στα κυτταροτοξικά αποτελέσματα του cisplatin μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: (α) μηχανισμοί που προηγούνται της δέσμησης του φαρμάκου στα μόρια - στόχους, (β) μηχανισμοί που συνδέονται απευθείας με τη σύνδεση του φαρμάκου στο DNA και (γ) μηχανισμοί που αφορούν τα βιοσηματοδοτικά μονοπάτια που έπονται της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με το DNA. Αναφορικά με την πρώτη κατηγορία μηχανισμών ανθεκτικότητας έναντι του cisplatin, πιστεύεται ότι στα κύτταρα με φαρμακοανθεκτικότητα οι «μεταφορείς» CTR1, που θεωρούνται υπεύθυνοι για τη μεταφορά του φαρμάκου στον ενδοκυτταρικό χώρο, εκφράζονται σε μικρότερο βαθμό, μειώνοντας έτσι την ικανότητα του συμπλόκου να εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα. Όσον αφορά την ανθεκτικότητα που αναπτύσσεται στο στάδιο της αλληλεπίδρασης με το DNA, δεν είναι ακόμα σαφές το πως ακριβώς αναπτύσσεται. Υπάρχουν, ωστόσο, δύο επικρατούσες θεωρίες. Τα βασικά κυτταρικά συστήματα που επιδιορθώνουν τις βλάβες που προκαλεί το cisplatin είναι δύο: το NER (Nucleotide Excision Repair) και το MMR (Mismatch Repair). Η πρώτη θεωρία εικάζει ότι στα κύτταρα με ανθεκτικότητα στη δράση του cisplatin το NER λειτουργεί αποτελεσματικότερα. Αντίστοιχα, σύμφωνα με τη δεύτερη θεωρία, το MMR είναι αυτό που ανιχνεύει τα προϊόντα προσθήκης του cisplatin με το DNA, αποτυγχάνει στην επιδιόρθωσή τους και ακολούθως σηματοδοτεί την έναρξη του κυτταρικού θανάτου. Στα φαρμακοανθεκτικά κύτταρα (cis-res) θεωρείται ότι το MMR υποεκφράζεται, αφήνοντας έτσι άλλους πιο αποτελεσματικούς μηχανισμούς να φέρουν εις πέρας το έργο της επιδιόρθωσης των προϊόντων προσθήκης που έχουν σχηματιστεί [13]. Εκτός της ανθεκτικότητας που αναπτύσσουν τα καρκινικά κύτταρα στη θεραπεία με cisplatin, άλλος ένας περιοριστικός παράγοντας στην χρήση του φαρμάκου είναι η ισχυρή τοξικότητα έναντι υγιών κυττάρων που εμφανίζει. Αυτή περιλαμβάνει νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα, νευροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, αιμοτοξικότητα, καρδιοτοξικότητα και γαστρεντερική τοξικότητα [14]. Η σοβαρότητα των τοξικών παρενεργειών του cisplatin έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται από την δόση στην οποία έχει υποβληθεί ο ασθενής. Από όλες τις τοξικές παρενέργειες που οφείλονται στη θεραπεία με cisplatin η πιο έντονη είναι η νεφροτοξικότητα, καθώς το φάρμακο εναποτίθεται στα νεφρά σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με όλα τα άλλα όργανα του οργανισμού. Παρόλο που το φάρμακο αυτό καθ' αυτό δεν είναι τοξικό για τα νεφρά, θεωρείται ότι μετατρέπεται σε ισχυρό νεφροτοξικό παράγοντα μέσα στα σωληναριακά κύτταρα των νεφρών [15].

Για τους παραπάνω λόγους, ήταν απαραίτητη η σύνθεση νέων κυτταροτοξικών ενώσεων που να ξεπερνούν τα μειονεκτήματα του cisplatin. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνουν μερικώς ανάλογα του cisplatin, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση διαφόρων ειδών καρκίνου. Τέτοια είναι οι carboplatin, oxaliplatin, nedaplatin, lobarplatin και heptaplatin,

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

τα οποία έχουν εγκριθεί και χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του καρκίνου. Από αυτές, οι πιο σημαντικές είναι το carboplatin και το oxaliplatin καθώς οι άλλες τρεις έχουν εγκριθεί για χρήση μόνο στην Ιαπωνία, την Κίνα και την Κορέα [16]. Το carboplatin (cis-1,1-δικαρβοξυλικοκυκλοβουτανοδιαμινολευκόχρυσος(II)) συντέθηκε το 1981 [17] και η δομή του είναι ανάλογη με αυτή του cisplatin με τη διαφορά ότι οι υποκαταστάτες χλωρίου έχουν αντικατασταθεί από τον διδοντικό υποκαταστάτη 1,1-δικαρβόξυκυκλοβουτάνιο. Η χορήγηση του carboplatin είναι ευκολότερη από του cisplatin, λόγω της καλύτερης υδατοδιαλυτότητάς του, ενώ ακόμη παρατηρείται και χαμηλότερη τοξικότητα προς τους υγιείς ιστούς. Παρόλα αυτά, το carboplatin εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα ενάντια σε ίδιους τύπους καρκίνου με το cisplatin, ενώ παρατηρείται και παρόμοιο προφίλ φαρμακοανθεκτικότητας όπως και στην περίπτωση του cisplatin [18]. Όμοια με το cisplatin, το carboplatin δημιουργεί προϊόντα προσθήκης με το DNA, μετά την απομάκρυνση του δικαρβοξυλικού υποκαταστάτη στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA. Τα προϊόντα προσθήκης του συμπλόκου με το DNA μπορούν να είναι, όπως και στην περίπτωση του cisplatin, είτε μονολειτουργικά είτε ομοκλωνικά (intrachain ή intrastrand) ή διακλωνικά (interchain ή interstrand). Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του carboplatin είναι παρόμοιος με του cisplatin, καθώς βασίζεται επίσης στην υδρόλυση του συμπλόκου, αφού αυτό εισέλθει στον ενδοκυτταρικό χώρο. Η χαμηλότερη παρατηρούμενη τοξικότητά του σε σχέση με το cisplatin οφείλεται στο γεγονός ότι ο υποκαταστάτης 1,1-δικαρβοξυλικό κυκλοβουτάνιο είναι χειρότερη αποχωρούσα ομάδα από το χλώριο, με αποτέλεσμα τον αργότερο ρυθμό αντίδρασης του συμπλόκου με πυρηνόφιλα [16].



**Εικόνα 1.4.** Τα γνωστά αντικαρκινικά φάρμακα carboplatin (E2) και oxaliplatin (E3) τα οποία αποτελούν παράγωγα του cisplatin.

Το oxaliplatin (οξαλικό-1R,2R-trans-διαμινοκυκλοεξανολευκόχρυσος(II)) το τρίτο ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο λευκοχρύσου, το οποίο συντέθηκε το 1996. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία καρκίνων του πνεύμονα, του μαστού και του παχέος εντέρου. Παρόλο που οι ασθενείς που υπόκεινται σε θεραπεία με το φάρμακο εμφανίζουν μειωμένη ωτοτοξικότητα και νεφροτοξικότητα σε σχέση με τα άλλα φάρμακα του λευκοχρύσου, πολλές φορές βιώνουν παραισθησία και δυσαισθησία των χεριών και των ποδιών [19]. Ομοίως με τα προηγούμενα, ο κύριος στόχος του oxaliplatin είναι το DNA με το οποίο σχηματίζει προϊόντα προσθήκης. Ο σχηματισμός αυτών των προϊόντων προσθήκης, όπως και στις περιπτώσεις του carboplatin και του cisplatin, γίνεται μέσω του δεσμού ένταξης που σχηματίζεται μεταξύ του N7 των γουανινών ή των αδενινών και του μεταλλικού κέντρου του συμπλόκου. Για να καταστεί αυτό δυνατό, πρέπει πρώτα να ενεργοποιηθεί το σύμπλοκο. Αυτό γίνεται όσο αυτό βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος όπου γίνεται μετατροπή της ένωσης σε δίχλωρο ανάλογα, τα οποία ακολουθούν την πορεία του cisplatin [20].

Το Nedaplatin είναι ένα σύμπλοκο δεύτερης γενιάς του Pt(II) το οποίο είναι εγκεκριμένο για κλινική χρήση ως αντικαρκινικό χημειοθεραπευτικό φάρμακο στην Ιαπωνία, ενώ βρίσκεται σε διάφορα στάδια

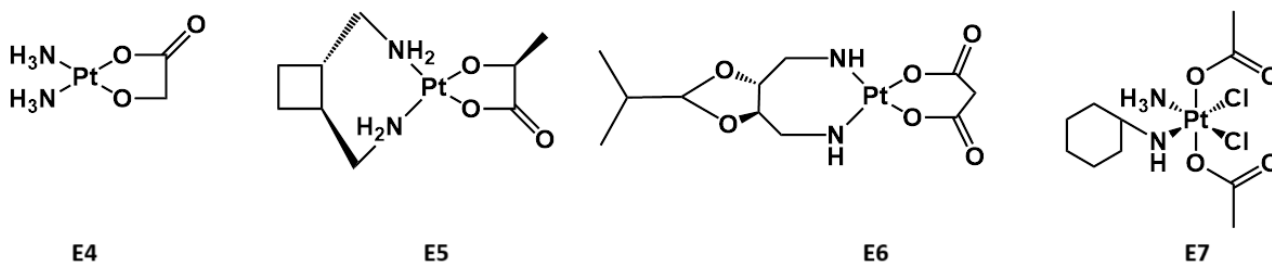
## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

κλινικών δοκιμών σε άλλα μέρη του κόσμου. Στο μεταλλικό κέντρο λευκοχρύσου βρίσκονται ενταγμένοι δύο αμωνιακοί υποκαταστάτες, όμοια με το cisplatin, ενώ η διαφοροποίησή του με το γνωστό αντικαρκινικό φάρμακο είναι ότι αντί για δύο υποκαταστάτες χλωρίου, φέρει έναν διδοντικό ανιονικό υποκαταστάτη γλυκολικού οξέος (Εικόνα 1.5). Όταν το nedaplatin υδρολυθεί, παράγεται το διύδροξο παράγωγό του, το οποίο έχει την ικανότητα σχηματισμού προϊόντων προσθήκης με το DNA. Η παραπάνω τροποποίηση της δομής του σε σχέση με το cisplatin έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη νεφροτοξικότητα, ενώ παρουσιάζει θεραπευτική ικανότητα σε επίπεδα ανάλογα του carboplatin. Το nedaplatin έχει αποδειχθεί ότι είναι δραστικό ενάντια σε καρκίνους των πνευμόνων, του εγκεφάλου και του λαϊμού. Επιπλέον, το nedaplatin μπορεί να χορηγηθεί και σε ασθενείς που εμφανίζουν χαρακτηριστικά υπεραισθησίας προς το carboplatin [21].

Συνεχίζοντας με τα ανάλογα του cisplatin, το heptaplatin είναι ένα σύμπλοκο τρίτης γενιάς, το οποίο από το 2005 είναι εγκεκριμένο για χορήγηση σε ασθενείς στην Νότια Κορέα που πάσχουν από καρκίνο του στομάχου σε προχωρημένα στάδια. Παρόλο που το heptaplatin έχει δείξει δραστηριότητα ενάντια και σε άλλους τύπους καρκίνου, η νεφροτοξικότητα που εμφανίζει έχει περιορίσει την χρήση του. Στο μεταλλικό κέντρο του λευκοχρύσου εντάσσονται ένας διαμινικός χηλικός υποκαταστάτης και ένα μηλονικό ανιόν (malonate), το οποίο έχει τον ρόλο της αποχωρούσας ομάδας [22]. Το lobaplatin είναι ένα εγκεκριμένο (στην Κίνα) αντικαρκινικό φάρμακο λευκοχρύσου τρίτης γενιάς, το οποίο αποτελεί παράγωγο του heptaplatin. Χρησιμοποιείται σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του μαστού, καρκίνο των πνευμόνων και χρόνια μυελώδη λευχαιμία [23]. Στο μεταλλικό κέντρο λευκοχρύσου βρίσκονται ενταγμένα ένα διαμινοκυκλοβουτάνιο, το οποίο έχει τον ρόλο του σταθεροποιητικού αμινικού υποκαταστάτη που δεν υδρολύεται, και ένα λακτικό ανιόν (lactate), το οποίο παίζει τον ρόλο της αποχωρούσας ομάδας κατά την ενδοκυτταρική υδρόλυση του συμπλόκου για την ενεργοποίησή του. Το υδρολυμένο προϊόν του lobaplatin δεσμεύεται στο DNA, όπως και τα άλλα ανάλογα του cisplatin [24].

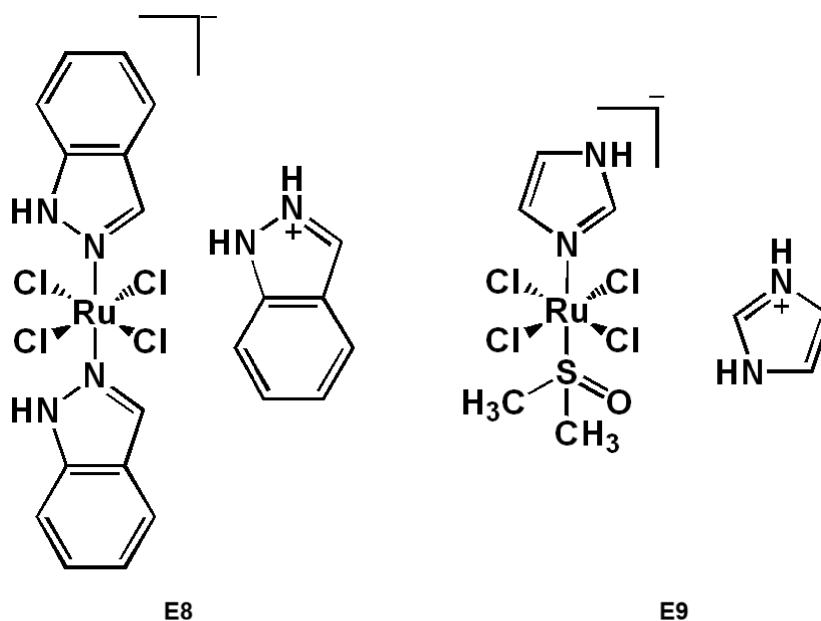
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση του satraplatin, ενός συμπλόκου του Pt(IV) το οποίο βρίσκεται υπό κλινικές δοκιμές φάσης (III) για τη θεραπεία καρκίνου του προστάτη, τόσο ως το μοναδικό φάρμακο του θεραπευτικού σχήματος, όσο και ως συνδυαστικό φάρμακο με ταυτόχρονη χορήγηση άλλων χημειοθεραπευτικών. Το satraplatin φέρει δύο οξικά ανιόντα ενταγμένα στο μεταλλικό κέντρο μαζί με έναν υποκαταστάτη 1,2-κυκλοεξυλαμίνης, γεγονός που συνεισφέρει σημαντικά στη λιποφιλικότητα του συμπλόκου και, κατά συνέπεια, στην ικανότητά του να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Οι υπόλοιποι υποκαταστάτες του μεταλλικού κέντρου είναι ένας αμωνιακός υποκαταστάτης και δύο υποκαταστάτες χλωρίου. Έχει παρατηρηθεί ότι το satraplatin παρουσιάζει δραστηριότητα σε όγκους με φαρμακοανθεκτικότητα έναντι του cisplatin, ενώ τα επίπεδα δραστηριότητάς του είναι παρόμοια με του carboplatin. Το satraplatin δρα με τον γνωστό τρόπο που δρουν όλα τα σύμπλοκα του Pt(II) που περιγράφηκαν νωρίτερα, με τη διαφορά ότι για να μπορεί να το κάνει αυτό πρέπει πρώτα να αναχθεί, ενδοκυτταρικά, στο αντίστοιχο σύμπλοκο του Pt(II). Έτσι, μετά τον σχηματισμό των προϊόντων προσθήκης με το DNA αναστέλλει την αντιγραφή και τη μεταγραφή του DNA του κυττάρου, οδηγώντας έτσι το κύτταρο σε απόπτωση. Το γεγονός ότι οι δύο μη υδρολύσιμοι υποκαταστάτες του συμπλόκου δεν είναι οι ίδιοι μεταξύ τους, οδηγεί σε σχηματισμό διαφορετικού είδους προϊόντων προσθήκης με το DNA σε σχέση με το cisplatin τα οποία με τη σειρά τους οδηγούν σε καλύτερη αναστολή της μεταγραφής του DNA και είναι δυσκολότερο να διορθωθούν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι το satraplatin να εμφανίζει ικανοποιητική δραστηριότητα ακόμη και σε όγκους με ανθεκτικότητα στο cisplatin [25].

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή



**Εικόνα 1.5.** Ανάλογα του cisplatin, τρίτης και τέταρτης γενιάς. Από αριστερά προς δεξιά: Nedarplatin (E4), Lobaplatin (E5), Heptaplatin (E6) και Satraplatin (E7).

Η επιτυχία που γνώρισαν, όσον αφορά τη θεραπεία του καρκίνου, το cisplatin και τα ανάλογά του, καθώς και τα μειονεκτήματα που αυτά εμφανίζουν, έχουν οδηγήσει στην έρευνα για την αξιοποίηση σύμπλοκων ενώσεων άλλων μετάλλων, όπως για παράδειγμα το ρουθίνιο. Το ρουθίνιο βρίσκεται σε δύο κυρίως οξειδωτικές βαθμίδες R(II) και Ru(III). Ένα ακόμη πλεονέκτημα των συμπλόκων του ρουθηνίου είναι ότι το ρουθίνιο εμφανίζει αρκετές ομοιότητες με τον σίδηρο. Ως εκ τούτου, έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με τους υποδοχείς της τρανσφερίνης, οι οποίοι πιστεύεται ότι υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, τα σύμπλοκα ρουθηνίου εμφανίζουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα προς τα καρκινικά κύτταρα, έναντι των υγιών [26]. Το πρώτο (χρονικά) σύμπλοκο του ρουθηνίου το οποίο εισήλθε σε κλινικές δοκιμές είναι το NAMI-A, ένα σύμπλοκο του Ru(III), το οποίο ολοκλήρωσε επιτυχώς τις κλινικές δοκιμές φάσης I, αλλά στη συνέχεια απορρίφθηκε εξαιτίας της υψηλής τοξικότητας που παρατηρήθηκε στους ασθενείς οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε αυτό [27]. Το σύμπλοκο έχει οκταεδρική γεωμετρία, με τέσσερις υποκαταστάτες χλωρίου να καταλαμβάνουν τις ισημερινές θέσεις της σφαίρας ένταξης του μεταλλικού κέντρου, ενώ στις αξονικές θέσεις βρίσκονται ένα DMSO, ενταγμένο μέσω του ατόμου S, και ένα ιμιδαζόλιο ενταγμένο μέσω του ατόμου N. Το αρνητικό φορτίο του συμπλόκου αντισταθμίζεται από ένα κατιόν ιμιδαζολίου. Το σύμπλοκο είναι σταθερό όταν βρίσκεται σε στερεή κατάσταση, ενώ υπόκειται σε ταχεία υδρόλυση όταν βρίσκεται σε υδατικό διάλυμα, η οποία μάλιστα είναι εξαρτώμενη από το pH. Σε πειράματα που έχουν γίνει, αποδείχθηκε ότι σε θερμοκρασία 37° C και φυσιολογικό pH, όλη η ποσότητα του μητρικού συμπλόκου σχεδόν εξαφανίζεται εντός 15 λεπτών, καθώς τόσο τα χλώρια όσο και το DMSO υδρολύονται [28]. Όσον αφορά την αλληλεπίδρασή του με το DNA, το NAMI-A σχηματίζει προϊόντα προσθήκης με το DNA, μονολειτουργικά και διλειτουργικά. Τα πειράματα έδειξαν ότι το NAMI-A σχηματίζει ομοκλωνικά διλειτουργικά προϊόντα προσθήκης αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό από ότι το cisplatin. Σε αυτά τα προϊόντα προσθήκης το μεταλλικό κέντρο ρουθηνίου σχηματίζει δεσμούς ένταξης είτε με μονάδες γουανίνης, όμοια με το cisplatin. Σε σπανιότερες περιπτώσεις έχουν παρατηρηθεί και διακλωνικά προϊόντα προσθήκης. Επιπλέον, το NAMI-A σχηματίζει και διλειτουργικά προϊόντα προσθήκης DNA-πρωτεΐνης σε βαθμό, μάλιστα, ανάλογο με το cisplatin. Παρά τον παρόμοιο με το cisplatin τρόπο δράσης του NAMI-A, η κυτταροτοξικότητά του βρέθηκε αρκετά χαμηλότερη (περίπου 1000 φορές).



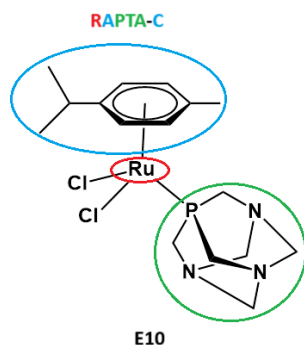
**Εικόνα 1.6.** Σύμπλοκα του Ru(III) τα οποία έχουν βρεθεί υπό κλινικές δοκιμές ως αντικαρκινικά φάρμακα. Από αριστερά προς δεξιά KP1019 (E8), NAMI-A (E9).

Το KP1019, είναι ένα οκταεδρικό σύμπλοκο του Ru(III), ανάλογο του NAMI-A (Εικόνα 1.6), το οποίο έδειξε δραστηριότητα τόσο έναντι των αρχικών όγκων αλλά και έναντι των μεταστάσεων. Σε στερεή κατάσταση, το KP1019, είναι σταθερό, ενώ εμφανίζει μέτρια διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα. Σε θερμοκρασία 25° C η απομάκρυνση του ενός υποκαταστάτη χλωρίου μέσω υδρόλυσης λαμβάνει χώρα με αργό ρυθμό (περίπου 2% ανά ώρα), σε αντίθεση με το NAMI-A, αναδεικνύοντας τον ρόλο του ινδολίου στη διεργασία της υδρόλυσης. Σε θερμοκρασία 37° C και φυσιολογικό pH η υδρόλυση του συμπλόκου είναι ταχύτερη, με τον χρόνο ημίσειας ζωής του να είναι περίπου μισή ώρα. Στο χρονικό διάστημα αυτό υδρολύονται επίσης και οι ινδαζολικοί υποκαταστάτες, εκτός από τους υποκαταστάτες χλωρίου [28]. Οι παρατηρούμενες διαφορές στην κινητική του KP1019 σε σχέση με αυτή του NAMI-A έχουν ως αποτέλεσμα το διαφορετικό τρόπο δράσης των δύο συμπλόκων. Μία σημαντική διαφορά είναι η σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση ρουθηνίου στο κυττασόλιο που παρατηρείται για το KP1019. Ως αποτέλεσμα, η επικρατούσα άποψη σχετικά με την κυτταροτοξικότητα του KP1019 είναι ότι αυτή δεν οφείλεται κατά κύριο λόγο στην αλληλεπίδραση με το DNA, αλλά στην παρεμβολή του συμπλόκου στην διακυτταρική επικοινωνία (cell signaling) και στις μεταβολικές οδούς. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο εμφανίζει έντονες αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες του κυττασολίου, με αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS). Τα παραγόμενα ROS οδηγούν το κύτταρο σε οξειδωτικό στρες και συνεπακόλουθα κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης [29]. Το KP1339 ή αλλιώς BOLD-100 είναι ένα παράγωγο του KP1019, όπου ως αντισταθμιστικό κατιόν δρα ένα κατιόν νατρίου αντί για κατιόν ινδαζολίου. Το σύμπλοκο αυτό βρίσκεται ακόμη σε κλινικές δοκιμές και φαίνεται να είναι ένα πολλά υποσχόμενο σύμπλοκο, του οποίου τόσο η βιολογική δραστηριότητα, όσο και ο μηχανισμός δράσης μελετώνται ακόμα [30].

Άλλη μία οικογένεια οργανομεταλλικών συμπλόκων του Ru(II) η οποία έχει δείξει αξιόλογα κυτταροτοξικά αποτελέσματα είναι αυτή των συμπλόκων RAPTA. Το πρώτο σύμπλοκο αυτού του τύπου, το RAPTA-C, συντέθηκε και μελετήθηκε από την ομάδα του P. J. Dyson, το 2001 [31]. Στο σύμπλοκο αυτό το μεταλλικό κέντρο είναι το ρουθίνιο σε οξειδωτική κατάσταση +2, Ru(II). Σε αυτή την οξειδωτική κατάσταση του ρουθίνιο είναι πιο ευκίνητο κινητικά από ότι στην κατάσταση Ru(III), ανταλλάσσοντας ταχύτερα τους

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

υποκαταστάτες του. Σε αυτό βρίσκονται ενταγμένοι οι εξής υποκαταστάτες: ένα *p*-κουμένιο (cym), το οποίο συνδέεται με το μεταλλικό κέντρο  $\eta^6$ -απτικό δεσμό, δύο ευκίνητοι υποκαταστάτες χλωρίου και ο υποκαταστάτης PTA (1,3,5,-τριαζα-7-φωσφοαδαμαντάνιο). Το αρένιο μέσω του τρόπου ένταξής του στο μεταλλικό κέντρο Ru(II) σταθεροποιεί την +2 οξειδωτική του κατάσταση, καθώς δρα τόσο ως *p*-δέκτης όσο και ως  $\eta^6$  δότης ηλεκτρονίων μέσω του απτικού δεσμού, ενώ, επιπλέον, αυξάνει και τον λιπόφιλο χαρακτήρα του συμπλόκου [32]. Λόγω της ομοιότητάς τους με αυτά, η γεωμετρική διευθέτηση των συμπλόκων αυτών έγινε γνωστή με το όνομα «σκαμπό πιάνου» (riano stool). Ενδιαφέρον προκαλεί η επιλογή του υποκαταστάτη PTA, καθώς προκαλεί πολύ μικρή στερική παρεμπόδιση σε σχέση με άλλους υποκαταστάτες φωσφίνης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η υδατοδιαλυτότητα του συμπλόκου [33]. Οι κυτταροτοξικές μελέτες του RAPTA-C έδειξαν χαμηλή κυτταροτοξικότητα ( $IC_{50} > 300 \mu M$ ) στις περισσότερες κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Παρόλα αυτά, σε *in vivo* μελέτες το σύμπλοκο έδειξε να περιορίζει τις μεταστάσεις καθώς και τον αρχικό όγκο, ενώ ακόμη έδειξε και μειωμένη τοξικότητα [34]. Ο μηχανισμός δράσης του RAPTA-C βασίζεται στην υδρόλυση του συμπλόκου. Όταν το RAPTA-C βρίσκεται στον εξωκυτταρικό χώρο, εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης ανιόντων χλωρίου ο βαθμός υδρόλυσής του είναι πολύ μικρός, σε σύγκριση με όταν βρίσκεται εσωτερικά του κύτταρου, όπου η σημαντικά μικρότερη συγκέντρωση ανιόντων χλωρίου κάνουν το σύμπλοκο να είναι πιο «ευάλωτο» στην υδρόλυση. Με αυτόν τον τρόπο, το RAPTA-C και προστατεύεται μέχρι να εισέλθει στο κύτταρο, αλλά και ενεργοποιείται στον εσωκυτταρικό χώρο. Το RAPTA-C δεν συνδέεται στο DNA σε φυσιολογικές τιμές pH, καθώς υπερσχύει η υδροξο- μορφή του συμπλόκου, ενώ με την μείωση του pH η ύδροξο- μορφή του αντικαθίσταται με την ύδατο-, ανταλλάσσοντας το μόριο του νερού με άζωτο-δότη από τις άζωτούχες βάσεις του DNA. Συνδέεται στο DNA εμφανίζοντας έτσι δραστηριότητα. Σημειώνεται ότι στα καρκινικά κύτταρα επικρατούν τιμές pH ελαφρώς μικρότερες του 7, ενισχύοντας έτσι τη δράση του [31]. Παρά τα παραπάνω, οι μελέτες που έγιναν στη συνέχεια απέδειξαν ότι η βιολογική δραστηριότητα του RAPTA-C δεν οφείλεται στην δημιουργία προϊόντων προσθήκης με το DNA, αλλά μάλλον σε αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες [35].



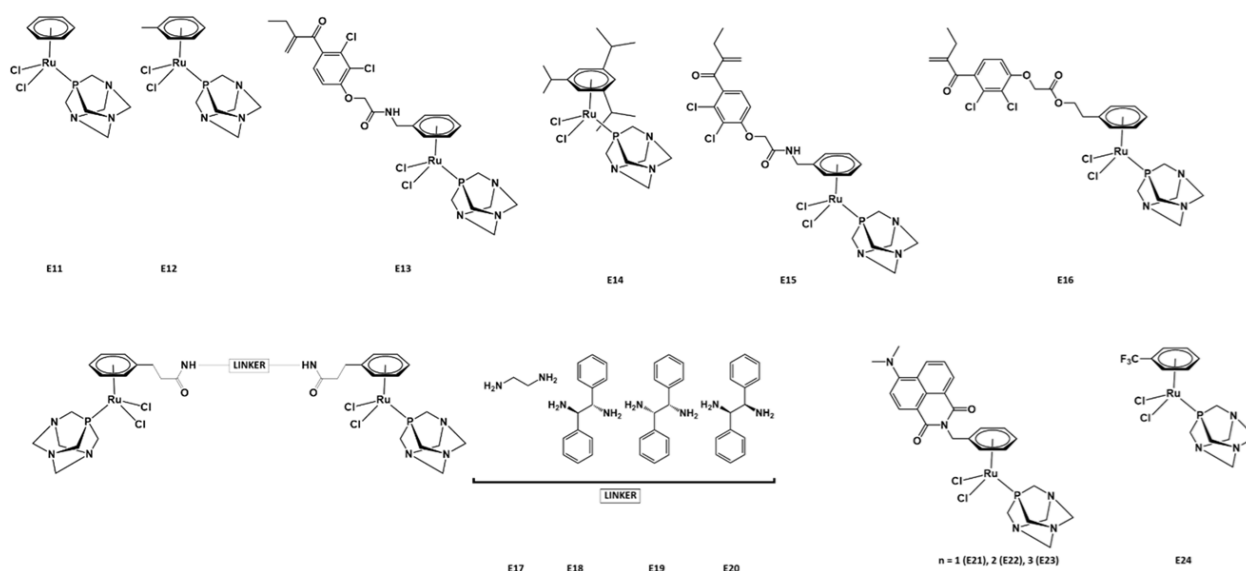
**Εικόνα 1.7.** Συντακτικός τύπος του RAPTA-C (E10) με χρωματική ένδειξη για το πως προκύπτει το όνομα του συμπλόκου.

Διατηρώντας το μεταλλικό κέντρο και τους υποκαταστάτες Cl και PTA με τροποποιήσεις στο αρένιο έχουν συντεθεί διάφορα παράγωγα του RAPTA-C, μερικά από τα οποία απεικονίζονται ενδεικτικά στην Εικόνα 1.8. Όταν το αρένιο τροποποιήθηκε με αιθακρυνικό οξύ, παρατηρήθηκε αναστολή της δράσης της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης GST P1-1, η οποία είναι ένα ένζυμο το οποίο υπερκεφράζεται σε καρκινικά κύτταρα [36]. Ένα άλλο σύμπλοκο, το RAPTA-T στο οποίο ως αρένιο χρησιμοποιείται το τολουόλιο, έδειξε αντιμεταστατικές ιδιότητες στην καρκινική κυτταρική σειρά MDA-MB-231 [37]. Ακόμη,

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

όταν το αρένιο τροποποιήθηκε έτσι ώστε να περιέχει ως υποκαταστάτη έναν ισχυρό δέκτη ηλεκτρονίων, όπως το CF<sub>3</sub>, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικότητας, σε σχέση με το RAPTA-C, η οποία οφείλεται στην ταχύτερη υδρόλυση του αρενίου [38]. Γενικότερα, οι διάφορες μελέτες οι οποίες έχουν διεξαχθεί έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι όσο πιο ογκώδες είναι το αρένιο που χρησιμοποιείται, τόσο μικρότερη είναι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το DNA [39].

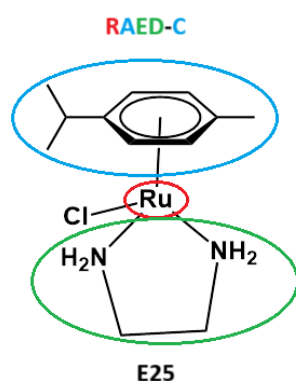
Το ναφθαλιμίδιο είναι μια γνωστή, οργανική κυτταροτοξική ένωση η οποία αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής ανάμεσα στις βάσεις του DNA (intercalation). Αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία ενός αναλόγου συμπλόκου RAPTA, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.8. Το σύμπλοκο είχε βελτιωμένη δραστηριότητα και εκλεκτικότητα προς τα καρκινικά κύτταρα, ενώ ήταν δραστικό και απέναντι στην καρκινική κυτταρική σειρά A2780cis-res, η οποία είναι ανθεκτική έναντι του cisplatin. Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης του συμπλόκου, παρατηρήθηκε ότι το τροποποιημένο με ναφθαλιμίδιο αρένιο παρεμβάλλονταν ανάμεσα στις βάσεις του DNA, ενώ βρέθηκε επίσης ότι κάποιες πρωτεΐνες εντάσσονταν στο Ru(II) [40]. Ακόμη, έχουν συντεθεί και διπυρηνικά σύμπλοκα του ρουθηνίου, με τροποποιημένα αρένια έτσι ώστε να γεφυρώνουν τα δύο μεταλλικά κέντρα. Στη μελέτη αυτή, που πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του P. J. Dyson, χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών γεφυρωτικοί υποκαταστάτες. Στην πρώτη περίπτωση, ως γέφυρα χρησιμοποιήθηκε η αιθυλενοδιαμίνη, η οποία είναι ένας εύκαμπτος υποκαταστάτης, ικανός να υιοθετεί διαφορετικές διαμορφώσεις. Η δεύτερη περίπτωση γεφυρωτικού υποκαταστάτη που χρησιμοποίησε η ερευνητική ομάδα ήταν η 1,2-διαιθυλαιθυλενοδιαμίνη, η οποία αποτελεί έναν πιο άκαμπτο υποκαταστάτη. Εξαιτίας της στερεοχημικής διαμόρφωσης της 1,2-διαιθυλαιθυλενοδιαμίνης προέκυψαν τρία διαφορετικά στερεοϊσομερή (RS, SS, RR). Σύμφωνα με την έρευνα, τα τρία σύμπλοκα με την 1,2-διαιθυλαιθυλενοδιαμίνη είχαν καλύτερη δραστηριότητα, ενώ ήταν δραστικά ακόμη και απέναντι στην καρκινική κυτταρική σειρά A2780cis-res η οποία εμφανίζει ανθεκτικότητα στο cisplatin [41]. Παρά το γεγονός ότι έχουν συντεθεί αρκετά διαφορετικά σύμπλοκα του τύπου [Ru(*η*<sup>6</sup>-arene)Cl<sub>2</sub>(PTA)], το πρώτο (RAPTA-C) παραμένει αυτό με το καλύτερο αντικαρκινικό προφίλ [42].



**Εικόνα 1.8.** Μονοπυρηνικά και διπυρηνικά σύμπλοκα της οικογένειας συμπλόκων RAPTA, παράγωγα του RAPTA-C.

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

Άλλη μία σημαντική κατηγορία συμπλόκων του Ru(II) με αρένια είναι τα μονολειτουργικά, με μία καλώς αποχωρούσα ομάδα χλωρίου και χηλικούς υποκαταστάτες διαμίνες ή διμίνες. Το πιο γνωστό σύμπλοκο αυτής της κατηγορίας είναι το RAED-C (Εικόνα 1.9), το οποίο συντέθηκε για πρώτη φορά από την ερευνητική ομάδα του P. J. Sadler το 2001 [43]. Όπως και το RAPTA-C, έτσι και το RAED-C είναι σύμπλοκο του Ru(II) με γεωμετρία “riano stool”. Και σε αυτή την περίπτωση ως αρένιο χρησιμοποιήθηκε το *cym*, και μια χηλικά ενταγμένη αιθυλενοδιαμίνη (*en*). Την εναπομείνασα θέση ένταξης του μεταλλικού κέντρου καταλαμβάνει ένας υποκαταστάτης χλωρίου. Το RAED-C έδειξε να εμφανίζει υψηλή κυτταροτοξικότητα ενάντια σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, ακόμα και εάν αυτές ήταν ανθεκτικές έναντι του *cisplatin* [44]. Όπως και για το *cisplatin*, τα σύμπλοκα του τύπου RAED μπορούν να σχηματίσουν προϊόντα προσθήκης με το DNA, αφού πρώτα υδρολυθούν προς σχηματισμό  $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{en})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ . Διάφορες τροποποιήσεις έχουν γίνει στο αρχικό RAED-C, όπως για παράδειγμα η χρήση διαφορετικών αρενίων ή διαφορετικού χηλικού υποκαταστάτη με σκοπό τη βελτίωση των χαρακτηριστικών του συμπλόκου. Έτσι, όταν ως αρένιο χρησιμοποιήθηκε το διφαινύλιο, βρέθηκε ότι το σύμπλοκο συνδέεται αποκλειστικά με αζωτούχες βάσεις γουανίνης και με κανένα άλλο νουκλεοτίδιο που φέρει άλλη αζωτούχα βάση. Η σύνδεση γίνεται μέσω του N7 της γουανίνης, ενώ υποβοηθητικά στο σχηματισμό του προϊόντος προσθήκης δρα και ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του καρβονυλικού οξυγόνου του C6 της γουανίνης και του υδρογόνου της αμινομάδας της *en*. Ακόμη, όταν το χρησιμοποιούμενο αρένιο έχει ένα εκτεταμένο αρωματικό σύστημα, όπως για παράδειγμα το διυδροανθρακένιο, μπορεί να αλληλεπιδράσει με το DNA μέσω παρεμβολής μεταξύ των βάσεων, δρώντας έτσι επικουρικά στον σχηματισμό προϊόντων προσθήκης [45]. Εάν στη θέση της ουδέτερης *en* χρησιμοποιηθεί ένας ανιονικός υποκαταστάτης, όπως για παράδειγμα η ακετυλακετόνη, αυξάνεται η ταχύτητα υδρόλυσης, όπως και το  $pK_a$  του συμπλόκου. Ακόμη, διαφοροποιείται και η εκλεκτικότητα του συμπλόκου όσον αφορά τις αζωτούχες βάσεις που «προτιμάει». Έτσι, είναι δυνατός ο σχηματισμός δεσμού τόσο με το N7 όσο και με το N1 της αδενίνης, σε βαθμό, μάλιστα, συγκρίσιμο με το N7 της γουανίνης, ενώ, ακόμα, παρατηρείται και σχηματισμός δεσμών με κυτοσίνες ή θυμίνες [46].



**Εικόνα 1.9.** Συντακτικός τύπος του RAED-C (E25) με χρωματική ένδειξη για το πως προκύπτει το όνομα του συμπλόκου.

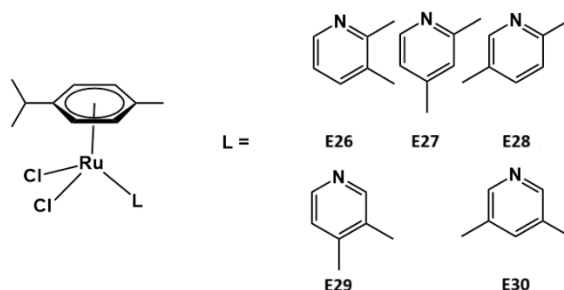
Εκτός από μονολειτουργικά σύμπλοκα τύπου RAED από την ομάδα του P. J. Sadler, έχουν συντεθεί και άλλα σύμπλοκα του Ru(II) με αρένια, χλώρια και υποκαταστάτες με άτομα δότες αζώτου όπως το διλειτουργικό  $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{NH}_3)\text{Cl}_2]$  (όπου  $\eta^6\text{-arene}$  = *cym* ή διφαινύλιο) που είναι επίσης εμπνευσμένες από το *cisplatin*. Παρόλο που τα σύμπλοκα έδειξαν να υδρολύονται ταχύτατα προς σχηματισμό του

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

διύδατο παραγώγου, τα κυτταροτοξικά αποτελέσματα έδειξαν ότι ήταν πρακτικά αδρανή απέναντι στην καρκινική κυτταρική σειρά A2780. Εικάζεται ότι αιτία του παραπάνω είναι η υψηλή δραστηριότητα των συμπλόκων με διάφορες ενδοκυτταρικές ενώσεις, με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή τους [47].

Τα σύμπλοκα με γενικό τύπο  $[(\eta^6\text{-arene})\text{Ru}(\text{LCl})\text{PF}_6]$ , όπως ως αρένιο έχει χρησιμοποιηθεί το βενζόλιο ή το *cym*, ενώ ως υποκαταστάτης L χρησιμοποιήθηκε η 2(2'-πυριδυλ)κινολίνη (*rqh*) έχουν μελετηθεί από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας. Για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση τέτοιου είδους συμπλόκων με το DNA, χρησιμοποιήθηκε η 9-μεθυλογουανίνη (9-MeG), η οποία εντάσσεται στο μεταλλικό κέντρο μέσω του N7, κατόπιν της υδρόλυσης του χλωρίου. Οι μελέτες με φασματοσκοπία NMR έδειξαν ότι πέρα από την ένταξη, προκαλούνται και άλλες μεταβολές στη δομή της 9-MeG, εξαιτίας της εγγύτητας στο αρωματικό σύστημα του υποκαταστάτη *rqh*. Η σημαντικότερη μεταβολή που σημειώθηκε ήταν η παρεμπόδιση της ελεύθερης περιστροφής της 9-MeG ως αποτέλεσμα του μεγέθους της *rqh* και των αλληλεπιδράσεων που αναπτύχθηκαν μεταξύ των δύο [48]. Επίσης, όσον αφορά τα δομικά ανάλογα  $[(\eta^6\text{-cym})\text{Ru}(\text{pqx})\text{Cl}]\text{Cl}$  και  $[(\eta^6\text{-cym})\text{Ru}(\text{rbqx})\text{Cl}]\text{Cl}$  (*pqx* = 2(2'-πυριδυλ)κινόξαλίνη, *rbqx* = 2-(2'-πυριδυλ)βενζο[*g*]κινόξαλίνη) πραγματοποιήθηκαν μελέτες, μέσω NMR, με σκοπό τη διευκρίνιση των μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων των συμπλόκων αυτών με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'\text{-CGCGCG-3}')_2$ . Τα δύο σύμπλοκα αυτά βρέθηκε ότι προκαλούν σημαντικές μεταβολές στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του εξανουκλεοτιδίου, οι οποίες, μάλιστα, μπορούν να αποδοθούν στις χηλικούς υποκαταστάτες *rqx* και *rbqx*, καθώς η αλληλεπίδραση του εξανουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο  $[(\eta^6\text{-cym})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]\text{Cl}$  δεν προκάλεσε αντίστοιχες μεταβολές. Και τα δύο σύμπλοκα φάνηκε ότι δεσμεύονται στη μικρή αύλακα του DNA με το δεύτερο σύμπλοκο, αυτό της *rbqx*, να αλληλεπιδρά ισχυρότερα. Και στις δύο περιπτώσεις, η αλληλεπίδραση είχε ως αποτέλεσμα τη επιμήκυνση ή τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου της διπλής έλικας του ολιγονουκλεοτιδίου. Καθώς βρέθηκε ότι τα σύμπλοκα αυτά σε φυσιολογικές συνθήκες δεν υπόκεινται υδρόλυση, και ότι είναι αρκετά κυτταροτοξικά απέναντι σε κυτταρικές σειρές όπως K562 και MCF-7, μπορεί να θεωρηθεί ότι εάν η παρατηρούμενη κυτταροτοξικότητα οφείλετε σε αλληλεπιδράσεις των συμπλόκων με το DNA, αυτές είναι μη-ομοιοπολικές [49].

Άλλο ένα παράδειγμα ενώσεων του Ru(II) με αρένια που έχουν μελετηθεί ενδελεχώς είναι αυτές που φέρουν ως υποκαταστάτες (εκτός από τους δύο υποκαταστάτες χλωρίου) μία υποκατεστημένη πυριδίνη. Τέτοιου είδους ενώσεις συνέθεσε και μελέτησε η ερευνητική ομάδα της V. Moreno το 2012. Τα σύμπλοκα αυτά βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με το DNA, προκαλώντας αλλαγές τόσο στην δευτεροταγή, όσο και στην τριτοταγή δομή του, ενώ ακόμη είχαν υποσχόμενα κυτταροτοξικά αποτελέσματα [50].

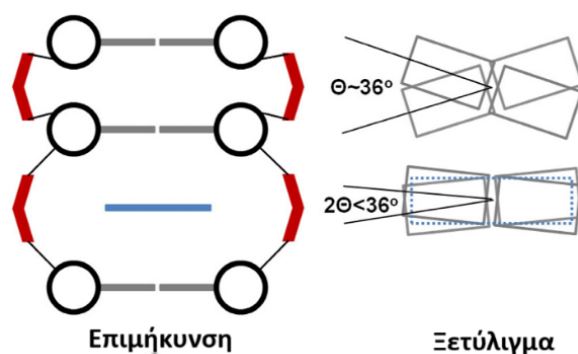


**Εικόνα 1.10:** Οργανομεταλλικά σύμπλοκα του Ru(II) με υποκατεστημένες πυριδίνες.

### 1.2. Μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το DNA:

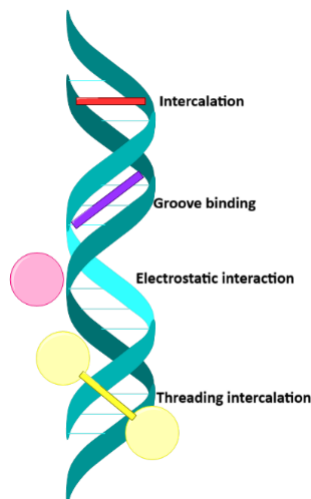
## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

Εκτός από την αλληλεπίδραση μέσω ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (covalent or coordinative interactions) που περιγράφηκε παραπάνω, κυρίως αλκυλιωτικών ενώσεων και συμπλόκων, σημαντικό ενδιαφέρον έχουν προσελκύσει οι ενώσεις που αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (non-covalent interactions). Υπάρχουν τρία βασικά είδη μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με το DNA. Η κυριότερη από αυτές είναι η παρεμβολή ενός αρωματικού συστήματος δακτυλίων μεταξύ των βάσεων του DNA (intercalation). Για να συμβεί αυτό, ένα εκτενές αρωματικό σύστημα παρεμβάλλεται μερικώς μεταξύ των διαδοχικών βάσεων της διπλής έλικας του DNA [51]. Υπάρχουν δύο βασικά είδη παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του DNA. Το πρώτο είναι η κλασική παρεμβολή, κατά την οποία το μόριο-παρεμβολέας (ή το αρωματικό του μέρος) παρεμβάλλεται μεταξύ των διαδοχικών βάσεων του DNA. Το δεύτερο είδος παρεμβολής αφορά τη λεγόμενη «νηματώδη» παρεμβολή (threading intercalation). Η νηματώδης παρεμβολή γίνεται, συνήθως, από μόρια που περιέχουν και πολικές ομάδες στη δομή τους, και σε αντίθεση με την κλασική παρεμβολή, που περιγράφηκε νωρίτερα, το μόριο εισέρχεται στη δομή του DNA με τις πολικές ομάδες του να προεξέχουν έξω από τη διπλή έλικα [52,53]. Αποτέλεσμα της παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του DNA είναι η περαιτέρω αύξηση του μήκους της μικρής ή μεγάλης άυλακας του DNA, η συνολική επιμήκυνση του μορίου και το ξετύλιγμα της διπλής έλικας. Το τοπικό ξετύλιγμα της διπλής έλικας που προκαλείται από την παρεμβολή μπορεί να φτάσει μέχρι και το 50% της στροφής της έλικας. Η παρεμβολή ενός μικρού μορίου μεταξύ των βάσεων του DNA προκαλεί δομικές μεταβολές στην διπλή έλικα, περιορίζοντας έτσι την ικανότητά της να συμμετέχει σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η μεταγραφή. Το εύρος του ξετυλίγματος που προκαλεί η σύνδεση του μορίου - παρεμβολέα εξαρτάται από το ίδιο το μόριο, και μπορεί να φτάσει να διπλασιάσει την απόσταση που κανονικά υπάρχει μεταξύ των γειτονικών βάσεων DNA. Ένα μόριο ή ένα σύμπλοκο μπορεί να έχει μία, δύο ή και περισσότερες ομάδες που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA. Κάθε ξεχωριστή παρεμβολή οδηγεί σε όλα τα προαναφερθέντα δομικά αποτελέσματα [54]. Η σταθερά πρόσδεσης για αυτού του τύπου τις αλληλεπιδράσεις με το DNA κυμαίνονται από  $10^5$  έως  $10^{11}$   $M^{-1}$  [52]. Για να επιτευχθεί η κατάσταση ισορροπίας κατά την παρεμβολή ενός κλασικού μορίου παρεμβολέα, όπως για παράδειγμα το βρωμιούχο αιθίδιο (EB), απαιτείται ένα χρονικό διάστημα το οποίο κυμαίνεται από χιλιοστά του δευτερολέπτου έως μερικά δευτερόλεπτα. Το intercalation ως όρος χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για να περιγραφεί ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης της ακριδίνης με το DNA. Η παρεμβολή ενός μορίου μεταξύ των βάσεων του DNA, το οποίο μόριο μπορεί να είναι είτε κατιονικό είτε ουδέτερο, διακόπτει την γενετική πληροφορία που περιέχεται στο γονιδίωμα και για αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί ως παράγοντας μετάλλαξης ή κυτταροτοξικότητας [54].



**Εικόνα 1.11:** Το αποτέλεσμα της παρεμβολής ενός μορίου μεταξύ των βάσεων της διπλής έλικας του DNA [54].

Ένας δεύτερος τρόπος μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης ενός μορίου με το DNA είναι η δέσμευση στις αύλακές του (groove binding). Τα μόρια που δεσμεύονται στις αύλακες του DNA έχουν συνήθως σχήμα ημισέληνου, και η δέσμευσή τους στις αύλακες του DNA μπορεί να συμβεί είτε στη μικρή είτε στη μεγάλη αύλακα. Τα μόρια που αλληλεπιδρούν με αυτόν τον τρόπο με το DNA συγκρατούνται μέσω αλληλεπιδράσεων Van der Waals και δεσμών υδρογόνου, κατά κύριο λόγο. Δύο παράγοντες που καθορίζουν εάν η δέσμευση θα γίνει στη μεγάλη ή στη μικρή αύλακα του DNA είναι το μέγεθος και το σχήμα του μορίου. Ως επί το πλείστον, τα μόρια που δρουν με αυτόν τον τρόπο εμφανίζουν προτίμηση για τη μικρή αύλακα του DNA, και πιο συγκεκριμένα σε περιοχές πλούσιες σε βάσεις αδενίνης και θυμίνης. Η προτίμηση στην μικρή αύλακα, οφείλεται, κυρίως, στην μεγαλύτερη πληθώρα και εγγύτητα των σημείων όπου μπορούν να σχηματιστούν δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του μορίου και του DNA, καθώς, επίσης, και στο ευνοϊκό ηλεκτροστατικό δυναμικό. Η σταθερά πρόσδεσης ενός μορίου στην αύλακα του DNA είναι συνήθως μεγαλύτερη από  $10^4$ - $10^6$   $M^{-1}$  [52]. Τέλος, το τρίτο βασικό είδος μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με το DNA είναι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που είναι και ο πιο ασθενείς από τους τρεις τρόπους ( $K_b \approx 10^2$ - $10^4$   $M^{-1}$ ) [51].



**Εικόνα 1.12:** Μη-ομοιοπολικοί τρόποι αλληλεπίδρασης μικρών μορίων και σύμπλοκων ενώσεων με το DNA.

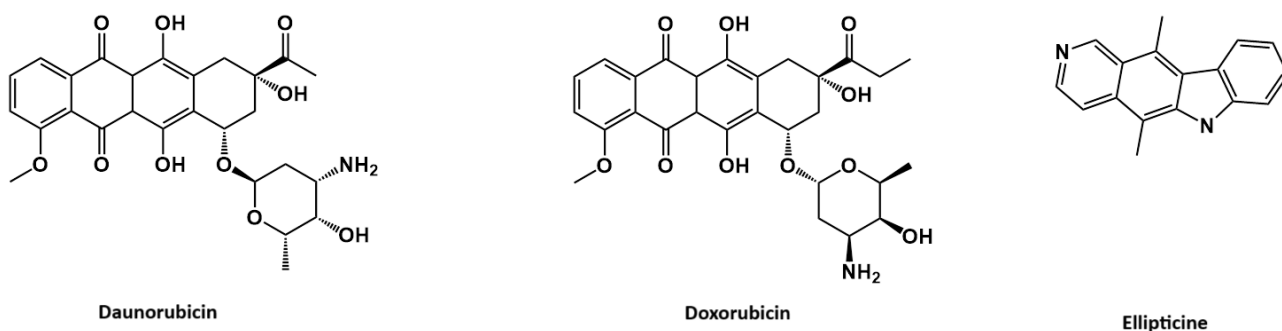
Η δαουνορουβικίνη (daunorubicin) (Εικόνα 1.13) είναι μία οργανική ένωση η οποία είναι εγκεκριμένη από τον FDA για χορηγία σε καρκινοπαθείς, οι οποίοι πάσχουν από λευχαιμία. Ανήκει στη γενική κατηγορία των ανθρακυκλίνων (anthracyclines) και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με κυταραβίνη (cytarabine) εδώ και 45 περίπου χρόνια και παράγεται από τους μικροοργανισμούς *Streptomyces cerulorubidus* και *Streptomyces peucetius*. Η δαουνορουβικίνη προκαλεί κυτταρικό θάνατο μέσα από διάφορους μηχανισμούς δράσης. Ένας από αυτούς είναι η αλληλεπίδραση με το DNA μέσω παρεμβολή μεταξύ των βάσεων του του τετρακυκλικού αρωματικού συστήματος που έχει ως αποτέλεσμα να αναστέλλει την λειτουργία της τοποϊσομεράσης II με συνέπεια να οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο [55].

Ένα από τα σχετικά ευρέως χρησιμοποιούμενα στην αντικαρκινική θεραπεία φάρμακα που δρουν μέσω παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του DNA είναι η δοξορουβικίνη (doxorubicin) (Εικόνα 1.13), η οποία είναι ένα ύδροξυ παράγωγο της δαουνορουβικίνης. Η δοξορουβικίνη είναι εγκεκριμένη από τον FDA και

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού, καρκίνωμα, σάρκωμα, και αιματολογικές κακοήθειες. Παρά την σχετικά ευρεία χρήση της ως φάρμακο, η δοξορουβικίνη προκαλεί και αρκετές παρενέργειες στους ασθενείς, με την πιο σημαντική από αυτές να είναι η καρδιοτοξικότητα, ενώ προκαλεί ζημιές και σε άλλα ζωτικά όργανα, όπως ο εγκέφαλος, το συκώτι και τα νεφρά. Στην παρεμβολή της δοξορουβικίνης μεταξύ των βάσεων του DNA δρουν υποβοηθητικά και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζει το μόριο με αλληλουχίες CG. Η παρεμβολή του δοξορουβικίνης μεταξύ των βάσεων του DNA οδηγεί σε ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA και αλλαγές στην τοπολογία του DNA. Φυσικά, η αλληλεπίδραση με το DNA και η πρόκληση βλαβών σε αυτό δεν είναι ο μοναδικός τρόπος με τον οποίο η δοξορουβικίνη μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο, καθώς έχουν μελετηθεί και περιγραφεί και διάφοροι άλλοι τρόποι δράσης του φαρμάκου, όπως αναστολή της λειτουργία των τοποϊσομερασών I και II [56]. Διάφορα ακόμα παράγωγα των ανθακυκλίνων βρίσκονται σε κλινική χρήση για τη θεραπεία ποικίλων μορφών καρκίνου. Μερικά από αυτά είναι η ιδαρουβικίνη (idarubicin) που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία οξείας μυελογενούς λευχαιμίας και η βαλρουβικίνη (valrubicin), η οποία χρησιμοποιείται για τη διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης [57].

Ακόμη μία οργανική ένωση με αντικαρκινική δραστηριότητα είναι η ελλiptικίνη (ellipticine) (Εικόνα 1.13). Η ελλiptικίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1959 από το φυτό *Ochrosia elliptica* Labill και μπορεί να απομονωθεί και από άλλα φυτά που ανήκουν στην ίδια οικογένεια με το παραπάνω (Aporcynaceae). Το μόριο της ένωσης αποτελείται από ένα σύστημα τεσσάρων συντηγμένων (fused) δακτυλίων, αποτελούμενο ουσιαστικά από μία μονάδα ινδόλης και μία μονάδα ισοκινολίνης ενωμένες μεταξύ τους. Αποτέλεσμα είναι η επιπεδότητα του μορίου που το καθιστά ικανό να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Φυσικά, όπως και στα προηγούμενα μόρια που συζητήθηκαν, αυτός δεν είναι ο μοναδικός τρόπος δράσης του μορίου, καθώς, ακόμη, αναστέλλει την τοποϊσομεράση II, σχηματίζει προϊόντα προσθήκης με το DNA, ενώ έχει και άλλους μηχανισμούς δράσης, οι οποίοι δεν θα αναπτυχθούν εδώ. Η ελλiptικίνη είναι δραστική ενάντια σε διάφορες μορφές καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του ήπατος, η λευχαιμία, ο καρκίνος του πνεύμονα κ.α [58].

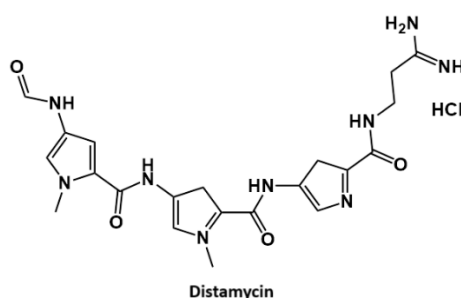


**Εικόνα 1.13:** Συντακτικοί τύποι των ενώσεων δαουνορουβικίνη, δοξορουβικίνη, ακτινομυκίνη D και ελλiptικίνη.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, εκτός της παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του DNA, η δέσμευση στις αύλακες του DNA είναι άλλος ένας τρόπος με τον οποίο μία ένωση δυνητικά αντικαρκινική μπορεί να αλληλεπιδράσει με το DNA. Όσον αφορά τις οργανικές ενώσεις που είναι γνωστές για αυτού του είδους την αλληλεπίδραση με το DNA, αυτές μπορεί να είναι είτε συνθετικής είτε φυσικής προέλευσης, και όπως είναι γνωστό, αλληλεπιδρούν κατά προτίμηση με αλληλουχίες DNA πλούσιες σε

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

αδενίνη και θυμίνη και από την πλευρά της μικρή αύλακα. Το κύριο δομικό χαρακτηριστικό όλων των ενώσεων που δρουν με αυτόν το τρόπο είναι η ύπαρξη ενός αρωματικού συστήματος κοίλου σχήματος (ημισέληνο) το οποίο να εφαρμόζει στη μικρή αύλακα του DNA. Ακόμη, η ένωση θα πρέπει να είναι ικανή να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τις χαρακτηρίστηκες ομάδες των νουκλεϊκών βάσεων καθώς αυτό σταθεροποιεί τη δέσμευση στην αύλακα. Επιπροσθέτως, οι περιοχές του DNA που είναι πλούσιες σε βάσεις αδενίνης και θυμίνης εμφανίζουν υψηλότερο αρνητικό δυναμικό. Έτσι, μια θετικά φορτισμένη ένωση είναι ικανή να αλληλεπιδράσει αποτελεσματικά με το μόριο του DNA σε αυτό το σημείο. Η δυσταμυκίνη (distamycin) (Εικόνα 1.14) είναι μία φυσικά παραγόμενη ένωση που απομονώνεται από τον μικροοργανισμό *Streptomyces distallicus*, και αλληλεπιδρά με το DNA μέσω δέσμευσης στη μικρή αύλακα. Η δυσταμυκίνη αποτελείται από τρεις πυρρολικούς δακτυλίους που ενώνονται με αμιδικούς δεσμούς μεταξύ τους, ενώ περιέχει και μία αμιδική πλευρική αλυσίδα, η οποία παίζει κρίσιμο ρόλο στην αλληλεπίδραση με το DNA, καθώς αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με αυτό. Έτσι λοιπόν, η παρουσία αμιδομάδων σε συνδυασμό με την θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα δίνουν τη δυνατότητα στο μόριο της δυσταμυκίνης να αλληλεπιδρά και να δεσμεύεται στη μικρή αύλακα του DNA. Αυτό συμβαίνει διότι στη μικρή αύλακα υπάρχει τοπικά περισσότερο αρνητικό φορτίο συγκεντρωμένο, εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων που είναι συγκεντρωμένες σε μικρότερο χώρο σε σχέση με τη μεγάλη αύλακα. Έτσι λοιπόν, οι ομάδες του μορίου της δυσταμυκίνης, που είναι περισσότερο θετικές μπορούν να αλληλεπιδράσουν αποτελεσματικά με το συγκεκριμένο μέρος του DNA. Παρά όλα τα παραπάνω, η δυσταμυκίνη δεν εμφανίζει θεραπευτική κυτταροτοξικότητα αυτή καθ' αυτή, αλλά αυξάνει δραματικά την αντικαρκινική δραστηριότητα άλλων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων όταν συγχωρηγείται [59].



**Εικόνα 1.14:** Συντακτικός τύπος της δυσταμυκίνης.

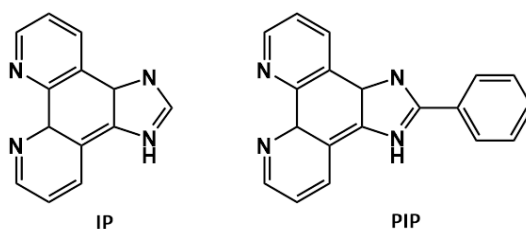
### **1.2.1. Σύμπλοκα μετάλλων της 1<sup>ης</sup> σειράς των στοιχείων μετάπτωσης που αλληλεπιδρούν μη-ομοιοπολικά με το DNA:**

Από τα παραπάνω είναι εύκολα αντιληπτό ότι οι μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με το DNA είναι ένα μεγάλο κεφάλαιο στην έρευνα για κυτταροτοξικές ενώσεις. Προηγουμένως παρουσιάστηκαν κάποια παραδείγματα οργανικών ενώσεων με τον συγκεκριμένο τρόπο δράσης. Φυσικά όμως, η μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το DNA είναι κάτι που έχει απασχολήσει έντονα ανά τα έτη και τον τομέα της βιοανόργανης χημείας. Οι σύμπλοκες ενώσεις που αλληλεπιδρούν ομοιοπολικά με το DNA (όπως το cisplatin), εμφανίζουν μειονεκτήματα, όπως η υψηλή τους τοξικότητα, το χαμηλό όριο δοσολογίας, η φαρμακοανθεκτικότητα που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα η μη αντιστρεπτή δέσμευσή τους κλπ, τα οποία σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τον τρόπο δράσης τους [60]. Έτσι, σύμπλοκα μετάλλων της 1<sup>ης</sup> σειράς έχουν προσφέρει εναλλακτικές στα παραπάνω με τη μη-ομοιοπολική δέσμευσή τους στο DNA.

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

Μία από τις αναφορές σχετικά με σύμπλοκα μετάλλων της πρώτης σειράς μετάπτωσης τα οποία να αλληλεπιδρούν μη-ομοιοπολικά μέσω των υποκαταστατών τους με το DNA είναι αυτή των Mahadevan και Palaniandavar του 1997. Σε αυτή, γίνεται λόγος για την αλληλεπίδραση συμπλόκων του Cu(II) με θειοθερικούς υποκαταστάτες με CT-DNA. Το επίπεδης τετραγωνικής γεωμετρίας σύμπλοκο [Cu(pdto)]<sup>2+</sup> βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά ισχυρότερα με το DNA σε σχέση με άλλα μη επίπεδα τετραγωνικά σύμπλοκα μέσω μερικής παρεμβολής των πυριδινικών δακτυλίων του υποκαταστάτη του, μεταξύ των βάσεων του DNA [61].

Σε μία μελέτη που αφορά σύμπλοκες ενώσεις του Co(III) της ομάδα του Zhang από το 2001, συντέθηκαν, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τα δύο εξής σύμπλοκα: [Co(phen)IP]<sup>3+</sup> και [Co(phen)PIP]<sup>3+</sup>. Η αλληλεπίδραση των δύο ενώσεων με το DNA μελετήθηκε με διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές και βρέθηκε ότι και οι δύο παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA μέσω των υποκαταστατών IP και PIP (Εικόνα 1.15). Παρόλα αυτά, η παρεμβολή του δεύτερου συμπλόκου, που φέρει το PIP ως υποκαταστάτη δηλαδή αντί για το IP, είναι αποτελεσματικότερη. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο εκτενέστερο αρωματικό σύστημα του PIP σε σχέση με το IP [62].



**Εικόνα 1.15:** Οι υποκαταστάτες IP (imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline) και PIP (2-phenylimidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline).

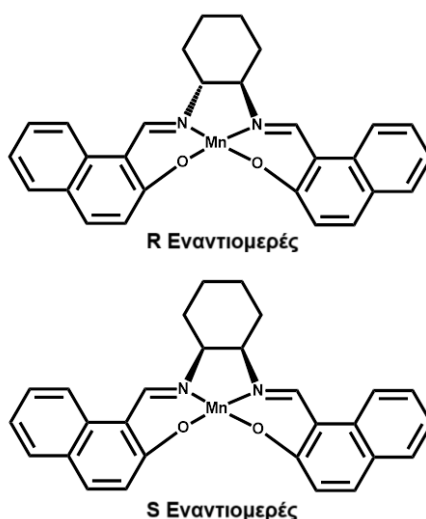
Σε μεταγενέστερη μελέτη, του 2002, από την ερευνητική ομάδα του L. Ji, συντέθηκαν, χαρακτηρίστηκαν και μελετήθηκαν σύμπλοκα του Cu(II) με μακροκυκλικούς υποκαταστάτες αζώτου, τα οποία βρέθηκε ότι έχουν διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης με το DNA παρά την ομοιότητα της δομής τους. Ο υποκαταστάτης του πρώτου συμπλόκου έφερε στην άκρη της δομής του δύο πυριδινικούς δακτυλίους οι οποίοι παρεμβάλλονταν μερικώς μεταξύ των βάσεων του DNA. Στο δεύτερο σύμπλοκο της σειράς, οι πυριδινικοί δακτύλιοι του υποκαταστάτη έχουν αντικατασταθεί από μικρές αλειφατικές αλυσίδες που φέρουν ομάδες κυανίου στην άκρη τους. Αποτέλεσμα αυτής της τροποποίησης ήταν ότι χάθηκε η ικανότητα για παρεμβολή μεταξύ των βάσεων και πλέον το σύμπλοκο αλληλεπιδρούσε με το DNA μέσω δεσμών υδρογόνου και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Περαιτέρω τροποποίηση της δομής του υποκαταστάτη, και πιο συγκεκριμένα αντικατάσταση των κυανομάδων της άκρης της δομής του με υδροξυλομάδες, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας του συμπλόκου για σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με το μόριο του DNA. Έτσι λοιπόν, αντλήθηκε το συμπέρασμα ότι οι λειτουργικές ομάδες στην πλευρική αλυσίδα του υποκαταστάτη παίζουν ρόλο-κλειδί στον τρόπο και την ικανότητα αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA [63].

Το 2005 η ερευνητική ομάδα του S. Kumbhar μελέτησε την αλληλεπίδραση συμπλόκων του Co(III) του γενικού τύπου [Co(en)<sub>2</sub>L]Br<sub>3</sub> με το DNA (όπου L = phen ή 2,2'-bpy ή phendione ή dprrz). Τα σύμπλοκα και των τεσσάρων υποκαταστατών βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν μέσω παρεμβολής μεταξύ των βάσεων με το DNA και μάλιστα οι ερευνητές ήταν ικανοί να κατατάξουν τους υποκαταστάτες σύμφωνα με την ικανότητά

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

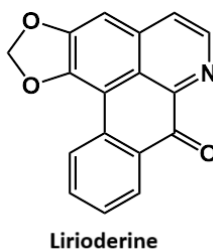
τους για παρεμβολή. Ο πιο ικανός υποκαταστάτης για τον συγκεκριμένο τρόπο αλληλεπίδρασης ήταν το dpprz, ακολουθούμενο από τη rhen, τη rhendione και την bry με τη σειρά που αναγράφονται. Η μεγαλύτερη ικανότητα συμπλόκων που φέρουν το dpprz ως υποκαταστάτη για intercalation επιβεβαιώνεται και από μελέτη του 2012 από την ομάδα του M. Palaniandavar, η οποία συνέθεσε μια σειρά συμπλόκων του Cu(II) με υποκαταστάτες διμίνης. Ως υποκαταστάτες διμίνης χρησιμοποιήθηκαν η 2,2'-bry, η rhen, η drq, το dpprz και το dmdpprz. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, τα σύμπλοκα της drq και του dpprz αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με το DNA μέσω μερικής παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του σε σύγκριση με τα υπόλοιπα σύμπλοκα, με  $K_b$  ίσες με  $1.4 \times 10^6$  και  $1.35 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Αυτό αποδόθηκε στο εκτενέστερο αρωματικό σύστημα των δύο υποκαταστατών σε σύγκριση με τους υπόλοιπους [64].

Σε μελέτη του 2009 η ερευνητική ομάδα του L. Zhu συνέθεσε σύμπλοκα του Mn(III) με χηλικούς υποκαταστάτες και μελέτησαν την αλληλεπίδρασή τους με το DNA μέσω διαφόρων φασματοσκοπικών τεχνικών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας όλα τα σύμπλοκα αλληλεπιδρούν μέσω παρεμβολής με το DNA. Η αλληλεπίδραση, μάλιστα, επηρεάζεται από τον εκάστοτε χηλικό υποκαταστάτη, και πιο συγκεκριμένα το σύμπλοκο του Mn(III) με το R εναντιομερές να του παρεμβάλλεται αποτελεσματικότερα μεταξύ των βάσεων του DNA σε σχέση με το S εναντιομερές [65].



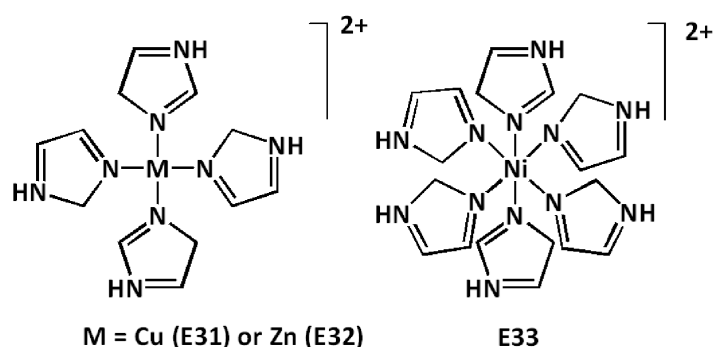
**Εικόνα 1.16:** Σύμπλοκα του Mn(III) τα οποία παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA. Απεικονίζονται τα δύο ισομερή του συμπλόκου, R και S [65].

Επίσης το 2009, η ομάδα του C. Orvig, απομόνωσε την λιριοδερίνη (lirioderine, Εικόνα 1.17) από το φυτό *Zanthoxylum nitidum*. Η λιριοδερίνη έδειξε αξιολογικά αποτελέσματα όσον αφορά την αντικαρκινική της δραστηριότητα. Η δομή της φαίνεται στην εικόνα 1.16. Οι ερευνητές, στη συνέχεια, χρησιμοποίησαν το μόριο ως υποκαταστάτη για τη σύνθεση συμπλόκων του Mn(II), του Fe(II), του Co(II) και του Zn(II), τα οποία αφού απομόνωσαν, μελέτησαν σχετικά με την αλληλεπίδρασή τους με το DNA. Ως μοντέλο DNA χρησιμοποίησαν το CT-DNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα σύμπλοκα στα οποία οι δύο υποκαταστάτες λιριοδερίνης είναι στο ίδιο επίπεδο μεταξύ τους αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής, και μάλιστα αποτελεσματικότερα από τον ελεύθερο υποκαταστάτη. Επιπροσθέτως τα σύμπλοκα είχαν καλύτερα κυτταροτοξικά αποτελέσματα και από το cisplatin [66].



**Εικόνα 1.17:** Συντακτικός τύπος της λιριοδερίνης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως υποκαταστάτης για τη σύνθεση συμπλόκων του Mn(II), του Fe(II), του Co(II) και του Zn(II) τα οποία αλληλεπιδρούν μη-ομοιοπολικά με το DNA.

Σε έρευνα του 2011 από την ομάδα του S. He, αναφέρεται η πλήρης σύνθεση και ο χαρακτηρισμός τριών νέων συμπλόκων, ένα του Cu(II), ένα του Zn(II) και ένα του Ni(II) με ιμιδαζολικούς υποκαταστάτες και υπερχλωρικά αντισταθμιστικά ιόντα. Η δομή των συμπλόκων φαίνεται στην Εικόνα 1.18. Η αλληλεπίδραση των παραπάνω συμπλόκων με CT-DNA μελετήθηκε με φασματοσκοπία UV-Vis. Η προσθήκη CT-DNA στα δείγματα των τριών συμπλόκων είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης της απορρόφησης και για τα τρία σύμπλοκα (υπερχρωμισμός). Έτσι, οι ερευνητές απέρριψαν την περίπτωση τα σύμπλοκα να αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής μεταξύ των βάσεων, καθώς είναι γνωστό ότι σε αυτή την περίπτωση η προσθήκη CT-DNA στα δείγματα των συμπλόκων θα οδηγούσε σε μείωση της παρατηρούμενης έντασης της απορρόφησης (υποχρωμισμός). Καθώς είχε ήδη μελετηθεί η σταθερότητα των συμπλόκων και είχε αποκλειστεί έτσι η πιθανότητα υδρόλυσης και ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης με το DNA, οι ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι τα σύμπλοκα αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω δέσμησης στις αλυσίδες του, η οποία καθίσταται δυνατή από την παρουσία των N στη δομή του συμπλόκου (στους υποκαταστάτες ιμιδαζολίου), τα οποία μπορούν και σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις καρβονυλομάδες των αζωτούχων βάσεων του DNA. Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας, το σύμπλοκο του χαλκού είχε την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το DNA, ακολουθούμενο από το σύμπλοκο του ψευδαργύρου και τέλος από το σύμπλοκο του νικελίου. Το παραπάνω αποδόθηκε στη διαφορετική γεωμετρία που υιοθετούν τα τρία σύμπλοκα. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο του χαλκού είναι επίπεδο τετραγωνικό, με συνέπεια να εμφανίζει μειωμένες στερικές παρεμποδίσεις σε σύγκριση με τα άλλα δύο σύμπλοκα. Επίσης το παραμορφωμένο τετραεδρικό σύμπλοκο του ψευδαργύρου, αν και παρεμποδίζεται στερικά περισσότερο από αυτό του χαλκού, η παρεμπόδιση αυτή είναι μικρότερη από το παραμορφωμένο οκταεδρικό σύμπλοκο του νικελίου, με αποτέλεσμα την ισχυρότερη αλληλεπίδραση του πρώτου με το DNA [67].



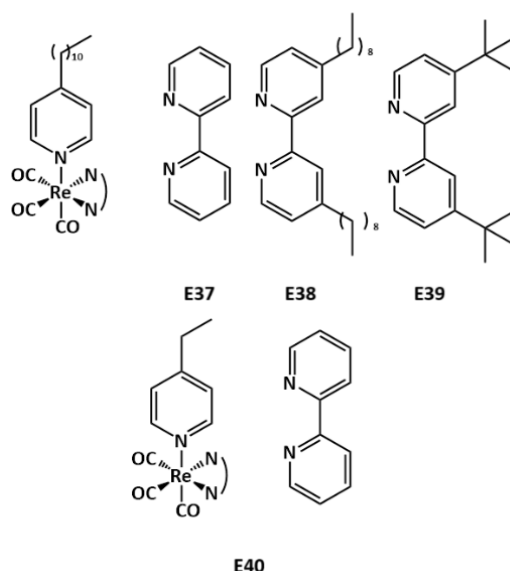
**Εικόνα 1.18:** Σύμπλοκα του Cu(II) (E31), του Zn(II) (E32) και του Ni(II) (E33) με ιμιδαζολικούς υποκαταστάτες.

Μία παρόμοια έρευνα με την προαναφερθείσα έγινε το 2011 επίσης, από την ομάδα του S. Zhao. Οι ερευνητές συνέθεσαν και χαρακτήρισαν μια σειρά σύμπλοκων ενώσεων των Co(II), Fe(III) και Mn(II), με ιμιδαζολικούς υποκαταστάτες. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση παρατηρήθηκε το φαινόμενο του υπερχρωμισμού κατά την τιτλοδότηση δειγμάτων των τριών συμπλόκων με CT-DNA. Έτσι, οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση των συμπλόκων με το DNA δεν ήταν δυνατό να συμβαίνει μέσω παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του, και κατά συνέπεια, απέδωσαν το φαινόμενο αποδίδοντας την αλληλεπίδραση των συμπλόκων σε εξωτερική δέσμευση (surface binding) με το DNA, η οποία υποβοηθάται από τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αζώτων των υποκαταστατών και των βάσεων του DNA. Επιπροσθέτως, απέδωσαν την παρατηρούμενη ισχυρότερη αλληλεπίδραση των συμπλόκων του κοβαλτίου και του σιδήρου με το DNA σε σχέση με το σύμπλοκο του μαγγανίου, στην μεγαλύτερη ιοντική ακτίνα του μαγγανίου σε σχέση με τα άλλα δύο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ασθενέστερη έλξη του θετικά φορτισμένου μεταλλικού κέντρου Mn(II) στο μόριο του DNA σε σχέση με τα άλλα δύο μεταλλικά κέντρα μικρότερης ιοντικής ακτίνας [68].

Σε μία αναφορά του 2012, η ερευνητική ομάδα του R. Devkar πραγματοποίησε τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό συμπλόκων των Cu(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II), V(II) χρησιμοποιώντας ως υποκαταστάτη το Moxifloxacin, ενός παραγώγου κινολίνης το οποίο χρησιμοποιείται ως αντιβιοτικό. Ο υποκαταστάτης εντάσσονταν στο μεταλλικό κέντρο διδοντικά, μέσω του καρβοξυλικού και του κετονικού οξυγόνου της δομής του. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA έγινε αρχικά με φασματοσκοπία UV-Vis, στην οποία παρατηρήθηκε το φαινόμενο του υποχρωμισμού, το οποίο αποτελεί ένδειξη αλληλεπίδρασης με το DNA μέσω παρεμβολής. Μάλιστα, η  $K_b$  που υπολογίστηκε, για τα περισσότερα σύμπλοκα, ήταν μεγαλύτερη από αυτή του ελεύθερου υποκαταστάτη, αποδεικνύοντας έτσι πως στις περισσότερες περιπτώσεις η συμπλοκοποίηση ενίσχυσε τη δέσμευσή του στο DNA. Επιπροσθέτως, η ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε και πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού σε διαλύματα βρωμιούχου αιθιδίου (EB). Για όλα τα σύμπλοκα της μελέτης παρατηρήθηκε μείωση της μετρούμενης έντασης του φθορισμού, υποδεικνύοντας πως εκτοπίζουν το EB. Μεταξύ όλων των συμπλόκων που εξετάστηκαν, αυτό του χαλκού έδειξε να έχει την ισχυρότερη αλληλεπίδραση. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα κυτταροτοξικότητας, έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς A549. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα σύμπλοκα είχαν βελτιωμένη τιμή  $IC_{50}$  σε σχέση με τον ελεύθερο υποκαταστάτη, με το σύμπλοκο του Cu(II) να έχει το μικρότερο  $IC_{50}$  από όλα [69].

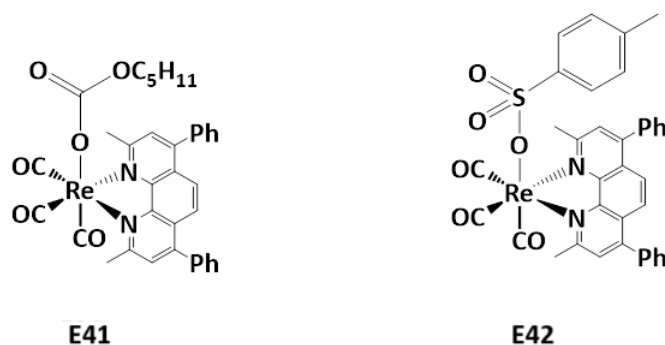
Η αλληλεπίδραση συμπλόκων του φεροκενίου με CT-DNA μελετήθηκε με διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές ως προς τον τρόπο σύνδεσής τους, ενώ η μεγαλύτερη σταθερά  $K_b$  βρέθηκε για το σύμπλοκο E34. Αν και τα σύμπλοκα E34 και E36 εμφάνισαν παρόμοιο τρόπο σύνδεσης με το CT-DNA, η σταθερά σύνδεσης  $K_b$  που υπολογίστηκε φασματισκοπικά ήταν μικρότερη για το E36 από αυτή του E34. Αυτό αποδόθηκε





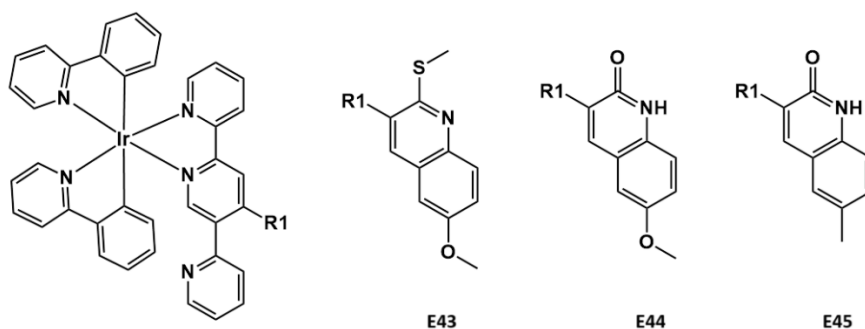
**Εικόνα 1.20:** Τρικαρβονυλικά σύμπλοκα του Re(I) με πυριδινικούς υποκαταστάτες.

Ακόμη μελέτες με τρικαρβονυλικά σύμπλοκα του Re(I), όπως το σύμπλοκο E41 της Εικόνας 1.21, έδειξαν πως είναι δραστικά έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών όπως οι MDA-MB-231, MDA-MB-468. Η αλληλεπίδρασή τους με CT-DNA πραγματοποιείται με μη-ομοιοπολικό τρόπο, μέσω μερικής παρεμβολής [74]. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται σε μία ακόμη σχετική εργασία, η οποία αφορά τρικαρβονυλικά σύμπλοκα του Re(I) με καρβοξυλικούς ή σουλφονικούς υποκαταστάτες. Τα σύμπλοκα της έρευνας αυτής έδειξαν αντικαρκινική δραστηριότητα έναντι διαφόρων κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού. Το πιο δραστικό σύμπλοκο της μελέτης, το E42 (Εικόνα 1.21), έδειξε ικανοποιητική κυτταροτοξικότητα, με την τιμή  $IC_{50}$  να είναι της τάξεως των μερικών nM [75].



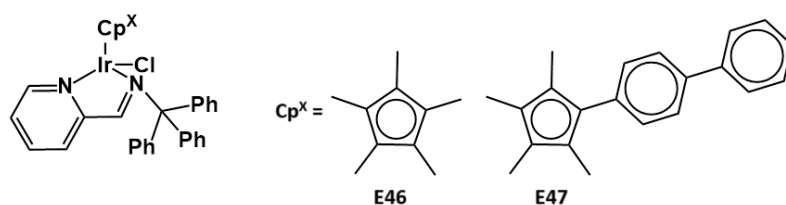
**Εικόνα 1.21:** Τρικαρβονυλικά σύμπλοκα του Re(I) με υποκατεστημένη 1,10-φαινανθρολίνη.

Τα σύμπλοκα του Ir(III) έχουν επίσης μελετηθεί ως προς τον τρόπο που συνδέονται στο DNA και την κυτταροτοξική τους δραστηριότητα. Ένα παράδειγμα συμπλόκων του Ir(III) τα οποία αλληλεπιδρούν μη-ομοιοπολικά με το DNA είναι τα σύμπλοκα E43-E45 της Εικόνας 1.22. Οι μελέτες με φασματοσκοπία UV-Vis οδήγησαν τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι τα σύμπλοκα δεσμεύονται στις αύλακες του DNA (groove binding). Οι  $K_b$  που υπολογίστηκαν για τα τρία αυτά σύμπλοκα ακολουθούσαν τη σειρά  $K_b (E43) > K_b (E44) > K_b (E45)$ . Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με EB [76].



**Εικόνα 1.22:** Σύμπλοκα του Ir(III) με κορεσμένη σφαίρα ένταξης τα οποία αλληλεπιδρούν μη-ομοιοπολικά με το DNA.

Σε ακόμη μία αναφορά που μελετά οργανομεταλλικά σύμπλοκα του Ir(III) με CT-DNA (E46 και E47 της Εικόνας 1.23) βρέθηκε πως συνδέονται μέσω παρεμβολής με σταθερές της τάξης του  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . Ακόμη, και τα δύο βρέθηκαν να είναι αποτελεσματικά έναντι καρκινικών κυττάρων της σειράς A549 [77].

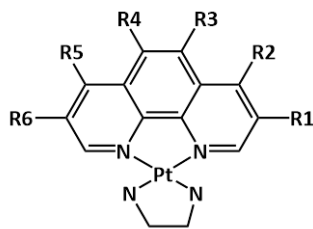


**Εικόνα 1.23:** Κυτταροτοξικά σύμπλοκα του Ir(III) με υποκατεστημένα κυκλοπενταδιεύλια.

### 1.2.3. Σύμπλοκα του παλλαδίου και του λευκοχρύσου:

Τα σύμπλοκα του Pt(II) και του Pd(II) διαθέτουν κοινά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν κατάλληλα για να δεσμευτούν στο DNA, όπως η επίπεδη τετραγωνική γεωμετρία τους και η κινητική αδράνεια κάποιων υποκαταστατών με άτομα δότες N. Η πρώτη αναφορά αφορά το σύμπλοκο  $[\text{Pt}(\text{trpy})(\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OH})]^+$  (trpy = 2,2',2''-terpyridine) που συνδέεται ισχυρά στο DNA μέσω παρεμβολής με μηχανισμό ανάλογο με αυτό του EB [78]. Τα σύμπλοκα  $[\text{Pt}(\text{trpy})(\text{HET})]^+$ ,  $[\text{Pt}(\text{phen})(\text{en})]^{2+}$  και  $[\text{Pt}(\text{bpy})(\text{en})]^{2+}$  παρεμβάλλονται, επίσης, στο DNA, ενώ το  $[\text{Pt}(\text{phen})(\text{en})]^{2+}$  εμφανίζει την μεγαλύτερη  $K_b$  ( $\approx 10^4$ ) [79,80]. Γενικά οι αναφορές για σύμπλοκα του Pd(II) με κορεσμένη σφαίρα ένταξης και κινητικά αδρανείς υποκαταστάτες είναι μάλλον σπάνιες. Ενδεικτικά αναφέρονται την πιο πρόσφατη που αφορά σε σύμπλοκα του τύπου  $[\text{Pd}(\text{phen})(\text{dn})]^{2+}$  (dn = 1,8-διάμινο ναφθαλένιο), τα οποία παρεμβάλλονται στο DNA παράγοντας ROS. Τα σύμπλοκα αυτά εμφανίζουν αξιοσημείωτη κυτταροτοξικότητα έναντι διάφορων καρκινικών σειρών [81].

Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι σύμπλοκα ανάλογα των παραπάνω, όπου περιείχαν μεθυλιωμένα παράγωγα της phen, επίσης παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA, μέσω της μικρής αύλακας, με σταθερά σύνδεσης περίπου  $10^5$ - $10^6 \text{ M}^{-1}$ . Σε κυτταροτοξικές μελέτες που έγιναν, στη καρκινική κυτταρική σειρά L1210, βρέθηκε ότι η θέση και ο αριθμός των μεθυλομάδων που φέρει το μόριο της υποκατεστημένης phen επηρεάζει τη βιολογική δραστηριότητα του συμπλόκου [82].



E48 = R1, R2, R3, R4, R5, R6 = H

E49 = R1, R3, R4, R5, R6 = H R2 = Me

E50 = R1, R2, R4, R5, R6 = H R3 = Me

E51 = R1, R3, R4, R6 = H R2, R5 = Me

E52 = R1, R2, R5, R6 = H R3, R4 = Me

E53 = R3, R4 = H R1, R2, R5, R6 = Me

**Εικόνα 1.24:** Σύμπλοκες ενώσεις του τύπου [Pt(phen)(en)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> με μεθυλιωμένα παράγωγα της phen. Για λόγους συντομίας παραλείπονται τα αντισταθμιστικά ιόντα.

Η αντικατάσταση της en με το διαμινοκυκλοεξάνιο (dach), υποκαταστάτης και στο oxaliplatin, είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της κυτταροτοξικής δραστηριότητας του συμπλόκου. Μάλιστα, βρέθηκε ότι το σύμπλοκο με την S,S-dach ήταν πιο δραστικό από αυτό με την R,R-dach, κάτι το οποίο είναι αξιοσημείωτο καθώς στην περίπτωση του oxaliplatin ίσχυε το αντίθετο. Βέβαια ο μηχανισμός δράσης εδώ είναι διαφορετικός. Η μεθυλίωση της phen σε διάφορες θέσεις είχε παρόμοιο αποτέλεσμα με τα σύμπλοκα της en, καθώς έδειξε να αυξάνει την κυτταροτοξικότητα σε σχέση με το αρχικό σύμπλοκο. Πιο δραστικό βρέθηκε να είναι το σύμπλοκο [Pt(5,6-Me<sub>2</sub>phen)(S,S-dach)], το οποίο είχε τιμές IC<sub>50</sub> στην κλίμακα του nM έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών. Εντούτοις, τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα των κυτταροτοξικών μελετών δεν αντικατοπτρίστηκαν και στις in vivo μελέτες, όπου παρατηρήθηκε πολύ μικρή δραστηριότητα [83].

#### 1.2.4. Σύμπλοκα του ρουθηνίου:

##### 1.2.4.1. Οκταεδρικά σύμπλοκα του Ru(II) με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες:

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, το ρουθίνιο αποτελεί εναλλακτική του λευκοχρύσου, όσον αφορά την ανάπτυξη κυτταροτοξικών ενώσεων, ειδικότερα στην περίπτωση αυτών που δρουν μη-ομοιοπολικά. Τα σύμπλοκα του Ru(II) είναι γνωστό ότι υιοθετούν οκταεδρική γεωμετρία. Το μέγεθος και η συμμετρία των συμπλόκων αυτών, καθώς και η ύπαρξη βοηθητικών υποκαταστατών, οι οποίοι δεν αλληλεπιδρούν με το DNA, δίνουν τη δυνατότητα στα οκταεδρικά σύμπλοκα του Ru(II) να εμφανίζουν μεγαλύτερη εκλεκτικότητα προς συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων στο DNA [84]. Ένα τέτοιο σύμπλοκο είναι το [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>, το οποίο μπορεί να απομονωθεί τόσο ως Λ όσο και ως Δ ισομερές [85]. Η ομάδα του K. Barton μελέτησε τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης των δύο ισομερών του συμπλόκου με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-GTGCAC-3')<sub>2</sub> μέσω φασματοσκοπίας NMR. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το Λ ισομερές του συμπλόκου προκαλεί ισχυρότερες μετατοπίσεις από ότι το Δ ισομερές στα A5H2 και στα H1' πρωτόνια του d(5'-GTGCAC-3')<sub>2</sub>. Επιπλέον, και τα δύο ισομερή προκαλούν μετατόπιση των κορυφών των T2CH<sub>3</sub> προς περιοχές χαμηλότερων πεδίων στο φάσμα NMR. Τα παραπάνω αποτελούν ενδείξεις δύο διαφορετικών μηχανισμών αλληλεπίδρασης, παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του DNA και δέσμευσης στις αύλακες του DNA. Επιβεβαιωτικά των παραπάνω ισχυρισμών ήταν και τα αποτελέσματα της μελέτης της αλληλεπίδρασης των δύο ισομερών με ένα άλλο εξανουκλεοτίδιο, το d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, το οποίο μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την πιθανή εξάρτηση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης από την

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

αλληλουχία και το είδος των βάσεων του DNA. Σε αντίθεση με το  $d(5'-GTGCAC-3')$ <sub>2</sub>, εντοπίστηκαν πολύ μικρές διαφοροποιήσεις στις τιμές των κορυφών των πρωτονίων του δεσμευμένου  $d(5'-CGCGCG-3')$ <sub>2</sub>. Και στις δύο περιπτώσεις ολιγονουκλεοτιδίων, παρατηρήθηκε ότι οι εντονότερες μετατοπίσεις σημειώθηκαν για τα H4H7 και H5H6 της phen, τα οποία βρίσκονται στο εξωτερικό μέρος της δομής της. Σύμφωνα με τα παραπάνω και τα δύο εναντιομερή αλληλεπιδρούν τόσο με παρεμβολή όσο και με δέσμευση στις αύλακες τους DNA, με το Δ εναντιομερές να είναι ικανότερο για παρεμβολή. Επιπλέον, οι ελάχιστες μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν για το  $d(5'-CGCGCG-3')$ <sub>2</sub> αποτελούν ένδειξη εκλεκτικής αλληλεπίδρασης με αλληλουχίες DNA πλούσιες σε βάσεις A και T [86,87].

Μεταγενέστερα, διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση του  $[Ru(phen)_2(dprq)]^{2+}$  για λόγους σύγκρισης με το προηγούμενο. Ως μοντέλο DNA χρησιμοποιήθηκε το δωδεκανουκλεοτίδιο  $d(5'-TCGGGATCCCGA-3')$ <sub>2</sub>. Οι κορυφές του ολιγονουκλεοτιδίου δεν έδειξαν ιδιαίτερη διεύρυνση, σε αντίθεση με αυτές του συμπλόκου και ιδίως των πρωτονίων H5H6, ένδειξη ενδιάμεσης κινητικής για την κλίμακα του NMR. Τα σακχαρικά πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου είχαν τις πιο έντονες upfield μετατοπίσεις (-0.18 έως -0.27 ppm). Θεωρήθηκε ότι το σύμπλοκο δεσμεύεται στην περιοχή από την T7 ως και την C9 στην μικρή αύλακα. Από τα πρωτόνια του συμπλόκου την μεγαλύτερη διαφοροποίηση εμφάνισαν το H5H6 και H4H7, όπως προηγουμένως [88].

Το  $[Ru(bpy)_2(dprz)]^{2+}$  αποτελεί ανάλογο του  $[Ru(phen)_3]^{2+}$ . Το  $[Ru(bpy)_2(dprz)]^{2+}$  έχει την ιδιότητα της διαλυτοεξαρθώμενης φωταύγειας, η οποία παρατηρείται σε διαλύματα οργανικών διαλυτών και όχι σε υδατικά. Όταν, όμως, γίνει προσθήκη DNA σε υδατικό διάλυμα του συμπλόκου, παρατηρείται ότι το σύστημα εκδηλώνει έντονη φωταύγεια, εξαιτίας της παρεμβολής του dprz μεταξύ των βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα να χάνει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια H<sub>2</sub>O που βρίσκονται γύρω του. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι το  $[Ru(bpy)_2(dprz)]^{2+}$  αλληλεπιδρά με τη μεγάλη αύλακα του DNA [89]. Παρομοίως, το  $[Ru(phen)_2(dprz)]^{2+}$  παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA με αποτέλεσμα την κάμψη του μορίου του DNA [90]. Σε μελέτες NMR με το  $d(5'-GTTCGAT-3')$ <sub>2</sub> για το Δ ισομερές (E57) παρατηρήθηκαν διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ του πρωτονίου A5H8 του ολιγονουκλεοτιδίου και των H4' και H7' του dprz και εξάχθηκε το συμπέρασμα της αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με τη μεγάλη αύλακα του DNA. Οι ίδιες παρατηρήσεις δεν έγιναν για την περίπτωση του Λ (E56), ένδειξη ότι η προσέγγιση μέσω της μεγάλης αύλακας είναι εναντιοεκλεκτική για το Δ ισομερές [91].

Τα οκταεδρικά σύμπλοκα Ru(II) που φέρουν ως υποκαταστάτη το dprq αντί του dprz, όπως το  $[Ru(phen)_2(dprq)]^{2+}$ , αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω intercalation. Στα φάσματα που λήφθηκαν από το μίγμα του συμπλόκου με το  $d(5'-GTTCGAC-3')$ <sub>2</sub> παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη upfield μετακίνηση και διεύρυνση των σημάτων των πρωτονίων της dprq εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του E58 με το DNA. Σημαντικές ήταν οι μετατοπίσεις των κορυφών των πρωτονίων H1' των κεντρικών βάσεων του εξανουκλεοτιδίου τα οποία βρίσκονται στη μικρή αύλακα της διπλής έλικας. Με βάση τα παραπάνω και τις διασταυρούμενες κορυφές του φάσματος NOESY, συνάχθηκε το συμπέρασμα της δέσμευσης στην μικρή αύλακα του DNA [92]. Με το  $d(5'-TCGGGATCCCGA-3')$ <sub>2</sub> παρατηρήθηκε πολύ έντονη διεύρυνση των κορυφών του συμπλόκου και ελάχιστες διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου και του E58. Το σύμπλοκο  $[Ru(phen)_2(dprq)]^{2+}$  και πάλι προσέγγιζε το μόριο του DNA από τη μικρή αύλακα. Από την σύγκριση του τρόπου αλληλεπίδρασης των συμπλόκων  $[Ru(phen)_2(dprz)]^{2+}$  και  $[Ru(phen)_2(dprq)]^{2+}$  με το DNA παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο αρωματικό σύστημα του dprz επιτρέπει αποτελεσματικότερες αρωματικές αλληλεπιδράσεις με το DNA [88].

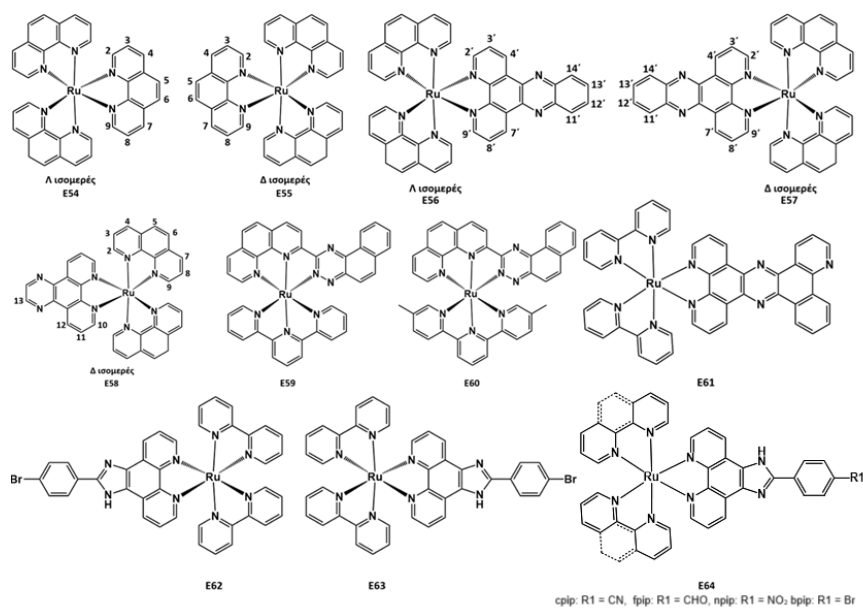
Τα σύμπλοκα E59 και E60 της Εικόνας 1.25, μελετήθηκαν ως προς την αλληλεπίδρασή τους με το CT-DNA και βρέθηκαν να παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA με  $K_b$  ίσες με  $1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  και  $1.0 \times$

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

$10^6 \text{ M}^{-1}$ , αντίστοιχα, συγκρίσιμες δηλαδή με την  $K_b$  του γνωστού μορίου-παρεμβολέα EB ( $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) [93]. Το σύμπλοκο  $[\text{Ru}(\text{bry})_2(\text{btrpz})]^{2+}$  (E61), μελετήθηκε ως προς την αλληλεπίδρασή του με CT-DNA με διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές και βρέθηκε ότι ο υποκαταστάτης btrpz παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA. Στις μελέτες ανταγωνιστικής πρόσδεσης απόσβεσης φθορισμού με EB που έλαβαν χώρα, παρατηρήθηκε ότι τη προσθήκη διαλύματος του  $[\text{Ru}(\text{bry})_2(\text{btrpz})]^{2+}$  στο διάλυμα του συστήματος CT-DNA-EB είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού, κάτι που αποτελεί απόδειξη της αλληλεπίδρασης με το DNA, με σταθερά  $K_b$  που υπολογίστηκε ίση με  $0.43 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  [94].

Τα σύμπλοκα E62 και E63 αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του. Μάλιστα, το  $\Delta$  εναντιομερές (E62) είναι πιο αποτελεσματικό, όσον αφορά την αλληλεπίδρασή του με το DNA, γεγονός που αντικατοπτρίζεται και στις σταθερές  $K_b$  των δύο συμπλόκων, οι οποίες υπολογίστηκαν  $4.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  και  $2.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  αντίστοιχα. Το ίδιο συμβαίνει και με την κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων, με το  $\Delta$  ισομερές να είναι πιο κυτταροτοξικό έναντι της κυτταρικής σειράς HeLa [95].

Τέλος, τα οκταεδρικά σύμπλοκα των γενικών τύπων  $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{L}]^{2+}$  και  $[\text{Ru}(\text{bry})_2\text{L}]^{2+}$ , όπου L = crip ή frip ή brip ή nrip (Εικόνας 1.25) μελετήθηκαν ως προς την αλληλεπίδρασή τους με CT-DNA και συγκρίθηκαν με τους ελεύθερους υποκαταστάτες. Τα πειράματα έδειξαν ότι τα σύμπλοκα μπορούν να παρεμβάλλονται αποτελεσματικότερα μεταξύ των βάσεων του DNA σε σύγκριση με τα σύμπλοκα με bry. Ενώ, αναφορικά με τον υποκαταστάτη L, οι αλδεΰδο- και νιτρίλο- υποκαταστάτες έδειξαν να οδηγούν σε αποτελεσματικότερη αλληλεπίδραση μεταξύ του συμπλόκου και του DNA. Σε όλες τις περιπτώσεις, η αλληλεπίδραση των συμπλόκων ήταν αποτελεσματικότερη από αυτή των ελεύθερων υποκαταστατών [96].



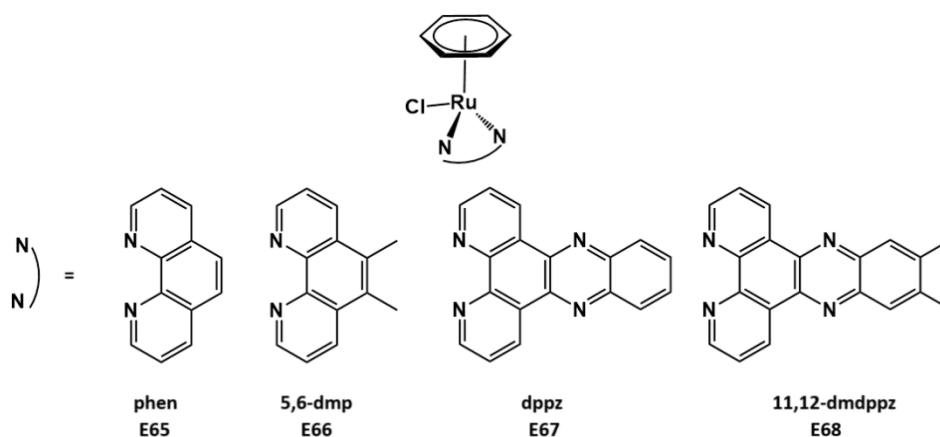
**Εικόνα 1.25:** Οκταεδρικά σύμπλοκα του Ru(II) με ολιγοπυριδινικούς υποκαταστάτες φορτίου 2+ (παραλείπεται από το σχήμα για λόγους ευκρίνειας) τα οποία αλληλεπιδρούν μη ομοιοπολικά με το DNA.

### 1.2.4.2. Σύμπλοκα Ru(II) με αρένια:

Μία ενδιαφέρουσα μελέτη, του 2017, ασχολείται με σύμπλοκα του τύπου  $[(\eta^6\text{-benzene})\text{Ru}(\text{diimine})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  και τον μηχανισμό αλληλεπίδρασής τους με το DNA. Η δομή των συμπλόκων αυτών φαίνεται στην Εικόνα 1.26. Ως μοντέλο DNA για τους σκοπούς της έρευνας χρησιμοποιήθηκε CT-

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

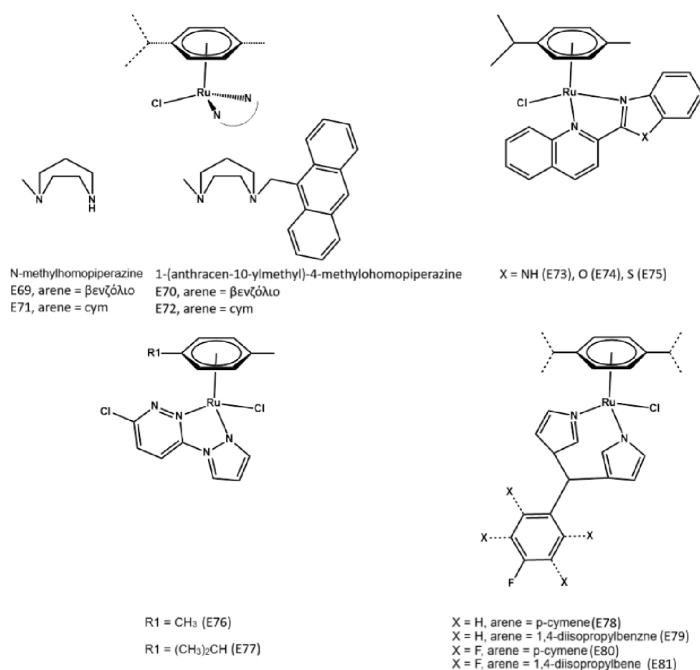
DNA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, στα σύμπλοκα E67 και E68 τα αρωματικά συστήματα των υποκαταστατών *dprz* και 11,12-*dmdprz* παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και για τον σύμπλοκο με τον υποκαταστάτη *rhen*, σε αντίθεση με το αντίστοιχο σύμπλοκο με 5,6-*dmp* στη θέση του υποκαταστάτη διμίνης, για το οποίο οι ερευνητές πιστεύουν ότι η αλληλεπίδραση του υποκαταστάτη διμίνης με το DNA γίνεται μέσω δέσμευσης στην αύλακα του DNA. Με σκοπό την ποσοτική σύγκριση της ικανότητας δέσμευσης των συμπλόκων στο DNA, οι ερευνητές υπολόγισαν τη σταθερά πρόσδεσης  $K_b$  του κάθε συμπλόκου. Και τα τέσσερα σύμπλοκα της μελέτης είχαν  $K_b$  της τάξεως του  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , με το E67 να έχει τη μεγαλύτερη σταθερά, ακολουθούμενο κατά σειρά από τα E68, E66 και E65. Ο λόγος που τα σύμπλοκα με το *dprz* και 11,12-*dmdprz* παρουσιάζουν βελτιωμένη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA, κατά 6-10 φορές μάλιστα, είναι η ύπαρξη εκτενέστερου αρωματικού συστήματος στον υποκαταστάτη τύπου διμίνης, το οποίο επιτρέπει τη βαθύτερη εισχώρηση του υποκαταστάτη μεταξύ των βάσεων του DNA. Επιπροσθέτως, η ύπαρξη των μεθυλομάδων στη δομή του 11,12-*dmdprz* δημιουργεί στερική παρεμπόδιση σε σχέση με το μη υποκατεστημένο *dprz* η οποία είναι και ο λόγος που το E67 έχει καλύτερη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA σε σύγκριση με το E68. Το ίδιο φαινόμενο θα αναμενόταν να παρατηρηθεί και στην περίπτωση της *rhen* και τη 5,6-*dmp*, κάτι που ωστόσο δεν συμβαίνει. Αυτό το φαινόμενο οφείλεται στον διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης των δύο υποκαταστατών με το DNA. Το σύμπλοκο με τη 5,6-*dmp* εμπλέκεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δέσμευσης στις αύλακες του DNA, σε αντίθεση με το E65, το οποίο παρεμβάλλεται (μέσω της *rhen*) μεταξύ των βάσεων του DNA. Έτσι, οι δύο μεθυλομάδες που υπάρχουν στη δομή της 5,6-*dmp* λειτουργούν ευεργετικά για τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του υποκαταστάτη με το μόριο του DNA, αυξάνοντας έτσι την ικανότητα αλληλεπίδρασης, και κατά συνέπεια τη σταθερά δέσμευσης, του συμπλόκου με το DNA. Μία σημαντική παρατήρηση που προκύπτει από τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής είναι η μικρότερη  $K_b$  που υπολογίστηκε και για τα τέσσερα σύμπλοκα σε σύγκριση με το αντίστοιχο σύμπλοκο, με *dprz* στη θέση της διμίνης και εξαμέθυλο βενζόλιο στη θέση του αρενίου. Μάλιστα, η διαφορά στη σταθερά πρόσδεσης  $K_b$  είναι αρκετά μεγάλη με το σύμπλοκο του εξαμέθυλο βενζολίου να έχει  $K_b$  μεγαλύτερη κατά μία τάξη μεγέθους. Η διαφορά αυτή αποδόθηκε από τους συγγραφείς της μελέτης στην ύπαρξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του εξαμέθυλο βενζολίου και του DNA, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στην περίπτωση του βενζολίου [97].



**Εικόνα 1.26:** Σύμπλοκα του γενικού τύπου  $[(\eta^6\text{-benzene})\text{Ru}(\text{diimine})\text{Cl}](\text{PF}_6)$  (το φορτίο και τα αντισταθμιστικά ιόντα παραλείπονται για λόγους ευκρίνειας σχήματος) τα οποία αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του DNA.

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

Οι μελέτες οι οποίες αναφέρονται σε σύμπλοκα του Ru(II) που αλληλεπιδρούν αποκλειστικά μέσω μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με το DNA είναι σχετικά περιορισμένες. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις λειτουργούν επικουρικά στον κύριο τρόπο δέσμευσης των συμπλόκων στο DNA, τον σχηματισμό προϊόντων προσθήκης. Τέτοια σύμπλοκα είναι τα σύμπλοκα του τύπου  $[Ru(\eta^6\text{-arene})(L)Cl]^+$ , όπου  $\eta^6\text{-arene}$  βενζόλιο ή *cym* και όπου L είτε N-methylhomopiperazine (σύμπλοκα E69 και E71) ή 1-(anthracen-10-ylmethyl)-4-methylhomopiperazine (σύμπλοκα E70 και E72, Εικόνα 1.27). Στα σύμπλοκα E70 και E72 όπου υπάρχει ένα εκτενές αρωματικό σύστημα, βρέθηκε ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής με το DNA, ενώ στα σύμπλοκα E69 και E71 δεν υπάρχει αυτή η δυνατότητα και παρατηρήθηκε μόνο δέσμευση στις αύλακες του DNA και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Ως αποτέλεσμα οι  $K_b$  που υπολογίστηκαν για τα σύμπλοκα E70 και E72 ήταν μεγαλύτερες κατά μία τάξη μεγέθους από τα αντίστοιχα των E69 και E71 για την αλληλεπίδρασή τους με CT-DNA [98]. Τα σύμπλοκα E73 - E75 (Εικόνα 1.27) τα οποία είναι ανάλογα των προηγούμενων επίσης μελετήθηκαν ως προς την αλληλεπίδρασή τους με CT-DNA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα τα σύμπλοκα αυτά αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, και πιο συγκεκριμένα μέσω δέσμευσης στις αύλακες και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, παρόλο που σε κάποια από τα πειραματικά δεδομένα υπήρχαν ενδείξεις παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του DNA. Οι  $K_b$  που υπολογίστηκαν μέσω των πειραμάτων ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού κυμαίνονταν από  $2.24$  έως  $5.13 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  και αποτελούν απόδειξη της ισχυρής ικανότητας των συμπλόκων να αλληλεπιδρούν με το DNA. Η μεγαλύτερη από αυτές υπολογίστηκε για το σύμπλοκο E73 και πιθανόν οφείλεται στην ικανότητα του χηλικού υποκαταστάτη του συμπλόκου για σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Ωστόσο, τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι οι αδέσμευτοι χηλικοί υποκαταστάτες είχαν καλύτερη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA, λόγω μειωμένων στερικών παρεμποδίσεων. Παρόλα αυτά, τα τρία σύμπλοκα αποδείχθηκαν περισσότερο κυτταροτοξικά έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7 [99]. Σε άλλη μελέτη, από την ομάδα του G. Smith, σημειώθηκε ο σημαντικός ρόλος που παίζει και το αρένιο στην ικανότητα του συμπλόκου για αλληλεπίδραση με το DNA. Η διαφορά μεταξύ των συμπλόκων E76 και E77 έγκειται στον υποκαταστάτη αρενίου, καθώς στο E76 υπάρχει ενταγμένο μέσω απτικού δεσμού ένα *p*-ξυλένιο, ενώ στο E77 ένα *cym*. Η δομική αυτή διαφορά κάνει το E76 να αλληλεπιδρά ελαφρώς ισχυρότερα με CT-DNA με  $K_b$  ίση με  $3.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , ενώ η  $K_b$  του E77 βρέθηκε ίση με  $2.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Και τα δύο σύμπλοκα δεσμεύονται στις αύλακες του DNA, με τη διαφορά αυτή στην ισχύ της αλληλεπίδρασης να αποδίδεται στην μικρότερη στερική παρεμπόδιση που προσφέρει ο υποκαταστάτης *p*-ξυλένιο [100]. Για τα δομικά ανάλογα σύμπλοκα E78 - E81 τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω παρεμβολής και μέσω δέσμευσης στις αύλακες. Μεταξύ των τεσσάρων συμπλόκων οι μεγαλύτερες  $K_b$  υπολογίστηκαν για τα E80 και E81, τα οποία είναι φθοροϋποκατεστημένα σε όλες τις θέσεις του βενζολικού δακτυλίου του χηλικού υποκαταστάτη, με το E81 να έχει την καλύτερη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA με  $K_b$  ίση με  $6.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Η ισχυρότερη ικανότητα αλληλεπίδρασης του E81 με το DNA αντανακλάται και στην κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων, καθώς το σύμπλοκο αυτό ήταν το πιο κυτταροτοξικό έναντι της κυτταρικής σειράς A549 [101].



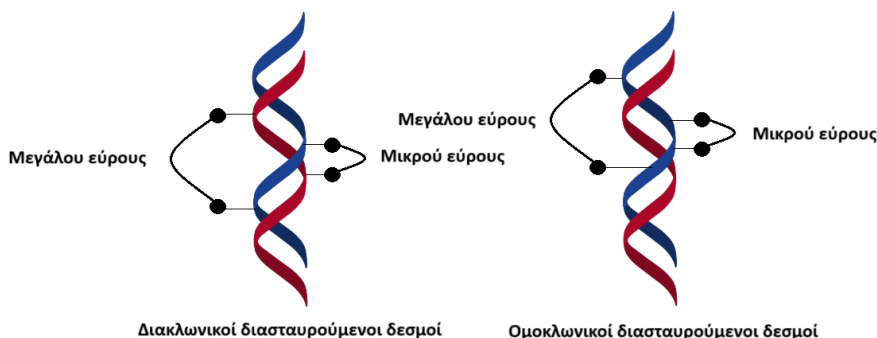
**Εικόνα 1.27:** Σύμπλοκα του Ru(II) με αρένια τα οποία αλληλεπιδρούν μη ομοιοπολικά με το DNA.

### 1.3. Αλληλεπίδραση με το DNA και FBA:

Όπως είναι σαφές από τα παραπάνω, η μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση με το DNA, τόσο από οργανικά μόρια, όσο και από μεταλλικά σύμπλοκα, έχει μελετηθεί εκτενώς και έχουν εξαχθεί αξιόλογα συμπεράσματα. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις η αλληλεπίδραση με ένα μόνο σημείο του DNA μπορεί να μην είναι αρκετή ώστε να υπάρξει σημαντική κυτταροτοξικότητα, και κατά συνέπεια δυνητικά θεραπευτική ικανότητα από ένα μόριο ή σύμπλοκο. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται πολλές φορές μια διαφορετική προσέγγιση για τη σύνθεση νέων υποψηφίων κυτταροτοξικών ενώσεων. Η προσέγγιση αυτή ονομάζεται Fragment Based Approach (FBA). Η FBA δεν είναι μια καινούρια προσέγγιση καθώς χρησιμοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια στη σύνθεση νέων ενώσεων που αλληλεπιδρούν με βιομόρια και ουσιαστικά περιλαμβάνει τη βελτίωση της ικανότητας δέσμωσης μικρών μορίων σε βιομόρια μέσω της τροποποίησής τους με προσθήκη νέων λειτουργικών ομάδων με την ικανότητα δέσμωσης σε βιομόρια. Η προσέγγιση αυτή έχει πρώτα χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό οργανικών μορίων, αλλά δεν περιορίζεται σε αυτά, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον σχεδιασμό και τη σύνθεση συμπλόκων. Όπως είναι γνωστό, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα για να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο πρέπει να ξεπεράσουν τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Η προσθήκη μιας επιπλέον λειτουργικής μονάδας η οποία να έχει την ικανότητα δέσμωσης στο DNA είτε ομοιοπολικά είτε μη-ομοιοπολικά, δίνει τη δυνατότητα στο σύμπλοκο να συνδέεται με πολλαπλά σημεία του DNA (DNA crosslinks, διασταυρούμενοι δεσμοί), μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Οι διασταυρούμενοι δεσμοί μπορούν να είναι μεγάλου ή μικρού εύρους, ανάλογα την απόσταση που χωρίζει τα σημεία του DNA στα οποία δεσμεύεται το σύμπλοκο. Οι διασταυρούμενοι δεσμοί μεγάλου εύρους μπορούν να περιλαμβάνουν τη δέσμωση σε διαφορετικά σημεία του ίδιου ή και διαφορετικών κλώνων του DNA από ένα σύμπλοκο και είναι πιο αποτελεσματικοί στην παρεμπόδιση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA [102]. Οι διασταυρούμενοι δεσμοί μεγάλου εύρους δεν αναγνωρίζονται εύκολα από τις πρωτεΐνες HMG1 εξαιτίας της μικρής κάμψης που προκαλούν στο DNA. Παρόλα αυτά, είναι πολύ αποτελεσματικοί στο να αλλάζουν τοπικά τη διαμόρφωση του DNA. Ακόμη, τα προϊόντα προσθήκης με διασταυρούμενους δεσμούς μεγάλου

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

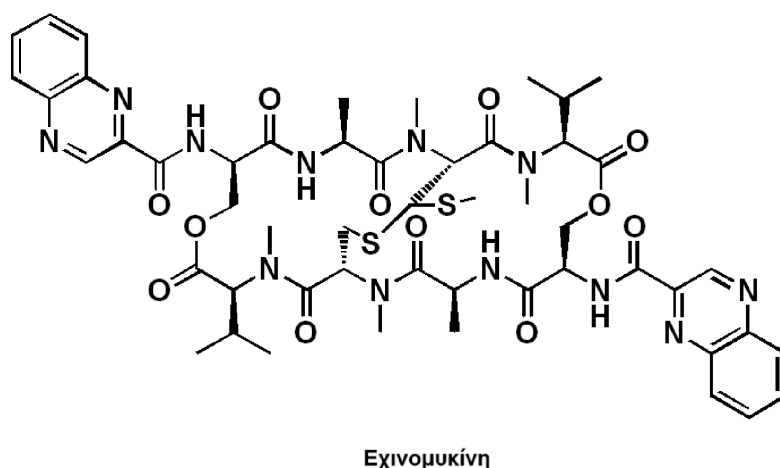
εύρους διατηρούνται για αρκετό καιρό χωρίς να επιδιορθώνονται από τους μηχανισμούς των κυττάρων όπως έχουν δείξει μελέτες [103].



**Εικόνα 1.28:** Είδη διασταυρούμενων δεσμών μεταξύ ενός διλειειτουργικού συμπλόκου και του μορίου του DNA.

### 1.3.1. Οργανικά διλειειτουργικά μόρια:

Η εχινομυκίνη (echinomycin) είναι ένα οργανικό μόριο αποτελούμενο από ένα κυκλικό οκταπεπτίδιο με δύο μονάδες κινολίνης στη δομή του (Εικόνα 1.29). Από την απομόνωσή της από το βακτήριο *Streptomyces echinatus* άρχισε να μελετάται η αντικαρκινική της δραστηριότητα, φτάνοντας μάλιστα στο στάδιο των κλινικών δοκιμών φάσης II [104]. Παρόλα αυτά, δεν προχώρησε σε επόμενα στάδια κλινικών δοκιμών κυρίως εξαιτίας της υψηλής τοξικότητας που παρουσίασε απέναντι σε υγιείς ιστούς. Σε μελέτες της αλληλεπίδρασης της εχινομυκίνης με DNA οι ερευνητές παρατήρησαν ότι προκαλεί ξετύλιγμα της διπλής έλικας και επιμήκυνση της σε διπλάσιο βαθμό, παρεμβαλλόμενη σε δύο σημεία του DNA ταυτόχρονα, με απόσταση τέσσερα ζεύγη βάσεων [105].

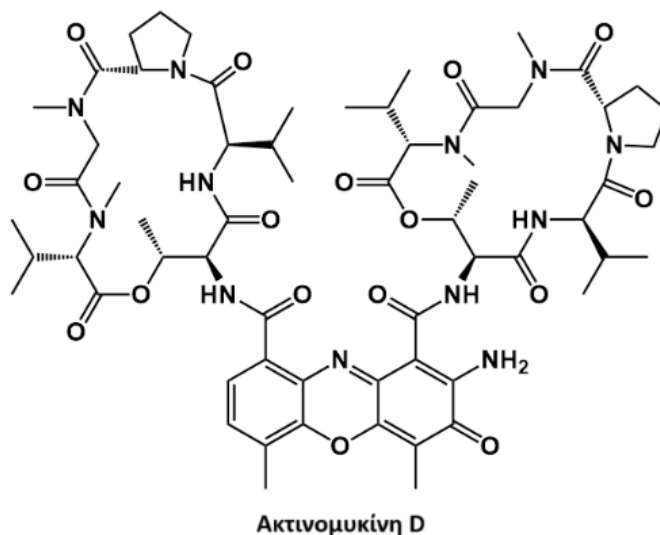


**Εικόνα 1.29:** Συντακτικός τύπος της εχινομυκίνης.

Η ακτινομυκίνη D (Εικόνα 1.30) είναι μία οργανική ένωση που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1940 από προϊόντα ζύμωσης του μικροοργανισμού *Actinomyces antibioticus* [106]. Από το 1964 χρησιμοποιείται ως φάρμακο στη χημειοθεραπεία για την καταπολέμηση του καρκίνου των νεφρών και του σαρκόματος

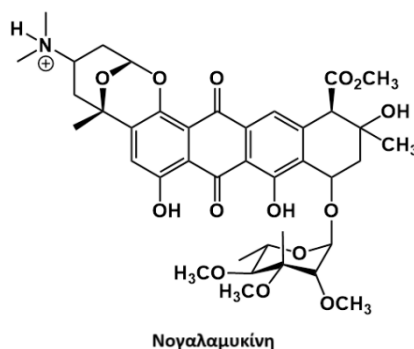
## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

του Ewing [107]. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην παρεμβολή του φαινοξαζονικού συστήματος δακτυλίων του μορίου μεταξύ γειτονικών βάσεων του DNA, ενώ, ταυτόχρονα, οι πενταπεπτιδικές αλυσίδες του μορίου δεσμεύονται στη μικρή αύλακα του DNA μέσω δεσμών υδρογόνου με τις νουκλεϊκές βάσεις [108]. Η ακτινομυκίνη D δρα είτε μονολειτουργικά είτε διλειτουργικά, μέσω παρεμβολής σε αλληλουχίες που περιέχουν ζεύγη G:C. Ο λόγος που το μόριο εμφανίζει εκλεκτικότητα για τέτοιες αλληλουχίες DNA είναι ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ομάδων NH και C=O των μονάδων θρεονίνης της ακτινομυκίνης D με τα N3 και N2 των ζευγών CG [109]. Μελέτες NMR που έγιναν με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-AAACGTTT-3')<sub>2</sub> επιβεβαιώνουν την παραπάνω υπόθεση [110].



Εικόνα 1.30: Συντακτικός τύπος της ακτινομυκίνης D.

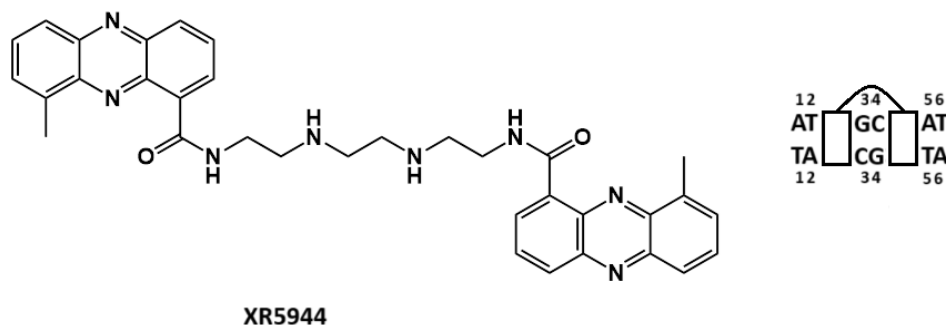
Η νογαλαμυκίνη (nogalamycin) (Εικόνα 1.31) είναι ένα αντικαρκινικό αντιβιοτικό που ανήκει στην κατηγορία των ανθρακοκυκλινών και δεν έχει κλινική χρήση σήμερα. Παράγεται φυσικά από το βακτήριο *Streptomyces nogalater* και έχει δείξει δραστηριότητα ενάντια σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως L1210, P388, HeLa, MCF-7 κ.α. Η νογαλαμυκίνη παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, κατά προτίμηση σε αλληλουχίες CG. Η αλληλεπίδραση της νογαλαμυκίνης με το DNA μελετήθηκε με χρήση φασματοσκοπίας NMR, τα οποία επιβεβαίωσαν τα παραπάνω. Το σακχαρικό άκρο της νογαλόζης βρέθηκε να είναι στη μικρή αύλακα της διπλής έλικας, ενώ η αμινογλυκόζη στη μεγάλη αύλακα [111,112].



Εικόνα 1.31: Συντακτικός τύπος της νογαλαμυκίνης.

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

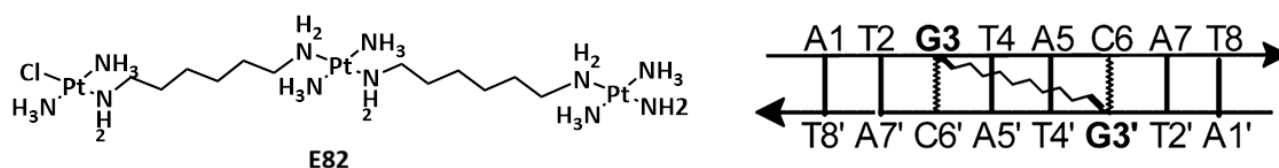
Η ένωση XR5944 (Εικόνα 1.32), είναι μια οργανική ένωση η οποία έχει δείξει σημαντικά κυτταροτοξικά αποτελέσματα έναντι διαφόρων ειδών καρκινικών κυτταρικών σειρών. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι έχει δραστηριότητα και έναντι κυτταρικών σειρών με φαρμακοανθεκτικότητα, ωστόσο εξαιτίας της τοξικότητας που εμφάνιζε έναντι υγιών κυττάρων δεν χρησιμοποιήθηκε κλινικά, φτάνοντας μόνο σε κλινικές δοκιμές φάσης I [113]. Οι μελέτες που έγιναν έδειξαν ότι η XR5944 δεσμεύεται στο DNA μέσω παρεμβολής και μέσω δέσμευσης στη μεγάλη αύλακα [114].



**Εικόνα 1.32:** Δομή της ένωσης XR5944, καθώς και σημεία παρεμβολής του μορίου στο ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-ATGCAT-3')<sub>2</sub>.

### 1.3.2. Πολυπυρηνικά διλειτουργικά σύμπλοκα:

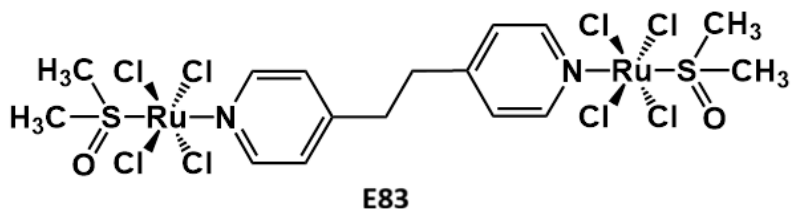
Το πρώτο ανόργανο πολυπυρηνικό σύμπλοκο το οποίο συντέθηκε και μελετήθηκε ως προς την αλληλεπίδρασή του με το DNA με το ήταν το Triplatin (E82), η δομή του οποίου φαίνεται στην Εικόνα 1.33. Το σύμπλοκο αυτό έφτασε μέχρι στάδιο II κλινικών δοκιμών. Στη δομή του συμπλόκου, οι δύο ακραίες μονάδες είναι trans-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> και γεφυρώνονται μεταξύ τους από μία μονάδα trans-H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>. Το triplatin σχηματίζει προϊόντα προσθήκης με το N7 των γουανινών. Η απόσταση των δύο ακραίων μεταλλικών κέντρων υπολογίστηκε σε 27.4 Å, δίνοντας τη δυνατότητα στο σύμπλοκο για διασταυρούμενους δεσμούς μεγάλου εύρους [103]. Τα προϊόντα προσθήκης που σχηματίζονται δεν αναγνωρίζονται τόσο αποτελεσματικά από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου, οδηγώντας το κύτταρο σε απόπτωση [115]. Οι διασταυρούμενοι δεσμοί 1,4, τους οποίους σχηματίζει το triplatin με το DNA, προκαλούν δομικές μεταβολές τόσο στο μέρος του μορίου του DNA που βρίσκεται μεταξύ των σημείων αλληλεπίδρασης με τα μεταλλικά κέντρα, όσο και σε περιοχές του DNA που βρίσκονται εκτός του σημείου αλληλεπίδρασης. Ακόμη, παρατηρήθηκε η μη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου Watson - Crick (W.-C.) [103].



**Εικόνα 1.33:** Συντακτικός τύπος του triplatin (E68) μαζί με σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασής του με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-ATGTACAT-3')<sub>2</sub>.

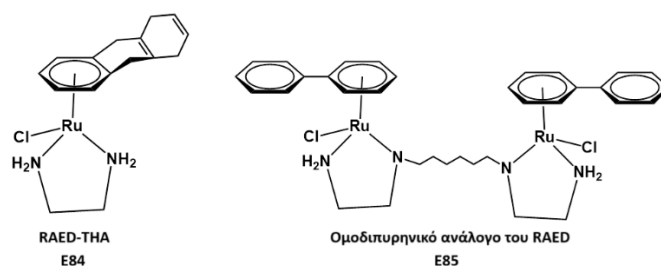
## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

Όπως σημειώθηκε και νωρίτερα, το NAMI-A είναι ένα μονοπυρηνικό σύμπλοκο του ρουθηνίου, του οποίου η δράση οφείλεται ως επί το πλείστον στην αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι, μετά από υδρόλυση του ενός υποκαταστάτη χλωρίου, το NAMI-A είναι ικανό να δημιουργήσει προϊόντα προσθήκης και με το DNA. Με βάση την FBA έχουν συντεθεί και διπυρηνικά ανάλογα του NAMI-A (σύμπλοκο E83, Εικόνα 1.34). Η εισαγωγή του δεύτερου μεταλλικού κέντρου βελτίωσε την αντιμεταστατική ικανότητα του συμπλόκου σε σύγκριση με το NAMI-A, καθώς είχε την ίδια δραστικότητα με αυτό σε δοσολογία 3.5 φορές μικρότερη όμως. Επίσης, το E83 σχηματίζει διακλωνικούς διασταυρούμενους δεσμούς με το DNA γρηγορότερα και σε σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό από ότι το NAMI-A, καθώς το 10.5% της συνολικής ποσότητας του δεσμευμένου στο DNA συμπλόκου ήταν μέσω διακλωνικών διασταυρούμενων δεσμών, έναντι 4.7% για το NAMI-A. Συνολικά, λοιπόν, η εισαγωγή της δεύτερης μεταλλικής μονάδας στο αρχικό σύμπλοκο NAMI-A οδήγησε σε βελτιωμένη δραστικότητα και σταθερότητα των προϊόντων προσθήκης με το DNA, με αποτέλεσμα την βελτίωση της αντιμεταστατικής ικανότητας του συμπλόκου και συνεπακόλουθα την δυνατότητα μικρότερης δοσολογίας, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των τοξικών παρενεργειών του συμπλόκου στον ασθενή. Εντούτοις, παρά την βελτίωση των αντιμεταστατικών ιδιοτήτων του NAMI-A, δεν παρατηρήθηκε παρόμοια βελτίωση στην κυτταροτοξικότητα του συμπλόκου με την εισαγωγή της δεύτερης ενεργής μονάδας [116,117].



**Εικόνα 1.34:** Ομοδιπυρηνικό ανάλογο του NAMI-A.

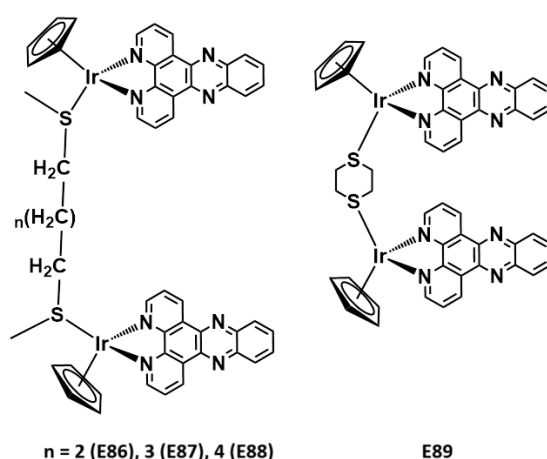
Η FBA έχει επίσης εφαρμοστεί και στα επίσης προαναφερθέντα σύμπλοκα τύπου RAED. Πιο συγκεκριμένα, έγινε αντικατάσταση του *cym* του RAED-C με το THA (σύμπλοκο RAED-THA (E84), Εικόνα 1.35). Το THA φέρει ένα εκτενέστερο αρωματικό σύστημα σε σχέση με το *cym*, δίνοντας έτσι την ικανότητα στο RAED-THA να αλληλεπιδρά και με μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με το DNA, εκτός από τον σχηματισμό προϊόντων προσθήκης που λαμβάνει χώρα μετά την υδρόλυση του υποκαταστάτη χλωρίου. Ο υποκαταστάτης THA παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του ενός μόνο κλώνου της διπλής έλικας, μετά τον σχηματισμό του προϊόντος προσθήκης από το μεταλλικό κέντρο με την ελεύθερη θέση ένταξης που προκύπτει από την υδρόλυση του χλωρίου. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ασυνήθιστα υψηλή, για τέτοιου είδους σύμπλοκα, κυτταροτοξικότητα που εμφάνισε το RAED-THA, η οποία ήταν συγκρίσιμη με αυτή του *cisplatin* [118]. Επεκτείνοντας την προσέγγιση FBA σε σύμπλοκα τύπου RAED, συντέθηκε το ομοδιπυρηνικό σύμπλοκο E85 της Εικόνας 1.35, το οποίο φέρει έναν υποκαταστάτη διφαινυλίου στη θέση του αρενίου, ενώ τα δύο μεταλλικά κέντρα Ru(II) ενώνονται μεταξύ τους από μία μακριά αλκυλοαλυσίδα. Το E85 δεσμεύεται ραγδαία στο DNA, κατά προτίμηση σε G, μετά από την υδρόλυση των υποκαταστατών χλωρίου, σχηματίζοντας έτσι διλειτουργικά προϊόντα προσθήκης με το μόριο του DNA. Παράλληλα, βρέθηκε ότι ο διφαινυλικός υποκαταστάτης επίσης αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την σταθερότητα του προϊόντος προσθήκης. Επιπροσθέτως, οι διακλωνικοί διασταυρούμενοι δεσμοί που σχηματίζει το σύμπλοκο με το DNA είναι τύπου 1,3 κατά κύριο λόγο, ενώ βρέθηκαν ενδείξεις και για 1,2 διασταυρούμενους δεσμούς [119].



**Εικόνα 1.35:** Μονοπυρηνικό και διπυρηνικό σύμπλοκο τύπου RAED σχεδιασμένα με την στρατηγική FBA.

### 1.3.2.1. Πολυπυρηνικά διλειτουργικά σύμπλοκα που δρουν μη-ομοιοπολικά:

Σε δημοσίευση του 2010, η ερευνητική ομάδα του W. S. Sheldrick μελέτησε την αλληλεπίδραση διπυρηνικών συμπλόκων του Ir(III) με εύκαμπτους γεφυρωτικούς υποκαταστάτες (Εικόνα 1.36) με το DNA. Όταν ένα αρωματικό μόριο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA προκαλεί επιμήκυνση της αλυσίδας κατά ~3.4 Å. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η προκαλούμενη επιμήκυνση μπορεί να κυμαίνεται από 2.0 μέχρι 3.7 Å. Επιπλέον, μετά την παρεμβολή ενός μορίου μεταξύ των βάσεων του DNA, η γωνία περιστροφής της διπλής έλικας από βάση σε βάση έχει υπολογιστεί ότι μειώνεται από 36° σε περίπου 26°. Σύμφωνα με την «αρχή του αποκλεισμού του πλησιέστερου γείτονα» για να υπάρξει διλειτουργική παρεμβολή, σε δύο σημεία της ίδιας αλυσίδας, τα δύο σημεία παρεμβολής πρέπει να απέχουν μεταξύ τους κατ' ελάχιστο δύο ζεύγη βάσεων (10.2 Å). Στο σύμπλοκο E86 η απόσταση αυτή υπολογίστηκε ίση με 8 Å, ενώ στα E87 και E88 βρέθηκε να ισούται με 11.5 και 13 Å αντίστοιχα. Συνεπώς, τα E87 και E88 θα πρέπει να είναι ικανά για διπλή παρεμβολή μεταξύ των βάσεων, ενώ το E86 όχι. Τα πειραματικά δεδομένα επιβεβαίωσαν τα παραπάνω. Η αλληλεπίδραση με το d(5'-GCGCATCGCG-3')<sub>2</sub> μέσω παρεμβολής σε δύο σημεία για το E88 επιβεβαιώθηκε και μέσω NMR [120].

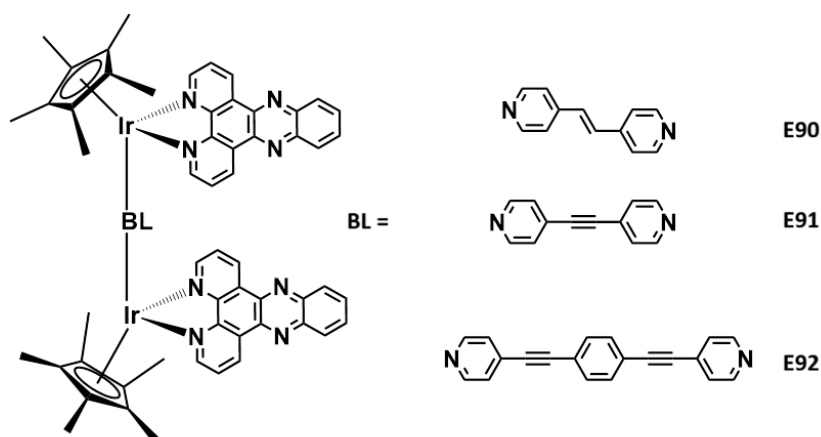


**Εικόνα 1.36:** Διπυρηνικά σύμπλοκα του Ir(III) με τους εύκαμπτους γεφυρωτικούς υποκαταστάτες: 2,7-διθιανοοκτάνιο (E86), 2,8-διθιανοεννεάνιο (E87), 2,9-διθιανοδεκάνιο (E88) και 1,4-διθιάνιο (E89).

Η ίδια ερευνητική ομάδα μελέτησε την αλληλεπίδραση ανάλογων συμπλόκων του Ir(III) με δύσκαμπτους γεφυρωτικούς υποκαταστάτες (Εικόνα 1.37) με CT-DNA. Αρχικά, εξακριβώθηκε η παρεμβολή των dppz των E90 - E92 μεταξύ των βάσεων του DNA. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η K<sub>b</sub> του E92 ήταν

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

μεγαλύτερη των άλλων δύο κατά μία τάξη μεγέθους. Με βάση τα παραπάνω, και άλλα πειραματικά δεδομένα, εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι τα E90 και E91 δρουν μονολειτουργικά μέσω παρεμβολής, ενώ το E92 διλειτουργικά. Για τον διπαρεμβολέα (bisintercalator) E92 βρέθηκε ότι μεταξύ των δύο σημείων παρεμβολής μεσολαβούν πέντε ζεύγη βάσεων. Ωστόσο, παρά τη διλειτουργική δράση του E92 ήταν λιγότερο κυτταροτοξικό έναντι της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε σχέση με τα σύμπλοκα E90 και E91 που δεσμεύονται μονολειτουργικά στο DNA [121].

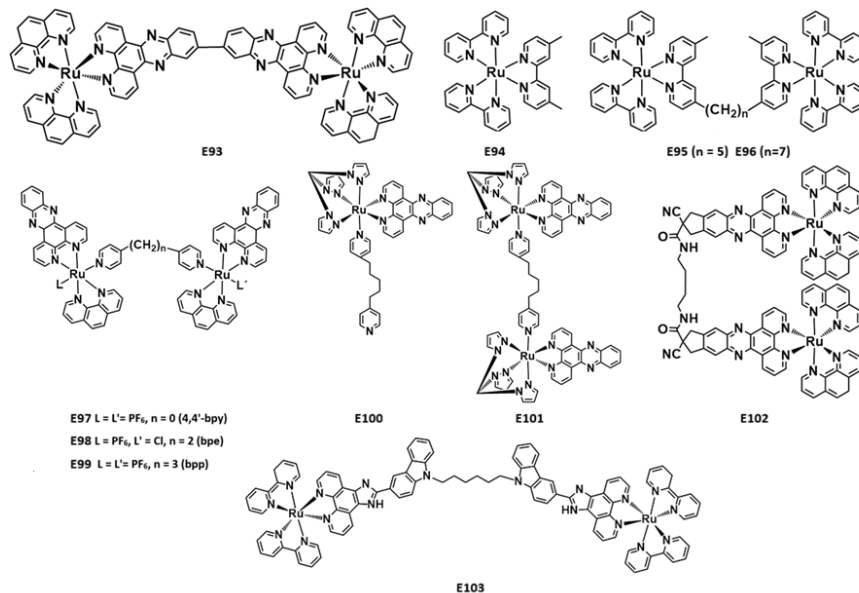


**Εικόνα 1.37:** Διπυρηνικά σύμπλοκα του Ir(III) με τους δύσκαμπτους γεφυρωτικούς υποκαταστάτες: dprp (E90), dprey (E91) και dpeb (E92).

Οι μελέτες της αλληλεπίδρασης του διπυρηνικού συμπλόκου E93 (Εικόνα 1.38) με το DNA έδειξαν ότι παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του. Ο υποκαταστάτης που πραγματοποιεί την παρεμβολή μεταξύ των βάσεων είναι ο γεφυρωτικός υποκαταστάτης didprz. Για να επιτευχθεί αυτό, ο κεντρικός δεσμός C-C του υποκαταστάτη περιστρέφεται μερικώς, έτσι ώστε η μία υπομονάδα dprz να παρεμβάλλεται πλήρως μεταξύ των βάσεων του DNA, ενώ η δεύτερη υπομονάδα dprz παρεμβάλλεται μερικώς [122]. Όσον αφορά τα σύμπλοκα E95 και E96 καθώς και το μονοπυρηνικό ανάλογό τους E94 της Εικόνας 1.38 αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ το μονοπυρηνικό σύμπλοκο δεν έχει μεγάλη ικανότητα δέσμευσης στο DNA, ωστόσο η εισαγωγή της δεύτερης μεταλλικής μονάδας προκάλεσε τεράστια βελτίωση της ισχύος δέσμευσης προς το DNA, καθώς σημειώθηκε αύξηση της  $K_b$  κατά δύο τάξεις μεγέθους. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι το σύμπλοκο με την επταμελή ανθρακική γεφυρωτική αλυσίδα (E96) εμφανίζει την καλύτερη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το σύμπλοκο αυτό είχε την ικανότητα διλειτουργικής παρεμβολής στο DNA [123,124]. Τα τρία διπυρηνικά σύμπλοκα E97 - E99 με τους γεφυρωτικούς υποκαταστάτες 4,4'-bry, bpe, bpr μελετήθηκαν ως προς την αλληλεπίδρασή τους με DNA και όσον αφορά την επίδραση των γεφυρωτικών υποκαταστατών σε αυτή. Τα δύο dprz του E99 είναι παράλληλα μεταξύ τους. Το ίδιο δεν συμβαίνει και με τα άλλα δύο σύμπλοκα, για τα οποία βρέθηκε ότι οι υποκαταστάτες dprz βρίσκονται υπό γωνία  $\sim 64^\circ$  ως προς τον άξονα του DNA, με συνέπεια να μην είναι εφικτή η πλήρης ταυτόχρονη παρεμβολή και των δύο υποκαταστατών dprz μεταξύ των βάσεων του DNA. Συνεπώς, στο E99 είναι δυνατή η διλειτουργική παρεμβολή με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού. Το μήκος του γεφυρωτικού τους υποκαταστάτη είναι και ο βασικός παράγοντας που απαγορεύει τη παρεμβολή του δεύτερου υποκαταστάτη dprz στα E97 και E98 [125]. Όπως φάνηκε και από το προηγούμενο παράδειγμα που αναφέρθηκε, η ύπαρξη δύο ομάδων οι οποίες να μπορούν να δράσουν

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

ως παρεμβολείς του DNA είναι πολύ σημαντική για να μπορεί να δράσει διλειτουργικά ως παρεμβολέας ένα σύμπλοκο, χωρίς ωστόσο να είναι ο αποκλειστικός παράγοντας που το καθορίζει αυτό. Το παραπάνω αντανακλάται στην περίπτωση των συμπλόκων E100 και E101, τα οποία δεσμεύονται αμφοτέρα μονολειτουργικά στο DNA, με παρόμοιες σταθερές δέσμευσης  $K_b$  [126]. Για το σύμπλοκο E102 η απόσταση μεταξύ των δύο σημείων παρεμβολής υπολογίστηκε ίση με δύο ζεύγη βάσεων. Συνεπώς, κατά την παρεμβολή το σύμπλοκο εκτείνεται σε μία απόσταση ίση με τέσσερα ζεύγη βάσεων, ενώ βρέθηκε ότι προκαλεί επιμήκυνση του μορίου του DNA κατά 3 Å περίπου. Επιπροσθέτως, η ύπαρξη δύο μονάδων που παρεμβάλλονται μεταξύ των βάσεων του DNA κάνουν το σύμπλοκο να έχει πολύ μεγάλη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA (binding affinity). Είναι εμφανές, λοιπόν, το πλεονέκτημα που δίνει η διλειτουργική παρεμβολή σε ένα τέτοιο σύμπλοκο, αναφορικά με την αλληλεπίδρασή του με το DNA. Η μεγάλη ευκαμψία της αλειφατικής αλυσίδας του γεφυρωτικού υποκαταστάτη θεωρείται κομβική για τον τρόπο δράσης του συμπλόκου. Επίσης και το μήκος της παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, αφού σε πειράματα που έγινε με σύμπλοκα με γεφυρωτικούς υποκαταστάτες ανάλογης ευκαμψίας και διαφορετικούς μήκους, δεν βρέθηκαν στοιχεία που να υποστηρίζουν τη διλειτουργική δράση μέσω παρεμβολής [127]. Ακόμη, το σύμπλοκο E103 μελετήθηκε σχετικά με την αλληλεπίδρασή του με CT-DNA μέσω διαφόρων φασματοσκοπικών τεχνικών, μεταξύ των οποίων και πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με EB και βρέθηκε ότι παρεμβάλλεται διλειτουργικά στο DNA με  $K_b$  ίση με  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Παρά την ικανότητα του E103 για διπλή παρεμβολή στο μόριο του DNA, η κυτταροτοξικότητά απέναντι σε κύτταρα της καρκινικής σειράς HeLa βρέθηκε να είναι αρκετά χαμηλή, πιθανότατα επειδή μπορεί να μην σχετίζεται με την ικανότητα αλληλεπίδρασης του συμπλόκου με το DNA, αλλά να προκαλείται από διαφορετικό μηχανισμό [128].

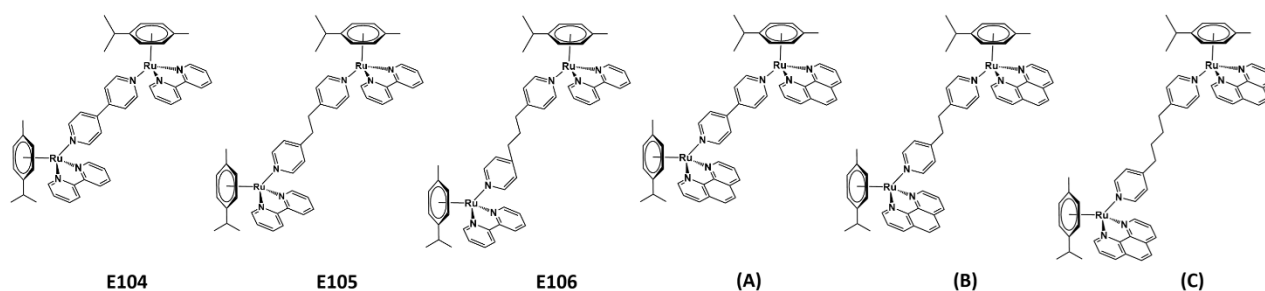


**Εικόνα 1.38:** Οκταεδρικά σύμπλοκα του Ru(II) που αλληλεπιδρούν μη-ομοιοπολικά με το DNA.

Πρόσφατα, η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου μας δημοσίευσε μια μελέτη σχετικά με τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό νέων διπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II) με αρένια και ολιγοπυριδίνες. Στην εργασία αυτή μελετήθηκε ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των διπυρηνικών συμπλόκων που απομονώθηκαν με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  με διάφορες μεθόδους, καθώς επίσης και η κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων αυτών. Τα σύμπλοκα φαίνονται στην Εικόνα 1.39. Τα σύμπλοκα (A) -

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>: Εισαγωγή

(C), στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι κυτταροτοξικές μελέτες βρέθηκαν να είναι δραστικά έναντι διαφορετικών καρκινικών σειρών, όπως A2780, A2780cis-res και MCF7. Μεταξύ των τριών συμπλόκων που εξετάστηκαν την χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα, καθώς και εκλεκτικότητα, προς τα καρκινικά κύτταρα βρέθηκε να έχει το σύμπλοκο με τον μικρότερο γεφυρωτικό υποκαταστάτη (4,4'-bpy, BL1), δηλαδή το (A). Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων αυτών με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  έγινε με διάφορες μεθόδους, όπως πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με EB και NMR. Τα αποτελέσματα των μελετών έδειξαν ότι το σύμπλοκο (A) ήταν αυτό που είχε την μεγαλύτερη ισχύ δέσμευσης με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , με σημαντική διαφορά από τα υπόλοιπα, καθώς η σταθερά πρόσδεσης  $K_b$  που υπολογίστηκε για αυτό ήταν μεγαλύτερη κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με τα (B) και (C). Φυσικά, όλα τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν είχαν βελτιωμένη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DNA σε σχέση με το μονοπυρηνικό ανάλογο σύμπλοκο με το οποίο συγκρίθηκαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το (A) είναι το μόνο σύμπλοκο το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , μέσω της μίας rhen που φέρει στη δομή του, μεταξύ των βάσεων A5-A6, ενώ η δεύτερη rhen δεσμεύεται στη μικρή αύλακα του  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ . Η δέσμευση του συμπλόκου προκαλεί ξετύλιγμα τις διπλής έλικας, καθώς επίσης και ρήξη των δεσμών υδρογόνου του κεντρικού τμήματος της αλληλουχίας (AATT). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι ενώ το (A) είναι αυτό με την μεγαλύτερη ισχύ δέσμευσης στο DNA, και αυτό το οποίο προκαλεί τη μεγαλύτερη δομική μεταβολή της διπλής έλικας, είναι και αυτό με τα λιγότερο υποσχόμενα κυτταροτοξικά αποτελέσματα. Αντίθετα, τα σύμπλοκα (B) και (C) δεσμεύονται στις αύλακες. Παρόλα αυτά, τα σύμπλοκα αυτά παρουσίασαν σημαντικά καλύτερες κυτταροτοξικές ικανότητες, καθώς επίσης και εκλεκτικότητα προς τα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, συνάγεται το συμπέρασμα ότι παρόλο που ο τρόπος αλληλεπίδρασης με το DNA είναι ένας εξαιρετικά σημαντικός παράγοντας που μπορεί πιθανώς να καθορίζει τις κυτταροτοξικές ικανότητες ενός συμπλόκου, δεν είναι ο αποκλειστικός παράγοντας, καθώς είναι πιθανό αυτή να προκαλείται ακόμη και από αλληλεπιδράσεις με άλλα βιομόρια-στόχους. Φαίνεται ότι όσο περισσότεροι είναι οι βαθμοί ελευθερίας του γεφυρωτικού υποκαταστάτη, τόσο πιο βελτιωμένες είναι και οι κυτταροτοξικές ικανότητες των συμπλόκων αυτού του τύπου [129].



**Εικόνα 1.39:** Διπυρηνικά σύμπλοκα του Ru(II) με *cym* ως αρένιο και ολιγοπυριδινικούς υποκαταστάτες.



# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>:**

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



### 2.1. Αντιδραστήρια:

Τα D<sub>2</sub>O, acetone-d<sub>6</sub>, DMSO-d<sub>6</sub> και CDCl<sub>3</sub> καθαρότητας >99.5% τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη των φασμάτων NMR αγοράστηκαν από την εταιρία Deutero GmbH. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια των πειραματικών πορειών που ακολουθήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (HPLC) και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το τριυδάτο τριχλωριούχο ρουθίνιο(III) (RuCl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O), ήταν καθαρότητας 99% και αγοράστηκε από την εταιρία Fluka. Οι υποκαταστάτες 4,4'-διπυριδίνη (4,4'-bpy), 1,3-δισ(4-πυριδυλο)προπάνιο (bpp) και 1,2-δισ(4-πυριδυλο)αιθάνιο (bpe) αγοράστηκαν από την εταιρία Fluorochem και ήταν καθαρότητας 99.8%. Ο υποκαταστάτης βενζο[h]κινολίνη αγοράστηκε από την εταιρία Fluorochem. Οι ενώσεις 1,4-διβρωμοβενζόλιο, 4-πυριδυλοβορονικό οξύ, διφαινυλ-4,4'-διβορονικό οξύ, υδροχλωρική 4-βρωμοπυριδίνη, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KPF<sub>6</sub>, LiCl και τα φωσφορικά άλατα Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O και NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O καθαρότητας >98% που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma Aldrich. Ο καταλύτης Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> συντέθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφική μέθοδο [130].

Τα μονόκλωνα ολιγονουκλεοτίδια 5'-CGCGAATTCGCG-3', 5'-CGCGCG-3' και 5'-CTTTTGCAAAG-3' καθώς και το Calf Thymus DNA (CT-DNA) αγοράστηκαν από την εταιρία Eurogentec (Seraing, Belgium) και μετατράπηκαν στα αντίστοιχα δίκλωνα μόρια κατόπιν της διάλυσής τους στο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων. Το διάλυμα βρωμιούχου εθιδίου (EB) 10 mg/mL σε διαλύτη H<sub>2</sub>O, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα φθορισμού αγοράστηκε από την Sigma Aldrich.

### 2.2. Οργανολογία & μέθοδοι:

#### 2.2.1. Φασματοσκοπία NMR:

Για τις μετρήσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) χρησιμοποιήθηκαν τα εξής όργανα: Bruker Avance 250 με συχνότητα συντονισμού πρωτονίου 250 MHz και Bruker Avance 500 με συχνότητα συντονισμού πρωτονίου 500,13 MHz. Η θερμοκρασία στην οποία έγινε η λήψη των φασμάτων ήταν 298 K σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και σε όλα τα πειράματα. Τα φάσματα επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού TopSpin 4.1.1 (Bruker Analytik GmbH). Η απόδοση των σημάτων συντονισμού έγινε με την επικουρία φασμάτων δύο διαστάσεων <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY και <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY. Τα <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY και <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY καταγράφηκαν σύμφωνα με τις παλμικές ακολουθίες της Bruker για τα πειράματα αυτά σε θερμοκρασία 298 K. Τα φάσματα <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY καταγράφηκαν σε χρόνους μίξης 300, 600, 900 και 1100 ms. Τα Όλα τα δείγματα NMR παρασκευάστηκαν με προσθήκη 500 μL του κατάλληλου διαλύτη ή μίγματος διαλυτών σε 0.5-2 mg της εκάστοτε ουσίας, ανάλογα με το μοριακό βάρος της καθεμίας. Αναφορικά με τα φάσματα NMR με τα τρία ολιγονουκλεοτίδια, αυτά λήφθηκαν με διαλύτη H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O (9:1), όπου ως H<sub>2</sub>O χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer) (100mM) με pH = 7.0, του οποίου η παρασκευή περιγράφεται παρακάτω.

Με τη χρήση πειραμάτων <sup>1</sup>H NMR και <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των συμπλόκων (A) - (C) και (9) - (11) με τα ολιγονουκλεοτίδια d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> και d(5'-CTTTTGCAAAG-3')<sub>2</sub>. Επικουρικά χρησιμοποιήθηκαν και πειράματα <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY NMR. Αρχικά καταγράφηκαν και αναλύθηκαν τα φάσματα NMR 1D <sup>1</sup>H και 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY & NOESY των ελεύθερων ολιγονουκλεοτιδίων. Τα δείγματα ήταν συγκέντρωσης 2 mM σε διαλύτη H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O (9:1) και θερμοκρασία 298 K. Η καταγραφή των φασμάτων έγινε στο όργανο 500 MHz της Bruker και ως mixing time επιλέχθηκε t<sub>mix</sub> = 350 ms. Στις ίδιες συνθήκες και διαλύτη καταγράφηκαν και μελετήθηκαν και τα φάσματα των

ελεύθερων συμπλόκων. Στη συνέχεια, το εκάστοτε δείγμα του ολιγονουκλεοτιδίου τιτλοδοτήθηκε με διάλυμα του κάθε συμπλόκου επιτυγχάνοντας με τις τιτλοδοτήσεις τις μοριακές αναλογίες  $r = 0.5$ ,  $r = 1$  και  $r = 2$  για κάθε ζεύγος συμπλόκου-ολιγονουκλεοτιδίου. Μετά την προσθήκη του διαλύματος του συμπλόκου σε αυτό του ολιγονουκλεοτιδίου και πριν από την καταγραφή των φασμάτων NMR, σε όλες τις περιπτώσεις, έγινε επώαση του νέου διαλύματος που προέκυπτε για 30' σε θερμοκρασία δωματίου. Σε όλες τις τιτλοδοτήσεις, καταγράφηκαν τα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR και  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY NMR, ενώ, όπου κρίθηκε απαραίτητο για την επιτυχή απόδοση των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων είτε του συμπλόκου είτε του ολιγονουκλεοτιδίου, καταγράφηκαν και φάσματα  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR.

### **2.2.2. Φασματομετρία μάζας:**

Τα φάσματα μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-ESI-MS) λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο μάζας Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL™ υψηλής διακριτικής ικανότητας, εξοπλισμένο με παγίδα τροχιάς ιόντων, με πηγή ιονισμού Electrospray (ESI). Τα δείγματα που παρασκευάστηκαν ήταν διαλύματα συγκέντρωσης  $10^{-6}$  M. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Xcalibur.

### **2.2.3. Κρυσταλλογραφία ακτίνων X μονοκρυστάλλου:**

Κατάλληλοι κρύσταλλοι των συμπλόκων  $\{[\text{Ru}(\text{cym})(\text{bzq-H}^+)]_2(\mu\text{-BL1})\}(\text{PF}_6)_2$  (5),  $\{[\text{Ru}(\text{cym})(\text{bzq-H}^+)]_2(\mu\text{-BL2})\}(\text{PF}_6)_2$  (6) και  $\{[\text{Ru}(\text{cym})(\text{bzq-H}^+)]_2(\mu\text{-BL3})\}(\text{PF}_6)_2$  (8) κολλήθηκαν σε λεπτή ίνα γυαλιού με κυανοακρλική κόλλα και τοποθετήθηκαν στην κεφαλή του γωνιομέτρου. Τα δεδομένα περίθλασης συλλέχθηκαν στο περιθλασίμετρο Bruker D8 Quest Eco, εξοπλισμένο με ανιχνευτή Photon II και μονοχρωμάτορα TRIUMPH (κυρτού γραφίτη) που χρησιμοποιεί ακτινοβολία Mo K $\alpha$  ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ) χρησιμοποιώντας το πακέτο λογισμικού APEX3 [131]. Τα «καρέ» που συλλέχθηκαν, ενσωματώθηκαν με το λογισμικό Bruker SAINT χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο wide frame. Τα δεδομένα διορθώθηκαν για τα αποτελέσματα της απορρόφησης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο πολλαπλής σάρωσης (SADABS) [132]. Η δομή επιλύθηκε χρησιμοποιώντας το πακέτο λογισμικού Bruker SHELXT και βελτιώθηκε μέσω τεχνικών ελαχίστων τετραγώνων full-matrix στο F2 (SHELXL 2018/3) [133] μέσω του προγράμματος ShelXle [134]. Όλα τα άτομα εκτός των H υποβλήθηκαν σε ανισότροπη επεξεργασία, ενώ τα οργανικά άτομα H τοποθετήθηκαν σε υπολογισμένες, ιδανικές θέσεις στα αντίστοιχα άτομα άνθρακα. Σε όλες τις περιπτώσεις τα αντισταθμιστικά ανιόντα  $\text{PF}_6^-$  αντικαταστάθηκαν στο μοντέλο της κρυσταλλικής δομής ως διαταραγμένα σε δύο θέσεις με ποσοστά κάλυψης από 51 έως 79%. Κάποιες crosspeaks των 2D NMR φασμάτων οδήγησαν στη βελτίωση του μοντέλου των  $\text{bzq-H}^+$  ως διαταραγμένα σε δύο θέσεις με εναλλασσόμενα άτομα δότες άνθρακα και αζώτου. Στην περίπτωση του (5) οι παραπάνω διορθώσεις οδήγησαν σε μεγαλύτερα R με ποσοστά κάλυψης 63.9 και 36.1%. Στην κρυσταλλική δομή του (7) υπάρχει κενός χώρος (περίπου το 24% του όγκου της κυψελίδας) πληρωμένος με ηλεκτρονιακή πυκνότητα που δεν ήταν εφικτό να μοντελοποιηθεί. Έγινε κατεργασία με τη ρουτίνα SQUEEZE του PLATON [135], από την οποία υποδείχθηκε η παρουσία 557 ηλεκτρονίων στον προσβάσιμο από διαλύτη κενό χώρο, τα οποία αντιστοιχούν σε 9 - 10 μόρια χλωροφορμίου ανά μοναδιαία κυψελίδα. Το PLATON χρησιμοποιήθηκε για γεωμετρικούς υπολογισμούς, ενώ το X-Seed [136] για μοριακά γραφικά. Στον Πίνακα 2.1 φαίνονται τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα των (5) - (7).

**Πίνακας 2.1:** Κρυσταλλικά δεδομένα συμπλόκων (5) - (7).  $R = \sum | |F_o| - |F_c| | / \sum |F_o|$ ,  $wR = \{ \sum [w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2] / \sum [w(|F_o|^4)] \}^{1/2}$  και  $w = 1 / [\sigma^2(F_o^2) + (0.0335P)^2 + 23.0550P]$

όπου  $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$ . (5):  $a = 0.0335$ ,  $b = 23.0550$ ; (6):  $a = 0.0927$ ,  $b = 0.2116$ ; (7)-solvents

$a = 0.0965$ ,  $b = 0$

Compound	(5)	(6)	(7) -solvents
Empirical formula	C <sub>56</sub> H <sub>52</sub> F <sub>12</sub> N <sub>4</sub> P <sub>2</sub> Ru <sub>2</sub>	C <sub>58</sub> H <sub>56</sub> F <sub>12</sub> N <sub>4</sub> P <sub>2</sub> Ru <sub>2</sub>	C <sub>59</sub> H <sub>58</sub> F <sub>12</sub> N <sub>4</sub> P <sub>2</sub> Ru <sub>2</sub>
Formula	{[Ru(cym)(bzq-H <sup>+</sup> ) <sub>2</sub> (μ-BL1)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> }	{[Ru(cym)(bzq-H <sup>+</sup> ) <sub>2</sub> (μ-BL2)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> }	{[Ru(cym)(bzq-H <sup>+</sup> ) <sub>2</sub> (μ-BL3)](PF <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> }
Formula weight	1273.09	1301.14	1315.17
Temperature (K)	296(2)		
Wavelength (Å)	0.71073		
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Orthorhombic
Space group	P2 <sub>1</sub> /c	P2 <sub>1</sub> /n	Pbcn
Unit cell dimensions <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å) <i>α</i> , <i>β</i> , <i>γ</i> (°)	15.0334(18), 12.2099(13), 14.9357(16) 90, 99.617(4), 90	12.0285(18), 14.1760(19), 16.545(3) 90, 97.378(7), 90	12.0886(6), 15.2050(8), 37.266(2) 90, 90, 90
Volume (Å <sup>3</sup> )	2703.0(5)	2797.8(8)	6849.8(6)
Z	2	2	4
Density (g/cm <sup>3</sup> ) (calculated)	1.564	1.544	1.275
Absorption coefficient (mm <sup>-1</sup> )	0.701	0.679	0.555
F(000)	1284	1316	2664
Crystal size (mm <sup>3</sup> )	0.30 x 0.28 x 0.06	0.35 x 0.25 x 0.05	0.20 x 0.18 x 0.17
θ range for data collection (°)	2.439 to 24.995	2.869 to 24.997	2.414 to 25.000
Index ranges	-17 ≤ <i>h</i> ≤ 17, -14 ≤ <i>k</i> ≤ 14, -17 ≤ <i>l</i> ≤ 17	-14 ≤ <i>h</i> ≤ 14, -16 ≤ <i>k</i> ≤ 16, -19 ≤ <i>l</i> ≤ 19	-14 ≤ <i>h</i> ≤ 14, -18 ≤ <i>k</i> ≤ 18, -44 ≤ <i>l</i> ≤ 44
Reflections collected	34804	32595	102068
Independent reflections [R <sub>int</sub> ]	4733 [0.1164]	4923 [0.1140]	6020 [0.2062]
Completeness to θ	99.8%	99.8%	99.9%
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>		
Data / restraints / parameters	4733 / 472 / 453	4923 / 210 / 419	6020 / 327 / 412
Goodness-of-fit	1.189	1.048	0.949
Final R indices [I > 2σ(I)] (R <sub>obs</sub> , wR <sub>obs</sub> )	0.0908, 0.1820	0.0656, 0.1518	0.0674, 0.1630
R indices [all data] (R <sub>all</sub> , wR <sub>all</sub> )	0.1260, 0.1935	0.1155, 0.1712	0.1473, 0.1867
Largest diff. peak and hole (e <sup>-</sup> ·Å <sup>-3</sup> )	1.093 and -0.829	1.069 and -0.972	0.392 and -0.526

#### 2.2.4. Φασματοσκοπία φθορισμού:

Οι μετρήσεις εκπομπής φθορισμού έγιναν με το φθορισμόμετρο Jasco FP-8300, εξοπλισμένο με λαμπτήρα ξένου ως πηγή φωτός. Τα φάσματα εκπομπής καταγράφηκαν σε μήκος κύματος 500-800 nm με διέγερση στα 480 nm σε κυψελίδα χαλαζία (quartz cell) διαδρομής  $b = 1$  cm. Τα slit widths διέγερσης (excitation) και εκπομπής (emission) διατηρήθηκαν στα 5 nm. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με το πρόγραμμα Spectra Gryph 1.2-spectroscopy software. Για την παρασκευή των διαλυμάτων των δειγμάτων για τις μετρήσεις φθορισμού χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer) συγκέντρωσης 100 mM και pH = 7.0. Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε ως εξής: σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL προστέθηκαν 200 mL διαλύματος Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O συγκέντρωσης 0.058 M και 200 mL NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O συγκέντρωσης 0.42 M. Η ακριβής τιμή του pH προσδιορίστηκε με τη βοήθεια ψηφιακού πεχαμέτρου και την προσθήκη μικρής ποσότητας HCl ή NaOH ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή pH. Τέλος προστέθηκε απεσταγμένο H<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 500 mL. Το αρχικό διάλυμα EB 10 mg/mL, πριν χρησιμοποιηθεί για τις μετρήσεις, αραιώθηκε με προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι τελικής συγκέντρωσης 5.2 μM.

Ο τύπος της πρόσδεσης όλων των συμπλόκων εξετάστηκε επίσης και μέσω πειραμάτων ανταγωνιστικής πρόσδεσης-απόσβεσης φθορισμού σε διαλύματα βρωμιούχου εθιδίου (EB). Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν με τιτλοδοτήσεις διαλυμάτων DNA - EB με τα σύμπλοκα (A) - (C) και (1) - (16). Ως μοντέλα DNA χρησιμοποιήθηκαν τα τρία ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν και για τα πειράματα με NMR καθώς επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις, και CT-DNA. Τα διαλύματα του DNA ήταν συγκέντρωσης 20  $\mu\text{M}$  και σε αυτά προστέθηκε σταδιακά διάλυμα EB συγκέντρωσης 5.2  $\mu\text{M}$  μέχρι κορεσμού [137]. Ο κορεσμός του διαλύματος DNA από το διάλυμα του EB έγινε αντιληπτός μέσω της εκπομπής φθορισμού, η οποία στη συγκέντρωση φθορισμού αποκτά μέγιστη και πρακτικά σταθερή τιμή. Στη συνέχεια, ακολούθησε διαδοχική προσθήκη του διαλύματος του εκάστοτε συμπλόκου (συγκέντρωσης 1 mM) στο κορεσμένο διάλυμα DNA-EB. Μετά από κάθε προσθήκη ακολούθησε επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία 298 K. Έπειτα από την επώαση καταγράφηκε το φάσμα εκπομπής φθορισμού στις συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Σε όλες τις περιπτώσεις η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού μειωνόταν σε διαφορετικό βαθμό με την αύξηση της προστιθέμενης ποσότητας του διαλύματος του συμπλόκου στο κορεσμένο διάλυμα DNA-EB.

#### **2.4. Υπολογισμός σταθερών πρόσδεσης:**

Οι τιμές των σταθερών πρόσδεσης  $K_{SV}$  και  $K_b$  υπολογίστηκαν με την ακόλουθη μεθοδολογία:

Αρχικά υπολογίστηκε η απόσβεση φθορισμού (fluorescence quenching property), που περιγράφεται από την εξίσωση Stern-Volmer [138].

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \text{ (εξίσωση 2.1)}$$

Όπου  $F_0$  και  $F$  αντιστοιχούν οι εντάσεις του εκπεμπόμενου φθορισμού πριν και μετά την προσθήκη του μορίου αποσβέστη (σύμπλοκα (A) - (C), (1) - (16)), αντίστοιχα. Η  $K_{SV}$  καλείται σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer και  $[Q]$  είναι η συγκέντρωση της ένωσης. Η κλίση της γραφικής παράστασης της εξίσωσης 2.1 μας δίνει την τιμή της σταθεράς  $K_{SV}$ .

Η σταθερά πρόσδεσης  $K_b$  υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\log[(F_0-F)/F] = n\log[Q] + \log K_b \text{ (εξίσωση 2.2)}$$

Η γραφική παράσταση της εξίσωσης 2.2 είναι ευθεία γραμμή και η τιμή της σταθεράς  $K_b$  υπολογίστηκε από την σταθερή απόσταση από τον άξονα  $x'$ .

#### **2.5. Απόδοση των σημάτων NMR στα ελεύθερα ολιγονουκλεοτίδια:**

Όπως είναι γνωστό [139], δομή των δίκλωνων μορίων DNA B τύπου έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη γνωστών και προβλέψιμων ενδομοριακών αποστάσεων, τις οποίες μπορούμε να εκμεταλλευτούμε και με τη βοήθεια φασμάτων NMR δύο διαστάσεων ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY και  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) να αποδώσουμε τα σήματα ενός φάσματος  $^1\text{H}$  NMR στα αντίστοιχα πρωτόνια του μορίου DNA. Για να το επιτύχουμε αυτό πρέπει να ακολουθήσουμε και να αξιοποιήσουμε μια σειρά διασταυρούμενων κορυφών NOE, την οποία αποκαλούμε διαδρομή από βάση σε  $\text{H1}'$  (base-to- $\text{H1}'$  pathway). Αυτό που εκμεταλλευόμαστε στη διαδρομή αυτή είναι η κοντινή απόσταση που έχει το  $\text{H1}'$  του σακχάρου τόσο με τη δική του, όσο και με την επόμενη βάση της αλυσίδας. Έτσι λοιπόν, αρχικά προσδιορίζονται τα σήματα που αντιστοιχούν στο 5' και στο 3' άκρο της αλυσίδας, καθώς τα  $\text{H8}$  ή  $\text{H6}$  των άκρων θα έχουν διασταυρούμενη κορυφή NOE μόνο με το  $\text{H1}'$  της δικής του βάσης. Έτσι προσδιορίζεται το σήμα NMR του  $\text{H1}'$  της πρώτης βάσης του ολιγονουκλεοτιδίου. Από

αυτό, είναι εφικτό ακολούθως να προσδιοριστεί το H8 ή το H6 της δεύτερης βάσης. Ακολουθείται αυτή η διαδικασία όσες φορές χρειαστεί μέχρι να προσδιοριστούν όλα τα σήματα των H1', H6 και H8 του ολιγονουκλεοτιδίου. Τα σήματα των H5 των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου βρίσκονται, συνήθως, στην ίδια περιοχή με τα H1'. Αυτά τα δύο πρωτόνια εμφανίζουν μεταξύ τους πολύ έντονη διασταυρούμενη κορυφή NOE, μέσω της οποίας γίνεται η απόδοση των σημάτων για τα H5 του ολιγονουκλεοτιδίου. Για την περίπτωση που στην αλληλουχία της αλυσίδας του ολιγονουκλεοτιδίου υπάρχει θυμίνη, η απόδοση της κορυφής των πρωτονίων της μεθυλομάδας της θυμίνης, γίνεται από την ισχυρή διασταυρούμενη κορυφή που εμφανίζουν τα πρωτόνια αυτά με το H6 της ίδιας της θυμίνης. Τα σήματα των (n.b.) H2 των αδενοσινών αποδίδονται μέσω της διασταυρούμενης κορυφής που εμφανίζουν με τα H1' του απέναντι κλώνου του δίκλωνου μορίου. Αφού έχουν προσδιοριστεί οι κορυφές των (n.b.) H2 που δεν συμμετέχουν στον δεσμό W-C, είναι εύκολο να αποδοθούν τα σήματα των πρωτονίων που συμμετέχουν σε αυτόν, καθώς τα (W-C) H2 εμφανίζουν διασταυρούμενη κορυφή NOE με τα (n.b.) H2, τα οποία με τη σειρά τους εμφανίζουν NOE σήμα με τα (W-C) NH. Τέλος τα σήματα των πρωτονίων του σακχάρου προσδιορίζονται εύκολα από τα COSY σήματα που εμφανίζονται ξεκινώντας από το H1' - H2' και συνεχίζοντας.

## **2.6. Σύνθεση πρόδρομων συμπλόκων του Ru(II):**

### **2.6.1. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου [(cym)Ru(μ-Cl)Cl]<sub>2</sub> (Π1):**

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής [140] μεθόδου σε ό,τι αφορά τους διαλύτες, τις ποσότητες και τους χρόνους αντίδρασης επιτυγχάνοντας καλύτερη απόδοση.

202.5 mg τριύδατου χλωριδίου του ρουθηνίου(III) RuCl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O (0.78 mmol) διαλύονται σε 10 mL αιθανόλης σε σφαιρική φιάλη των 50 mL. Στο διάλυμα προστίθεται 1 mL α-φελλανδρένης (6.21 mmol). Το μείγμα αναδεύεται για 4 ώρες εν βρασμό με κάθετο ψυκτήρα (reflux). Κατά τη διάρκεια της ανάδευσης το αρχικά σκούρο κόκκινο χρώμα του διαλύματος εξασθενεί και το χρώμα του τελικού προϊόντος είναι κόκκινο. Μετά το πέρας των τεσσάρων ωρών ο όγκος του διαλύματος μειώνεται στο μισό του αρχικού ώστε να καταβυθιστεί το επιθυμητό στερεό. Ακολούθως το μίγμα ψύχεται για 24 ώρες στους -4° C με αποτέλεσμα την καταβύθιση επιπλέον στερεού. Μετά το πέρας των 24 ωρών το στερεό συλλέγεται, εκπλένεται με 3 mL τολουολίου και 5 mL διαιθυλαιθέρα και ξηραίνεται. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με εκείνα της βιβλιογραφίας [140]. Απόδοση (%): 94%.

### **2.6.2. Σύνθεση του συμπλόκου [(cym)Ru(phen)Cl]PF<sub>6</sub> (Π2):**

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής [141] μεθόδου σε ό,τι αφορά τους διαλύτες, τις ποσότητες και τους χρόνους αντίδρασης επιτυγχάνοντας καλύτερη απόδοση.

Σε σφαιρική φιάλη των 25 mL εισάγονται 8 mL MeOH και 62 mg [(cym)Ru(μ-Cl)Cl]<sub>2</sub> (0.10 mmol). Στο παραπάνω διάλυμα προστίθενται 38.3 phen (0.21 mmol) και ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος σε T = 65° C για 16 h. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σχηματίζεται μαύρο ίζημα το οποίο απομακρύνεται με διήθηση. Το διήθημα κίτρινου χρώματος συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και το σχηματιζόμενο στερεό, κίτρινου χρώματος επίσης, επαναδιαλύεται σε 3 mL H<sub>2</sub>O. Στο νέο διάλυμα γίνεται προσθήκη περίσσειας KPF<sub>6</sub> με αποτέλεσμα την καταβύθιση κίτρινου ιζήματος. Το ίζημα αυτό συλλέγεται και αφού εκπλυθεί με H<sub>2</sub>O (2 × 5 mL) και μίγμα 8:1 Et<sub>2</sub>O/MeOH (2 × 9 mL), ξηραίνεται. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με εκείνα της βιβλιογραφίας [141]. Απόδοση 91%. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, acetone-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.96 (d, 2H), 8.91 (d, 2H), 8.28 (s, 2H), 8.16 (t, 2H), 6.34 (d, 2H), 6.11 (d, 2H), 2.80 (m, 1H) 2.28 (s, 3H), 1.05

(d, 6H). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.93 (d, 2H), 8.93 (d, 2H), 8.30 (s, 2H), 8.17 (t, 2H), 6.34 (d, 2H), 6.11 (d, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 0.91 (d, 6H).

### 2.6.3. Σύνθεση του συμπλόκου [(cym)Ru(ppy)Cl] (Π3):

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής [141] μεθόδου σε ό,τι αφορά τους διαλύτες, τις ποσότητες και τους χρόνους αντίδρασης επιτυγχάνοντας καλύτερη απόδοση.

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL εισάγονται 8 mL απαερωμένης μεθανόλης και σε αυτή διαλύονται 60.3 mg διμερούς συμπλόκου [(cym)Ru(μ-Cl)Cl]<sub>2</sub> (0.098 mmol), 28 μL 2-φαινυλοπυριδίνης (ppy, 0.197 mmol) και 38.7 mg KOAc (0.394 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος το διάλυμα έχει αποκτήσει κίτρινο χρώμα, ενώ παρατηρείται και ο σχηματισμός μαύρου ιζήματος το οποίο απομακρύνεται με διήθηση. Το διάλυμα που απομένει συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον ίζημα διαλύεται σε 5 mL χλωροφορμίου, από το οποίο απορρίπτεται το μη διαλυτό μέρος το ιζήματος. Στη συνέχεια το ίζημα διαλύεται σε 5 mL ακετόνης. Όμοια με το χλωροφόρμιο, μέρος του ιζήματος παραμένει αδιάλυτο και απομακρύνεται με διήθηση. Το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και εκπλένεται με C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (3 × 10 mL). Τέλος, ακολουθεί συλλογή και ξήρανση του ιζήματος. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με αυτά της βιβλιογραφίας [141]. Απόδοση 97 %. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.35 (d, 1H), 8.13 (d, 1H), 7.94 (d, 1H), 7.82 (t, 1H), 7.72 (d, 1H), 7.20 (t, 1H), 7.06 (t, 1H), 6.95 (t, 1H), 5.75 (d, 1H), 5.68 (d, 1H), 5.41 (d, 1H), 5.15 (d, 1H), 2.28 (m, 1H), 1.92 (s, 3H), 0.85 (d, 3H), 0.77 (d, 3H). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, acetone-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.39 (d, 1H), 8.15 (d, 1H), 7.89 (d, 1H), 7.80 (t, 1H), 7.69 (d, 1H), 7.16 (t, 1H), 7.06 (t, 1H), 6.94 (t, 1H), 5.72 (overlapping d, 1H), 5.69 (overlapping d, 1H), 5.36 (d, 1H), 5.06 (d, 1H), 2.41 (m, 1H), 2.00 (s, 1H), 0.96 (d, 3H), 0.85 (d, 3H).

### 2.6.4. Σύνθεση του συμπλόκου [(cym)Ru(bzq)Cl] (Π4):

Το σύμπλοκο αυτό παρασκευάστηκε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής [141] μεθόδου σε ό,τι αφορά τους διαλύτες, τις ποσότητες και τους χρόνους αντίδρασης επιτυγχάνοντας καλύτερη απόδοση.

Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 8 mL απαερωμένης μεθανόλης και σε αυτή διαλύονται 105.7 mg διμερούς συμπλόκου [(cym)RuCl(μ-Cl)]<sub>2</sub> (0.17 mmol), 61.9 mg βενζο[h]κινολίνης (bzq, 0.34 mmol) και 67.8 mg KOAc (0.69 mmol). Το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες με αποτέλεσμα τη μεταβολή του χρώματος σε πορτοκαλί και την καταβύθιση μαύρου ιζήματος, το οποίο απομακρύνεται με διήθηση. Το εναπομείναν διάλυμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και το προκύπτον ίζημα διαλύεται σε 5 mL χλωροφορμίου. Μέρος του ιζήματος παραμένει αδιάλυτο στο χλωροφόρμιο και απομακρύνεται με διήθηση. Στη συνέχεια το ίζημα διαλύεται σε 5 mL ακετόνης. Όμοια με το χλωροφόρμιο, μέρος του ιζήματος παραμένει αδιάλυτο και απομακρύνεται με διήθηση. Το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και εκπλένεται με C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (3 × 10 mL). Τέλος, ακολουθεί συλλογή και ξήρανση του ιζήματος. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα συμφωνούν με εκείνα της βιβλιογραφίας [141]. Απόδοση 96%. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.65 (d, 1H), 8.43 (d, 1H), 8.36 (d, 1H), 7.83 (t, 1H), 7.70 (d, 1H), 7.52 (overlapping d, 1H), 7.50 (overlapping d, 1H), 5.84 (dd, 2H), 5.54 (d, 1H), 5.32 (d, 1H), 2.32 (m, 1H), 1.92 (s, 3H), 0.81 (d, 3H), 0.70 (d, 3H). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, acetone-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.66 (d, 1H), 8.39 (d, 1H), 8.36 (d, 1H), 7.81 (t, 1H), 7.65 (d, 1H), 7.57 (t, 1H), 7.51 (overlapping d, 1H), 7.50 (overlapping d, 1H), 5.84 (dd, 2H), 5.47 (d, 1H), 5.22 (d, 1H), 2.45 (m, 1H), 2.00 (s, 3H), 0.92 (d, 3H), 0.78 (d, 3H).

## **2.7. Σύνθεση υποκαταστατών:**

### **2.7.1. Σύνθεση του 1,4-βενζυλ-διβορονικού πινακολικού εστέρα:**

Η σύνθεση έγινε με κατάλληλη τροποποίηση της βιβλιογραφικής μεθόδου [142].

Σε φιάλη των 25 mL εισάγονται 500 mg 1,4-διβρωμοβενζόλιο (212 mmol), 5,3 mg Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0.006 mmol) και 1.29 mg διβορονικού πινακολικού εστέρα (5.08 mmol). Ακολούθως προστίθενται 1.25 g KOAc (12.72 mmol) το οποίο είχε προηγουμένως ξηρανθεί σε T = 140° C για 2 ώρες. Στη συνέχεια, γίνεται απαέρωση των στερεών αντιδραστηρίων υπό διοχέτευση αερίου N<sub>2</sub> για 20 min. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος, στο μίγμα των απαερωμένων στερεών προστίθενται 15 mL του διαλύτη 1,4-διοξάνιο. Το μίγμα αναδεύεται για 12 h σε T = 60° C. Έπειτα, γίνεται διήθηση του μίγματος της αντίδρασης, παρουσία Celite, και έκπλυση με οξικό αιθυλεστέρα (3 × 5 mL). Ο διαλύτης του διηθήματος εξατμίζεται, ακολούθως, υπό κενό, με αποτέλεσμα την καταβύθιση λευκού μικροκρυσταλλικού στερεού. Το προκύπτον στερεό εκπλένεται με αιθανόλη μέχρι τα διηθήματα των εκπλύσεων να είναι άχρωμα. Απόδοση 95%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ σε ppm): 7.80 (s, 4H), 1.35 (s, 24H).

### **2.7.2. Σύνθεση του 4,4'-διφαινυλο-διβορονικού πινακολικού εστέρα:**

Η σύνθεση έγινε με κατάλληλη τροποποίηση της βιβλιογραφικής μεθόδου [142].

Σε φιάλη των 25 mL εισάγονται 500 mg 4,4'-διβρωμοδιφαινύλιο (1.6 mmol), 6 mg Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (0.008 mmol) και 975 mg διβορονικού πινακολικού εστέρα (0.84 mmol). Ακολουθεί προσθήκη 942 mg KOAc (9.6 mmol), το οποίο είχε ξηρανθεί προηγουμένως σε T = 140° C για 2 ώρες. Τα στερεά απαερώνονται υπό διοχέτευση αερίου N<sub>2</sub> για 20 min και στη συνέχεια προστίθενται 20 mL 1,4-διοξάνιου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε T = 60° C για 12 h. Μετά το πέρας των 12 ωρών γίνεται διήθηση του μίγματος, παρουσία Celite, και έκπλυση με οξικό αιθυλεστέρα (3×5 mL). Έπειτα, το μίγμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού, υπό κενό, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό λευκού μικροκρυσταλλικού στερεού. Το προκύπτον στερεό εκπλένεται με αιθανόλη, μέχρι το διήθημα των εκπλύσεων να είναι άχρωμο. Απόδοση 95%. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ σε ppm): 7.88 (d, 4H), 7.63 (d, 4H) 1.36 (s, 24H).

### **2.7.3. Σύνθεση του 1,4-δισ(4-πυριδυλο)βενζόλιο (dprbz, BL4):**

Ο υποκαταστάτης συντέθηκε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου σε ό,τι αφορά τους χρόνους τις αντίδρασης, τη θερμοκρασία και τους διαλύτες με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης [143].

Σε φιαλίδιο με πώμα των 25 mL, εισάγονται 400 mg 1,4-βενζυλδιβορονικού πινακολικού εστέρα (1.22 mmol), 1.5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (14.54 mmol), 2.3 g υδροχλωρικής 4-βρωμοπυριδίνης (12.12 mmol) και 114 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.11 mmol). Αυτά, απαερώνονται με παροχή αερίου N<sub>2</sub> για 20 λεπτά. Στο μίγμα προστίθενται 10 mL τολουολίου και 1 mL H<sub>2</sub>O τα οποία έχουν επίσης απαερωθεί. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται υπό θέρμανση (T = 100° C) για 48 ώρες. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος παρατηρείται ότι έχει καταβυθιστεί λευκό ίζημα. Ακολούθως, απομακρύνεται ο διαλύτης υπό κενό, με αποτέλεσμα την αύξηση της ποσότητας του λευκού στερεού. Αυτό εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×10 mL), τολουόλιο (2×3 mL), μεθανόλη (3×5 mL) και διαιθυλαιθέρα (2×5 mL). Απόδοση 60%. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 8.68 (d, 4H), 7.98 (s, 4H), 7.80 (d, 4H).

#### **2.7.4. Σύνθεση του 4,4'-δισ(4-πυριδυλο)-1,1'-διφαινύλιο (dppbh, BL5):**

Ο υποκαταστάτης συντέθηκε με μικρές τροποποιήσεις της βιβλιογραφικής μεθόδου σε ό,τι αφορά τους χρόνους τις αντίδρασης, τη θερμοκρασία και τους διαλύτες με σκοπό τη βελτίωση της απόδοσης [143].

Σε φιαλίδιο με πώμα των 25 mL, εισάγονται 418 mg 4,4'-διφαινυλοδιβολονικού πινακολικού εστέρα (1.02 mmol), 1.3 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (12.34 mmol), 2 g υδροχλωρικής 4-βρωμοπυριδίνης (10.28 mmol) και 119 mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.1 mmol). Τα στερεά απαερώνονται με παροχή αερίου N<sub>2</sub> για 20 λεπτά. Ακολούθως, προστίθενται 15 mL τολουολίου και 1.5 mL H<sub>2</sub>O, επίσης απαερωμένα. Το μίγμα αναδεύεται υπό θέρμανση (T = 100° C) για 48 ώρες. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος παρατηρείται η καταβύθιση υποκίτρινου στερεού. Αφού εξατμιστεί υπό κενό ο διαλύτης, το στερεό υπόλειμμα εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×10 mL), τολουόλιο (3×3 mL), μεθανόλη (3×5 mL) και διαιθυλαιθέρα (2×5 mL). Απόδοση 65%. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 8.67 (d, 4H), 7.94 (dd, 8H), 7.79 (d, 4H).

#### **2.8. Σύνθεση συμπλόκων του Ru(II):**

##### **2.8.1. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου {{{(cym)Ru(ppry)}<sub>2</sub>(μ-BL1)}(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, (1):**

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 27.1 mg P3 (0.06 mmol) και 9.8 mg AgNO<sub>3</sub> (0.06 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός, για 32 ώρες. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος παρατηρείται η καταβύθιση λευκού ιζήματος AgCl, το οποίο απομακρύνεται με διήθηση. Στο διήθημα προστίθενται 2.99 mg 4,4'-bpy (0.02 mmol) και το σκούρο πράσινο διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Στη συνέχεια, στο διάλυμα, του οποίου το χρώμα δεν έχει μεταβληθεί, γίνεται προσθήκη 55.2 mg KPF<sub>6</sub> (0.3 mmol) με αποτέλεσμα την καταβύθιση σκούρου πράσινου ιζήματος. Το ίζημα συλλέγεται και εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×3 mL) και ξηραίνεται. Απόδοση 66%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.59 (d, 2H), 8.39 (d, 2H), 8.21 (d, 4H), 7.95 (d, 2H), 7.92 (t, 2H), 7.70 (d, 2H), 7.40 (t, 2H), 7.27 (t, 2H), 7.06 (d, 4H), 6.12 (d, 2H), 6.05 (d, 2H), 5.87 (d, 2H), 5.41 (d, 2H), 2.10 (m, 2H), 1.51 (s, 6H), 0.71 (d, 6H), 0.67 (d, 6H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1081.1123, θεωρητικό: 1081.1025 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>52</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(ppry)}<sub>2</sub>(μ-BL1)}(PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>.

##### **2.8.2. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου {{{(cym)Ru(ppry)}<sub>2</sub>(μ-BL2)}(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>, (2):**

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 30.3 mg P3 (0.07 mmol) και 10.9 mg AgNO<sub>3</sub> (0.06 mmol) και το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός, για 32 ώρες. Στο διάστημα αυτό παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από κίτρινο σε σκούρο πράσινο και καταβύθιση λευκού ιζήματος AgCl. Αφού ο AgCl απομακρυνθεί με διήθηση, στο διάλυμα προστίθενται 3.9 mg bpy (0.02 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος, δεν παρατηρείται μεταβολή στο χρώμα του διαλύματος. Ακολούθως, γίνεται προσθήκη 64.4 mg KPF<sub>6</sub> (0.35 mmol) με αποτέλεσμα την καταβύθιση σκούρου πράσινου ιζήματος. Το ίζημα συλλέγεται και εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×3 mL) και ξηραίνεται. Απόδοση 65%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.60 (d, 2H), 8.40 (d, 2H), 8.22 (d, 4H), 7.96 (overlapping d, 4H), 7.72 (d, 2H), 7.42 (t, 2H), 7.28 (t, 2H), 7.06 (overlapping d, 6H), 6.12 (d, 2H), 6.08 (d, 2H), 5.90 (d, 2H), 5.42 (d, 2H), 2.71 (d, 4H), 2.12 (m, 2H), 1.47 (s, 6H), 0.72 (d, 6H), 0.67 (d, 6H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1108.1401, θεωρητικό: 1108.1502 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>54</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(ppry)}<sub>2</sub>(μ-BL2)}(PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>.

### **2.8.3. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(cym)Ru(ppy)]_2(\mu-BL3)\}(PF_6)_2$ , (3):**

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700  $\mu$ L Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 29.5 mg P3 (0.07 mmol) και 10.6 mg AgNO<sub>3</sub> (0.06 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός, για 32 ώρες. Στο διάστημα αυτό το χρώμα του διαλύματος μεταβάλλεται από κίτρινο σε σκούρο πράσινο, ενώ παρατηρείται και η καταβύθιση λευκού ιζήματος AgCl. Αφού το ίζημα απομακρυνθεί με φυγοκέντρηση, στο διάλυμα προστίθενται 4.1 mg brrp (0.02 mmol) και το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Στο διάστημα αυτό δεν παρατηρείται μεταβολή στο χρώμα του διαλύματος. Ακολούθως, γίνεται προσθήκη 64.4 mg KPF<sub>6</sub> (0.35 mmol) με αποτέλεσμα την καταβύθιση σκούρου πράσινου ιζήματος. Το ίζημα συλλέγεται, εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3x3 mL) και τέλος ξηραίνεται. Απόδοση 64%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.61 (d, 2H), 8.41 (d, 2H), 8.23 (d, 4H), 7.95 (overlapping d, 4H), 7.72 (d, 2H), 7.42 (t, 2H), 7.27 (t, 2H), 7.07 (overlapping d, 6H), 6.14 (d, 2H), 6.07 (d, 2H), 5.89 (d, 2H), 5.43 (d, 2H), 2.43 (t, 4H), 1.62 (t, 2H), 1.52 (s, 6H), 0.73 (d, 6H), 0.68 (d, 6H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1122.1849, θεωρητικό: 1122.1823 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>55</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν  $\{[(cym)Ru(ppy)]_2(\mu-BL3)\}(PF_6)^+$ .

### **2.8.4. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(cym)Ru(ppy)]_2(\mu-BL4)\}(PF_6)_2$ , (4):**

Σε σφαιρική φιάλη των συνέχεια 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 300  $\mu$ L Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 37,8 mg P3 (0.09 mmol) και 13.6 mg AgNO<sub>3</sub> (0.08 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 32 ώρες, απουσία φωτός. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το ίζημα AgCl και γίνεται προσθήκη 6.2 mg drbz (0.03 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 64 ώρες και ακολούθως προστίθενται 7 mL H<sub>2</sub>O και περίσσεια KPF<sub>6</sub> με αποτέλεσμα την καταβύθιση σκούρου πράσινου ιζήματος. Το ίζημα, αφού συλλεχθεί, εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3x6 mL). Ακολούθως, γίνεται προσθήκη 10 mL Me<sub>2</sub>CO και με διήθηση διαχωρίζεται το ίζημα που μένει αδιάλυτο στην Me<sub>2</sub>CO από το διήθημα. Το διήθημα, τέλος, συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Απόδοση 67%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.80 (d, 2H), 8.67 (d, 4H), 8.54 (d, 2H), 8.01 (overlapping d, 2H), 8.00 (overlapping t, 2H), 7.83 (s, 4H), 7.77 (d, 2H), 7.66 (d, 4H), 7.47 (t, 2H), 7.35 (t, 2H), 7.14 (t, 2H), 6.31 (d, 2H), 6.24 (d, 2H), 6.01 (d, 2H), 5.56 (d, 2H), 2.31 (m, 2H), 1.73 (s, 6H), 0.87 (d, 6H), 0.81 (d, 6H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1156.2021, θεωρητικό: 1159.1922 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>58</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν  $\{[(cym)Ru(ppy)]_2(\mu-BL4)\}(PF_6)^+$ .

### **2.8.5. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου $\{[(cym)Ru(bzq)]_2(\mu-BL1)\}(PF_6)_2$ , (5):**

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700  $\mu$ L Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 28.3 mg P4 (0.06 mmol) και 9.6 mg AgNO<sub>3</sub> (0.06 mmol) και το διάλυμα κίτρινου χρώματος αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός, για 32 ώρες. Στο χρονικό διάστημα αυτό, το χρώμα του διαλύματος μεταβάλλεται από κίτρινο σε σκούρο πράσινο, ενώ παρατηρείται και καταβύθιση λευκού ιζήματος AgCl. Αφού το ίζημα AgCl απομακρυνθεί με διήθηση, στο διάλυμα προστίθενται 2.9 mg 4,4'-bpy (0.02 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Στο χρονικό διάστημα αυτό το χρώμα του διαλύματος παραμένει σταθερό. Ακολούθως γίνεται προσθήκη 55.2 mg KPF<sub>6</sub> (0.3 mmol) με αποτέλεσμα την καταβύθιση σκούρου πράσινου ιζήματος. Το ίζημα συλλέγεται, εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3 · 3 mL) και τέλος ξηραίνεται. Απόδοση 74%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.95 (d, 2H), 8.67 (d, 2H), 8.52, (d, 2H), 8.47 (d, 4H), 7.82 (t, 2H), 7.80 (d, 2H), 7.69 (t, 2H), 7.65 (d, 2H), 7.64 (d, 2H), 7.44 (d, 4H), 6.25 (d, 2H), 6.20 (d, 2H), 5.99 (d, 2H), 5.59 (d, 2H), 2.06 (m, 2H), 1.54 (s, 6H), 0.59 (d, 6H), 0.52 (d, 6H). HR-ESI-MS (5 mL

CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1129.2076, θεωρητικό: 1129.1915 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>56</sub>H<sub>52</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(bzq)}<sub>2</sub>(μ-BL1)}(PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>.

### **2.8.6. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου {{{(cym)Ru(bzq)}<sub>2</sub>(μ-BL2)}(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (6):**

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 28.8 mg P4 (0.06 mmol) και 9.8 mg AgNO<sub>3</sub> (0.06 mmol) και το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός, για 32 ώρες. Στο χρονικό διάστημα αυτό, το χρώμα του διαλύματος μεταβάλλεται από κίτρινο σε σκούρο πράσινο. Ακόμη, καταβυθίζεται λευκό ίζημα AgCl το οποίο απομακρύνεται με διήθηση. Στη συνέχεια, στο διάλυμα προστίθενται 4.1 mg bpe (0.02 mmol) και γίνεται ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Στο χρονικό διάστημα αυτό δεν παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του διαλύματος. Έπειτα, προστίθενται 55.2 mg KPF<sub>6</sub> (0.3 mmol) με αποτέλεσμα την καταβύθιση σκούρου πράσινου ιζήματος. Το ίζημα συλλέγεται, εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×3 mL) και τέλος ξηραίνεται. Απόδοση 71%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 10.01 (d, 2H), 8.72 (d, 2H), 8.55 (d, 2H), 8.42 (d, 4H), 7.87 (d, 2H), 7.81 (t, 2H), 7.74 (d, 2H), 7.70 (d, 2H), 6.96 (d, 4H), 6.31 (d, 2H), 6.29 (d, 2H), 6.04 (d, 2H), 5.57 (d, 2H), 2.66 (s, 4H), 2.17 (m, 2H), 1.60 (s, 6H), 0.71 (d, 6H), 0.63 (d, 6H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1157.2358, θεωρητικό: 1157.2228 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>58</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(bzq)}<sub>2</sub>(μ-BL2)}(PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>.

### **2.8.7. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου {{{(cym)Ru(bzq)}<sub>2</sub>(μ-BL3)}(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (7):**

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 15.8 mg P4 (0.04 mmol) και 5.4 mg AgNO<sub>3</sub> (0.03 mmol) και το προκύπτον διάλυμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός, για 32 ώρες. Στο χρονικό διάστημα αυτό το χρώμα του διαλύματος μεταβάλλεται από κίτρινο σε σκούρο πράσινο. Επιπλέον, παρατηρείται η καταβύθιση λευκού ιζήματος AgCl, το οποίο απομακρύνεται με διήθηση. Ακολούθως, στο διήθημα προστίθενται 2.1 mg bpp (0.01 mmol) και γίνεται ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Στο χρονικό διάστημα αυτό δεν παρατηρείται μεταβολή του χρώματος του διαλύματος. Έπειτα, προστίθενται 36.8 mg KPF<sub>6</sub> (0.2 mmol) με αποτέλεσμα την καταβύθιση σκούρου πράσινου ιζήματος. Το ίζημα, αφού συλλεχθεί, εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×3 mL) και τέλος ξηραίνεται. Απόδοση 73%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.91 (d, 2H), 8.64 (d, 2H), 8.52 (d, 2H), 8.21 (d, 4H), 7.80 (overlapping d, 2H), 7.79 (overlapping t, 2H), 7.66 (overlapping d, 6H), 6.92 (d, 4H), 6.21 (d, 2H), 6.16 (d, 2H), 5.94 (d, 2H), 5.53 (d, 2H), 2.29 (t, 4H), 2.04 (m, 2H), 1.52 (s, 6H), 1.43 (m, 4H), 0.59 (d, 6H), 0.52 (d, 6H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1171.2424, θεωρητικό: 1171.2385 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>59</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(bzq)}<sub>2</sub>(μ-BL3)}(PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>.

### **2.8.8. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου {{{(cym)Ru(bzq)}<sub>2</sub>(μ-BL4)}(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (8):**

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 300 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 22.7 mg P4 (0.05 mmol) και 7.7 mg AgNO<sub>3</sub> (0.05 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 32 ώρες, απουσία φωτός. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το ίζημα AgCl και γίνεται προσθήκη 3.5 mg drbz (0.02 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 64 ώρες και ακολούθως συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το προκύπτον ίζημα διαλύεται σε 5 mL Me<sub>2</sub>CO και, αφού γίνει προσθήκη περίσσειας NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για επιπλέον 40 ώρες. Έπειτα, γίνεται συμπύκνωση του μίγματος μέχρι ξηρού και το ίζημα εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×6 mL). Τέλος, γίνεται ξήρανση του ιζήματος. Απόδοση 66%.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 10.00 (d, 2H), 8.72 (d, 2H), 8.56 (d, 2H), 8.45 (d, 4H), 7.86 (overlapping d, 2H), 7.84 (overlapping t, 2H), 7.73 (overlapping s, 4H), 7.73 (overlapping d, 4H), 7.72 (overlapping t, 2H), 7.66 (d, 2H), 7.56 (d, 4H), 6.30 (d, 2H), 6.22 (d, 2H), 6.02 (d, 2H), 6.02 (d, 2H), 5.64 (d, 2H), 2.11 (m, 2H), 1.63 (s, 6H), 0.63 (d, 6H), 0.56 (d, 6H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1204.2436, θεωρητικό: 1204.2415 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>62</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(bzq)}<sub>2</sub>(μ-BL4)}(PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>}.

### 2.8.9. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου {{{(cym)Ru(bzq)}[(cym)Ru(phen)](μ-BL1)}(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, (9):

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 24,1 mg P2 (0.04 mmol) και 6,2 mg AgNO<sub>3</sub> (0.04 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται σε T = 75° C για 16 ώρες, απουσία φωτός. Στη συνέχεια απομακρύνεται το λευκό ίζημα AgCl και προστίθενται 8,8 mg 4,4'-bpy (0.06 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται (T=75° C) για 16 ώρες και ακολούθως ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθεται περίσσεια KPF<sub>6</sub> με αποτέλεσμα την καθίζηση κίτρινου ιζήματος το οποίο εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (2 · 4 mL) και ξηραίνεται.

Παράλληλα, σε άλλη σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 300 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 18,1 mg P4 (0.04 mmol) και 6,2 mg AgNO<sub>3</sub> (0.04 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός, για 40 ώρες. Αφού απομακρυνθεί το ίζημα AgCl από το μίγμα της αντίδρασης, γίνεται προσθήκη του ιζήματος που απομονώθηκε από την προηγούμενη σφαιρική φιάλη (διαλυμένο σε 2 mL Me<sub>2</sub>CO). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος, γίνεται προσθήκη επιπλέον 10 mL H<sub>2</sub>O και περίσσειας KPF<sub>6</sub>, με αποτέλεσμα την καταβύθιση πράσινου ιζήματος. Αφού το ίζημα απομονωθεί εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×6 mL) και ξηραίνεται. Απόδοση 77%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 10.41 (d, 2H), 10.03 (d, 1H), 9.05 (d, 2H), 8.79 (d, 2H), 8.73 (overlapping d, 1H), 8.72 (overlapping t, 1H) 8.72 (overlapping d, 1H), 8.71 (overlapping d, 2H), 8.55 (d, 1H), 8.37 (t, 2H), 8.30 (s, 2H), 7.85 (d, 1H), 7.81 (t, 1H), 7.71 (overlapping d, 1H), 7.70 (overlapping d, 1H), 7.62 (d, 2H), 7.43 (d, 1H), 6.85 (d, 2H), 6.48 (d, 2H), 6.36 (d, 1H), 6.32 (d, 1H), 6.07 (d, 1H), 5.62 (d, 1H), 2.21 (m, 1H), 1.69 (s, 3H), 0.71 (d, 3H), 0.63 (d, 3H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1171.2424, θεωρητικό: 1171.2385 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>55</sub>H<sub>52</sub>N<sub>5</sub>P<sub>2</sub>F<sub>12</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(bzq)}[(cym)Ru(phen)](μ-BL1)}(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>}<sup>+</sup>.

### 2.8.10. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου {{{(cym)Ru(bzq)}[(cym)Ru(phen)](μ-BL2)}(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, (10):

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 37.1 mg P3 (0.06 mmol) και 9.5 mg AgNO<sub>3</sub> (0.06 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται σε T = 75° C για 16 ώρες, απουσία φωτός. Στη συνέχεια απομακρύνεται το λευκό ίζημα AgCl και προστίθενται 16.05 mg bpy (0.09 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται (T=75° C) για 16 ώρες και ακολούθως ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθενται 5 mL H<sub>2</sub>O και περίσσεια KPF<sub>6</sub> με αποτέλεσμα την καταβύθιση ιζήματος κίτρινου χρώματος. Το ίζημα συλλέγεται, εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (2 · 4 mL) και ξηραίνεται.

Παράλληλα, σε άλλη σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 300 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 28.0 mg P4 (0.06 mmol) και 9.5 mg AgNO<sub>3</sub> (0.06 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός, για 32 ώρες. Αφού απομακρυνθεί το ίζημα AgCl από το μίγμα της αντίδρασης, γίνεται προσθήκη του ιζήματος που απομονώθηκε από την προηγούμενη σφαιρική φιάλη (διαλυμένο σε 2 mL Me<sub>2</sub>CO). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Μετά το πέρας του παραπάνω

χρονικού διαστήματος, γίνεται προσθήκη επιπλέον 10 mL H<sub>2</sub>O και περίσσειας KPF<sub>6</sub>, με αποτέλεσμα την καταβύθιση πράσινου ιζήματος. Αφού το ίζημα απομονωθεί εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×6 mL) και ξηραίνεται. Απόδοση 75%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 10.40 (d, 2H), 10.03 (d, 1H), 9.07 (d, 2H), 8.72 (d, 1H), 8.55 (overlapping d, 1H), 8.54 (overlapping d, 2H), 8.47 (d, 2H), 8.38 (t, 2H), 8.33 (s, 2H), 7.87 (d, 1H), 7.81 (t, 1H), 7.73 (overlapping d, 1H), 7.72 (overlapping d, 1H), 7.71 (overlapping d, 1H), 7.24 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 6.83 (d, 2H), 6.44 (overlapping d, 1H), 6.42 (overlapping d, 1H), 6.34 (d, 1H), 6.29 (d, 1H), 6.04 (d, 1H), 5.59 (d, 1H), 2.74 (t, 2H), 2.69 (t, 2H), 2.56 (m, 1H), 2.19 (m, 1H), 1.84 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 0.83 (d, 6H), 0.70 (d, 3H), 0.63 (d, 3H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1304.2021, θεωρητικό: 1304.1901 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>57</sub>H<sub>56</sub>N<sub>5</sub>P<sub>2</sub>F<sub>12</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(bzq)}[(cym)Ru(phen)](μ-BL2)}(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>}<sup>+</sup>.

#### **2.8.11. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου {{{(cym)Ru(bzq)}[(cym)Ru(phen)](μ-BL3)}(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, (11):**

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 34.5 mg P2 (0.06 mmol) και 8.9 mg AgNO<sub>3</sub> (0.05 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται σε T = 75° C για 16 ώρες, απουσία φωτός. Στη συνέχεια απομακρύνεται το λευκό ίζημα AgCl και προστίθενται 16.05 mg brrp (0.09 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται (T=75°C) για 16 ώρες και ακολούθως ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθενται 5 mL H<sub>2</sub>O και περίσσεια KPF<sub>6</sub> με αποτέλεσμα την καταβύθιση ιζήματος κίτρινου χρώματος. Το ίζημα συλλέγεται, εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (2 · 4 mL) και ξηραίνεται.

Παράλληλα, σε άλλη σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 300 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 26.0 mg P4 (0.06 mmol) και 8.9 mg AgNO<sub>3</sub> (0.05 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός, για 32 ώρες. Αφού απομακρυνθεί το ίζημα AgCl από το μίγμα της αντίδρασης, γίνεται προσθήκη του ιζήματος που απομονώθηκε από την προηγούμενη σφαιρική φιάλη (διαλυμένο σε 2 mL Me<sub>2</sub>CO). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Μετά το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος, γίνεται προσθήκη επιπλέον 10 mL H<sub>2</sub>O και περίσσειας KPF<sub>6</sub>, με αποτέλεσμα την καταβύθιση πράσινου ιζήματος. Αφού το ίζημα απομονωθεί εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×6 mL) και ξηραίνεται. Απόδοση 74%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 10.40 (d, 2H), 10.02 (d, 1H), 9.06 (d, 2H), 8.73 (d, 1H), 8.55 (d, 1H), 8.52 (d, 2H), 8.45 (d, 2H), 8.37 (t, 2H), 8.32 (s, 2H), 7.87 (d, 1H), 7.81 (t, 1H), 7.73 (overlapping d, 1H), 7.72 (overlapping d, 1H), 7.70 (overlapping d, 1H), 7.18 (d, 2H), 6.96 (d, 2H), 6.83 (d, 2H), 6.44 (d, 2H), 6.33 (d, 1H), 6.29 (d, 1H), 6.04 (d, 1H), 5.59 (d, 1H), 2.56 (m, 1H), 2.48 (t, 2H), 2.42 (t, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.60 (m, 2H), 1.29 (s, 3H), 0.84 (d, 6H), 0.72 (d, 3H), 0.64 (d, 3H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1318.2067, θεωρητικό: 1318.2057 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>58</sub>H<sub>58</sub>N<sub>5</sub>P<sub>2</sub>F<sub>12</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(bzq)}[(cym)Ru(phen)](μ-BL3)}(PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>}<sup>+</sup>.

#### **2.8.12. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου {{{(cym)Ru(phen)}<sub>2</sub>(μ-BL4)}(PF<sub>6</sub>)<sub>4</sub>, (12):**

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 25.2 mg P2 (0.04 mmol) και 6.5 mg AgNO<sub>3</sub> (0.03 mmol) και το διάλυμα θερμαίνεται (T=70°C) για 3 ώρες, απουσία φωτός. Ακολούθως, απομακρύνεται το λευκό ίζημα AgCl που έχει σχηματιστεί με διήθηση και στο διήθημα προστίθενται 3.4 mg drpbz (0.02 mmol). Το διάλυμα θερμαίνεται (T=70° C) για 16 ώρες. Στη συνέχεια, το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και σε αυτό γίνεται προσθήκη περίσσειας KPF<sub>6</sub> με αποτέλεσμα την καταβύθιση κίτρινου ιζήματος. Το ίζημα, αφού συλλεχθεί, εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3×3 mL), CHCl<sub>3</sub> (3×3 mL) και ξηραίνεται. Απόδοση 79%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 10.45 (d, 4H), 9.07 (d, 4H), 8.75 (d, 4H), 8.40 (t, 4H), 8.32 (s, 4H), 7.75 (s, 4H), 7.71 (d, 4H), 6.87 (d, 4H), 6.51 (d, 4H), 2.63 (m,

2H), 1.29 (s, 6H), 0.87 (d, 12H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1498.1676, θεωρητικό: 1498.1608 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>60</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>P<sub>3</sub>F<sub>18</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(phen)}<sub>2</sub>(μ-BL4)}(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>}<sup>+</sup>.

### 2.8.13. Σύνθεση του διμερούς συμπλόκου {{{(cym)Ru(phen)}<sub>2</sub>(μ-BL5)}Cl<sub>4</sub> (13):

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 40 mg Π2 (0.07 mmol) και 10.2 mg AgNO<sub>3</sub> (0.06 mmol). Το μίγμα θερμαίνεται (T = 75° C) για 16 ώρες, απουσία φωτός. Στη συνέχεια απομακρύνεται το ίζημα AgCl και το υγρό διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Το στερεό υπόλειμμα εισάγεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL που περιέχει 15 mL Me<sub>2</sub>CO και 3 mL CHCl<sub>3</sub>. Στη φιάλη επίσης προστίθενται 6.5 mg drbrh (0.02 mmol) καθώς επίσης και περίσσεια NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται (T=65° C) για 16 ώρες με αποτέλεσμα την καθίζηση ιζήματος καφέ χρώματος. Το μίγμα διηθείται, το διήθημα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και διαλύεται σε 2 mL CH<sub>3</sub>CN. Το επιθυμητό προϊόν λαμβάνεται με χρωματογραφία στήλης σίλικας 200 Mesh ύψους 30 cm και διαμέτρου 4 cm. Για την λήψη του πρώτου κλάσματος (παραπροϊόντα) ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε CH<sub>3</sub>CN, ενώ για τη λήψη του δεύτερου κλάσματος (επιθυμητό προϊόν) ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (8/1) κορεσμένο με KNO<sub>3</sub>. Το δεύτερο κλάσμα της χρωματογραφίας στήλης συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού, εκπλένεται με H<sub>2</sub>O (3 × 5 mL) και ξηραίνεται. Τέλος, για την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος, είναι απαραίτητη και η αλλαγή αντισταθμιστικών ιόντων από PF<sub>6</sub><sup>-</sup> σε Cl<sup>-</sup>, διαδικασία που απομονώνει το σύμπλοκο από όποιες προσμίξεις έχουν απομείνει. Απόδοση 31%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O, δ σε ppm): 10.12 (d, 4H), 8.88 (d, 4H), 8.44 (d, 4H), 8.27 (t, 4H), 8.15 (s, 4H), 7.77 (d, 4H), 7.70 (d, 4H), 7.60 (d, 4H), 6.59 (d, 4H), 6.23 (d, 4H), 2.46 (m, 2H), 1.91 (s, 6H), 0.81 (d, 12H). HR-ESI-MS (μετά από αλλαγή αντισταθμιστικών σε PF<sub>6</sub><sup>-</sup>) (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 1574.2619, θεωρητικό: 1574.2579 για τον μοριακό τύπο Ru<sub>2</sub>C<sub>66</sub>H<sub>60</sub>N<sub>6</sub>P<sub>3</sub>F<sub>18</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {{{(cym)Ru(phen)}<sub>2</sub>(μ-BL5)}(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>}<sup>+</sup>.

### 2.8.14. Σύνθεση του μονομερούς συμπλόκου [(cym)Ru(phen)(4,4'-bpy)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (14):

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 25 mg Π2 (0.04 mmol) και 6.4 mg AgNO<sub>3</sub> (0.034 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε T = 75° C για 16 ώρες, απουσία φωτός. Αφού απομακρυνθεί το λευκό ίζημα AgCl, προστίθενται 15.7 mg 4,4'-bpy (0.10 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται σε T = 75° C για 16 ώρες. Προκύπτει μίγμα κίτρινου-καφέ χρώματος, το οποίο ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώνεται με προσθήκη 5 mL H<sub>2</sub>O και ακολούθως σε αυτό προστίθεται περίσσεια KPF<sub>6</sub>. Ως αποτέλεσμα, καταβυθίζεται κίτρινο ίζημα, το οποίο εκπλένεται (3×5 mL H<sub>2</sub>O) και ξηραίνεται. Απόδοση 85%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 9.95 (d, 2H), 8.67 (d, 2H), 8.52 (d, 2H), 8.47 (d, 4H), 7.82 (overlapping t, 2H), 7.80 (overlapping d, 2H), 7.68 (overlapping d, 2H), 7.67 (overlapping d, 2H), 7.63 (d, 2H), 7.44 (d, 4H), 6.25 (d, 2H), 6.20 (d, 2H), 5.99 (d, 2H), 5.59 (d, 2H), 2.06 (m, 1H), 1.54 (s, 3H), 0.59 (d, 3H), 0.52 (d, 3H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 717.1289, θεωρητικό: 717.1235 για τον μοριακό τύπο RuC<sub>32</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {(cym)Ru(phen)(4,4'-bpy)}(PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>.

### 2.8.15. Σύνθεση του μονομερούς συμπλόκου [(cym)Ru(phen)(bpe)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (15):

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 25 mg Π2 (0.04 mmol) και 6.4 mg AgNO<sub>3</sub> (0.034 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε T=75° C για 16 ώρες, απουσία φωτός.

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: Πειραματικό Μέρος

Αφού απομακρυνθεί το λευκό ίζημα AgCl, προστίθενται 17.8 mg bre (0.10 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται σε T=75° C για 16 ώρες. Προκύπτει μίγμα κίτρινου-καφέ χρώματος, το οποίο ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώνεται με προσθήκη 5 mL H<sub>2</sub>O και ακολούθως σε αυτό προστίθεται περίσσεια KPF<sub>6</sub>. Ως αποτέλεσμα, καταβυθίζεται κίτρινο ίζημα, το οποίο εκπλένεται (3×5 mL H<sub>2</sub>O) και ξηραίνεται. Απόδοση 80%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 10.26 (d, 2H), 9.03 (d, 2H), 8.37 (t, 2H), 8.30 (d, 2H), 8.29 (s, 2H), 7.21 (d, 2H), 7.03 (d, 2H), 6.71 (d, 2H), 6.31 (d, 2H), 2.85 (t, 2H), 2.77 (t, 2H), 2.37 (m, 1H), 1.72 (s, 3H), 0.68 (d, 6H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 745.1432, θεωρητικό: 745.1469 για τον μοριακό τύπο RuC<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {[(cym)Ru(phen)(bre)](PF<sub>6</sub>)}<sup>+</sup>.

### **2.8.16. Σύνθεση του μονομερούς συμπλόκου [(cym)Ru(phen)(brr)](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub> (16):**

Σε σφαιρική φιάλη των 20 mL που περιέχει 7 mL H<sub>2</sub>O και 700 μL Me<sub>2</sub>CO εισάγονται 20 mg Π2 (0.03 mmol) και 5.1 mg AgNO<sub>3</sub> (0.03 mmol). Το μίγμα αναδεύεται σε T=75° C για 16 ώρες, απουσία φωτός. Αφού απομακρυνθεί το λευκό ίζημα AgCl, προστίθενται 14.6 mg brr (0.07 mmol) και το διάλυμα αναδεύεται σε T=75° C για 16 ώρες. Προκύπτει μίγμα κίτρινου-καφέ χρώματος, το οποίο ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, αραιώνεται με προσθήκη 5 mL H<sub>2</sub>O και ακολούθως σε αυτό προστίθεται περίσσεια KPF<sub>6</sub>. Ως αποτέλεσμα, καταβυθίζεται κίτρινο ίζημα, το οποίο εκπλένεται (3×5 mL H<sub>2</sub>O) και ξηραίνεται. Απόδοση 83%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ σε ppm): 10.27 (d, 2H), 9.03 (d, 2H), 8.38 (overlapping t, 2H), 8.35 (overlapping d, 2H), 8.32 (overlapping d, 2H), 8.29 (s, 2H), 7.26 (d, 2H), 7.09 (d, 2H), 6.70 (d, 2H), 6.32 (d, 2H), 2.53 (t, 2H), 2.50 (t, 2H), 2.36 (m, 1H), 1.75 (m, 2H), 1.23 (s, 3H), 0.68 (d, 6H). HR-ESI-MS (5 mL CH<sub>3</sub>CN), θετικά (m/z): πειραματικό: 759.1647, θεωρητικό: 759.1625 για τον μοριακό τύπο RuC<sub>35</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, που αποδίδεται στο κατιόν {[(cym)Ru(phen)(brr)](PF<sub>6</sub>)}<sup>+</sup>.



# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>:**

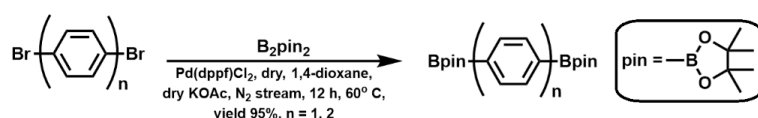
## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΥΤΗΣΗ**



### 3.1. Σύνθεση υποκαταστατών και συμπλόκων:

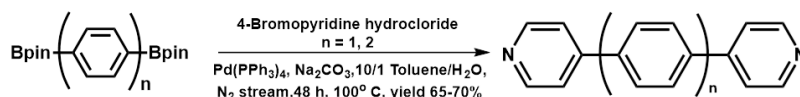
#### 3.1.1. Σύνθεση υποκαταστάτων:

Για τη σύνθεση των διπυριδινικών παραγώγων του βενζολίου και του διφαινυλίου ήταν αναγκαία πρώτα η σύνθεση των διβορονικών πινακολικών εστερικών παραγώγων των δύο οργανικών υποστρωμάτων από τα αρχικά δίβρωμο παράγωγά τους (Εικόνα 3.1). Ως διαλύτης για τις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιήθηκε το 1,4-διοξάνιο, ως καταλύτης το Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό ατμόσφαιρα N<sub>2</sub>. Η αντίδραση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση των, 1,4-βενζυλ-διβορονικό πινακολικό εστέρα και 4,4'-διφαινυλ-διβορονικό πινακολικό εστέρα σε υψηλές αποδόσεις. Η χρήση του καταλύτη Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> αντί του συνήθως χρησιμοποιούμενου για τέτοιου είδους αντιδράσεις Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα στη συνθετική πορεία, καθώς το dppf προσδίδει σταθερότητα στον καταλύτη αποτρέποντας τη μετατροπή του σε αδρανείς μορφές, ενώ αυξάνει και την εκλεκτικότητα του καταλυτικού συστήματος [144]. Το KOAc είναι κρίσιμο για την επιτυχία της σύνθεσης, καθώς αντιδρά με το B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub>, συμβάλλοντας, έτσι, στη μεταφορά της ομάδας βορυλίου στο αρυλικό ενδιάμεσο σύμπλοκο. Επιπλέον, συμβάλλει στην απομάκρυνση του αλογόνου από το αρυλικό υπόστρωμα, καθώς επίσης και στην αναγέννηση του καταλύτη στην δραστική του μορφή [145,146].



**Εικόνα 3.1:** Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης των 1,4-βενζυλ-διβορονικός πινακολικός εστέρας (n = 1) και 4,4'-διφαινυλ-διβορονικός πινακολικός εστέρας (n = 2).

Ακολούθως, η σύνθεση των υποκαταστατών 1,4-δισ(4-πυριδυλ)βενζόλιο και 4,4'-δισ(4-πυριδυλ)διφαινύλιο πραγματοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης σύζευξης Suzuki (Suzuki coupling), παρουσία καταλύτη Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (Εικόνα 3.2). Στις αντιδράσεις σύζευξης Suzuki, συχνά προτιμάται η χρήση του B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub> αντί του βορικού οξέος. Το B<sub>2</sub>pin<sub>2</sub> είναι πιο σταθερό, ενεργοποιείται με πιο ήπιες βάσεις, ενώ είναι και πιο ανθεκτικό στην υδρόλυση. Ακόμη, είναι πιο εύκολη η διαχείριση και αποθήκευσή του σε σύγκριση με τα βορικά οξέα [147].



**Εικόνα 3.2:** Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης των υποκαταστατών dpbz (n = 1) και dpbph (n = 2).

### 3.1.2. Σύνθεση των συμπλόκων του Ru(II):

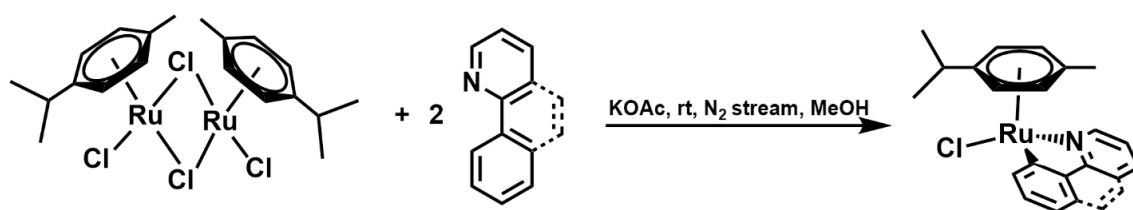
Το διμερές σύμπλοκο [Ru(cym)(μ-Cl)Cl]<sub>2</sub> Π1 συντέθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος [148]. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (Εικόνα 3.3) πραγματοποιείται αναγωγή του Ru<sup>III</sup> σε Ru<sup>II</sup> με ταυτόχρονη οξείδωση της α-φαιλανδρίνης σε cym.



**Εικόνα 3.3:** Αντίδραση σύνθεσης του διμερούς συμπλόκου [(cym)RuCl<sub>2</sub>]<sub>2</sub> Π1.

Το σύμπλοκο [(cym)Ru(rhen)Cl](PF<sub>6</sub>) Π2 συντέθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφική μέθοδο [149], σε ένα στάδιο, κατά το οποίο μικρή περίσσεια του υποκαταστάτη rhen προστέθηκε σε μεθανολικό διάλυμα [Ru(cym)(μ-Cl)Cl]<sub>2</sub> σε θερμοκρασία 65° C για 16 ώρες. Το τελικό σύμπλοκο απομονώθηκε ως εξαφθοροφωσφορικό άλας μετά την προσθήκη KPF<sub>6</sub>.

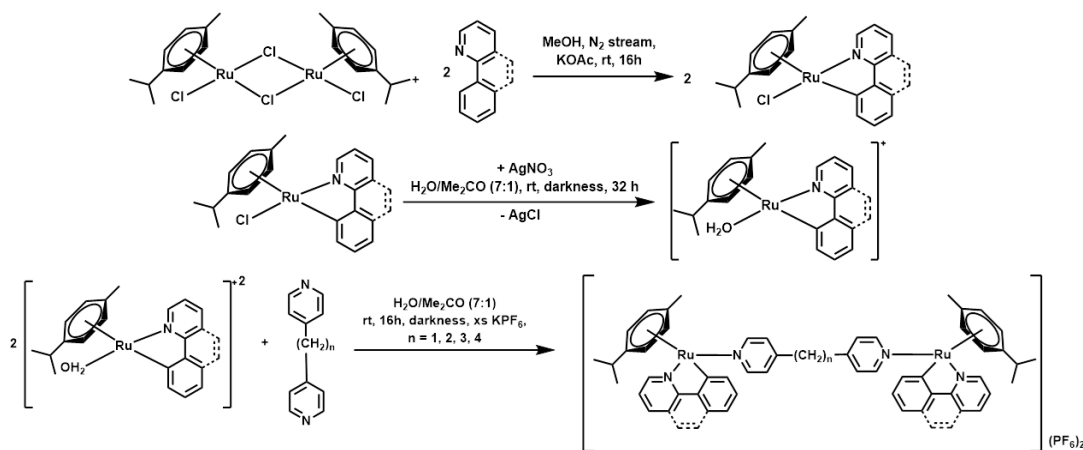
Τα πρόδρομα σύμπλοκα του τύπου [(cym)Ru(L<sup>C-N</sup>)Cl] (Π3 και Π4, όπου L<sup>C-N</sup> οι ανιονικοί υποκαταστάτες (ppy-H<sup>-</sup>) ή (bzq-H<sup>-</sup>)) συντέθηκαν τροποποιώντας τη βιβλιογραφική μέθοδο σύνθεσής τους [149]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική μέθοδο, η απομόνωση του επιθυμητού συμπλόκου γίνεται με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα - οξικού αιθυλεστέρα. Ακολουθώντας τις αντίστοιχες πειραματικές πορείες που αναφέρονται στο πειραματικό μέρος (2.6.2 και 2.6.3) επιτεύχθηκε η σύνθεση και απομόνωση των συμπλόκων αυτών σε υψηλή καθαρότητα αποφεύγοντας την χρωματογραφία στήλης. Το ακαθάρτιστο πράσινο στερεό των παραπάνω αντιδράσεων, που προκύπτει μετά από διήθηση και συμπύκνωση του διαλύματος, επαναδιαλύεται σε 5 mL χλωροφορμίου και διηθείται, ώστε να απομακρυνθεί το μη αντιδράσαν KOAc, το οποίο είναι πρακτικά αδιάλυτο στο χλωροφόρμιο. Μετά από νέα συμπύκνωση του χλωροφορμίου μέχρι ξηρού, το στερεό διαλύεται ξανά σε 5 mL ακετόνης, και διηθείται. Έτσι απομακρύνεται από το στερεό προϊόν της αντίδρασης η περίσσεια KOAc. Μετά από νέα συμπύκνωση της ακετόνης μέχρι ξηρού το στερεό εκπλένεται με εξάνιο, για την απομάκρυνση των μη-αντιδρασάντων ppy ή bzq καθώς οι ενώσεις αυτές διαλύονται ικανοποιητικά ενώ το σύμπλοκο παραμένει αδιάλυτο.



**Εικόνα 3.4:** Αντίδραση σύνθεσης των συμπλόκων Π3 και Π4.

### 3.1.2.1. Σύνθεση των διπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II) με φορτίο 2+:

Τα διπυρηνικά σύμπλοκα με φορτίο 2+ αποτελούνται από δύο μονομεταλλικές μονάδες, με τους ανιονικούς χηλικούς υποκαταστάτες  $ppy-H^+$  ή  $bzq-H^+$ , γεφυρωμένες με έναν ουδέτερο γεφυρωτικό υποκαταστάτη. Η σύνθεση των συμπλόκων αυτών με γενικό τύπο  $\{[(cym)Ru(L^{N-C})]_2(\mu-BL)\}(PF_6)_2$ , όπου BL ο γεφυρωτικός υποκαταστάτης, παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.5. Τα σύμπλοκα αυτά συντέθηκαν ακολουθώντας τις γενικές συνθετικές πορείες ανάλογων συμπλόκων [129] με τις αντιδράσεις των Π3 ή Π4 να πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου και μεγαλύτερους χρόνους.

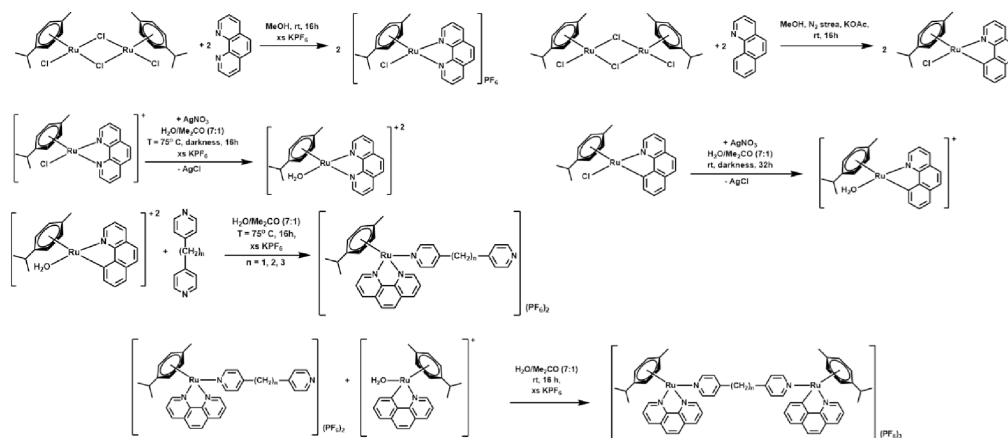


**Εικόνα 3.5:** Αντιδράσεις σύνθεσης διμερών συμπλόκων του Ru(II) με γενικό τύπο  $\{[(cym)Ru(L^{N-C})]_2(\mu-BL)\}(PF_6)_2$ , σύμπλοκα (1) - (8).

### 3.1.2.2. Σύνθεση διπυρηνικών συμπλόκων φορτίου 3+:

Τα διπυρηνικά σύμπλοκα με φορτίο 3+ αποτελούνται από μια μονομεταλλική μονάδα με ουδέτερο χηλικό υποκαταστάτη (phen), φορτίου 2+, και μία μονάδα με ανιονικό χηλικό υποκαταστάτη ( $ppy-H^+$  ή  $bzq-H^+$ ), φορτίου 1+, γεφυρωμένες με έναν ουδέτερο BL. Για τα σύμπλοκα αυτά, με γενικό τύπο  $\{[(cym)Ru(L^{N-C})][(cym)Ru(phen)](\mu-BL)\}(PF_6)_3$ , δεν κατέστη δυνατή η σύνθεση με γεφυρωτικούς BL τους  $dpbz$  και  $dpbrh$  (BL4 και BL5 αντίστοιχα), για λόγους διαλυτότητάς τους. Η σύνθεση των συμπλόκων γίνεται σε τρία διακριτά στάδια, όπως αυτά φαίνονται και στην Εικόνα 3.6. Το πρώτο στάδιο περιλάμβανε τη σύνθεση των μονομερών συμπλόκων του γενικού τύπου  $[(cym)Ru(phen)(BL)](PF_6)_2$ , στα οποία ο BL εντάσσεται μονοδοντικά ((14) - (16)). Στο δεύτερο στάδιο, έγινε η απομάκρυνση των  $Cl^-$  από το πρόδρομο σύμπλοκο Π4 με τη γνωστή μέθοδο του  $AgNO_3$  προς σχηματισμό του  $[(cym)Ru(L^{N-C})(H_2O)](PF_6)$ . Τέλος, στο τρίτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση μεταξύ των προϊόντων των δύο προηγούμενων σταδίων σε μίγμα διαλυτών  $H_2O/Me_2CO$  (7:1) και θερμοκρασία δωματίου, με αποτέλεσμα, την απομόνωση των διπυρηνικών συμπλόκων (9) - (11).

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

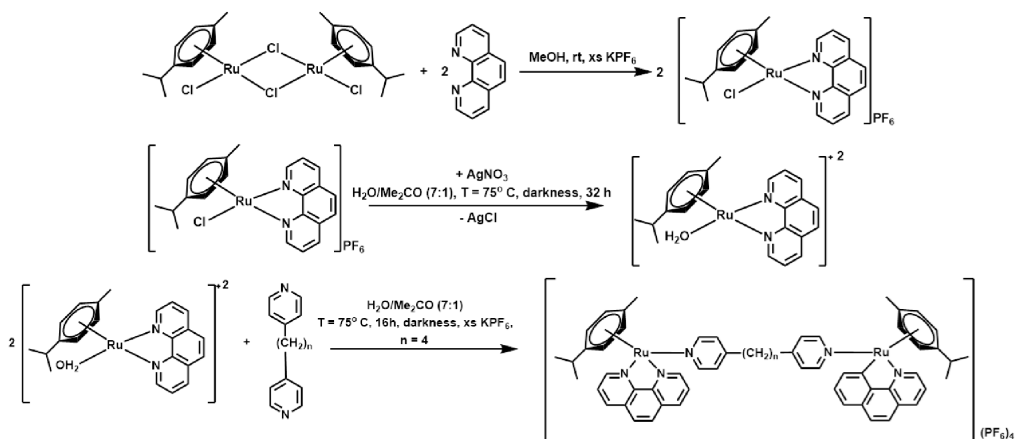


**Εικόνα 3.6:** Αντιδράσεις σύνθεσης διμερών συμπλόκων του Ru(II) με γενικό τύπο  $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{L}^{\text{N}-})_2][(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})](\mu\text{-BL})\}(\text{PF}_6)_3$ .

#### 3.1.2.3. Σύνθεση διπυρηνικών συμπλόκων φορτίου 4+:

Τα διπυρηνικά σύμπλοκα με φορτίο 4+ αποτελούνται από δύο μονομεταλλικές μονάδες με τον ουδέτερο χηλικό υποκαταστάτη phen, γεφυρωμένες με έναν ουδέτερο BL. Τα σύμπλοκα (A) - (C) συντέθηκαν σύμφωνα με την βιβλιογραφία [129], ενώ για τα σύμπλοκα (12) και (13), με τους γεφυρωτικούς υποκαταστάτες BL4 και BL5 (drbz και drbrh αντίστοιχα) η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε είχε σημαντικές διαφορές. Οι γενικές αντιδράσεις της σύνθεσής τους απεικονίζονται στις Εικόνες 3.6 και 3.7.

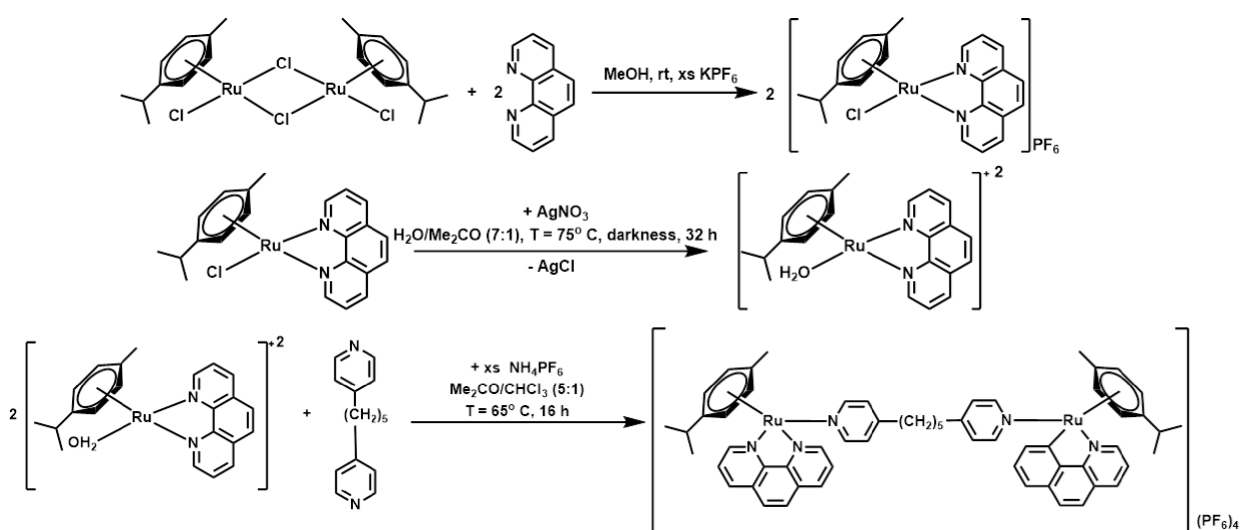
Για το σύμπλοκο (12) μετά την απομάκρυνση του υποκαταστάτη χλωρίου από τη σφαίρα ένταξης του συμπλόκου Π2 με  $\text{AgNO}_3$ , έγινε η προσθήκη του drbz σε αναλογία μικρότερη της στοιχειομετρικής και σε θερμοκρασία  $75^\circ\text{C}$ . Το τελικό διπυρηνικό σύμπλοκο απομονώθηκε μετά την προσθήκη περίσσειας  $\text{KPF}_6$  σε υδατικό διάλυμα του προϊόντος της αντίδρασης, απομονώθηκε με διήθηση και εκπλύθηκε με νερό, καθώς τα πρόδρομα σύμπλοκα είναι ευδιάλυτα στο νερό και μπορούν έτσι να απομακρυνθούν. Στη συνέχεια, ήταν απαραίτητη η έκπλυση του προϊόντος και με  $\text{CHCl}_3$  για να διαλυθεί η όποια ποσότητα του drbz που δεν αντέδρασε.



**Εικόνα 3.6:** Αντιδράσεις σύνθεσης του συμπλόκου (12).

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

Αναφορικά με το σύμπλοκο (13), η συνθετική του πορεία στα δύο πρώτα στάδια, μέχρι δηλαδή και την απομάκρυνση του υποκαταστάτη Cl<sup>-</sup> από την σφαίρα ένταξης του P2, δεν διαφέρει από αυτή που περιγράφηκε πιο πάνω για το σύμπλοκο (12). Τα επόμενα στάδια, ωστόσο, διαφέρουν ως προς τα μίγματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν. Οι αντιδράσεις που έλαβαν χώρα κατά τη σύνθεση του συμπλόκου φαίνονται στην Εικόνα 3.7. Η πρώτη αξιοσημείωτη διαφορά εντοπίζεται για την αντίδραση μεταξύ του ενδιάμεσου συμπλόκου του ρουθηνίου και του γεφυρωτικού υποκαταστάτη drbrh. Στο (12), το μίγμα διαλυτών στο οποίο έλαβε χώρα η αντίδραση ήταν H<sub>2</sub>O/Me<sub>2</sub>CO (7:1). Στις πρώτες απόπειρες σύνθεσης του (13) δοκιμάστηκε το ίδιο μίγμα διαλυτών, χωρίς επιτυχία. Το μίγμα H<sub>2</sub>O/Me<sub>2</sub>CO (7:1) δεν ήταν αποτελεσματικό για τη σύνθεση του συμπλόκου (13) καθώς ο υποκαταστάτης drbrh είναι πρακτικά αδιάλυτος στο μίγμα αυτό. Ένας διαλύτης στον οποίο το drbrh εμφάνιζε ελάχιστη διαλυτότητα, ικανή ωστόσο για να λάβει χώρα η αντίδραση, ήταν το χλωροφόρμιο. Ωστόσο το ενδιάμεσο σύμπλοκο του Ru(II) δεν ήταν διαλυτό στον διαλύτη αυτό. Έτσι, το συγκεκριμένο στάδιο της συνθετικής πορείας αποφασίστηκε να λάβει χώρα σε μίγμα 5:1 Me<sub>2</sub>CO/CHCl<sub>3</sub>, ούτως ώστε να είναι δυνατή η διάλυση τόσο του ενδιάμεσου συμπλόκου που προέκυψε από την απομάκρυνση του Cl<sup>-</sup> από τη σφαίρα ένταξης του P2, όσο και του drbrh. Επιπλέον, στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκε και περίσσεια NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> για να βελτιωθεί η διαλυτότητα του ενδιάμεσου συμπλόκου του ρουθηνίου, η οποία μειώθηκε από την παρουσία χλωροφορμίου. Η αντίδραση έλαβε χώρα υπό συνθήκες reflux σε θερμοκρασία 65° C για 16 ώρες. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος αυτού, απομονώθηκε στερεό καφέ χρώματος. Για τον διαχωρισμό των προϊόντων ήταν απαραίτητη η χρήση της τεχνικής της χρωματογραφίας στήλης. Το στερεό προϊόν της αντίδρασης διαλύθηκε σε MeCN. Ο ίδιος διαλύτης χρησιμοποιήθηκε και ως διαλύτης έκλουσης για την απομόνωση του πρώτου κλάσματος της στήλης, το οποίο αποδείχθηκε ότι αποτελούνταν από παραπροϊόντα. Το επιθυμητό σύμπλοκο (13) εντοπίστηκε στο δεύτερο κλάσμα της στήλης, για την λήψη του οποίου ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε μίγμα MeCN/H<sub>2</sub>O (8:1) κορεσμένο σε KNO<sub>3</sub>. Το KNO<sub>3</sub> απομακρύνθηκε από το στερεοποιημένο δεύτερο κλάσμα της στήλης με εκπλύσεις με νερό, στο οποίο το σύμπλοκο ήταν αδιάλυτο, ως άλας του PF<sub>6</sub><sup>-</sup>. Ωστόσο, η πλήρης απομόνωση του (13) κατέστη δυνατή μόνο μετά από τη διαδικασία αλλαγής των αντισταθμιστικών ιόντων του συμπλόκου από PF<sub>6</sub><sup>-</sup> σε Cl<sup>-</sup>. Έτσι, το συγκεκριμένο σύμπλοκο, είναι το μόνο το οποίο δεν απομονώθηκε με αντισταθμιστικά ιόντα PF<sub>6</sub><sup>-</sup>.

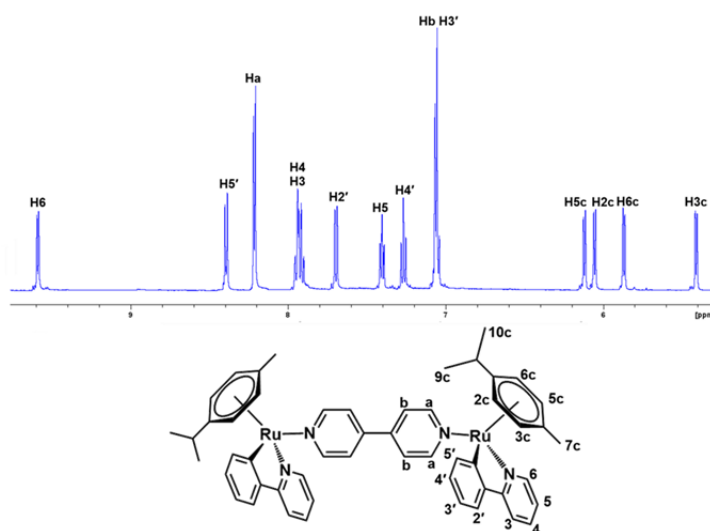


Εικόνα 3.7: Αντιδράσεις σύνθεσης του συμπλόκου (13).

### 3.2. Μελέτη των συμπλόκων του Ru(II) (1) - (16) με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού <sup>1</sup>H NMR:

#### 3.2.1. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου $\{[(cym)Ru(pry)]_2(\mu-BL1)\}(PF_6)_2$ , (1):

Στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου (1) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> παρατηρείται ένα σετ κορυφών για όλα τα πρωτόνια των υποκαταστατών των δύο μεταλλικών κέντρων Ru(II), απόδειξη της συμμετρικότητας του συμπλόκου. Ο υποκαταστάτης pry-H<sup>+</sup> εντάσσεται χηλικά στα μεταλλικά κέντρα μέσω του N1 και του C6', όπως υποδηλώνεται από την μεγάλη downfield μετατόπιση Δδ των σημάτων των H6 και H5', τα οποία είναι γειτονικά ως προς τις θέσεις ένταξης. Επίσης, παρατηρείται η απουσία σήματος για πρωτόνιο του C6', άλλη μία απόδειξη του ανιονικού τρόπου ένταξης του υποκαταστάτη. Το φάσμα του διπυρηνικού συμπλόκου παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.8. Η πλήρης απόδοση των σημάτων των πρωτονίων των υποκαταστάτων του συμπλόκου φαίνεται στον Πίνακα 3.1 και έγινε με τη βοήθεια των φασμάτων δύο διαστάσεων <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY και NOESY (Εικόνα 3.9). Ισοδύναμοι είναι οι δύο πυριδινικοί δακτύλιοι του γεφυρωτικού υποκαταστάτη BL1, καθώς παρατηρείται μία διπλή κορυφή στα 8.21 ppm η οποία αποδίδεται στα γειτονικά του πυριδινικού N πρωτόνια Ha, και ακόμη μία κορυφή, διπλή, στα 7.06 ppm, η οποία αποδίδεται στα Hb. Τέλος, αναφορικά με τα πρωτόνια του ενταγμένου με η<sup>6-</sup> απτικό δεσμό ένταξης cym, παρατηρείται η ύπαρξη τεσσάρων διαφορετικών σημάτων, ένα για κάθε αρωματικό πρωτόνιό του, ένδειξη της απώλειας της συμμετρίας του λόγω της C-N ένταξης της pry-H<sup>+</sup> ή της μειωμένης ελευθερίας στην περιστροφή του, με αποτέλεσμα τα αρωματικά πρωτόνια που βρίσκονται προς την πλευρά της pry-H<sup>+</sup> να επηρεάζονται διαφορετικά από το αρωματικό της νέφος. Ακόμη, τα σήματα των πρωτονίων του γεφυρωτικού υποκαταστάτη BL1 εμφανίζονται με διπλάσια ολοκλήρωση σε σχέση με τα σήματα των πρωτονίων των υπόλοιπων υποκαταστατών, διευκολύνοντας έτσι και την απόδοσή τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται στα φάσματα <sup>1</sup>H NMR των συμπλοκών (A), (B) και (C), στα οποία ο χηλικός υποκαταστάτης, rhen, είναι απόλυτα συμμετρικός [129].

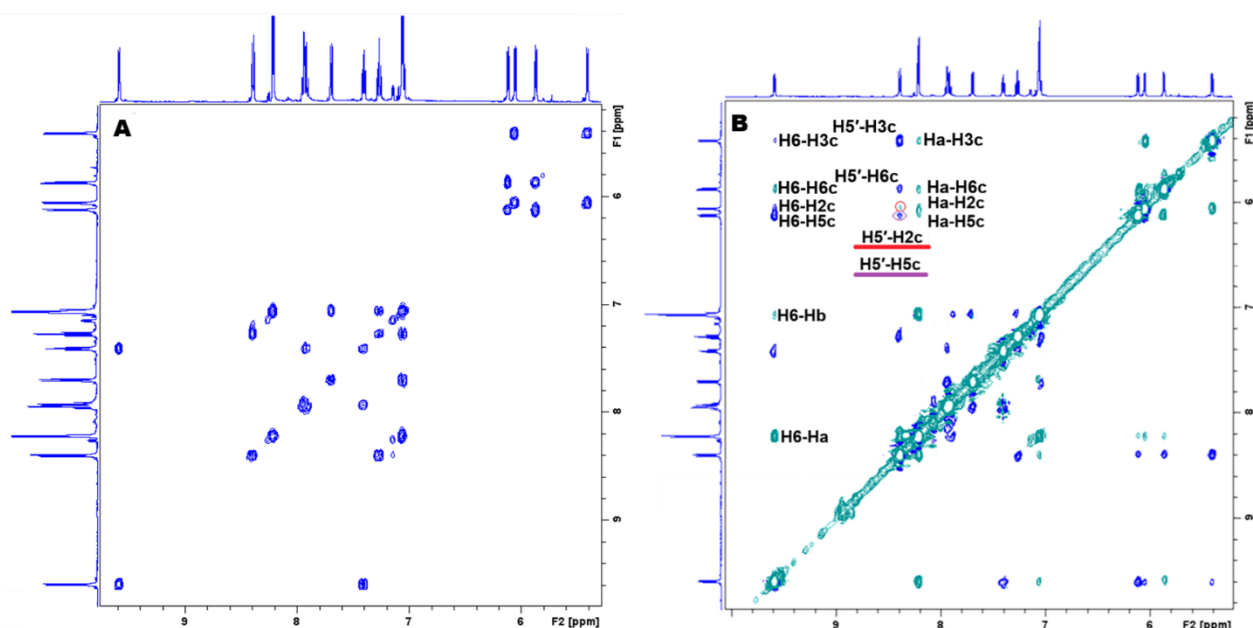


**Εικόνα 3.8:** Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου (1) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.1:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (1) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

ppg-H <sup>+</sup>		BL1		cym	
H3	7.90, d, 1H	Ha	8.21, d, 2H	H2c	6.05, d, 1H
H4	7.93, t, 1H	Hb	7.06, d, 2H	H3c	5.41, d, 1H
H5	7.40, t, 1H			H5c	6.12, d, 1H
H6	9.59, d, 1H			H6c	5.86, d, 1H
H2'	7.70, d, 1H			H7c	1.51, s, 3H
H3'	7.05, t, 1H			H8c	2.10, m, 1H
H4'	7.27, t, 1H			H9c	0.71, d, 3H
H5'	8.39, d, 1H			H10c	0.67, d, 3H

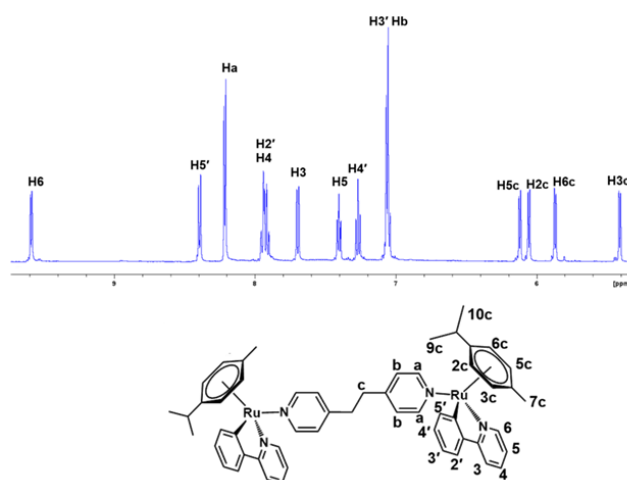
Η σχετική θέση μεταξύ των διαφορετικών υποκαταστατών του συμπλόκου μελετήθηκε σε διάλυμα μέσω φασματοσκοπίας NOESY (Εικόνα 3.9). Στο 2D φάσμα εντοπίστηκαν αρκετές διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ πρωτονίων που ανήκουν στους διαφορετικούς υποκαταστάτες του διπυρηνικού συμπλόκου (interligand crosspeaks). Ειδικότερα, παρατηρείται ότι το H6 της ppg-H<sup>+</sup> εμφανίζει διασταυρούμενες κορυφές με όλα τα αρωματικά πρωτόνια του cym, , ωστόσο, με τα H5c και H6c είναι μεγαλύτερης έντασης σε σύγκριση με τις αντίστοιχες με H2c και H3c. Επιπλέον, το πρωτόνιο H5', που ανήκει στον βενζολικό δακτύλιο της ppg-H<sup>+</sup>, εμφανίζει μία crosspeak μεγάλης έντασης με το αρωματικό πρωτόνιο του κουμενίου, H3c. Και τα δύο αυτά πρωτόνια του υποκαταστάτη ppg-H<sup>+</sup>, καθώς επίσης και τα πρωτόνια Ha του BL1 εμφανίζουν διασταυρούμενες κορυφές με όλα τα αρωματικά πρωτόνια του κουμενίου, υποδεικνύοντας την ελεύθερη περιστροφή του υποκαταστάτη cym. Μολαταύτα, η περιστροφή αυτή δεν γίνεται το ίδιο γρήγορα όπως στις περιπτώσεις των συμπλόκων (A) - (C) [129], όπως φαίνεται από τις διαφορετικής έντασης διασταυρούμενες κορυφές. Το γεγονός ότι η διασταυρούμενη κορυφή μεταξύ του H5' με το H3c και αυτή του H6 με το H5c είναι σημαντικά μεγαλύτερη έντασης, αποτελεί ένδειξη ότι, και λόγω της πιο αργής περιστροφής του cym, η πλευρά του cym με την μεθυλομάδα βρίσκεται γειτονικά με την ppg-H<sup>+</sup>.



**Εικόνα 3.9:** Α) Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY του συμπλόκου (1) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Β) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (1) στις ίδιες συνθήκες και  $t_{\text{mix}} = 600$  ms. Υπογραμμισμένες οι διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ των πρωτονίων των διαφορετικών υποκαταστατών του συμπλόκου (interligand crosspeaks).

### 3.2.2. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{ppy})_2](\text{BL2})\}(\text{PF}_6)_2$ (2):

Στο φάσμα του (2) σε  $\text{DMSO-d}_6$  εμφανίζεται πάλι ένα σετ κορυφών, υποδεικνύοντας πως το σύμπλοκο είναι συμμετρικό. Το φάσμα καθώς και η πλήρης απόδοση των κορυφών παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.10 και στον Πίνακα 3.2. Όπως και στην περίπτωση του συμπλόκου (1), η ένταξη της  $\text{ppy-H}^+$  και στα δύο μεταλλικά κέντρα  $\text{Ru(II)}$  μέσω N1 και από τον C6'. Όμοια με το (1) παρατηρείται ισχυρή μετατόπιση των πρωτονίων H6 και H5' προς χαμηλότερα πεδία ενώ για τον BL2 παρατηρείται ένα σετ κορυφών τόσο για τα αρωματικά πρωτόνια (Ha, Hb) όσο και για τα αλειφατικά του πρωτόνια (Hc). Τέλος, για το cym, εμφανίζονται ξεχωριστά σήματα για τα αρωματικά του πρωτόνια, όπως επίσης και για τα πρωτόνια της ισοπροπυλομάδας.

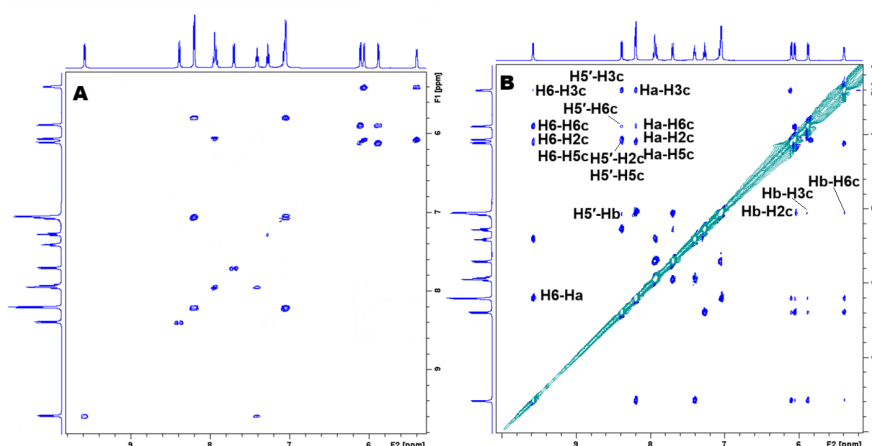


**Εικόνα 3.10:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (2) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.2:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (2) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

ppg-H <sup>+</sup>		BL2		cym	
H3	7.70, d, 1H	Ha	8.20, d, 2H	H2c	6.06, d, 1H
H4	7.94, t, 1H	Hb	7.04, d, 2H	H3c	5.39, d, 1H
H5	7.41, t, 1H	Hc	2.70, d, 2H	H5c	6.11, d, 1H
H6	9.58, d, 1H			H6c	5.88, d, 1H
H2'	7.94, d, 1H			H7c	1.45, s, 3H
H3'	7.07, t, 1H			H8c	2.10, m, 1H
H4'	7.27, t, 1H			H9c	0.71, d, 3H
H5'	8.39, d, 1H			H10c	0.66, d, 3H

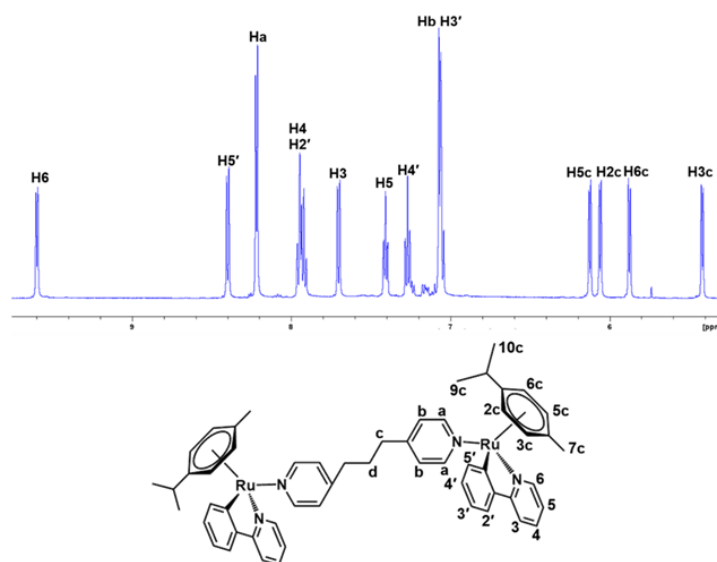
Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται τα φάσματα <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY και NOESY του συμπλόκου (2) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K. Στο φάσμα NOESY, παρατηρούνται ξανά crosspeaks μεταξύ των διαφορετικών υποκαταστατών του, όπως μεταξύ του H6 της ppg-H<sup>+</sup> και των αρωματικών πρωτονίων του cym, και μεταξύ του H5' της ppg-H<sup>+</sup> και του Ha του BL2. Όπως κι στην περίπτωση του (1) παρατηρείται ότι η διασταυρούμενη κορυφή του H6 με το H3c του κουμενίου είναι αρκετά μικρότερης έντασης σε σύγκριση με τις αντίστοιχες crosspeaks των H5' και Ha με το ίδιο πρωτόνιο του cym. Αντίστοιχα, τα δύο τελευταία εμφανίζουν πολύ μικρότερης έντασης διασταυρούμενη κορυφή με το H6c σε σχέση με την αντίστοιχη του H6 της ppg-H<sup>+</sup>. Επιπροσθέτως, το Hb του πυριδινικού δακτυλίου του BL2 εμφανίζει διασταυρούμενες κορυφές με όλα τα αρωματικά πρωτόνια του cym, πλην του H5c, με εκείνη του H2c να είναι σημαντικά μεγαλύτερης έντασης από τις υπόλοιπες. Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι παρόλο που το cym περιστρέφεται ελεύθερα, η περιστροφή του είναι αργή στην κλίμακα χρόνου του NMR. Επιπροσθέτως, η διαφορά στις εντάσεις των διασταυρούμενων κορυφών, μπορεί να αξιοποιηθεί δίνοντας πληροφορίες για τη σχετική θέση του κουμενίου έναντι των υποκαταστατών. Έτσι φαίνεται πως για μια ακόμη φορά η πλευρά του cym που φέρει την μεθυλομάδα να βρίσκεται εγγύτερα στον βενζολικό δακτύλιο της ppg-H<sup>+</sup> και στον γεφυρωτικό υποκαταστάτη, ενώ αντίστοιχα η ισοπροπυλομάδα να βρίσκεται εγγύτερα στον πυριδινικό δακτύλιο της ppg-H<sup>+</sup>.



**Εικόνα 3.11:** A) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (2) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. B) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (2) στις ίδιες συνθήκες και t<sub>mix</sub> = 600 ms.

**3.2.3. Μελέτη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου  $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{ppy})]_2(\mu\text{-BL3})\}(\text{PF}_6)_2$  (3):**

Το φάσμα μίας διάστασης  $^1\text{H}$  NMR και δύο διαστάσεων  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  COSY και NOESY για το σύμπλοκο (3) παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.12 και οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται στον Πίνακα 3.3. Για μια φορά ακόμη παρατηρείται ένα σετ κορυφών για όλα τα πρωτόνια των υποκαταστατών υποδεικνύοντας την συμμετρία του. Η ένταξη του χηλικού υποκαταστάτη ppy μέσω του N1 και του C6' φαίνεται, όπως και στις περιπτώσεις των (1) και (2), αφενός από την απουσία σήματος για H6' και από τις ισχυρές μετατοπίσεις των γειτονικών ως προς τις θέσεις ένταξης πρωτονίων H6 ( $\Delta\delta = +0.35$  ppm) και H5' ( $\Delta\delta = +0.27$  ppm) (Πίνακας 3.3). Σχετικά με τα σήματα των αρωματικών πρωτονίων του γεφυρωτικού υποκαταστάτη BL3, αυτά βρίσκονται upfield μετατοπισμένα, όπως και στις περιπτώσεις των (1) και (2), ως αποτέλεσμα ένταξης του. Τέλος, για το cym αίρεται η ισοδυναμία μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων του όπως επίσης και μεταξύ των πρωτονίων της ισοπροπυλομάδας, καθώς εμφανίζονται ξεχωριστά σήματα για τα πρωτόνια αυτά (Εικόνα 3.12).

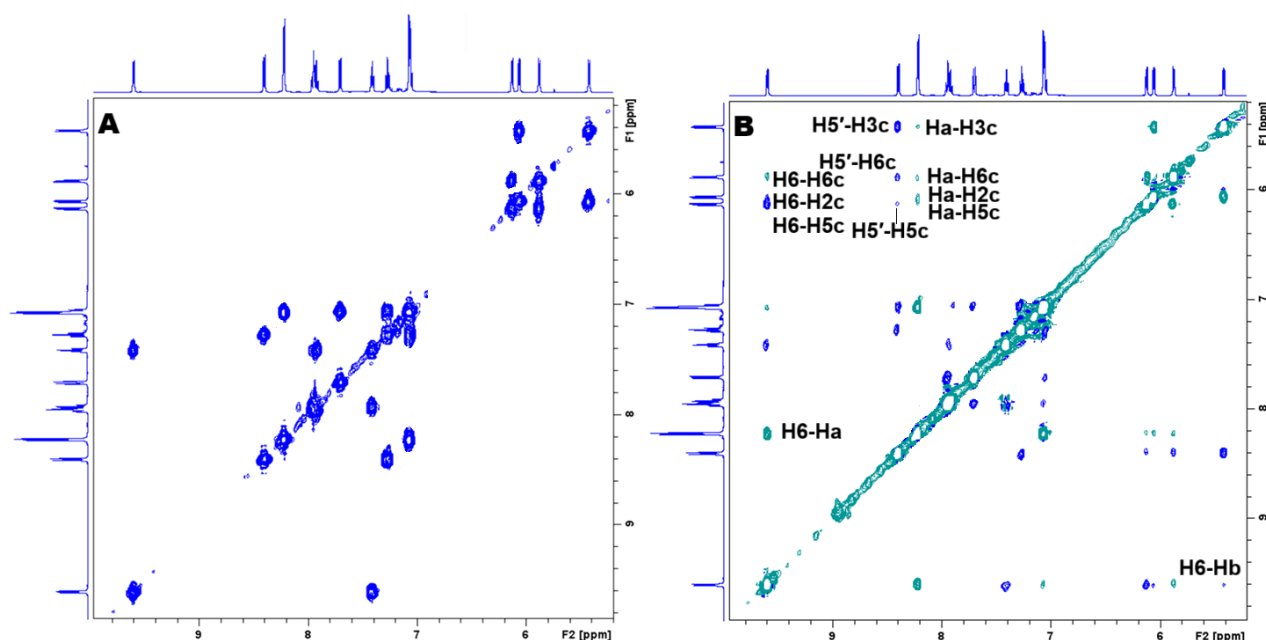


**Εικόνα 3.12:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (3) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.3:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (3) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

ppy-H <sup>+</sup>		BL3		cym	
H3	7.70, d, 1H	Ha	8.22, d, 2H	H2c	6.06, d, 1H
H4	7.94, t, 1H	Hb	7.07, d, 2H	H3c	5.42, d, 1H
H5	7.41, t, 1H	Hc	2.42, d, 2H	H5c	6.13, d, 1H
H6	9.60, d, 1H	Hd	1.60, t, 2H	H6c	5.88, d, 1H
H2'	7.94, d, 1H			H7c	1.51, s, 3H
H3'	7.05, t, 1H			H8c	2.10, m, 1H
H4'	7.27, t, 1H			H9c	0.72, d, 3H
H5'	8.40, d, 1H			H10c	0.67, d, 3H

Όσον αφορά το φάσμα NOESY του συμπλόκου (3) (Εικόνα 3.13) παρατηρείται η ύπαρξη αρκετών διασταυρούμενων κορυφών που οφείλονται στην αλληλεπίδραση πρωτονίων τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικούς υποκαταστάτες του διπυρηνικού συμπλόκου. Αρχικά, εμφανίζονται crosspeaks μεταξύ του H6 της rpy-H<sup>+</sup> και των αρωματικών πρωτονίων του κουμενίου, με εκείνη του H5c να είναι ισχυρότερη σε σχέση με τις υπόλοιπες. Παρομοίως, και το H5', που βρίσκεται στον βενζολικό δακτύλιο της rpy-H<sup>+</sup>, εμφανίζει διασταυρούμενες κορυφές με όλα τα αρωματικά πρωτόνια του αρενίου, εκτός του H2c. Μεταξύ αυτών, η crosspeak του H5' με το H3c είναι μεγαλύτερης έντασης από όλες τις υπόλοιπες με τα αρωματικά πρωτόνια του cyt. Επίσης, crosspeaks εμφανίζονται και μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων του γεφυρωτικού υποκαταστάτη BL3 και των πρωτονίων H2c, H3c, H5c και H6c του cyt, χωρίς αξιοσημείωτη διαφορά στην ένταση μεταξύ τους. Τα παραπάνω αποτελούν ένδειξη πως το cyt τοποθετείται προς την πλευρά των αρωματικών δακτυλίων της rpy-H<sup>+</sup> στην οποία βρίσκονται εγγύτερα το H5c και H3c.



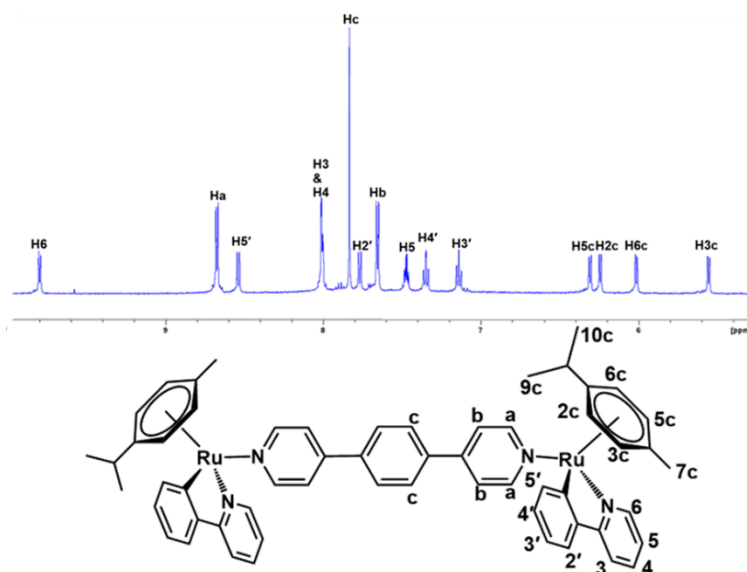
**Εικόνα 3.13:** Α) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (3) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Β) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (2) στις ίδιες συνθήκες και t<sub>mix</sub> = 600 ms.

### 3.2.4. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cyt})\text{Ru}(\text{rpy})]_2(\mu\text{-BL4})\}(\text{PF}_6)_2$ , (4):

Ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου (4) με φασματοσκοπία NMR έγινε σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K (Εικόνα 3.14, Πίνακας 3.4). Στο φάσμα πρωτονίου του παρατηρείται ένα σετ κορυφών, ενδεικτικό της υψηλής συμμετρίας του. Η ένταξη της rpy-H<sup>+</sup> γίνεται χηλικά, μέσω του N1 και του C6', όπως σε όλες τις περιπτώσεις που προαναφέρθηκαν. Σε ό,τι αφορά τα πρωτόνια του αρενίου, διατηρείται η τάση που παρατηρήθηκε και στα προηγούμενα σύμπλοκα, κατά την οποία αίρεται η ισοδυναμία μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων του και εμφανίζονται ως τέσσερα ξεχωριστά σήματα. Τέλος, για τον γεφυρωτικό υποκαταστάτη BL4, παρατηρείται ότι η ένταξη του μέσω των πυριδινικών ατόμων N δεν επέφερε σημαντική μετατόπιση του σήματος των Ha. Ωστόσο τα σήματα των Hb και Hc του BL4 βρέθηκαν μετατοπισμένα προς υψηλότερες τιμές ppm, με την μεγαλύτερη μετατόπιση να εντοπίζεται για το σήμα του Hc. Εξαιτίας του διαφορετικού διαλύτη που λήφθηκαν τα φάσματα του (4) σε σχέση με τα

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

προηγούμενα σύμπλοκα (1) - (3), δεν είναι δυνατόν να γίνουν απ' ευθείας συγκρίσεις στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων τους.



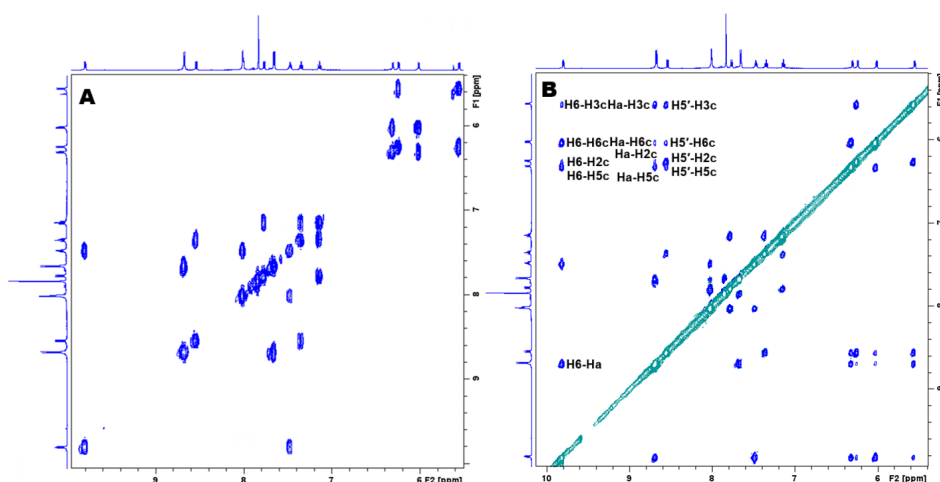
**Εικόνα 3.14:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (4) σε διαλύτη acetone- $d_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.4:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (4) σε διαλύτη acetone- $d_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

ppy-H <sup>+</sup>		BL4		cym	
H3	8.01, d, 1H	Ha	8.67, d, 2H	H2c	6.24, d, 1H
H4	8.00, t, 1H	Hb	7.66, d, 2H	H3c	5.56, d, 1H
H5	7.47, t, 1H	Hc	7.83, s, 2H	H5c	6.31, d, 1H
H6	9.80, d, 1H			H6c	6.01, d, 1H
H2'	7.77, d, 1H			H7c	1.76, s, 3H
H3'	7.14, t, 1H			H8c	2.31, m, 1H
H4'	7.35, t, 1H			H9c	0.87, d, 3H
H5'	8.54, d, 1H			H10c	0.81, d, 3H

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτονίων του συμπλόκου μελετήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας NOESY όπως και στα προαναφερθέντα σύμπλοκα (Εικόνα 3.15), σε διαλύτη acetone- $d_6$  και θερμοκρασία 298 K. Ανάλογα με τα σύμπλοκα (1) - (3), παρατηρούνται διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ του πρωτονίου H6 της ppy-H<sup>+</sup> και των αρωματικών πρωτονίων του κουμενίου, H5c και H6c να είναι μεγαλύτερης έντασης από αυτές μεταξύ H6 με H2c και H3c. Επιπλέον, διακρίνονται crosspeaks μεταξύ των τεσσάρων αρωματικών πρωτονίων του cym και των H5' της ppy-H<sup>+</sup>. Μεταξύ αυτών τη μεγαλύτερη ένταση έχουν οι crosspeaks των H5' με τα H2c και H3c, τα οποία βρίσκονται στην απέναντι πλευρά του cym, σε σύγκριση με τα H5c και H6c που έδιναν τις κορυφές μεγαλύτερης έντασης με το H6, υποδεικνύοντας ότι η

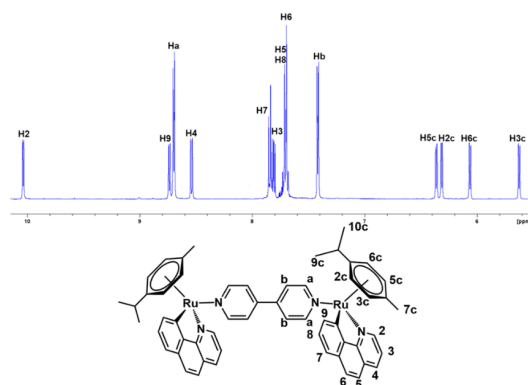
πλευρά του κουμενίου με τα πρωτόνια H5c και H6c τοποθετείται εγγύτερα στον πυριδινικό δακτύλιο του rrg-H<sup>+</sup>, σε σχέση με την πλευρά του cym που φέρει τα H2c και H3c που βρίσκεται εγγύτερα στον βενζολικό δακτύλιο της rrg-H<sup>+</sup>. Ακόμη, διασταυρούμενες κορυφές εμφανίζονται από τα Ha του γεφυρωτικού υποκαταστάτη με τα αρωματικά πρωτόνια του κουμενίου, οι οποίες είναι παρόμοιες έντασης μεταξύ τους.



**Εικόνα 3.15:** Α) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (4) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Β) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (4) στις ίδιες συνθήκες και t<sub>mix</sub> = 600 ms.

### 3.2.5. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου $\{[(cym)Ru(bzq)]_2(\mu-BL1)\}(PF_6)_2$ , (5):

Ο χαρακτηρισμός του συμπλόκου (5) με φασματοσκοπία NMR έγινε σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> στους 298K. Στο φάσμα του συμπλόκου παρατηρείται ένα σετ κορυφών για τα πρωτόνια των υποκαταστατών του, χαρακτηριστικό της υψηλής συμμετρίας του. Σε ό,τι αφορά τον χηλικό ανιονικό υποκαταστάτη bzq-H<sup>+</sup>, η ένταξή του γίνεται μέσω του N1 και του αποπρωτονιωμένου C10, για τον οποίο δεν παρατηρείται σήμα στο φάσμα που να αποδίδεται σε πρωτόνιο του. Όλα τα πρωτόνια του δίνουν σήματα τα οποία είναι downfield μετατοπισμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα σήματα του πρόδρομου συμπλόκου Π4 (Πίνακας Π3), εκτός του H5, το σήμα του οποίου βρίσκεται μετατοπισμένο ελαφρώς προς χαμηλότερες τιμές ppm (Πίνακας 3.5). Περνώντας, στη συνέχεια, στα πρωτόνια του cym, παρατηρείται ότι και στην περίπτωση του συμπλόκου (5), το οποίο ως χηλικό υποκαταστάτη φέρει την bzq-H<sup>+</sup> και όχι την rrg-H<sup>+</sup> όπως τα προηγούμενα σύμπλοκα (1) - (4), υπάρχει άρση της ισοδυναμίας μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων του, όπως επίσης και μεταξύ των πρωτονίων της ισοπροπυλομάδας. Στα υπόλοιπα πρωτόνια οι μετατοπίσεις ακολουθούν τις τάσεις που περιγράφηκαν για τα πιο πάνω σύμπλοκα (1) - (4).

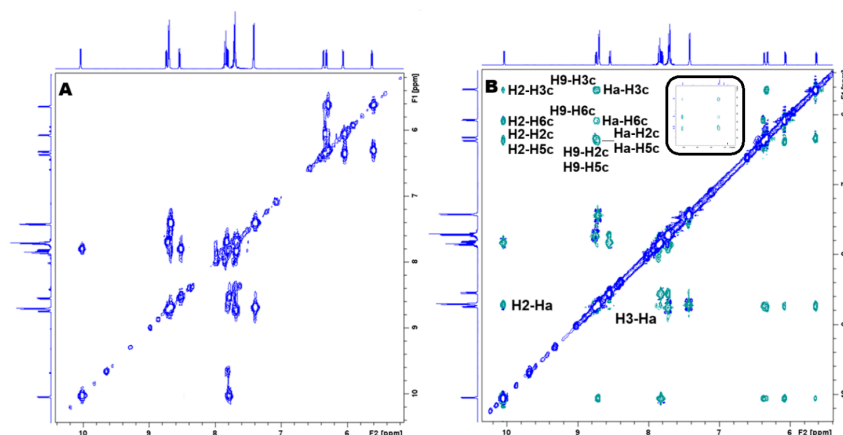


**Εικόνα 3.16:** Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου (5) σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.5:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (5) σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

bzq-H <sup>+</sup>		BL1		cym	
H2	10.04, d, 1H	Ha	8.70, d, 2H	H2c	6.31, d, 1H
H3	7.80, t, 1H	Hb	7.41, d, 2H	H3c	5.62, d, 1H
H4	8.54, d, 1H			H5c	6.36, d, 1H
H5	7.71, s, 1H			H6c	6.06, d, 1H
H6	7.70, s, 1H			H7c	1.69, s, 3H
H7	7.84, d, 1H			H8c	2.19, m, 1H
H8	7.71, t, 1H			H9c	0.71, d, 3H
H9	8.74, d, 1H			H10c	0.63, d, 3H

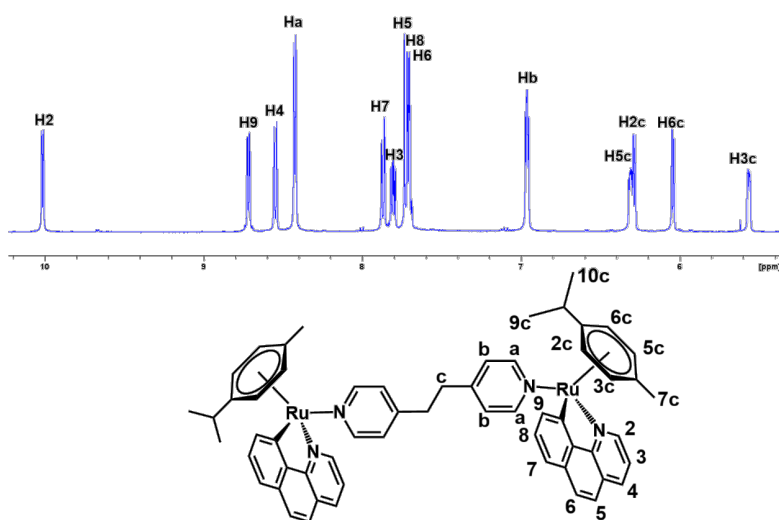
Όσον αφορά τις σχετικές διευθετήσεις μεταξύ των υποκαταστατών του συμπλόκου (5), αυτές μελετήθηκαν με φασματοσκοπία NOESY σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K. Στο φάσμα που λήφθηκε εντοπίστηκαν πολλές διασταυρούμενες κορυφές, αποτέλεσμα της χωρικής (<4 Å) αλληλεπίδρασης των πρωτονίων που βρίσκονται σε διαφορετικούς υποκαταστάτες. Ειδικότερα, διακρίνονται διασταυρούμενες κορυφές που αντιστοιχούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των H2 της bzq-H<sup>+</sup> και H9 της bzq-H<sup>+</sup> με όλα τα αρωματικά πρωτόνια του κουμενίου. Ομοίως, τα Ha του BL1, επίσης εμφανίζουν crosspeaks με όλα τα αρωματικά πρωτόνια του κουμενίου με μικρή διαφορά στις σχετικές εντάσεις όπως στις περιπτώσεις των προηγούμενων συμπλόκων. Έτσι λοιπόν, παρατηρείται ότι το H2, το οποίο βρίσκεται στον πυριδινικό δακτύλιο της bzq-H<sup>+</sup>, εμφανίζει crosspeaks μεγαλύτερης έντασης με τα H5c και H6c του κουμενίου, ενώ το H9 εμφανίζει διασταυρούμενες κορυφές υψηλότερης έντασης με τα H2c και H3c. Τέλος, τα Ha του BL1 δείχνουν μεγαλύτερης έντασης διασταυρούμενες κορυφές με τα H5c και H3c, τα οποία βρίσκονται στην πλευρά του cym που φέρει τη μεθυλομάδα. Φαίνεται, λοιπόν, πως το cym περιστρέφεται σχετικά αργά γύρω από τον η<sup>6</sup>- απτικό δεσμό, με την πλευρά του που φέρει την μεθυλομάδα να βρίσκεται κοντά στον BL1. Επίσης, φαίνεται ότι ευνοείται η διάταξη στον χώρο κατά την οποία η πλευρά του cym με τα H5c και H6c βρίσκεται εγγύτερα στον πυριδινικό δακτύλιο της bzq-H<sup>+</sup>, ενώ η πλευρά του υποκαταστάτη στην οποία βρίσκονται τα H2c και H3c βρίσκεται εγγύτερα στον βενζολικό δακτύλιο της bzq-H<sup>+</sup>.



**Εικόνα 3.17:** Α) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (5) σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Β) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (5) στις ίδιες συνθήκες και t<sub>mix</sub> = 600 ms. Στο ένθετο παρουσιάζεται το τμήμα του φάσματος που περιέχει τις διασταυρούμενες κορυφές των αρωματικών πρωτονίων του cym.

**3.2.6. Μελέτη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου  $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})]_2(\mu\text{-BL2})\}(\text{PF}_6)_2$  (6):**

Η λήψη του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (6) έγινε σε διαλύτη acetone- $\text{d}_6$  σε θερμοκρασία 298 K. Όμοια με τα προηγούμενα σύμπλοκα, στο φάσμα παρατηρείται ένα σετ σημάτων, (Εικόνα 3.18) υποδεικνύοντας την υψηλή του συμμετρία. Η ένταξη του υποκαταστάτη  $\text{bzq-H}^+$  γίνεται μέσω του N1 και του C10, ενώ τα σήματά τους βρίσκονται downfield μετατοπισμένα. Όσον αφορά τα πρωτόνια του γεφυρωτικού υποκαταστάτη BL2, και ειδικότερα τα αρωματικά του πρωτόνια, παρατηρείται ότι τα  $\text{H}_a$  έδωσαν σήμα μετατοπισμένο ελαφρώς (-0.02 ppm) προς χαμηλότερες τιμές ppm, ενώ το σήμα του  $\text{H}_b$  βρέθηκε μετατοπισμένο σημαντικά προς χαμηλότερα πεδία (+0.26 ppm). Το παραπάνω φαινόμενο είναι πιθανό να οφείλεται στην ανάπτυξη ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων από το  $\text{H}_a$  με τα αρωματικά νέφη των υπόλοιπων υποκαταστατών, τύπου CH- $\pi$ , σε σύγκριση με το  $\text{H}_b$ , λόγω της εγγύτητάς τους. Τέλος, για τα αρωματικά πρωτόνια του cym, παρατηρούνται ξεχωριστά σήματα.



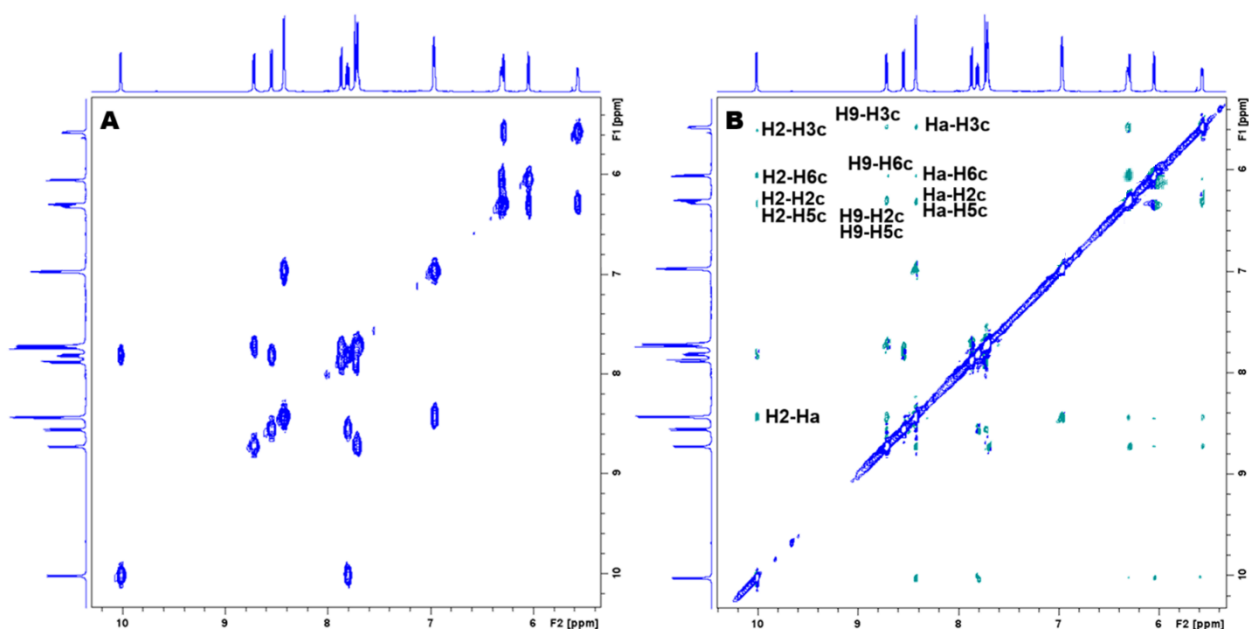
**Εικόνα 3.18:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (6) σε διαλύτη acetone- $\text{d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.6:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (6) σε διαλύτη acetone- $\text{d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

bzq-H <sup>+</sup>		BL2		cym	
H2	10.01, d, 1H	Ha	8.42, d, 2H	H2c	6.29, d, 1H
H3	7.81 t, 1H	Hb	6.96, d, 2H	H3c	5.57, d, 1H
H4	8.55, d, 1H	Hc	2.66, s, 2H	H5c	6.31, d, 1H
H5	7.74, s, 1H			H6c	6.04, d, 1H
H6	7.70, s, 1H			H7c	1.60, s, 3H
H7	7.87, d, 1H			H8c	2.17, m, 1H
H8	7.72, t, 1H			H9c	0.71, d, 3H
H9	8.72, d, 1H			H10c	0.63, d, 3H

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

Όσον αφορά τα φάσματα NOESY του (6) σε acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K, παρατηρούνται αρκετές διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ πρωτονίων που βρίσκονται σε διαφορετικούς υποκαταστάτες. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι τα πρωτόνια H2 και H9 του bzq-H<sup>+</sup> εμφανίζουν crosspeaks με όλα τα αρωματικά πρωτόνια του κουμενίου. Το ίδιο παρατηρείται και για τα πρωτόνια Ha του BL2. Το παραπάνω φαινόμενο αποδεικνύει την εγγύτητα του cym με όλους τους υπόλοιπους υποκαταστάτες. Επίσης, υπάρχουν αρκετές crosspeaks μεταξύ πρωτονίων της bzq-H<sup>+</sup> και του BL2, όπως π.χ. μεταξύ του H2 και Ha. Επιπροσθέτως, η διασταυρούμενη κορυφή του H2 της bzq-H<sup>+</sup> με το πρωτόνιο H6c είναι μεγαλύτερης έντασης συγκριτικά με εκείνες με τα υπόλοιπα αρωματικά πρωτόνια του cym. Αντίστοιχα, για το H9 της bzq-H<sup>+</sup> η διασταυρούμενη κορυφή με το H2c του cym είναι ισχυρότερη σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των υπόλοιπων αρωματικών πρωτονίων του cym, ενώ, τα Ha του BL2 εμφανίζουν crosspeaks μεγαλύτερης έντασης με τα H5c και H3c του cym. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι, ευνοείται περισσότερο η διευθέτηση κατά την οποία η πλευρά του υποκαταστάτη που φέρει την ισοπροπυλομάδα είναι σε κοντινή απόσταση με τη bzq-H<sup>+</sup>, ενώ η πλευρά του cym που φέρει τη μεθυλομάδα ευνοϊκότερο να βρίσκεται σε κοντινή απόσταση στον γεφυρωτικό υποκαταστάτη BL2.



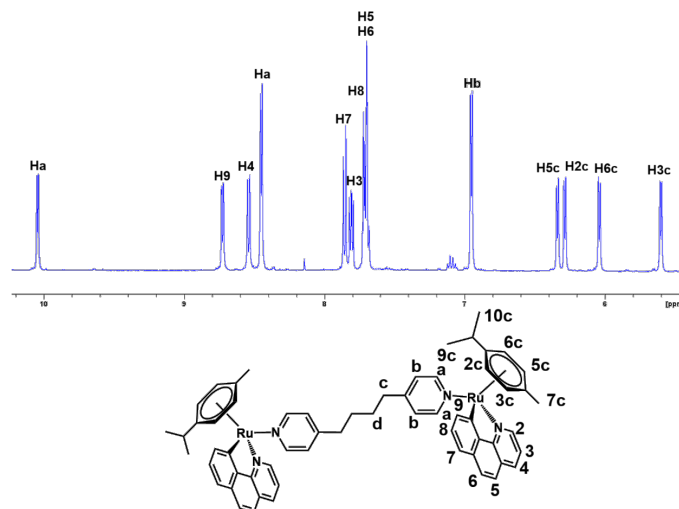
**Εικόνα 3.19:** A) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (6) σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. B) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (6) στις ίδιες συνθήκες και t<sub>mix</sub> = 600 ms.

#### 3.2.7. Χαρακτηρισμός με <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου $\{[(cym)Ru(bzq)]_2(\mu-BL3)\}(PF_6)_2$ , (7):

Το φάσμα του συμπλόκου (7) λήφθηκε σε acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K. Στο φάσμα παρατηρείται ένα σετ κορυφών για τα πρωτόνια των υποκαταστατών υποδεικνύοντας τη συμμετρία του. Ο χηλικός υποκαταστάτης bzq-H<sup>+</sup> εντάσσεται στα μεταλλικά κέντρα μέσω του N1 και του C10 (Πίνακας 3.7) όπως και στα προηγούμενα σύμπλοκα (Εικόνα 3.20). Σε ό,τι αφορά τα αρωματικά πρωτόνια του γεφυρωτικού υποκαταστάτη BL3, τα σήματά τους παρατηρήθηκαν μετατοπισμένα προς υψηλότερα πεδία. Ωστόσο, μικρή μετατόπιση παρουσιάζει το Ha, πιθανόν λόγω της προστασίας που υφίστανται από το αρωματικό νέφος της bzq-H<sup>+</sup> που βρίσκεται κοντά του. Τέλος, για τα αρωματικά πρωτόνια του cym, παρατηρήθηκε το

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

ίδιο φαινόμενο με τα προηγούμενα σύμπλοκα εμφανίζοντας ξεχωριστά σήματα στο φάσμα μετατοπισμένα σε χαμηλότερα πεδία.

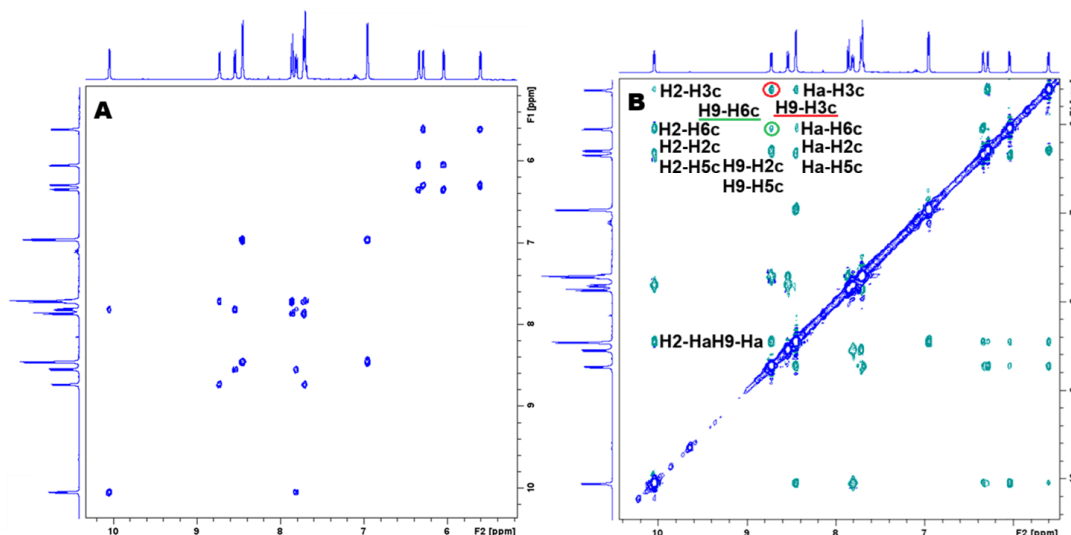


**Εικόνα 3.20:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (7) σε διαλύτη acetone- $\text{d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.7:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (7) σε διαλύτη acetone- $\text{d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

bzq- $\text{H}^+$		BL3		cym	
H2	10.05, d, 1H	Ha	8.46, d, 2H	H2c	6.29, d, 1H
H3	7.81 t, 1H	Hb	6.96, d, 2H	H3c	5.61, d, 1H
H4	8.54, d, 1H	Hc	2.39, s, 2H	H5c	6.34, d, 1H
H5	7.71, s, 1H	Hd	1.58, m, 2H	H6c	6.04, d, 1H
H6	7.71, s, 1H			H7c	1.68, s, 3H
H7	7.86, d, 1H			H8c	2.20 m, 1H
H8	7.72, t, 1H			H9c	0.72, d, 3H
H9	8.73, d, 1H			H10c	0.64, d, 3H

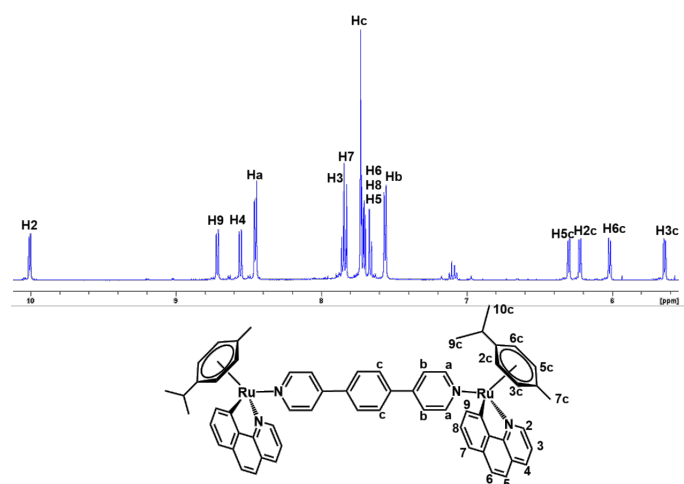
Στο φάσμα NOESY του (7) σε διαλύτη acetone- $\text{d}_6$  και θερμοκρασία 298 K, το οποίο παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.21, παρατηρούνται διασταυρούμενες κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν στην αλληλεπίδραση του H2 της bzq- $\text{H}^+$  με όλα τα αρωματικά πρωτόνια του cym διαφορετικών εντάσεων, ενώ το ίδιο παρατηρείται και για τα H9 της bzq- $\text{H}^+$  και Ha του BL3 με τα αρωματικά πρωτόνια του cym. Ακόμη, crosspeaks εμφανίζονται ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ του H2 και του H9 της bzq- $\text{H}^+$  με το Ha του BL3. Αντίστοιχα, τα H9 και Ha εμφανίζουν διασταυρούμενες κορυφές μικρής έντασης με το H6c. Τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν σε μια παρόμοια διεύθυνση των υποκαταστατών με εκείνη των συμπλόκων (5) και (6).



**Εικόνα 3.21:** Α) Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY του συμπλόκου (7) σε διαλύτη acetone- $\text{d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Β) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (7) στις ίδιες συνθήκες και  $t_{\text{mix}} = 600$  ms.

### 3.2.8. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $\{[(\text{cym})\text{Ru}(\text{bzq})]_2(\mu\text{-BL4})\}(\text{PF}_6)_2$ (8):

Στο φάσμα του συμπλόκου (8) σε διαλύτη DMSO- $\text{d}_6$  και θερμοκρασία 298 K. (Εικόνα 3.22) παρατηρείται ένα σετ κορυφών για τα πρωτόνια του συμπλόκου, απόδειξη της υψηλής συμμετρίας του. Για μια φορά ακόμη η ένταξη της  $\text{bzq-H}^+$  γίνεται μέσω του N1 και του C10. Οι τιμές των σημάτων όλων των πρωτονίων του συμπλόκου (8) φαίνονται στον Πίνακα 3.8. Για τα αρωματικά πρωτόνια του cym, παρατηρούνται ξεχωριστά σήματα. Όσον αφορά τα σήματα των πρωτονίων του γεφυρωτικού υποκαταστάτη BL4, αυτά βρέθηκαν σημαντικά μετατοπισμένα προς υψηλότερα πεδία από 0.32 έως και 0.34 ppm πιθανόν εξαιτίας της απόσυρσης ηλεκτρονιακής πυκνότητας από το N των πυριδινικών δακτυλίων και την επαγόμενη μείωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο αρωματικό σύστημα των τριών δακτυλίων του BL4.

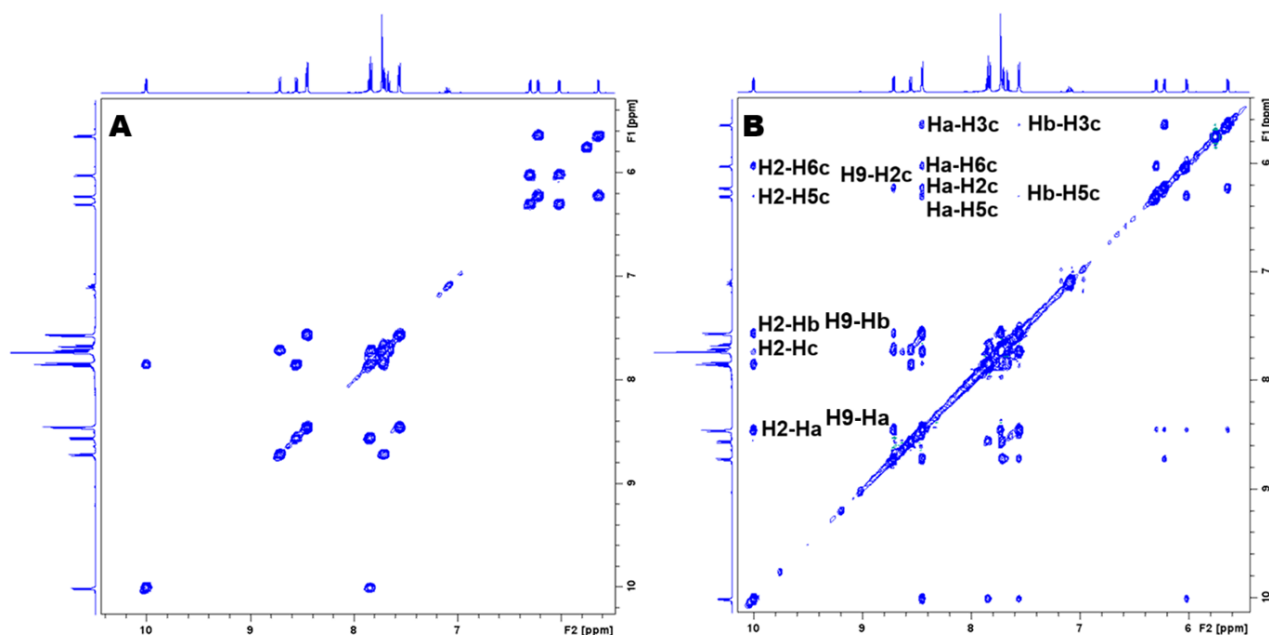


**Εικόνα 3.22:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (8) σε διαλύτη DMSO- $\text{d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.8:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (8) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

bzq-H <sup>+</sup>		BL4		cym	
H2	10.00, d, 1H	Ha	8.45, d, 2H	H2c	6.22, d, 1H
H3	7.85, t, 1H	Hb	7.56, d, 2H	H3c	5.64, d, 1H
H4	8.56, d, 1H	Hc	7.73, s, 2H	H5c	6.30, d, 1H
H5	7.66, s, 1H			H6c	6.02, d, 1H
H6	7.72, s, 1H			H7c	1.63, s, 3H
H7	7.83, d, 1H			H8c	2.11 m, 1H
H8	7.71, t, 1H			H9c	0.63, d, 3H
H9	8.72, d, 1H			H10c	0.56, d, 3H

Στο φάσμα του (8) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K, που παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.23, παρατηρείται μεγάλος αριθμός διασταυρούμενων κορυφών προερχόμενες από την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτονίων που βρίσκονται σε διαφορετικούς υποκαταστάτες. Ειδικότερα, το H2 της bzq-H<sup>+</sup> εμφανίζει crosspeaks με το H6c του κουμενίου και μία ακόμη, πολύ μικρής έντασης με το H5c. Αντίστοιχα, το H9 εμφανίζει μια μόνο crosspeak με το H2c του cym. Ακόμη παρατηρούνται σημαντικής έντασης διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ του Ha του BL4 με όλα τα αρωματικά πρωτόνια του cym, ενώ παρατηρούνται ακόμη διασταυρούμενες κορυφές και για το περισσότερο απομακρυσμένο Hb του BL4 με τα H3c και H5c. Τα παραπάνω ευρήματα σχετίζονται με την ακαμψία του BL4 που τον φέρνει πλησιέστερα στο cym και την bzq-H<sup>+</sup>, ενώ για μια ακόμη φορά η διεύθετηση του cym είναι τέτοια ώστε να φέρει την ισοπροπυλομάδα σε κοντινή απόσταση με τη bzq-H<sup>+</sup> και την πλευρά του στην οποία βρίσκεται η μεθυλομάδα σε κοντινή απόσταση με τον BL4.

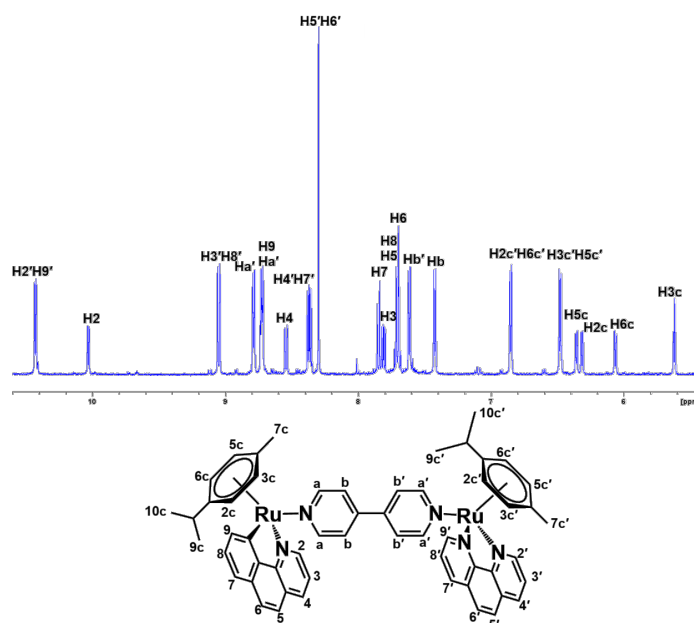


**Εικόνα 3.23:** A) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (8) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. B) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (8) στις ίδιες συνθήκες και t<sub>mix</sub> = 600 ms.

### 3.2.9. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου $\{[(cym)Ru(bzq)][(cym)Ru(phen)](\mu-BL1)\}(PF_6)_3$ (9):

Το σύμπλοκο (9) είναι το πρώτο από τα σύμπλοκα που απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής το οποίο έχει φορτίο 3+, συνδυάζοντας δύο διαφορετικούς χηλικούς υποκαταστάτες στα δύο μεταλλικά κέντρα της δομής του. Στο ένα μεταλλικό κέντρο εντάσσεται χηλικά N,N, ένας ουδέτερος υποκαταστάτης, η phen, ενώ στο δεύτερο μεταλλικό κέντρο εντάσσεται χηλικά N-C, ένας ανιονικός υποκαταστάτης, η bzq-H<sup>+</sup>, ώστε το συνολικό φορτίο του διπυρηνικού συμπλόκου να είναι 3+ καθώς τα δύο μεταλλικά κέντρα γεφυρώνονται από ουδέτερους BLs.

Το φάσμα <sup>1</sup>H NMR του (9) σε acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K (Εικόνα 3.24) είναι εμφανώς πιο περίπλοκο από τα αντίστοιχα των συμπλόκων (1) - (8). Με «'» αριθμούνται τα πρωτόνια του μεταλλικού κέντρου που εντάσσεται η phen όπου τα πρωτόνια της είναι ισοδύναμα ανά δύο μεταξύ τους και εμφανίζουν κοινά σήματα στο φάσμα, διπλάσιες ολοκλήρωσης από εκείνα των πρωτονίων της bzq-H<sup>+</sup>. Τα πρωτόνια της τελευταίας όπως και στα προηγούμενα σύμπλοκα δεν είναι ισοδύναμα μεταξύ τους, εμφανίζοντας ξεχωριστά σήματα. Όσον αφορά τις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της phen, παρατηρείται ότι τα πρωτόνια H2'H9' και H3'H8', τα οποία βρίσκονται κοντά στα εντασσόμενα N1' και N10' είναι downfield μετατοπισμένα σε σχέση με την ελεύθερη phen όπως και τα πρωτόνια της bzq-H<sup>+</sup>. Περνώντας στη συνέχεια στα δύο αρένια cym και cym', παρατηρείται ότι για το μεν cym' τα αρωματικά πρωτόνια του είναι ισοδύναμα ανά δύο (H2c'H6c' και H3c'H5c') δίνοντας δύο σήματα, ενώ τα αρωματικά πρωτόνια του cym εμφανίζουν τέσσερα σήματα, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις. Αξίζει επίσης να αναφερθεί το γεγονός ότι οι μετατοπίσεις των σημάτων των αρωματικών πρωτονίων και των δύο κουμενίων είναι upfield σε σχέση με τα P2 και P4, με αυτές όμως των πρωτονίων του cym είναι σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές του cym' (Πίνακες P1 και P3). Η εξήγηση του παραπάνω φαινομένου σχετίζεται με ηλεκτρονιακούς παράγοντες στην σφαίρα ένταξης του ρουθηνίου, από την αντικατάσταση του ανιονικού Cl<sup>-</sup> στο P2 ή P4 με τον ουδέτερο BL1. Τέλος, σχετικά με τα σήματα των πρωτονίων του γεφυρωτικού υποκαταστάτη BL1, παρατηρείται άρση της ισοδυναμίας μεταξύ των δύο πυριδινικών δακτυλίων του ως αποτέλεσμα της ασυμμετρίας του συμπλόκου.

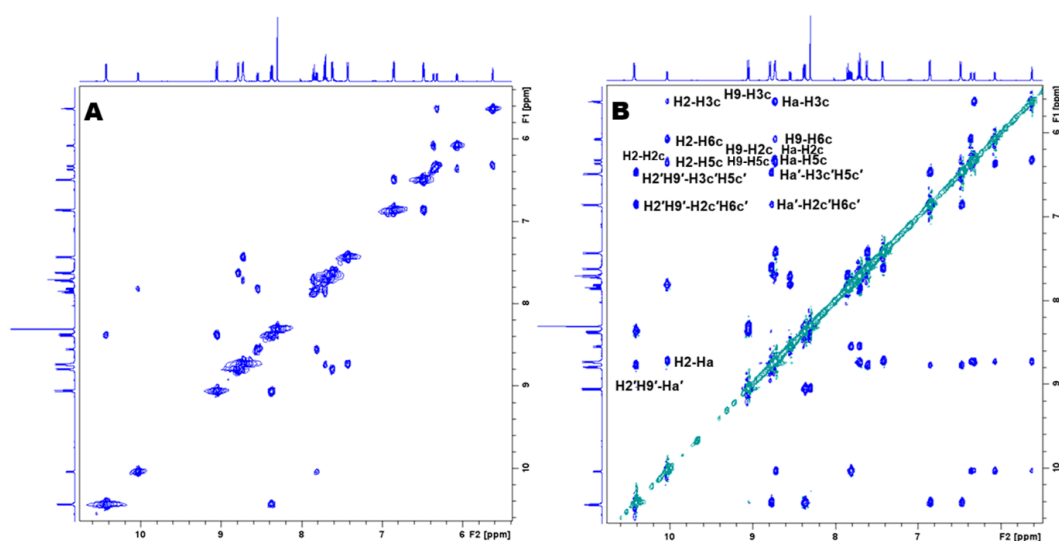


**Εικόνα 3.24:** Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου (9) σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.9:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του (9) σε acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

	bzq-H <sup>+</sup>	phen		BL1		cym		cym'	
H2	10.03, d, 1H	H2'H9'	10.43, d, 2H	Ha	8.72, d, 2H	H2c	6.32, d, 1H	H2c'H6c'	6.85, d, 2H
H3	7.81, t, 1H	H3'H8'	9.05, t, 2H	Ha'	8.79, d, 2H	H3c	5.62, d, 1H	H3c'H5c'	6.48, d, 2H
H4	8.55, d, 1H	H4'H7'	8.37, d, 2H	Hb	7.43, d, 2H	H5c	6.36, d, 1H	H7c'	1.93, s, 3H
H5	7.71, s, 1H	H5'H6'	8.30, s, 2H	Hb'	7.62, d, 2H	H6c	6.07, d, 1H	H8c'	2.58, m, 1H
H6	7.71, s, 1H					H7c	1.69, s, 3H	H9c'H10c'	0.83, d, 6H
H7	7.85, d, 1H					H8c	2.22, m, 1H		
H8	7.71, t, 1H					H9c	0.71, d, 3H		
H9	8.72, d, 1H					H10c	0.63, d, 3H		

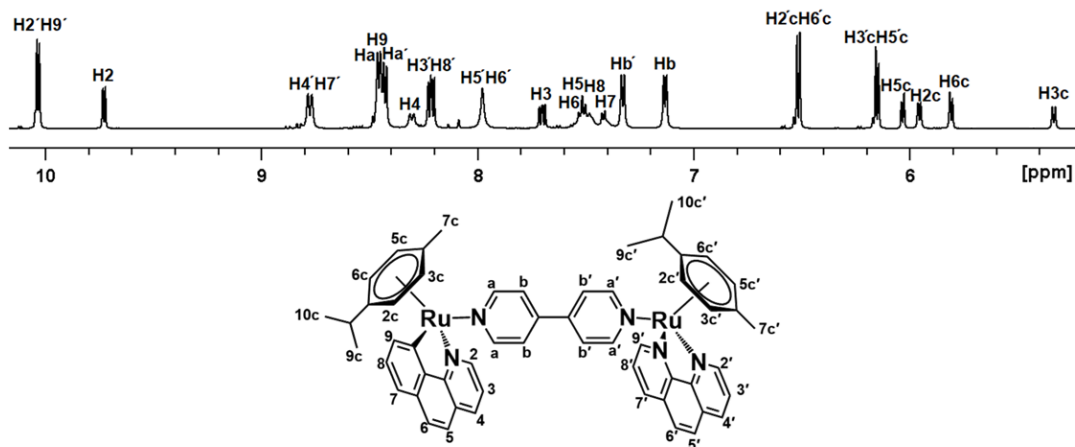
Η σχετική θέση των υποκαταστατών του (9), μελετήθηκε μέσω φασματοσκοπίας NOESY σε acetone-d<sub>6</sub> και τους 298 K (Εικόνα 3.25). Στο φάσμα εμφανίζονται crosspeaks προερχόμενες από τα πρωτόνια H2'H9' της phen και τα H2 και H9 της bzq-H<sup>+</sup> με όλα τα αρωματικά πρωτόνια του cym' και cym αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ των αρωματικών πρωτονίων του cym' και των H2'H9' είναι παρόμοιας έντασης μεταξύ τους, ενώ μεταξύ των H2, H9 και των H2c, H3c, H5c και H6c διαφορετικής, υποδεικνύοντας μια πιο καθορισμένη θέση του κουμενίου ως προς την bzq-H<sup>+</sup>. Επιπλέον, παρατηρείται η ύπαρξη διασταυρούμενων κορυφών εξαιτίας της αλληλεπίδρασης των Ha και Ha' με τα πρωτόνια των cym και cym' που βρίσκονται κοντά τους. Έτσι η crosspeak του Ha με το H3c έχει μεγαλύτερη ένταση από εκείνη του H2 με το H3c ενώ του H2 με το H6c είναι σημαντικά μεγαλύτερης έντασης από εκείνη του Ha με το H3c. Μοιάζει, λοιπόν, παρότι το αρένιο περιστρέφεται με αποτέλεσμα όλα τα αρωματικά του πρωτόνια να αλληλεπιδρούν με τα H2, H9 και Ha, η διευθέτηση του είναι τέτοια ώστε η πλευρά του που φέρει την ισοπροπυλομάδα να βρίσκεται πάνω από την bzq-H<sup>+</sup>, ενώ η μεθυλομάδα να βρίσκεται εγγύτερα στον BL. Όμοια είναι και η διευθέτηση του cym' σε σχέση με τους υπόλοιπους υποκαταστάτες του άλλου μεταλλικού κέντρου.



**Εικόνα 3.25:** A) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (9) σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. B) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (9) στις ίδιες συνθήκες και t<sub>mix</sub> = 600 ms.

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

Το σύμπλοκο (9) χαρακτηρίστηκε επίσης και σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH = 7.0), αφού πρώτα μετατράπηκε στο χλωριούχο άλας του, καθώς μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> μέσω NMR και πειραμάτων ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με EB. Το φάσμα του συμπλόκου καθώς και η απόδοση των σημάτων των πρωτονίων του παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.26 και στον Πίνακα 3.10.



**Εικόνα 3.26:** Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου (9) σε D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH = 7.0) στους 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.10:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (9) σε D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH = 7.0) στους 298 K @ 500 MHz.

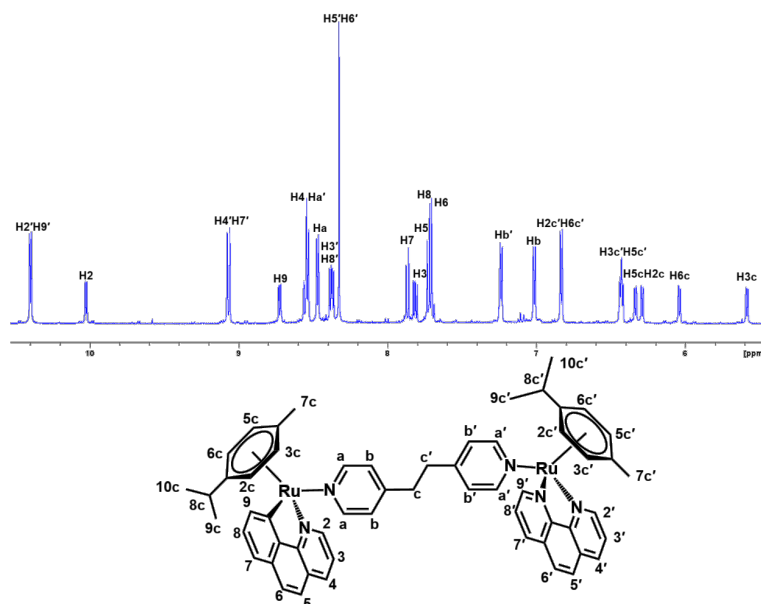
bzaq-H <sup>+</sup>		phen		BL1		cym		cym'	
H2	9.73, d, 1H	H2'H9'	10.04, d, 2H	Ha	8.46, d, 2H	H2c	5.96, d, 1H	H2c'H6c'	6.52, d, 2H
H3	7.70, t, 1H	H3'H8'	8.22, t, 2H	Ha'	8.43, d, 2H	H3c	5.33, d, 1H	H3c'H5c'	6.16, d, 2H
H4	8.30, d, 1H	H4'H7'	8.78, d, 2H	Hb	7.13, d, 2H	H5c	6.03, d, 1H	H7c'	1.77, s, 3H
H5	7.51, s, 1H	H5'H6'	7.98, s, 2H	Hb'	7.33, d, 2H	H6c	5.81, d, 1H	H8c'	2.36, m, 1H
H6	7.53, s, 1H					H7c	1.52, s, 3H	H9c'H10c'	0.72, d, 6H
H7	7.42, d, 1H					H8c	1.94, m, 1H		
H8	7.50, t, 1H					H9c	0.47, d, 3H		
H9	8.45, d, 1H					H10c	0.38, d, 3H		

#### 3.2.10. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου {[(cym)Ru(bzaq)][(cym)Ru(phen)](μ-BL2)}(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub>, (10):

Στο φάσμα του συμπλόκου (10), σε acetone-d<sub>6</sub> στους 298 K, παρατηρούνται δύο σετ κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των υποκαταστατών για κάθε μεταλλικό κέντρο. Όπως και στο (9), τα πρωτόνια της phen είναι ανά δύο ισοδύναμα, ενώ της bzaq-H<sup>+</sup> εμφανίζουν ξεχωριστά σήματα. Τα σήματα των πρωτονίων της phen βρέθηκαν όλα downfield μετατοπισμένα, ως αποτέλεσμα της χηλικής της ένταξης, με τις μεγαλύτερες μετατοπίσεις να παρατηρούνται για τα H2'H9' τα οποία βρίσκονται γειτονικά ως προς τις θέσεις ένταξης. Το ίδιο συμβαίνει και στα σήματα των H2 και H9 της bzaq-H<sup>+</sup> τα οποία είναι επίσης

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

downfield μετατοπισμένα. Τόσο τα πρωτόνια του *cym* όσο και του *cym'* έδωσαν σήματα upfield μετατοπισμένα, όπως και στο σύμπλοκο (9). Τέλος, για τα πρωτόνια του γεφυρωτικού υποκαταστάτη BL2 παρατηρείται άρση της συμμετρίας, εξαιτίας της ανισοδυναμίας μεταξύ των σφαιρών ένταξης των δύο μεταλλικών κέντρων τα οποία γεφυρώνει. Έτσι, παρατηρείται ένα σετ σημάτων για τα πρωτόνια τα οποία βρίσκονται στον πυριδινικό δακτύλιο που εντάσσεται στο μεταλλικό κέντρο που φέρει τη *rhen* ως χηλικό υποκαταστάτη και άλλο ένα σετ για τα πρωτόνια που βρίσκονται στον πυριδινικό δακτύλιο ο οποίος είναι ενταγμένος στο μεταλλικό κέντρο το οποίο φέρει την *Bzq-H<sup>+</sup>*. Όλα τα σήματα των πρωτονίων του BL2 είναι downfield μετατοπισμένα, αποτέλεσμα της ένταξης του.



**Εικόνα 3.27:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (10) σε διαλύτη  $\text{acetone-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

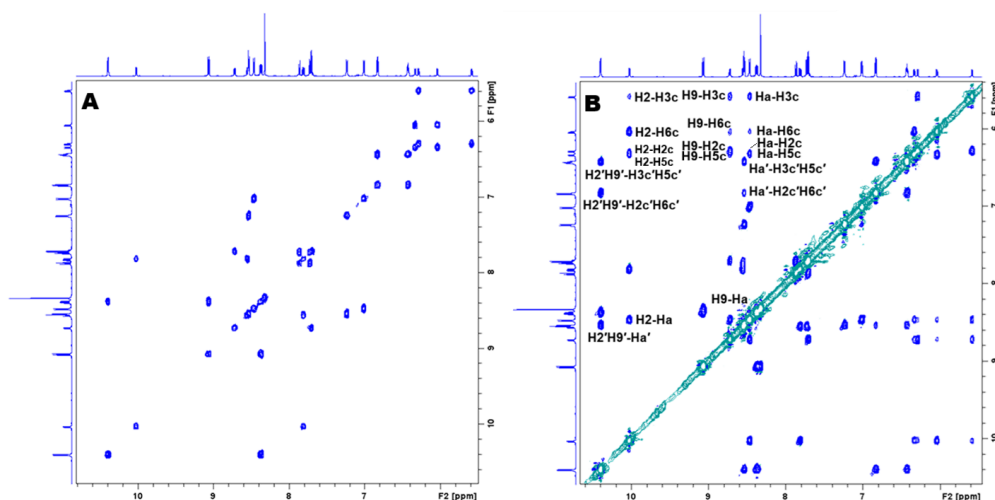
**Πίνακας 3.11:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (10) σε διαλύτη  $\text{acetone-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

<i>bzq-H<sup>+</sup></i>		<i>phen</i>		BL2		<i>cym</i>		<i>cym'</i>	
H2	10.03, d, 1H	H2'H9'	10.40, d, 2H	Ha	8.53, d, 2H	H2c	6.29, d, 1H	H2c'H6c'	6.83, d, 2H
H3	7.86, t, 1H	H3'H8'	8.47, t, 2H	Ha'	8.55, d, 2H	H3c	5.59, d, 1H	H3c'H5c'	6.44, d, 2H
H4	8.56, d, 1H	H4'H7'	9.07, d, 2H	Hb	7.43, d, 2H	H5c	6.34, d, 1H	H7c'	1.84, s, 3H
H5	7.81, s, 1H	H5'H6'	8.33, s, 2H	Hb'	7.62, d, 2H	H6c	6.04, d, 1H	H8c'	2.58, m, 1H
H6	7.72, s, 1H			Hc	2.69, t, 2H	H7c	1.67, s, 3H	H9c'H10c'	0.83, d, 6H
H7	7.87, d, 1H			Hc'	2.71, t, 2H	H8c	2.19, m, 1H		
H8	7.73, t, 1H					H9c	0.71, d, 3H		
H9	8.72, d, 1H					H10c	0.63, d, 3H		

Στο φάσμα δύο διαστάσεων NOESY του συμπλόκου (10), σε  $\text{acetone-d}_6$  στους 298 K, παρατηρούνται crosspeaks που αποδίδονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτονίων που βρίσκονται είτε στον ίδιο είτε σε διαφορετικούς υποκαταστάτες. Αρχικά παρατηρούνται οι διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ των H2'H9' και Ha' και μεταξύ των H2, H9 με τα Ha που βοήθησαν στην απόδοση των σημάτων των πρωτονίων του BL2, σε συνδυασμό και με το φάσμα COSY (Εικόνα 3.28). Ακόμη, παρατηρούνται crosspeaks μεταξύ των

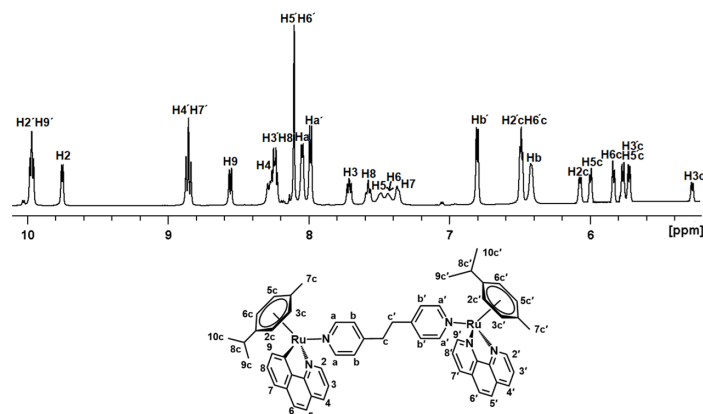
### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

H2'H9' και των αρωματικών πρωτονίων H2c'H6c' και H3c'H5c' του cym', οι οποίες είναι παρόμοιας έντασης μεταξύ τους. Αυτό το φαινόμενο είναι χαρακτηριστικό της ισοδυναμίας (ανά δύο) που εμφανίζουν τα αρωματικά πρωτόνια του κουμενίου. Επιπλέον, τα H2c'H6c' και H3c'H5c' εμφανίζουν crosspeaks και με τα πρωτόνια Ha' του BL2. Παρόλο που η ένταση των δύο κορυφών δεν διαφέρει σημαντικά, η ένταση της διασταυρούμενης κορυφής του Ha' με το H3c'H5c' είναι ελαφρώς ισχυρότερη, υποδεικνύοντας μια διευθέτηση του cym', κατά την οποία η μεθυλομάδα του βρίσκεται πάνω από τον γεφυρωτικό υποκαταστάτη, ενώ η ισοπροπυλομάδα του βρίσκεται σε κοντινότερη απόσταση με την rhen. Στο δεύτερο μεταλλικό κέντρο του συμπλόκου, παρόλο που παρατηρούμε ξανά crosspeaks μεταξύ όλων των αρωματικών πρωτονίων του cym με τα H2 και H9 της bzq-H<sup>+</sup> και τα Ha του BL2, υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στις εντάσεις τους, υποδεικνύοντας ότι η πλευρά του κουμενίου στην οποία βρίσκεται η ισοπροπυλομάδα βρίσκεται εγγύτερα στον BL2, ενώ, ταυτόχρονα, η πλευρά του cym που φέρει τη μεθυλομάδα βρίσκεται εγγύτερα στον βενζολικό δακτύλιο της bzq-H<sup>+</sup>.



**Εικόνα 3.28:** A) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (10) σε acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. B) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (10) στις ίδιες συνθήκες.

Το φάσμα <sup>1</sup>H NMR για το σύμπλοκο (10) σε D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH = 7.0) και 298 K ως χλωριούχο άλας, φαίνεται στη Εικόνα 3.29, και οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων των πρωτονίων του, στον Πίνακα 3.12.



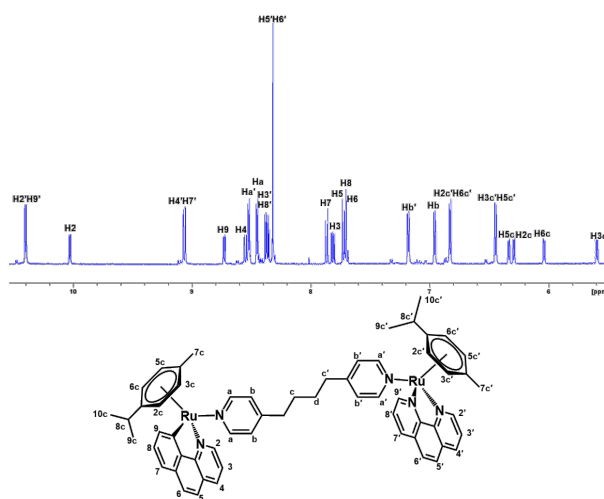
**Εικόνα 3.29:** Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου (10) σε D<sub>2</sub>O, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH = 7.0) στους 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.12:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (10) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

bzq-H <sup>+</sup>		phen		BL2		cym		cym'	
H2	9.75, d, 1H	H2'H9'	9.97, d, 2H	Ha	8.05, d, 2H	H2c	6.08, d, 1H	H2c'H6c'	6.49, d, 2H
H3	7.71, t, 1H	H3'H8'	8.24, t, 2H	Ha'	7.99, d, 2H	H3c	5.27, d, 1H	H3c'H5c'	5.70/5.76, d, 2H
H4	8.29, d, 1H	H4'H7'	8.85, d, 2H	Hb	6.42, d, 2H	H5c	6.00, d, 1H	H7c'	0.82, s, 3H
H5	7.49, s, 1H	H5'H6'	8.10, s, 2H	Hb'	6.80, d, 2H	H6c	5.83, d, 1H	H8c'	2.00, m, 1H
H6	7.44, s, 1H			Hc	2.49, t, 2H	H7c	1.26, s, 3H	H9c'H10c'	0.68, d, 6H
H7	7.36, d, 1H			Hc'	2.49, t, 2H	H8c	2.00, m, 1H		
H8	7.58, t, 1H					H9c	0.55, d, 3H		
H9	8.56, d, 1H					H10c	0.51, d, 3H		

**3.2.11. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου {[(cym)Ru(bzq)][(cym)Ru(phen)](μ-BL3)}(PF<sub>6</sub>)<sub>3</sub> (11):**

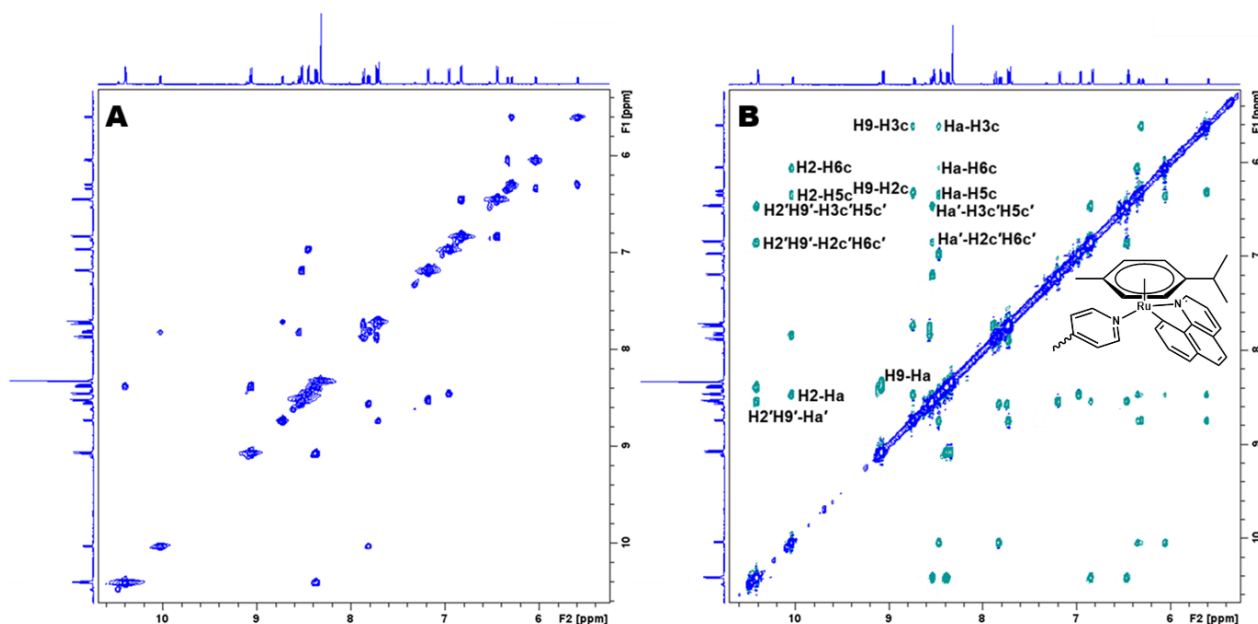
Το τρίτο τριφορτιακό σύμπλοκο της σειράς των συμπλόκων είναι το σύμπλοκο (11), με τον υποκαταστάτη BL3 να γεφυρώνει τα δύο μεταλλικά κέντρα Ru(II). Το αρωματικό μέρος του φάσματος <sup>1</sup>H NMR παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.30. Όπως και στις άλλες περιπτώσεις, παρατηρείται ένα σετ κορυφών για τα πρωτόνια των υποκαταστατών κάθε μεταλλικού κέντρου. Η phen εντάσσεται στο μεταλλικό κέντρο μέσω των N1' και N10', και η bzq-H<sup>+</sup> μέσω N1 και C10 (Πίνακας 3.13). Η μεγαλύτερη μετατόπιση εντοπίζεται για τα πρωτόνια H2'H9', τα οποία βρίσκονται γειτονικά ως προς τις θέσεις ένταξης του υποκαταστάτη, το σήμα των οποίων είναι μετατοπισμένο κατά +0.44 ppm σε σχέση με το σήμα των ίδιων πρωτονίων στο πρόδρομο σύμπλοκο Π2 πιθανόν λόγω ηλεκτρονιακών φαινομένων στη σφαίρα ένταξης του ρουθηνίου (αντικατάσταση του Cl από το N του BL3). Όμοια τα πρωτόνια της bzq-H<sup>+</sup>, μετατοπίζονται downfield, με τις μεγαλύτερες μετατοπίσεις να σημειώνονται για τα H2 και H9, κατά +0.38 και +0.29 ppm, αντίστοιχα. Τα αρωματικά πρωτόνια των κουμενίων συμπεριφέρονται όπως και στα σύμπλοκα (9) και (10). Τέλος, αναφορικά με τον γεφυρωτικό υποκαταστάτη BL3, στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR παρατηρούνται διαφορετικά σήματα για τα πρωτόνια του κάθε πυριδινικού δακτυλίου, καθώς επίσης και για τα Hc και Hc'. Οι μετατοπίσεις των σημάτων των πρωτονίων του είναι γενικά upfield, εκτός από τα Ha' και Ha, τα οποία βρίσκονται εκατέρωθεν των εντασσόμενων N του BL3.

**Εικόνα 3.30:** Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου (11) σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.13:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (11) σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

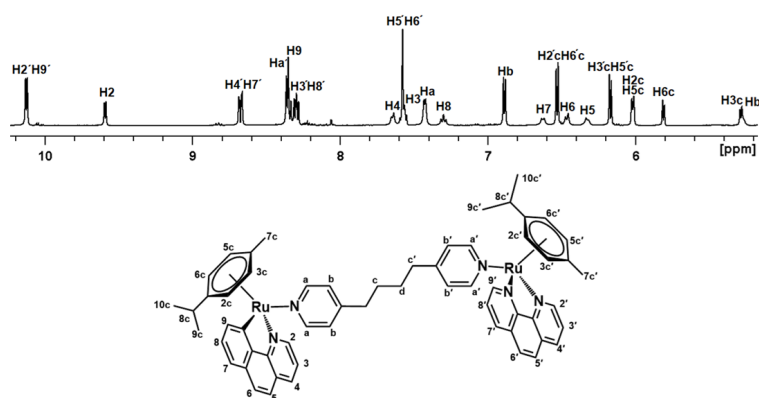
	bzq-H <sup>+</sup>		phen		BL3		cym		cym'
H2	10.03, d, 1H	H2'H9'	10.40, d, 2H	Ha	8.45, d, 2H	H2c	6.29, d, 1H	H2c'H6c'	6.83, d, 2H
H3	7.81, t, 1H	H3'H8'	8.38, t, 2H	Ha'	8.52, d, 2H	H3c	5.59, d, 1H	H3c'H5c'	6.44, d, 2H
H4	8.55, d, 1H	H4'H7'	9.07, d, 2H	Hb	6.96, d, 2H	H5c	6.33, d, 1H	H7c'	1.92, s, 3H
H5	7.75, s, 1H	H5'H6'	8.33, s, 2H	Hb'	7.18, d, 2H	H6c	6.04, d, 1H	H8c'	2.58, m, 1H
H6	7.71, s, 1H			Hc	2.41, t, 2H	H7c	1.68, s, 3H	H9c'H10c'	0.84, d, 6H
H7	7.87, d, 1H			Hc'	2.48, t, 2H	H8c	2.21, m, 1H		
H8	7.72, t, 1H			Hd	1.59, m, 2H	H9c	0.71, d, 3H		
H9	8.72, d, 1H					H10c	0.64, d, 3H		

Περνώντας στη συνέχεια στη μελέτη του συμπλόκου με φασματοσκοπία NOESY (Εικόνα 3.31). Έτσι παρατηρούνται crosspeaks μεταξύ των H2'H9' με τα αρωματικά πρωτόνια του cym και μεταξύ των Ha' και των H2c'H6c' και των H3c'H5c', οι οποίες παρουσιάζουν μικρή διαφορά στις εντάσεις τους, με αυτή του Ha' με το H3c'H5c' να είναι ισχυρότερη, υποδεικνύοντας μια μικρή «προτίμηση» στη διεύθυνση κατά την οποία η μεθυλομάδα του βρίσκεται πάνω από τον πυριδινικό δακτύλιο του BL3, ενώ η ισοπροπυλομάδα βρίσκεται πάνω από τη phen. Η σχετική θέση των υποκαταστατών στο άλλο μεταλλικό κέντρο προσδιορίζεται από το γεγονός ότι το H2 της bzq-H<sup>+</sup> εμφανίζει crosspeak με το H2c και το H6c που είναι σημαντικά μικρότερης έντασης συγκριτικά με τις H3c και το H5c. Έτσι η μεθυλομάδα του cym διευθετείται πάνω από τον πυριδινικό δακτύλιο του BL3, ενώ η ισοπροπυλομάδα πάνω από την bzq-H<sup>+</sup>.



**Εικόνα 3.31:** A) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (11) σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. B) Αρωματική περιοχή του φάσματος NOESY του συμπλόκου (11) σε acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Σημειώνονται οι διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ πρωτονίων των διαφορετικών υποκαταστατών του συμπλόκου (interligand crosspeaks).

Το σύμπλοκο (11) χαρακτηρίστηκε, επίσης, και σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH = 7.0 ως χλωριούχο άλας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.32 και στον Πίνακα 3.14, και παρατηρούνται τα ίδια φαινόμενα που παρατηρήθηκαν και σε acetone-d<sub>6</sub>.



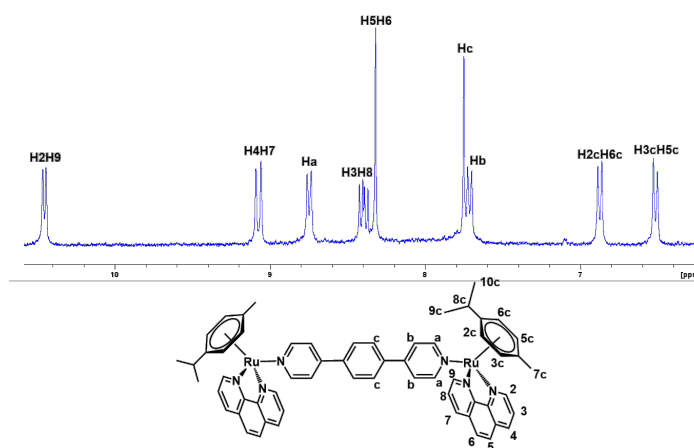
**Εικόνα 3.32:** Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου (11) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.14:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (11) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

	bzq-H <sup>+</sup>	phen		BL3		cym		cym'	
H2	9.60, d, 1H	H2'H9'	10.12, d, 2H	Ha	7.43, d, 2H	H2c	6.02, d, 1H	H2c'H6c'	6.53, d, 2H
H3	7.57, t, 1H	H3'H8'	8.29, t, 2H	Ha'	8.36, d, 2H	H3c	5.29, d, 1H	H3c'H5c'	6.17, d, 2H
H4	7.65, d, 1H	H4'H7'	8.68, d, 2H	Hb	5.27, d, 2H	H5c	6.02, d, 1H	H7c'	1.77, s, 3H
H5	6.33, s, 1H	H5'H6'	7.58, s, 2H	Hb'	6.89, d, 2H	H6c	5.81, d, 1H	H8c'	2.37, m, 1H
H6	6.47, s, 1H			Hc	1.19, t, 2H	H7c	1.39, s, 3H	H9c'H10c'	0.73, d, 6H
H7	6.63, d, 1H			Hc'	1.96, t, 2H	H8c	1.97, m, 1H		
H8	7.30, t, 1H			Hd	0.77, m, 2H	H9c	0.50, d, 3H		
H9	8.30, d, 1H					H10c	0.49, d, 3H		

### 3.2.12. Μελέτη των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR του συμπλόκου $\{[cym]Ru(phen)\}(BL4)\}(PF_6)_4$ , (12):

Όσον αφορά το σύμπλοκο (12), το οποίο είναι το πρώτο τετραφορτιακό σύμπλοκο της σειράς συμπλόκων, το φάσμα του λήφθηκε σε διαλύτη acetone-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K (Εικόνα 3.33). Τα σήματα των πρωτονίων της phen, ισοδύναμα ανά δύο μεταξύ τους, βρέθηκαν downfield μετατοπισμένα, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα στο πρόδρομο σύμπλοκο Π2, με τη μεγαλύτερη μετατόπιση να σημειώνεται για τα H2H9, τα οποία βρίσκονται γειτονικά στις θέσεις ένταξης του υποκαταστάτη (Πίνακας 3.15). Στα πρωτόνια των cym παρατηρείται ισοδυναμία, όπως αναμενόταν όμοια με τα σύμπλοκα (A) - (C) [129]. Τέλος, τα πρωτόνια του BL4 βρέθηκαν ελαφρώς downfield μετατοπισμένα (Ha Δδ = +0.07 ppm), αλλά και upfield (Hb Δδ = -0.03 ppm). Τα Ha, καθώς βρίσκονται πολύ κοντά στο εντασσόμενο άτομο N, επηρεάζονται από την εναπόθεση ηλεκτρονιακής πυκνότητας προς το μεταλλικό κέντρο εξαιτίας της ένταξης του N, ενώ τα Hb, τα οποία βρίσκονται πιο απομακρυσμένα ως προς το πυριδινικό άζωτο, προστατεύονται αποτελεσματικότερα από τα ηλεκτρονιακά νέφη των γειτονικών υποκαταστατών. Για τον ίδιο λόγο το σήμα των Hc βρέθηκε upfield μετατοπισμένο κατά -0.21 ppm.

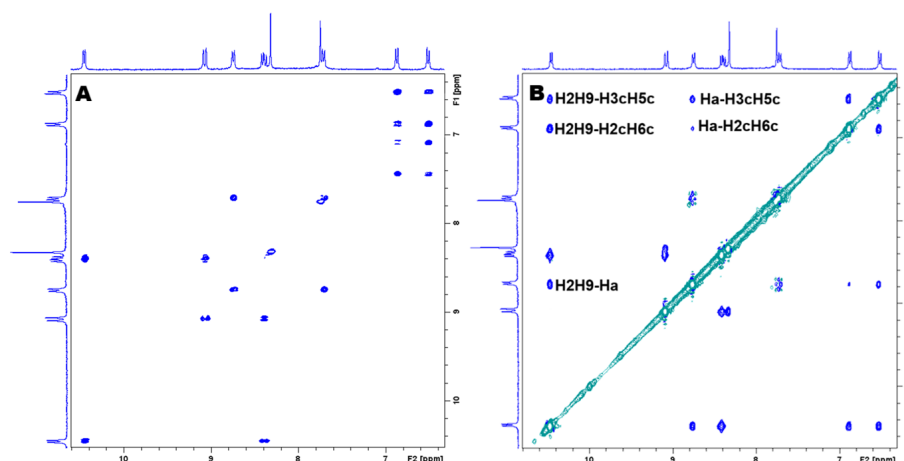


**Εικόνα 3.33:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (12) σε διαλύτη acetone- $d_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.15:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (12) σε διαλύτη acetone- $d_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

phen		BL4		cym	
H2H9	10.45, d, 1H	Ha	8.75, d, 2H	H2cH6c	6.22, d, 1H
H3H8	8.40, t, 1H	Hb	7.71, d, 2H	H3cH5c	5.64, d, 1H
H4H7	9.07, d, 1H	Hc	7.75, s, 2H	H7c	1.63, s, 3H
H5H6	8.32, s, 1H			H8c	2.11 m, 1H
				H9cH10c	0.63, d, 3H

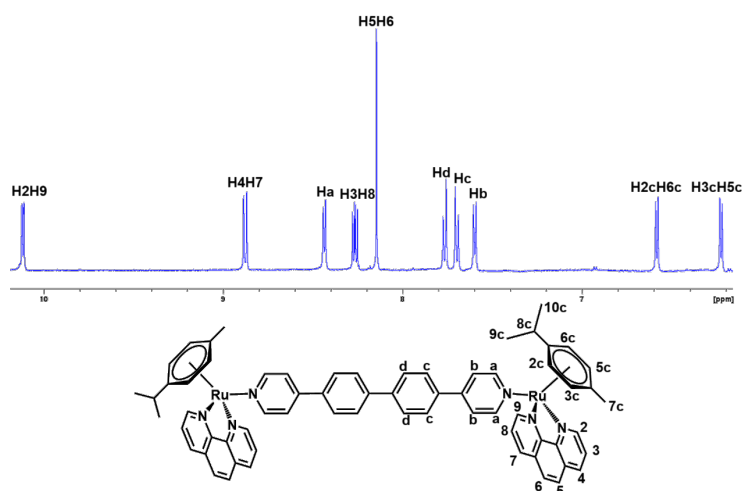
Στο φάσμα NOESY του συμπλόκου, σε διαλύτη acetone- $d_6$  και θερμοκρασία 298 K (Εικόνα 3.34) διακρίνονται εμφανώς λιγότερες διασταυρούμενες κορυφές σε σχέση με τα προηγούμενα σύμπλοκα εξαιτίας της συμμετρικότητας του συμπλόκου. Ειδικότερα, υπάρχουν crosspeaks μεταξύ των H2H9 με τα πρωτόνια Ha του BL4 και με τα αρωματικά πρωτόνια του cym. Οι διασταυρούμενες κορυφές με τα H2cH6c και H3cH5c είναι παρόμοιας έντασης, ως αποτέλεσμα της ελεύθερης και ταχείας για τη χρονική κλίμακα του NMR περιστροφής του cym που του επιτρέπει την αλληλεπίδραση με όλους τους υπόλοιπους υποκαταστάτες. Επίσης, σημειώνονται διασταυρούμενες κορυφές και μεταξύ των Ha με τα αρωματικά πρωτόνια του cym. Η διασταυρούμενη κορυφή του Ha με τα H3cH5c είναι μεγαλύτερης έντασης από την αντίστοιχη με H2cH6c, γεγονός που σημαίνει ότι η διάταξη κατά την οποία το cym βρίσκεται με τη μεθυλομάδα του πάνω από τον γεφυρωτικό υποκαταστάτη, ενώ η ισοπροπυλομάδα του υποκαταστάτη βρίσκεται πάνω από την phen ευνοείται ελαφρώς.



**Εικόνα 3.34:** Α) Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  COSY του συμπλόκου (12) σε διαλύτη acetone- $d_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Β) Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  -  $^1\text{H}$  NOESY του συμπλόκου (12) σε διαλύτη acetone- $d_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Σημειώνονται οι διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ πρωτονίων διαφορετικών υποκαταστατών του συμπλόκου (interligand crosspeaks).

### 3.2.13. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $\{[\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})](\text{BL5})\}\text{Cl}_4$ , (13):

Το σύμπλοκο (13) είναι το δεύτερο τετραφορτιακό σύμπλοκο και το μόνο το οποίο φέρει ως γεφυρωτικό υποκαταστάτη τον BL5. Όπως αναλύθηκε προηγουμένως, το σύμπλοκο αυτό ήταν δυνατό να απομονωθεί μόνο ως χλωριούχο άλας και ως εκ τούτου ο χαρακτηρισμός του με NMR έγινε σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  στους 298 K. Στο φάσμα του (Εικόνα 3.35) διακρίνεται ένα σετ κορυφών εξαιτίας της συμμετρικότητας του συμπλόκου. Η ένταξη της phen γίνεται χηλικά από τα N1 και N10, όπως και στα προηγούμενα σύμπλοκα. Τα σήματα των πρωτονίων του υποκαταστάτη βρέθηκαν downfield μετατοπισμένα σε σύγκριση με το πρόδρομο σύμπλοκο Π2 (Εικόνα Π3, Πίνακας Π1), με τα H2H9 να έχουν την ισχυρότερη μετατόπιση. Εξαιτίας της ισοδυναμίας των phen, κατά τα γνωστά, παρατηρείται ισοδυναμία και για τα πρωτόνια του cym, τα σήματα των οποίων βρέθηκαν επίσης downfield μετατοπισμένα (Πίνακας 3.16). Για τα πρωτόνια του BL5 δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός των μετατοπίσεων σε σχέση με την ελεύθερή του μορφή, καθώς ο BL5 είναι αδιάλυτος σε υδατικό διάλυμα και δεν ήταν δυνατή η λήψη φάσματος  $^1\text{H}$  NMR για τον ελεύθερο υποκαταστάτη σε  $\text{D}_2\text{O}$ .

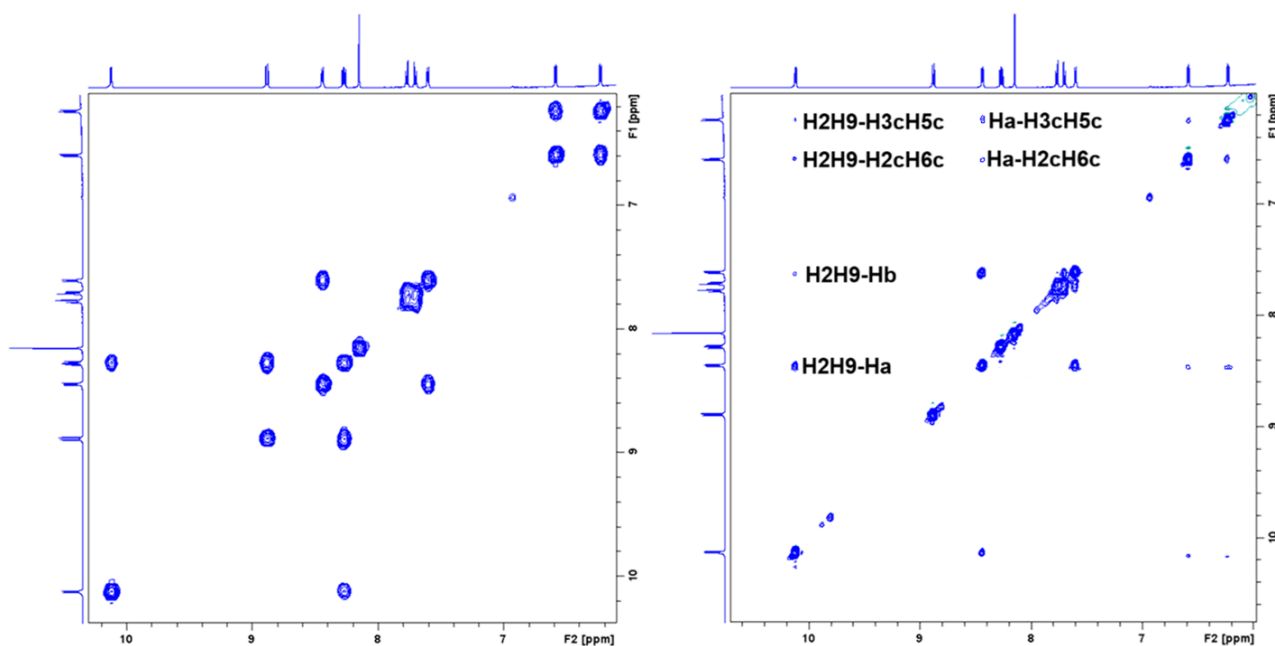


**Εικόνα 3.35:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (13) σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.16:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (13) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

phen		BL5		cym	
H2H9	10.12, d, 1H	Ha	8.44, d, 2H	H2cH6c	6.59, d, 1H
H3H8	8.27, t, 1H	Hb	7.60, d, 2H	H3cH5c	6.23, d, 1H
H4H7	8.88, d, 1H	Hc	7.70, d, 2H	H7c	1.91, s, 3H
H5H6	8.15, s, 1H	Hd	7.77, d, 2H	H8c	2.46, m, 1H
				H9cH10c	0.81, d, 3H

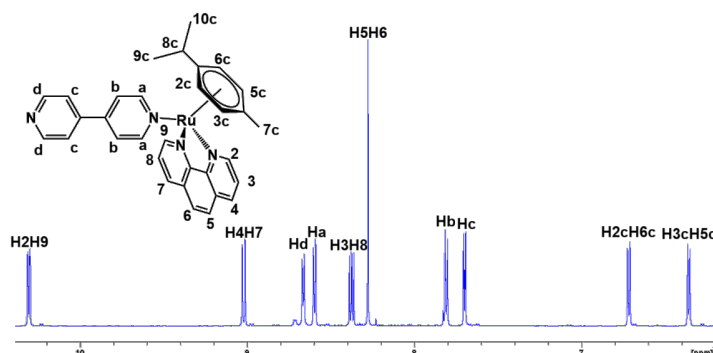
Στο φάσμα NOESY του (13) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και θερμοκρασία 298 K (Εικόνα 3.36) βρέθηκαν διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ πρωτονίων που βρίσκονται σε διαφορετικούς αλλά και στον ίδιο υποκαταστάτη. Αρχικά, σημειώνεται η crosspeak μεταξύ των H2H9 της phen και των Ha του BL5, όμοια και με τα προηγούμενα σύμπλοκα. Επιπλέον, τα H2H9 εμφανίζουν crosspeaks και με τα H2cH6c και H3cH5c του cym, με αυτή με τα H2cH6c να είναι μεγαλύτερης έντασης μεταξύ των δύο. Επιπλέον, τα Ha του γεφυρωτικού υποκαταστάτη, επίσης εμφανίζουν crosspeaks με τα αρωματικά πρωτόνια του cym, με αυτή με τα H3cH5c να είναι μεγαλύτερης έντασης. Φαίνεται, συνεπώς, ότι οι υποκαταστάτες του συμπλόκου υιοθετούν μια χωρική διεύθεση όμοια με του συμπλόκου (12).



**Εικόνα 3.36:** Α) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (13) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Β) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H NOESY του συμπλόκου (13) σε διαλύτη D<sub>2</sub>O και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Σημειώνονται οι διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ πρωτονίων διαφορετικών υποκαταστατών του συμπλόκου (interligand crosspeaks).

**3.2.14. Μελέτη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου  $[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})(4,4'\text{-bpy})](\text{PF}_6)_2$  (14):**

Το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μονομεταλλικού σύμπλοκο (14), λήφθηκε σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K (Εικόνα 3.37, Πίνακας 3.17). Τα πρωτόνια της phen είναι ισοδύναμα ανά δύο μεταξύ τους, καθώς ο υποκαταστάτης εντάσσεται μέσω των N1 και N10, χηλικά στο μεταλλικό κέντρο  $\text{Ru(II)}$ . Τα σήματα των πρωτονίων του υποκαταστάτη βρέθηκαν downfield μετατοπισμένα. Η μεγαλύτερη μετατόπιση σημειώθηκε για τα H2H9, τα οποία βρίσκονται γειτονικά ως προς τις θέσεις ένταξης. Στα πρωτόνια του cym παρατηρούνται οι γνωστές ισοδυναμίες που περιγράφηκαν και προηγουμένως και τα σήματά τους βρέθηκαν με μεγάλες downfield μετατοπίσεις. Τα σήματα των πρωτονίων της 4,4'-bpy βρέθηκαν upfield μετατοπισμένα. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί η άρση της ισοδυναμίας μεταξύ των δύο πυριδινικών δακτυλίων της 4,4'-bpy, αφού ο ένας εντάσσεται στο μεταλλικό κέντρο μέσω του N, ενώ ο άλλος παραμένει αδέσμευτος.

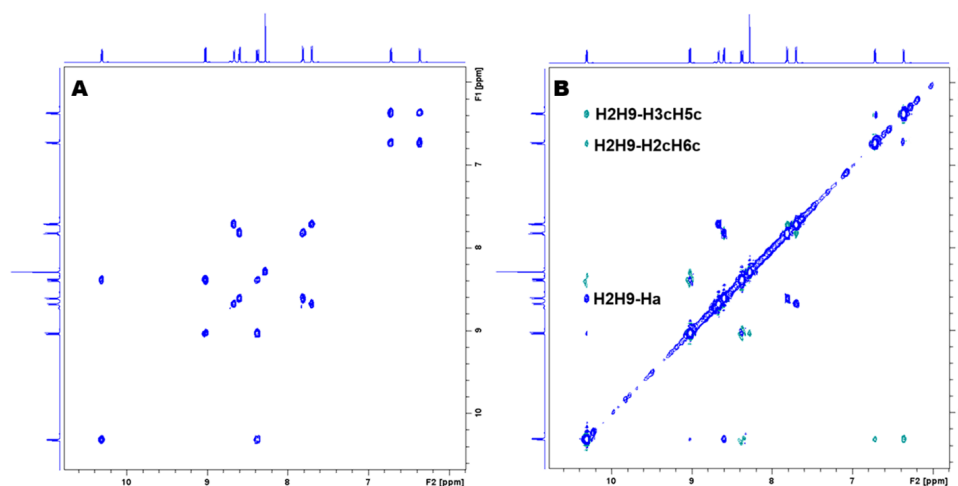


**Εικόνα 3.37:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (14) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.17:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (14) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

phen		4,4'-bpy		cym	
H2H9	10.31, d, 1H	Ha	8.60, d, 2H	H2cH6c	6.72, d, 2H
H3H8	8.38, t, 1H	Hb	7.81, d, 2H	H3cH5c	6.36, d, 2H
H4H7	9.02, d, 1H	Hc	7.70, d, 2H	H7c	1.82, s, 3H
H5H6	8.28, s, 1H	Hd	8.67, d, 2H	H8c	2.39 m, 1H
				H9cH10c	0.69, d, 6H

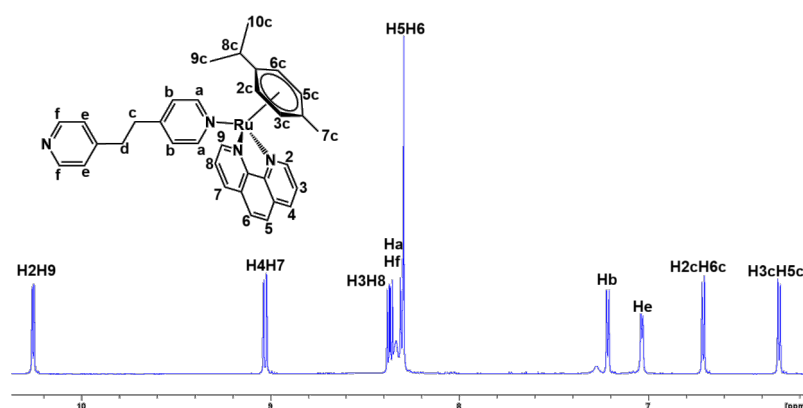
Στο φάσμα NOESY του συμπλόκου (14) (Εικόνα 3.38) διακρίνονται crosspeaks μεταξύ πρωτονίων που βρίσκονται σε διαφορετικούς υποκαταστάτες αλλά και στον ίδιο υποκαταστάτη. Ειδικότερα, τα H2H9 εμφανίζουν διασταυρούμενη κορυφή με τα Ha και με τα αρωματικά πρωτόνια του cym, H2cH6c και H3cH5c. Μεταξύ των crosspeaks των H2H9 με τα αρωματικά πρωτόνια του cym, μεγαλύτερης έντασης είναι αυτή με τα H3cH5c, δείχνοντας έτσι την πιθανή ύπαρξη ευνοούμενης χωρικής διεύθεσης, κατά την οποία η μεθυλομάδα του αρενίου βρίσκεται πάνω από τον χηλικό υποκαταστάτη. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί η απουσία crosspeak μεταξύ πρωτονίων της 4,4'-bpy και του αρενίου, σε αντίθεση με τα προηγούμενα, διπυρηνικά σύμπλοκα. Πιθανή αιτία του φαινομένου αυτού είναι ο μεγαλύτερος βαθμός ελευθερίας που έχει η 4,4'-bpy με αποτέλεσμα να βρίσκεται σε μεγαλύτερη απόσταση από το cym.



**Εικόνα 3.38:** Α) Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY του συμπλόκου (14) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Β) Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  NOESY του συμπλόκου (14) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Σημειώνονται οι διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ πρωτονίων διαφορετικών υποκαταστατών του συμπλόκου (interligand crosspeaks).

### 3.2.15. Μελέτη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR του συμπλόκου $[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})(\text{bpe})](\text{PF}_6)_2$ , (15):

Περνώντας στο επίσης μονομεταλλικό σύμπλοκο (15), το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του οποίου λήφθηκε σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K (Εικόνα 3.39). Η χηλική ένταξη της phen κάνει τα πρωτόνια της ισοδύναμα ανά δύο. Τα σήματά του βρέθηκαν downfield μετατοπισμένα, εκτός από αυτό του H5H6. Η μεγαλύτερη μετατόπιση σημειώθηκε για τα H2H9 (Πίνακας 3.18). Αναφορικά με το cym, και ειδικότερα τα αρωματικά πρωτόνια του, τα σήματά τους βρέθηκαν downfield μετατοπισμένα, σε σχέση με το πρόδρομο σύμπλοκο P2 (Πίνακας Π1). Αντίθετα, τα σήματα των αλειφατικών πρωτονίων του υποκαταστάτη βρέθηκαν downfield μετατοπισμένα. Επίσης, upfield μετατοπισμένα είναι και τα σήματα των πρωτονίων του bpe. Ακόμη, όμοια με το σύμπλοκο (14), οι πυριδινικοί δακτύλιοι του bpe παύουν να είναι ισοδύναμοι, καθώς ο ένας είναι ενταγμένος μέσω του N στο μεταλλικό κέντρο, ενώ ο δεύτερος παραμένει αδέσμευτος.

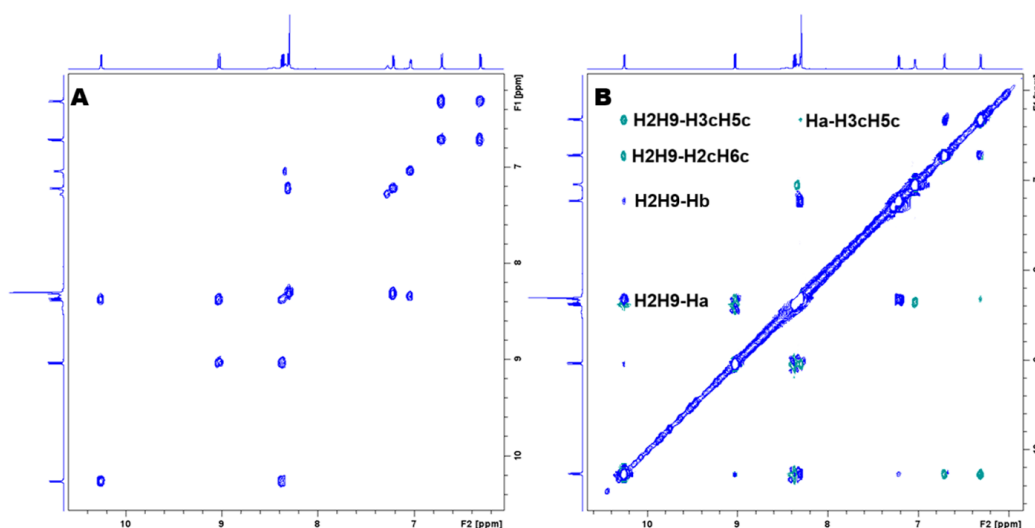


**Εικόνα 3.39:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (15) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.18:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (15) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

phen		bpe		cym	
<b>H2H9</b>	10.26, d, 1H	<b>Ha</b>	8.30, d, 2H	<b>H2cH6c</b>	6.71, d, 2H
<b>H3H8</b>	8.37, t, 1H	<b>Hb</b>	7.21, d, 2H	<b>H3cH5c</b>	6.31, d, 2H
<b>H4H7</b>	9.03, d, 1H	<b>Hc</b>	2.85, t, 2H	<b>H7c</b>	1.72, s, 3H
<b>H5H6</b>	8.29, s, 1H	<b>Hd</b>	2.77, t, 2H	<b>H8c</b>	2.37 m, 1H
		<b>He</b>	7.03, d, 2H	<b>H9cH10c</b>	0.68, d, 6H
		<b>Hf</b>	8.30, d, 2H		

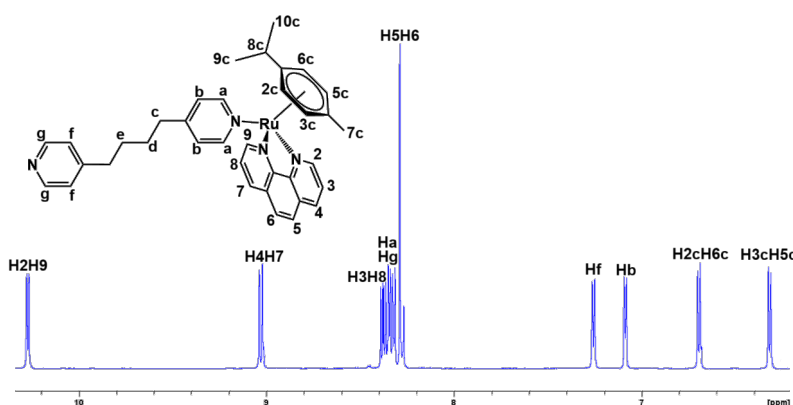
Στο φάσμα NOESY του (15), σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K (Εικόνα 3.40), εντοπίστηκαν crosspeaks μεταξύ πρωτονίων ευρισκόμενων σε διαφορετικούς υποκαταστάτες του συμπλόκου. Αρχικά, σημειώνονται crosspeaks μεταξύ των Ha και Hb του bpe με τα H2H9 της phen, ένδειξη της κοντινής απόστασης μεταξύ των δύο υποκαταστατών. Οι crosspeaks αυτές λειτούργησαν επικουρικά και στην απόδοση των σημάτων του υποκαταστάτη bpe. Επιπλέον, τα πρωτόνια H2H9 της phen έδωσαν crosspeaks και με τα αρωματικά πρωτόνια του cym χωρίς αξιοσημείωτη διαφορά στην ένταση αυτών. Ακόμη, τα Ha του bpe εμφανίζουν crosspeak με τα H3cH5c του αρενίου, όχι, ωστόσο, με τα H2cH6c. Φαίνεται συνεπώς, υπάρχει «προτίμηση» για τη διάταξη κατά την οποία η πλευρά του υποκαταστάτη που φέρει τη μεθυλομάδα βρίσκεται πάνω από τον πυριδινικό δακτύλιο του bpe, ενώ η άλλη πλευρά του υποκαταστάτη βρίσκεται πάνω από τη phen.



**Εικόνα 3.40:** Α) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H COSY του συμπλόκου (15) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Β) Αρωματική περιοχή του φάσματος <sup>1</sup>H - <sup>1</sup>H NOESY του συμπλόκου (15) σε διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub> και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Σημειώνονται οι διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ πρωτονίων διαφορετικών υποκαταστατών του συμπλόκου (interligand crosspeaks).

**3.2.16. Μελέτη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου  $[(\text{cym})\text{Ru}(\text{phen})(\text{bpp})](\text{PF}_6)_2$ , (16):**

Το τελευταίο σύμπλοκο αυτής της σειράς συμπλόκων είναι το μονομεταλλικό σύμπλοκο (16), το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του οποίου λήφθηκε σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K (Εικόνα 3.41). Η χηλική ένταξη της phen δημιουργεί ισοδυναμία στα πρωτόνια της, όπως και στα προηγούμενα σύμπλοκα. Όλα τα σήματα των πρωτονίων της phen βρέθηκαν μετατοπισμένα προς υψηλότερες τιμές ppm, με τη μεγαλύτερη μετατόπιση να σημειώνεται για το σήμα των  $\text{H}2\text{H}9$  (Πίνακας 3.19). Όσον αφορά τα αρωματικά πρωτόνια του cym, για τα οποία παρατηρούνται οι γνωστές ισοδυναμίες, βρέθηκαν μετατοπισμένα σε χαμηλότερα πεδία, ενώ τα αλειφατικά πρωτόνια προς υψηλότερα πεδία. Τέλος, σχετικά με τον υποκαταστάτη bpp, αρχικά παρατηρείται η άρση της συμμετρίας που υπήρχε στον ελεύθερο υποκαταστάτη, λόγω της ένταξης μέσω του N του ενός πυριδινικού δακτυλίου, ενώ ο δεύτερος διατηρείται αδέσμευτος. Τα σήματα των πρωτονίων του υποκαταστάτη βρέθηκαν μετατοπισμένα προς πιο προστατευμένα πεδία.

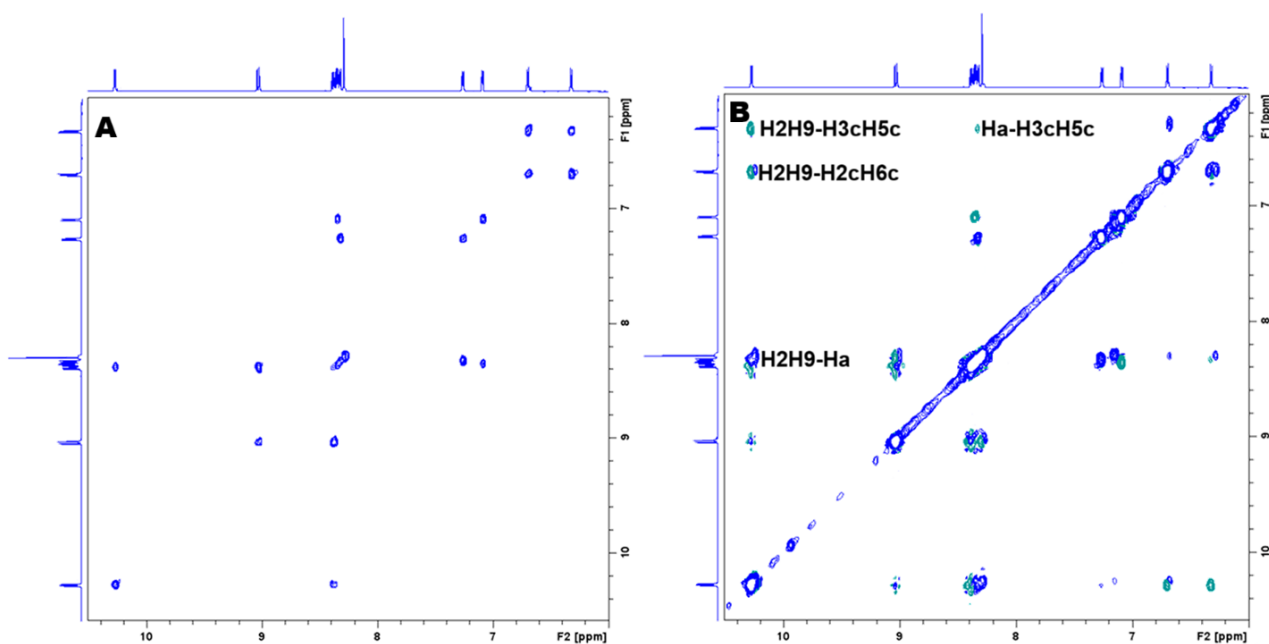


**Εικόνα 3.41:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του συμπλόκου (16) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας 3.19:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (16) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

phen		bpp		cym	
<b>H2H9</b>	10.27, d, 1H	<b>Ha</b>	8.35, d, 2H	<b>H2cH6c</b>	6.70, d, 2H
<b>H3H8</b>	8.38, t, 1H	<b>Hb</b>	7.09, d, 2H	<b>H3cH5c</b>	6.32, d, 2H
<b>H4H7</b>	9.03, d, 1H	<b>Hc</b>	1.74, t, 2H	<b>H7c</b>	1.75, s, 3H
<b>H5H6</b>	8.29, s, 1H	<b>Hd</b>	2.50, t, 2H	<b>H8c</b>	2.36, m, 1H
		<b>He</b>	2.46, t, 2H	<b>H9cH10c</b>	0.68, d, 6H
		<b>Hf</b>	7.26, d, 2H		
		<b>Hg</b>	8.32, d, 2H		

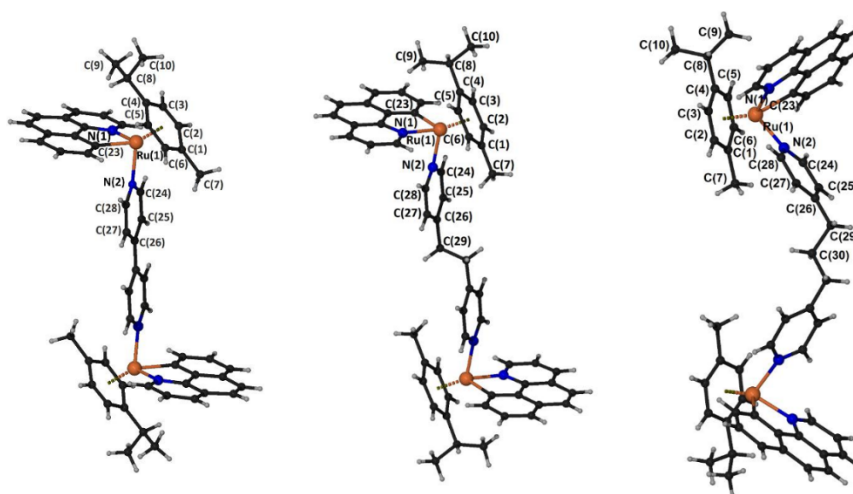
Στο φάσμα NOESY του συμπλόκου (16) σε  $\text{DMSO-d}_6$  και 298 K (Εικόνα 3.42), παρατηρείται η ύπαρξη διασταυρούμενων κορυφών μεταξύ πρωτονίων διαφορετικών υποκαταστατών του συμπλόκου. Ειδικότερα, τα  $\text{H}2\text{H}9$  της phen εμφανίζουν διασταυρούμενη κορυφή με τα  $\text{H}_a$  του bpp, καθώς επίσης και με τα αρωματικά πρωτόνια του cym, με αυτή με τα  $\text{H}2\text{cH}6\text{c}$  να είναι ελαφρώς μεγαλύτερης έντασης από αυτή με τα  $\text{H}3\text{cH}5\text{c}$ . Επιπλέον, τα  $\text{H}_a$  εμφανίζουν crosspeak με τα  $\text{H}3\text{cH}5\text{c}$ , αλλά όχι με τα  $\text{H}2\text{cH}6\text{c}$ . Με βάση τα παραπάνω φαίνεται ότι ευνοείται η διάταξη κατά την οποία η μεθυλομάδα του cym βρίσκεται σε κοντινή απόσταση με τον υποκαταστάτη bpp, ενώ η ισοπροπυλομάδα βρίσκεται εγγύτερα της phen.



**Εικόνα 3.42:** Α) Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY του συμπλόκου (16) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Β) Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  NOESY του συμπλόκου (16) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz. Σημειώνονται οι διασταυρούμενες κορυφές μεταξύ πρωτονίων διαφορετικών υποκαταστατών του συμπλόκου (interligand crosspeaks).

### 3.3. Κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων (5) - (7):

Κατάλληλοι κρύσταλλοι των συμπλόκων (5), (6) και (7) αναλύθηκαν με περίθλαση ακτίνων Χ. Οι κρύσταλλοι των παραπάνω διπυρηνικών συμπλόκων λήφθηκαν μέσω αργής διάχυσης διαιθυλαιθέρα σε διάλυμα των συμπλόκων σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Οι κρυσταλλικές δομές των τριών συμπλόκων απεικονίζονται στην Εικόνα 3.43.



**Εικόνα 3.43:** Σχηματική απεικόνιση τύπου «balls and sticks» των κρυσταλλικών δομών των συμπλόκων (5), (6) και (7). Η συμμετρία των συμπλόκων δημιουργεί ισοδύναμα άτομα: (5),  $-x+2, -y+1, -z+2$ ; (6),  $-x+1, -y, -z+1$ ; (7),  $-x, y, -z+1/2$ .

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων (5) και (6) ανήκουν στις μονοκλινείς ομάδες χώρου  $P2_1/c$  και  $P2_1/n$ , ενώ αυτή του συμπλόκου (7) στην ορθορομβική ομάδα χώρου  $Pbcn$ . Κάποια επιλεγμένα μήκη δεσμών με βάση τις κρυσταλλικές δομές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.20. Και στα τρία σύμπλοκα τα κατιόντα βρίσκονται επάνω σε στοιχεία συμμετρίας: κέντρα αναστροφής στο μέσο των γεφυρωτικών υποκαταστατών στα σύμπλοκα (5) και (6), και άξονας διπλής συμμετρίας, ο οποίος είναι η διχοτόμος της γωνίας C(29) - C(30) - C(29)[-x, y, -z+1/2]) στο σύμπλοκο (7). Τα μεταλλικά κέντρα υιοθετούν την αναμενόμενη ψευδοκταεδρική γεωμετρία τύπου «σκαμπό πιάνου» (riano stool), με αμελητέες μόνο διαφορές μεταξύ τους.

**Πίνακας 3.20:** Επιλεγμένα μήκη δεσμών (Å) και γωνίες ( $^{\circ}$ ) για τα σύμπλοκα (5) - (7). [a] Ο υποκαταστάτης bzq παρουσιάζει παραμόρφωση και εξευγενίστηκε σε δύο θέσεις. Χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από το τμήμα με τις υψηλότερες τιμές πληρότητας.

	(5)	(6)	(7)
Ru(1) – cym C <sub>6</sub> centroid	1.722(1)	1.702(1)	1.696(1)
Ru(1) – C(23)	2.089(12) <sup>[a]</sup>	2.053(6)	2.083(6)
Ru(1) – N(1)	2.099(9) <sup>[a]</sup>	2.080(6)	2.088(6)
Ru(1) – N(2)	2.133(7)	2.103(5)	2.102(6)
Ru(1) – Ru(1)	11.361(2)	13.133(2)	12.522(1)
cym C <sub>6</sub> centroid – Ru(1) – N(1)	131.24(4) <sup>[a]</sup>	130.63(2)	130.69(2)
cym C <sub>6</sub> centroid – Ru(1) – C(23)	127.88(5) <sup>[a]</sup>	131.38(2)	129.97(2)
cym C <sub>6</sub> centroid – Ru(1) – N(2)	128.15(2)	124.64(3)	127.34(2)
N(1) – Ru(1) – C(23)	77.1(5) <sup>[a]</sup>	79.0(2)	77.9(2)
N(1) – Ru(1) – N(2)	88.8(4)	88.0(2)	86.8(2)
N(2) – Ru(1) – C(23)	86.8(6)	87.5(2)	87.5(2)

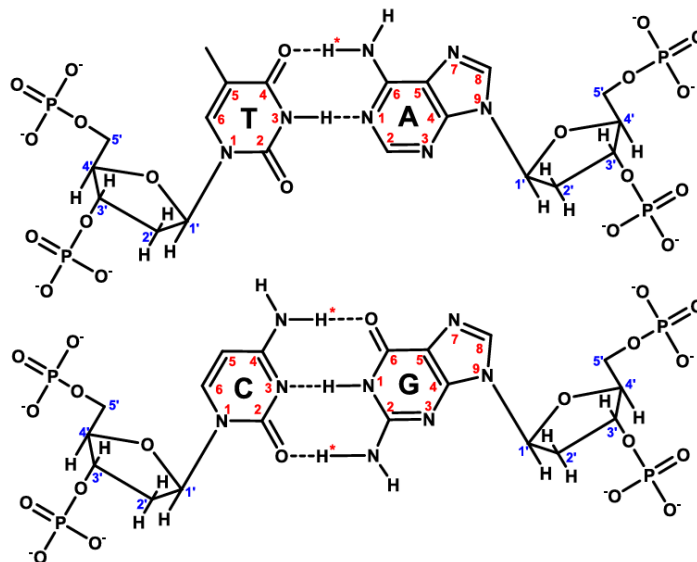
Τα μεταλλικά κέντρα Ru(II) περιβάλλονται από 6 π άτομα άνθρακα του cym, ένα σ άτομο άνθρακα και ένα άτομο αζώτου της bzq, καθώς επίσης και από ένα πυριδινικό άτομο αζώτου του εκάστοτε γεφυρωτικού υποκαταστάτη. Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα, δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία άλλες κρυσταλλικές δομές για σύμπλοκα Ru(II) με υποκαταστάτες έναν εξαμελή αρωματικό υποκαταστάτη, bzq και έναν ακόμη υποκαταστάτη ο οποίος να εντάσσεται μέσω εταιροατόμου. Τα πιο κοντινά παραδείγματα που έχουν βρεθεί είναι τα σύμπλοκα [Ru( $\eta^6$ -benzene)(bzq)Cl] [150], {Ru(cym)(bzq)[p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(CF<sub>3</sub>)]} [151] και [Ru(cym)(bzq)Cl] [152,153]. Τα μήκη δεσμών και οι γωνίες γύρω από τα μεταλλικά κέντρα Ru(II) στα σύμπλοκα (5) - (7) είναι παρόμοιες με αυτές που έχουν υπολογιστεί για τις δομές των παραπάνω μονομεταλλικών συμπλόκων.

Επιπροσθέτως, υπάρχουν μερικά σημεία στα οποία αξίζει να γίνει ειδική αναφορά, σχετικά με τις κρυσταλλοδομές των συμπλόκων (5) - (7). Και στα τρία σύμπλοκα φαίνεται ότι ισοπροπυλομάδα του cym είναι κοντά στη bzq-H<sup>+</sup>, ενώ η μεθυλομάδα είναι στραμμένη προς τον BL, συμφωνώντας με τα όσα προέκυψαν από τα φάσματα NOESY. Ακόμη, στα (5) και (6) τα επίπεδα που ορίζουν οι αρωματικοί δακτύλιοι των bzq-H<sup>+</sup> των συμπλόκων είναι παράλληλα μεταξύ τους, με τους υποκαταστάτες αυτούς καθ' αυτούς να βρίσκονται σε αντίθετες μεριές του συμπλόκου, υιοθετώντας μια τύπου anti διαμόρφωση. Αντίθετα, στο σύμπλοκο (7), αποτέλεσμα του άξονα διπλής συμμετρίας που αναφέρθηκε νωρίτερα είναι η υιοθέτηση μιας τύπου syn διαμόρφωσης κατά την οποία οι bzq-H<sup>+</sup> βρίσκονται στην ίδια πλευρά, με τη γωνία μεταξύ των επιπέδων που ορίζουν τα αρωματικά συστήματα των δύο υποκαταστατών να είναι 82.1 $^{\circ}$ . Το παραπάνω φαινόμενο κάνει την απόσταση μεταξύ των δύο μεταλλικών κέντρων του συμπλόκου (7) μικρότερη από αυτή που ίσως αναμενόταν, με αποτέλεσμα η απόσταση μεταξύ των μεταλλικών κέντρων να είναι μεγαλύτερη στο σύμπλοκο (6), από ότι στο (7), για το οποίο η απόσταση αυτή, ωστόσο, είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του συμπλόκου (5).

### 3.4. Μελέτες αλληλεπίδρασης διμερών συμπλόκων του Ru(II) με ολιγονουκλεοτίδια με NMR:

#### 3.4.1. Απόδοση των σημάτων NMR των ελεύθερων ολιγονουκλεοτιδίων:

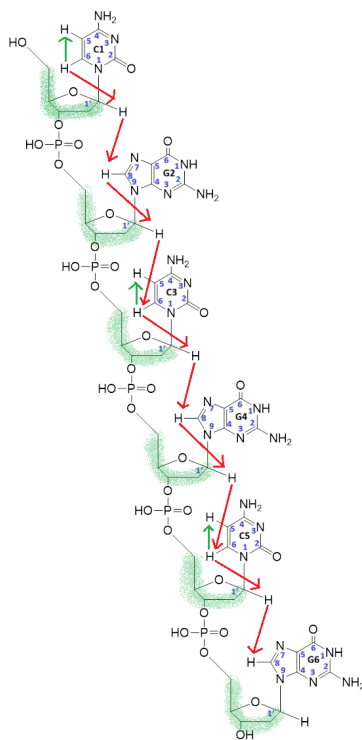
Η απόδοση των σημάτων <sup>1</sup>H NMR των ελεύθερων δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων Β τύπου d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')<sub>2</sub> και d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> έγινε ακολουθώντας τη γενική μεθοδολογία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία [139]. Η αρίθμηση των πρωτονίων στα ζεύγη βάσεων CG και AT φαίνεται στην Εικόνα 3.44



**Εικόνα 3.44:** Απεικόνιση των ζευγών βάσεων AT και CG, με σημειωμένους τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται στα ζεύγη, όπως επίσης και την αρίθμηση των πρωτονίων τους. Με H\* τα H των αμινομάδων που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ H σημειώνονται τα πρωτόνια των αμινομάδων που δεν συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου.

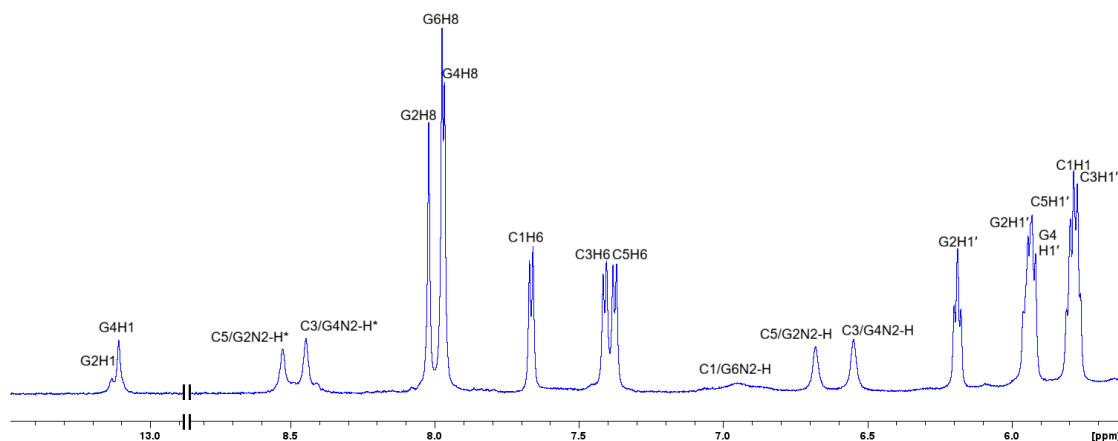
Αναφορικά με το εξαμερές ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, το πρώτο σήμα το οποίο αποδόθηκε είναι αυτό του C1H6, το οποίο αποδίδεται ως το υψηλότερο (σε ppm) σήμα από τα τρία σήματα που αποδίδονται σε πρωτόνια H6 των κυτοσινών (7.0-8.0 ppm). Η απόδοση του συγκεκριμένου σήματος στο συγκεκριμένο πρωτόνιο του ολιγονουκλεοτιδίου επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι το H6, καθώς βρίσκεται στο 5' τελικό άκρο της αλληλουχίας, αναμένεται να εμφανίζει μία μόνο crosspeak στο φάσμα NOESY με σακχαρικό πρωτόνιο H1', αυτό της C1. Στη συνέχεια, εφόσον έχει αποδοθεί το σήμα του C1H1' είναι εύκολη η απόδοση του σήματος του G2H8 χάρη στο NOE σήμα που εμφανίζεται από την αλληλεπίδραση του συγκεκριμένου πρωτονίου με το C1H1'. Το G2H8 δίνει crosspeak με το G2H1' κ.ο.κ. Ακολουθείται έτσι ένας «περίπατος» από σήματα NOE μεταξύ των πρωτονίων H8/H6 των βάσεων του DNA και των H1' των σακχάρων (Εικόνα 3.45), από τον οποίο μπορεί να γίνει η πλήρης απόδοση των σημάτων των πρωτονίων αυτών. Επιπροσθέτως, η απόδοση των σημάτων των πρωτονίων CH5 μπορεί να γίνει με ευκολία χάρη στα σήματα COSY που εμφανίζουν τα συγκεκριμένα πρωτόνια με τα CH6. Επίσης, μέσω του φάσματος COSY είναι εφικτή και η απόδοση των σημάτων των υπόλοιπων σακχαρικών πρωτονίων, καθώς κάθε σακχαρικό πρωτόνιο εμφανίζει διασταυρούμενη κορυφή με το πρωτόνιο ή τα πρωτόνια των γειτονικών σε αυτό ανθράκων.

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση



**Εικόνα 3.45:** Απεικόνιση του «περιπάτου» από crosspeaks που ακολουθείται στα φάσματα NOE (κόκκινα βέλη) και COSY (πράσινο) κατά την απόδοση των σημάτων στο  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ . Για λόγους απλούστευσης του σχήματος παρουσιάζεται ο ένας κλώνος της διπλής έλικας.

Όσον αφορά τα ανταλλάξιμα πρωτόνια των εξωκυκλικών αμινομάδων των κυτοσινών και των γουανινών (τόσο των  $H^*$  όσο και των  $H$ ), όπως επίσης και για τα  $N1H$  των γουανινών, η απόδοση των σημάτων τους γίνεται με την αξιοποίηση των διακλωνικών διασταυρούμενων κορυφών NOE που εμφανίζουν. Πιο συγκεκριμένα, τα  $CN4H$  εμφανίζουν NOE crosspeak με το  $CH5$  της ίδιας  $C$  στην οποία ανήκουν, οπότε είναι εφικτή η απόδοση του σήματός τους. Επιπλέον, εμφανίζουν (τα  $CN4H$ ) NOE σήμα και με τα  $CN4H^*$  της ίδιας κυτοσίνης, τα οποία με τη σειρά τους εμφανίζουν διασταυρούμενη κορυφή με τα  $GN1H$  της συμπληρωματικής γουανίνης. Επιπροσθέτως, για τα ανταλλάξιμα πρωτόνια των τερματικών βάσεων  $C1$  και  $G6$  δεν εντοπίζεται σήμα στο φάσμα  $^1H$  NMR του ολιγονουκλεοτιδίου σε  $H_2O/D_2O$  (9:1). Αυτό οφείλεται είτε στην μη ύπαρξη δεσμών υδρογόνου στις τερματικές βάσεις, είτε στην ταχύτατη ανταλλαγή των ανταλλάξιμων πρωτονίων των τερματικών βάσεων με τα πρωτόνια του διαλύτη σε θερμοκρασία 298 K. Στον Πίνακα 3.21 αναγράφονται οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων των σημάτων των πρωτονίων των βάσεων του  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ , καθώς επίσης και αυτές των σακχαρικών  $H1'$ . Οι τιμές των σημάτων των πρωτονίων που αποδόθηκαν με την παραπάνω διαδικασία επιβεβαιώθηκαν και με την βιβλιογραφία [49].



**Εικόνα 3.46:** Περιοχή του φάσματος του ολιγονουκλεοτιδίου  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM αποτελούμενο από μίγμα  $H_2O/D_2O$  (9:1), pH = 7 σε θερμοκρασία 298 K στα 500 MHz.

**Πίνακας 3.21:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) των σημάτων των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM αποτελούμενο από μίγμα  $H_2O/D_2O$  (9:1), pH = 7 σε θερμοκρασία 298 K στα 500 MHz.

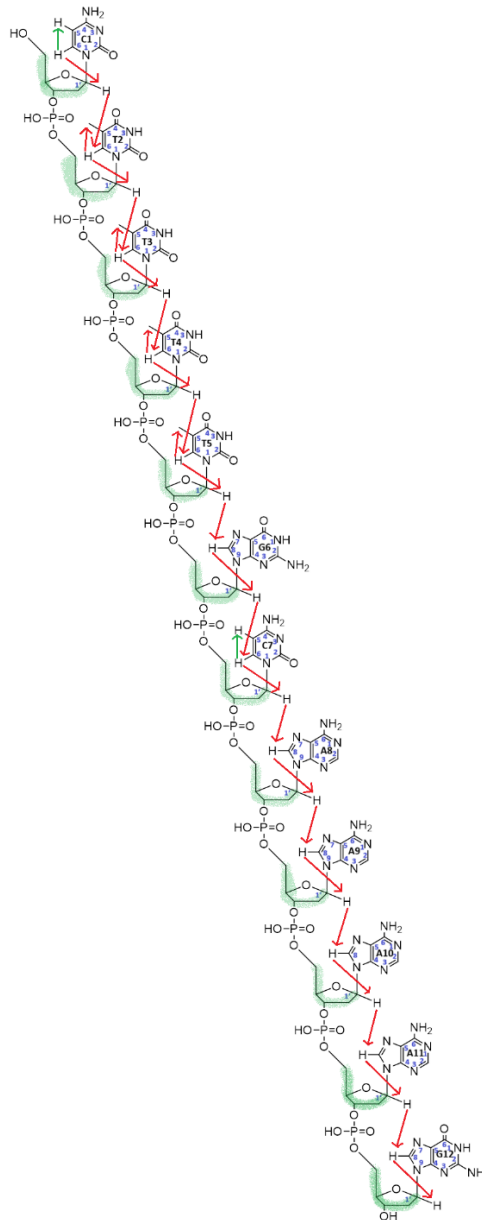
Base	H8/H6	H5	H1'	GH1 (W-C)	C/GN2-H* (W-C)	C/GN2-H (n.b.)
C1	7.70	5.98	5.81	-	-	-
G2	8.03	-	5.96	13.14	8.54	6.67
C3	7.42	5.49	5.80	-	-	-
G4	7.96	-	5.94	13.11	8.46	6.53
C5	7.38	5.52	5.83	-	-	-
G6	7.99	-	6.21	-	-	6.93

Η απόδοση των σημάτων του δεύτερου ολιγονουκλεοτιδίου, του  $d(5'-CTTTTGCAAAG-3')_2$ , έγινε ακολουθώντας τις ίδιες αρχές που περιγράφηκαν και για το εξανουκλεοτίδιο. Ειδικότερα, και σε αυτή την περίπτωση, το C1H6 αποδόθηκε ως το χαμηλότερο (σε ppm) σήμα από τα δύο σήματα πρωτονίων CH6 που αναμένονται από το συγκεκριμένο ολιγονουκλεοτίδιο, όπως επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι εμφανίζει μία μόνο crosspeak με H1', της ίδιας της C1, καθώς βρίσκεται στο άκρο της αλληλουχίας. Έπειτα, ακολουθήθηκε ο «περίπατος» βάσης-H1', όπως περιγράφηκε και προηγουμένως, με αποτέλεσμα την απόδοση των σημάτων των CH6/TH6, AH8/GH8 καθώς επίσης και των αντίστοιχων σακχαρικών πρωτονίων H1'. Ο «περίπατος» απεικονίζεται στην Εικόνα 3.47. Ακόμη τα σήματα των AH2 αποδίδονται μέσω των NOE σημάτων που εμφανίζουν με τα H1' της απέναντι T. Αντίστοιχα οι μεθυλομάδες των T εμφανίζουν crosspeaks μεγάλης έντασης με τα σακχαρικά H1' της προηγούμενης βάσης. Τα υπόλοιπα σήματα των σακχαρικών πρωτονίων αποδόθηκαν από τα crosspeaks που εμφανίζουν με τα γειτονικά τους πρωτόνια στο φάσμα COSY, χρησιμοποιώντας ως ανακτρήριο σήμα αυτό του H1' για κάθε βάση.

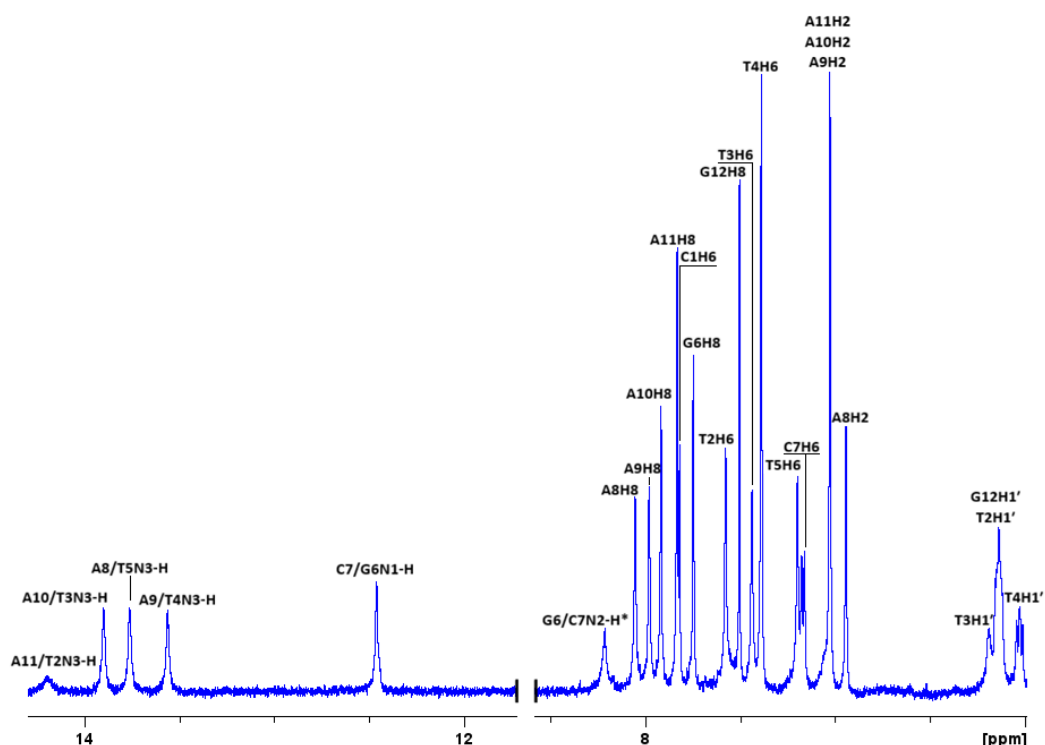
Η απόδοση των ανταλλάξιμων πρωτονίων του  $d(5'-CTTTTGCAAAG-3')_2$  γίνεται με τη βοήθεια των NOE crosspeaks που εμφανίζουν. Τα CN4H εμφανίζουν NOE crosspeak με το CH5 της ίδιας C στην οποία ανήκουν, οπότε είναι εφικτή η απόδοση του σήματός τους. Επιπλέον, εμφανίζουν NOE σήμα και με τα

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

CN4H\* της ίδιας κυτοσίνης, τα οποία με τη σειρά τους εμφανίζουν διασταυρούμενη κορυφή με τα GN1H της συμπληρωματικής γουανίνης. Τα πρωτόνια των ιμινομάδων των T αποδίδονται με τη βοήθεια των NOE crosspeaks που εμφανίζουν με τα AH2 των συμπληρωματικών του A. Επιπροσθέτως, για τα ανταλλάξιμα πρωτόνια των τερματικών βάσεων C1 και G12 δεν εντοπίζεται σήμα στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR του ολιγονουκλεοτιδίου σε H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) εξαιτίας της μη ύπαρξης δεσμών υδρογόνου στις τερματικές βάσεις. Στον Πίνακα 3.22 αναγράφονται οι τιμές της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων των βάσεων του δωδεκανουκλεοτιδίου καθώς και των σακχαρικών H1', ενώ τμήμα του φάσματος <sup>1</sup>H NMR απεικονίζεται στην Εικόνα 3.48.



**Εικόνα 3.47:** Απεικόνιση του «περιπάτου» από crosspeaks που ακολουθείται στα φάσματα NOE (κόκκινο) και COSY (πράσινο) κατά την απόδοση των σημάτων στο d(5'-CTTTTGCAAAG-3')<sub>2</sub>. Για λόγους απλούστευσης του σχήματος παρουσιάζεται ο ένας κλώνος της έλικας.



**Εικόνα 3.48:** Περιοχή του φάσματος του ολιγονουκλεοτιδίου  $d(5'-CTTTGCAAAG-3')_2$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM αποτελούμενο από μίγμα  $H_2O/D_2O$  (9:1), pH = 7 σε θερμοκρασία 298 K στα 500 MHz.

**Πίνακας 3.22:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) των σημάτων των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου  $d(5'-CTTTGCAAAG-3')_2$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM αποτελούμενο από μίγμα  $H_2O/D_2O$  (9:1), pH = 7 σε θερμοκρασία 298 K στα 500 MHz.

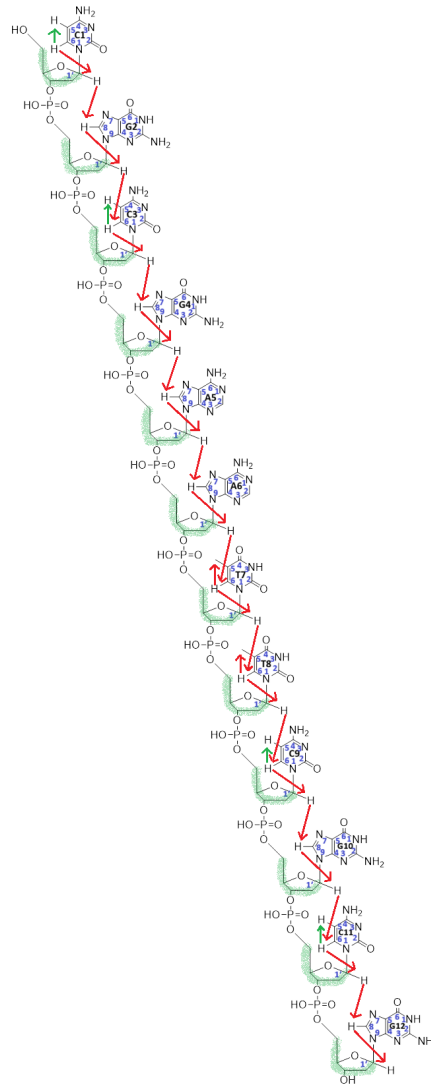
	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H
<b>C1</b>	7.83	5.89	5.82	-	-	-
<b>T2</b>	7.58	1.62	6.15	14.20	-	-
<b>T3</b>	7.45	1.59	6.16	13.91	-	-
<b>T4</b>	7.40	1.58	6.03	13.77	-	-
<b>T5</b>	7.20	1.59	5.72	13.57	-	-
<b>G6</b>	7.75	-	5.68	12.47	8.22	6.20
<b>C7</b>	7.18	5.29	5.30	12.47	-	-
<b>A8</b>	8.06	7.03	5.60	13.57	-	-
<b>A9</b>	7.99	6.96	5.62	13.77	-	-
<b>A10</b>	7.92	7.03	5.70	13.91	-	-
<b>A11</b>	7.84	7.03	5.87	14.20	-	-
<b>G12</b>	7.51	-	6.14	-	-	-

Η απόδοση των σημάτων  $^1H$  NMR του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  έγινε ακολουθώντας τη γενική μεθοδολογία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία [139]. Η αρίθμηση των πρωτονίων στα ζεύγη βάσεων CG και AT φαίνεται στην Εικόνα 3.44.

Είναι γνωστό ότι οι κορυφές των H6 και H5 των κυτοσινών είναι διπλές και εντοπίζονται στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1H$  NMR και στην περιοχή των σημάτων των σακχαρικών πρωτονίων H1', αντίστοιχα. Συνεπώς, η απόδοση των σημάτων του δωδεκανουκλεοτιδίου ξεκινάει από το σήμα των C1H6, το οποίο αποδίδεται ως το σήμα μεταξύ των C(n)H6 το οποίο βρίσκεται σε χαμηλότερες τιμές ppm. Το συγκεκριμένο πρωτόνιο, καθώς βρίσκεται στο 5' τελικό άκρο της αλληλουχίας, στο φάσμα δύο NOESY

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

εμφανίζει μόνο μία διασταυρούμενη κορυφή με σακχαρικό πρωτόνιο H1', συγκεκριμένα το C1H1'. Το τελευταίο, με τη σειρά του, εκτός από το C1H6, εμφανίζει crosspeak και με το G2H8. Με τον τρόπο αυτό αποδίδεται το σήμα του G2H8 και μπορεί να ακολουθηθεί αυτός ο «περίπατος» μέχρι να έχουν αποδοθεί όλα τα σήματα των H6, H8 και H1' της αλληλουχίας (Εικόνα 3.49). Επιπλέον, μέσω του φάσματος COSY, αποδίδονται τα σήματα των πρωτονίων H5 του ολιγονουκλεοτιδίου, καθώς εμφανίζουν διασταυρούμενες κορυφές με τα H6. Τα υπόλοιπα σακχαρικά πρωτόνια, πέραν των H1', αποδόθηκαν μέσω των φασμάτων COSY. Τα σήματα των AH2 εμφανίζουν crosspeaks με τα H1' των συμπληρωματικών τους T, μέσω των οποίων γίνεται η απόδοσή τους. Τα σήματα των μεθυλομάδων των T αποδίδονται με τη βοήθεια των NOE crosspeaks που εμφανίζουν με τα σακχαρικά H1' της προηγούμενης τους βάσης.

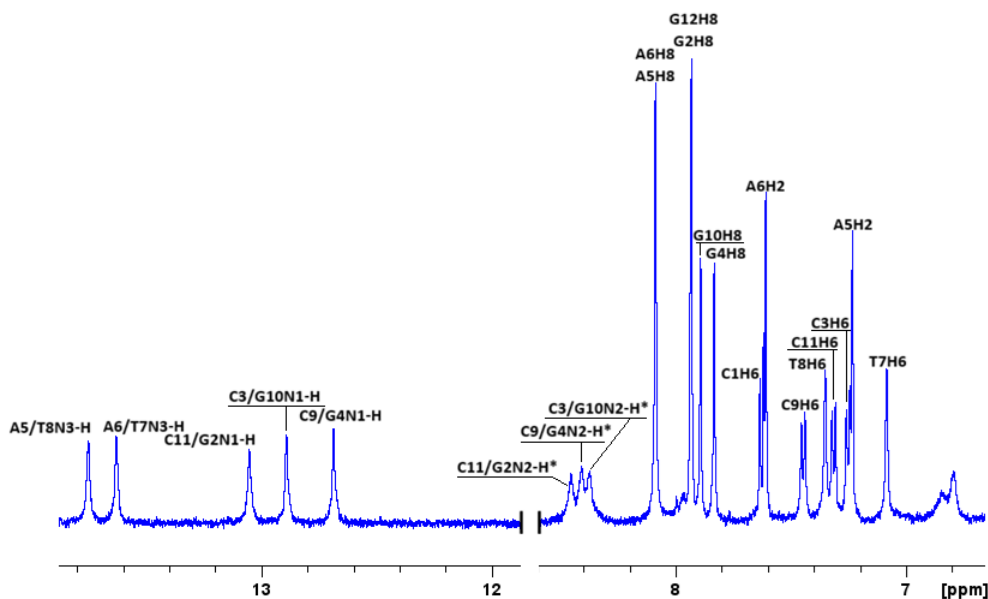


**Εικόνα 3.49:** Απεικόνιση του «περίπατου» από crosspeaks που ακολουθείται στα φάσματα NOE (κόκκινο) και COSY (πράσινο) κατά την απόδοση των σημάτων στο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Για λόγους απλούστευσης του σχήματος παρουσιάζεται ο ένας κλώνος της έλικας.

Η απόδοση των ανταλλάξιμων πρωτονίων του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> γίνεται με τη βοήθεια των NOE crosspeaks που εμφανίζουν. Τα CN4H και CH5 μιας δεδομένης C εμφανίζουν crosspeak μεταξύ τους η οποία βοηθά στην απόδοσή τους. Επιπλέον, εμφανίζουν NOE σήμα και με τα CN4H\* της ίδιας κυτοσίνης, τα οποία με τη σειρά τους εμφανίζουν διασταυρούμενη κορυφή με τα GN1H της συμπληρωματικής γουανίνης. Τα πρωτόνια των ιμινομάδων των T αποδίδονται με τη βοήθεια των NOE crosspeaks που

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

εμφανίζουν με τα AH2 των συμπληρωματικών τους Α. Επιπροσθέτως, για τα ανταλλάξιμα πρωτόνια των τερματικών βάσεων C1 και G12 δεν εντοπίζεται σήμα στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR του ολιγονουκλεοτιδίου σε H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) εξαιτίας είτε της μη ύπαρξης δεσμών υδρογόνου στις τερματικές βάσεις, είτε στην ταχύτατη ανταλλαγή των ανταλλάξιμων πρωτονίων των τερματικών βάσεων με τα πρωτόνια του διαλύτη σε θερμοκρασία 298 Κ. Στον Πίνακα 3.23 αναγράφονται οι τιμές της χημικής μετατόπισης των πρωτονίων των βάσεων του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> καθώς και των σακχαρικών H1', ενώ τμήμα του φάσματος <sup>1</sup>H NMR απεικονίζεται στην Εικόνα 3.50.



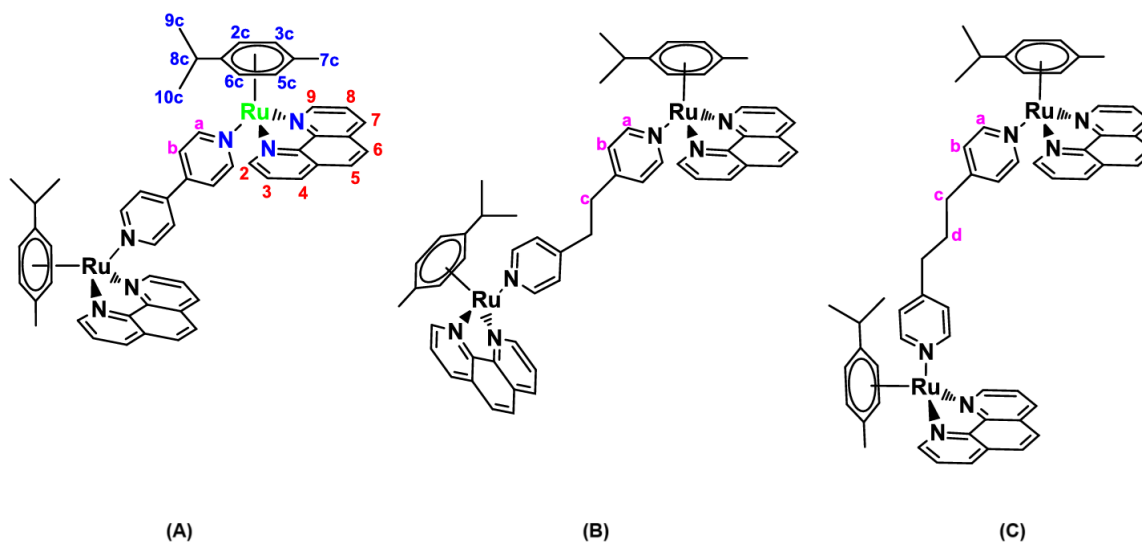
**Εικόνα 3.50:** Περιοχή του φάσματος του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM αποτελούμενο από μίγμα H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1), pH = 7 σε θερμοκρασία 298 Κ στα 500 MHz.

**Πίνακας 3.23:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) των σημάτων των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM αποτελούμενο από μίγμα H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1), pH = 7 σε θερμοκρασία 298 Κ στα 500 MHz

	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H
<b>C1</b>	7.60	5.88	5.72	-	n.o.	n.o.
<b>G2</b>	7.93	-	5.88	13.04	8.44	6.57
<b>C3</b>	7.25	5.35	5.56	12.88	8.36	6.41
<b>G4</b>	7.83	-	5.42	12.68	8.40	6.79
<b>A5</b>	8.09	7.23	5.97	13.75	-	-
<b>A6</b>	8.09	7.60	6.13	13.62	-	-
<b>T7</b>	7.09	1.25	5.88	13.62	-	-
<b>T8</b>	7.35	1.51	6.08	13.75	-	-
<b>C9</b>	7.44	5.60	5.64	12.68	8.40	6.79
<b>G10</b>	7.89	-	5.83	12.88	8.36	6.41
<b>C11</b>	7.31	5.42	5.72	13.04	8.44	6.57
<b>G12</b>	7.92	-	6.13	-	n.o.	n.o.

**3.4.2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων (A) - (C) με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-CGCGCG-3')$ <sub>2</sub> με φασματοσκοπία NMR:**

Στο πρώτο στάδιο των μελετών της αλληλεπίδρασης των διπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II) με ολιγονουκλεοτίδια, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των συμπλόκων (A) - (C) (Εικόνα 3.51) με τα ολιγονουκλεοτίδια  $d(5'-CGCGCG-3')$ <sub>2</sub> και  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')$ <sub>2</sub>.



**Εικόνα 3.51:** Κυτταροτοξικά τετραφορτιακά διπυρηνικά σύμπλοκα του Ru(II). Παραλείπονται τα αντισταθμιστικά ιόντα και τα φορτία για λόγους ευκρίνειας σχήματος [129].

Σχετικά με τα σύμπλοκα (A) - (C), βρέθηκε ότι ο γεφυρωτικός υποκαταστάτης που ενώνει τα δύο μεταλλικά κέντρα του ρουθηνίου παίζει ρόλο κομβικής σημασίας, καθώς καθορίζει τόσο τη μεταξύ τους απόσταση, μέσω του μήκους του, όσο και την σχετική διεύθυνση των δύο μεταλλικών κέντρων και των υποκαταστατών που αυτοί φέρουν, μέσω της γεωμετρίας που υιοθετεί [129]. Τα τρία διμερή σύμπλοκα αυτά έχουν μελετηθεί ως προς την αλληλεπίδρασή τους με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')$ <sub>2</sub> μέσω φασματοσκοπίας NMR, πειραμάτων ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού σε διαλύματα EB και μέσω μοριακής προσομοίωσης πρόσδεσης (molecular docking simulations). Τα πειράματα αυτά είχαν δείξει ότι το σύμπλοκο (A) με τον μικρότερο σε μήκος και τον δύσκαμπτο γεφυρωτικό υποκαταστάτη έχει τη μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης  $K_b$ . Μάλιστα η μία από τις δύο υπομονάδες rhen του συμπλόκου παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του ολιγονουκλεοτιδίου μεταξύ των A5 και A6, ενώ η δεύτερη rhen αλληλεπιδρά με το DNA μέσω δέσμευσης στην μικρή του αύλακα. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')$ <sub>2</sub> προκαλεί ξετύλιγμα και σχάση των δεσμών υδρογόνου στο κεντρικό σημείο της έλικας (5'-AATT-3'). Αντίστοιχα, τα σύμπλοκα (B) και (C) δεσμεύονται στη μικρή αύλακα του DNA, με την  $K_b$  μικρότερη από την  $K_b$  του (A) κατά μία τάξη μεγέθους. Μολοταύτα, και τα τρία διπυρηνικά σύμπλοκα έχουν μεγαλύτερη  $K_b$  σε σχέση με το αντίστοιχο μονοπυρηνικό σύμπλοκο, όπου αντί των BL1 - BL3 στο μεταλλικό κέντρο Ru(II) εντάσσεται τερματικά υποκαταστάτης πυριδίνης [129].

Με σκοπό την περαιτέρω κατανόηση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης των συμπλόκων αυτών με το DNA, εξετάστηκε η εκλεκτικότητα ως προς το είδος των βάσεων με αλληλοσυμπληρωματικά

ολιγονουκλεοτίδια  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  και  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ , τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους καθώς το πρώτο είναι πλούσιο σε ζεύγη C:G, ενώ το δεύτερο σε A:T.

### 3.4.2.1. Αλληλεπίδραση του (A) με το $d(5'-CGCGCG-3')_2$ :

Κατόπιν της τιτλοδότησης του  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  με το σύμπλοκο (A) στα φάσματα  $^1H$  NMR που καταγράφηκαν παρατηρήθηκαν διπλά σήματα για τα περισσότερα πρωτόνια του (A) εξαιτίας της μείωσης της συμμετρίας του συμπλόκου. Ως εκ τούτου, οι rhen του (A) θα καλούνται πλέον rhenA και rhenB. Σε  $r = 0.5$  παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στη χημική μετατόπιση των σημάτων των πρωτονίων H4H7 και H5H6 της rhenA, κατά  $-0.41$  και  $-0.81$  ppm αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, για τα πρωτόνια της rhenB, παρατηρήθηκε επίσης σημαντική upfield μετατόπισή τους από  $-0.17$  έως  $-0.95$  ppm (Πίνακας 3.24), καθώς επίσης και σημαντική διεύρυνση των κορυφών τους. Τα περισσότερα πρωτόνια των υπόλοιπων υποκαταστατών του (A) έδωσαν upfield μετατοπισμένα σήματα. Ακόμη, παρατηρήθηκε άρση της συμμετρίας και για τα πρωτόνια των cym, τα οποία εμφάνισαν διπλά σήματα (όπως οι rhen). Ωστόσο, οι μετατοπίσεις των σημάτων των πρωτονίων αυτών είναι σημαντικά μικρότερες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες των πρωτονίων των rhenA και rhenB. Μπορεί, λοιπόν, να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι υποκαταστάτες cym του συμπλόκου δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με το  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  και οι μετατοπίσεις των πρωτονίων τους οφείλονται σε δομικές αλλαγές του συμπλόκου, ενώ η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο από τις rhen. Τέλος, είναι λογικό να υποτεθεί ότι η άρση της συμμετρίας του συμπλόκου επηρεάζει παρόμοια με το cym και τη rhen και τον BL1. Ωστόσο, για τον BL1 δεν εντοπίστηκαν διπλά σήματα, πιθανώς λόγω της μικρής διαφοροποίησης, η οποία είναι εκτός των ορίων της διακριτικής ικανότητας του οργάνου.

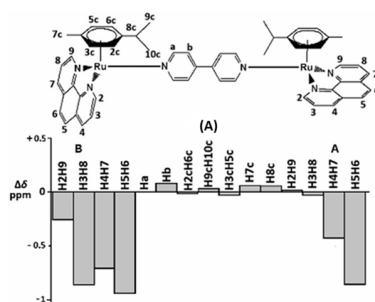
**Πίνακας 3.24:** Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των σημάτων του συμπλόκου (A) ( $H_2O/D_2O$  9:1, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0) στην ελεύθερη κατάσταση, καθώς και σε αναλογίες ανάμιξης  $r = 0.5, 1$  και  $2$  με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ . Οι τιμές στην παρένθεση εκφράζουν τη διαφορά με τις τιμές για το ελεύθερο σύμπλοκο (A) (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed. Με A και B διαχωρίζονται οι δύο διαφορετικές οντότητες φαινανθρολίνης ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο.

	(A)	r = 0.5		r = 1		r = 2	
		A	B	A	B	A	B
H2H9	10.02	10.02 (0.00)	9.85 (-0.17)	10.04 (+0.02)	9.85 (-0.17)	10.05 (+0.03)	9.92 (-0.10)
H3H8	8.20	8.16 (-0.04)	7.35 (-0.85)	8.17 (-0.03)	7.52 (-0.68)	8.19 (-0.01)	7.80 (-0.40)
H4H7	8.80	8.39 (-0.41)	n.o.	8.50 (-0.30)	n.o.	8.62 (-0.18)	n.o.
H5H6	8.07	7.26 (-0.81)	7.12 (-0.95)	7.20 (-0.87)	7.12 (-0.95)	7.19 (-0.88)	n.o.
Ha	8.46	8.46 (0.00)		8.47 (+0.01)		8.47 (+0.01)	
Hb	7.39	7.48 (+0.09)		7.47 (+0.08)		7.45 (+0.06)	
H2cH6c	6.50	6.52 (+0.02)	6.49 (-0.01)	6.52 (+0.02)	6.50 (0.00)	6.52 (+0.02)	
H3cH5c	6.14	6.18 (+0.04)	6.16 (+0.02)	6.21 (+0.07)	6.20 (+0.06)	6.20 (+0.06)	
H9cH10c	0.72	0.79 (+0.07)	0.69 (-0.03)	0.78 (+0.06)	0.70 (-0.02)	0.77 (+0.05)	0.72 (0.00)
H7c	1.78	1.85 (+0.07)		1.86 (+0.08)		1.83 (+0.05)	
H8c	2.36	2.42 (+0.06)		2.39 (+0.03)		2.38 (+0.02)	

Από τις μεταβολές των χημικών μετατοπίσεων των rhenA και rhenB είναι διακριτή η διαφορά στο χημικό περιβάλλον μεταξύ των δύο φαινανθρολινών του (A). Οι μεγαλύτερες upfield μετατοπίσεις στα

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

σήματα των πρωτονίων της *rhenB*, δείχνουν ότι το περιβάλλον της *rhenB* είναι πλουσιότερο ηλεκτρονιακά, σε ολόκληρη την έκτασή της. Αντίστοιχα, για την *rhenA*, φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά μόνο το μπροστινό της μέρος (H4H7, H5H6) με παρόμοιο τρόπο. Ειδική αναφορά αξίζει να γίνει στο γεγονός ότι με την αύξηση του  $r$  μειώνεται η διαφορά στην τιμή των χημικών μετατοπίσεων των σημάτων των πρωτονίων των *rhenA* και *rhenB*. Με άλλα λόγια, φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η ποσότητα του συμπλόκου στο μίγμα, οι τιμές των σημάτων των πρωτονίων των *rhen* μετατοπίζονται προς τις τιμές που έχουν για το ελεύθερο σύμπλοκο (A), ένδειξη του ότι ήδη από χαμηλά  $r$  έχει επιτευχθεί κορεσμός του  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  σε μεγάλο ποσοστό. Οι μετατοπίσεις των σημάτων των πρωτονίων των υποκαταστατών του συμπλόκου (A) σε  $r = 0.5$  απεικονίζονται σχηματικά στην Εικόνα 3.52.



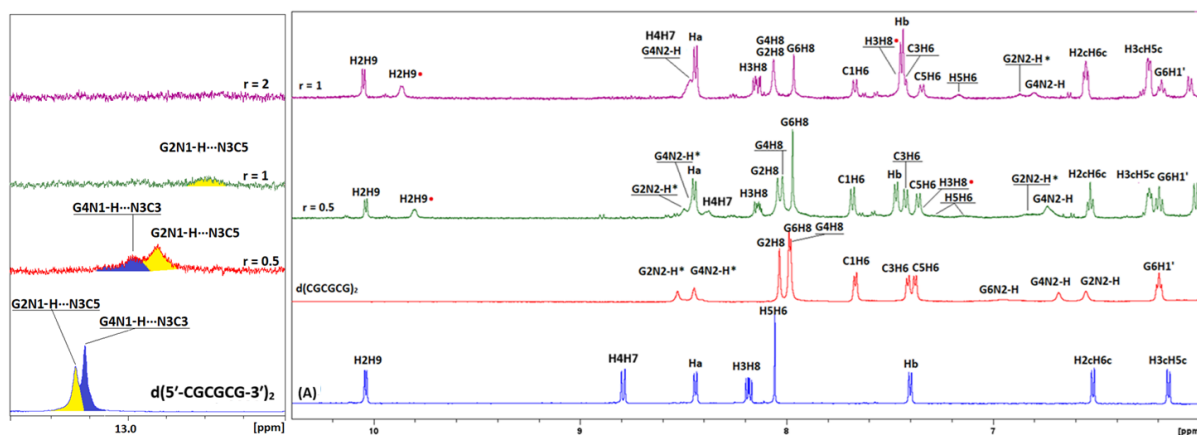
**Εικόνα 3.52:** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα σήματα των πρωτονίων των υποκαταστατών του συμπλόκου (A) κατόπιν της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  σε αναλογία ανάμιξης  $r = 0.5$ .

Φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο (A) είχε ως αποτέλεσμα την downfield μετατόπισή των σημάτων των πρωτονίων του  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ . Από την μικρότερη αναλογία,  $r = 0.5$ , παρατηρούνται downfield μετατοπίσεις για τα G2H8 (+0.04 ppm), C3H6 (+0.03 ppm), C3H5 (+0.10 ppm) και G4H8 (+0.07 ppm). Μάλιστα, οι μετατοπίσεις αυτές αυξάνονται με την αύξηση του  $r$ , φτάνοντας τις μέγιστες τιμές τους σε  $r = 2$ , όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.25. Οι παραπάνω παρατηρήσεις, υποδεικνύουν τη μείωση των αρωματικών αλληλεπιδράσεων (stacking interactions) κυρίως μεταξύ των C3 και G4. Επιπλέον, σε  $r = 0.5$ , για τα ίμινο πρωτόνια G2N1H και G4N1H παρατηρήθηκε και έντονη διεύρυνση των κορυφών, με ταυτόχρονη upfield μετατόπισή τους (-0.15 και -0.19 ppm αντίστοιχα). Οι παραπάνω μεταβολές οφείλονται, κατά πάσα πιθανότητα, στη επιμήκυνση (elongation) των δεσμών υδρογόνου στα συμπληρωματικά ζεύγη G2:C5 και G4:C3, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του ολιγονουκλεοτιδίου με το σύμπλοκο (A). Μάλιστα, με την αύξηση του  $r$ , η κορυφή του G4N1H εξαφανίζεται πλήρως (interruption), ενώ η κορυφή του G2N1H συνεχίζει να διευρύνεται, με αποτέλεσμα σε  $r = 2$  να μην είναι καμία από τις δύο ορατές.

**Πίνακας 3.25:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0) στις τρεις αναλογίες ανάμιξης με το σύμπλοκο (A). Σε παρένθεση φαίνονται οι μετατοπίσεις σε σύγκριση με τις τιμές του ολιγονουκλεοτιδίου χωρίς την παρουσία συμπλόκου, σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

	r = 0.5									r = 1									r = 2		
	H8/6	H5	H1'	GN1H	C/GN2H*(n.b.)	C/GN2H	H8/6	H5	H1'	GN1H	C/GN2H*(n.b.)	C/GN2H	H8/6	H5	H1'	GN1H	C/GN2H*(n.b.)	C/GN2H			
<b>C1</b>	7.71 +0.01	6.01 +0.02	5.87 +0.06	-	-	-	7.71 +0.01	6.03 +0.05	5.88 +0.07	-	-	-	7.71 +0.01	6.04 +0.06	5.95 +0.14	-	-	-			
<b>G2</b>	8.07 +0.04	-	5.92 -0.04	12.99 -0.15	8.52 -0.02	6.84 +0.17	8.10 +0.07	-	5.91 -0.05	n.o.	8.50 -0.04	6.87 +0.20	8.12 +0.09	-	5.87 -0.09	n.o.	8.50 -0.04	6.88 +0.21			
<b>C3</b>	7.45 +0.03	5.59 +0.10	5.82 +0.02	-	-	-	7.46 +0.04	5.66 +0.17	5.84 +0.04	-	-	-	7.49 +0.07	5.72 +0.23	5.77 -0.03	-	-	-			
<b>G4</b>	8.03 +0.07	-	5.89 -0.05	12.92 -0.19	8.47 +0.01	6.73 +0.20	8.07 +0.11	-	5.91 -0.03	12.78 -0.33	8.50 +0.04	6.80 +0.27	8.15 +0.19	-	5.84 -0.10	n.o.	8.52 +0.06	6.96 +0.43			
<b>C5</b>	7.36 -0.02	5.52 0.00	5.72 -0.11	-	-	-	7.35 -0.03	5.52 0.00	5.65 -0.18	-	-	-	7.38 0.00	5.52 0.00	5.56 -0.27	-	-	-			
<b>G6</b>	7.99 0.00	-	6.19 -0.02	n.o.	n.o.	n.o.	7.99 0.00	-	6.16 -0.05	n.o.	n.o.	n.o.	7.99 0.00	-	6.15 -0.06	n.o.	n.o.	n.o.			

Σχετικά με τις κορυφές των άμινο-πρωτονίων του d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> τα οποία συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου (H\*), παρατηρούνται μικρότερες μεταβολές στα σήματά τους στο φάσμα NMR, υποδεικνύοντας πιθανώς μικρότερη επιμήκυνση του δεσμού υδρογόνου. Τα σήματα των n.b. άμινο-πρωτονίων παρουσιάζουν σημαντικές downfield μετατοπίσεις, οι οποίες σε r = 2 φτάνουν μέχρι και τα +0.21 και +0.43 ppm, αντίστοιχα. Με βάση τα παραπάνω, ενώ είναι πιθανή η ολική σχάση (interruption) του δεσμού υδρογόνου που σχηματίζουν τα ίμινο πρωτόνια G2N1H και G4N1H με τα N3 των απέναντι C, ενώ η δομή του ολιγονουκλεοτιδίου παραμένει Β τύπου, όπως φαίνεται από την επιμήκυνση αλλά όχι ολική ρήξη των δεσμών των C5/G2N2H και C3/G4N2H. Καθώς τα πρωτόνια στα οποία παρατηρούνται οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις βρίσκονται στην μεγάλη αύλακα του DNA, φαίνεται το (A) να αλληλεπιδρά με το d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> από την μεγάλη αύλακα με την rhenB να παρεμβάλλεται μεταξύ των C3 και G4. Έτσι, η rhenA δεν παρεμβάλλεται ταυτόχρονα στο d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, καθώς ο BL1 είναι άκαμπος, με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η περαιτέρω προσέγγιση του δεύτερου μεταλλικού κέντρου στην διπλή έλικα. Για τον λόγο αυτό η αλληλεπίδραση της rhenA με το d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> μπορεί να γίνει μόνο μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων των H4H7 και H5H6, τα οποία βρίσκονται στο άκρο της δομής της rhen το οποίο βρίσκεται πλησιέστερα στο DNA. Εναλλακτικά, είναι πιθανή η αλληλεπίδραση του (A) με το d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> με παραπάνω από έναν τρόπους. Ο πρώτος τρόπος αλληλεπίδρασης είναι αυτός που περιγράφηκε παραπάνω, ενώ ένα δεύτερο σύμπλοκο δεσμεύεται στην μικρή αύλακα του DNA με τη μία rhen κοντά στις G2C3. Τέλος, ενώ με την αύξηση του r τα σήματα του (A) μετατοπίζονται προς τις τιμές του ελεύθερου συμπλόκου, για το d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> παρατηρείται το αντίθετο: οι μετατοπίσεις των πρωτονίων του DNA συνεχίζουν να αυξάνονται με την αύξηση του r. Όπως είναι γνωστό, το DNA, παρουσία πολυσθενών κατιόντων υιοθετεί διαφορετικές διαμορφώσεις σε σύγκριση με μονοσθενή κατιόντα, όπως για παράδειγμα το Na<sup>+</sup>. Ειδικότερα, η παρουσία πολυφορτιακών κατιόντων ως αντισταθμιστικά μπορεί να προκαλέσει χωρική συμπύκνωση (condensation) του DNA [154].. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα του [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup>, το οποίο σταθεροποιεί το Z-DNA αποτελεσματικότερα από δισθενή και μονοσθενή κατιόντα εξαιτίας του υψηλού θετικού του φορτίου [155]. Κατά παρόμοιο τρόπο το +4 φορτισμένο (A) μπορεί να προκαλεί σε κάποιο βαθμό χωρική συμπύκνωση του d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> με αποτέλεσμα τις παρατηρούμενες μετατοπίσεις στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR.



**Εικόνα 3.53:** Μέρος του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του μίγματος (A) -  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$  σε  $r = 0.5$  και  $r = 1$ , καθώς επίσης και του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου και ελεύθερου συμπλόκου σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων ( $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM,  $\text{pH} = 7.0$ ). Στην εικόνα σημειώνεται και η απόδοση των παρατηρούμενων σημάτων. Τα πρωτόνια που σημειώνονται με αστερίσκο είναι εκείνα που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ αυτά που σημειώνονται με κόκκινη κουκίδα αφορούν πρωτόνια της *phenB*.

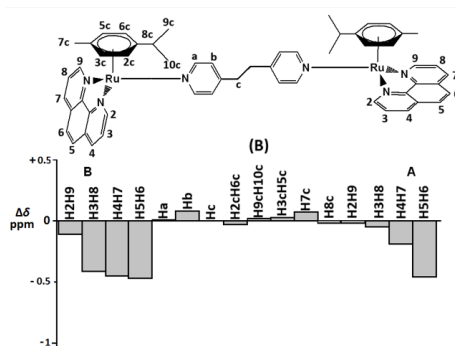
### 3.4.2.2. Αλληλεπίδραση του (B) με το $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ :

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του συμπλόκου (B) με το ίδιο  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ . Παρόμοια με το (A), και στην περίπτωση του (B) η αλληλεπίδραση με το  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$  είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διπλών σημάτων στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR για τα περισσότερα από τα πρωτόνια των υποκαταστατών του συμπλόκου εξαιτίας της άρσης της συμμετρίας του. Τα πρωτόνια και των δύο *phen* είναι upfield μετατοπισμένα ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με το  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ , με αυτά της *phenB* να παρουσιάζουν τις πιο μεγάλες μεταβολές. Τόσο για την *phenB* όσο και για την *phenA* οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις παρατηρούνται στα πρωτόνια που βρίσκονται εξωτερικά της δομής, δηλαδή στα H4H7 και H5H6. Πιο συγκεκριμένα τα H5H6 και των δύο *phen* είναι μετατοπισμένα κατά περίπου ίδια  $\Delta\delta$ ,  $-0.43$  ppm για την *phenA* και  $-0.44$  ppm για τη *phenB*. Ωστόσο, για τα H4H7 παρατηρείται αξιοσημείωτη διαφοροποίηση, καθώς στην περίπτωση της *phenA* είναι μετατοπισμένα κατά  $-0.22$  ppm, ενώ στην περίπτωση της *phenB* η παρατηρούμενη μετατόπιση είναι σχεδόν η διπλάσια ( $-0.42$  ppm) (Πίνακας 3.26). Όσον αφορά τα υπόλοιπα πρωτόνια του υποκαταστάτη, για την *phenA*, τα H2H9 ήταν μετατοπισμένα κατά  $-0.03$  ppm και τα H3H8 κατά  $-0.07$  ppm. Για τα ίδια πρωτόνια, στην περίπτωση της *phenB* οι μετατοπίσεις ήταν  $-0.12$  και  $-0.38$  ppm, αντίστοιχα. Οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις των πρωτονίων της *phenB* είναι αποτέλεσμα του πλουσιότερου ηλεκτρονιακού περιβάλλοντος γύρω από αυτή εξαιτίας της ισχυρότερης αλληλεπίδρασής της με το  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ . Πέραν αυτών, σε  $r = 0.5$ , παρατηρούνται και άλλες αξιοσημείωτες μετατοπίσεις όπως το Hb του BL2, το οποίο βρέθηκε μετατοπισμένο κατά  $+0.11$  ppm, όμοια με την περίπτωση του (A), όπου το Hb ήταν μετατοπισμένο κατά  $+0.09$  ppm. Παρομοίως, και τα υπόλοιπα πρωτόνια του BL2 εμφάνισαν downfield μετατοπισμένα σήματα, αν και σε μικρότερο βαθμό. Επίσης, σημαντική downfield μετατόπιση παρατηρήθηκε και για τα πρωτόνια της μεθυλομάδας του κουμενίου, χωρίς να εμφανίζουν διπλό σήμα. Όλα αυτά αποτελούν ενδείξεις σημαντικών διαφοροποιήσεων στη δομή του συμπλόκου (B) κατόπιν της αλληλεπίδρασής του με το DNA. Ωστόσο, οι σημαντικά χαμηλότερες παρατηρούμενες μετατοπίσεις των σημάτων των πρωτονίων των υπόλοιπων υποκαταστατών σε σύγκριση με αυτά των *phen*, αποδεικνύουν ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$  λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο από τις *phen*. Η ομοιότητα στη συμπεριφορά του συμπλόκου (B) με αυτή του (A), σημαίνει πιθανώς την ύπαρξη παρόμοιων δομικών αλλαγών στα δύο σύμπλοκα.

**Πίνακας 3.26:** Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των σημάτων του συμπλόκου (B) (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0) στην ελεύθερη κατάσταση, καθώς και σε αναλογίες ανάμιξης  $r = 0.5, 1$  και  $2$  με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>. Οι τιμές στην παρένθεση εκφράζουν τη διαφορά με τις τιμές για το ελεύθερο σύμπλοκο (B) (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed. Με A και B διαχωρίζονται οι δύο διαφορετικές οντότητες φαινανθρολίνης ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο.

	(B)	r = 0.5		r = 1		r = 2	
		A	B	A	B	A	B
H2H9	10.04	10.01 (-0.03)	9.92 (-0.12)	10.01 (-0.03)	9.94 (-0.10)	10.01 (-0.03)	9.97 (-0.07)
H3H8	8.24	8.17 (-0.07)	7.86 (-0.38)	8.19 (-0.05)	7.92 (-0.32)	8.19 (-0.05)	8.07 (-0.17)
H4H7	8.87	8.65 (-0.22)	8.45 (-0.42)	8.70 (-0.17)	8.53 (-0.34)	8.76 (-0.11)	8.67 (-0.20)
H5H6	8.15	7.72 (-0.43)	7.71 (-0.44)	7.80 (-0.35)	7.75 (-0.40)	7.94 (-0.21)	7.96 (-0.19)
Ha	8.20	8.23 (+0.03)		8.23 (+0.03)		8.18 (-0.02)	
Hb	7.06	7.17 (+0.11)		7.15 (+0.09)		7.10 (+0.04)	
Hc	2.74	2.75 (+0.01)		2.75 (+0.01)		2.75 (+0.01)	
H2cH6c	6.52	6.49 (-0.03)	6.46 (-0.06)	6.49 (-0.03)	6.47 (-0.05)	6.49 (-0.03)	6.47 (-0.05)
H3cH5c	6.09	6.14 (+0.05)	6.13 (+0.04)	6.13 (+0.04)	6.11 (+0.02)	6.09 (0.00)	6.08 (-0.01)
H9cH10c	0.72	0.73 (+0.01)	0.69 (-0.03)	0.73 (+0.01)	0.69 (-0.03)	0.71 (-0.01)	0.69 (-0.03)
H7c	1.59	1.69 (+0.10)		1.67 (+0.08)		1.67 (+0.08)	
H8c	2.37	2.34 (-0.03)		2.34 (-0.03)		2.36 (-0.01)	

Περνώντας στη συνέχεια στα αρωματικά πρωτόνια του d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> παρατηρείται ότι στην πλειονότητά τους είναι downfield μετατοπισμένα (Πίνακας 3.27). Οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις των σημάτων σε σχέση με το ελεύθερο d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> παρατηρούνται, όπως και στην περίπτωση του (A), στις βάσεις C3 και G4. Ειδικότερα, το C3H5 είναι μετατοπισμένο κατά +0.09 ppm, ενώ το G4H8 κατά +0.06 ppm. Τα ίμμο πρωτόνια που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου G4N1H και G2N1H απέδωσαν διευρυμένες κορυφές, οι οποίες ήταν upfield μετατοπισμένες κατά -0.15 και -0.05 ppm, αντίστοιχα. Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να θεωρηθεί ότι οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των C5/G2N1H και C3/G4N1H έχουν επιμηκυνθεί (elongation). Τα σήματα των πρωτονίων αυτών παραμένουν διακριτά και σε  $r = 2$ , οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι δεν συμβαίνει πλήρης ρήξη (interruption) των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν τους δύο κλώνους του DNA. Μολοταύτα, όσο αυξάνεται το  $r$  τόσο αυξάνονται και οι upfield μετατοπίσεις των συγκεκριμένων πρωτονίων, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή τους σε  $r = 2$ , -0.12 ppm για το G2N1H και -0.31 ppm για το G4N1H. Η συμπεριφορά αυτή είναι όμοια με αυτή που παρατηρήθηκε για το (A), ωστόσο τα φαινόμενα αυτά είναι πιο ισχυρά στην περίπτωση του (A).

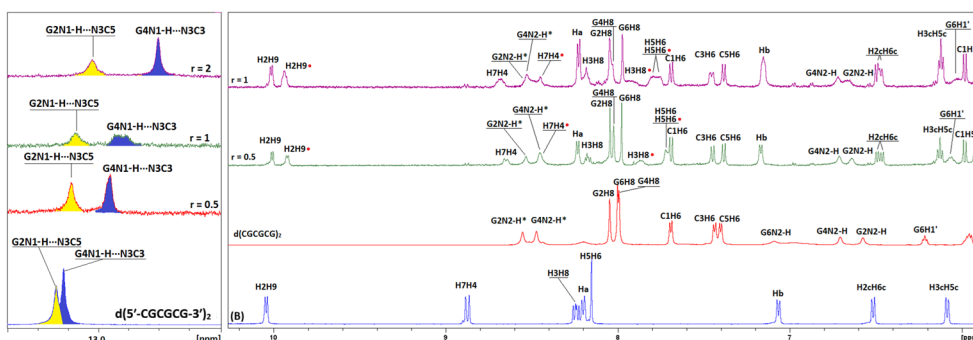


**Εικόνα 3.54:** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα σήματα των πρωτονίων των υποκαταστατών του συμπλόκου (B) κατόπιν της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> σε αναλογία ανάμιξης  $r = 0.5$ .

**Πίνακας 3.27:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0) στις τρεις αναλογίες ανάμιξης με το σύμπλοκο (B). Σε παρένθεση φαίνονται οι μετατοπίσεις σε σύγκριση με τις τιμές του ολιγονουκλεοτιδίου χωρίς την παρουσία συμπλόκου, σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

	r = 0.5						r = 1						r = 2					
	H8/6	H5	H1'	GN1H	C/GN2H *	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5	H1'	GN1H	C/GN2H *	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5	H1'	GN1H	C/GN2H *	(n.b.) C/GN2H
C1	7.69 -0.01	5.98 0.00	5.84 0.03	-	-	-	7.69 -0.01	5.98 0.00	5.85 0.04	-	-	-	7.67 -0.03	5.96 -0.02	5.85 +0.04	-	-	-
G2	8.05 +0.02	-	5.89 -0.07	13.09 -0.05	8.53 -0.01	6.71 +0.04	8.05 +0.02	-	5.84 -0.12	13.07 -0.07	8.53 -0.01	6.71 +0.04	8.07 +0.04	-	5.91 -0.05	13.02 -0.12	8.50 -0.04	6.74 +0.07
C3	7.45 +0.03	5.58 +0.09	5.81 +0.01	-	-	-	7.46 +0.04	5.60 +0.11	5.81 +0.01	-	-	-	7.46 +0.04	5.65 +0.16	5.86 +0.06	-	-	-
G4	8.02 +0.06	-	5.92 -0.02	12.96 -0.15	8.46 0.00	6.64 +0.11	8.03 +0.07	-	5.91 -0.03	12.92 -0.19	8.45 -0.01	6.65 +0.12	8.04 +0.08	-	5.89 -0.05	12.80 -0.31	8.43 -0.03	6.74 +0.21
C5	7.38 0.00	5.53 +0.01	5.69 -0.14	-	-	-	7.38 0.00	5.53 +0.01	5.67 -0.16	-	-	-	7.37 -0.01	5.52 0.00	5.87 +0.04	-	-	-
G6	7.98 -0.01	-	6.06 -0.15	n.o.	n.o.	n.o.	7.97 -0.02	-	6.04 -0.17	n.o.	n.o.	n.o.	8.06 +0.07	-	6.00 -0.21	n.o.	n.o.	n.o.

Όσον αφορά τα πρωτόνια των εξωκυκλικών αμινομάδων, τα οποία δεν συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου, C/GN2H, παρατηρούνται downfield μετατοπισμένα, σε μικρότερο βαθμό, ωστόσο, συγκριτικά με τα αντίστοιχα πρωτόνια του (A). Τα σακχαρικά πρωτόνια C5H1' και G6H1', τα οποία βρίσκονται στην μικρή αύλακα του DNA, βρέθηκαν upfield μετατοπισμένα κατά -0.14 και -0.15 ppm αντίστοιχα (r = 0.5), ένδειξη ότι βρίσκονται σε κοντινή απόσταση με την rhenA του συμπλόκου (B). Μία ακόμη ένδειξη του ότι η rhenA του (B) αλληλεπιδρά με την μικρή αύλακα του DNA είναι το γεγονός ότι τα C5H6, C5H5 και G6H8, τα οποία βρίσκονται στη μεγάλη αύλακα, είναι πρακτικά αμετατόπιστα σε σχέση με το ελεύθερο d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>. Με την αύξηση του r, όπως και στην περίπτωση του (A), παρατηρείται περαιτέρω μετατόπιση των σημάτων των πρωτονίων του d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, εν αντιθέσει με αυτά του (B). Μπορεί, κατά συνέπεια, να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι εξαιτίας του +4 φορτίου του συμπλόκου, λαμβάνουν χώρα ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τον φωσφορικό σκελετό του d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, προτείνεται η αλληλεπίδραση του (B) με το d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> μέσω δέσμησης στην μικρή αύλακα του, παρά με παρεμβολή μεταξύ των βάσεων. Ωστόσο, λόγω των εμφανών ομοιοτήτων με την συμπεριφορά του (A), δεν μπορεί να αποκλειστεί πλήρως το ενδεχόμενο ύπαρξης αλληλεπιδράσεων του συμπλόκου με το ολιγονουκλεοτίδιο και μέσω παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του.



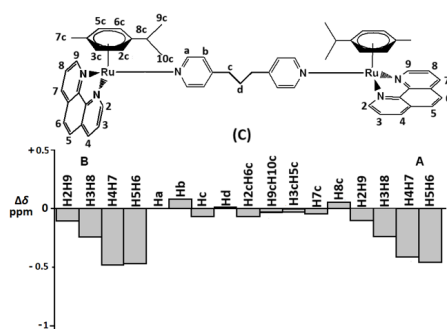
**Εικόνα 3.55:** Μέρος του φάσματος <sup>1</sup>H NMR του μίγματος (B) - d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> σε r = 0.5 και r = 1, καθώς επίσης και του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου και ελεύθερου συμπλόκου σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0). Στην εικόνα σημειώνεται και η απόδοση των παρατηρούμενων σημάτων. Τα πρωτόνια που σημειώνονται με αστερίσκο είναι εκείνα που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ αυτά που σημειώνονται με κόκκινη κουκίδα αφορούν πρωτόνια της rhenB.

**3.4.2.3. Αλληλεπίδραση του (C) με το d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>:**

Μόνο τα H4H7 και τα αρωματικά πρωτόνια του cym του (C) εμφανίζουν διπλά σήματα, κατόπιν της αλληλεπίδρασης με το d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> υποδεικνύοντας μερική άρση της συμμετρίας (Πίνακας 3.28). Πιο συγκεκριμένα, σε  $r = 0.5$ , παρατηρήθηκε η ύπαρξη διπλών σημάτων για τα H4H7 των rhen, καθώς επίσης και για τα H2cH6c, H3cH5c και H9cH10c των cym. Σε  $r = 2$ , παρατηρείται η εμφάνιση διπλών και για τα H3H8 της rhen. Παρόλα αυτά, η διαφορά στα δύο ξεχωριστά σήματα των H3H8 ήταν μόλις 0.01 ppm. Συνεπώς, μπορεί να υποτεθεί ότι οι δύο rhen του (C) αλληλεπιδρούν με σχετικά παρόμοιο τρόπο με το DNA. Όμοια με τις περιπτώσεις των δύο προηγούμενων συμπλόκων, η αύξηση του  $r$  οδηγεί σε μείωση των παρατηρούμενων μετατοπίσεων των πρωτονίων του συμπλόκου. Κατά συνέπεια, σε μικρά  $r$  μπορεί να θεωρηθεί ότι υπάρχει κορεσμός του d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> με το σύμπλοκο, με αποτέλεσμα το επιπλέον (C) που παραμένει ελεύθερο να μετατοπίζει την ισορροπία προς την πλευρά του ελεύθερου συμπλόκου. Συνολικά, οι μετατοπίσεις που σημειώθηκαν για τα πρωτόνια των rhen του (C) κυμαίνονται από -0.06 έως -0.50 ppm, με τις πιο μεγάλες μετατοπίσεις να σημειώνονται για τα H4H7 και H5H6, ενώ τις χαμηλότερες για τα H2H9 (Εικόνα 3.56). Συνεπώς, φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση των rhen του (C) γίνεται από το «μπροστινό» μέρος του αρωματικού συστήματος. Το μέγεθος των μετατοπίσεων αυτών υποδηλώνει περισσότερο αλληλεπίδραση μέσω των αυλάκων του DNA, παρά μέσω παρεμβολής. Όμοια με τα δύο προηγούμενα σύμπλοκα η μικρή άρση της συμμετρίας του συμπλόκου μπορεί να επιδρά στον BL3, χωρίς ωστόσο αυτός να εμφανίζει διπλά σήματα.

**Πίνακας 3.28:** Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των σημάτων του συμπλόκου (C) (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0) στην ελεύθερη κατάσταση, καθώς και σε αναλογίες ανάμιξης  $r = 0.5$ , 1 και 2 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>. Οι τιμές στην παρένθεση εκφράζουν τη διαφορά με τις τιμές για το ελεύθερο σύμπλοκο (C) (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed. Με A και B διαχωρίζονται οι δύο διαφορετικές οντότητες φαινανθρολίνης ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο.

	(C)	r = 0.5		r = 1		r = 2	
		A	B	A	B	A	B
H2H9	10.03	9.93 (-0.10)		9.94 (-0.09)		9.97 (-0.06)	
H3H8	8.21	7.95 (-0.26)		8.00 (-0.21)		8.08 (-0.13)	8.07 (-0.14)
H4H7	8.83	8.41 (-0.42)	8.33 (-0.50)	8.48 (-0.35)	8.41 (-0.42)	8.59 (-0.24)	8.55 (-0.28)
H5H6	8.10	7.62 (-0.48)		7.69 (-0.41)		7.94 (-0.16)	
Ha	8.20	8.20 (0.00)		8.20 (0.00)		8.20 (0.00)	
Hb	7.01	7.14 (+0.13)		7.12 (+0.11)		7.08 (+0.07)	
Hc	2.40	2.30 (-0.10)		2.36 (-0.04)		2.40 (0.00)	
Hd	1.57	1.60 (+0.03)		1.58 (+0.01)		1.60 (+0.03)	
H2cH6c	6.51	6.44 (-0.05)	6.40 (-0.11)	6.48 (-0.03)	6.41 (-0.10)	6.46 (-0.05)	6.44 (-0.07)
H3cH5c	6.14	6.10 (-0.04)	6.08 (-0.06)	6.11 (-0.03)	6.08 (-0.06)	6.10 (-0.04)	6.12 (-0.02)
H9cH10c	0.75	0.72 (-0.03)	0.68 (-0.07)	0.73 (-0.02)	0.69 (-0.06)	0.73 (-0.02)	0.70 (-0.05)
H7c	1.78	1.73 (-0.05)		1.74 (-0.04)		1.71 (-0.07)	
H8c	2.39	2.46 (+0.07)		2.30 (-0.09)		2.32 (-0.07)	

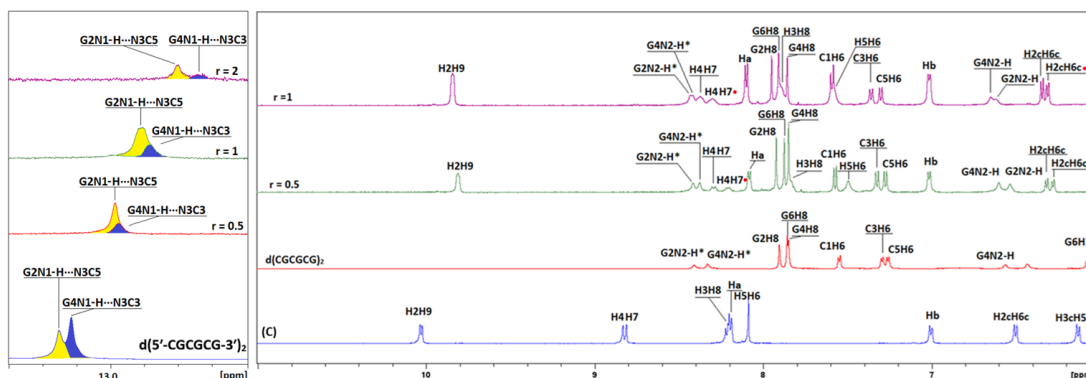


**Εικόνα 3.56:** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα σήματα των πρωτονίων των υποκαταστατών του συμπλόκου (C) κατόπιν της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> σε αναλογία ανάμιξης  $r = 0.5$ .

Περνώντας στη συνέχεια στα πρωτόνια του d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, σε  $r = 0.5$  παρατηρείται μετατόπιση των σημάτων των C3H6 και C3H5 κατά +0.02 και +0.09 ppm αντίστοιχα, οι οποίες σε  $r = 2$  έλαβαν τη μέγιστη τιμή τους, δηλαδή, +0.06 και +0.20 ppm, αντίστοιχα (Πίνακας 3.29). Οι παραπάνω μετατοπίσεις, αποτελούν ένδειξη της ελάττωσης των π - π αρωματικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βάσεων C3 και G4. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μετατόπιση καθώς επίσης και διεύρυνση των σημάτων των G2N1H και G4N1H. Οι μετατοπίσεις αυτές ήταν -0.33 και -0.25 ppm, αντίστοιχα, ένδειξη της επιμήκυνσης των δεσμών υδρογόνου στις θέσεις αυτές. Επιπροσθέτως, παρατηρείται ότι το (C) προκαλεί παρόμοιες μεταβολές σε ολόκληρη την έκταση του d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, εν αντιθέσει με τα προηγούμενα δύο σύμπλοκα, ένδειξη της ταυτόχρονης αλληλεπίδρασης με πολλούς διαφορετικούς τρόπους με το DNA. Παρά τις μετατοπίσεις αυτές, τα σήματα των ίμινο πρωτονίων των ζευγών G2:C5 και G4:C3 παραμένουν ανιχνεύσιμα σε όλα τα  $r$ , υποδεικνύοντας τη μη ρήξη των δεσμών υδρογόνου. Ακόμη, διαπιστώνεται ότι υπάρχει σημαντική downfield μετατόπιση των n.b. C/GN2H, από +0.05 έως και +0.29 ppm. Από τα παραπάνω μπορεί να θεωρηθεί ότι του (C) αλληλεπιδρά με το DNA μέσω δέσμησης στις αύλακες και μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Παρόμοια με τα (A) και (B), η αύξηση του  $r$  οδηγεί σε αύξηση των μετατοπίσεων του d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, εν αντιθέσει με το (C) του οποίου οι μετατοπίσεις μειώνονται. Αιτία του φαινομένου αυτού, όπως και στα (A) και (B), πιθανώς είναι το +4 φορτίο του συμπλόκου, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε χωρική συμπίκνωση (condensation) του DNA.

**Πίνακας 3.29:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0) στις τρεις αναλογίες ανάμιξης με το σύμπλοκο (C). Σε παρένθεση φαίνονται οι μετατοπίσεις σε σύγκριση με τις τιμές του ολιγονουκλεοτιδίου χωρίς την παρουσία συμπλόκου, σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

	$r = 0.5$						$r = 1$						$r = 2$						
	H8/6	H5	H1'	GN1H/C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5	H1'	GN1H/C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5	H1'	GN1H/C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	(n.b.) C/GN2H	
C1	7.69 -0.01	5.98 0.00	5.81 0.00	-	-	-	7.69 -0.01	5.99 +0.01	5.79 -0.02	-	-	-	7.69 -0.01	5.99 +0.01	5.79 -0.02	-	-	-	-
G2	8.04 +0.01	-	5.77 -0.19	12.98 -0.16	8.54 0.00	6.72 +0.05	8.05 +0.02	5.86 +0.02	12.94 -0.10	8.53 -0.01	6.75 +0.08	6.75 +0.08	8.08 +0.05	-	5.79 -0.17	12.81 -0.33	8.51 -0.03	6.80 +0.13	6.80 +0.13
C3	7.44 +0.02	5.58 +0.09	5.88 +0.08	-	-	-	7.46 +0.04	5.63 +0.14	5.87 +0.07	-	-	-	7.48 +0.06	5.69 +0.20	5.82 +0.02	-	-	-	-
G4	7.96 0.00	-	5.72 -0.22	12.99 -0.12	8.50 +0.04	6.65 +0.12	8.00 +0.04	-	5.73 -0.21	12.93 -0.18	8.48 +0.02	6.72 +0.19	8.06 +0.10	-	5.78 -0.16	12.86 -0.25	8.56 +0.10	6.82 +0.29	6.82 +0.29
C5	7.39 +0.01	5.56 +0.04	5.86 +0.03	-	-	-	7.40 +0.02	5.58 +0.06	5.85 +0.02	-	-	-	7.42 +0.04	5.61 +0.09	5.80 -0.03	-	-	-	-
G6	7.99 0.00	-	5.91 -0.30	n.o.	n.o.	n.o.	7.96 -0.03	5.91 -0.21	6.00 -0.21	n.o.	n.o.	n.o.	8.03 +0.04	-	5.83 -0.38	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.



**Εικόνα 3.57:** Μέρος του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του μίγματος (C) -  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$  σε  $r = 0.5$  και  $r = 1$ , καθώς επίσης και του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου και ελεύθερου συμπλόκου σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων ( $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0). Στην εικόνα σημειώνεται και η απόδοση των παρατηρούμενων σημάτων. Τα πρωτόνια που σημειώνονται με αστερίσκο είναι εκείνα που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ αυτά που σημειώνονται με κόκκινη κουκίδα αφορούν πρωτόνια της rhenB.

Από τα προηγούμενα συμπεραίνεται ότι και τα τρία σύμπλοκα αλληλεπιδρούν με το  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$  μέσω των rhen. Η αλληλεπίδραση εντοπίζεται κυρίως στο κεντρικό τμήμα του  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ , με τον τρόπο αλληλεπίδρασης να διαφέρει για το κάθε σύμπλοκο. Αξίζει να σημειωθεί ότι, μεταξύ των τριών συμπλόκων μόνο το (A) με τον μικρότερο και άκαμπτο BL φαίνεται να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA προκαλώντας σχάση (interruption) των δεσμών υδρογόνου σε  $r = 1$  και 2. Η αλληλεπίδραση μέσω παρεμβολής γίνεται από την rhenB με τη rhenA να αλληλεπιδρά μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με πρωτόνια του  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$  που βρίσκονται στη μεγάλη αύλακα. Είναι πιθανό περιοριστικός παράγοντας στο να παρεμβληθεί και η δεύτερη rhen του συμπλόκου να είναι είτε η αρχή του «αποκλεισμού του πλησιέστερου γείτονα» (nearest neighbor exclusion), σύμφωνα με την οποία δεν μπορεί να συμβεί παρεμβολή σε ακριβώς γειτονικά ζεύγη βάσεων ενός μορίου DNA, είτε η ακαμψία του BL1. [156]. Αντίθετα με το (A), τα (B) και (C) δεν προκαλούν ρήξη των δεσμών υδρογόνου. Φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την μικρή αύλακα του DNA μέσω υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, προκαλώντας έτσι την επιμήκυνση (elongation) αλλά όχι διάσπαση (interruption) των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των G2:C5 και G4:C3.

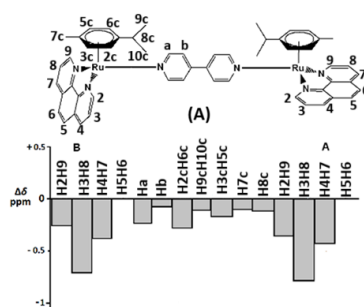
### 3.4.3. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων (A) - (C) με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ με φασματοσκοπία NMR:

#### 3.4.3.1. Αλληλεπίδραση του (A) με το $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ :

Όσον αφορά την αλληλεπίδραση του συμπλόκου (A) με το  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ , παρατηρείται, όπως και στην περίπτωση του  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ , άρση της συμμετρίας του συμπλόκου. Σε  $r = 0.5$ , παρατηρούνται αρκετά μεγάλες upfield μετατοπίσεις των σημάτων των πρωτονίων των rhen του (A), οι οποίες φτάνουν μέχρι και τα  $-0.76$  ppm. Ακόμη, το σήμα των H5H6 χάνεται εξαιτίας της εκτεταμένης διεύρυνσής του (Πίνακας 3.30). Τα παραπάνω αποτελούν αποδείξεις της ισχυρής αλληλεπίδρασης τόσο της rhenB, όσο και της rhenA με το DNA. Οι παρατηρούμενες μετατοπίσεις των H των rhen είναι σημαντικά μεγαλύτερες από την περίπτωση του  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ . Επιπλέον, εν αντιθέσει με την περίπτωση του  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ , παρατηρούνται σημαντικές μετατοπίσεις των σημάτων των πρωτονίων και των υπόλοιπων υποκαταστατών του (A) (Εικόνα 3.58). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται σημαντικές μετατοπίσεις για τα Ha του BL1 κατά  $-0.20$  ppm ( $r = 0.5$ ), όπως επίσης και για τα πρωτόνια των cyt, των οποίων οι μετατοπίσεις φτάνουν έως και  $-0.21$  και  $-0.26$  ppm για τα H2cH6c των cytA και cytB αντίστοιχα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση και μέσω του cyt και του BL1. Εναλλακτικά, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση του (A) με το  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$  να λαμβάνει χώρα μέσω των rhenA και rhenB και, εξαιτίας αυτής, να προκαλούνται δομικές αλλαγές στο (A) με αποτέλεσμα τις παρατηρούμενες μετατοπίσεις.

**Πίνακας 3.30:** Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των σημάτων του συμπλόκου (A) ( $H_2O/D_2O$  9:1, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0) στην ελεύθερη κατάσταση, καθώς και σε αναλογίες ανάμιξης  $r = 0.5, 1$  και  $2$  με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ . Οι τιμές στην παρένθεση εκφράζουν τη διαφορά με τις τιμές για το ελεύθερο σύμπλοκο (A) (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed. Με A και B διαχωρίζονται οι δύο διαφορετικές οντότητες φαινανθρολίνης ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο.

	(A)	$r = 0.5$		$r = 1$		$r = 2$	
		A	B	A	B	A	B
H2H9	10.02	9.80 (-0.22)	9.62 (-0.40)	9.82 (-0.20)	9.65 (-0.37)	9.85 (-0.17)	9.72 (-0.30)
H3H8	8.20	7.50 (-0.70)	7.44 (-0.76)	7.89 (-0.31)		7.94 (-0.26)	7.55 (-0.65)
H4H7	8.80	8.46 (-0.34)	8.40 (-0.40)	7.39 (-1.41)		7.35 (-1.45)	7.27 (-1.53)
H5H6	8.07	n.o.		n.o.		7.17 (-0.90)	
Ha	8.46	8.26 (-0.20)		8.27 (-0.19)		8.30 (-0.16)	
Hb	7.39	7.35 (-0.04)		7.35 (-0.04)		7.34 (-0.05)	
H2cH6c	6.50	6.29 (-0.21)	6.24 (-0.26)	6.31 (-0.19)	6.26 (-0.24)	6.34 (-0.16)	6.30 (-0.20)
H3cH5c	6.14	6.09 (-0.06)	6.05 (-0.09)	6.10 (-0.04)	6.08 (-0.06)	6.09 (-0.05)	6.07 (-0.07)
H9cH10c	0.72	0.68 (-0.04)	0.66 (-0.06)	0.68 (-0.04)	0.66 (-0.06)	0.67 (-0.05)	0.66 (-0.06)
H7c	1.78	1.73 (-0.05)		1.74 (-0.04)		1.73 (-0.05)	
H8c	2.36	2.29 (-0.07)		2.29 (-0.07)		2.27 (-0.09)	



**Εικόνα 3.58:** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα σήματα των πρωτονίων των υποκαταστατών του συμπλόκου (A) κατόπιν της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-TTTTGCAAAA-3')_2$  σε αναλογία ανάμιξης  $r = 0.5$ .

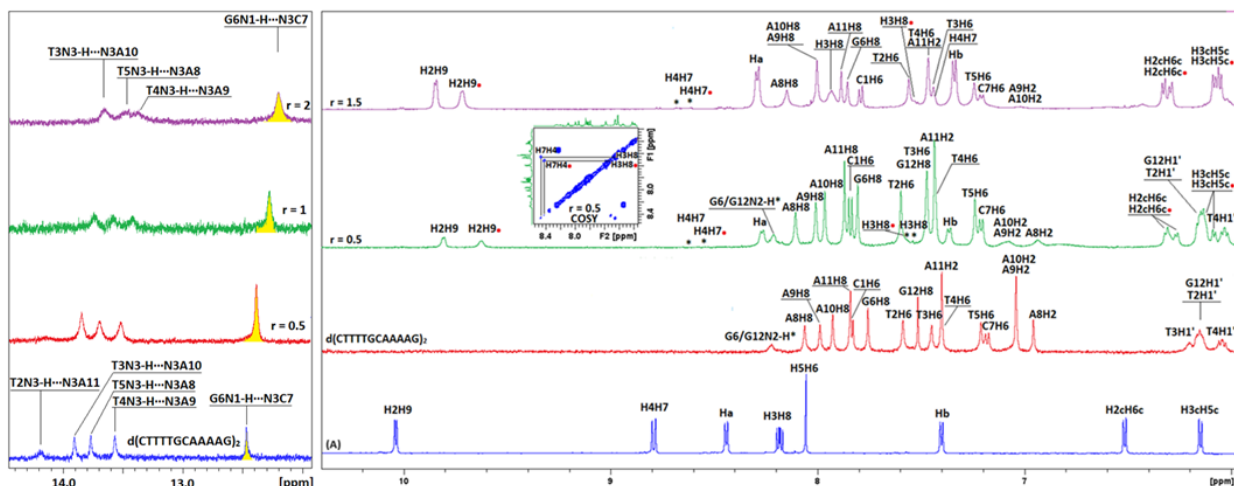
Στα αρωματικά πρωτόνια του  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$ , παρατηρούνται μικρού μεγέθους downfield μετατοπίσεις, με το G6H8 και το G12H8 να έχουν τις μεγαλύτερες (Πίνακας 3.31). Με την αύξηση του  $r$ , αυξάνονται και κάποιες από τις μετατοπίσεις των σημάτων του  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$ . Ειδικότερα η μετατόπιση του σήματος του G6H8 φτάνει τα +0.11 ppm σε  $r = 2$ , ενώ αξιοσημείωτη είναι και η μετατόπιση του σήματος του A8H8 σε  $r = 2$ , (+0.09 ppm). Επιπροσθέτως, σημαντικές μετατοπίσεις σημειώνονται και για τα σήματα των T4H6 και T5H6, αν και μικρότερες σε σύγκριση με τις προαναφερθείσες. Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση του (A) με το  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα του ολιγονουκλεοτιδίου, με αποτέλεσμα το destacking των βάσεων του DNA. Για τις συγκεκριμένες βάσεις, ακόμη, παρατηρούνται έντονες upfield μετατοπίσεις για τα H1', τα οποία βρίσκονται στην μικρή αύλακα του DNA, υποδεικνύοντας έτσι την προσέγγιση του συμπλόκου στο  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  μέσω αυτής.

**Πίνακας 3.31:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  ( $H_2O:D_2O$  9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0) στις τρεις αναλογίες ανάμιξης με το σύμπλοκο (A). Σε παρένθεση φαίνονται οι μετατοπίσεις σε σύγκριση με τις τιμές του ολιγονουκλεοτιδίου χωρίς την παρουσία συμπλόκου, σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

	r = 0.5						r = 1						r = 2					
	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H
C1	7.82 -0.01	5.88 -0.01	5.82 0.00	-	-	-	7.82 -0.01	5.88 +0.06	5.84 +0.02	-	-	-	7.79 -0.04	5.87 -0.02	5.82 0.00	-	-	-
T2	7.58 0.00	1.62 0.00	6.13 -0.02	14.19 -0.07	-	-	7.57 -0.01	1.62 0.00	6.11 -0.04	n.o.	-	-	7.56 -0.02	1.62 0.00	6.06 -0.09	n.o.	-	-
T3	7.45 0.00	1.60 +0.01	6.12 -0.04	13.84 -0.07	-	-	7.46 +0.01	1.63 +0.04	6.12 -0.04	13.77 -0.14	-	-	7.47 +0.02	1.64 +0.05	6.08 -0.08	13.66 -0.25	-	-
T4	7.41 +0.01	1.60 +0.02	6.00 -0.03	13.51 -0.06	-	-	7.42 +0.02	1.64 +0.06	5.99 -0.04	13.45 -0.12	-	-	7.44 +0.04	1.64 +0.06	5.92 -0.11	13.38 -0.19	-	-
T5	7.22 +0.02	1.60 +0.01	5.67 -0.05	13.69 -0.08	-	-	7.23 +0.03	1.62 +0.03	5.61 -0.11	13.62 -0.15	-	-	7.25 +0.05	1.64 +0.05	5.55 -0.17	13.48 -0.29	-	-
G6	7.79 +0.04	-	5.64 -0.04	12.38 -0.09	8.20 -0.02	6.36 +0.16	7.81 +0.06	-	5.59 -0.09	12.30 -0.17	8.17 -0.05	6.34 +0.14	7.86 +0.11	-	5.62 -0.06	12.20 -0.27	8.16 -0.06	6.45 +0.25
C7	7.18 0.00	5.29 0.00	5.29 -0.01	-	-	-	7.20 +0.02	5.32 +0.03	5.32 +0.02	-	-	-	7.21 +0.03	5.34 +0.05	5.35 +0.05	-	-	-
A8	8.09 +0.03	7.03 0.00	5.56 -0.04	-	-	-	8.12 +0.06	n.o.	5.54 -0.06	-	-	-	8.15 +0.09	n.o.	5.46 -0.14	-	-	-
A9	7.99 0.00	6.92 -0.11	5.63 +0.01	-	-	-	8.00 +0.01	n.o.	5.60 -0.02	-	-	-	8.00 +0.01	n.o.	5.60 -0.02	-	-	-
A10	7.95 +0.03	7.03 0.00	5.69 -0.01	-	-	-	7.97 +0.05	n.o.	5.68 -0.02	-	-	-	7.94 +0.02	n.o.	5.61 -0.09	-	-	-
A11	7.86 +0.02	7.03 0.00	5.88 +0.01	-	-	-	7.87 +0.03	n.o.	5.85 -0.02	n.o.	-	-	7.89 +0.05	n.o.	5.82 -0.05	-	-	-
G12	7.58 +0.07	-	6.13 -0.01	-	-	-	7.57 +0.06	-	6.11 -0.03	-	-	-	7.56 +0.04	-	6.06 -0.08	-	-	-

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

Επιπλέον, παρατηρούνται αξιοσημείωτες μετατοπίσεις και για τα ίμινο πρωτόνια των βάσεων του  $d(5'-CTTTTGCAAAG-3')_2$ , οι οποίες σε  $r = 0.5$  κυμαίνονται από  $-0.07$  έως  $-0.09$  ppm, φτάνοντας μέχρι και  $-0.29$  ppm σε  $r = 2$ . Ακόμη, το σήμα του T2N3H διακρίνεται σημαντικά διευρυμένο (Εικόνα 3.59), γεγονός που πιθανώς υποδεικνύει, σε συνδυασμό και με την παρατηρούμενη μετατόπιση του σήματος του G12H8, ότι το ξετύλιγμα της έλικας ξεκινάει από τα άκρα της αλληλουχίας. Μάλιστα το σήμα του T2N3H είναι μη ανιχνεύσιμο από  $r = 1$  λόγω της εκτεταμένης διεύρυνσης, υποδεικνύοντας τη ρήξη του δεσμού υδρογόνου στη θέση αυτή. Η αύξηση των μετατοπίσεων των σημάτων των ίμινο πρωτονίων με την αύξηση του  $r$  δείχνει ότι το φαινόμενο αυτό γίνεται εντονότερο με την αύξηση της ποσότητας του συμπλόκου (A).



**Εικόνα 3.59:** Μέρος του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του μίγματος (A) -  $d(5'-CTTTTGCAAAG-3')_2$  σε  $r = 0.5, 1$  και  $2$ , καθώς επίσης και του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου και ελεύθερου συμπλόκου σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων ( $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM,  $\text{pH} = 7.0$ ). Στην εικόνα σημειώνεται και η απόδοση των παρατηρούμενων σημάτων. Τα πρωτόνια που σημειώνονται με αστερίσκο είναι εκείνα που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ αυτά που σημειώνονται με κόκκινη κουκίδα αφορούν πρωτόνια της phenB.

#### 3.4.3.2. Αλληλεπίδραση του (B) με το $d(5'-CTTTTGCAAAG-3')_2$ :

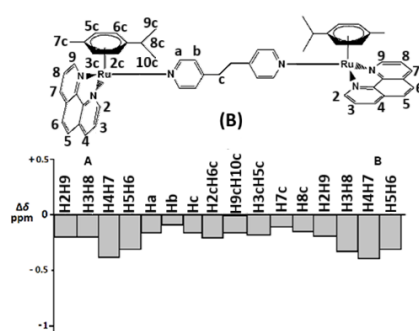
Ακολούθως, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του συμπλόκου (B) με το  $d(5'-CTTTTGCAAAG-3')_2$ . Όμοια με το (A), παρατηρείται άρση της συμμετρίας του συμπλόκου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση διπλών σημάτων στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR. Τα σήματα των phen εντοπίστηκαν σημαντικά upfield μετατοπισμένα, και για τις δύο phen (Πίνακας 3.32). Αυτό αποτελεί απόδειξη του ότι και οι δύο phen εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με το ολιγονουκλεοτίδιο. Οι πιο μεγάλες μετατοπίσεις σε σχέση με τα σήματα του ελεύθερου συμπλόκου (B) παρατηρούνται για τα H4H7 και H5H6 (Εικόνα 3.60). Η διαφορά, μάλιστα, των σημάτων των συγκεκριμένων πρωτονίων μεταξύ των phenA και phenB είναι σχετικά μικρή, 0.05 ppm στην μεγαλύτερη τιμή της. Με βάση αυτό, μπορεί να υποθεθεί είτε ότι οι phenA και phenB αλληλεπιδρούν με το  $d(5'-CTTTTGCAAAG-3')_2$  με παρόμοιο τρόπο, είτε ότι υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ τους κινητικά γρήγορη στη χρονική κλίμακα του NMR. Όσον αφορά τους υπόλοιπους υποκαταστάτες παρατηρούνται, επίσης, upfield μετατοπίσεις των σημάτων τους, μικρότερου μεγέθους σε σύγκριση με τα πρωτόνια των phen. Για τον λόγο αυτό, μπορεί να θεωρηθεί ότι οι μετατοπίσεις αυτές είναι αποτέλεσμα των δομικών αλλαγών που προκαλούνται στο (B) εξαιτίας της αλληλεπίδρασης με το  $d(5'-CTTTTGCAAAG-3')_2$ . Επιπλέον, παρατηρούνται διπλά σήματα και για τα πρωτόνια των cym εξαιτίας της άρσης της συμμετρίας του

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

συμπλόκου. Φυσικά η άρση της συμμετρίας του επηρεάζει και τον BL2, ωστόσο η διαφοροποίηση που προκαλείται είναι πολύ μικρή στα σήματα στο φάσμα NMR και είναι εκτός των ορίων της διακριτικής ικανότητας του οργάνου. Επιπροσθέτως, οι μετατοπίσεις για το σύμπλοκο (B) είναι μικρότερες συγκριτικά με τις αντίστοιχες του (A). Συνεπώς, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση του (B) με το ολιγονουκλεοτίδιο να λαμβάνει χώρα με διαφορετικό τρόπο από ότι του (A), υιοθετώντας διαφορετικές διαμορφώσεις.

**Πίνακας 3.32:** Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των σημάτων του συμπλόκου (B) (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0) στην ελεύθερη κατάσταση, καθώς και σε αναλογίες ανάμιξης r = 0.5, 1 και 2 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CTTTTGCAAAAAG-3')<sub>2</sub>. Οι τιμές στην παρένθεση εκφράζουν τη διαφορά με τις τιμές για το ελεύθερο σύμπλοκο (B) (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed. Με A και B διαχωρίζονται οι δύο διαφορετικές οντότητες φαινανθρολίνης και p-κουμενίου ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο.

	(B)	r = 0.5		r = 1		r = 2	
		A	B	A	B	A	B
H2H9	10.04	9.87 (-0.17)	9.85 (-0.19)	9.89 (-0.15)	9.86 (-0.18)	9.89 (-0.15)	9.88 (-0.16)
H3H8	8.24	8.06 (-0.18)	7.97 (-0.27)	8.05 (-0.19)	7.97 (-0.27)	8.04 (-0.20)	7.96 (-0.28)
H4H7	8.87	8.51 (-0.36)	8.46 (-0.41)	8.56 (-0.31)	8.53 (-0.34)	8.62 (-0.25)	8.59 (-0.28)
H5H6	8.15	7.82 (-0.33)	7.81 (-0.34)	n.o.		n.o.	
Ha	8.20	8.05 (-0.15)		8.06 (-0.14)		8.07 (-0.13)	
Hb	7.06	6.98 (-0.08)		6.99 (-0.07)		6.96 (-0.10)	
Hc	2.74	2.59 (-0.15)		2.59 (-0.15)		2.59 (-0.15)	
H2cH6c	6.52	6.34 (-0.18)	6.33 (-0.19)	6.35 (-0.17)	6.34 (-0.18)	6.36 (-0.16)	6.35 (-0.17)
H3cH5c	6.09	5.98 (-0.11)	5.96 (-0.13)	5.98 (-0.11)	5.96 (-0.13)	5.97 (-0.12)	5.96 (-0.13)
H9cH10c	0.72	0.59 (-0.13)	0.58 (-0.14)	0.60 (-0.12)	0.58 (-0.14)	0.60 (-0.12)	0.58 (-0.14)
H7c	1.59	1.49 (-0.10)		1.49 (-0.10)		1.49 (-0.10)	
H8c	2.37	2.22 (-0.15)		2.22 (-0.15)		2.22 (-0.15)	



**Εικόνα 3.60:** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα σήματα των πρωτονίων των υποκαταστατών του συμπλόκου (B) κατόπιν της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-TTTTGCAAAA-3')<sub>2</sub> σε αναλογία ανάμιξης r = 0.5.

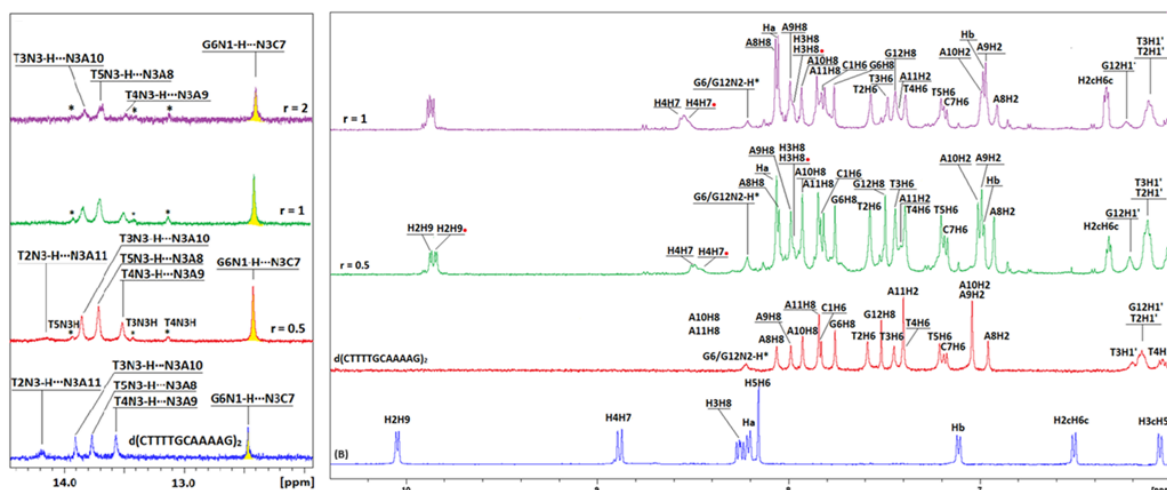
Περνώντας στη συνέχεια στα αρωματικά πρωτόνια των αζωτούχων βάσεων του DNA, παρατηρούνται γενικά είτε μικρές downfield μετατοπίσεις, είτε, σε ορισμένες περιπτώσεις, και μηδενικές μετατοπίσεις σε σύγκριση με το ελεύθερο d(5'-CTTTTGCAAAAAG-3')<sub>2</sub>. Οι μετατοπίσεις των σημάτων των A8-A11H2 (-0.02

Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

έως -0.03 ppm) πιθανότατα προκαλούνται από την εγγύτητά τους σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε ηλεκτρονιακή πυκνότητα, όπως είναι το αρωματικό σύστημα των υποκαταστατών του (B). Η παραπάνω πρόταση μπορεί να επιβεβαιωθεί και από το γεγονός πως παρατηρούνται ανάλογες μετατοπίσεις για τα σήματα των σακχαρικών πρωτονίων των T3, T4 και T5 οι οποίες είναι οι συμπληρωματικές βάσεις των παραπάνω αδενινών. Λόγω του γεγονότος ότι τόσο το H2 των A όσο και τα H1' των T βρίσκονται στην μικρή αύλακα του DNA, προτείνεται ότι το σύμπλοκο (B) δεσμεύεται, μέσω των rhenA και rhenB, στην μικρή αύλακα στα δύο άκρα του d(5'-CTTTGCAAAAG-3')<sub>2</sub>, όπως και στις περιπτώσεις των d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> και του d(5'-CGGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Επιπροσθέτως, η ισορροπία μεταξύ του προϊόντος της αλληλεπίδρασης του (B) με το d(5'-CTTTGCAAAAG-3')<sub>2</sub>, του ελεύθερου (B) και του ελεύθερου d(5'-CTTTGCAAAAG-3')<sub>2</sub> είναι ενδιάμεσης ταχύτητας ως προς την χρονική κλίμακα του NMR στους 298 K, όπως μπορεί να γίνει αντιληπτό από την ύπαρξη νέων σημάτων για τα ίμινο πρωτόνια που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου N3H των T3, T4 και T5 (Εικόνα 3.61). Αξίζει να σημειωθεί, ότι το ίδιο φαινόμενο δεν παρατηρείται για τα σήματα των πρωτονίων του ζεύγους G6:C7, το οποίο βρίσκεται στο κεντρικό τμήμα της αλληλουχίας. Συνεπώς, εκτός από το ότι το σύμπλοκο (B) δεσμεύεται κατά προτίμηση στην μικρή αύλακα του DNA, μπορεί να εξαχθεί και το συμπέρασμα ότι προτιμούνται ζεύγη βάσεων A:T. Ωστόσο, οι μετατοπίσεις που σημειώθηκαν στα d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub> και d(5'-CGGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> ήταν μεγαλύτερες από το d(5'-CTTTGCAAAAG-3')<sub>2</sub>, δείχνοντας πιθανώς ένα καλύτερο προφίλ αλληλεπίδρασης για ολιγονουκλεοτίδια πλούσια σε ζεύγη CG. Και στα τρία ολιγονουκλεοτίδια η αλληλεπίδραση με το (B) προκάλεσε επιμήκυνση και όχι πλήρη ρήξη των δεσμών υδρογόνου, εκτός του δεσμού A11/T2N3H σε r = 1 με το d(5'-CTTTGCAAAAG-3')<sub>2</sub>.

**Πίνακας 3.33:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CTTTGCAAAAG-3')<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0) στις τρεις αναλογίες ανάμιξης με το σύμπλοκο (B). Σε παρένθεση φαίνονται οι μετατοπίσεις σε σύγκριση με τις τιμές του ολιγονουκλεοτιδίου χωρίς την παρουσία συμπλόκου, σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

	r = 0.5						r = 1						r = 2					
	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H
C1	7.83 0.00	5.89 0.00	5.83 +0.01	-	-	-	7.82 -0.01	5.89 0.00	5.82 0.00	-	-	-	7.82 -0.01	5.90 +0.01	5.82 0.00	-	-	-
T2	7.58 0.00	1.62 0.00	6.13 -0.02	14.18 -0.02	-	-	7.58 0.00	1.62 0.00	6.11 -0.04	13.96 -0.24	-	-	7.57 -0.01	1.60 -0.02	6.11 -0.04	n.o.	-	-
T3	7.45 0.00	1.59 0.00	6.16 0.00	13.89 -0.02	-	-	7.45 0.00	1.60 +0.01	6.12 -0.04	13.87 -0.04	-	-	7.45 0.00	1.59 0.00	6.10 -0.06	13.85 -0.06	-	-
T4	7.40 0.00	1.59 +0.01	6.00 -0.03	13.55 -0.02	-	-	7.39 -0.01	1.59 +0.01	5.99 -0.04	13.54 -0.03	-	-	7.39 -0.01	1.59 +0.01	5.97 -0.06	n.o.	-	-
T5	7.21 +0.01	1.59 0.00	5.67 -0.05	13.75 -0.02	-	-	7.21 +0.01	1.59 0.00	5.67 -0.05	13.74 -0.03	-	-	7.21 +0.01	1.59 0.00	5.64 -0.08	13.73 -0.04	-	-
G6	7.76 +0.01	-	5.69 +0.01	12.45 -0.02	8.22 -0.02	6.22 +0.02	7.77 +0.02	-	5.60 -0.08	12.44 -0.03	8.22 -0.02	6.25 +0.05	7.77 +0.02	-	5.62 -0.06	12.43 -0.04	8.22 -0.02	6.26 +0.06
C7	7.18 0.00	5.29 0.00	5.31 +0.02	-	-	-	7.18 0.00	5.29 0.00	5.28 -0.02	-	-	-	7.18 0.00	5.28 -0.01	5.28 -0.02	-	-	-
A8	8.07 +0.01	7.00 -0.03	5.60 0.00	-	-	-	8.06 0.00	7.00 -0.03	5.59 -0.01	-	-	-	8.07 +0.01	6.99 -0.04	5.56 -0.04	-	-	-
A9	7.99 0.00	6.93 -0.03	5.62 0.00	-	-	-	8.00 +0.01	6.92 -0.04	5.60 +0.02	-	-	-	8.00 +0.01	6.91 -0.05	5.61 -0.01	-	-	-
A10	7.93 +0.01	7.01 -0.02	5.69 -0.01	-	-	-	7.94 +0.02	7.01 -0.02	5.67 -0.03	-	-	-	7.94 +0.02	6.98 -0.05	5.64 -0.06	-	-	-
A11	7.85 +0.01	7.00 -0.03	5.88 +0.01	-	-	-	7.85 +0.01	7.00 -0.03	5.87 0.00	-	-	-	7.87 +0.03	6.99 -0.04	5.85 -0.02	-	-	-
G12	7.50 -0.01	-	6.15 +0.01	-	-	-	7.49 -0.02	-	6.11 -0.03	-	-	-	7.53 +0.02	-	6.09 -0.05	-	-	-



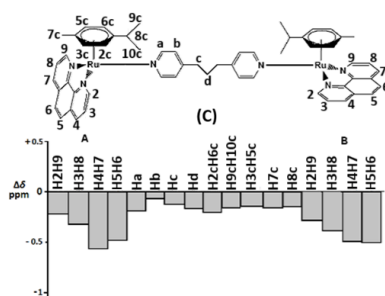
**Εικόνα 3.61:** Μέρος του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του μίγματος (B) -  $d(5'-\text{CTTTGCAAAG}-3')_2$  σε  $r = 0.5, 1$  και  $2$ , καθώς επίσης και του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου και ελεύθερου συμπλόκου σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων ( $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM,  $\text{pH} = 7.0$ ). Στην εικόνα σημειώνεται και η απόδοση των παρατηρούμενων σημάτων. Τα πρωτόνια που σημειώνονται με αστερίσκο είναι εκείνα που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου, ενώ αυτά που σημειώνονται με κόκκινη κουκίδα αφορούν πρωτόνια της *phenB*.

### 3.4.3.3. Αλληλεπίδραση του (C) με το $d(5'-\text{CTTTGCAAAG}-3')_2$ :

Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου (C) με το  $d(5'-\text{CTTTGCAAAG}-3')_2$  είχε ως αποτέλεσμα την άρση της συμμετρίας του συμπλόκου, με αποτέλεσμα την εμφάνιση διπλών σημάτων για όλα τα πρωτόνια των *phen*, καθώς επίσης και για τα πρωτόνια των *cym*. Η άρση της συμμετρίας του συμπλόκου είναι βέβαιο ότι επηρεάζει και τα υπόλοιπα πρωτόνια των υποκαταστάσεων για τα οποία δεν εντοπίστηκαν διπλά σήματα, καθώς η προκαλούμενη διαφοροποίηση είναι αρκετά μικρή. Επίσης, για όλα τα πρωτόνια των υποκαταστατών του συμπλόκου παρατηρείται *upfield* μετατόπιση των σημάτων τους, με τις τιμές να κυμαίνονται από  $-0.05$  έως  $-0.60$  ppm (Πίνακας 3.34). Όπως είναι αναμενόμενο, οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις παρατηρούνται στα σήματα των *phenA* και *phenB*, υποδεικνύοντας ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με το  $d(5'-\text{CTTTGCAAAG}-3')_2$  λαμβάνει χώρα μέσω αυτών (Εικόνα 3.62). Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.34, οι διαφορές στα σήματα των πρωτονίων των *phenA* και *phenB* μεταξύ τους είναι αρκετά μικρές, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στον παρόμοιο τρόπο αλληλεπίδρασης αυτών με το  $d(5'-\text{CTTTGCAAAG}-3')_2$ . Επιπροσθέτως, οι μετατοπίσεις των σημάτων των πρωτονίων των *cym*, οι οποίες παρότι είναι υπαρκτές, είναι σημαντικά μικρότερες από τις αντίστοιχες των πρωτονίων των *phen*, μπορεί να θεωρηθεί ότι έχουν προκληθεί από τις δομικές αλλαγές που προκαλεί στο σύμπλοκο (C) η αλληλεπίδραση με το  $d(5'-\text{CTTTGCAAAG}-3')_2$ . Η ίδια αιτία είναι που προκαλεί και τις ακόμα μικρότερες μετατοπίσεις των σημάτων των πρωτονίων του BL3.

**Πίνακας 3.34:** Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των σημάτων του συμπλόκου (C) (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0) στην ελεύθερη κατάσταση, καθώς και σε αναλογίες ανάμιξης  $r = 0.5, 1$  και  $2$  με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CTTTTGCAAAAAG-3')<sub>2</sub>. Οι τιμές στην παρένθεση εκφράζουν τη διαφορά με τις τιμές για το ελεύθερο σύμπλοκο (C) (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed. Με A και B διαχωρίζονται οι δύο διαφορετικές οντότητες φαινανθρολίνης και p-κουμενίου ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο.

	(C)	r = 0.5		r = 1		r = 2	
		A	B	A	B	A	B
H2H9	10.03	9.83 (-0.20)	9.77 (-0.26)	9.84 (-0.19)	9.78 (-0.25)	9.85 (-0.18)	9.81 (-0.22)
H3H8	8.21	7.91 (-0.30)	7.80 (-0.41)	7.95 (-0.26)	7.83 (-0.38)	7.98 (-0.23)	7.87 (-0.34)
H4H7	8.83	8.23 (-0.60)	8.32 (-0.51)	8.28 (-0.55)	8.36 (-0.47)	8.43 (-0.40)	8.36 (-0.47)
H5H6	8.10	7.63 (-0.47)	7.56 (-0.54)	7.66 (-0.44)	7.58 (-0.52)	7.72 (-0.38)	7.64 (-0.46)
Ha	8.20	8.04 (-0.16)		8.04 (-0.16)		8.05 (-0.15)	
Hb	7.01	6.96 (-0.05)		6.96 (-0.05)		6.95 (-0.06)	
Hc	2.40	2.31 (-0.09)		2.30 (-0.10)		2.30 (-0.10)	
Hd	1.57	1.44 (-0.13)		1.47 (-0.10)		1.46 (-0.11)	
H2cH6c	6.51	6.28 (-0.23)	6.27 (-0.24)	6.29 (-0.22)	6.28 (-0.23)	6.32 (-0.19)	6.30 (-0.21)
H3cH5c	6.14	6.00 (-0.14)	5.98 (-0.16)	6.00 (-0.14)	5.98 (-0.16)	6.00 (-0.14)	5.99 (-0.15)
H9cH10c	0.75	0.63 (-0.13)	0.60 (-0.15)	0.63 (-0.13)	0.60 (-0.15)	0.63 (-0.12)	0.60 (-0.15)
H7c	1.78	1.62 (-0.16)		1.63 (-0.15)		1.64 (-0.14)	
H8c	2.39	2.25 (-0.14)		2.20 (-0.19)		2.22 (-0.17)	



**Εικόνα 3.62:** Ραβδόγραμμα που απεικονίζει τις μεταβολές στα σήματα των πρωτονίων των υποκαταστατών του συμπλόκου (C) κατόπιν της αλληλεπίδρασης με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CTTTTGCAAAAAG-3')<sub>2</sub> σε αναλογία ανάμιξης  $r = 0.5$ .

Όσον αφορά τα μη ανταλλάξιμα πρωτόνια του d(5'-CTTTTGCAAAAAG-3')<sub>2</sub>, παρατηρούνται μικρές μετατοπίσεις σε  $r = 0.5$ , με τις πιο σημαντικές μετατοπίσεις να σημειώνονται για τα σήματα των σακχαρικών πρωτονίων της G6, τα οποία εντοπίζονται upfield μετατοπισμένα κατά 0.03-0.07 ppm. Επίσης, αξιοσημείωτη είναι και η μετατόπιση των H2 των A8 και A11, τα σήματα των οποίων εντοπίστηκαν upfield μετατοπισμένα -0.08 ppm. Αύξηση του  $r$  έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαφοράς στα παρατηρούμενα σήματα για τα προαναφερθέντα πρωτόνια του d(5'-CTTTTGCAAAAAG-3')<sub>2</sub>, με την

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

μετατόπιση των A8H2 και A11H2 να φτάνει τα -0.09 ppm σε  $r = 2$ . Στο ίδιο  $r$ , διακρίνεται, ακόμη, πολύ σημαντική upfield μετατόπιση για το A9H2 (-0.21 ppm). Επίσης, η μετατόπιση του G6H1' σε  $r = 2$ , φτάνει τα -0.10 ppm. Τα παραπάνω αποτελούν ενδείξεις της δέσμωσης του (C) στη μικρή αύλακα του DNA. Τέλος, η αύξηση του  $r$  οδηγεί στην ανάδειξη μιας ακόμα σημαντικής μετατόπισης για τα αρωματικά πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου. Ειδικότερα, το G6H8 σε  $r = 2$  εντοπίζεται στα 7.82 ppm, μετατοπισμένο κατά +0.07 ppm. Η παραπάνω μετατόπιση του σήματος του G6H8 μπορεί να σημαίνει destacking της G6 με τις γειτονικές της βάσεις. Η αύξηση των μετατοπίσεων των σημάτων του  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$  με την αύξηση του  $r$  οφείλεται στο +4 φορτίο του (C), το οποίο, όμοια με τα προηγούμενα, προκαλεί χωρική συμπίκνωση του DNA εξαιτίας των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται.

Αναφορικά με τα ανταλλάξιμα πρωτόνια του  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ , αξίζει να αναφερθεί ότι από  $r = 0.5$  το σήμα του T2N3H πρακτικά χάνεται (Εικόνα 3.63), γεγονός που υποδεικνύει τη ρήξη του δεσμού υδρογόνου μεταξύ του A11/T2N3H. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την περίπτωση του  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  η αλληλεπίδραση του οποίου με το (C) δεν είχε ως αποτέλεσμα τη ρήξη δεσμών υδρογόνου στο ολιγονουκλεοτίδιο. Επιπλέον, η μετατόπιση του σήματος του T3N3H κατά -0.12 ppm, αποτελεί περεταίρω ένδειξη της παρουσίας επιπλέον ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην περιοχή αυτή από τις rhen του (C). Παρά τις δομικές μεταβολές που προκαλεί η παρουσία του (C) τοπικά στις περιοχές που είναι πλούσιες σε βάσεις AT, η B τύπου δομή της έλικας παραμένει ακέραιη.

**Πίνακας 3.35:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$  (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0) στις τρεις αναλογίες ανάμιξης με το σύμπλοκο (C). Σε παρένθεση φαίνονται οι μετατοπίσεις σε σύγκριση με τις τιμές του ολιγονουκλεοτιδίου χωρίς την παρουσία συμπλόκου, σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

	r = 0.5						r = 1						r = 2					
	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H
C1	7.82 -0.01	5.88 -0.01	5.83 +0.01	-	-	-	7.81 -0.02	5.88 -0.01	5.83 +0.01	-	-	-	7.80 -0.03	5.87 -0.02	5.82 0.00	-	-	-
T2	7.58 0.00	1.62 0.00	6.12 -0.03	14.11 -0.09	-	-	7.57 -0.01	1.63 +0.01	6.12 -0.03	n.o.	-	-	7.57 -0.01	1.62 0.00	6.06 0.09	n.o.	-	-
T3	7.45 0.00	1.61 +0.02	6.14 -0.02	13.84 -0.07	-	-	7.45 0.00	1.62 +0.02	6.12 -0.04	13.84 -0.07	-	-	7.46 +0.01	1.61 +0.02	6.09 -0.07	13.79 -0.12	-	-
T4	7.39 -0.01	1.61 +0.03	6.02 -0.01	13.75 -0.02	-	-	7.39 -0.01	1.62 +0.04	5.99 -0.04	13.75 -0.02	-	-	7.39 -0.01	1.61 +0.03	5.95 -0.08	13.75 -0.02	-	-
T5	7.22 +0.02	1.62 +0.03	5.69 -0.03	13.53 -0.04	-	-	7.22 +0.02	1.63 +0.04	5.65 -0.03	13.53 -0.04	-	-	7.24 +0.04	1.63 +0.04	5.62 -0.10	13.51 -0.06	-	-
G6	7.78 +0.03	-	5.64 -0.04	12.33 -0.14	8.21 -0.03	6.31 +0.11	7.80 +0.05	-	5.63 -0.05	12.33 -0.14	8.21 -0.03	6.31 +0.11	7.82 +0.07	-	5.58 -0.10	12.26 -0.21	8.21 -0.03	6.36 +0.16
C7	7.19 +0.01	5.28 -0.01	5.28 -0.02	12.33 -0.14	-	-	7.19 +0.01	5.30 +0.01	5.31 +0.01	12.33 -0.14	-	-	7.20 +0.07	5.32 +0.03	5.23 -0.07	12.26 -0.21	-	-
A8	8.08 +0.02	6.95 -0.08	5.57 -0.03	13.53 -0.04	-	-	8.10 +0.04	6.94 -0.09	5.57 -0.04	13.53 -0.04	-	-	8.12 +0.06	6.94 -0.09	5.52 -0.08	13.51 -0.06	-	-
A9	7.99 0.00	6.92 -0.04	5.61 -0.01	13.75 -0.02	-	-	7.99 0.00	6.90 -0.06	5.58 -0.04	13.75 -0.02	-	-	7.99 0.00	6.75 -0.21	5.52 -0.10	13.75 -0.02	-	-
A10	7.93 +0.01	7.02 -0.01	5.69 -0.01	13.84 -0.07	-	-	7.94 +0.02	7.00 -0.03	5.66 -0.04	13.84 -0.07	-	-	7.95 +0.03	6.99 -0.04	5.61 -0.09	n.o.	-	-
A11	7.85 +0.01	6.95 -0.08	5.88 +0.01	n.o.	-	-	7.86 +0.02	6.94 -0.09	5.84 -0.03	n.o.	-	-	7.87 +0.03	6.94 -0.09	5.75 -0.12	n.o.	-	-
G12	7.43 -0.08	-	6.14 0.00	-	-	-	7.43 -0.08	-	6.13 -0.01	-	-	-	7.57 +0.06	-	6.08 -0.06	-	-	-



άλλες μελέτες που ασχολούνται με την αλληλεπίδραση συμπλόκων του Ru(II) με ολιγονουκλεοτίδια DNA [157]. Επιπροσθέτως, για την αλληλεπίδραση των εναντιομερών του  $[Ru(\text{rhen})_3]^{2+}$  με ολιγονουκλεοτίδια DNA έχει βρεθεί ότι η παρεμβολή είναι ο κύριος μηχανισμός αλληλεπίδρασης με το  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ , ενώ στην περίπτωση του  $d(5'-GTGCAC-3')_2$ , η οποία περιέχει βάσεις A και T, η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα μέσω επιφανειακής αλληλεπίδρασης [158]. Κατά συνέπεια φαίνεται το (A) να αλληλεπιδρά αποτελεσματικότερα με ολιγονουκλεοτίδια πλούσια σε βάσεις CG.

Το (B) δεσμεύεται και στα τρία ολιγονουκλεοτίδια μέσω της μικρής αύλακας [129]. Ειδική αναφορά αξίζει να γίνει στο γεγονός η αλληλεπίδραση του συμπλόκου (B) με το  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  δεν έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση κανενός δεσμού υδρογόνου στη διπλή έλικα αυτού, όπως και με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  [129]. Εντούτοις, όταν το ίδιο σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$  παρατηρείται διάσπαση του δεσμού υδρογόνου του T4N3H με την A9. Φαίνεται συνεπώς ότι η διάσπαση των δεσμών υδρογόνου της διπλής έλικας για το σύμπλοκο (B) επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το είδος των βάσεων και τη σχετική αλληλουχία.

Περνώντας στη συνέχεια στο σύμπλοκο (C), παρατηρείται ότι προκαλεί ρήξη στους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ T2:A11 στο  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ , ενώ στην περίπτωση του  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  και του  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  προκαλεί επιμήκυνση αυτών μόνο [129]. Τέτοιου είδους εντοπισμένες διασπάσεις δεσμών υδρογόνου παρομοιάζουν στη δράση των ελικασών, οι οποίες βοηθούν στην έναρξη της διαδικασίας της αντιγραφής του DNA, χωρίζοντας τους δύο κλώνους μεταξύ τους [159]. Από τα παραπάνω μπορεί να θεωρηθεί ότι το (A) επηρεάζει περισσότερο ζεύγη CG, προκαλώντας ακόμη και ρήξη των δεσμών υδρογόνου, ενώ τα (B) (BL2) και (C) (BL3) φαίνεται να έχουν το ίδιο αποτέλεσμα σε ζεύγη AT. Είναι εμφανές, λοιπόν, ότι οι διαφορετικοί βαθμοί ελευθερίας και το μήκος των BL1, BL2 και BL3 επηρεάζουν την συμπεριφορά των (A) - (C). Παρόλα αυτά, και τα τρία σύμπλοκα δεσμεύονται στη μικρή αύλακα του  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ .

#### **3.4.4. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων (9) - (11) με το ολιγονουκλεοτίδιο $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ με φασματοσκοπία NMR:**

##### **3.4.4.1. Αλληλεπίδραση του (9) με το $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ :**

Η τιτλοδότηση του  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  με το σύμπλοκο (9), προκαλεί σημαντικές αλλαγές στα σήματα των πρωτονίων της rhen και της bzq. Υπενθυμίζεται ότι με «'» επισημαίνονται τα σήματα των πρωτονίων των υποκαταστατών που είναι ενταγμένοι στο μεταλλικό κέντρο του Ru(II) το οποίο φέρει τη rhen ως χηλικό υποκαταστάτη. Για το H2 της bzq, εντοπίστηκαν τρία διαφορετικά σήματα σε αναλογία ανάμιξης  $r = 0.5$ , τα οποία είναι upfield μετατοπισμένα, από -0.13 έως -0.48 ppm (Πίνακας 3.36), ένδειξη της ύπαρξης τριών διαφορετικών χημικών περιβαλλόντων για τη bzq. Τα σήματα των υπολοίπων πρωτονίων του υποκαταστάτη, όπου η εκτεταμένη διεύρυνση επέτρεψε την απόδοσή τους, βρέθηκαν επίσης upfield μετατοπισμένα μέχρι και κατά -0.50 ppm. Η ύπαρξη πολλαπλών σημάτων για ίδια πρωτόνια της bzq υποδεικνύει την αλληλεπίδρασή της με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  με τουλάχιστον δύο διακριτούς τρόπους. Εξαιτίας του μεγέθους του ενός σετ μετατοπίσεων, οι οποίες φτάνουν μέχρι και τα -0.50 ppm, μπορεί να θεωρηθεί ότι ο ένας τρόπος αλληλεπίδρασης της bzq με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  είναι μέσω παρεμβολής. Αντίστοιχα, ο δεύτερος τρόπος αλληλεπίδρασής της με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  μπορεί να είναι η δέσμευση στην αύλακα του DNA. Με παρόμοιο τρόπο, παρατηρείται η διάσπαση του σήματος των H2'H9' της rhen σε τρία σήματα, upfield μετατοπισμένα, από -0.10 έως -0.39 ppm. Το παραπάνω φαινόμενο υποδεικνύει ότι οι τρόποι αλληλεπίδρασης της rhen με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  είναι

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

παρόμοιοι με της bzq. Η αύξηση της ποσότητας του (9) οδηγεί σε μείωση των μετατοπίσεων, πιθανώς λόγω κορεσμού ο οποίος επιτυγχάνεται ήδη από χαμηλά *r*. Ακόμη, παρατηρείται ότι και τα H του BL1 εμφανίζουν πολλαπλά σήματα, εν αντιθέσει με τα (A) - (C) για τα οποία οι προκαλούμενες διαφοροποιήσεις ήταν μικρότερες από τη διακριτική ικανότητα του οργάνου λήψης των φασμάτων.

**Πίνακας 3.36:** Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των σημάτων του συμπλόκου (9) (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0) στην ελεύθερη κατάσταση, καθώς και σε αναλογίες ανάμιξης *r* = 0.5, 1 και 2 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Οι τιμές στην παρένθεση εκφράζουν τη διαφορά με τις τιμές για το ελεύθερο σύμπλοκο (9) (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

Protons	(9)	<i>r</i> = 0.5			<i>r</i> = 1			<i>r</i> = 2			Protons	(9)	<i>r</i> = 0.5			<i>r</i> = 1			<i>r</i> = 2			Protons	(9)	<i>r</i> = 0.5			<i>r</i> = 1			<i>r</i> = 2				
		A	B	C	A	B	C	A	B	C			A	B	C	A	B	C	A	B	C			A	B	C	A	B	C	A	B	C		
H2'H9'	10.04	9.94 (-0.10)	9.72 (-0.32)	9.65 (-0.39)	9.96 (-0.08)	9.78 (-0.26)	9.69 (-0.35)	9.99 (-0.05)	9.92 (-0.12)	9.82 (-0.22)	H2c'H6c'	6.52	6.42 (-0.10)	6.38 (-0.14)	-	6.44 (-0.08)	6.42 (-0.10)	-	6.48 (-0.04)	6.45 (-0.07)	-	Ha'	8.43	8.35 (-0.08)	8.39 (+0.04)	8.35 (-0.08)	8.36 (-0.07)	8.39 (-0.04)	8.35 (-0.08)	8.39 (-0.04)	8.39 (0.00)	8.43 (0.00)	8.39 (-0.04)	
H3'H8'	8.22	8.05 (-0.17)	n.o.	7.58 (-0.64)	8.08 (-0.14)	-	-	8.12 (-0.10)	-	-	H3c'H5c'	6.16	6.19 (+0.03)	6.16 (0.00)	-	6.18 (+0.02)	6.16 (0.00)	-	6.17 (+0.01)	6.16 (0.00)	-	Hb'	7.33	7.38 (+0.05)	-	7.39 (+0.04)	7.37 (+0.04)	7.43 (+0.10)	7.37 (+0.04)	7.37 (+0.04)	7.44 (+0.11)	7.36 (+0.05)		
H4'H7'	8.78	8.34 (-0.44)	-	-	8.34 (-0.44)	-	-	8.39 (-0.39)	-	-	H7c'	1.77	1.80 (+0.03)	-	-	1.79 (+0.02)	-	-	1.78 (+0.01)	-	-	-	Ha	8.46	8.31 (-0.15)	8.31 (-0.15)	-	8.33 (-0.13)	8.33 (-0.13)	-	8.35 (-0.11)	8.33 (-0.13)	-	
H5'H6'	7.98	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	H8c'	2.36	2.31 (-0.05)	-	-	2.31 (-0.05)	-	-	2.31 (-0.05)	-	-	Hb	7.13	7.16 (+0.03)	-	-	7.16 (+0.03)	7.15 (+0.02)	-	7.16 (+0.03)	7.13 (+0.00)	-		
H2	9.73	9.59 (-0.14)	9.25 (-0.48)	9.60 (-0.13)	9.59 (-0.14)	9.28 (-0.45)	-	9.61 (-0.12)	9.40 (-0.33)	-	H9c'	0.72	0.67 (-0.05)	-	-	0.68 (-0.04)	-	-	0.69 (-0.03)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H3	7.70	7.49 (-0.21)	-	-	7.51 (-0.19)	-	-	7.56 (-0.14)	-	-	H2c	5.96	5.89 (-0.07)	-	-	5.80 (-0.16)	-	-	5.74 (-0.22)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H4	8.30	7.80 (-0.50)	8.12 (-0.18)	-	7.88 (-0.42)	-	-	7.99 (-0.31)	-	-	H3c	5.33	5.30 (-0.03)	-	-	5.27 (-0.06)	-	-	5.24 (-0.09)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H5	7.51	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	H5c	6.03	6.10 (+0.07)	-	-	6.05 (+0.02)	-	-	5.97 (-0.06)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H6	7.53	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	H6c	5.81	5.61 (-0.20)	-	-	5.59 (-0.22)	-	-	5.59 (-0.22)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	7.42	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	H7c	1.52	1.54 (+0.02)	-	-	1.56 (+0.04)	-	-	1.57 (+0.05)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H8	7.50	7.18 (-0.32)	-	-	7.20 (-0.30)	-	-	7.23 (-0.27)	-	-	H8c	1.94	1.97 (+0.03)	-	-	2.00 (+0.06)	-	-	2.04 (+0.10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H9	8.45	8.30 (-0.15)	-	-	8.32 (-0.13)	-	-	8.34 (-0.11)	-	-	H9c	0.47	0.46 (-0.01)	-	-	0.38 (-0.09)	-	-	0.30 (-0.17)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
											H10c	0.38	0.34 (-0.04)	-	-	0.32 (-0.06)	-	-	0.25 (-0.13)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Η αλληλεπίδραση του (9) με το d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> προκάλεσε σημαντικές μεταβολές και στα σήματα των πρωτονίων του DNA. Ειδικότερα, σε *r* = 0.5, τα σήματα των H6 των C και T και H8 των G και A, βρέθηκαν ως επί το πλείστον downfield μετατοπισμένα, με τη μετατόπιση να φτάνει ακόμα και τα +0.14 ppm για το G10H8. Επίσης, μεγάλες downfield μετατοπίσεις παρατηρούνται και για τα C3H6, T7H6, A5H8 και A6H8, από +0.07 έως +0.10 ppm (Πίνακας 3.37). Οι παραπάνω μετατοπίσεις μπορούν να σημαίνουν το destacking των βάσεων του DNA. Η παρεμβολή είτε της bzq είτε της rhen μπορεί να είναι η αιτία του φαινομένου αυτού, αφού είναι γνωστό πως το destacking των βάσεων του DNA μπορεί να προκληθεί από την παρεμβολή ενός παρεμβολέα μεταξύ των βάσεων του DNA [160]. Το παραπάνω φαινόμενο παρεμβολής, είναι πολύ πιθανό να λαμβάνει χώρα από την πλευρά της μικρής αύλακας του DNA, καθώς για πρωτόνια όπως το A5H2 και το A6H2, τα οποία βρίσκονται στη μικρή αύλακα, παρατηρείται εκτεταμένη διεύρυνση των σημάτων τους. Ακόμη, σημαντικές είναι και οι μετατοπίσεις των σακχαρικών πρωτονίων G4H1' (-0.17 ppm) και A5H1' (-0.19 ppm), τα οποία επίσης βρίσκονται στη μικρή αύλακα του DNA. Θεωρώντας, λοιπόν, ότι το αρωματικό σύστημα είτε της bzq είτε της rhen αλληλεπιδρά με το κεντρικό μέρος του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, και επιπλέον λαμβάνοντας υπόψη ότι η απόσταση μεταξύ των δύο μεταλλικών κέντρων είναι περίπου 10-11 Å [129], καθώς και ότι η απόσταση μεταξύ των διαδοχικών βάσεων του DNA B τύπου είναι περίπου 3.4 Å [161], το δεύτερο μεταλλικό κέντρο μπορεί να βρίσκεται κοντά είτε στην περιοχή των G2-C3-G4 είτε των T7-T8-C9. Τα δεδομένα από τα φάσματα <sup>1</sup>H NMR, δείχνουν ότι και τα δύο ενδεχόμενα είναι πιθανά, καθώς παρατηρούνται μεταβολές και στις δύο προαναφερθείσες περιοχές. Πιο συγκεκριμένα, τα σήματα των T7CH<sub>3</sub> και T8CH<sub>3</sub> βρέθηκαν downfield μετατοπισμένα, κατά +0.09 και +0.13 ppm, αντίστοιχα. Ακόμη, τα σήματα των C3H5 και C9H5 εντοπίστηκαν

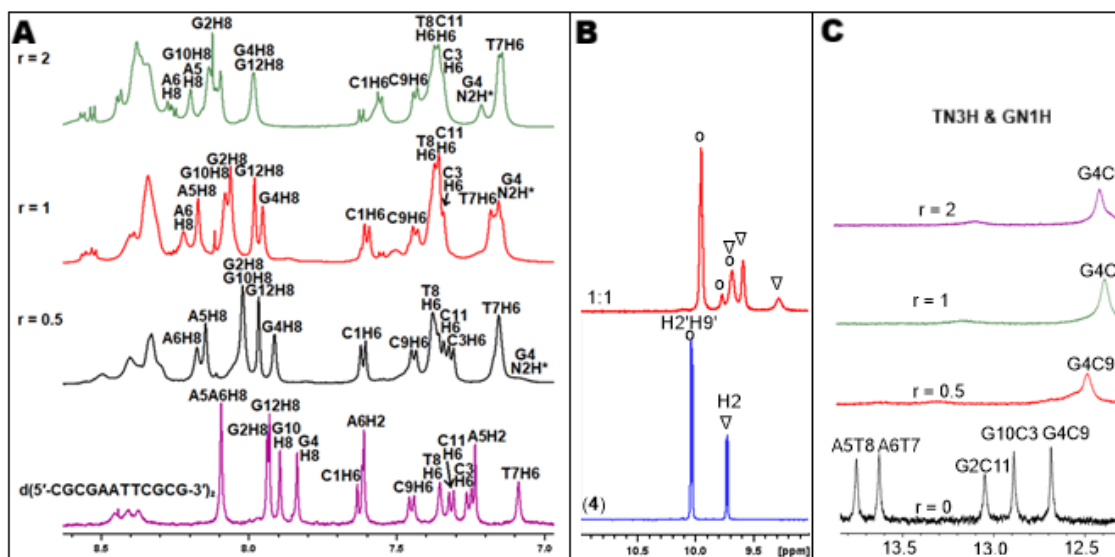
### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

σημαντικά downfield μετατοπισμένα κατά +0.15, +0.24 ppm, αντίστοιχα. Όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν ότι το (9) αλληλεπιδρά και με τις δύο αυτές περιοχές του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Η αύξηση του r, είχε ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση των αρχικά παρατηρούμενων μετατοπίσεων. Φαίνεται, λοιπόν, ότι παρόλο που το (9) είναι +3 φορτισμένο, το φορτίο του είναι αρκετά υψηλό ώστε να προκαλείται συμπύκνωση (condensation) του DNA, όπως στις περιπτώσεις των (A) - (C), με αποτέλεσμα την αύξηση των μετατοπίσεων των H του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> με την αύξηση του r, παρά την ταυτόχρονη μείωση αυτών των H του (9), η οποία υποδεικνύει κορεσμό του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> από μικρά r.

**Πίνακας 3.37:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0) στις τρεις αναλογίες ανάμιξης με το σύμπλοκο (9). Σε παρένθεση φαίνονται οι μετατοπίσεις σε σύγκριση με τις τιμές του ολιγονουκλεοτιδίου χωρίς την παρουσία συμπλόκου, σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

	r = 0.5									r = 1									r = 2								
	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C)			H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C)			H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C)											
				GN1H/TN3HC	GN2H*	(n.b.) C/GN2H				GN1H/TN3HC	GN2H*	(n.b.) C/GN2H				GN1H/TN3HC	GN2H*	(n.b.) C/GN2H									
<b>C1</b>	7.62 (0.00)	6.00 (+0.12)	5.88 (+0.16)	-	n.o.	n.o.	7.61 (-0.01)	6.02 (+0.14)	5.93 (+0.21)	-	n.o.	n.o.	7.57 (-0.05)	6.02 (+0.14)	5.89 (+0.17)	-	n.o.	n.o.									
<b>G2</b>	8.03 (+0.10)	-	5.75 (-0.13)	12.68 (-0.36)	8.43 (-0.01)	6.68 (+0.11)	8.07 (+0.14)	-	5.71 (-0.17)	12.51 (-0.53)	8.41 (-0.03)	6.75 (+0.18)	8.11 (+0.18)	-	5.65 (-0.23)	12.35 (-0.69)	8.40 (-0.04)	6.81 (+0.24)									
<b>C3</b>	7.33 (+0.08)	5.50 (+0.15)	5.62 (+0.06)	12.63 (-0.25)	8.37 (+0.01)	6.63 (+0.22)	7.36 (+0.11)	5.57 (+0.22)	5.65 (+0.09)	12.41 (-0.47)	8.39 (+0.03)	6.79 (+0.38)	7.38 (+0.13)	5.54 (+0.19)	5.65 (+0.09)	12.38 (-0.50)	8.40 (+0.04)	6.91 (+0.50)									
<b>G4</b>	7.92 (+0.09)	-	5.25 (-0.17)	12.52 (-0.16)	8.52 (+0.12)	7.07 (+0.28)	7.96 (+0.13)	-	5.15 (-0.27)	12.42 (-0.26)	8.56 (+0.16)	7.23 (+0.44)	7.99 (+0.16)	-	5.09 (-0.33)	12.37 (-0.31)	8.60 (+0.20)	7.35 (+0.56)									
<b>A5</b>	8.16 (+0.07)	n.o.	5.78 (-0.19)	n.o.	-	-	8.18 (+0.09)	n.o.	5.66 (-0.31)	n.o.	-	-	8.20 (+0.11)	n.o.	5.56 (-0.41)	n.o.	-	-									
<b>A6</b>	8.19 (+0.10)	n.o.	6.11 (-0.02)	13.35 (-0.27)	-	-	8.23 (+0.14)	n.o.	6.11 (-0.02)	13.18 (-0.44)	-	-	8.28 (+0.19)	n.o.	6.05 (-0.08)	13.06 (-0.56)	-	-									
<b>T7</b>	7.16 (+0.07)	1.34 (+0.09)	5.83 (-0.05)	13.35 (-0.27)	-	-	7.18 (+0.09)	1.38 (+0.13)	5.80 (-0.08)	13.18 (-0.44)	-	-	7.19 (+0.10)	1.45 (+0.20)	5.74 (-0.14)	13.06 (-0.56)	-	-									
<b>T8</b>	7.39 (+0.04)	1.64 (+0.13)	6.03 (-0.05)	n.o.	-	-	7.39 (+0.04)	1.70 (+0.19)	6.00 (-0.08)	n.o.	-	-	7.43 (+0.08)	1.75 (+0.24)	6.02 (-0.06)	n.o.	-	-									
<b>C9</b>	7.45 (+0.01)	5.84 (+0.24)	5.73 (+0.09)	12.52 (-0.16)	8.52 (+0.12)	7.07 (+0.28)	7.44 (0.00)	5.94 (+0.34)	5.76 (+0.12)	12.42 (-0.26)	8.56 (+0.16)	7.23 (+0.44)	7.44 (0.00)	6.03 (+0.43)	5.73 (+0.11)	12.37 (-0.31)	8.60 (+0.20)	7.35 (+0.56)									
<b>G10</b>	8.03 (+0.14)	-	5.77 (-0.06)	12.63 (-0.25)	8.37 (+0.01)	6.63 (+0.22)	8.08 (+0.19)	-	5.66 (-0.17)	12.41 (-0.47)	8.39 (+0.03)	6.79 (+0.38)	8.14 (+0.25)	-	5.61 (-0.22)	12.38 (-0.50)	8.40 (+0.04)	6.91 (+0.50)									
<b>C11</b>	7.35 (+0.04)	5.48 (+0.06)	5.62 (-0.10)	12.68 (-0.36)	8.43 (-0.01)	6.68 (+0.11)	7.38 (+0.07)	5.51 (+0.09)	5.51 (-0.21)	12.51 (-0.53)	8.41 (-0.03)	6.75 (+0.18)	7.39 (+0.08)	5.63 (+0.21)	5.48 (-0.24)	12.35 (-0.69)	8.40 (-0.04)	6.81 (+0.24)									
<b>G12</b>	7.98 (+0.06)	-	6.10 (-0.03)	-	n.o.	n.o.	7.99 (+0.07)	-	6.06 (-0.07)	-	n.o.	n.o.	7.99 (+0.07)	-	5.99 (-0.14)	-	n.o.	n.o.									

Σε r = 0.5, τα σήματα των T7N3H, T8N3H, G2N2H και G10N2H του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> ήταν εκτενώς διευρυμμένα (Εικόνα 3.64) και ήταν πρακτικά μη ανιχνεύσιμα, υποδεικνύοντας ρήξη των δεσμών υδρογόνου στις θέσεις αυτές. Σε r = 1 το φαινόμενο αυτό εντείνεται και παρατηρείται και για τα αμινικά πρωτόνια C11/G2N2H\* και C3/G10N2H\*. Αντιθέτως, τα σήματα των G4N1H, C9/G4N2H\* δεν επηρεάζονται σημαντικά από την παρουσία του διπυρηνικού συμπλόκου (9), όντας ελαφρώς μετατοπισμένα (-0.01 και +0.01 ppm, αντίστοιχα). Επιπλέον, τα σήματα των n.b. C11/G2N2H, C9/G4N2H και C3/G10N2H βρέθηκαν downfield μετατοπισμένα, κατά +0.11, +0.28 και +0.22 ppm, αντίστοιχα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συνάδουν με ρήξη των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA στο κεντρικό μέρος της αλληλουχίας. Ακόμη, η πολύ έντονη παρατηρούμενη μετατόπιση του σήματος του ίμινο πρωτονίου G4N1H, η οποία σε r = 2 φτάνει τα -0.31 ppm, είναι ενδεικτική της επιμήκυνσης του δεσμού υδρογόνου μεταξύ C9:G4, ο οποίος, ωστόσο δεν οδηγείται σε πλήρη ρήξη, καθώς το σήμα του G4N1H είναι ανιχνεύσιμο σε όλα τα r.



**Εικόνα 3.64:** Επιλεγμένες περιοχές του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του μίγματος (9) -  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG-3}')_2$  σε  $r = 0.5$ ,  $r = 1$  και  $r = 2$  καθώς επίσης και του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου και ελεύθερου συμπλόκου σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων ( $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM,  $\text{pH} = 7.0$ ). Στην εικόνα σημειώνεται και η απόδοση των παρατηρούμενων σημάτων. Τα πρωτόνια που σημειώνονται με αστερίσκο είναι εκείνα που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου. (A) Περιοχή 7.0 - 8.6 ppm. (B) Περιοχή 9.0 - 11.0 ppm του αδέσμευτου συμπλόκου (9) και σε αναλογία ανάμιξης  $r = 1$  με το ολιγονουκλεοτίδιο. Με κύκλο επισημαίνονται τα σήματα που αντιστοιχούν σε  $\text{H}2'\text{H}9'$ , ενώ με τρίγωνο αυτά που αντιστοιχούν σε  $\text{H}2$ . (C) Περιοχή των ανταλλάξιμων ίμινο πρωτονίων.

#### 3.4.4.2. Αλληλεπίδραση του (10) με το $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG-3}')_2$ :

Συνεχίζοντας, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του συμπλόκου (10) με το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG-3}')_2$ . Σε  $r = 0.5$ , παρατηρήθηκαν διπλά σήματα για τα  $\text{H}2'\text{H}9'$  της rhen και τα  $\text{H}2$  της bzq. Τα σήματα αυτά ήταν upfield μετατοπισμένα σε σχέση με το ελεύθερο σύμπλοκο (10). Ειδικότερα, τα δύο σήματα των  $\text{H}2'\text{H}9'$  ήταν μετατοπισμένα κατά -0.05 και -0.08 ppm, ενώ αυτά των  $\text{H}2$  κατά -0.12 και -0.16 ppm (Πίνακας 3.38). Φαίνεται λοιπόν, ότι η αλληλεπίδραση του (10) με το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG-3}')_2$  προκαλεί μεγαλύτερες μετατοπίσεις στο  $\text{H}2$  της bzq σε σύγκριση με το  $\text{H}2'\text{H}9'$  της rhen. Ωστόσο, αρκετά μεγαλύτερες μετατοπίσεις σημειώθηκαν για τα  $\text{H}5'\text{H}6'$ , για τα οποία επίσης εντοπίστηκαν διπλά σήματα, καθώς επίσης και για τα  $\text{H}5$  και  $\text{H}6$  της bzq. Τα  $\text{H}5'\text{H}6'$  ήταν μετατοπισμένα κατά -0.29 και -0.23 ppm, το  $\text{H}5$  κατά -0.26 ppm, ενώ το  $\text{H}6$  κατά -0.21 ppm. Υπενθυμίζεται ότι τα  $\text{H}5'\text{H}6'$ ,  $\text{H}5$  και  $\text{H}6$  βρίσκονται στο εξωτερικό τμήμα του συστήματος δακτυλίων των rhen και bzq. Αντίστοιχα, παρατηρούνται upfield μετατοπισμένα σήματα και για τα υπόλοιπα πρωτόνια της rhen και της bzq. Οι μετατοπίσεις αυτές είναι μικρότερες για τα εσωτερικά πρωτόνια και γίνονται μεγαλύτερες σταδιακά στα εξωτερικά πρωτόνια,  $\text{H}5'\text{H}6'$  και  $\text{H}5$  και  $\text{H}6$  αντίστοιχα. Μπορεί, συνεπώς, να θεωρηθεί, εξαιτίας των ισχυρών μετατοπίσεων που σημειώθηκαν, ότι και η rhen και η bzq αλληλεπιδρούν με το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG-3}')_2$ , κυρίως μέσω του εξωτερικού τμήματός τους. Το μέγεθος των μετατοπίσεων είναι συγκρίσιμο με αυτές που σημειώθηκαν στην περίπτωση του συμπλόκου (9), και συνάδουν με αλληλεπίδραση με το DNA μέσω δέσμησης στις αλυσίδες του. Σε αντίθεση με τα προηγούμενα σύμπλοκα, η αύξηση του  $r$  δεν οδηγεί σε μείωση των μετατοπίσεων των  $\text{H}$  του (10), υποδεικνύοντας ότι δεν επιτυγχάνεται κορεσμός από μικρά  $r$ . Επίσης, για τα  $\text{H}$  των υπόλοιπων υποκαταστατών δεν βρέθηκαν διπλά σήματα ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG-3}')_2$ , εκτός από τα  $\text{H}$  του πυριδινικού δακτυλίου του BL2 που βρίσκεται στην πλευρά

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

της βζα. Οι μετατοπίσεις των πρωτονίων του δακτυλίου αυτού ήταν μάλιστα μεγαλύτερες σε σχέση με τον πυριδινικό δακτύλιο που βρίσκεται κοντά στη ρhen, υποδεικνύοντας μεγαλύτερη μεταβολή του χημικού περιβάλλοντος στη βζα παρά στη ρhen.

**Πίνακας 3.38:** Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των σημάτων του συμπλόκου (10) (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0) στην ελεύθερη κατάσταση, καθώς και σε αναλογίες ανάμιξης r = 0.5, 1 και 2 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Οι τιμές στην παρένθεση εκφράζουν τη διαφορά με τις τιμές για το ελεύθερο σύμπλοκο (10) (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

Protons	(10)	r=0.5		r=1		r=2		Protons	(10)	r=0.5		r=1		r=2		Protons	(10)	r=0.5		r=1		r=2	
		A	B	A	B	A	B			A	B	A	B	A	B			A	B	A	B	A	B
H2'H9'	9.97	9.92 (-0.05)	9.89 (-0.08)	9.93 (-0.06)	9.90 (-0.07)	9.97 (0.00)	9.92 (-0.05)	H2c'H6c'	6.49	6.42 (-0.07)	-	6.42 (-0.07)	-	6.44 (-0.05)	-	Ha'	7.99	8.00 (+0.01)	-	8.01 (+0.02)	-	8.02 (+0.03)	-
H3'H8'	8.24	8.16 (-0.08)	8.07 (-0.17)	8.17 (-0.07)	8.10 (-0.14)	8.18 (-0.06)	8.12 (-0.05)	H3c'H5c'	5.76	5.82 (+0.06)	-	5.84 (+0.08)	-	5.85 (+0.07)	-	Hb'	6.80	6.87 (+0.07)	-	6.85 (+0.05)	-	6.83 (+0.03)	-
H4'H7'	8.85	8.67 (-0.18)	8.62 (-0.23)	8.68 (-0.17)	8.64 (-0.21)	8.70 (-0.15)	8.66 (-0.19)	H7c'	0.82	1.04 (+0.22)	-	1.05 (+0.23)	-	1.08 (+0.26)	-	Hc'	2.49	2.50 (+0.01)	-	2.49 (0.00)	-	2.49 (0.00)	-
H5'H6'	8.10	7.81 (-0.29)	7.87 (-0.23)	7.83 (-0.27)	7.88 (-0.22)	7.85 (-0.25)	7.89 (-0.21)	H8c'	2.33	2.28 (-0.05)	-	2.28 (-0.05)	-	2.28 (-0.05)	-	Ha	8.05	8.04 (-0.01)	8.02 (-0.03)	8.03 (-0.02)	8.00 (-0.05)	7.99 (-0.06)	7.98 (-0.07)
H2	9.75	9.63 (-0.12)	9.59 (-0.16)	9.62 (-0.13)	9.58 (-0.17)	9.61 (-0.14)	9.58 (-0.17)	H9c'10c'	0.69	0.64 (-0.05)	-	0.64 (-0.05)	-	0.64 (-0.05)	0.65 (-0.04)	Hb	6.42	6.61 (+0.19)	6.56 (+0.14)	6.55 (+0.13)	6.50 (+0.08)	6.49 (+0.07)	6.44 (+0.02)
H3	7.71	7.55 (-0.16)	7.41 (-0.30)	7.55 (-0.16)	7.42 (-0.29)	7.55 (-0.16)	7.43 (-0.28)	H2c	6.07	5.91 (-0.16)	-	5.89 (-0.18)	-	5.85 (-0.22)	-	Hc	2.49	2.50 (+0.01)	-	2.49 (0.00)	-	2.49 (0.00)	-
H4	8.29	8.06 (-0.23)	7.99 (-0.30)	8.02 (-0.27)	7.98 (-0.31)	8.00 (-0.29)	7.95 (-0.34)	H3c	5.27	5.22 (-0.04)	-	5.22 (-0.05)	-	5.20 (-0.07)	-								
H5	7.49	7.23 (-0.26)	-	7.20 (-0.29)	-	7.20 (-0.29)	-	H5c	6.00	5.90 (-0.10)	-	5.89 (-0.11)	-	5.87 (-0.13)	-								
H6	7.44	7.23 (-0.21)	-	7.21 (-0.23)	-	7.18 (-0.26)	-	H6c	5.83	5.70 (-0.13)	-	5.69 (-0.14)	-	5.67 (-0.16)	-								
H7	7.36	7.17 (-0.19)	-	7.14 (-0.22)	-	7.10 (-0.26)	-	H7c	1.26	1.24 (-0.02)	-	1.22 (-0.04)	-	1.19 (-0.07)	-								
H8	7.58	7.34 (-0.24)	-	7.30 (-0.28)	-	7.31 (-0.27)	-	H8c	2.00	1.93 (-0.07)	-	1.89 (-0.11)	-	1.85 (-0.15)	-								
H9	8.56	8.39 (-0.17)	-	8.38 (-0.18)	-	8.36 (-0.20)	-	H9c	0.55	0.43 (-0.12)	-	0.39 (-0.16)	-	0.38 (-0.17)	-								
								H10c	0.51	0.40 (-0.11)	-	0.39 (-0.12)	-	0.37 (-0.14)	-								

Η προσθήκη συμπλόκου (10) στο διάλυμα του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> προκαλεί σημαντικές μεταβολές και στα σήματα των πρωτονίων του ολιγονουκλεοτιδίου. Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου (10) προκαλεί αρκετά μικρότερες downfield μετατοπίσεις στα σήματα των αρωματικών πρωτονίων των βάσεων του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, οι οποίες κυμαίνονται από +0.01 έως +0.06 ppm σε r = 0.5, σε σύγκριση με το (9). Οι περισσότερες μετατοπίσεις σημειώνεται για Η τα οποία βρίσκονται σε βάσεις που είναι στα άκρα της αλληλουχίας, ειδικότερα των ζευγών G2:C11, C3:G10 και G4:C9. Τα σήματα των πρωτονίων και οι μετατοπίσεις τους σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο φαίνονται στον Πίνακα 3.39. Η αύξηση σε r = 1 και 2 οδήγησε σε αύξηση και των παρατηρούμενων μετατοπίσεων, όπως αναμένονταν εξαιτίας της μη επίτευξης κορεσμού σε μικρά r αλλά και λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με το +3 φορτισμένο σύμπλοκο (10). Οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις σημειώθηκαν για τα C3H5 (+0.06 ppm σε r = 0.5) και C9H5 (+0.05 ppm σε r = 0.5). Καθώς οι δύο βάσεις βρίσκονται αρκετά μακριά η μία από την άλλη, είναι πιθανή η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση δύο μονάδων του (10) με το d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> ταυτόχρονα, στα άκρα της διπλής έλικας, και ειδικότερα στις αλληλουχίες G2-C3-G4 και C9-G10-C11, που αναφέρθηκαν και προηγουμένως. Επιπροσθέτως, σημειώνονται οι upfield

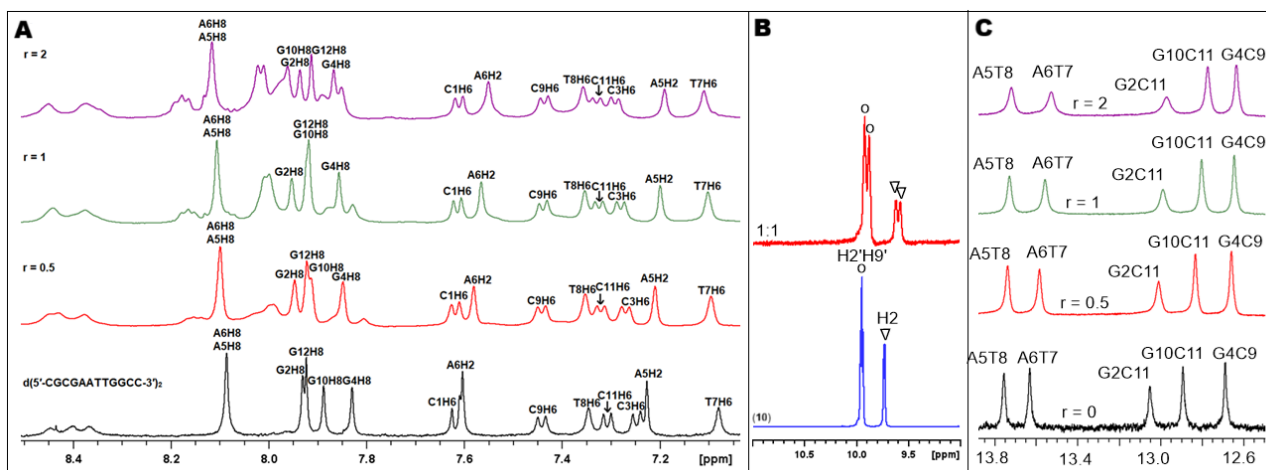
### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

μετατοπίσεις των G2H1' (-0.05 ppm), C11H1' (-0.03 ppm) και G12H1' (-0.05 ppm). Σε  $r = 2$  σημειώθηκε αρκετά μεγάλη upfield μετατόπιση για το G12H1' κατά -0.16 ppm. Καθώς το πρωτόνιο αυτό βρίσκεται στη μικρή αύλακα, υποδεικνύεται παρουσία επιπλέον ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην μικρή αύλακα, η οποία οδηγεί στην προστασία του G12H1'. Ωστόσο, τα H5, H6 και H8 που αναφέρθηκαν παραπάνω βρίσκονται στη μεγάλη αύλακα. Επομένως, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση του (10) με το d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> να λαμβάνει χώρα μέσω και της μεγάλης και της μικρής αύλακας της διπλής έλικας.

**Πίνακας 3.39:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0) στις τρεις αναλογίες ανάμιξης με το σύμπλοκο (10). Σε παρένθεση φαίνονται οι μετατοπίσεις σε σύγκριση με τις τιμές του ολιγονουκλεοτιδίου χωρίς την παρουσία συμπλόκου, σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

	r = 0.5						r = 1						r = 2					
	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3HC/ GN2H*	(W-C) GN2H*	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3HC/ GN2H*	(W-C) GN2H*	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3HC/ GN2H*	(W-C) GN2H*	(n.b.) C/GN2H
C1	7.63 (+0.01)	5.92 (+0.04)	5.77 (+0.05)	-	n.o.	n.o.	7.62 (0.00)	5.91 (+0.03)	5.77 (+0.05)	-	n.o.	n.o.	7.61 (-0.01)	5.91 (+0.03)	5.77 (+0.05)	-	n.o.	n.o.
G2	7.95 (+0.02)	-	5.83 (-0.05)	13.02 (-0.02)	8.44 (0.00)	6.61 (+0.04)	7.96 (+0.03)	-	5.82 (-0.06)	12.99 (-0.05)	8.46 (+0.02)	6.63 (+0.06)	7.96 (+0.03)	-	5.81 (-0.07)	12.96 (-0.08)	8.47 (+0.03)	6.64 (+0.07)
C3	7.28 (+0.03)	5.41 (+0.06)	5.59 (+0.03)	12.84 (-0.04)	8.39 (+0.03)	6.48 (+0.07)	7.28 (+0.03)	5.43 (+0.08)	5.59 (+0.03)	12.81 (-0.07)	8.39 (+0.03)	6.50 (+0.09)	7.29 (+0.04)	5.45 (+0.10)	5.59 (+0.03)	12.78 (-0.10)	8.39 (+0.03)	6.52 (+0.11)
G4	7.85 (+0.02)	-	5.40 (-0.02)	12.67 (-0.01)	8.43 (+0.03)	6.85 (+0.06)	7.86 (+0.03)	-	5.38 (-0.04)	12.65 (-0.03)	8.44 (+0.04)	6.86 (+0.07)	7.87 (+0.04)	-	5.35 (-0.07)	12.64 (-0.04)	8.45 (+0.05)	6.90 (+0.11)
A5	8.10 (+0.01)	7.21 (-0.02)	5.96 (-0.01)	13.75 (0.00)	-	-	8.11 (+0.02)	7.20 (-0.03)	5.93 (-0.01)	13.73 (-0.02)	-	-	8.12 (+0.03)	7.19 (-0.04)	5.91 (-0.06)	13.72 (-0.03)	-	-
A6	8.10 (+0.01)	7.59 (-0.01)	6.12 (-0.01)	13.59 (-0.03)	-	-	8.11 (+0.02)	7.57 (-0.03)	6.12 (-0.01)	13.56 (-0.06)	-	-	8.12 (+0.03)	7.57 (-0.03)	6.12 (-0.01)	13.53 (-0.09)	-	-
T7	7.10 (+0.01)	1.28 (+0.03)	5.88 (0.00)	13.59 (-0.03)	-	-	7.10 (+0.01)	1.29 (+0.04)	5.88 (0.00)	13.56 (-0.06)	-	-	7.11 (+0.02)	1.30 (+0.05)	5.86 (-0.02)	13.53 (-0.09)	-	-
T8	7.36 (+0.01)	1.55 (+0.04)	6.07 (-0.01)	13.75 (0.00)	-	-	7.36 (+0.01)	1.55 (+0.04)	6.05 (-0.03)	13.73 (-0.02)	-	-	7.36 (+0.01)	1.56 (+0.05)	6.05 (-0.03)	13.72 (-0.03)	-	-
C9	7.44 (0.00)	5.65 (+0.05)	5.67 (+0.03)	12.67 (-0.01)	8.43 (+0.03)	6.85 (+0.06)	7.44 (0.00)	5.69 (+0.09)	5.69 (+0.05)	12.65 (-0.03)	8.44 (+0.04)	6.86 (+0.07)	7.44 (0.00)	5.71 (+0.11)	5.69 (+0.05)	12.64 (-0.04)	8.45 (+0.05)	6.90 (+0.11)
G10	7.92 (+0.03)	-	5.83 (0.00)	12.84 (-0.04)	8.39 (+0.03)	6.48 (+0.07)	7.92 (+0.03)	-	5.82 (-0.01)	12.81 (-0.07)	8.39 (+0.03)	6.50 (+0.09)	7.93 (+0.04)	-	5.81 (-0.02)	12.78 (-0.10)	8.39 (+0.03)	6.52 (+0.11)
C11	7.33 (+0.02)	5.45 (+0.03)	5.69 (-0.03)	13.02 (-0.02)	8.44 (0.00)	6.61 (+0.04)	7.33 (+0.02)	5.46 (+0.04)	5.67 (-0.05)	12.81 (-0.07)	8.39 (+0.03)	6.50 (+0.09)	7.33 (+0.02)	5.47 (+0.05)	5.65 (-0.07)	12.96 (-0.08)	8.47 (+0.03)	6.64 (+0.07)
G12	7.92 (0.00)	-	6.08 (-0.05)	-	n.o.	n.o.	7.92 (0.00)	-	6.02 (-0.11)	-	n.o.	n.o.	7.92 (0.00)	-	5.97 (-0.16)	-	n.o.	n.o.

Όσον αφορά τα ανταλλάξιμα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου, η αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο (10) προκάλεσε μικρότερες μεταβολές στα σήματά τους σε σύγκριση με το συμπλόκου (9). Τα σήματα των πρωτονίων αυτών είχαν μικρές upfield μετατοπίσεις και ήταν ελαφρώς διευρυμένα μόνο. Φαίνεται συνεπώς ότι η αλληλεπίδραση του (10) με το d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> δεν οδηγεί στη ρήξη των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA. Σε  $r = 0.5$  παρατηρήθηκαν μικρές upfield μετατοπίσεις για τα T7N3H (-0.03 ppm) και G10N1H (-0.04 ppm). Αντίστοιχα τα σήματα των C3:G10N2H\* βρέθηκαν downfield μετατοπισμένα κατά +0.03 ppm. Σε  $r = 1$  σημειώθηκαν περαιτέρω μετατοπίσεις των σημάτων των ίμινο πρωτονίων του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Οι μετατοπίσεις των πρωτονίων που αντιστοιχούν στα ζεύγη βάσεων C9:G4 και A5:T8, οι οποίες βρίσκονται στο κεντρικό μέρος της αλληλουχίας, είναι οι μικρότερες. Επιβεβαιώνεται με αυτόν τον τρόπο η προτίμηση του συμπλόκου για τα αλληλεπίδραση με τα άκρα της διπλής έλικας. Σε  $r = 2$ , παρατηρήθηκε διεύρυνση των σημάτων των G2N1H, T8N3H και T7N3H (Εικόνα 3.65), ένδειξη ενδιάμεσης κινητικής για την αλληλεπίδραση του (10) με το d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> για τη χρονική κλίμακα του NMR.



**Εικόνα 3.65:** Επιλεγμένες περιοχές του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του μίγματος (10) -  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$  σε  $r = 0.5$  και  $r = 1$   $r = 2$  καθώς επίσης και του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου και ελεύθερου συμπλόκου σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων ( $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0). Στην εικόνα σημειώνεται και η απόδοση των παρατηρούμενων σημάτων. Τα πρωτόνια που σημειώνονται με αστερίσκο είναι εκείνα που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου. (A) Περιοχή 7.0 - 8.6 ppm. (B) Περιοχή 9.0 - 11.0 ppm του αδέσμευτου συμπλόκου (10) και σε αναλογία ανάμιξης  $r = 1$  με το ολιγονουκλεοτίδιο. Με κύκλο επισημαίνονται τα σήματα που αντιστοιχούν σε  $\text{H}_2'\text{H}_9'$ , ενώ με τρίγωνο αυτά που αντιστοιχούν σε  $\text{H}_2$ . (C) Περιοχή των ανταλλάξιμων ίμινο πρωτονίων.

### 3.4.4.3. Αλληλεπίδραση του (11) με το $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$ :

Κατόπιν της τιτλοδότησης του  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$  με σύμπλοκο (11), παρατηρήθηκαν όμοια φαινόμενα με την περίπτωση του (10). Πιο συγκεκριμένα, σημειώνεται η ύπαρξη διπλών σημάτων για τα περισσότερα πρωτόνια τόσο των rhen και bzq. Ειδικότερα για τα  $\text{H}_2$  και  $\text{H}_2'\text{H}_9'$ , εκτός από την ύπαρξη σε δύο ξεχωριστών σημάτων, παρατηρείται εκτεταμένη διεύρυνση των κορυφών τους, καθώς επίσης και upfield μετατόπιση, κατά  $-0.18$  και  $-0.20$  ppm για τα δύο σήματα των  $\text{H}_2'\text{H}_9'$ , και κατά  $-0.14$  και  $-0.15$  ppm για τα δύο σήματα των  $\text{H}_2$  (Πίνακας 3.40). Οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις, όπως ήταν αναμενόμενο, σημειώθηκαν για τα πρωτόνια των bzq και rhen, υποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση του (11) μέσω των υποκαταστατών αυτών με το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$ . Ωστόσο, εν αντιθέσει με το σύμπλοκο (10), η αλληλεπίδραση των rhen και bzq με το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$  πιθανότατα εκτείνεται σε μεγαλύτερο μέρος του αρωματικού συστήματός τους, όπως φαίνεται από τις μετατοπίσεις των πρωτονίων τους. Εν προκειμένω, το σήμα των  $\text{H}_3'\text{H}_8'$  ήταν μετατοπισμένο κατά  $-0.29$  ppm, των  $\text{H}_4'\text{H}_7'$  κατά  $-0.32$  και  $-0.35$  ppm, ενώ των  $\text{H}_5'\text{H}_6'$  κατά  $-0.05$  ppm. Αντίστοιχα, για τα πρωτόνια της bzq, τα σήματα των  $\text{H}_3$  ήταν μετατοπισμένα κατά  $-0.27$  και  $-0.40$  ppm και των  $\text{H}_8$  κατά  $-0.32$  ppm. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι παρατηρούμενες μετατοπίσεις στο σύμπλοκο (11) ήταν μεγαλύτερες από αυτές του συμπλόκου (10), μικρότερες, όμως, από του συμπλόκου (9). Όμοια με το (9), η αύξηση του  $r$  οδήγησε σε μικρότερες μετατοπίσεις για τα H του (11), υποδεικνύοντας τον κορεσμό του  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$  από μικρά  $r$ .

Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

**Πίνακας 3.40:** Χημικές μετατοπίσεις (σε ppm) των σημάτων του συμπλόκου (11) (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH = 7.0) στην ελεύθερη κατάσταση, καθώς και σε αναλογίες ανάμιξης r = 0.5, 1 και 2 με το ολιγονουκλεοτίδιο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Οι τιμές στην παρένθεση εκφράζουν τη διαφορά με τις τιμές για το ελεύθερο σύμπλοκο (11) (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

Protons	(11)	r = 0.5		r = 1		r = 2		Protons	(11)	r = 0.5		r = 1		r = 2		Protons	(11)	r = 0.5		r = 1		r = 2	
		A	B	A	B	A	B			A	B	A	B	A	B			A	B	A	B	A	B
H2'H9'	10.12	9.92 (-0.20)	9.94 (-0.18)	9.94 (-0.18)	9.96 (-0.16)	9.98 (-0.14)	10.00 (-0.12)	H2c'H6c'	6.53	6.36 (-0.17)	6.38 (-0.15)	6.39 (-0.14)	6.40 (-0.13)	6.42 (-0.11)	6.43 (-0.10)	Ha'	8.36	8.25 (-0.13)	8.22 (-0.16)	8.25 (-0.13)	8.24 (-0.14)	8.26 (-0.12)	8.26 (-0.12)
H3'H8'	8.29	8.00 (-0.29)	-	8.04 (-0.25)	-	8.09 (-0.20)	-	H3c'H5c'	6.17	6.04 (-0.13)	6.06 (-0.11)	6.06 (-0.11)	6.08 (-0.09)	6.09 (-0.08)	6.10 (-0.07)	Hb'	6.89	7.09 (+0.20)	7.06 (+0.17)	7.04 (+0.15)	7.02 (+0.13)	6.99 (+0.10)	6.99 (+0.10)
H4'H7'	8.68	8.36 (-0.32)	8.33 (-0.35)	8.42 (-0.26)	8.38 (-0.30)	8.48 (-0.20)	8.44 (-0.24)	H7c'	1.77	1.66 (-0.11)	-	1.68 (-0.09)	-	1.70 (-0.07)	-	Hc'	1.96	2.27 (+0.31)	-	2.19 (+0.23)	-	2.12 (+0.16)	-
H5'H6'	7.58	7.53 (-0.05)	-	7.54 (-0.04)	-	7.56 (-0.02)	-	H8c'	2.37	2.22 (-0.15)	-	2.25 (-0.12)	-	2.27 (-0.10)	-	Ha	7.43	7.86 (+0.43)	-	7.79 (+0.36)	-	7.72 (+0.29)	-
H2	9.60	9.46b (-0.14)	9.45b (-0.15)	9.47b (-0.13)	9.46b (-0.14)	9.50b (-0.10)	9.49b (-0.11)	H9c'	0.73	0.63 (-0.10)	-	0.65 (-0.08)	-	0.66 (-0.07)	-	Hb	5.27	6.37 (+1.10)	-	6.19 (+0.92)	-	6.03 (+0.69)	-
H3	7.57	7.30 (-0.27)	7.17 (-0.40)	7.36 (-0.21)	7.25 (-0.32)	7.40 (-0.17)	7.32 (-0.25)	H2c	6.02	5.81 (-0.21)	-	5.85 (-0.17)	-	5.87 (-0.15)	-	Hc	1.96	2.22 (+0.26)	-	2.22 (+1.03)	-	2.22 (+1.03)	-
H4	7.65	7.61 (-0.04)	7.50 (-0.15)	7.63 (-0.02)	7.52 (-0.13)	7.65 (0.00)	7.58 (-0.07)	H3c	5.29	5.25 (-0.04)	5.20 (-0.09)	5.24 (-0.05)	5.20 (-0.09)	5.23 (-0.06)	5.19 (-0.10)	Hd	0.77	1.28 (+0.51)	-	1.18 (+0.40)	-	1.11 (+0.33)	-
H5	6.33	n.o.	-	n.o.	-	6.31 (-0.02)	-	H5c	6.02	6.06 (+0.04)	-	6.07 (+0.05)	-	(+0.06)	-								
H6	6.47	n.o.	-	n.o.	-	6.33 (-0.14)	6.31 (-0.16)	H6c	5.81	5.61 (-0.20)	-	5.62 (-0.19)	-	5.64 (-0.17)	-								
H7	6.63	n.o.	-	n.o.	-	6.59 (-0.04)	-	H7c	1.39	1.35 (-0.04)	1.38 (-0.01)	1.32 (-0.06)	1.35 (-0.04)	1.31 (-0.08)	1.33 (-0.06)								
H8	7.30	6.98 (-0.32)	-	7.03 (-0.27)	-	7.08 (-0.22)	-	H8c	1.97	1.85 (-0.12)	-	1.84 (-0.13)	-	1.83 (-0.14)	-								
H9	8.34	8.16 (-0.18)	-	8.17 (-0.17)	-	8.20 (-0.14)	-	H9c	0.50	0.45 (-0.05)	-	0.42 (-0.08)	-	0.38 (-0.12)	-								
								H10c	0.49	0.40 (-0.09)	-	0.32 (-0.17)	-	0.31 (-0.18)	-								

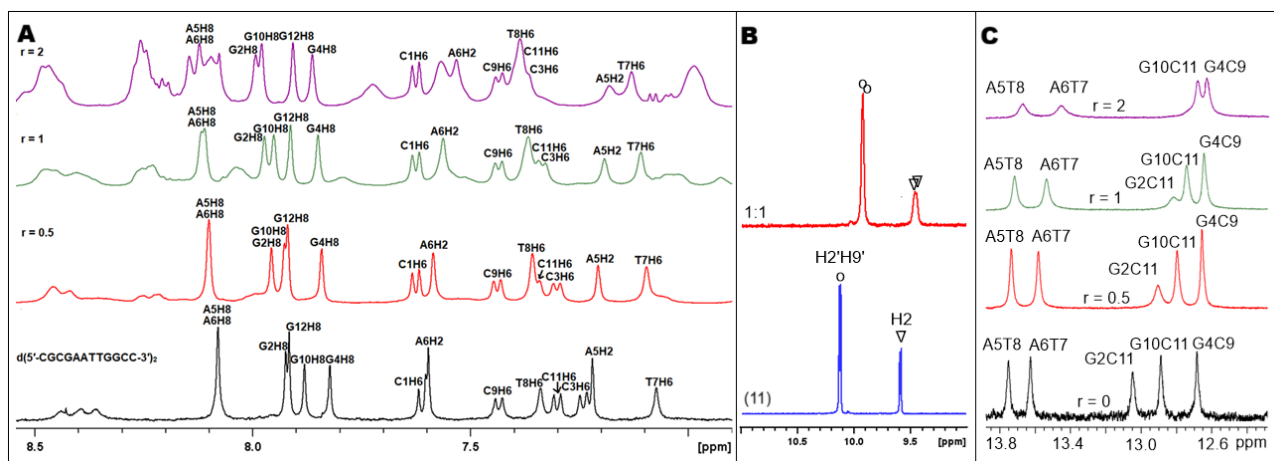
Σχετικά με τα H του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>, παρατηρήθηκαν σημαντικές μετατοπίσεις σε σχέση με το ελεύθερο ολιγονουκλεοτίδιο, οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 3.41. Πιο συγκεκριμένα, τα σήματα των G2H8, C3H6, G10H8 και C11H6 ανιχνεύθηκαν downfield μετατοπισμένα κατά +0.03 έως +0.05 ppm σε r = 0.5, με τις μετατοπίσεις αυτές να φτάνουν +0.06 έως +0.12 σε r = 2. Τα σήματα των υπολοίπων H8 και H6 των βάσεων του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> ήταν ελαφρώς μετατοπισμένα (<0.04 ppm) ακόμη και σε r = 2. Αξιοσημείωτη είναι και η μετατόπιση του A6H8 (+0.06 ppm) σε r = 2, η οποία σε συνδυασμό με τις προαναφερθείσες μετατοπίσεις και με αυτές των C3H5 (+0.26 ppm) και C11H5 (+0.19 ppm) αποτελούν ενδείξεις ότι το (11) δεσμεύεται στη μεγάλη αύλακα του DNA. Επιπροσθέτως, σημαντικές upfield μετατοπίσεις σημειώθηκαν για σακχαρικά πρωτόνια H1', τα οποία βρίσκονται στα άκρα της μικρής αύλακας της διπλής έλικας. Μάλιστα, για ορισμένα πρωτόνια, όπως το G2H1' και το G12H1', οι μετατοπίσεις αυτές ήταν μεγαλύτερες από -0.25 ppm, σε r = 2. Παρόμοιες μετατοπίσεις έχουν σημειωθεί για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CCGGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> κατά την αλληλεπίδραση με διπυρηνικά σύμπλοκα του Ru(II), οι οποίες είχαν αποδοθεί σε αλληλεπίδραση των συμπλόκων με το ολιγονουκλεοτίδιο μέσω δέσμησης στη μικρή του αύλακα [162]. Φαίνεται, συνεπώς, το (11) να δεσμεύεται μέσω και των δύο αυλάκων στο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Σε κάθε περίπτωση, η αύξηση του r οδήγησε σε αύξηση των μετατοπίσεων των πρωτονίων του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται από το υψηλό θετικό φορτίο του (11) (+3) το οποίο, όμοια με τις προηγούμενες περιπτώσεις που αναφέρθηκαν, οδηγεί σε χωρική συμπύκνωση (condensation) του DNA.

Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

**Πίνακας 3.41:** Χαρακτηριστικές τιμές χημικών μετατοπίσεων (σε ppm) για τα πρωτόνια του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O:D<sub>2</sub>O 9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0) στις τρεις αναλογίες ανάμιξης με το σύμπλοκο (11). Σε παρένθεση φαίνονται οι μετατοπίσεις σε σύγκριση με τις τιμές του ολιγονουκλεοτιδίου χωρίς την παρουσία συμπλόκου, σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων (+: μετατόπιση σε υψηλότερες τιμές ppm, -: μετατόπιση σε χαμηλότερες τιμές ppm). n.o. = not observed.

	r = 0.5						r = 1						r = 2					
	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H	H8/6	H5/H2/CH <sub>3</sub>	H1'	(W-C) GN1H/TN3H	(W-C) C/GN2H*	(n.b.) C/GN2H
<b>C1</b>	7.63 (+0.03)	5.92 (+0.04)	5.76 (+0.04)	-	n.o.	n.o.	7.63 (+0.03)	5.94 (+0.06)	5.77 (+0.05)	-	n.o.	n.o.	7.63 (+0.03)	5.94 (+0.06)	5.77 (+0.05)	-	n.o.	n.o.
<b>G2</b>	7.96 (+0.03)	-	5.81 (-0.07)	12.91 (-0.13)	8.46 (+0.02)	6.65 (+0.08)	7.97 (+0.04)	-	5.77 (-0.11)	12.82 (-0.22)	8.47 (+0.03)	6.70 (+0.13)	7.99 (+0.06)	-	5.60 (-0.28)	12.64 (-0.40)	8.48 (+0.04)	6.74 (+0.17)
<b>C3</b>	7.30 (+0.05)	5.46 (+0.11)	5.56 (0.00)	12.80 (-0.08)	8.42 (+0.06)	6.52 (+0.11)	7.34 (+0.09)	5.53 (+0.18)	5.56 (0.00)	12.74 (-0.14)	8.46 (+0.10)	6.59 (+0.18)	7.37 (+0.12)	5.61 (+0.26)	5.56 (0.00)	12.69 (-0.19)	8.48 (+0.12)	6.67 (+0.26)
<b>G4</b>	7.84 (+0.01)	-	5.37 (-0.05)	12.66 (-0.02)	8.45 (+0.05)	6.87 (+0.08)	7.85 (+0.02)	-	5.33 (-0.09)	12.64 (-0.04)	8.48 (+0.08)	6.92 (+0.13)	7.86 (+0.03)	-	5.27 (-0.15)	12.64 (-0.04)	8.52 (+0.12)	6.99 (+0.20)
<b>A5</b>	8.10 (+0.01)	7.21 (-0.02)	5.94 (-0.03)	13.73 (-0.02)	-	-	8.11 (+0.02)	7.19 (-0.04)	5.92 (-0.05)	13.72 (-0.03)	-	-	8.12 (+0.03)	7.18 (-0.05)	5.88 (-0.09)	13.69 (-0.06)	-	-
<b>A6</b>	8.10 (+0.01)	7.59 (-0.01)	6.12 (-0.01)	13.58 (-0.04)	-	-	8.12 (+0.03)	7.56 (-0.04)	6.11 (-0.02)	13.54 (-0.08)	-	-	8.15 (+0.06)	7.54 (-0.06)	6.09 (-0.04)	13.47 (-0.15)	-	-
<b>T7</b>	7.10 (+0.01)	1.27 (+0.02)	5.88 (0.00)	13.58 (-0.04)	-	-	7.10 (+0.01)	1.30 (+0.06)	5.87 (-0.01)	13.54 (-0.08)	-	-	7.13 (+0.04)	1.35 (+0.10)	5.85 (-0.03)	13.47 (-0.15)	-	-
<b>T8</b>	7.36 (+0.01)	1.54 (+0.03)	6.06 (-0.02)	13.73 (-0.02)	-	-	7.36 (+0.01)	1.57 (+0.06)	6.05 (-0.03)	13.72 (-0.03)	-	-	7.39 (+0.04)	1.60 (+0.09)	6.02 (-0.06)	13.69 (-0.06)	-	-
<b>C9</b>	7.44 (0.00)	5.67 (+0.07)	5.66 (+0.02)	12.66 (-0.02)	8.45 (+0.05)	6.87 (+0.08)	7.44 (0.00)	5.71 (+0.11)	5.60 (-0.04)	12.64 (-0.04)	8.48 (+0.08)	6.92 (+0.13)	7.44 (0.00)	5.76 (+0.16)	5.61 (-0.03)	12.64 (-0.04)	8.52 (+0.12)	6.99 (+0.20)
<b>G10</b>	7.93 (+0.04)	-	5.80 (-0.03)	12.80 (-0.08)	8.42 (+0.06)	6.52 (+0.11)	7.95 (+0.06)	-	5.77 (-0.06)	12.74 (-0.14)	8.46 (+0.10)	6.59 (+0.18)	7.98 (+0.09)	-	5.75 (-0.08)	12.69 (-0.19)	8.48 (+0.12)	6.67 (+0.26)
<b>C11</b>	7.35 (+0.04)	5.51 (+0.09)	5.67 (-0.05)	12.91 (-0.13)	8.46 (+0.02)	6.65 (+0.08)	7.36 (+0.05)	5.55 (+0.13)	5.64 (-0.08)	12.82 (-0.22)	8.47 (+0.03)	6.70 (+0.13)	7.39 (+0.08)	5.61 (+0.19)	5.60 (-0.12)	12.64 (-0.40)	8.48 (+0.04)	6.74 (+0.17)
<b>G12</b>	7.92 (0.00)	-	6.02 (-0.11)	-	n.o.	n.o.	7.91 (-0.01)	-	5.93 (-0.20)	-	n.o.	n.o.	7.91 (-0.01)	5.86 (-0.27)	-	-	n.o.	n.o.

Σημαντικές μεταβολές σημειώθηκαν και για τα σήματα των πρωτονίων των ίμινο (GN1H, TN3H) και άμινο (GN2H\*) ομάδων του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Σε αναλογία r = 0.5, τα σήματα των G2N1H και G10N1H είχαν τις μεγαλύτερες μετατοπίσεις, -0.13 και -0.08 ppm, αντίστοιχα. Με την αύξηση του r, αυξήθηκαν και οι παραπάνω μετατοπίσεις, φτάνοντας τα -0.40 και -0.19 ppm. Επίσης, σε r = 2, σημαντική μετατόπιση σημειώθηκε και για το T7N3H, ίση με -0.15 ppm. Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις επιβεβαιώνουν ότι η αλληλεπίδραση του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> με το (11) γίνεται τόσο από τα άκρα του, όσο και από το κεντρικό του τμήμα. Επιπλέον, σημαντική διεύρυνση παρατηρήθηκε στις κορυφές των G2N1H, T7N3H και T8N3H (Εικόνα 3.66), η οποία υποδεικνύει την επιμήκυνση των δεσμών υδρογόνου και πιθανώς τοπικό ξετύλιγμα της διπλής έλικας ιδίως στο άκρο της αλληλουχίας. Το σήμα του G2N1H είναι μη ανιχνεύσιμο σε r = 2 εξαιτίας της εκτεταμένης διεύρυνσης του σήματός του, υποδεικνύοντας ρήξη του συγκεκριμένου δεσμού υδρογόνου. Επιπροσθέτως, τα σήματα όλων των N2H και N2H\* εντοπίστηκαν σημαντικά downfield μετατοπισμένα, μέχρι και κατά +0.26 ppm, ένδειξη των σημαντικών μεταβολών που προκαλεί το (11) στο d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>.

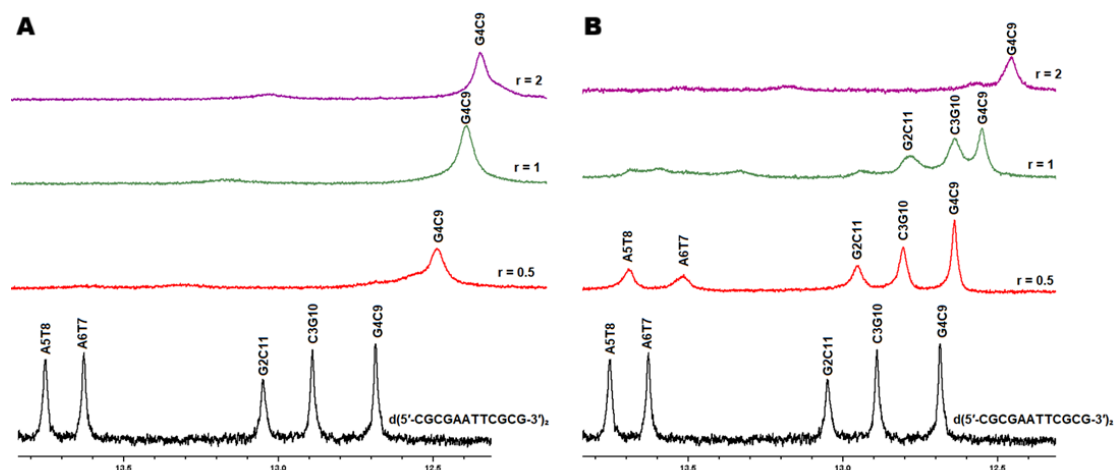


**Εικόνα 3.66:** Επιλεγμένες περιοχές του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του μίγματος (11) -  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$  σε  $r = 0.5$  και  $r = 1$   $r = 2$  καθώς επίσης και του ελεύθερου ολιγονουκλεοτιδίου και ελεύθερου συμπλόκου σε ίδιες συνθήκες λήψης των φασμάτων ( $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$  9:1, 298 K, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών συγκέντρωσης 100 mM, pH = 7.0). Στην εικόνα σημειώνεται και η απόδοση των παρατηρούμενων σημάτων. Τα πρωτόνια που σημειώνονται με αστερίσκο είναι εκείνα που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου. (A) Περιοχή 7.0 - 8.6 ppm. (B) Περιοχή 9.0 - 11.0 ppm του αδέσμευτου συμπλόκου (11) και σε αναλογία ανάμιξης  $r = 1$  με το ολιγονουκλεοτίδιο. Με κύκλο επισημαίνονται τα σήματα που αντιστοιχούν σε  $\text{H}2'\text{H}9'$ , ενώ με τρίγωνο αυτά που αντιστοιχούν σε  $\text{H}2$ . (C) Περιοχή των ανταλλάξιμων ίμινο πρωτονίων.

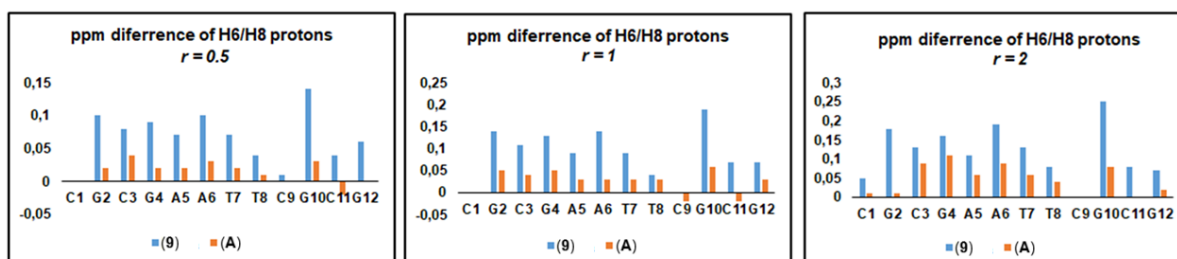
Με βάση τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι τα σύμπλοκα (9) - (11) δεσμεύονται στο  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$  μέσω και των bzq και rhen, με διάφορους τρόπους. Παρόμοια συμπεριφορά είχε παρατηρηθεί και για τα (A) - (C) με το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$  [129]. Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων με το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$  προκάλεσε μικρές δομικές μεταβολές σε αυτά, όπως αποδεικνύεται από τις upfield μετατοπίσεις που καταγράφηκαν για την πλειονότητα των σημάτων τους, ακόμη και για υποκαταστάτες οι οποίοι δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$ . Το σύμπλοκο (9) αλληλεπιδρά με το κεντρικό μέρος της αλληλουχίας μέσω παρεμβολής από τη μικρή αύλακα του  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$ , με αποτέλεσμα το τοπικό ξετύλιγμα και τη ρήξη των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των κεντρικών βάσεων της έλικας. Το σύμπλοκο  $\Delta\text{-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dpr})]^{2+}$  έχει αποδειχθεί, μέσω  $^1\text{H}$  NMR, ότι αλληλεπιδρά με το  $d(5'-\text{GTGAC}-3')_2$  με παρόμοιο τρόπο, παρόλο που η παρεμβολή προσεγγίζοντας τη διπλή έλικα μέσω της μικρής αύλακας θεωρείται σχετικά σπάνια [163]. Το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και για το  $\Lambda\text{-}[\mu\text{-}(11,11'\text{-bidppz})(\text{phen})_2\text{Ru}_2]^{4+}$  [164]. Συγκρίνοντας τα σύμπλοκα (A) και (9), τα οποία φέρουν τον BL1, ως προς την αλληλεπίδραση με το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$ , παρατηρείται ότι και τα δύο αλληλεπιδρούν αρχικά με το κεντρικό τμήμα της διπλής έλικας, και στη συνέχεια εκτείνονται προς τα δύο άκρα της [129]. Παρά την παραπάνω ομοιότητα, τα δύο σύμπλοκα επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο το  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$ . Το (9) προκαλεί μεγαλύτερες downfield μετατοπίσεις των H6 των C3, T7, T8 και C11 και των H8 των G2, G4, A5, A6, G10 και G12 του  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$ , έως και κατά +0.25 ppm σε  $r = 2$ . Επιπλέον, στην περίπτωση του (A), τα σήματα των ίμινο πρωτονίων ήταν λιγότερο διευρυμένα, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η απόδοσή τους ακόμη και σε  $r = 1$ . Αντίθετα, στην περίπτωση του (9), τα σήματα των περισσότερων ίμινο πρωτονίων είναι μη ανιχνεύσιμα λόγω της εκτεταμένης διεύρυνσής τους ακόμη και σε  $r = 0.5$ , υποδεικνύοντας τη ρήξη των δεσμών υδρογόνου του  $d(5'-\text{CGCGAATTCGCG}-3')_2$  από το σύμπλοκο (9) σε μικρότερα  $r$  σε σχέση με το σύμπλοκο (A). Παρόλο που οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις συμβάλλουν στην ύπαρξη ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενός

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

συμπλόκου και του DNA, φαίνεται ότι το υψηλότερο φορτίο δεν είναι ο καθοριστικός παράγοντας της ισχύος της δέσμευσης. Σε αντίστοιχες μελέτες έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις όπου σύμπλοκα χαμηλότερου φορτίου αλληλεπιδρούν με το DNA με παρόμοια ή και μεγαλύτερη ισχύ από σύμπλοκα υψηλότερου φορτίου. Μία τέτοια περίπτωση αναφέρεται από την ομάδα του J. A. Thomas, όπου μεταξύ δομικά όμοιων μεταξύ τους συμπλόκων, τα σύμπλοκα με το χαμηλότερο φορτίο δεσμεύονταν ισχυρότερα στο DNA [165]. Σε διαφορετική μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τετραφορτιακά σύμπλοκα του Ru(II) με πολυπυριδινικούς υποκαταστάτες αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω δέσμευσης στις αύλακες, ενώ διφορτιακά ανάλογα τους αλληλεπιδρούν μέσω παρεμβολής με το DNA, προκαλώντας του έτσι μεγαλύτερες δομικές μεταβολές [166].



**Εικόνα 3.67:** Περιοχή των ίμινο πρωτονίων στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR (H<sub>2</sub>O : D<sub>2</sub>O, 9 : 1, 298 K, phosphate buffer 100 mM, pH = 7.0) κατά την τιτλοδότηση του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> με Α) το σύμπλοκο (9) και Β) το σύμπλοκο (Α) [129].

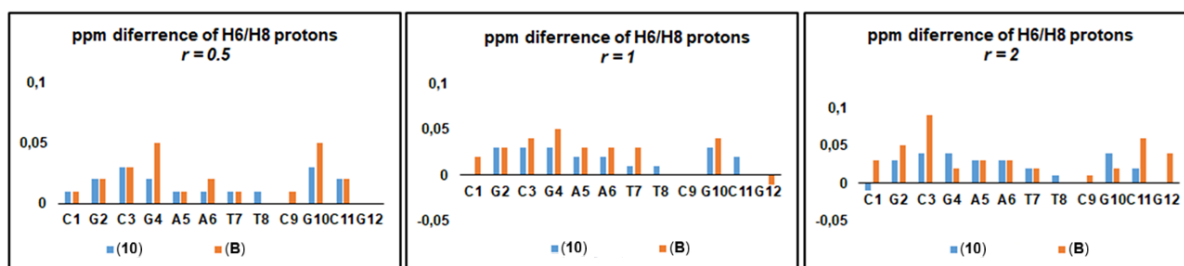


**Εικόνα 3.68:** Συγκριτικά ραβδογράμματα για τις μετατοπίσεις που προκαλούνται στα σήματα των πρωτονίων H6 και H8 σε ppm στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR (H<sub>2</sub>O : D<sub>2</sub>O, 9 : 1, 298 K, phosphate buffer 100 mM, pH = 7.0) του ολιγονουκλεοτιδίου d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub> ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τα σύμπλοκα (9) και (Α).

Ο BL2 που είναι ο γεφυρωτικός υποκαταστάτης του (10), είναι μεγαλύτερου μήκους και εύκαμπτος σε αντίθεση με τον BL1. Δίνει, με αυτόν τον τρόπο, τη δυνατότητα στο (10) να «προσαρμόζεται» στις δομικές απαιτήσεις του d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>. Έχει αποδειχθεί ότι η ευκαμψία και το μήκος του γεφυρωτικού υποκαταστάτη επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τον τρόπο αλληλεπίδρασης ενός διπυρηνικού συμπλόκου με το DNA [167]. Οι upfield μετατοπίσεις των H1' σε συνδυασμό με τις downfield μετατοπίσεις των H6 και H8, καθώς επίσης και των N2H\* υποδεικνύουν ότι το σύμπλοκο (10) δεσμεύεται τόσο στη μεγάλη όσο και στη μικρή αύλακα του DNA, όπως είχε παρατηρηθεί και για το (B) [129]. Συγκρίνοντας τις μεταβολές που

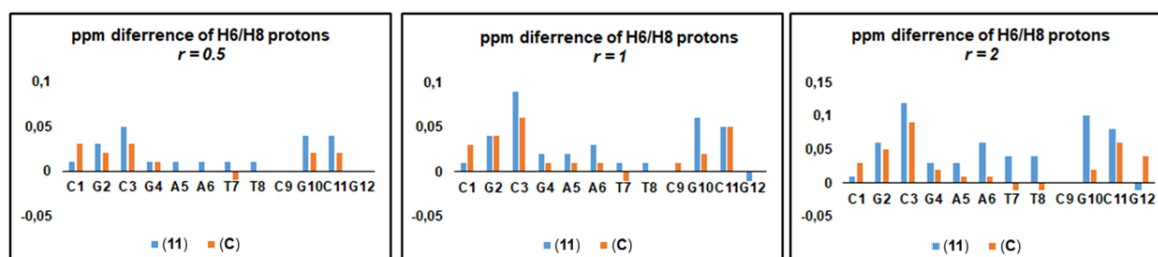
### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

προκαλεί το σύμπλοκο (10) στα σήματα του  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  σε σχέση με το σύμπλοκο (B), παρατηρείται ότι το (B) προκαλεί ελαφρώς μεγαλύτερες μετατοπίσεις. Οι διαφορές αυτές, ωστόσο, είναι αρκετά μικρές (Εικόνα 3.69). Και τα δύο σύμπλοκα, φαίνεται ότι προκαλούν επιμήκυνση και όχι πλήρη ρήξη των δεσμών υδρογόνου του  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ . Ακόμη, τα (10) και (B) φαίνεται να δεσμεύονται στις ίδιες περιοχές του  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , αφού και τα δύο επηρεάζουν περισσότερο τα ζεύγη G2:C11, C3:G10 και G4:C9 [129].



**Εικόνα 3.69:** Συγκριτικά ραβδογράμματα για τις μετατοπίσεις που προκαλούνται στα σήματα των πρωτονίων H6 και H8 σε ppm στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O}$ , 9 : 1, 298 K, phosphate buffer 100 mM, pH = 7.0) του ολιγονουκλεοτιδίου  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τα σύμπλοκα (10) και (B).

Η συμπεριφορά του (11) με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  εμφανίζει ομοιότητες με αυτή του (10), όσον αφορά την αλληλεπίδραση και με τις δύο αλύκες του. Επίσης, φαίνεται να επηρεάζονται και κεντρικά και ακραία τμήματα της διπλής έλικας, όπως είχε παρατηρηθεί και στην περίπτωση του (B) [129]. Η αλληλεπίδραση με το (11) προκαλεί επιμήκυνση των δεσμών υδρογόνου του  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , έως και πλήρη ρήξη του C11/G2N1-H σε  $r = 2$ . Αντίθετα, το (B) δεν προκαλεί ρήξη κανενός δεσμού υδρογόνου στο  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , ενώ και η διεύρυνση των σημάτων όλων των πρωτονίων των ιμινομάδων που συμμετέχουν σε W.-C. δεσμούς υδρογόνου ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με το (11) [129]. Επιπροσθέτως, φαίνεται ότι το (11) προκαλεί μεγαλύτερες μετατοπίσεις των αρωματικών H6/H8 του  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  σε σύγκριση με το (C) (Εικόνα 3.70) [129]. Η ανθρακική αλυσίδα που ενώνει του δύο πυριδινικούς δακτυλίους του BL3 είναι μεγαλύτερη από ότι στο BL2, αυξάνοντας, έτσι, τους βαθμούς ελευθερίας του BL3 σε σχέση με τον BL2. Συνεπώς, το σύμπλοκο (11) έχει μεγαλύτερη ευχέρεια στον να «προσαρμόζεται» στη γεωμετρία του ολιγονουκλεοτιδίου, όπως έχει αποδειχθεί και για άλλα διπυρηνικά σύμπλοκα του Ru(II) [168]. Έτσι μπορούν να εξηγηθούν οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις που προκαλεί στο σύμπλοκο (11) στο  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , καθώς και τα πιο διευρυμένα σήματα σε σύγκριση με το (10).



**Εικόνα 3.70:** Συγκριτικά ραβδογράμματα για τις μετατοπίσεις που προκαλούνται στα σήματα των πρωτονίων H6 και H8 σε ppm στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{H}_2\text{O} : \text{D}_2\text{O}$ , 9 : 1, 298 K, phosphate buffer 100 mM, pH = 7.0) του ολιγονουκλεοτιδίου  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με τα σύμπλοκα (11) και (C).

### 3.5. Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων (A) - (C) και (1) - (16) με μοντέλα DNA μέσω πειραμάτων ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεση φθορισμού με βρωμιούχο αιθίδιο:

Πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με EB σε θερμοκρασία 298 K έλαβαν χώρα για όλα τα σύμπλοκα. Πιο συγκεκριμένα τα (A) - (C) μελετήθηκαν με τα  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ ,  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  και με CT-DNA, ενώ τα (1) - (16) με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ . Όπως είναι γνωστό, το EB είναι μία φθορίζουσα ένωση, η οποία αλληλεπιδρά με το DNA μέσω παρεμβολής και μέσω δέσμευσης στις αύλακες του DNA [169]. Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του EB με το DNA είναι η αύξηση της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού. Εάν, ωστόσο, κάποιο άλλο μόριο που έχει τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με το DNA πάρει τη θέση του, αποβάλλοντας το EB από το σύστημα, παρατηρείται μείωση της έντασης του εκπεμπόμενου φθορισμού, προς την αρχική της τιμή. Με τον τρόπο αυτό, μέσω της μεταβολής της έντασης του φθορισμού του EB, μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τον τρόπο της αλληλεπίδρασης ενός μορίου με το DNA [170].

#### 3.5.1. Πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με βρωμιούχο αιθίδιο των συμπλόκων (A) - (C):

Για τα (A) - (C) με το  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  οι σταθερές  $K_{SV}$  που υπολογίστηκαν ήταν παρόμοιου μέγεθος μεταξύ τους, καθώς κυμαίνονταν από  $1.1-1.5 \times 10^4 M^{-1}$ . Ωστόσο, οι αντίστοιχες  $K_{SV}$  για το  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  διαφέρουν, καθώς μόνο για το (A) υπολογίστηκε  $K_{SV}$  παρόμοιου μεγέθους ( $1.6 \times 10^4 M^{-1}$ ), ενώ για τα άλλα δύο σύμπλοκα οι  $K_{SV}$  που υπολογίστηκαν ήταν μικρότερες από  $0.5 \times 10^4 M^{-1}$ . Επίσης, παρόμοιου μεγέθους ήταν και η  $K_{SV}$  που υπολογίστηκε για την αλληλεπίδραση του (A) με CT-DNA καθώς αυτή βρέθηκε ίση με  $1.16 \times 10^4 M^{-1}$ . Αξίζει να σημειωθεί ότι η αντίστοιχη σταθερά  $K_{SV}$  που είχε υπολογιστεί για την αλληλεπίδραση του συμπλόκου (A) με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  [129] ήταν μεγαλύτερη κατά μία τάξη μεγέθους ( $16.65 \times 10^4 M^{-1}$ ) από τα  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  και  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$ , όπως και από την  $K_{SV}$  με το CT-DNA. Όσον αφορά τα σύμπλοκα (B) και (C), οι  $K_{SV}$  που υπολογίστηκαν με το CT-DNA ήταν παρόμοιο μεγέθους με τις αντίστοιχες με τα  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  και  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$ , καθώς και με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ . Η μεγαλύτερη  $K_{SV}$  όταν ως μοντέλο DNA χρησιμοποιήθηκε CT-DNA υπολογίστηκε για το σύμπλοκο (C) και βρέθηκε ίση με  $5.47 \times 10^4 M^{-1}$ .

**Πίνακας 3.42:** Σταθερές  $K_{SV}$  και  $K_b$  για την αλληλεπίδραση των συμπλόκων (A) - (C) με CT-DNA και τα ολιγονουκλεοτίδια  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  και  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  σε θερμοκρασία 298 K. Παρουσιάζονται επίσης και οι αντίστοιχες σταθερές για τα τρία σύμπλοκα όπως και για το  $[(cym)Ru(phen)(py)]Cl_2$  με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  [129].

Σύμπλοκο	CT-DNA		$d(5'-CGCGCG-3')_2$		$d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$		$d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ [129]	
	$K_{SV} (\times 10^4 M^{-1})$	$K_b (\times 10^3 M^{-1})$	$K_{SV} (\times 10^4 M^{-1})$	$K_b (\times 10^3 M^{-1})$	$K_{SV} (\times 10^4 M^{-1})$	$K_b (\times 10^3 M^{-1})$	$K_{SV} (\times 10^4 M^{-1})$	$K_b (\times 10^3 M^{-1})$
(A)	$1.164 \pm 0.209$	$27.880 \pm 1.665$	$1.192 \pm 0.059$	$19.783 \pm 0.668$	$1.643 \pm 0.064$	$14.106 \pm 0.315$	$16.650 \pm 0.080$	$12.133 \pm 0.001$
(B)	$1.067 \pm 0.224$	$634.016 \pm 22.794$	$1.425 \pm 0.018$	$8.643 \pm 0.083$	$0.390 \pm 0.058$	$1.812 \pm 0.092$	$0.286 \pm 0.018$	$2.333 \pm 0.001$
(C)	$5.468 \pm 0.096$	$6.381 \pm 0.213$	$1.289 \pm 0.053$	$1.517 \pm 0.032$	$0.239 \pm 0.016$	$1.239 \pm 0.126$	$0.273 \pm 0.027$	$3.336 \pm 0.001$
$[(cym)Ru(phen)(py)]Cl_2$ [129]	-	-	-	-	-	-	$2.014 \pm 0.129$	$0.158 \pm 0.001$

Η  $K_b$  είναι χαρακτηριστική της ικανότητας αλληλεπίδρασης του κάθε συμπλόκου με το εκάστοτε μοντέλο DNA. Παρατηρείται ότι στην περίπτωση του  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ , οι  $K_b$  αυξάνονται με την μείωση του βαθμού ελευθερίας των διαμορφώσεων του BL, από BL3 προς τον BL1 δηλαδή, με το σύμπλοκο (A) να έχει τη μεγαλύτερη  $K_b$  κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με τα άλλα δύο σύμπλοκα. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση του  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$ , με το οποίο το (A) είχε μεγαλύτερη  $K_b$  ( $1.41 \times 10^4 M^{-1}$ ), επίσης

κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με τα (B) και (C) ( $1.81 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  και  $1.24 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  αντίστοιχα). Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.42, παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα των  $K_b$  για το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  [129]. Φαίνεται, λοιπόν, η ισχύς δέσμησης του (A) να είναι μεγαλύτερη σε όλες τις περιπτώσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι  $K_b$  που υπολογίστηκαν για τα διυρηνικά σύμπλοκα ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από την αντίστοιχη που είχε υπολογιστεί [129] για το μονοπυρηνικό σύμπλοκο  $[(cym)Ru(\text{phen})(py)]Cl_2$ , υποδεικνύοντας ότι η ισχύς της δέσμησης των (A)-(C) με το DNA είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του μονομεταλλικού συμπλόκου  $[(cym)Ru(\text{phen})(py)]Cl_2$  [129,171]. Παρόμοια αποτελέσματα σημειώθηκαν και στην περίπτωση του διπλού παρεμβολέα  $N,N'-(4,4'-oxydibenzyl)bis(\text{phenanthridinium chloride})$  όπου βρέθηκε ότι η αλληλεπίδρασή του με το DNA είναι αποτελεσματικότερη σε σχέση με το μονολειτουργικό του ανάλογο [172]. Άρα, η ισχύς της αλληλεπίδρασης των (A)-(C) με το DNA διαφέρει σημαντικά ανάλογα το είδος των βάσεων του εκάστοτε ολιγονουκλεοτιδίου και την αλληλουχία, δηλαδή με τις μικρές γεωμετρικές διαφορές που παρουσιάζουν τα ολιγονουκλεοτίδια, αν και όλα είναι B τύπου. Αναφορικά με τις  $K_b$  που υπολογίστηκαν για την αλληλεπίδραση των συμπλόκων (A)-(C) με CT-DNA, το οποίο περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό βάσεων και, κατά συνέπεια, διαφορετικές αλληλουχίες, ήταν ως επί το πλείστον μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες με τα ολιγονουκλεοτίδια. Πιο συγκεκριμένα, η  $K_b$  του (B) για την αλληλεπίδρασή του με CT-DNA ήταν η μεγαλύτερη που υπολογίστηκε μεταξύ όλων, κατά δύο τάξεις μεγέθους σε σχέση με τις υπόλοιπες ( $6.34 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η αλληλεπίδραση του συμπλόκου (A) με CT-DNA έδωσε  $K_b$  μεγαλύτερη κατά δύο φορές περίπου σε σύγκριση με τα ολιγονουκλεοτίδια  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ ,  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  και  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  [129]. Η γενικότερη τάση που παρατηρήθηκε, κατά την οποία οι  $K_b$  με το CT-DNA ήταν μεγάλες σε σχέση με τα τρία ολιγονουκλεοτίδια μπορεί να εξηγηθεί από το μέγεθος του CT-DNA, το οποίο προσφέρει πολλά περισσότερα σημεία αλληλεπίδρασης για τα (A)-(C), τα οποία μπορούν να ικανοποιούν όλες τις δομικές απαιτήσεις των συμπλόκων για δέσμηση.

### **3.5.2. Πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με βρωμιούχο αιθίδιο των συμπλόκων (1) - (16):**

Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων (1)-(16) με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  μελετήθηκε μέσω πειραμάτων ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού με EB. Οι τιμές των σταθερών  $K_{SV}$  και  $K_b$  των συμπλόκων αυτών καθώς επίσης και των (A)-(C) [129] συνοψίζονται στον Πίνακα 3.43.

Οι τιμές της  $K_{SV}$  για το κάθε σύμπλοκο υπολογίστηκαν όπως προηγουμένως. Συγκρίνοντας τις σταθερές αυτές για τα σύμπλοκα (5) - (7) (διφορτιακά), (9)-(11) (τριφορτιακά) και (A) - (C) (τετραφορτιακά), παρατηρείται ότι τα σύμπλοκα με τον πιο εύκαμπτο γεφυρωτικό υποκαταστάτη, BL3, απέδωσαν χαμηλότερες τιμές  $K_{SV}$  σε σύγκριση με τα αντίστοιχα σύμπλοκα με τους BL1 και BL2, ανεξαρτήτως φορτίου. Μεταξύ των συμπλόκων με τον BL1 η μεγαλύτερη  $K_{SV}$  υπολογίστηκε για το τετραφορτιακό σύμπλοκο (A), κατά μία και δύο τάξεις μεγέθους, αντίστοιχα. Το αντίθετο συμβαίνει στην περίπτωση των συμπλόκων με τον BL2, όπου το τετραφορτιακό σύμπλοκο (C) είχε την χαμηλότερη σταθερά  $K_{SV}$ . Οι  $K_{SV}$  των +2 και +3 φορτισμένων συμπλόκων ήταν παρόμοιου μεγέθους, με αυτή του +2 συμπλόκου να είναι ελαφρώς μεγαλύτερη. Ακόμη, μεταξύ των ομοφορτιακών συμπλόκων δεν παρατηρείται κάποια σημαντική συστημική διαφοροποίηση εξαιτίας διαφοροποίησης του γεφυρωτικού υποκαταστάτη, με τα σύμπλοκα με τον BL4 ((4), (8) και (12)) να αποδίδουν  $K_{SV}$  παρόμοιου μεγέθους με τα υπόλοιπα σύμπλοκα. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η αύξηση του μήκους του BL ή και της ευκαμψίας του, στη συγκεκριμένη περίπτωση, δεν βελτιώνει την ικανότητα απόσβεσης του φθορισμού ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης με το DNA και της εκτόπισης του EB, πιθανόν λόγω της ακαμψίας του υποκαταστάτη BL4, η οποία μπορεί να περιορίζει

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

την δέσμευση των συμπλόκων και από τις δύο ρhen με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ . Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι το σύμπλοκο (13), το οποίο είναι το μοναδικό σύμπλοκο στο οποίο τα δύο μεταλλικά κέντρα Ru(II) γεφυρώνονται από τον BL5, έδωσε μεγαλύτερη  $K_{sv}$  σε σχέση με τα σύμπλοκα με τον BL4, ανεξαρτήτως του φορτίου. Μπορεί να θεωρηθεί, συνεπώς, ότι η αύξηση του μήκους του γεφυρωτικού υποκαταστάτη αντιπαρέχεται μερικώς την ακαμψία του, δίνοντας πιθανώς τη δυνατότητα στο σύμπλοκο να αλληλεπιδρά πολυλειτουργικά με το DNA. Τέλος, όσον αφορά τις σταθερές  $K_{sv}$  αξίζει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι οι σταθερές των μονομεταλλικών συμπλόκων (14) - (16) ήταν μικρότερες από την πλειονότητα των διπυρηνικών συμπλόκων, όπως ήταν αναμενόμενο με βάση την FBA.

**Πίνακας 3.43:** Σταθερές  $K_{sv}$  και  $K_b$  των συμπλόκων (1) - (16) κατά την αλληλεπίδραση με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  σε θερμοκρασία 298 K. Στον πίνακα επίσης παρουσιάζονται οι τιμές των  $K_{sv}$  και  $K_b$  των συμπλόκων (A) - (C) με το ίδιο ολιγονουκλεοτίδιο για λόγους σύγκρισης [129].

Σύμπλοκο	$K_{sv} (\times 10^4 M^{-1})$	$K_b (\times 10^3 M^{-1})$	Σύμπλοκο	$K_{sv} (\times 10^4 M^{-1})$	$K_b (\times 10^3 M^{-1})$
(1)	$0.43 \pm 0.058$	$187.67 \pm 2.2$	(11)	$0.29 \pm 0.049$	$6.70 \pm 0.58$
(2)	$0.51 \pm 0.053$	$0.03 \pm 0.001$	(12)	$0.93 \pm 0.094$	$0.83 \pm 0.01$
(3)	$0.47 \pm 0.058$	$21.36 \pm 0.41$	(13)	$1.19 \pm 0.148$	$1.37 \pm 0.8$
(4)	$0.22 \pm 0.034$	$0.67 \pm 0.02$	(14)	$0.32 \pm 0.036$	$0.38 \pm 0.02$
(5)	$2.31 \pm 0.215$	$807.6 \pm 19.9$	(15)	$0.32 \pm 0.063$	$0.48 \pm 0.03$
(6)	$1.42 \pm 0.352$	$298.4 \pm 4.3$	(16)	$0.40 \pm 0.014$	$0.87 \pm 0.02$
(7)	$0.33 \pm 0.064$	$602.8 \pm 76.1$	(A)	$16.65 \pm 0.080$	$12.13 \pm 0.01$
(8)	$0.23 \pm 0.011$	$64.18 \pm 4.9$	(B)	$0.286 \pm 0.018$	$2.333 \pm 0.01$
(9)	$0.69 \pm 0.040$	$5.59 \pm 0.21$	(C)	$0.273 \pm 0.027$	$3.336 \pm 0.01$
(10)	$0.90 \pm 0.065$	$28.51 \pm 0.97$			

Οι σταθερές δέσμευσης  $K_b$  για τα σύμπλοκα (1) - (16) και (A) - (C) υπολογίστηκαν μέσω της καμπύλης  $\log[(F_0-F)/F] = f(\log[Q])$  (Εικόνα Π30). Για τα τρία διφορτιακά σύμπλοκα ((5) - (7)) οι  $K_b$  τους ήταν υψηλότερες σε σύγκριση με αυτές των αντίστοιχων τριφορτιακών και τετραφορτιακών συμπλόκων (9) - (11) και (A) - (C). Το παραπάνω αποτελεί ένδειξη του ότι τα σύμπλοκα με φορτίο +2 έχουν καλύτερη ικανότητα δέσμευσης με το ολιγονουκλεοτίδιο  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ . Μεταξύ των συμπλόκων του BL1 το τετραφορτιακό σύμπλοκο (A) και το τριφορτιακό σύμπλοκο (9) έδωσαν  $K_b$  παρόμοιου μεγέθους, με αυτή του (A) να είναι μεγαλύτερη. Ωστόσο, η διαφορά και των δύο σε σχέση με τη  $K_b$  του διφορτιακού (5) είναι αξιοσημείωτα μεγάλη, καθώς η  $K_b$  του (5) είναι μεγαλύτερη κατά 1-2 τάξεις μεγέθους (Πίνακας 3.43). Αναφορικά με τα σύμπλοκα του BL2, παρατηρείται η τάση, κατά την οποία η μείωση του φορτίου συνεπάγεται αύξηση της  $K_b$  και συνεπακόλουθα της ισχύος δέσμευσης με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ . Ειδικότερα, η  $K_b$  (6) ήταν μεγαλύτερη κατά μία τάξη μεγέθους σε σύγκριση με αυτή του (10), η  $K_b$  του οποίου ήταν μεγαλύτερη κατά μία τάξη μεγέθους σε σύγκριση με αυτή του συμπλόκου (B). Η ίδια τάση παρατηρείται και μεταξύ των συμπλόκων του BL3. Επιπροσθέτως, παρατηρείται ότι τα σύμπλοκα των BL4 και BL5 έχουν σημαντικά χαμηλότερες  $K_b$  σε σύγκριση με τα σύμπλοκα με των BL1 και BL3, τα οποία έδωσαν τις μεγαλύτερες  $K_b$ , με τα σύμπλοκα του BL2 να έχουν  $K_b$  ενδιάμεσου μεγέθους. Πιθανή αιτία του φαινομένου αυτού είναι η δυσκαμψία των BL4 και BL5. Εξάιρεση αποτελεί η  $K_b$  του (2) η οποία είναι η χαμηλότερη  $K_b$  μεταξύ όλων των συμπλόκων. Στον αντίποδα, το σύμπλοκο (5) έδωσε την υψηλότερη  $K_b$  μεταξύ όλων, επιβεβαιώνοντας ότι τα διφορτιακά σύμπλοκα έχουν την καλύτερη ικανότητα αλληλεπίδρασης με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ . Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μεταξύ των δύο σειρών διφορτιακών συμπλόκων, αυτών με την  $ppg-H^+$  ως χηλικό υποκαταστάτη και αυτών με την  $bzq-H^+$  ως χηλικό υποκαταστάτη, τα σύμπλοκα με τον BL2, δηλαδή τα (2) και (6) έδωσαν  $K_b$  χαμηλότερες σε σχέση

με τα αντίστοιχα των BL1 και BL3. Απεναντίας, μεταξύ των τριφορτιακών συμπλόκων (9) - (12), το σύμπλοκο (10) (BL2) είχε τη μεγαλύτερη  $K_b$ . Φαίνεται, λοιπόν, ότι το μήκος και η ευκαμψία του γεφυρωτικού υποκαταστάτη παρόλο που επηρεάζουν σημαντικά την αλληλεπίδραση με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , δεν είναι οι αποκλειστικοί παράγοντες που καθορίζουν την ισχύ της δέσμησης με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ . Επιπλέον, αξίζει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι μεταξύ των διφορτιακών συμπλόκων (1) - (8) τα σύμπλοκα της  $bzq-H^+$  ((5) - (8)) έδωσαν σημαντικά μεγαλύτερες  $K_b$  σε σχέση με τα σύμπλοκα της  $rry-H^+$  ((1) - (4)). Αποδεικνύεται με αυτόν τον τρόπο το γεγονός ότι το εκτενέστερο αρωματικό σύστημα της  $bzq$  σε σχέση με της  $rry-H^+$  αυξάνει σημαντικά την ικανότητα δέσμησης με το DNA. Τέλος, τις χαμηλότερες  $K_b$  έδωσαν τα μονομεταλλικά σύμπλοκα (14) - (16), όπως αναμενόταν, καθώς η ύπαρξη της δεύτερης μεταλλικής μονάδας στα υπόλοιπα σύμπλοκα αυξάνει σημαντικά την δυνατότητα δέσμησης τους στο DNA, πιθανώς λόγω της δυνατότητας διλειτουργικών αλληλεπιδράσεων με το DNA [102]. Μάλιστα οι  $K_b$  των διπυρηνικών συμπλόκων σε σχέση με τα μονομεταλλικά (14) - (16) ήταν παραπάνω από διπλάσιες σε μέγεθος, υποδεικνύοντας σημαντικά μεγαλύτερη ισχύ δέσμησης των διπυρηνικών συμπλόκων. Επιπροσθέτως, τα πειράματα ανταγωνιστικής πρόσδεσης - απόσβεσης φθορισμού επιβεβαιώνουν τους προτεινόμενους τρόπους αλληλεπίδρασης των συμπλόκων (9) - (11) με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ . Το μέγεθος των  $K_{SV}$  και  $K_b$  σε σύγκριση με τις αντίστοιχες που έχουν υπολογιστεί για το EB, επιβεβαιώνουν ότι το σύμπλοκο (9) έχει την δυνατότητα παρεμβολής μεταξύ των βάσεων του DNA, ενώ τα (10) και (11) δεσμεύονται στη μικρή αύλακα του DNA [170,173].

### **3.6. Κυτταροτοξικές μελέτες των συμπλόκων (5) - (7) και (9) - (11):**

Τα διφορτιακά σύμπλοκα (5) - (7) στις κυτταροτοξικές μελέτες που έγιναν με την κυτταρική σειρά A2780 έδωσαν  $IC_{50}$  μεταξύ 5 και 10  $\mu M$ , ενώ με την κυτταρική σειρά A2780cis-res το  $IC_{50}$  των συμπλόκων αυτών ήταν 7-15  $\mu M$ . Οι τιμές αυτές ήταν ελαφρώς χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των τριφορτιακών συμπλόκων (9) - (11), ένδειξη του ότι η ελάττωση του συνολικού φορτίου των συμπλόκων από +3 σε +2 επηρεάζει ελαφρώς την κυτταροτοξικότητα με τις παραπάνω κυτταρικές σειρές. Αντίθετα, τα τετραφορτιακά σύμπλοκα (A) - (C) με στις ίδιες κυτταρικές σειρές είχαν αποδώσει σημαντικά μεγαλύτερες τιμές  $IC_{50}$  (35-200  $\mu M$ ) [129]. Φαίνεται, συνεπώς, ότι η αύξηση του συνολικού φορτίου, από +4 και άνω, πιθανόν να μειώνει σημαντικά την ικανότητα των συμπλόκων να εισέρχονται στον ενδοκυτταρικό χώρο, μειώνοντας, έτσι, και την κυτταροτοξικότητά τους. Ωστόσο, η μειωμένη κυτταροτοξικότητα των συμπλόκων (A) - (C) με τις παραπάνω καρκινικές κυτταρικές σειρές, συνοδεύεται και από μειωμένη δράση έναντι υγιών κυτταρικών σειρών, συγκεκριμένα την NIH-3T3, κάνοντας έτσι τα σύμπλοκα αυτά να έχουν καλύτερο παράγοντα εκλεκτικότητας (selectivity index, SI). Ο SI που υπολογίστηκε για τα +4 φορτισμένα σύμπλοκα (A) - (C) έφτανε μέχρι και 6, εν αντιθέσει με τα +2 και +3 φορτισμένα σύμπλοκα, των οποίων ο SI έλαβε μικρότερες τιμές (Πίνακας 3.44).

Όσον αφορά την συσχέτιση του μήκους των BL με την κυτταροτοξικότητα, παρατηρείται γενικότερα ότι τα σύμπλοκα του BL2 έχουν μειωμένη κυτταροτοξικότητα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα των BL1 και BL3. Το μήκος των γεφυρωτικών υποκαταστατών, το οποίο διαφέρει κατά προσέγγιση κατά 1-2 Å, είναι αρκετά μικρό για να μπορούν να λάβουν χώρα διλειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεγάλου εύρους με το DNA. Οι αποστάσεις μεταξύ των δύο μεταλλικών κέντρων Ru(II) στα σύμπλοκα (5) - (7) κυμαίνονται από 10 έως 12 Å, όπως επιβεβαιώνεται και από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Παρόμοιες αποστάσεις μεταξύ των μεταλλικών κέντρων αναμένονται και για τα σύμπλοκα (9) - (11), για τα οποία δεν ήταν δυνατή η λήψη κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αποτελέσματα - Συζήτηση

Τα τετραφορτιακά σύμπλοκα (Α) - (C) έδωσαν  $IC_{50} > 300 \mu M$  [129] έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7 (καρκίνος του μαστού), καθιστώντας τα πρακτικά αδρανή απέναντι στη συγκεκριμένη καρκινική κυτταρική σειρά. Αντίθετα τα σύμπλοκα (5) - (7) και (9) - (11), με την κυτταρική σειρά MCF-7 έδωσαν ενθαρρυντικές τιμές  $IC_{50}$ , 8-37  $\mu M$ . Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ των συμπλόκων αυτών, τα καλύτερα κυτταροτοξικά αποτελέσματα έδωσαν τα σύμπλοκα του B11, (5) και (9), ακόμη και σε σχέση με το γνωστό χημειοθεραπευτικό φάρμακο cisplatin. Χαμηλότερη τιμή  $IC_{50}$  σε σχέση με το cisplatin έδωσαν και έναντι της κυτταρικής σειράς A2780cis-res.

**Πίνακας 3.44:** Τιμές  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ), selectivity index και resistant factor για τα σύμπλοκα (5) - (7), (9) - (11) και (Α) - (C) [129]. [a] Selectivity Index =  $IC_{50}(\text{NIHT-3T3})/IC_{50}(\text{MCF-7}) - IC_{50}(\text{NIHT-3T3})/IC_{50}(\text{A2780}) - IC_{50}(\text{NIHT-3T3})/IC_{50}(\text{A2780cis-res})$ . [b] Resistance Factor =  $IC_{50}(\text{A2780cisR})/IC_{50}(\text{A2780})$ .

Σύμπλοκο	A2780	A2780cis-res	MCF-7	NIH-3T3	Selectivity Index [a]	Resistant Factor [b]
(5)	7.52 ± 0.34	7.58 ± 0.83	8.53 ± 1.03	18.69 ± 3.62	2.2 - 2.5 - 2.5	1
(6)	10.81 ± 3.22	14.64 ± 0.47	14.73 ± 1.65	34.75 ± 2.09	2.4 - 3.5 - 2.3	1.3
(7)	5.63 ± 1.28	11.83 ± 1.42	18.22 ± 1.30	14.54 ± 0.61	0.8 - 2.6 - 1.2	2.1
(9)	10.18 ± 0.76	9.76 ± 0.82	11.19 ± 1.24	17.22 ± 1.22	1.5 - 1.7 - 1.8	1
(10)	10.91 ± 2.93	27.66 ± 2.28	37.59 ± 8.87	46.32 ± 5.59	1.2 - 4.6 - 1.7	2.5
(11)	8.82 ± 1.35	17.64 ± 3.32	16.42 ± 1.04	25.14 ± 1.51	1.5 - 2.9 - 1.5	1.9
(A)	117.3 ± 26.92	193.0 ± 33.15	302.7 ± 26.62	192.3 ± 25.38	0.6 - 1.6 - 1	1.6
(B)	35.57 ± 9.75	46.00 ± 6.13	275.8 ± 37.43	137.6 ± 18.45	0.5 - 3.9 - 3	1.3
(C)	34.77 ± 1.71	47.42 ± 3.51	337.5 ± 0.16	184.9 ± 13.07	0.5 - 5.2 - 4	1.4
cisplatin	2.54 ± 0.11	18.43 ± 1.59	14.62 ± 1.25	3.02 ± 0.36	0.2 - 1.2 - 0.2	7.2

Με βάση όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορεί να θεωρηθεί ότι τα σύμπλοκα (5) - (7) και (9) - (11) είναι αρκετά υποσχόμενα όσον αφορά τα κυτταροτοξικά τους αποτελέσματα, σε σύγκριση με άλλα αντίστοιχα σύμπλοκα της βιβλιογραφίας [174,175]. Τα περισσότερα διπυρηνικά και μονοπυρηνικά σύμπλοκα του Ru(II) που αναφέρονται στην βιβλιογραφία αλληλεπιδρούν με τα βιομόρια στόχους ομοιοπολικά, εν αντιθέσει με τα παρόντα σύμπλοκα [176,177]. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων τα διπυρηνικά σύμπλοκα έδωσαν καλύτερα κυτταροτοξικά προφίλ σε σύγκριση με τα μονοπυρηνικά ανάλογά τους. Το παραπάνω θεωρείται ότι οφείλεται στη μεγαλύτερη λιποφιλικότητα των διπυρηνικών συμπλόκων ως αποτέλεσμα της παρουσίας των γεφυρωτικών υποκαταστατών, καθώς επίσης και στην ενδεχόμενη ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν διλειτουργικά [178,179,180]. Ωστόσο, έχει γενικότερα παρατηρηθεί ότι τα διπυρηνικά σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με το DNA μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων έχουν συνήθως χαμηλή κυτταροτοξικότητα, αλλά αξιοσημείωτο παράγοντα εκλεκτικότητας [181,129]. Το ίδιο δεν συμβαίνει για τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν, καθώς όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζουν τιμές  $IC_{50}$  χαμηλότερες από αυτές του cisplatin, έναντι κυτταρικών σειρών όπως οι A2780cis-res και MCF-7.



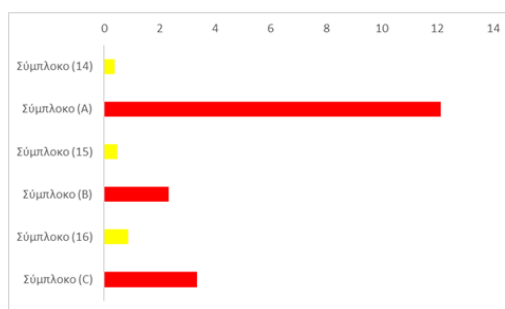
# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**



#### 4.1. Συμπεράσματα:

Με βάση τα αποτελέσματα που αναλύθηκαν στο 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο, μπορούν να εξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

1. Τα σύμπλοκα (1) - (16), τα οποία απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά, αποτελούν μια μικρή βιβλιοθήκη διπυρηνικών και μονοπυρηνικών συμπλόκων του Ru(II) με αρένια και ολιγοπυριδινικούς υποκαταστάτες με κορεσμένη σφαίρα ένταξης με συστηματική μεταβολή των γεωμετρικών χαρακτηριστικών και του φορτίου τους.
2. Είναι γνωστό πως το *p-cymene* περιστρέφεται ελεύθερα γύρω από τον η<sup>6</sup>- απτικό δεσμό με το Ru(II), ωστόσο ανάλογα με το είδος των υποκαταστατών του ρουθηνίου, η περιστροφή επιβραδύνεται ώστε να υπάρχουν χωρικές διευθετήσεις των υποκαταστατών που ευνοούνται περισσότερο. Στις περιπτώσεις όπου η *rhen* είναι ο χηλικός υποκαταστάτης φαίνεται να προτιμάται η διάταξη όπου η ισοπροπυλομάδα του *cym* βρίσκεται πάνω από την *rhen*. Η τάση αυτή επιβεβαιώνεται και στην περίπτωση της *bzq-H<sup>+</sup>*. Αντίθετα, στα σύμπλοκα με την *ppy-H<sup>+</sup>*, η οποία διαθέτει μικρότερο αρωματικό σύστημα δεν παρεμποδίζεται η περιστροφή.
3. Οι κρυσταλλικές δομές των (5) - (7) επιβεβαιώνουν την ψευδοκταεδρική γεωμετρία τύπου «σκαμπό πιάνου» (*riano stool*) για κάθε μεταλλικό κέντρο. Ακόμη οι κρυσταλλικές δομές των (5) - (7) συμφωνούν με τα δεδομένα που προέκυψαν από το φάσμα NOESY, ως προς τη προτιμώμενη διάταξη του *p-cymene*.
4. Στα (5) και (6) οι *bzq-H<sup>+</sup>* των δύο μεταλλικών κέντρων είναι *anti* μεταξύ τους, ενώ στο (7) *syn* και υπό γωνία 82.1°. Έτσι η απόσταση μεταξύ των Ru(II) είναι μεγαλύτερη στο (6) σε σχέση με το (7).
5. Η ύπαρξη της δεύτερης μεταλλικής μονάδας και των υποκαταστατών της, αυξάνει σημαντικά την ισχύ της δέσμευσης των (A) - (C) σε σχέση με τα μονοπυρηνικά ανάλογά τους (14) - (16), όπως αυτό απεικονίζεται και από τις  $K_b$  (Εικόνα 4.1).



**Εικόνα 4.1:** Ραβδόγραμμα των  $K_b$  ( $\times 10^3 M^{-1}$ ) των μονοπυρηνικών (14) - (16) έναντι των διπυρηνικών συμπλόκων (A) - (C) [129] (κόκκινο) με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')$ .

6. Τα (A) - (C) δεσμεύονται στα  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  και  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$  μέσω των *rhen* τους. Οι μετατοπίσεις των H των υπολοίπων υποκαταστατών είναι μικρότερες και προκαλούνται πιθανώς από τις μικρές δομικές αλλαγές που υφίστανται τα σύμπλοκα εξαιτίας της δέσμευσης.
7. Η αλληλεπίδραση των (A) - (C) με το DNA, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλουχία και το είδος των βάσεων του. Το (A) φαίνεται να δεσμεύεται ισχυρότερα, προκαλώντας και ρήξη ορισμένων δεσμών υδρογόνου, κυρίως σε ολιγονουκλεοτίδια με μεγαλύτερη αφθονία ζευγών C:G, όπως τα  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  και  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , παρά A:T ( $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ ). Αντίθετα, τα (B) και (C) προκαλούν ρήξη δεσμών υδρογόνου μόνο στο  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ , το οποίο είναι πλουσιότερο σε ζεύγη A:T.
8. Τα (A) - (C) αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους με τα  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  και  $d(5'-CTTTGCAAAAG-3')_2$ . Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το (A) είναι το μόνο σύμπλοκο από τα τρία που αλληλεπιδρά και μέσω παρεμβολής. Και τα τρία σύμπλοκα αλληλεπιδρούν με τα ολιγονουκλεοτίδια και μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Εξαιτίας των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τα +4

## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>: Συμπεράσματα

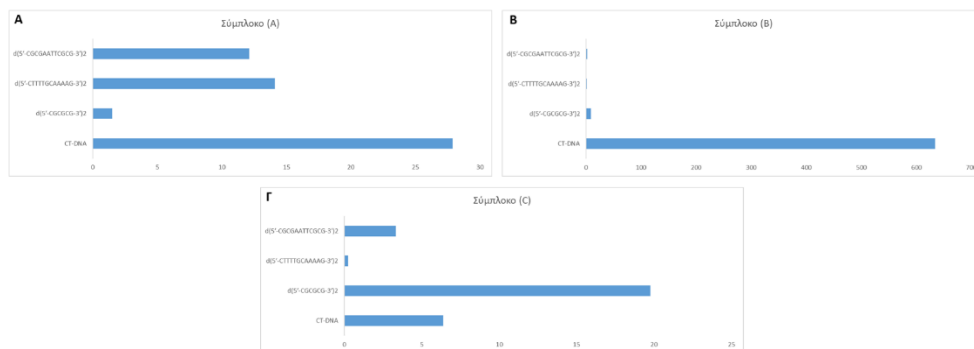
φορτισμένα (A) - (C) είναι πιθανή η χωρική συμπύκνωση των  $d(5'-CGCGCG-3')_2$  και  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$ , χωρίς ωστόσο να αλλοιώνεται η B τύπου δομή τους.

9. Μεταξύ των (A) - (C) το (A) είναι το μόνο που προκαλεί ρήξη δεσμών υδρογόνου και στα τρία ολιγονουκλεοτίδια (Πίνακας 4.1). Αντίθετα τα (B) και (C) προκαλούν ρήξη μόνο του A11/T2N3H στο  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$ . Φαίνεται, συνεπώς, ότι το μικρότερο μέγεθος και η ακαμψία του B11 ευνοούν την αλληλεπίδραση του (A) με τα ολιγονουκλεοτίδια προκαλώντας έτσι μεγαλύτερες μεταβολές σε αυτά. Ακόμη παρατηρείται ότι τα (A) και (C) αλληλεπιδρούν τόσο από τη μεγάλη όσο και από τη μικρή αύλακα, αναλόγως το ολιγονουκλεοτίδιο. Αντίθετα το (B) δεσμεύεται εκλεκτικά μέσω της μικρής αύλακας.

**Πίνακας 4.1:** Στοιχεία της αλληλεπίδρασης των (A) - (C) με τα  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ ,  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  και  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  [129].

	$d(5'-CGCGCG-3')_2$	$d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$	$d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ [129]
<b>(A)</b>	Μεγάλη αύλακα	Μικρή αύλακα	Μικρή αύλακα
	Ρήξη δεσμών υδρογόνου C3/G4N1H ( $r = 1$ ) & C5/G2N1H ( $r = 2$ )	Ρήξη δεσμών υδρογόνου A11/T2N3H ( $r = 1$ )	Ρήξη δεσμών υδρογόνου A6/T7N3H, A5/T8N3H ( $r = 1$ ) και C3/G10N1H, C11/G2N1H ( $r = 2$ )
<b>(B)</b>	Μικρή αύλακα	Μικρή αύλακα	Μικρή αύλακα
	Καμία πλήρης ρήξη δεσμού υδρογόνου	Ρήξη δεσμού υδρογόνου A11/T2N3H ( $r = 1$ )	Καμία πλήρης ρήξη δεσμού υδρογόνου
<b>(C)</b>	Μικρή αύλακα	Μικρή αύλακα	Μικρή & μεγάλη αύλακα
	Καμία πλήρης ρήξη δεσμού υδρογόνου	Ρήξη δεσμού υδρογόνου A11/T2N3H ( $r = 1$ )	Καμία πλήρης ρήξη δεσμού υδρογόνου

10. Στην Εικόνα 4.2 παρουσιάζονται σε ραβδογράμματα οι  $K_b$  των (A) - (C) με τα  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ ,  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  και  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , καθώς επίσης και με CT DNA. Όπως είναι φανερό, η  $K_b$  που υπολογίζεται για το CT DNA και αναφέρεται συνήθως στην βιβλιογραφία, αποτελεί τον «μέσο όρο» των επιμέρους σταθερών  $K_b$  που σχετίζονται με την αλληλουχία (με μικρές ή μεγάλες τιμές) και δεν αντιπροσωπεύει την πραγματική ισχύ δέσμευσης ενός μορίου στο DNA.



**Εικόνα 4.2:** Ραβδογράμματα των  $K_b$  ( $\times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) με τα  $d(5'-CGCGCG-3')_2$ ,  $d(5'-CTTTTGCAAAAG-3')_2$  και  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , καθώς επίσης και με CT DNA. Α) Σύμπλοκο (A), Β) Σύμπλοκο (B), Γ) Σύμπλοκο (C).

11. Οι  $K_b$  των (A) - (C) φαίνεται να αναδεικνύουν διαφορετικές «προτιμήσεις» ως προς το είδος και την αλληλουχία των βάσεων (Εικόνα 4.2). Η φθορισμομετρία, παρότι αποτελεί μία αξιόπιστη τεχνική που μπορεί να δώσει πληροφορίες για την ισχύ της αλληλεπίδρασης και, εμμέσως για τον τρόπο σύνδεσης, δεν μπορεί να εξετάσει την αλληλεπίδραση σε ατομικό επίπεδο, όπως το NMR, από το οποίο λαμβάνονται πιο λεπτομερείς πληροφορίες.

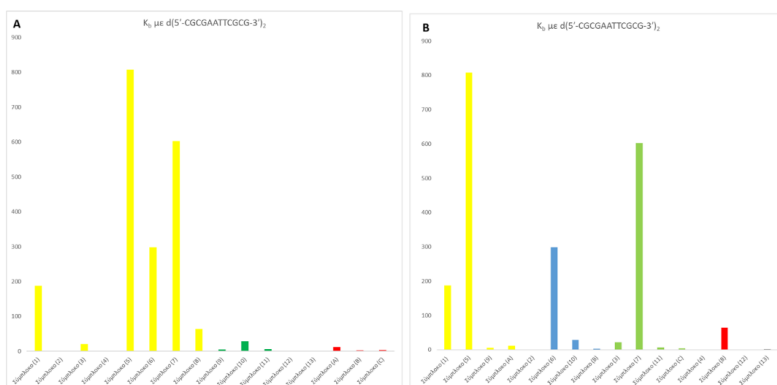
## Κεφάλαιο 4ο: Συμπεράσματα

12. Από την μελέτη της αλληλεπίδρασης των (9) - (11) με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  με NMR, παρατηρήθηκε ότι ενώ και τα τρία σύμπλοκα αλληλεπιδρούν με διάφορους τρόπους με το ολιγονουκλεοτίδιο, μόνο το (9) παρεμβάλλεται μεταξύ των νουκλεϊκών βάσεων. Επιβεβαιώνεται συνεπώς η τάση ότι το μικρότερο μήκος και η ακαμψία του BL1 παίζει καταλυτικό ρόλο στο παραπάνω φαινόμενο, καθώς το ίδιο είχε συμβεί με τα ομόλογα τους σύμπλοκα (A) - (C).

**Πίνακας 4.2:** Στοιχεία της αλληλεπίδρασης των (9) - (11) και (A) - (C) με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ .

Σύμπλοκα	$d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$
(9)	Μικρή αύλακα
	Ρήξη δεσμών υδρογόνου: A5/T8N3H, A6/T7N3H, C11/G2N1H, C3/G10N1H ( $r = 0.5$ ) και G2/C11N2H*, G10/C3N2H* ( $r = 1$ )
(A)	Μικρή αύλακα
	Ρήξη δεσμών υδρογόνου A6/T7N3H, A5/T8N3H ( $r = 1$ ) και C3/G10N1H, C11/G2N1H ( $r = 2$ )
(10)	Μικρή & μεγάλη αύλακα
	Καμία πλήρης ρήξη δεσμού υδρογόνου
(B)	Μικρή αύλακα
	Καμία πλήρης ρήξη δεσμού υδρογόνου
(11)	Μικρή & μεγάλη αύλακα
	C11/G2N1H ( $r = 2$ )
(C)	Μικρή & μεγάλη αύλακα
	Καμία πλήρης ρήξη δεσμού υδρογόνου

13. Τα (9) - (11) με φορτίο +3 προκαλούν μεγαλύτερες δομικές μεταβολές στο  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ , όπως ρήξη δεσμών υδρογόνου (Πίνακας 4.2), σε σχέση με εκείνα με φορτίο +4 (A) - (C). Αντίστοιχα εκείνα με φορτίο +2 δεσμεύονται ακόμη ισχυρότερα στο  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$  (Εικόνα 4.3). Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι το μεγαλύτερο θετικό φορτίο δεν οδηγεί απαραίτητα σε μεγαλύτερη  $K_b$ .



**Εικόνα 4.3:** Ραβδογράμματα των  $K_b$  των διπυρηνικών (1) - (13) και (A) - (C). A) Χωρισμένα αναλόγως το φορτίο: +2 (κίτρινο), +3 (πράσινο), +4 (κόκκινο). B) Χωρισμένα αναλόγως τον BL: BL1 (κίτρινο), BL2 (γαλάζιο), BL3 (πράσινο), BL4 (κόκκινο), BL5 (γκρι).

14. Το λιγότερο εκτεταμένο αρωματικό σύστημα της  $ppg-H^+$  από εκείνο της  $bzq-H^+$  αντικατοπτρίζεται στις χαμηλότερες τιμές  $K_b$  των συμπλόκων της (1) - (8), αποδεικνύοντας τη συμμετοχή του χηλικού υποκαταστάτη στη δέσμευση των συμπλόκων στο DNA.
15. Όπως φαίνεται και στο ραβδόγραμμα της Εικόνας 4.3B, και σε συμφωνία με τα όσα έδειξαν οι μελέτες με NMR, τα σύμπλοκα του BL1 φαίνεται να δεσμεύονται ισχυρότερα στο DNA. Ακόμη φαίνεται ότι τα σύμπλοκα του BL2 έχουν μικρότερη ισχύ δέσμευσης από αυτά του BL3.
16. Τα διπυρηνικά σύμπλοκα εμφανίζουν καλύτερα κυτταροτοξικά προφίλ με τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, σε σύγκριση με μονοπυρηνικά ανάλογά τους. Πιθανή αιτία του φαινομένου αυτού είναι η μεγαλύτερη λιποφιλικότητα των διπυρηνικών συμπλόκων εξαιτίας του γεφυρωτικού υποκαταστάτη.
17. Έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς MCF-7, τα διφορτιακά (5) - (7) και (9) - (11) έδωσαν αρκετά καλές τιμές  $IC_{50}$ . Ιδίως τα σύμπλοκα του BL1 (5) και (9) είχαν χαμηλότερο  $IC_{50}$  ακόμη και σε σύγκριση με το cisplatin. Εκείνα με τον BL2 φαίνεται να είναι γενικά τα λιγότερο κυτταροτοξικά από τα αντίστοιχα των BL1 και BL3.



# **Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: Βιβλιογραφία**



**Βιβλιογραφία:**

1. S. Minchin and J. Lodge, *Essays in Biochemistry*, 2019, **63**, 433-456
2. J. C. Puigvert, K. Sanjiv and T. Helleday, *The FEBS Journal*, 2016, **283**, 232-245.
3. B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright and J. R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 3505-3526.
4. M. Cory, D. D. McKee, J. Kagan, D. W. Henry and J. Allen Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 2528-2536.
5. A. Yadav and K. Poonia, *Applied Organom Chemis*, 2024, **38**, e7496.
6. D.-W. Shen, L. M. Pouliot, M. D. Hall and M. M. Gottesman, *Pharmacological Reviews*, 2012, **64**, 706-721.
7. N. Martinho, T. C. B. Santos, H. F. Florindo and L. C. Silva, *Front. Physiol.*, 2019, **9**, 1898.
8. R. J. Browning, P. J. T. Reardon, M. Parhizkar, R. B. Pedley, M. Edirisinghe, J. C. Knowles and E. Stride, *ACS Nano*, 2017, **11**, 8560-8578.
9. R. A. Alderden, M. D. Hall and T. W. Hambley, *J. Chem. Educ.*, 2006, **83**, 728.
10. R. C. Kiss, F. Xia and S. Acklin, *IJMS*, 2021, **22**, 8199.
11. Z. Herrera-Pérez, N. Gretz and H. Dweep, *CG*, 2016, **17**, 279-293.
12. S. Shruthi and K. Bhasker Shenoy, *ChemistrySelect*, 2024, **9**, e202401449.
13. L. Galluzzi, I. Vitale, J. Michels, C. Brenner, G. Szabadkai, A. Harel-Bellan, M. Castedo and G. Kroemer, *Cell Death Dis*, 2014, **5**, e1257-e1257.
14. K. Li, J. Li, Z. Li, L. Men, H. Zuo and X. Gong, *Pharmacological Research*, 2024, **203**, 107175.
15. Z. Herrera-Pérez, N. Gretz and H. Dweep, *CG*, 2016, **17**, 279-293.
16. G. F. D. Sousa, S. R. Wlodarczyk and G. Monteiro, *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2014, **50**, 693-701.
17. S. Shruthi and K. Bhasker Shenoy, *ChemistrySelect*, 2024, **9**, e202401449.
18. J. Zhou, Y. Kang, L. Chen, H. Wang, J. Liu, S. Zeng and L. Yu, *Front. Pharmacol.*, 2020, **11**, 343.
19. W. Kim, *Processes*, 2020, **8**, 680.
20. T. Alcindor and N. Beauger, *Current Oncology*, 2011, **18**, 18-25.
21. A. Kopacz-Bednarska and T. Król, *Nowotwory. Journal of Oncology*, 2022, **72**, 96-105.
22. P. Pedrosa, A. Carvalho, P. V. Baptista and A. R. Fernandes, in *Basic Concepts Viewed from Frontier in Inorganic Coordination Chemistry*, ed. T. Akitsu, IntechOpen, 2018.
23. S. Hua, X. Kong, B. Chen, W. Zhuang, Q. Sun, W. Yang, W. Liu and Y. Zhang, *CMP*, 2018, **11**, 316-325.
24. M. J. McKeage, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2001, **10**, 119-128.
25. A. Bhargava and U. N. Vaishampayan, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2009, **18**, 1787-1797.
26. C. Sonkar, S. Sarkar and S. Mukhopadhyay, *RSC Med. Chem.*, 2022, **13**, 22-38.
27. P. K. Shah, N. R. Jena and P. K. Shukla, *J Mol Model*, 2022, **28**, 291.
28. E. Alessio and L. Messori, *Molecules*, 2019, **24**, 1995.
29. R. L. Lucaci, A. C. Hangan, B. Sevastre and L. S. Oprean, *Molecules*, 2022, **27**, 6485.
30. B. Happl, T. Balber, P. Heffeter, C. Denk, J. M. Welch, U. Köster, C. Alliot, A.-C. Bonraisin, M. Brandt, F. Haddad, J. H. Sterba, W. Kandioller, M. Mitterhauser, M. Hacker, B. K. Keppler and T. L. Mindt, *Dalton Trans.*, 2024, **53**, 6031-6040.
31. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellis and S. L. Heath, *Chem. Commun.*, 2001, 1396-1397.
32. A. Kokkosi, E. Garofallidou, N. Zacharopoulos, N. Tsoureas, K. Diamanti, N. S. Thomaidis, A. Cheilari, C. Machalia, E. Emmanouilidou and A. I. Philippopoulos, *Molecules*, 2024, **29**, 3215.
33. S. Swaminathan and R. Karvembu, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, 2023, **6**, 982-996.
34. H. U. Holtkamp, S. Movassaghi, S. J. Morrow, M. Kubanik and C. G. Hartinger, *Metallomics*, 2018, **10**, 455-462.
35. C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellis, P. A. Salter and R. Scopelliti, *Journal of Organometallic Chemistry*, 2003, **668**, 35-42.
36. G. Süss-Fink, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 1673-1688.
37. R. Lee, S. Escrig, C. Maclachlan, G. Knott, A. Meibom, G. Sava and P. Dyson, *IJMS*, 2017, **18**, 1869.
38. A. E. Egger, C. G. Hartinger, A. K. Renfrew and P. J. Dyson, *J Biol Inorg Chem*, 2010, **15**, 919-927.
39. S. Swaminathan, J. Haribabu, N. Balakrishnan, P. Vasanthakumar and R. Karvembu, *Coordination Chemistry Reviews*, 2022, **459**, 214403.
40. K. J. Kilpin, C. M. Clavel, F. Edefe and P. J. Dyson, *Organometallics*, 2012, **31**, 7031-7039.
41. B. S. Murray, L. Menin, R. Scopelliti and P. J. Dyson, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 2536.

## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: Βιβλιογραφία

42. S. Chatterjee, S. Kundu, A. Bhattacharyya, C. G. Hartinger and P. J. Dyson, *J Biol Inorg Chem*, 2008, **13**, 1149-1155.
43. R. E. Morris, R. E. Aird, P. Del Socorro Murdoch, H. Chen, J. Cummings, N. D. Hughes, S. Parsons, A. Parkin, G. Boyd, D. I. Jodrell and P. J. Sadler, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 3616-3621.
44. S. Parveen, F. Arjmand and S. Tabassum, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, **175**, 269-286.
45. A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernández, S. Parsons, I. D. H. Oswald, A. Parkin, F. P. A. Fabbiani, J. E. Davidson, A. Dawson, R. E. Aird, D. I. Jodrell and P. J. Sadler, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 6858-6868.
46. R. Fernández, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons and P. J. Sadler, *Chemistry A European J*, 2004, **10**, 5173-5179.
47. S. Betanzos-Lara, A. Habtemariam, G. J. Clarkson and P. J. Sadler, *Eur J Inorg Chem*, 2011, **2011**, 3257-3264.
48. T. Tsolis, K. Ypsilantis, A. Kourtellaris and A. Garoufis, *Polyhedron*, 2018, **149**, 45-53.
49. T. Tsolis, K. D. Papavasileiou, S. A. Divanis, V. S. Melissas and A. Garoufis, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2016, **160**, 12-23.
50. J. Grau, V. Noe, C. Ciudad, M. J. Prieto, M. Font-Bardia, T. Calvet and V. Moreno, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, **109**, 72-81.
51. N. Kumar, R. Kaushal and P. Awasthi, *Journal of Molecular Structure*, 2023, **1288**, 135751.
52. A. Erxleben, *Chimia*, 2017, **71**, 102.
53. K. El-Adl, M.-K. Ibrahim, M. S. I. Alesawy and I. H. Eissa, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2021, **30**, 115958.
54. A. A. Almaqwashi, T. Paramanathan, I. Rouzina and M. C. Williams, *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**, 3971-3988.
55. T. Murphy and K. W. L. Yee, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2017, **18**, 1765-1780.
56. M. Kciuk, A. Gielecińska, S. Mujwar, D. Kołat, Ż. Kałuzińska-Kołat, I. Celik and R. Kontek, *Cells*, 2023, **12**, 659.
57. S. Faheem Askari, S. Tariq and M. Mehdi, *Int J Biotech Bioeng*, 2018, **4**, 81-85.
58. W. Hou, X. Xu, L. Huang, Z. Zhang, Z. Zhou, J. Wang, X. Ouyang, S. Xin, Z. Zhang, Y. Xiong, H. Huang and J. Lan, *Chemistry & Biodiversity*, 2024, **21**, e202400210.
59. G. S. Khan, A. Shah, Zia-ur-Rehman and D. Barker, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2012, **115**, 105-118.
60. S. Dasari and P. Bernard Tchounwou, *European Journal of Pharmacology*, 2014, **740**, 364-378.
61. S. Mahadevan and M. Palaniandavar, *Inorganica Chimica Acta*, 1997, **254**, 291-302.
62. Q. Zhang, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2001, **83**, 49-55.
63. J. Liu, T. Zhang, T. Lu, L. Qu, H. Zhou, Q. Zhang and L. Ji, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, **91**, 269-276.
64. A. C. Barve, S. Ghosh, A. A. Kumbhar, A. S. Kumbhar and V. G. Puranik, *Transition Met Chem*, 2005, **30**, 312-316.
65. B. Peng, W.-H. Zhou, L. Yan, H.-W. Liu and L. Zhu, *Transition Met Chem*, 2009, **34**, 231-237
66. Y.-C. Liu, Z.-F. Chen, L.-M. Liu, Y. Peng, X. Hong, B. Yang, H.-G. Liu, H. Liang and C. Orvig, *Dalton Trans.*, 2009, 10813.
67. J. Wang, X. Liu, Y. Sun, L. Yan and S. He, *Journal of Coordination Chemistry*, 2011, **64**, 1554-1565.
68. J. Wang, X. R. Liu, Y. J. Sun, K. S. Li and S. S. Zhao, *AMR*, 2011, **233-235**, 175-179.
69. R. Singh, R. N. Jadeja, M. C. Thounaojam, R. V. Devkar and D. Chakraborty, *Transition Met Chem*, 2012, **37**, 541-551.
70. F. Javed, A. A. Altaf, A. Badshah, M. N. Tahir, M. Siddiq, A. Shah, S. Ullah and B. Lal, *Journal of Coordination Chemistry*, 2012, **65**, 969-979.
71. C. C. Konkankit, S. C. Marker, K. M. Knopf and J. J. Wilson, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 9934-9974.
72. M. Kaplanis, G. Stamatakis, V. D. Papakonstantinou, M. Paravatou-Petsotas, C. A. Demopoulos and C. A. Mitsopoulou, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, **135**, 1-9.
73. G. Balakrishnan, T. Rajendran, K. Senthil Murugan, M. Sathish Kumar, V. K. Sivasubramanian, M. Ganesan, A. Mahesh, T. Thirunalasundari and S. Rajagopal, *Inorganica Chimica Acta*, 2015, **434**, 51-59.

## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: Βιβλιογραφία

74. J. Medley, G. Payne, H. N. Banerjee, D. Giri, A. Winstead, J. M. Wachira, J. A. Krause, R. Shaw, S. K. Pramanik and S. K. Mandal, *Mol Cell Biochem*, 2015, **398**, 21-30.
75. P. T. Wilder, D. J. Weber, A. Winstead, S. Parnell, T. V. Hinton, M. Stevenson, D. Giri, S. Azemati, P. Olczak, B. V. Powell, T. Odebode, S. Tadesse, Y. Zhang, S. K. Pramanik, J. M. Wachira, S. Ghimire, P. McCarthy, A. Barfield, H. N. Banerjee, C. Chen, J. A. Golen, A. L. Rheingold, J. A. Krause, D. M. Ho, P. Y. Zavalij, R. Shaw and S. K. Mandal, *Mol Cell Biochem*, 2018, **441**, 151-163.
76. S. Mukhopadhyay, R. S. Singh, R. P. Paitandi, G. Sharma, B. Koch and D. S. Pandey, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 8572-8585.
77. J. Li, L. Guo, Z. Tian, S. Zhang, Z. Xu, Y. Han, R. Li, Y. Li and Z. Liu, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 13552-13563.
78. K. W. Jenette, J. T. Gill, J. A. Sadownik, S. J. Lippard, *JACS*, 1976, **98**, 6159-6168.
79. M. Howe-Grant and S. J. Lippard, *Biochemistry*, 1979, **18**, 5762-5769.
80. S. J. Lippard, P. J. Bond, K. C. Wu and W. R. Bauer, *Science*, 1976, **194**, 726-728.
81. F. Binacchi, D. Cirri, E. Bimbi, N. Busto, A. Pratesi and T. Biver, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2025, **262**, 112749.
82. C. R. Brodie, J. G. Collins and J. R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans.*, 2004, 1145.
83. B. J. Pages, K. B. Garbutcheon-Singh and J. R. Aldrich-Wright, *Eur J Inorg Chem*, 2017, **2017**, 1613-1624.
84. L. Andrezálová and Z. Országhová, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2021, **225**, 111624.
85. F. P. Dwyer, E. C. Gyrfas, W. P. Rogers and J. H. Koch, *Nature*, 1952, **170**, 190-191.
86. J. P. Rehmann and J. K. Barton, *Biochemistry*, 1990, **29**, 1710-1717.
87. J. P. Rehmann and J. K. Barton, *Biochemistry*, 1990, **29**, 1701-1709.
88. J. G. Collins, A. D. Sleeman, J. R. Aldrich-Wright, I. Greguric and T. W. Hambley, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 3133-3141.
89. B. M. Zeglis, V. C. Pierre and J. K. Barton, *Chem. Commun.*, 2007, 4565.
90. J. P. Hall, K. O'Sullivan, A. Naseer, J. A. Smith, J. M. Kelly and C. J. Cardin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, **108**, 17610-17614.
91. C. M. Dupureur and J. K. Barton, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 33-43.
92. I. Greguric, J. R. Aldrich-Wright and J. G. Collins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 3621-3622.
93. L.-Y. Li, H.-N. Jia, H.-J. Yu, K.-J. Du, Q.-T. Lin, K.-Q. Qiu, H. Chao and L.-N. Ji, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, **113**, 31-39.
94. Y.-M. Chen, Y.-J. Liu, Q. Li and K.-Z. Wang, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2009, **103**, 1395-1404.
95. W.-X. Hong, F. Huang, T. Huan, X. Xu, Q. Han, G. Wang, H. Xu, S. Duan, Y. Duan, X. Long, Y. Liu and Z. Hu, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2018, **180**, 54-60.
96. L. Perdisatt, S. Moqadasi, L. O'Neill, G. Hessman, A. Ghion, M. Q. M. Warraich, A. Casey and C. O'Connor, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2018, **182**, 71-82.
97. M. Ganeshpandian, M. Palaniandavar, A. Muruganantham, S. K. Ghosh, A. Riyasdeen and M. A. Akbarsha, *Applied Organom Chemis*, 2018, **32**, e4154.
98. M. Ganeshpandian, R. Loganathan, E. Suresh, A. Riyasdeen, M. A. Akbarsha and M. Palaniandavar, *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 1203-1219.
99. T. A. Khan, K. Bhar, R. Thirumoorthi, T. K. Roy and A. K. Sharma, *New J. Chem.*, 2020, **44**, 239-257.
100. A. K. Kanyora, R. O. Omondi, P. Ongoma, J. O. Omolo, A. Welsh, S. Prince, J. Gichumbi, A. Mambanda and G. S. Smith, *J Biol Inorg Chem*, 2024, **29**, 251-264.
101. R. P. Paitandi, R. S. Singh, S. Mukhopadhyay, G. Sharma, B. Koch, P. Vishnoi and D. S. Pandey, *Inorganica Chimica Acta*, 2017, **454**, 117-127.
102. L. K. Batchelor and P. J. Dyson, *Trends in Chemistry*, 2019, **1**, 644-655.
103. Y. Qu, N. J. Scarsdale, M.-C. Tran and N. P. Farrell, *J Biol Inorg Chem*, 2003, **8**, 19-28.
104. Z. Lafi, W. Alshaer, M. M. Hatmal, M. A. Zihlif, N. Y. Asha, H. Abdelnabi and A. Awidi, *Jordan j. pharm. sci.*, 2023, **16**, 640-654.
105. M. Sato, T. Nakazawa, Y. Tsunematsu, K. Hotta and K. Watanabe, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013, **17**, 537-545.
106. S. A. Waksman, *Science*, 1953, **118**, 259-266.
107. B. B. Shaik, N. K. Katari and S. B. Jonnalagadda, *Chemistry & Biodiversity*, 2022, **19**, e202200535.
108. H. M. Sobell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, **82**, 5328-5331.

## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: Βιβλιογραφία

109. S.-Y. Wang, Y.-L. Lee, Y.-H. Lai, J. J. W. Chen, W.-L. Wu, J.-M. P. Yuann, W.-L. Su, S.-M. Chuang and M.-H. Hou, *PLoS ONE*, 2012, **7**, e47101.
110. X. Liu, H. Chen and D. J. Patel, *J Biomol NMR*, 1991, **1**, 323-347.
111. H. Robinson, Y.-C. Liaw, G. A. Van Der Marel, J. H. Van Boom and A. H.-J. Wang, *Nucl Acids Res*, 1990, **18**, 4851-4858.
112. M. S. Searle and W. Bicknell, *European Journal of Biochemistry*, 1992, **205**, 45-58.
113. W. Verborg, H. Thomas, D. Bissett, J. Waterfall, J. Steiner, M. Cooper and E. M. Rankin, *Br J Cancer*, 2007, **97**, 844-850.
114. A. J. Buric, J. Dickerhoff and D. Yang, *Molecules*, 2021, **26**, 4132.
115. J. Zehnulova, J. Kasparkova, N. Farrell and V. Brabec, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**, 22191-22199.
116. E. Alessio, E. Iengo, S. Zorzet, A. Bergamo, M. Coluccia, A. Boccarelli and G. Sava, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2000, **79**, 173-177.
117. A. Bergamo, G. Stocco, B. Gava, M. Cocchietto, E. Alessio, B. Serli, E. Iengo and G. Sava, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, **305**, 725-732.
118. Z. Ma, G. Palermo, Z. Adhireksan, B. S. Murray, T. von Erlach, P. J. Dyson, U. Rothlisberger and C. A. Davey, *Angew Chem Int Ed*, 2016, **55**, 7441-7444.
119. H. Chen, J. A. Parkinson, O. Novakova, J. Bella, F. Wang, A. Dawson, R. Gould, S. Parsons, V. Brabec and P. J. Sadler, *PNAS*, 2003, **100**, 14623-14628.
120. M. Kokoschka, J. Bangert, R. Stoll and W. S. Sheldrick, *Eur J Inorg Chem*, 2010, **2010**, 1507-1515.
121. Mhd. A. Nazif, R. Rubbiani, H. Alborzinia, I. Kitanovic, S. Wöfl, I. Ott and W. S. Sheldrick, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 5587.
122. L. M. Wilhelmsson, E. K. Esbjörner, F. Westerlund, B. Nordén and P. Lincoln, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 11784-11793.
123. F. M. O'Reilly and J. M. Kelly, *New J. Chem.*, 1998, **22**, 215-217.
124. F. M. O'Reilly and J. M. Kelly, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 7206-7213.
125. Kwon, Byung-Hyang, Choi, Byung-Hoon, Lee, Hyun Mee, Jang, Yoon Jung, and Lee, Jae-Cheol, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2010, **31**, 1615-1620.
126. C. Metcalfe, I. Haq and J. A. Thomas, *Inorg. Chem.*, 2004, **43**, 317-323.
127. M. Bahira, M. J. McCauley, A. A. Almaqwashi, P. Lincoln, F. Westerlund, I. Rouzina and M. C. Williams, *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**, 8856-8867.
128. P. Liu, J. Liu, Y.-Q. Zhang, B.-Y. Wu and K.-Z. Wang, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015, **143**, 89-99.
129. C. Georgakopoulou, D. Thomos, T. Tsolis, K. Ypsilantis, J. C. Plakatouras, D. Kordias, A. Magklara, C. Kouderis, A. G. Kalampounias and A. Garoufis, *Dalton Trans.*, 2022, **51**, 13808-13825.
130. D. R. Coulson, L. C. Satek and S. O. Grim, in *Inorganic Syntheses*, ed. F. A. Cotton, Wiley, 1st edn., 1972, vol. 13, pp. 121-124.
131. APEX 3; S. SAINT, Bruker AXS Inc., 5465 East Cheryl Parkway, Madison
132. G. M. Sheldrick, SADABS, 1996 University of Göttingen, Germany.
133. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.*, 2015, **71**, 3.
134. C. B. Hübschle, G. M. Sheldrick and B. Dittrich, *J. Appl. Crystallogr.*, 2011, **44**, 1281.
135. A. L. Spek, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2009, **65**, 148.
136. L. J. Barbour, *J. Supramol. Chem.*, 2001, **1**, 189.
137. S. U. Rehman, T. Sarwar, M. A. Husain, H. M. Ishqi and M. Tabish, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, **576**, 49-60.
138. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, New York, NY, Third edition, corrected at 4. printing., 2010.
139. M. Spring-Connell, M. Evich and M. W. Germann, *CP Nucleic Acid Chemistry*, 2018, **72**.
140. M. A. Bennett, T. -N. Huang, T. W. Matheson, A. K. Smith, S. Ittel and W. Nickerson, in *Inorganic Syntheses*, 1982, **21**, 74-78.
141. J. Canivet, L. Karmazin-Brelot and G. Süss-Fink, *Journal of Organometallic Chemistry*, 2005, **690**, 3202-3211.
142. T. C. Lovell, C. E. Colwell, L. N. Zakharov and R. Jasti, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 3786-3790.
143. G. Tang, Y. Liu, Y. Li, K. Peng, P. Zuo, Z. Yang and T. Xu, *JACS Au*, 2022, **2**, 1214-1222.

## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: Βιβλιογραφία

144. A. F. Littke and G. C. Fu, *Angew. Chemie Int. Ed.*, 2002, **41**, 4176-4211.
145. T. Ishiyama, M. Murata and N. Miyaoura, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 7508-7510.
146. K. Rao and K. Venkateswarlu, *Synlett*, 2018, **29**, 1055-1060.
147. A. J. J. Lennox and G. C. Lloyd-Jones, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 412-443.
148. M. A. Bennett, T. -N. Huang, T. W. Matheson, A. K. Smith, S. Ittel and W. Nickerson, in *Inorganic Syntheses*, ed. J. P. Fackler, Wiley, 1st edn., 1982, vol. 21, pp. 74-78.
149. J. Canivet, L. Karmazin-Brelot and G. Süß-Fink, *Journal of Organometallic Chemistry*, 2005, **690**, 3202-3211.
150. J. G. Malecki, M. Jaworska, R. Kruszynski and J. Klak, *Polyhedron*, 2005, **24**, 3012.
151. J. Kim, K. Shin, S. Jin, D. Kim and S. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**, 4137.
152. B. Li, C. Darcel, T. Roisnel and P. H. Dixneuf, *J. Organomet. Chem.*, 2015, **793**, 200.
153. N. U. D. Reshi, D. Senthurpandi and A. G. Samuelson, *J. Organomet. Chem.*, 2018, **866**, 189.
154. V. A. Bloomfield, *Biopolymers*, 1997, **44**, 269-282.
155. R. V. Gessner, G. J. Quigley, A. H.-J. Wang, G. A. van der Marel, J. H. Van Boom and A. Rich, *Biochemistry*, 1985, **24**, 237-240.
156. S. N. Rao and P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, **84**, 5735-5739.
157. A. Myari, N. Hadjiliadis, A. Garoufis, J. Malina and V. Brabec, *J Biol Inorg Chem*, 2007, **12**, 293-293.
158. O. Kulyk, A. Krivoshey, O. Kolosova, I. Prylutska, T. Vasiliu, R. Puf, F. Mocci, A. Laaksonen, S. Perepelytsya, D. Kobzev, R. Svoiakov, Z. Tkachuk and A. Tatarets, *J. Mater. Chem. B*, 2024, **12**, 11968-11982.
159. T. M. Lohman and N. T. Fazio, *BioEssays*, 2018, **40**, 1800009.
160. F. Gago, *Methods A Companion to Methods Enzym.*, 1998, **14**, 277.
161. J. T. Waters, X.-J. Lu, R. Galindo-Murillo, J. C. Gumbart, H. D. Kim, T. E. Cheatham and S. C. Harvey, *J. Phys. Chem. B*, 2016, **120**, 8449-8456.
162. B. T. Patterson, J. Grant Collins, F. M. Foley and F. Richard Keene, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 4343.
163. J. G. Collins, A. D. Sleeman, J. R. Aldrich-Wright, I. Greguric and T. W. Hambley, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 3133-3141.
164. L. M. Wilhelmsson, E. K. Esbjörner, F. Westerlund, B. Nordén and P. Lincoln, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 11784-11793.
165. H. Ahmad, A. Wragg, W. Cullen, C. Wombwell, A. J. H. M. Meijer and J. A. Thomas, *Chemistry A European J*, 2014, **20**, 3089-3096.
166. H. S. Derrat, C. C. Robertson, A. J. H. M. Meijer and J. A. Thomas, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 12300-12307.
167. H. K. Saeed, I. Q. Saeed, N. J. Buurma and J. A. Thomas, *Chemistry A European J*, 2017, **23**, 5467-5477.
168. J. L. Morgan, C. B. Spillane, J. A. Smith, D. P. Buck, J. G. Collins and F. R. Keene, *Dalton Trans.*, 2007, 4333.
169. R. Galindo-Murillo and T. E. Cheatham, *Nucleic Acids Research*, 2021, **49**, 3735-3747.
170. M. M. V. Ramana, R. Betkar, A. Nimkar, P. Ranade, B. Mundhe and S. Pardeshi, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015, **151**, 194-200.
171. J. R. Choudhury, *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**, 5622-5632.
172. M. Cory, D. D. McKee, J. Kagan, Henry D. W. and J. A. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 2528-2536.
173. V. Brabec and J. Kasparkova, *Coordination Chemistry Reviews*, 2018, **376**, 75-94.
174. B. Demoro, R. F. M. De Almeida, F. Marques, C. P. Matos, L. Otero, J. Costa Pessoa, I. Santos, A. Rodríguez, V. Moreno, J. Lorenzo, D. Gambino and A. I. Tomaz, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 7131.
175. F. Giannini, M. Bartoloni, L. E. H. Paul, G. Süß-Fink, J.-L. Reymond and J. Furrer, *Med. Chem. Commun.*, 2015, **6**, 347-350.
176. S. Swaminathan, J. Haribabu, M. Dharmasivam, N. Maroli, J. P. Jayadharini, N. Balakrishnan, N. Bhuvanesh, C. Echeverria and R. Karvembu, *Inorg. Chem.*, 2023, **62**, 3679-3691.
177. D. Stíbal, L. Geiser, G. Süß-Fink and J. Furrer, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 38332-38341.
178. G. E. Davey, Z. Adhireksan, Z. Ma, T. Riedel, D. Sharma, S. Padavattan, D. Rhodes, A. Ludwig, S. Sandin, B. S. Murray, P. J. Dyson and C. A. Davey, *Nat Commun*, 2017, **8**, 1575.

## Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>: Βιβλιογραφία

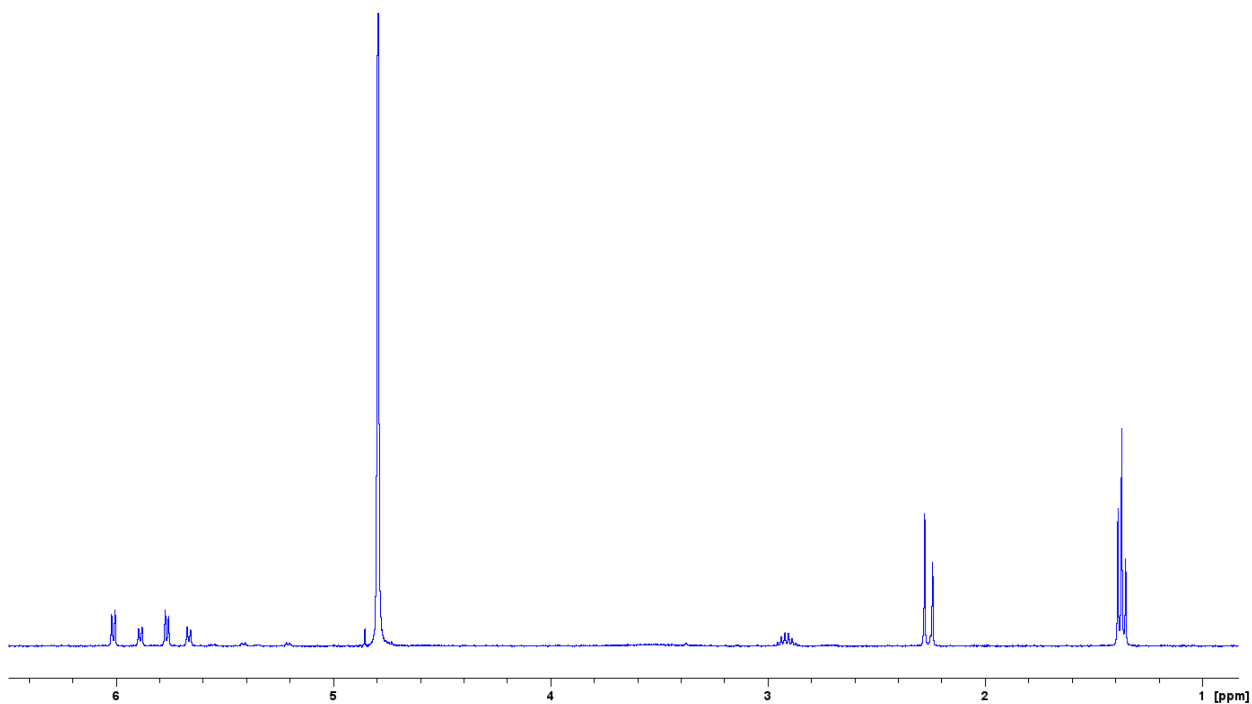
179. L. K. Batchelor, E. Păunescu, M. Soudani, R. Scopelliti and P. J. Dyson, *Inorg. Chem.*, 2017, **56**, 9617-9633.
180. T. Stringer, B. Therrien, D. T. Hendricks, H. Guzgay and G. S. Smith, *Inorganic Chemistry Communications*, 2011, **14**, 956-960.
181. W. Su, Y. Li, J. Xiao, Y. Zhang and P. Li, *Applied Organom Chemis*, 2018, **32**, e4420.



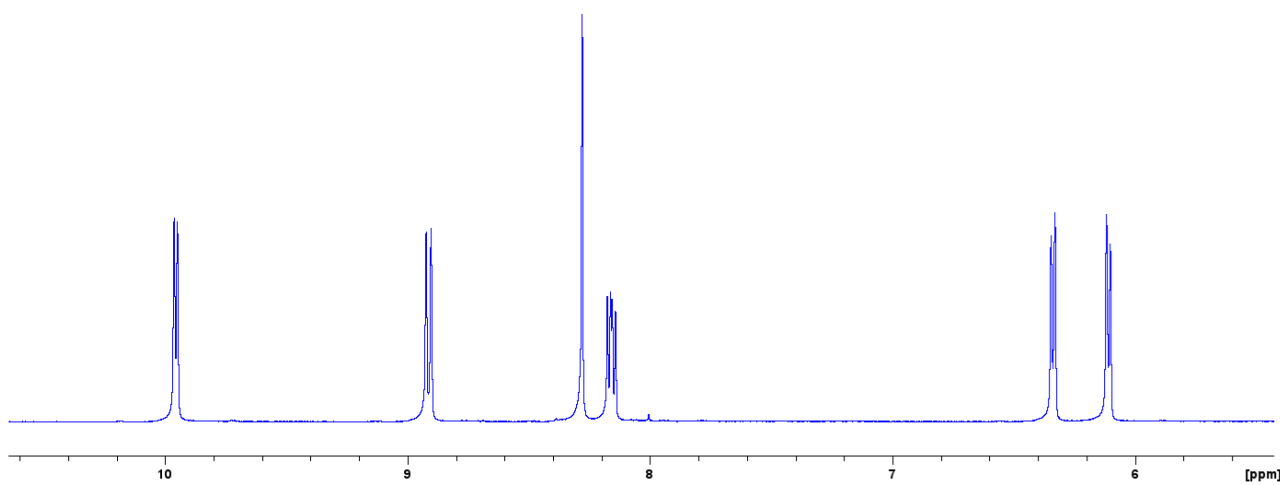
# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Παράρτημα

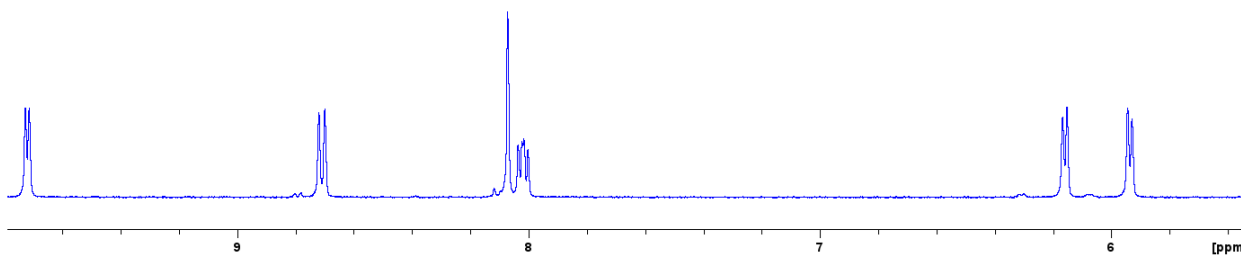


**Εικόνα Π1:** Περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του (Π1) σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

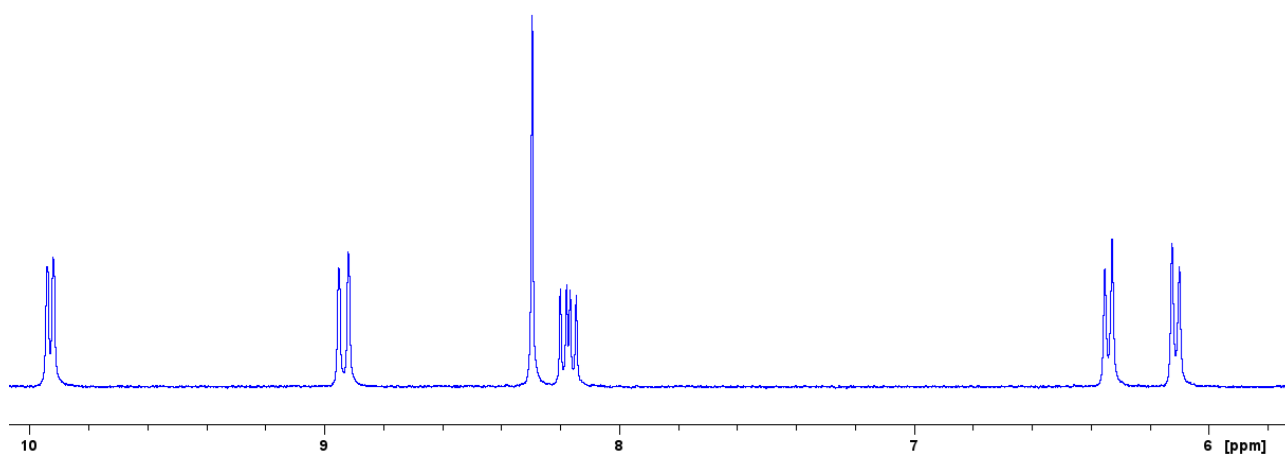


**Εικόνα Π2:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του (Π2) σε διαλύτη  $\text{acetone-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

Παράρτημα



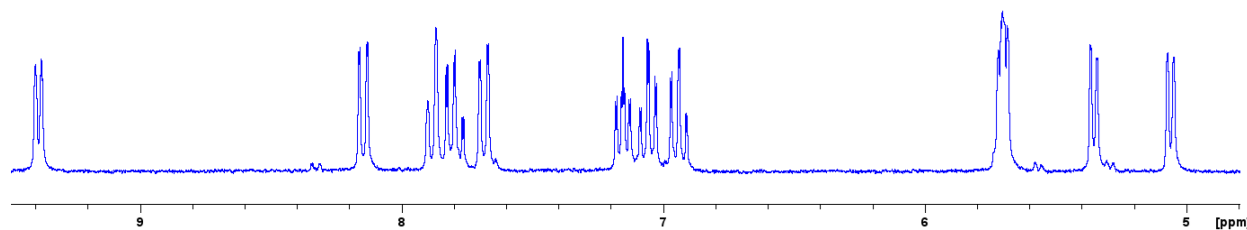
**Εικόνα Π3:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του (Π2) σε διαλύτη  $\text{D}_2\text{O}$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.



**Εικόνα Π4:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του (Π2) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

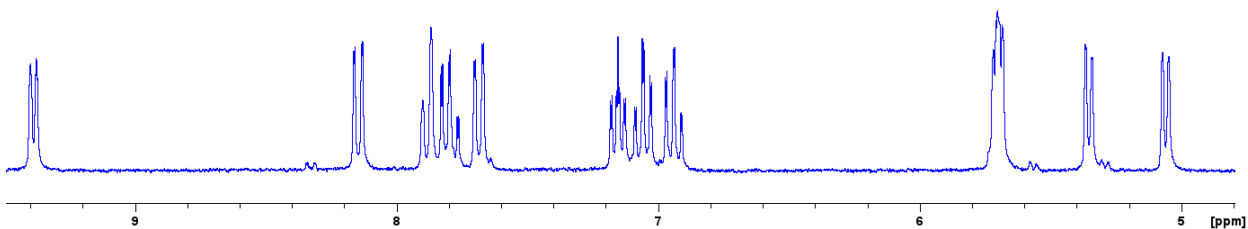
**Πίνακας Π1:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (Π2) σε διαλύτες acetone- $\text{d}_6$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  και  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

	Acetone- $\text{d}_6$	$\text{D}_2\text{O}$	$\text{DMSO-d}_6$
<b>H2H9</b>	9.96, d, 2H	9.72, d, 2H	9.93, d, 2H
<b>H3H8</b>	8.16, t, 2H	8.02, t, 2H	8.30, t, 2H
<b>H4H7</b>	8.91, d, 2H	8.71, d, 2H	8.93, d, 2H
<b>H5H6</b>	8.28, s, 2H	8.07, s, 2H	8.17, s, 2H
<b>H2cH6c</b>	6.36, d, 2H	6.16, d, 2H	6.34, d, 2H
<b>H3cH5c</b>	6.11, d, 2H	5.94, d, 2H	6.11, d, 2H
<b>H7c</b>	2.28, s, 3H	2.14, s, 3H	2.17, s, 3H
<b>H8c</b>	2.80, m, 1H	2.52, m, 1H	2.62, m, 1H
<b>H9cH10c</b>	1.05, d, 6H	0.85, d, 6H	0.91, d, 6H



**Εικόνα Π5:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του (Π3) σε διαλύτη acetone- $\text{d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

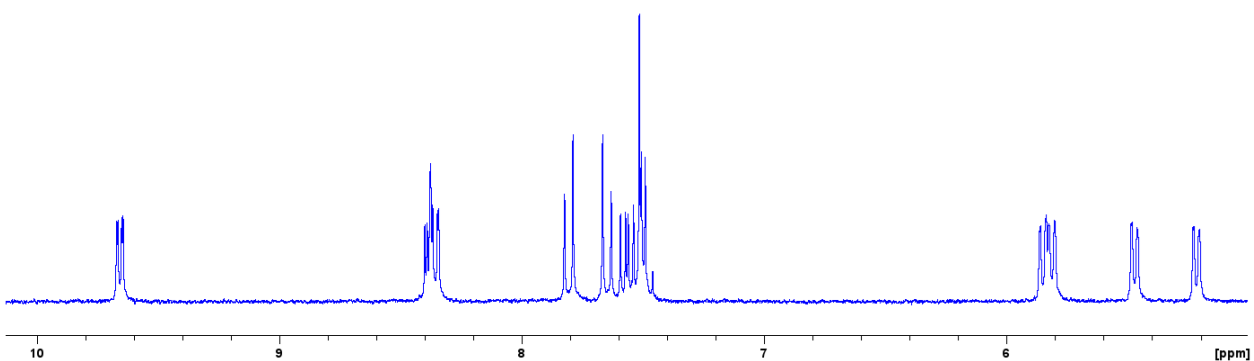
## Παράρτημα



**Εικόνα Π6:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του (Π3) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

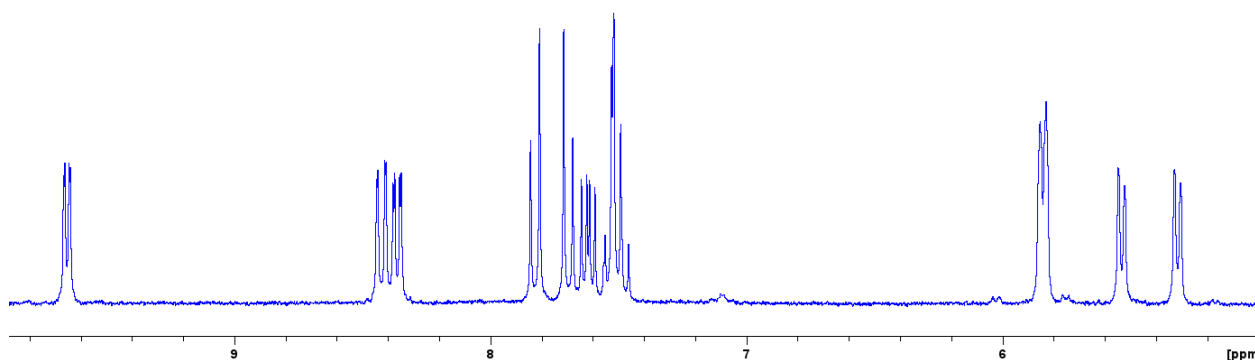
**Πίνακας Π2:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (Π3) σε διαλύτες  $\text{acetone-d}_6$ , και  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

	Acetone- $\text{d}_6$	DMSO- $\text{d}_6$
H6	9.39, d, 1H	9.35, d, 1H
H5	7.16, t, 1H	7.20, t, 1H
H4	7.80, t, 1H	7.82, t, 1H
H3	7.89, d, 1H	7.94, d, 1H
H2'	7.69, d, 1H	7.72, d, 1H
H3'	6.94, t, 1H	6.95, t, 1H
H4'	7.06, t, 1H	7.06, t, 1H
H5'	8.15, d, 1H	8.13, d, 1H
H2c	5.69, d, 1H	5.68, d, 1H
H3c	5.36, d, 1H	5.41, d, 1H
H5c	5.72, d, 1H	5.75, d, 1H
H6c	5.06, d, 1H	5.15, d, 1H
H7c	2.00, s, 3H	1.92, s, 3H
H8c	2.41, m, 1H	2.28, m, 1H
H9c	0.96, d, 3H	0.85, d, 3H
H10c	0.85, d, 3H	0.77, d, 3H



**Εικόνα Π7:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του (Π4) σε διαλύτη  $\text{acetone-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

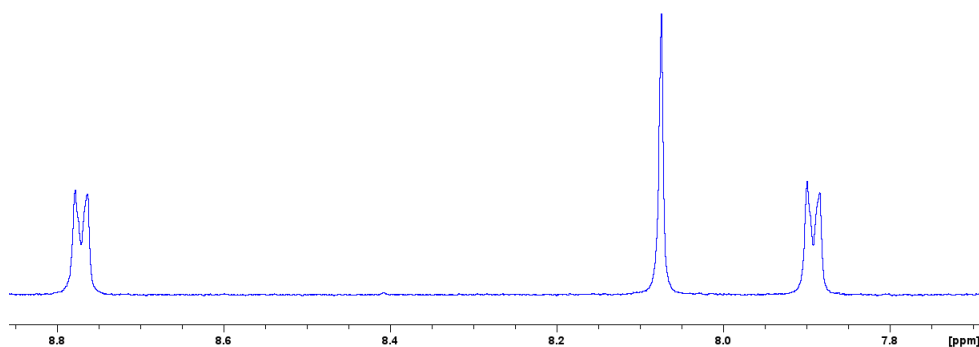
Παράρτημα



**Εικόνα Π8:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του (Π4) σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας Π3:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του συμπλόκου (Π4) σε διαλύτες acetone- $\text{d}_6$ , και  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

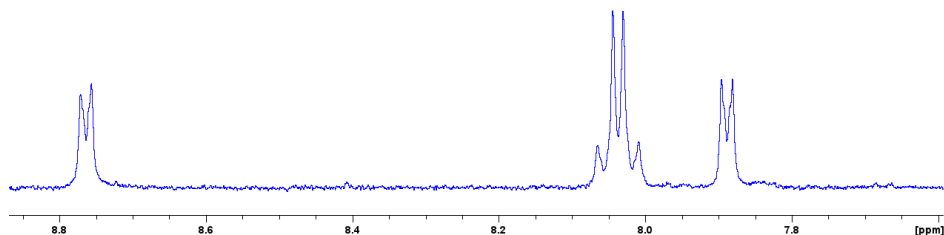
	Acetone- $\text{d}_6$	$\text{DMSO-d}_6$
<b>H2</b>	9.66, d, 1H	9.65, d, 1H
<b>H3</b>	7.57, t, 1H	7.52, t, 1H
<b>H4</b>	8.36, d, 1H	8.36, d, 1H
<b>H5</b>	7.65, d, 1H	7.70, d, 1H
<b>H6</b>	7.50, d, 1H	7.50, d, 1H
<b>H7</b>	7.81, d, 1H	7.83, d, 1H
<b>H8</b>	7.51, t, 1H	7.62, t, 1H
<b>H9</b>	8.39, d, 1H	8.43, d, 1H
<b>H2c</b>	5.81, d, 1H	5.54, d, 1H
<b>H3c</b>	5.47, d, 1H	5.34, d, 1H
<b>H5c</b>	5.85, d, 1H	5.84, d, 1H
<b>H6c</b>	5.22, d, 1H	5.32, d, 1H
<b>H7c</b>	2.00, s, 3H	1.92, s, 3H
<b>H8c</b>	2.45, m, 1H	2.32, m, 1H
<b>H9c</b>	0.92, d, 3H	0.81, d, 3H
<b>H10c</b>	0.78, d, 3H	0.70, d, 3H



**Εικόνα Π9:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του  $\text{d}^{\text{r}}\text{b}^{\text{z}}$  σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας Π4:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του  $\text{d}^{\text{r}}\text{b}^{\text{z}}$  σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

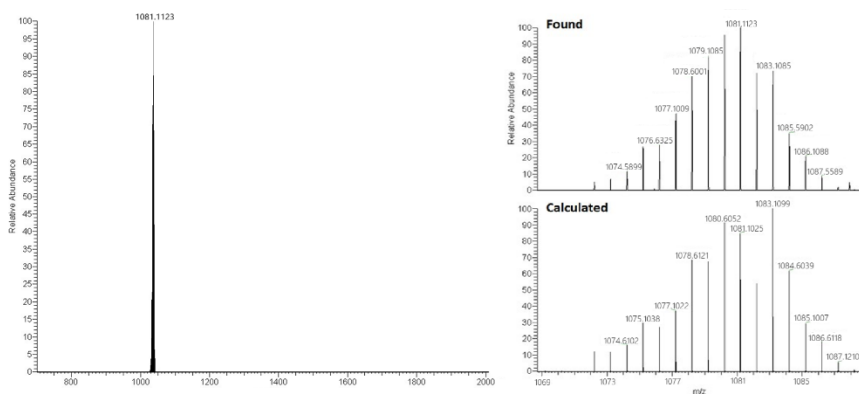
	$\text{DMSO-d}_6$
<b>Ha</b>	8.77, d, 4H
<b>Hb</b>	7.89, d, 4H
<b>Hc</b>	8.07, s, 4H



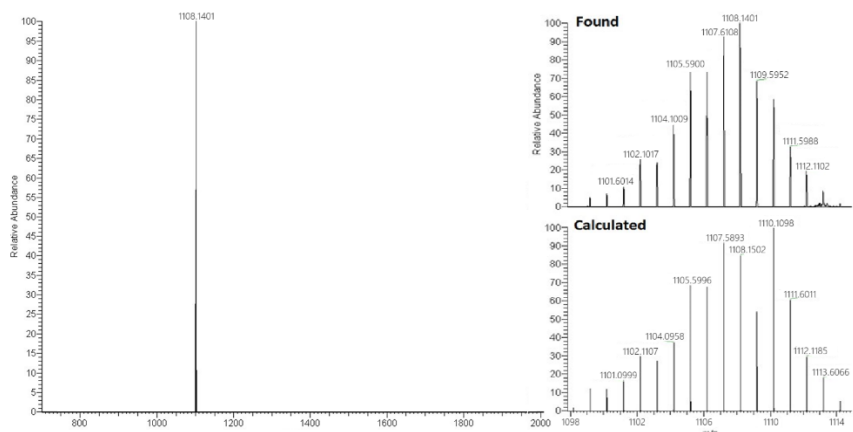
**Εικόνα Π10:** Αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR του αβρβρη σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και σε θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

**Πίνακας Π5:** Χημικές μετατοπίσεις, σε ppm, των πρωτονίων του αβρβρη σε διαλύτη  $\text{DMSO-d}_6$  και θερμοκρασία 298 K @ 500 MHz.

	$\text{DMSO-d}_6$
<b>Ha</b>	8.76, d, 4H
<b>Hb</b>	7.89, d, 4H
<b>Hc</b>	8.04, dd, 8H
<b>Hd</b>	8.04, dd, 8H

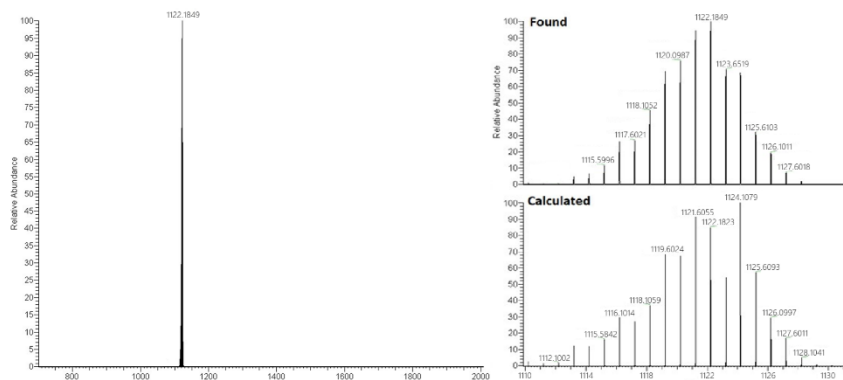


**Εικόνα Π11:** Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (1) σε διαλύτη  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

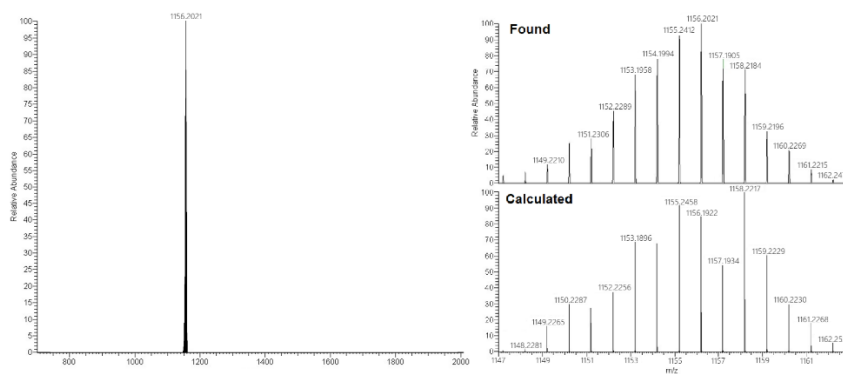


**Εικόνα Π12:** Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (2) σε διαλύτη  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

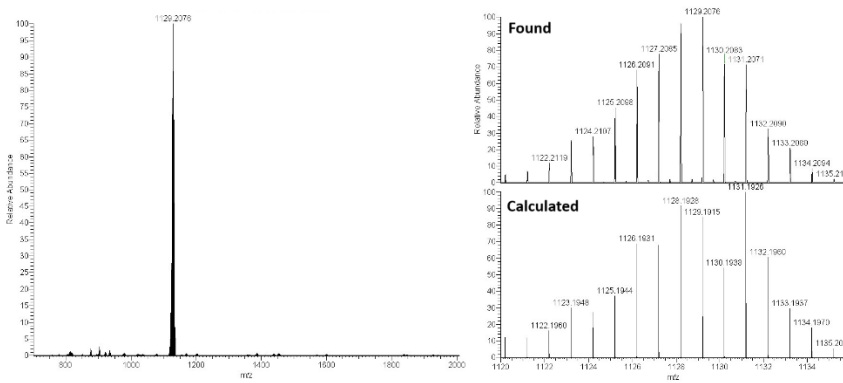
Παράρτημα



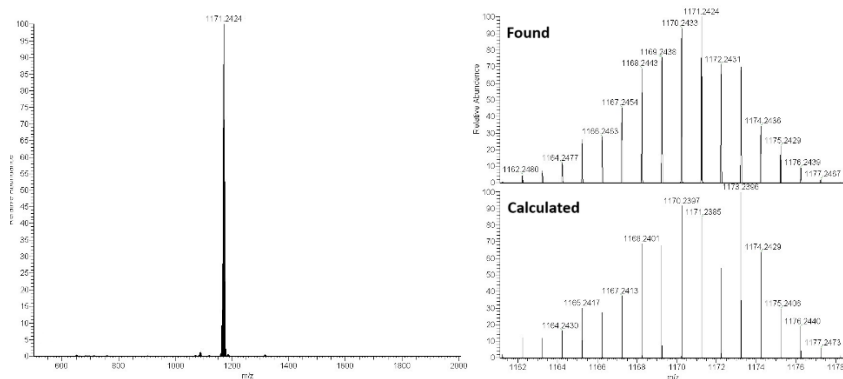
Εικόνα Π13: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (3) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.



Εικόνα Π14: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (4) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

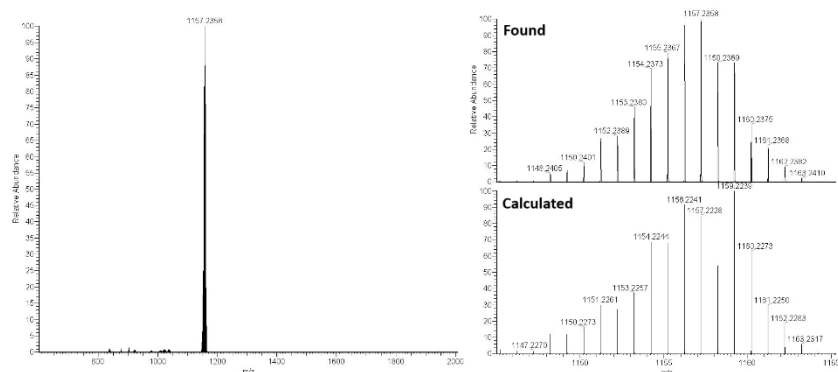


Εικόνα Π15: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (5) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

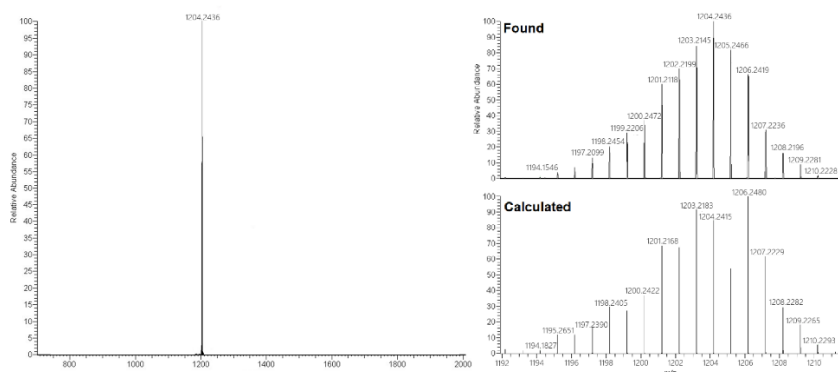


Εικόνα Π16: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (6) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

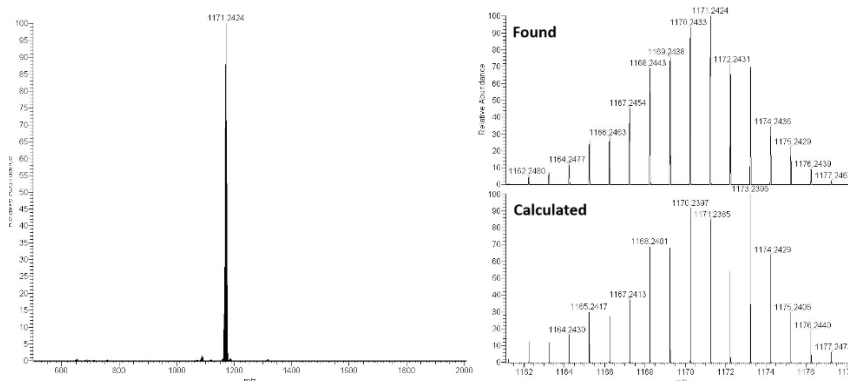
Παράρτημα



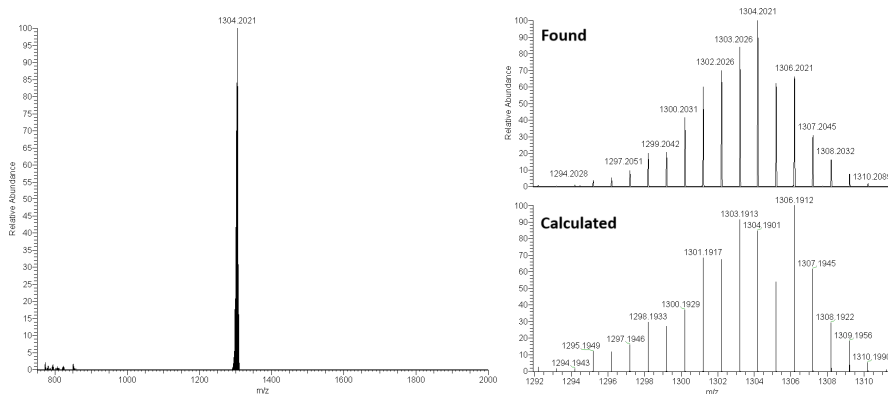
Εικόνα Π17: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (7) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.



Εικόνα Π18: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (8) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

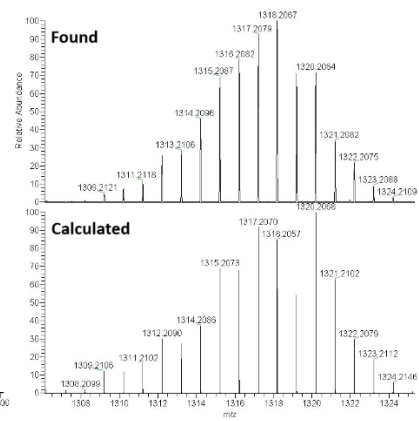
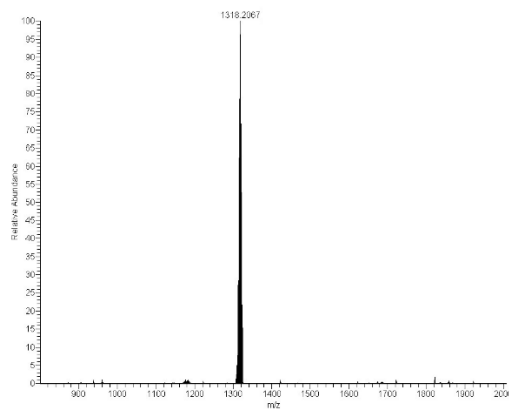


Εικόνα Π19: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (9) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

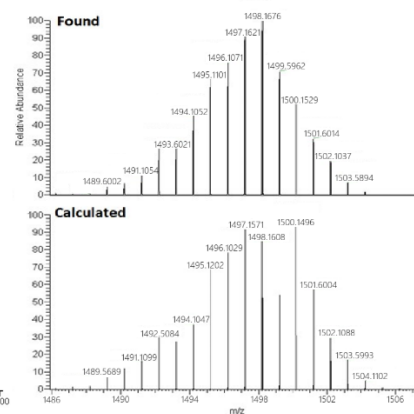
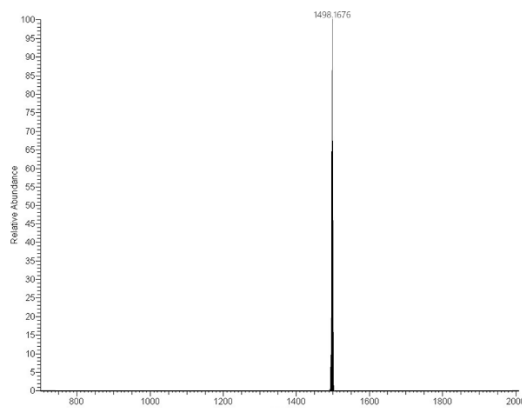


Εικόνα Π20: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (10) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

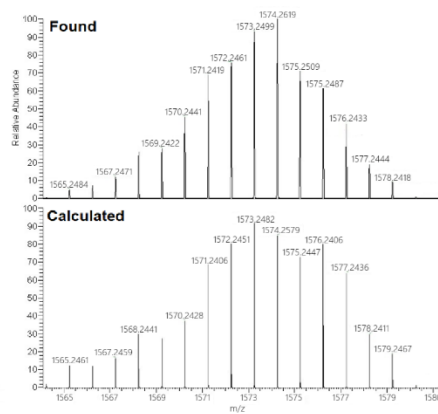
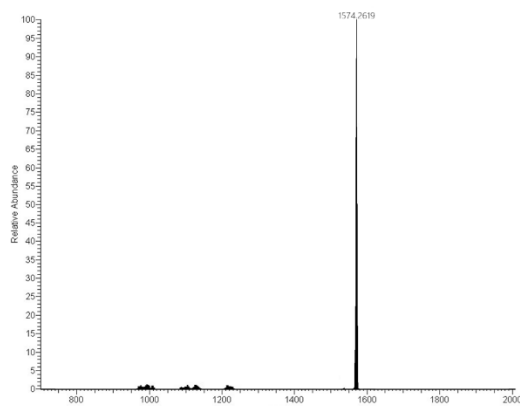
## Παράρτημα



Εικόνα Π21: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (11) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

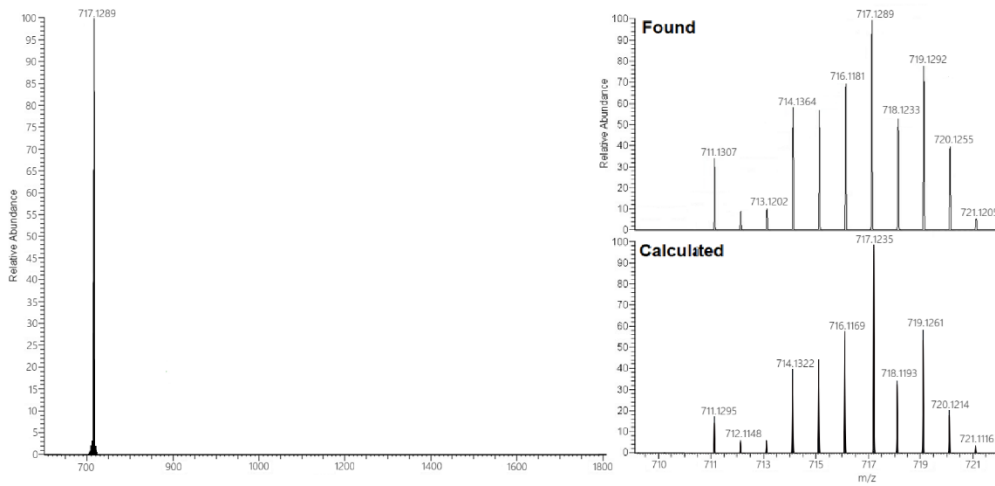


Εικόνα Π22: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (12) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

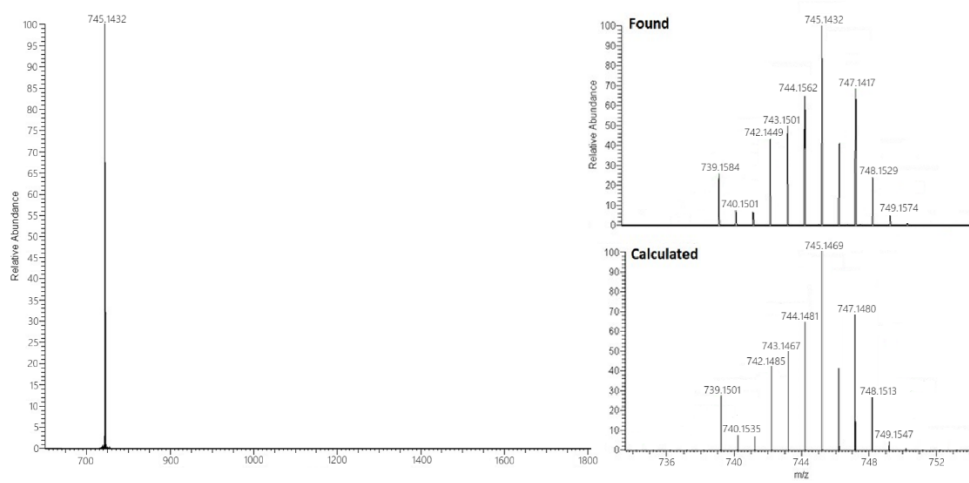


Εικόνα Π23: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (13) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

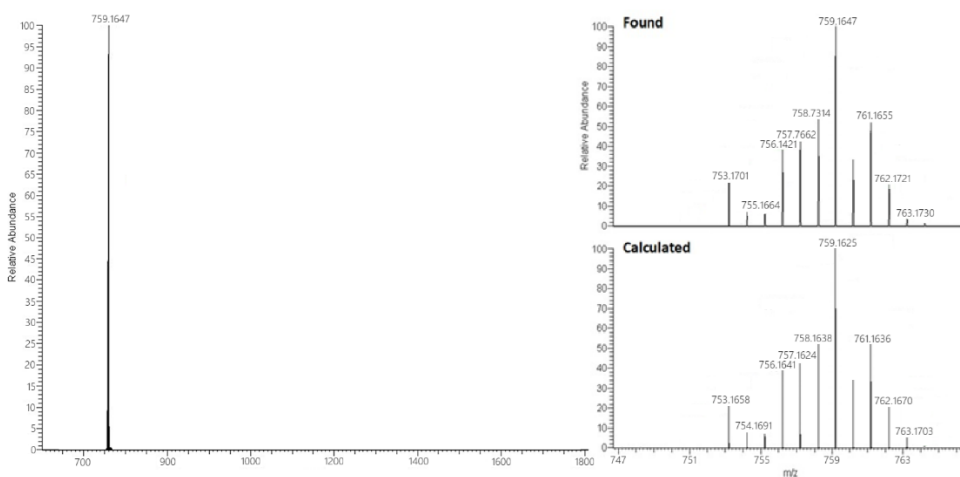
## Παράρτημα



Εικόνα Π24: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (14) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

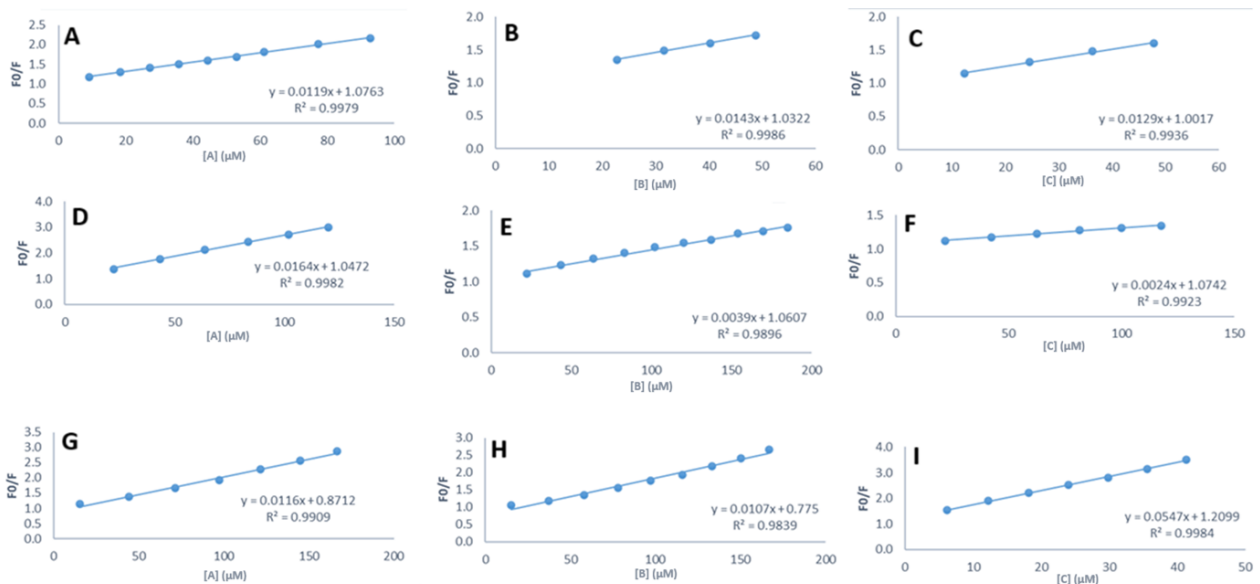


Εικόνα Π25: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (15) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

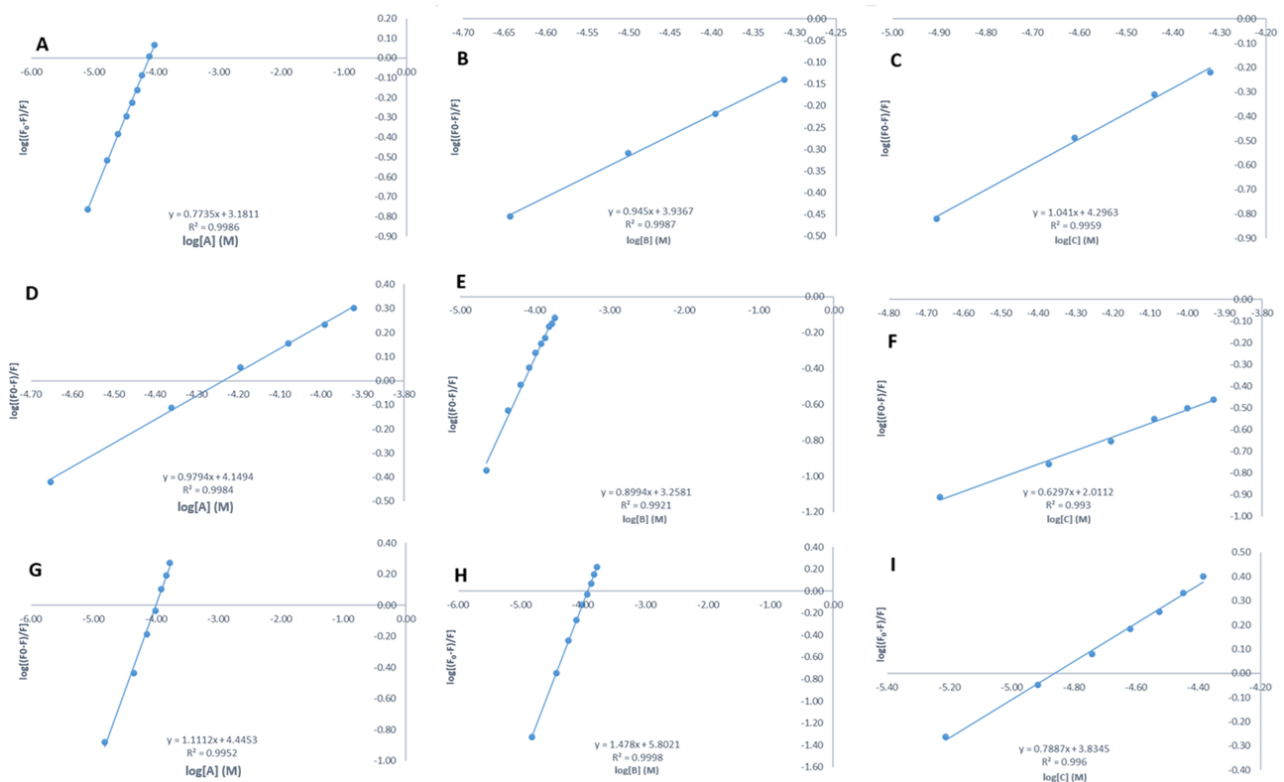


Εικόνα Π26: Φάσμα HR-ESI-MS του συμπλόκου (16) σε διαλύτη CH<sub>3</sub>CN.

## Παράρτημα

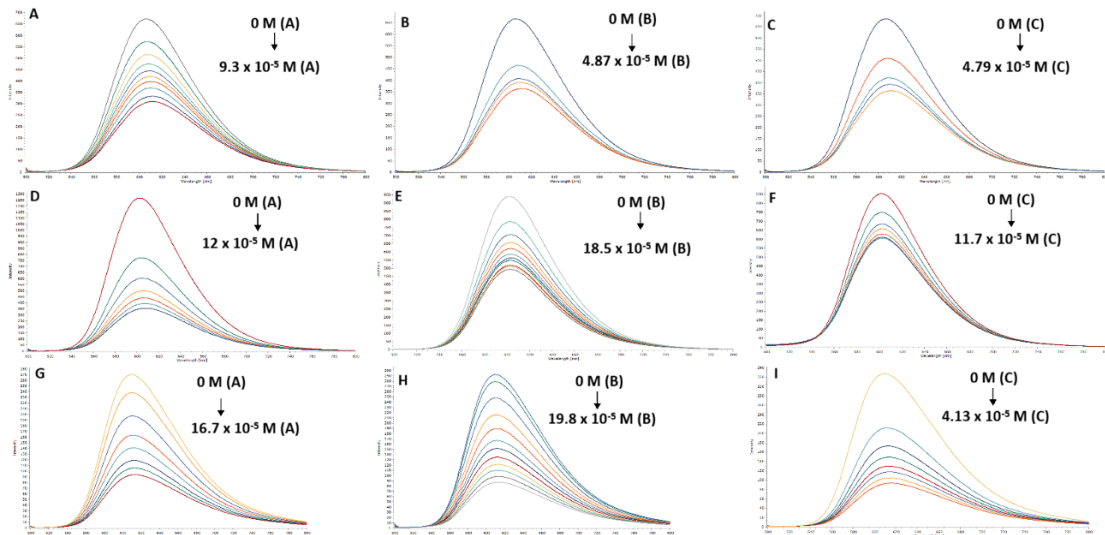


**Εικόνα Π27:** Διαγράμματα Stern-Volmer για την αλληλεπίδραση των (A) - (C) με το DNA-EB: A) (A) -  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ , B) (B) -  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ , C) (C) -  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ , D) (A) -  $d(5'-\text{CTTTTGCAAAG}-3')_2$ , E) (B) -  $d(5'-\text{CTTTTGCAAAG}-3')_2$ , F) (C) -  $d(5'-\text{CTTTTGCAAAG}-3')_2$ , G) (A) - CT-DNA, H) (B) - CT-DNA, I) (C) - CT-DNA.

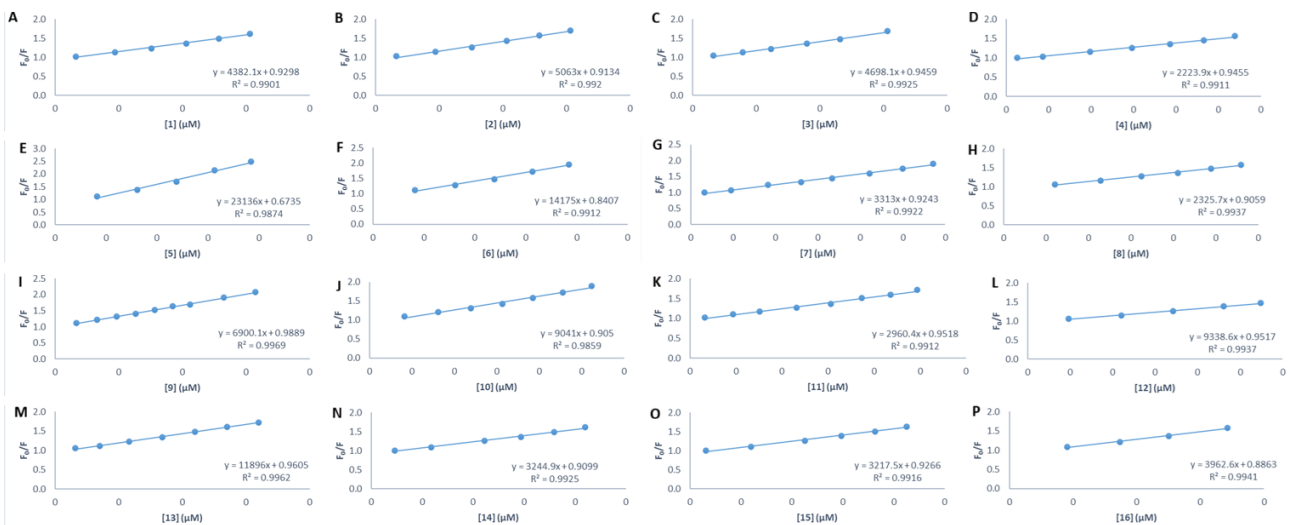


**Εικόνα Π28:** Διπλά λογαριθμικά διαγράμματα για την αλληλεπίδραση των (A) - (C) με το DNA-EB: A) (A) -  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ , B) (B) -  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ , C) (C) -  $d(5'-\text{CGCGCG}-3')_2$ , D) (A) -  $d(5'-\text{CTTTTGCAAAG}-3')_2$ , E) (B) -  $d(5'-\text{CTTTTGCAAAG}-3')_2$ , F) (C) -  $d(5'-\text{CTTTTGCAAAG}-3')_2$ , G) (A) - CT-DNA, H) (B) - CT-DNA, I) (C) - CT-DNA.

Παράρτημα

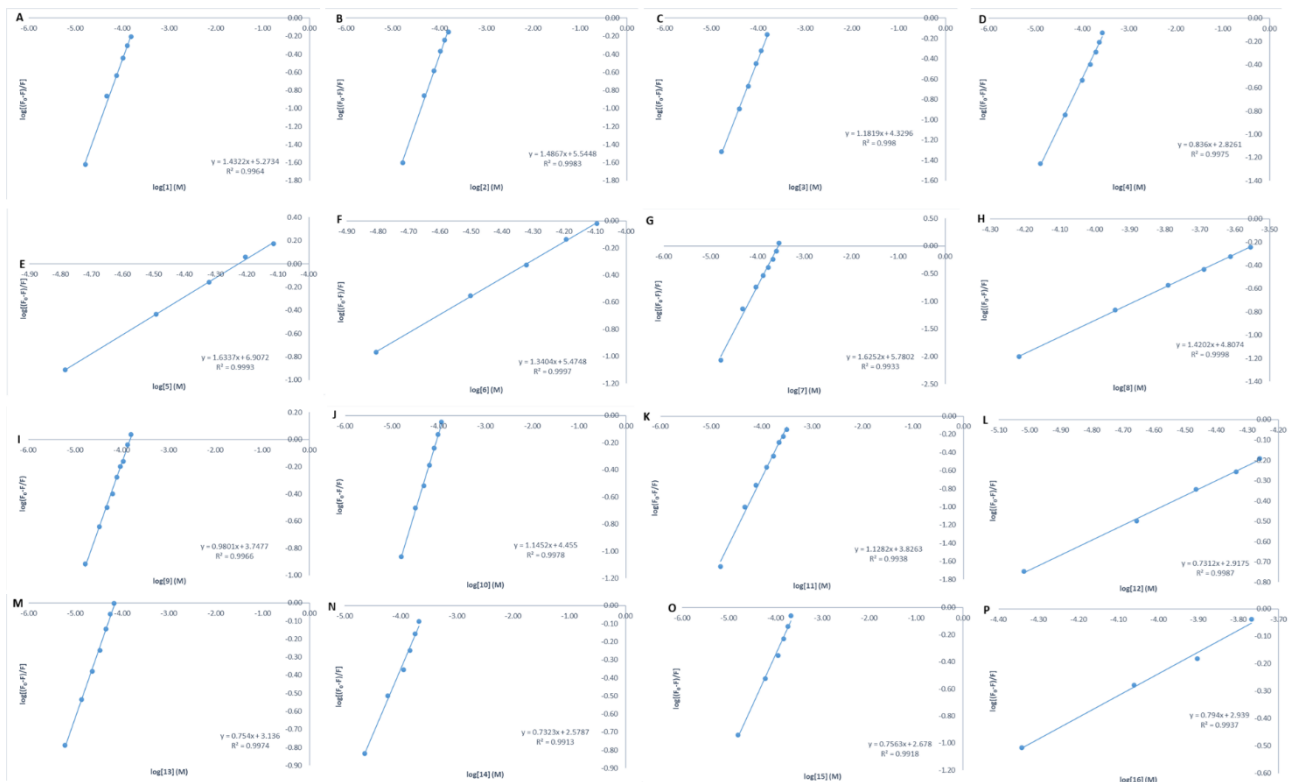


**Εικόνα Π29:** Φάσματα εκπομπής φθορισμού για την αλληλεπίδραση των (A) - (C) με το DNA-EB: A) (A) - d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, B) (B) - d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, C) (C) - d(5'-CGCGCG-3')<sub>2</sub>, D) (A) - d(5'-CTTTTGCAAAG-3')<sub>2</sub>, E) (B) - d(5'-CTTTTGCAAAG-3')<sub>2</sub>, F) (C) - d(5'-CTTTTGCAAAG-3')<sub>2</sub>, G) (A) - CT-DNA, H) (B) - CT-DNA, I) (C) - CT-DNA.

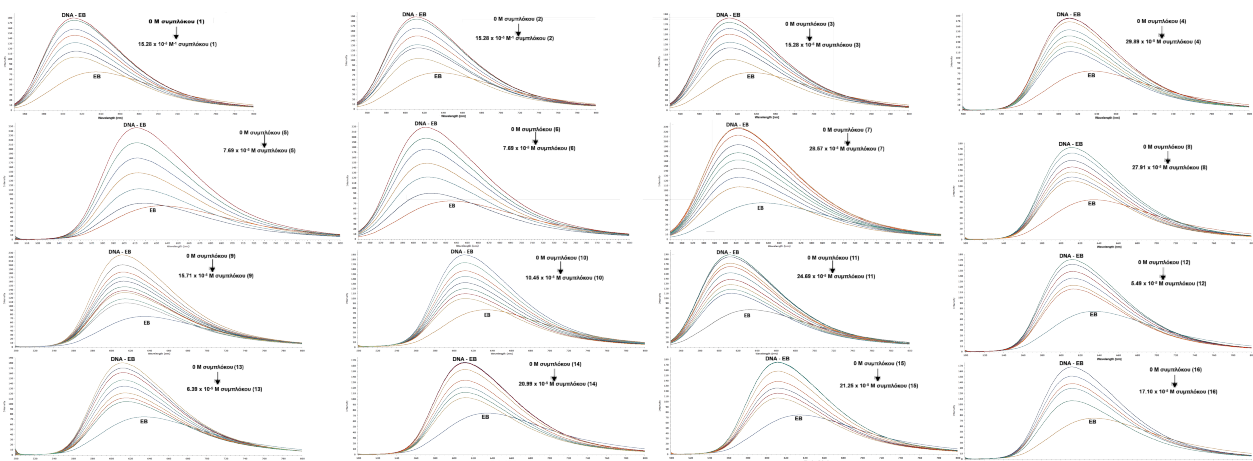


**Εικόνα Π30:** Διαγράμματα Stern-Volmer για την αλληλεπίδραση των (1) - (16) με το d(5'-CGCGAATTCGCG-3')<sub>2</sub>-EB: A) Σύμπλοκο (1), B) Σύμπλοκο (2), C) Σύμπλοκο (3), D) Σύμπλοκο (4), E) Σύμπλοκο (5), F) Σύμπλοκο (6), G) Σύμπλοκο (7), H) Σύμπλοκο (8), I) Σύμπλοκο (9), J) Σύμπλοκο (10), K) Σύμπλοκο (11), L) Σύμπλοκο (12), M) Σύμπλοκο (13), N) Σύμπλοκο (14), O) Σύμπλοκο (15), P) Σύμπλοκο (16).

## Παράρτημα



**Εικόνα Π31:** Διπλά λογαριθμικά διαγράμματα για την αλληλεπίδραση των (1) - (16) με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ -EB: A) Σύμπλοκο (1), B) Σύμπλοκο (2), C) Σύμπλοκο (3), D) Σύμπλοκο (4), E) Σύμπλοκο (5), F) Σύμπλοκο (6), G) Σύμπλοκο (7), H) Σύμπλοκο (8), I) Σύμπλοκο (9), J) Σύμπλοκο (10), K) Σύμπλοκο (11), L) Σύμπλοκο (12), M) Σύμπλοκο (13), N) Σύμπλοκο (14), O) Σύμπλοκο (15), P) Σύμπλοκο (16).



**Εικόνα Π32:** Φάσματα εκπομπής φθορισμού για την αλληλεπίδραση των (1) - (16) με το  $d(5'-CGCGAATTCGCG-3')_2$ -EB: A) Σύμπλοκο (1), B) Σύμπλοκο (2), C) Σύμπλοκο (3), D) Σύμπλοκο (4), E) Σύμπλοκο (5), F) Σύμπλοκο (6), G) Σύμπλοκο (7), H) Σύμπλοκο (8), I) Σύμπλοκο (9), J) Σύμπλοκο (10), K) Σύμπλοκο (11), L) Σύμπλοκο (12), M) Σύμπλοκο (13), N) Σύμπλοκο (14), O) Σύμπλοκο (15), P) Σύμπλοκο (16).

**Κατάλογος επιστημονικών δημοσιεύσεων:**

1. D. Thomos, T. Tsolis and A. Garoufis, "Cytotoxic binuclear  $\eta^6$ -arene-Ru(II) complexes: DNA sequence specific helix unwinding and binding", properties *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2025, **273**, 113027. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2025.113027>
2. D. Thomos, T. Tsolis, J. C. Plakatouras, I. Chronakis, A. Magklara and A. Garoufis, "DNA Noncovalent Interactions of Dinuclear  $\eta^6$ -Arene Ru(II) Complexes: Influence of Complex Charge and Bridging Ligand on DNA Binding Mode and Cytotoxic Activity", *Chemistry A European J*, 2025, **31**, e02680. <https://doi.org/10.1002/chem.202502680>

**Κατάλογος ανακοινώσεων σε επιστημονικά συνέδρια:**

1. 16<sup>th</sup> International Symposia on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC). Ioannina, June 11 - 14, 2023. DNA binding selectivity of binuclear Ru(II)-arene cytotoxic complexes. D. Thomos, T. Tsolis, A. Garoufis.
2. 2<sup>nd</sup> Panhellenic Workshop on Inorganic Chemistry (GRIC2023). Athens, September 28 - 30, 2023. DNA binding interactions of binuclear Ru(II)-arene cytotoxic complexes. D. Thomos, E. Sifnaiou, N. Papanizou, P. Galata, T. Tsolis, K. Ypsilantis, A. Garoufis.
3. 3<sup>rd</sup> Panhellenic Symposium on Inorganic Chemistry (3PSIC). Ioannina, November 7 - 9, 2025. Non-Covalent DNA Interactions of Dinuclear  $\eta^6$ -Arene Ru(II) Complexes: Effects of Complex Charge and Binding Ligand Length on Binding Modes and Cytotoxicity. D. Thomos, T. Tsolis, J. C. Plakatouras, I.-M. Chronakis, A. Magklara, A. Garoufis.