

DNA-interkalering av kirala ruteniumkomplex med liganden 6,7-dicyanodipyridoquinoxalin

Kandidatarbete KBTX01-15-06

John Axelsson, Louise Karlsson, Oliver Olsson,
Erik Romberg, Emma Skogman, Lisa Strand

Bilden på framsidan illustrerar en schematisk bild för hur interkalering kan se ut. Den vänstra delen av figuren visar DNA-interkalering med Δ -enantiomeren och den högra visar med Λ -enantiomeren.

Sammanfattning

Den primära uppgiften i denna studie var att framställa samt analysera det relativt outforskade komplexet $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ (phen=1,10-fenantrolin, dicnc=6,7-dicyanodipyrido[2,2-*d*:2',3'-*f*]quinoxalin). Mellanprodukten $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{pq}]^{2+}$ (pq=1,10-fenantrolin-5,6-dion) syntetiserades samt separerades i dess kirala enantiomerer Δ och Λ . Vidare kondenserades vardera enantiomer med diaminomaleonitril för att erhålla Δ - och Λ - $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$.

Komplexen analyserades till en början med absorptionsmätningar samt en $^1\text{H-NMR}$ -analys. Dessa analyser bekräftade en lyckad syntes av $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$. Enantiomerernas kiralitet studerades med cirkulär dikroism. Spektrat från denna metod indikerade en lyckad separation av komplexets enantiomerer. Vidare undersöktes vardera enantiomers interaktion med DNA med hjälp av linjär dikroism, kalorimetri samt fluorescensspektroskopi. Resultaten från dessa analyser visade en tydlig skillnad mellan enantiomererna. Jämfört med tidigare studier har vi fått motsatta resultat för enantiomererna i fluorescensanalysen samt annorlunda resultat från kalorimetri.

Utifrån dessa resultat drog vi slutsatsen att den undersökta molekylen $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ binder till DNA genom interkalering, samt att komplexets enantiomerer binder med olika affinitet. Detta tror vi beror på att enantiomererna har olika geometrisk orientering gentemot DNA.

Som sekundär uppgift utfördes ett flertal försök att syntetisera en ny sorts ftalocyanin från det tidigare framställda ruteniumkomplexet $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$. Tyvärr kunde ej en lyckad syntesväg verifieras. Vi misstänker att ruteniumkomplexets höga molmassa samt dess tvåvärda positiva laddning kan vara faktorer som påverkar denna syntes.

Abstract

DNA intercalation with chiral Ruthenium complexes with the ligand 6,7-dicyanodipyridoquinoline

The primary aim of this study was to synthesize and analyze the relatively unexplored complex $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ (phen = 1,10-phenanthroline, dicnq = 6,7-dicyanodipyrido [2,2-*d*:2',3'-*f*] quinoxaline). The intermediate $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{pq}]^{2+}$ (pq = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) was synthesized and separated into its chiral enantiomers Δ and Λ . They were then condensed with diaminomaleonitrile to obtain Δ - and Λ - $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$.

Products from the synthesis were at first analyzed by absorbance measurements as well as a $^1\text{H-NMR}$ analysis. Obtained spectra from these methods confirmed a successful synthesis of $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$. The chirality of the enantiomers were studied with circular dichroism and results from this method verified a successful separation of the two enantiomers. The interaction with DNA for each of the two enantiomers was investigated by linear dichroism, isothermal titration calorimetry (ITC) and fluorescence spectroscopy. These assays showed a clear difference between the enantiomers. Our results compared to previous studies showed opposite differences in the fluorescence analysis as well as in the ITC measurements.

Based on these results, we concluded that the investigated molecule $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ binds to DNA by intercalation. However, the enantiomers of the complex bind to DNA with different affinities. We believe that the reason for this is that their ligands do not have the same geometric orientation towards DNA.

As a secondary aim a new type of phthalocyanine was to be synthesized as well as investigating its interaction with DNA. Several attempts to synthesize this phthalocyanine from the produced complex $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ were performed, but without being able to verify a successful path of synthesis. We believe that the main reasons for the failures were that the complex has two positive charges as well as a high molar mass.

Molekylförkortningar och strukturer

phen

pq

dicnq

(I)

(II)

(III)

1,10-fenantrolin

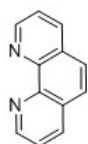
1,10-fenantrolin-5,6-dion

6,7-dicyanodipyrido[2,2-*d*:2',3'-*f*]quinoxalin

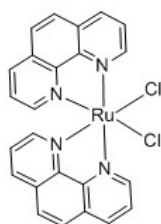
$\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2$

$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{pq}]^{2+}$

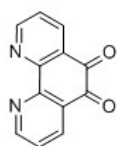
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$



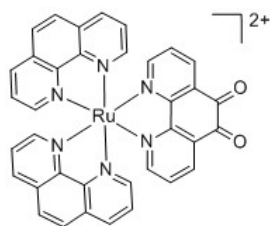
phen



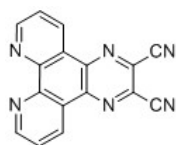
(I)



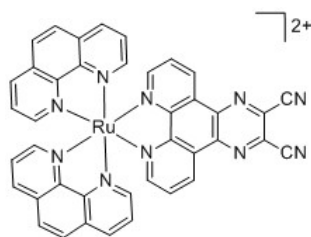
pq



(II)



dicnq



(III)

Ord och begrepp

Absorptionsband	Ett våglängdsområde som är karakteristiskt för en övergång mellan ett grundtillstånd till ett exciterat
Anisotrop	En molekyl eller substans som uppvisar andra fysikaliska egenskaper då den mäts i olika riktningar.
AT-DNA	DNA-polymer som endast innehåller kvävebaserna adenin och tyrosin.
Cirkulärpolariserat ljus	Ljus med konstant magnitud som vrider sig likt en helix kring propageringsriktningen.
ctDNA	DNA från kalvbräsa (thymuskörteln).
Dialys	Separationsteknik som utnyttjar diffusion genom ett membran för att byta ut eller utväxla små molekyler, exempelvis saltjoner.
Enantiomer	En av två stereoisomerer som är icke-identiska samt en spegelbild av den andra.
Interkalering	En molekyl eller molekylgrupp infogas mellan två andra molekyler som oftast är plana.
Isotrop	En molekyl eller substans som uppvisar samma fysikaliska egenskaper då den mäts i olika riktningar.
Kiral	Ett ämne som inte är identiskt med sin spegelbild.
Ljussensibiliserare	Molekyl som initierar en kemisk förändring i en fotokemisk process.
Planpolariserat ljus	Ljus som oscillerar i samma plan.
Optisk aktivitet	Ett ämnes förmåga att vrida polarisationsplanet hos planpolariserat ljus.
Orientering	Position jämfört med en referensaxel.
Polariserat ljus	Ljus kan beskrivas som en tvärgående våg och polariseringen definieras som riktningen av dess elektriska fält.
Racemisk blandning	En blandning som innehåller ett kemiskt ämnes vänstervridna och högervidna enantiomer i förhållande 1:1.

Innehåll

1	Inledning	1
2	Bakgrund	2
2.1	DNA och interkalering	2
2.2	Fotodynamisk terapi	5
3	Grundläggande Metoder	6
3.1	Bestämning av koncentration genom Absorbansmätningar	6
3.2	Verifiering av molekylstruktur med $^1\text{H-NMR}$	6
3.3	Analys av enantiomerer med Cirkulär Dikroism	6
3.4	Bestämning av bindingsgeometri mellan $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ och DNA med Linjär Dikroism	7
3.5	Kolonnkromatografi för rening av $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$	7
3.6	Kalorimetri (ITC, Isothermal titration calorimetry) - För att studera bindingsgeometri och termodynamik	7
3.7	Studering av DNA-interaktion med Fluorescens	8
4	Syntes	9
4.1	Syntes av $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2$ (I)	9
4.2	Syntes av $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{pq}]\text{Cl}_2$ (II)	10
4.3	Syntes av $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ (III)	11
5	Experimentell metod	12
6	Resultat	13
7	Diskussion	17
7.1	Interkalerade $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$?	17
7.2	Försök med ftalocyanin	18
7.3	Experimentell del	19
8	Slutsats	20
	Litteraturförteckning	
	A Bilaga	

1 | Inledning

I DNA lagras genetisk information för alla levande organismers uppbyggnad. Detta uppmärksammades år 1962 då Francis Crick, James Watson och Maurice Wilkins fick nobelpriset för deras

”Discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and it’s significance for information transfer in living materia”

– Nobelkommittén 1962 [1]

Deras studier utgjorde grunden för ett nytt forskningsområde med en önskan att förstå och påverka vår arvs massa till det bättre.

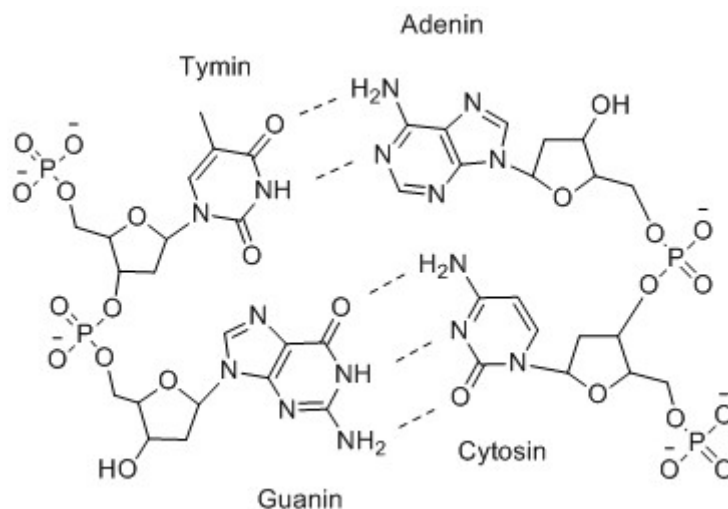
Idag är det fortfarande relativt okänt hur genetiska sjukdomar uppkommer och hur de ska behandlas. Genom att utveckla läkemedel som binder till specifika DNA-sekvenser finns potential att motverka sjukdomar som orsakas av genmutationer eller invaderande DNA, exempelvis virus [2, 3]. Läkemedelsmolekyler kan binda till DNA på flera olika sätt, varav ett är genom interkalering. Molekylen lägger sig då helt eller delvis mellan två baspar i DNA-strängen.

Syftet med denna studie är att undersöka ett ruteniumkomplex och dess interaktion med DNA med hjälp av kalorimetri samt spektroskopiska metoder. Projektets andra syfte är att syntetisera en ”Supermolekyl” som består av fyra sammanfogade ruteniumkomplex. Förhoppningsvis kan detta komplex uppvisa fotokemiska egenskaper vilket gör den fördelaktig vid fototerapeutiska behandlingar.

2 | Bakgrund

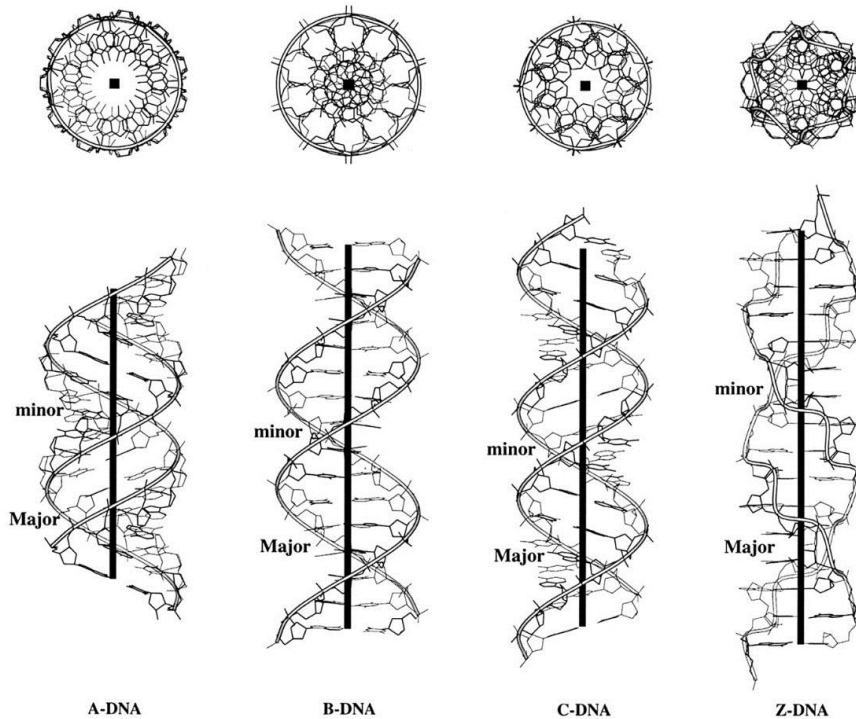
2.1 DNA och interkalering

Deoxiribonukleinsyra (DNA) är den molekyl som används för att förvara, kopiera samt uttrycka den genetiska koden i alla levande organismer. DNA är uppbyggt av två långa polymerer vridna runt varandra likt en helix. Varje sträng är uppbyggd av nukleotider vilka består av en sockergrupp, en fosfatgrupp samt en kvävebas. I DNA finns det fyra olika kvävebaser; adenin (A), tymin (T), guanin (G) och cytosin (C). Kvävebaser från olika strängar binder till varandra via vätebindningar; A binder till T med två bindningar och G till C med tre bindningar. De olika kvävebaserna med bindningar till sina komplementära baser visas i Figur 1 [4].



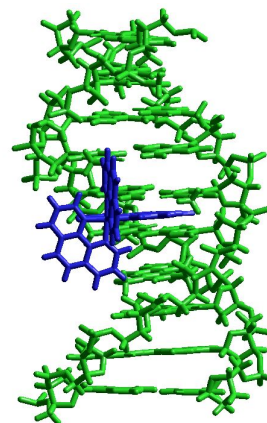
Figur 1: Schematisk bild över de fyra kvävebasernas struktur i DNA. Baserna binder till varandra med vätebindningar (- - -) och är på var sida bundna till socker-fosfatryggraden.

I varje polymersträng binder nukleotiderna till varandra via fosfodiesterbindningar mellan sockergruppen och fosfatgruppen. Då A endast binder till T och G endast till C blir den ena strängen den andres komplementära kopia. En specifik följd av nukleotider ger upphov till en gen. Genen fungerar i sin tur som en mall för syntesen av ett protein med en specifik funktion. Ordningen av nukleotider kan variera med i princip ett oändligt antal kombinationer, vilket ger ett enormt utbud av möjliga gener. DNA-helixen kan anta olika former av vridning: A-DNA, B-DNA, C-DNA samt Z-DNA vilka visas i Figur 2. Nästan uteslutande förekommer den högervridna B-formen i naturen med en höjd på 10.5 baspar (bp = 3.4Å) och vridningen 34.3° mellan två intilliggande baspar. B-formen bildar två fåror vilket illustreras i Figur 2, en större samt en mindre på varsin sida av ett baspar. Via dessa fåror kan molekyler som till exempel enzymer eller mediciner interagera med DNA [4].



Figur 2: Strukturen för A-, B-, C- och Z-DNA. Figuren visar även dessa formers stora och små fåror. Omtryckt från *3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures* av X. Lu och W. K. Olson, 2003, New Jersey: The State University of New Jersey. Copyright 2003 av Oxford University Press. Omtryckt med tillåtelse.

Den negativt laddade fosfatgruppen i en nukleotid gör DNA negativt laddat, vilket möjliggör integrering med positiva molekyler. En del plana molekyler, ofta innehållandes aromatiska enheter, kan interagera med DNA via interkalering. Detta är en icke-kovalent bindning där en molekyl infogas vinkelrätt mellan två baspar. Ett exempel på hur en interkalering kan se ut illustreras i Figur 3. Vid interkalering tvinnas DNA-helixen upp en aning och en förlängning av nukleotidbindningarna uppstår. På grund av nukleotidernas struktur har A-T rika områden färre steriska hinder samt en lägre bindningsenergi vilket underlättar för större molekyler att kunna interkalera till DNA [5, 6, 7].



Figur 3: Grafisk bild av en möjlig DNA-interkalering.

2.1.1 Varför är interkalering med DNA intressant?

Molekyler som binder in till DNA genom interkalering kan hindra DNA-strängarna från att separera och därmed inhibera DNA-replikering och proteinsyntes. Denna metod skulle därför vara ett väldigt effektivt behandlingssätt jämfört med att ta hand om de proteiner som redan bildats av sjukdomen. Två exempel på sådana sjukdomar är diabetes och alzheimers. Båda är problematiska folksjukdomar som årligen drabbar en stor mängd människor världen över [8, 9]. Det är även tänkbart att interkalering stoppar translationen helt och på så sätt dödar cellen, vilket skulle kunna vara ett bra komplement till behandling av bakterier och cancer. Detta kan jämföras med mekanismen bakom ett av naturens idag mest potenta gift, amatoxiner. Giftet verkar genom att binda in till mRNA och hindra proteinsyntesen vilket dödar dess offer väldigt effektivt [10].

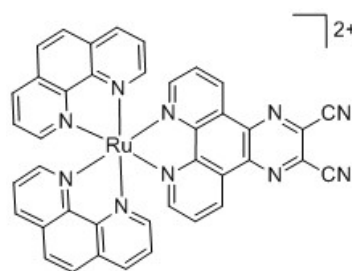
2.1.2 Val av interkalerande molekyl

För att interkalering ska fungera upptäcktes det tidigt att många krav ställs på den interkalerande molekylen [11]. De generella egenskaper som molekylen bör ha är att vara plan, gärna innehålla flera aromatiska ringar, vara flexibel samt ha katjoniska grupper på ändarna [6]. Många försök har gjorts med olika metaller och övergångsmetaller med varierande sidoligander.

Metallkomplex med en ruteniumatom i mitten har studerats i flera årtionden och har flera fördelar. Dessa är bland annat att komplexen blir väldigt stabila, både geometriskt och kemiskt, och att de också är fotokemiskt känsliga beroende på dess omgivning [6, 12]. Den senare egenskapen är praktisk när analyser utförs på komplexet, eftersom ämnen som fluorescerar och har skarpa toppar i UV/VIS området relativt enkelt kan kvantifieras. Det är möjligt att variera ligandernas strukturer på ruteniumkomplex och därmed bättre förstå hur olika strukturer kan påverka inbindningen till DNA [13].

Väldigt få studier har tidigare gjorts på ruteniumkomplexet $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ (phen = 1,10-phenanthroline; dicnq = 6,7-dicyanodipyrido[2,2-*d*:2',3'-*f*]quinoxaline) som ses i Figur 4. Ambrose & Maya (2000) såg att $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ interagerade med DNA och band till det med en ”måttlig styrka” [12]. Trots att komplexet är kiralt och bildar två olika enantiomerer vid syntes, Δ och Λ , undersöktes det aldrig om det fanns någon skillnad mellan dessa och deras interaktion med DNA. Detta trots att det visat sig i andra studier med liknande komplex att en skillnad i hur väl interkaleringen sker varierat med vilken enantiomer som använts [13]. Det gjordes heller aldrig någon undersökning av hur denna interaktion med DNA kan se ut. Därför har denna studie valt att undersöka hur de båda enantiomererna av $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ binder in till DNA och om inbindningen ser olika ut beroende på kiralitet.

Att $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ och liknande ruteniumkomplex ofta uppvisar egenskaper som fluorescens samt luminescens [14] gör att det finns flera användningsområden för dessa typer av komplex. Ett tänkbart område är analyser med DNA, då komplexen tenderar att uppvisa fluorescens vid avsaknaden av vätebindningar. I en vattenbaserad cell sker detta när molekylen interkalerar med DNA och på så sätt göms i basparens hydrofoba miljö.

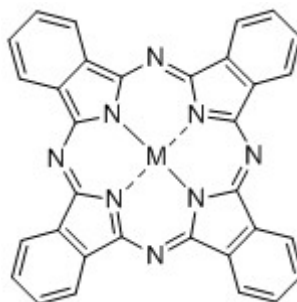


Figur 4: Struktur för $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$.

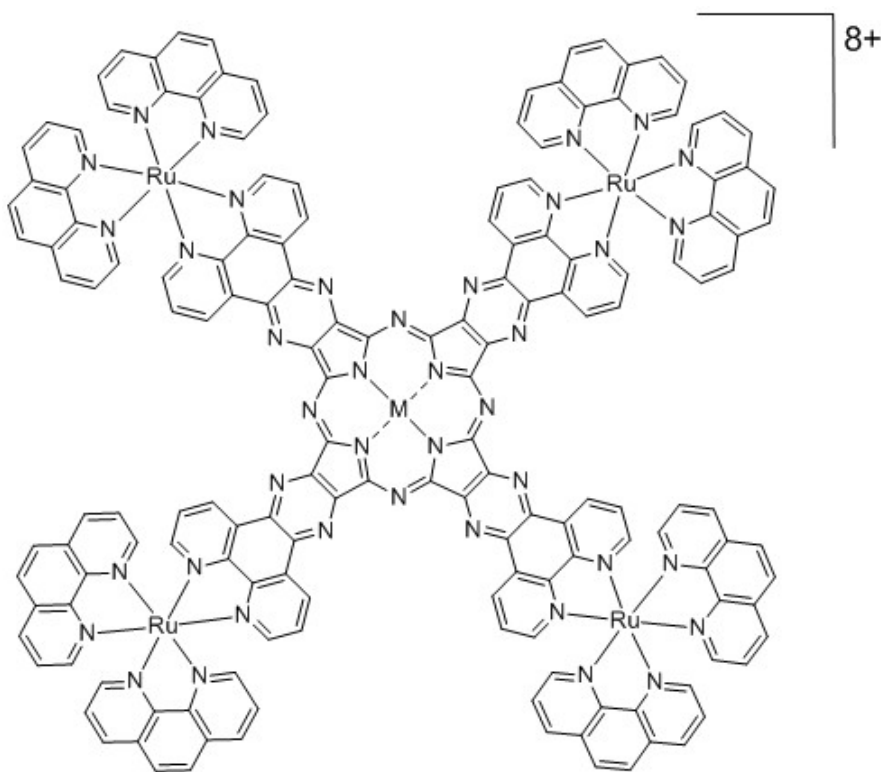
2.2 Fotodynamisk terapi

Fotodynamisk terapi är en typ av cancerbehandling där man med hjälp av ljus aktiverar läkemedlet, som i sin aktiva form dödar cancerceller. Ett ämne som tidigare har undersökts för att ersätta vad som används idag för denna form av cancerbehandling är ftalocyanin, se Figur 5. Till skillnad från de cancerbehandlingar som är tillgängliga idag så har ftalocyaniner ett absorptionsmax vid de våglängder som lättast penetrerar människovävnad. Samtidigt är ftalocyaniner inte toxiska, har hög kemisk tålighet och är goda ljussensibiliserare [15].

En sådan molekyl kan troligtvis användas djupare ner i vävnaden jämfört med vad som görs idag. Denna egenskap är mycket eftertraktad då fotodynamisk terapi är ett behandlingssätt av cancer som orsakar minimalt med obehag för patienten samtidigt som effekten är god [16]. Ett av flera problem som har upptäckts är att få de existerande ftalocyaninerna vattenlösliga. Därför ska vi i denna studie syntetisera en vattenlöslig ftalocyanin genom att sammanfoga fyra stycken $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicyq}]^{2+}$ till en enda "Supermolekyl", Figur 6.



Figur 5: Ftalocyanin. M representerar en metall med oxidationstal (II).



Figur 6: Molekylfigur av "Supermolekylen". M representerar en metall med oxidationstal (II) som kan variera.

3 | Grundläggande Metoder

3.1 Bestämning av koncentration genom Absorbansmätningar

Enligt Lambert Beers lag är en lösning absorptions A proportionell mot koncentrationen av det upplösta ämnet

$$A = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon cl \quad (1)$$

där I_0 är intensiteten på ingående ljusstrålen, c är koncentrationen, l är längden på kyvetten och ϵ är den molära absorptiviteten, som beror av ämnet och våglängd. Ju mer ljus som molekylerna i provet absorberar desto svagare blir den utgående ljusstrålens intensitet, I . Vid en spektroskopianalys skickas ljus med en viss våglängd in mot provet och en detektor mäter intensiteten på den utgående strålen. Intensitetsvärdena används av instrumentet för att räkna ut absorbansen med hjälp av ekvation (1). Varje ämne får därför ett absorptionspektrum med karaktäristiska absorptionsmaximum [17]. Dessa mätningar genomfördes för att verifiera koncentrationer av komplex i övriga analyser.

3.2 Verifiering av molekylstruktur med $^1\text{H-NMR}$

$^1\text{H-NMR}$ används för att undersöka molekylstrukturer i ett ämne med avseende på dess väteatomer (protoner). Provet utsätts för ett starkt magnetfält och pulser av radiovågor av olika frekvenser skickas mot provet. Väteatomer som ligger i sitt grundtillstånd kommer då att förflyttas till ett högre tillstånd. Radiovågspulsen avlägsnas och väteatomen förflyttas tillbaka till sitt ursprungliga tillstånd och avger då en liten, men mätbar strålning. Detta kan detekteras som toppar på en graf. Elektrondensiteten varierar för de olika bindningar som väte bidrar till och elektronerna runt väteatomkärnan kommer att skärma av kärnan från det externa magnetfältet. Därför måste radiovågsfrekvenserna justeras beroende på vilka bindningar som är i väteatomens närhet. Som ett resultat kommer topparna på grafen att uppkomma vid olika frekvenser samt ha olika utseende och intensitet beroende på molekylens struktur [18].

3.3 Analys av enantiomerer med Cirkulär Dikroism

En cirkulärpolariserande foton kan ses som en kiral partikel och således är höger- och vänstercirkulärpolariserande fotoner varandras enantiomerer. Därför kan den ena formen av fotonerna passera en lösning av en enantiomer av ett kiralt ämne lättare, det vill säga absorberas svagare än den andra. Cirkulär dikroism (CD) definieras som skillnaden i absorbans av höger- och vänstercirkulärpolariserande ljus enligt ekvation (2):

$$\text{CD} = A_{\text{VP}} - A_{\text{HP}} \quad (2)$$

Denna skillnad uppkommer på grund av att molekyler som är kirala absorberar olika mycket av dessa två typer av ljus. En racemisk blandning kommer därför inte att uppvisa CD eller optisk aktivitet. CD används för att verifiera att båda enantiomerer av rac-[Ru(phen)₂dicnq]Cl₂ erhållits efter separationen. CD-analysen verifierar även att denna separation blivit fullständig och

att det inte finns några föroreningar i proven. Vidare används denna analysmetod för att undersöka DNA-interaktioner eftersom en interkalering med DNA ger förändringar i CD-spektrumet [19].

3.4 Bestämning av bindningsgeometri mellan $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ och DNA med Linjär Dikroism

Linjär dikroism (LD) används för att undersöka orienterade molekyler, till exempel orienterat DNA med eventuella bundna molekyler eller dess subenheter. Metoden använder planpolariserat ljus, till skillnad från CD. När en molekyl anisotropt binder till flödesorienterat DNA blir den själv orienterad. Genom att sedan använda ett isotropt spektrum, A_{iso} kan information om molekylen bindningsgeometri gentemot DNA erhållas. Definitionen för LD kan ses i ekvation (3) och är differensen mellan det planpolariserade ljuset som absorberas parallellt och det som absorberas rätvinkligt mot en orienteringsriktning.

$$\text{LD} = A_{\parallel} - A_{\perp} \quad (3)$$

Om LD-signalen blir negativ påvisar detta att den polariserande energiövergången som undersöks är rätvinklig mot orienteringsriktningen. Blir signalen istället positiv är polariseringen av energiövergången som undersöks parallell mot orienteringsriktningen. Från LD^f , reducerad linjär dikroism, kan en vinkel α räknas ut enligt ekvation (4). Detta representerar vinkeln mellan orienteringsaxeln och det övergående dipolmomentet för en orienterad molekyl.

$$\text{LD}^f = \text{LD}/A_{\text{iso}} = (3/2)S(3\cos^2\alpha - 1) \quad (4)$$

där S är den makroskopiska orienteringsfaktorn som beskriver hur väl DNA-molekylerna i provet ordnar sig. Denna faktor antar ett värde mellan noll och ett, där noll är fullständig oordning och ett är perfekt ordning. Denna faktor kan erhållas från LD^f av rent DNA med samma koncentration som används i prover med ruteniumkomplex [19].

3.5 Kolonnkromatografi för rening av $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$

Kolonnkromatografi används för att separera olika molekyler i ett prov. Metoden använder en flytande mobil fas (elueringsmedel) och en fast (stationär) fas. En koncentrerad lösning av provet tillsätts först i toppen på kolonnen, därefter tillsätts elueringsmedlet kontinuerligt högst upp i kolonnen och tvingar provet med sig genom den stationära fasen. Detta ger upphov till en separation där olika komponenter i provet växelverkar olika starkt med den stationära fasen och därför elueras olika fort. Valet av stationär fas påverkar vilken typ av separation som skall utföras och kan exempelvis ske med avseende på molekylernas storlek, polaritet eller affinitet [20].

3.6 Kalorimetri (ITC, Isothermal titration calorimetry) - För att studera bindningsgeometri och termodynamik

En kalorimeter används för att mäta entalpiförändringar i en kemisk reaktion. Metoden bygger på titrering där ett ämne injiceras i en lösning av en bindningspartner i kalorimeterns provcell. I detta arbete undersöks metallkomplexets bindning till bindningspartnern DNA. Därför kommer metallkomplexet titreras ner i en lösning bestående av AT-DNA. Vid varje titrering mäter kalorimetern den värme som tas upp eller avges från provet i cellen jämfört med en referenscell innehållande avjoniserat vatten. Denna entalpiförändring uttrycks sedan som den energi som krävs för att hålla referenstemperaturen. Då volymen är känd kan bindningsentalpin bestämmas. De

två cellerna, provcellen och referenscellen, är båda placerade i ett adiabatiskt skal i kalorimetern och titrering sker automatiskt med hjälp av en spruta. Initialt reflekterar ITC-kurvan bindningsentalpin då allt metallkomplex ska kunna binda in till omättat DNA. DNA mättas gradvis med interkalerande metallkomplex varav den observerade entalpin sjunker vilket motsvarar en kurvig region i ITC-profilen. Denna kurviga region beror på K_A (associationskonstanten) men även på antalet bindningsplatser hos DNA. När bindningspartnern är helt mättad kommer den entalpiförändring som sker endast att bero på utspädningen och en del störningsfaktorer, så som vibrationer i bänken och koncentrationsskillnader i bufferten som används för provet och det tillsatta ämnet. Detta problem kan undvikas genom att köra en dialys på DNA-provet och sedan använda den bufferten för att späda stamlösningarna.

3.7 Studerande av DNA-interaktion med Fluorescens

En fluorescerande molekyl absorberar ljus av en viss våglängd och emitterar vid en längre våglängd. Detta fenomen kan undersökas med hjälp av en spektrofluorometer. Ljuset som belyser provet passerar först genom en excitationsmonokromator för att kunna selektera ett visst våglängdsområde som exciterar molekylerna. En emitteringsmonokromator som väljer ut ett specifikt våglängdsområde är placerat innan en detektor som registrerar denna ljusintensitet.

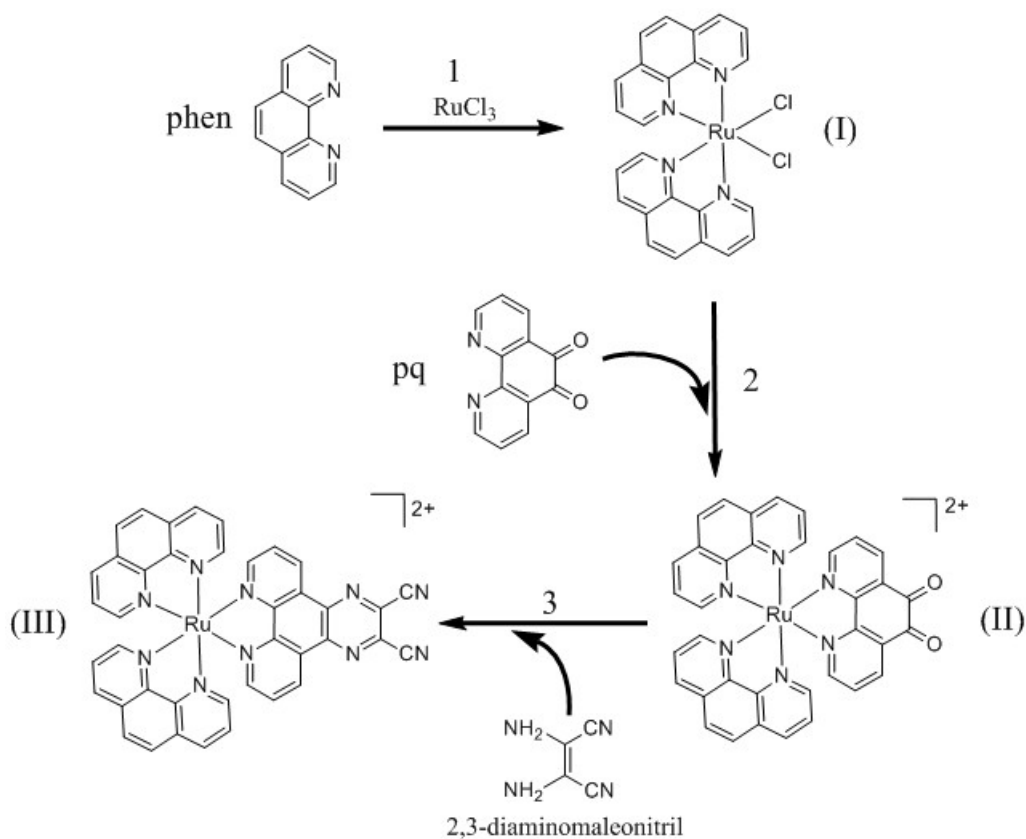
Fluorescens används i detta projekt för att undersöka om $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ i vattenlösning interkalerar med ctDNA. Om vatten kan komma åt att vätebinda till de två kväveatomerna i komplexets pyrazin-ring utsläcks fluorescensen som komplexet annars har. Utsläckningen förhindras när molekylerna interkalerar med DNA, detta på grund av att kväveatomerna hamnar vid platsen för interkalering vilket är utom räckhåll för vattenmolekylerna. Högkoncentrerat ctDNA tillsätts i små mängder till ett prov innehållande komplex löst i buffert, varav mätningar utförs mellan varje tillsättning av DNA. När intensiteten inte längre stiger tyder detta på att DNA är mättat. Ett förhållande på hur många DNA-baspar en $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ molekyl interkalerar med kan således beräknas [20].

4 | Syntes

4.1 Syntes av Ru(phen)₂Cl₂ (I)

Mellanprodukt (I) framställdes med metoder från litteratur [21] med vissa modifieringar. Reaktion 1 i Figur 7 illustrerar syntesen av (I).

Ruteniumtriklorid (2,50 g; 9,58 mmol), 1,10-fenantrolin (phen) (3,50 g; 19,4 mmol) samt litiumklorid (4,20 g; 99,1 mmol) löstes upp i 20 ml dimetylformamid (DMF). Lösningen fick en mörkbrun färg. Vätskan återloppskokades under omrörning i 7,5 timmar och blev med tiden svart och trögflytande. Den späddes med 80 ml aceton och fick stå i -20°C för långsam kristallisering. Efter 36 timmar erhöles kristallerna genom sugfiltrering och tvättning med kyld aceton samt kylt avjonat vatten. Filtratet blev först svagt gult som gradvis övergick till brunt under tvättningen med vatten. Filterkakan suspenderades i 100 ml vatten samt 100 ml etanol och kokades tills kristallerna hade löst sig. Det resulterade i en vinröd lösning som filtrerades genom ett veckfilter. Litiumklorid (24 g; 566 mmol) tillsattes till filtratet som förvarades vid 8°C i fem dagar. Lösningen sugfiltrerades, tvättades med vatten och dietyleter innan den lufttorkades. De resulterande svartglänsande kristallerna var produkten (I). Utbytet blev 2,31 g.



Figur 7: Schematisk bild av syntesvägen.

4.2 Syntes av $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{pq}]\text{Cl}_2$ (**II**)

Syntes av mellanprodukten (**II**) baserades på metoder från litteraturen [22] med vissa modifikationer. Syntesen visas i Reaktion 2 i Figur 7.

(**I**) (1,14 g; 2,14 mmol), 1,10-fenantrolin-5,6-dion (pq) (0,48 g; 2,53 mmol), 40 ml avjonat vatten och 20 ml etanol tillsattes till en e-kolv. Lösningen återloppskokades i syrefri miljö i 3,5 timmar och blev svartgul. Lösningen sugfiltrerades och indunstades med ytterligare tillsatser av etanol. De svarta kristallerna från indunstningen löstes i diklormetan till en mörkbrun lösning som sugfiltrerades. Filtratet delades upp i en gulaktig organisk fas och en svartbrun vattenfas. Den sistnämnda fasen innehöll en racemisk blandning av (**II**) Cl_2 som sugfiltrerades.

4.2.1 Separation av rac-(**II**)

L(+)-natriumarsenyltartrat (3,10 g; 12,6 mmol) löstes i 30 ml avjonat vatten, kokades upp och tillsattes till det kokande filtratet av (**II**). Kristallisering initierades genom intensiv skrapning med en glasstav på insidan av bägaren varefter lösningen långsamt fick svalna i 5 timmar i rumstemperatur för att sedan förvaras i kylskåp vid 8°C i sex dagar. 10 ml avjonat vatten tillsattes till lösningen som sedan sugfiltrerades. De svartbruna kristallerna, orenade Λ -(**II**)-L(+)-natriumarsenyltartrat, utvanns medan filtratet, moderluten, sparades för senare utvinning av Δ -enantiomeren.

4.2.2 Rening av Λ -(**II**)

De svartbruna kristallerna löstes upp i 25 ml varm dimetylsulfoxid (DMSO) och 85 ml kokande avjoniserat vatten. L(+)-natriumarsenyltartrat (0,85 g; 3,46 mmol) löstes i 10 ml varmt avjoniserat vatten och tillsattes till DMSO- och vattenlösningen. Kristallisering initierades och kristalllösningen tilläts svalna och förvarades därefter vid 8°C i sex dagar. Lösningen sugfiltrerades och tvättades med kallt vatten. Filterkakan löstes i 20 ml varm 50 % ättiksyra. Ammoniumhexafluorofosfat (0,85 g; 5,21 mol) löst i 10 ml avjonat vatten droppades ner i lösningen. Lösningen kylades på is i 30 minuter, filtrerades och tvättades med isvatten samt en blandning av dietyleter och etanol (3:2). Tvättningen upprepades med endast dietyleter. Utbytet av Λ -(**II**)(PF_6) $_2$ blev 0,55 g.

4.2.3 Rening av Δ -(**II**)

Moderluten, filtratet innehållande Δ -enantiomeren, kokades upp med 30 ml etanol. Ammoniumhexafluorofosfat (1,00 g, 6,13 mmol) löstes upp i 10 ml avjonat vatten för att sedan droppvis pipetteras ner i moderluten. Etanolens avdunstning påskyndades med hjälp av kvävgas och lösningen svalnade därefter i kyl i 4 timmar. Lösningen sugfiltrerades och tvättades med avjonat vatten, etanol och dietyleter. När kristallerna var helt torra löstes de i 10 ml aceton. Tetra-n-butylammoniumklorid (0,56 g; 2,01 mmol) löstes i 4 ml aceton och tillsattes sakta till kristalllösningen tills en brun fällning erhöles. Fällningen av orenad Δ -(**II**) Cl_2 sugfiltrerades och tvättades med aceton och dietyleter. Filterkakan löstes i 65 ml kokande vatten. D(-)-natriumarsenyltartrat (1,24 g; 5,04 mmol) löstes i 10 ml varmt vatten för att sedan föras över till den kokande vattenlösningen. Kristallisering initierades och kristalllösningen svalnade i rumstemperatur och placerades i kylskåp vid 8°C i sex dagar. Lösningen sugfiltrerades och tvättades med kallt vatten. Kristallerna löstes i 25 ml DMSO och 85 ml kokande vatten tillsattes. D(-)-natriumarsenyltartrat (0,86 g; 3,50 mmol) löst i 10 ml varmt vatten tillsattes och kristallisering initierades. Lösningen innehållande kristaller av Δ -(**II**)-D(-)-natriumarsenyltartrat tilläts svalna i rumstemperatur. Lösningen filtrerades sedan och tvättades med kallt vatten. Filterkakan löstes i 25 ml varm ättiksyra (50 %). Ammoniumhexafluorofosfat (0,85 g; 5,21 mmol) löst i 10 ml vatten tillsattes till lösningen. En fällning bildades som sedan sugfilterades samt tvättades med vatten följt av en blandning av

dietyleter och etanol (3:2) för att slutligen tvättas med ren dietyleter. Utbytet av Δ -(**II**)(PF₆)₂ blev 0,43 g.

4.3 Syntes av [Ru(phen)₂dicnq]²⁺ (**III**)

Syntesen baserades på tidigare arbete gjort av Ambroise & Maya (2000) med vissa modifikationer [12]. Reaktion 3 i Figur 7 illustrerar syntesen av (**III**).

Δ -(**II**)(PF₆)₂ (0,199 g; 0,243 mmol) och diaminomaleonitril (0,0549 g; 0,508 mmol) löstes i 20 ml etanol. 10 ml acetonitril och 2 ml ättiksyra tillsattes till lösningen som färgades gulbrun. Lösningen återloppskokades i syrefri miljö under kvävgas i en timme och läts sedan svalna. Vätskan var då klarröd men efter indunstning fick den en mörkare röd färg. Ammoniumhexafluorofosfat löst i en liten mängd avjonat vatten tillsattes kontinuerligt i små mängder tills en fällning bildades. Lösningen sugfiltrerades, tvättades med en blandning av etanol och dietyleter (1:2) vilket gav ett gult filtrat. De orangeröda kristallerna av Δ -(**III**)(PF₆)₂ löstes i lite acetonitril och renades i en kolonn med acetonitril elueringsmedel och neutral aluminium(**III**)oxid som den stationära fasen. Önskade restprodukter fastnade i den stationära fasen medan Δ -(**III**)(PF₆)₂ löstes i den mobila fasen. Då det lämnande elueringsmedlet genomgick en färgskiftning från transparent till rött påbörjades uppsamlingen av renad produkt. Uppsamlingen varade tills den röda färgen i utloppet minskade i intensitet. Tetrabutylammoniumklorid (1 g; 3,60 mmol) löst i 2 ml aceton tillsattes till den röda lösningen. Dietyleter och ytterligare tetrabutylammoniumklorid tillsattes tills en bestående fällning bildades och vätskan blev klar. Fällningen sugfiltrerades och tvättades med dietyleter tills filtratet var transparent. Utbytet av Δ -(**III**)Cl₂ blev 0,0521 g, vilket motsvarar 26 % av det teoretiska utbytet.

Syntes av Λ -(**III**) genomfördes på samma sätt som för Δ -enantiomeren. Startmängder av Λ -(**II**)(PF₆)₂ (0,207 g; 0,253 mmol) och diaminomaleonitril (0,0524 g; 0,485 mmol) gav utbytet 0,0612 g av Λ -(**III**)Cl₂, vilket motsvarar 30 % av det teoretiska utbytet.

5 | Experimentell metod

De komplex som har analyserats i detta avsnitt var enantiomererna av **(III)**. Anjonen bunden till komplexen var klorid om inget annat har angetts. Stamlösningar av komplexen förbereddes genom att lösa upp kloridsaltet i en buffertlösning (150 mM NaCl och 1 mM natriumkakodylat, pH 7). Anledningen till att bufferten hade en salthalt på 150 mM NaCl var för att efterlikna en fysiologisk salthalt. ctDNA användes för samtliga analysmetoder utom ITC där AT-DNA användes för att få mer konsekventa inbindningssignaler. Koncentrationer av DNA erhöles från beräkningar med ekvation (1), genom att använda $\epsilon=6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, vid 258 nm för ctDNA samt 262 nm för AT-DNA. Alla mätningar utfördes i rumstemperatur.

Varian Cary 50 UV/vis spectrophotometer (kyvettlängd: 1 cm) användes för absorbansmätningar. Koncentrationer beräknades genom att använda extinktionskoefficienter från tidigare studie av Ambrose & Maya (2000), där samma molekyl har undersökts[12],.

$^1\text{H-NMR}$ spektra för **(III)**(PF₆)₂ löst i DMSO analyserades med en Agilent 400 MHz spectrometer. Analys av resultat gjordes med programmet MestReNova 10.0.1.

CD-mätningar utfördes med en Chirascan CD spectropolarimeter (kyvettlängd: 1 cm). Koncentrationer på vardera enantiomer var 6 μM .

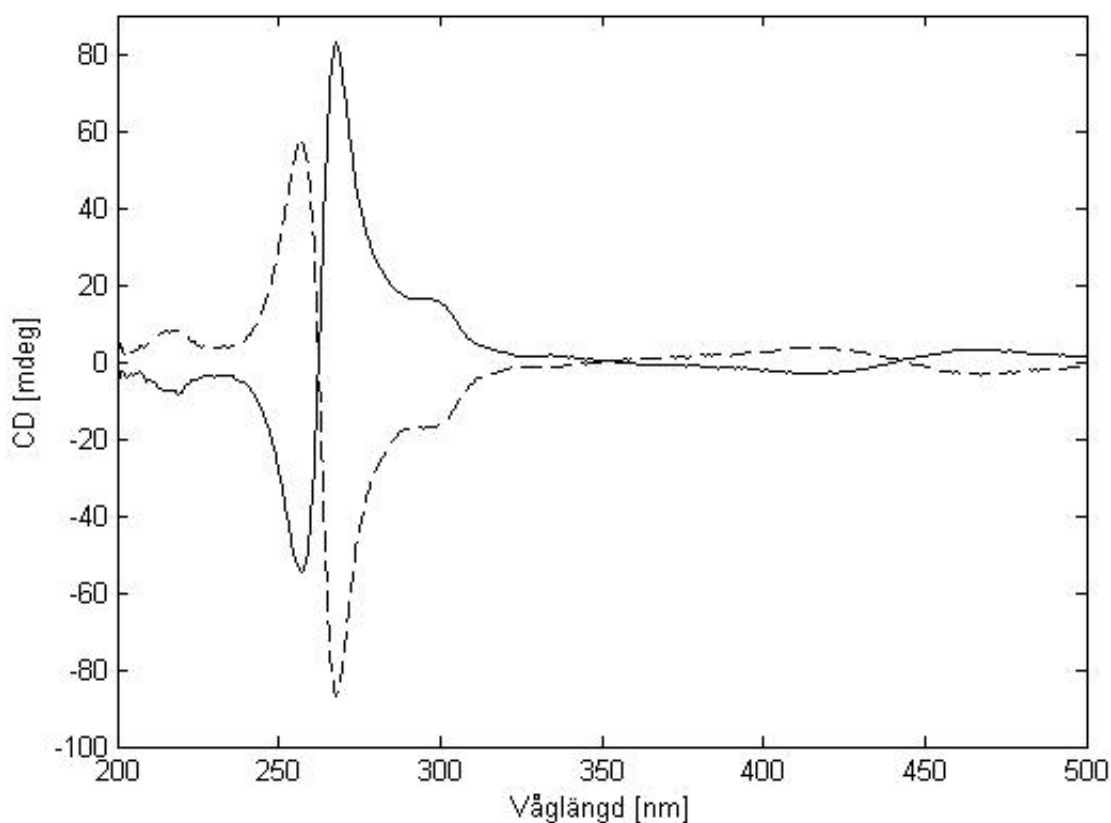
LD-mätningar utfördes med en Chirascan LD spectropolarimeter. Proverna förbereddes med 240 μM bp ctDNA och 60 samt 30 μM av komplexen som gav förhållande [komplex]:[baspar] 1:4 och 1:8. Vardera prov placerades i en yttre roterande Couette-flödescell med 1 mm optisk väglängd och mättes vid rotationshastigheten 120 rpm.

Kalorimetrimätningar för komplexen genomfördes med ITC200 isothermal titration calorimeter (Microcal) med mjukvaran Origin 7.0. Sprutan (40 μL) laddades med 659 μM Λ – **(III)** respektive 664 μM Δ – **(III)** i enskilda test som sedan titrerades ner i en cell (206 μL) med AT-DNA (413 μM bp). För att undvika värmeutveckling på grund av skillnader i saltkoncentration genomfördes en dialys med endast DNA och buffert.

Emissionsspektra för vardera enantiomer uppmättes med en Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer. Inställningar för maskinen: excitationsvåglängd: 440 nm, emissionsvåglängd: 500-800 nm, spaltbredd för excitation: 20 nm samt spaltbredd för emission: 10 nm. Kyvettens dimensioner var 1x0,5 cm: 1 cm för excitation samt 0,5 cm för emission. Endast komplex (30 μM) och buffert användes i en första mätning för att undersöka om det emitterar ljus. Ration [komplex]:[baspar] som användes vid den första DNA-komplex-mätningen var 1:0,1. DNA (240 μM bp) tillsattes i små mängder till komplexet (30 μM) och mätdata registrerades kontinuerligt tills samtliga komplex hade bundit in till DNA.

6 | Resultat

Spektrat från CD-analysen för enantiomererna av **(III)** ses i Figur 8. Som väntat har Δ -enantiomeren en graf som är en spegelbild av Λ . Distinkta absorptionsband syns tydligt kring 257, 268, 300, 420 samt 470 nm.

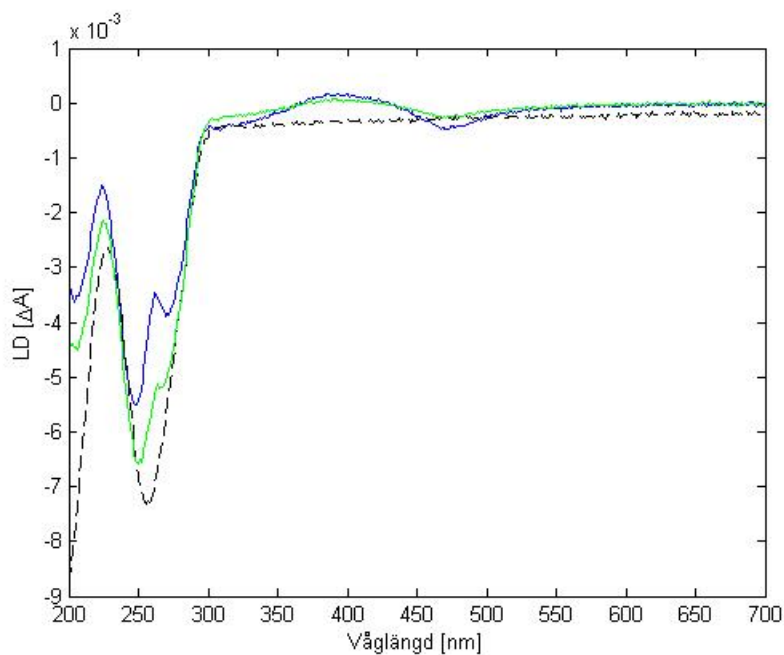


Figur 8: Cirkulär dikroism för Δ (---) och Λ (—) av komplexet **(III)** ($6 \mu\text{M}$).

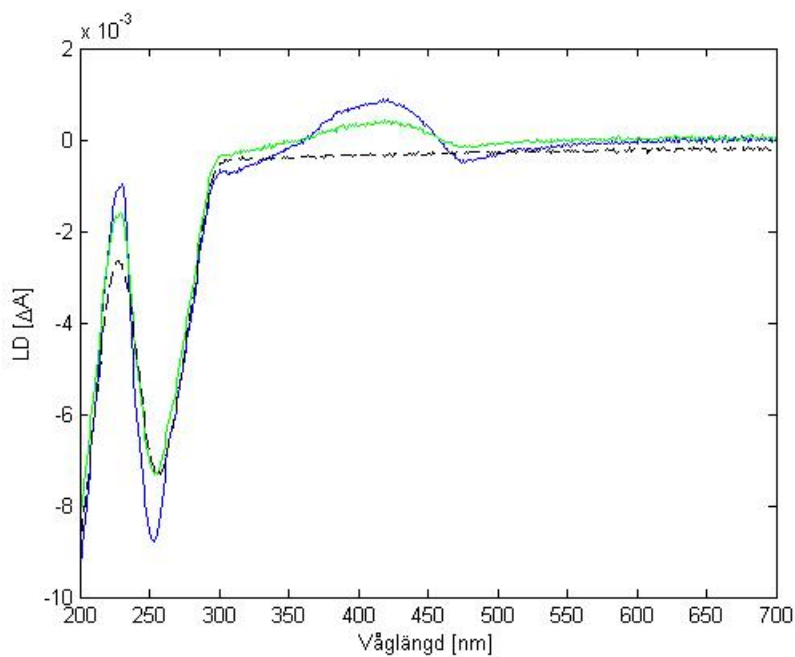
I analyser med LD finns det starka signaler för alla prover mellan 250-300 nm. Signalen blir relativt stabil från 300 nm och uppåt.

LD-spektrat för Δ -**(III)** visas i Figur 9 där ett starkt negativt band ses vid 250 nm. Ett band som blir starkare med en högre koncentration av komplexen uppkommer vid 262 nm för att sedan ge ett negativt band vid 270 nm. Båda koncentrationer ger en marginellt positiv signal mellan 367 och 425 nm samt att ett negativt band uppkommer vid 475 nm.

LD-spektrat för Λ -**(III)** visas i Figur 10. Till skillnad från Δ finns endast ett negativt band mellan 250 och 300 nm. Signalen för komplexen är positiva mellan 360 och 460 nm och ett negativt band uppkommer vid 475 nm.



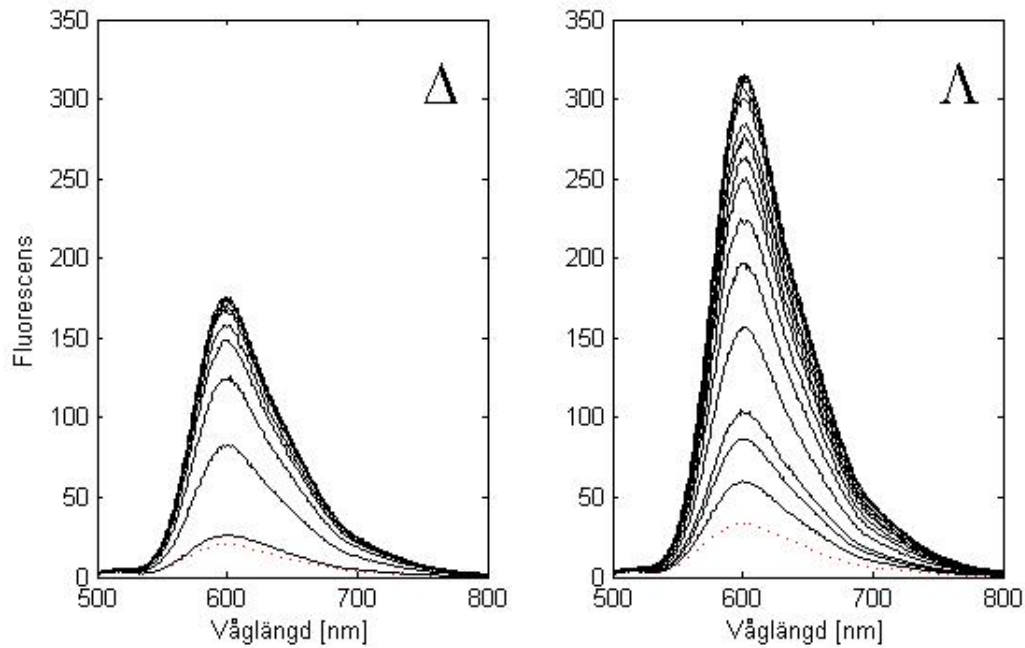
Figur 9: Linjär dikroism för Δ . Koncentrationer för Δ -(III) är $60 \mu\text{M}$ (blå) och $30 \mu\text{M}$ (grön) med $240 \mu\text{M}$ bp ctDNA. Den streckade linjen är ctDNA utan Δ -(III).



Figur 10: Linjär dikroism för Λ . Koncentrationerna av Λ -(III) är $60 \mu\text{M}$ (blå) och $30 \mu\text{M}$ (grön) med $240 \mu\text{M}$ bp ctDNA. Den streckade linjen är ctDNA utan Λ -(III).

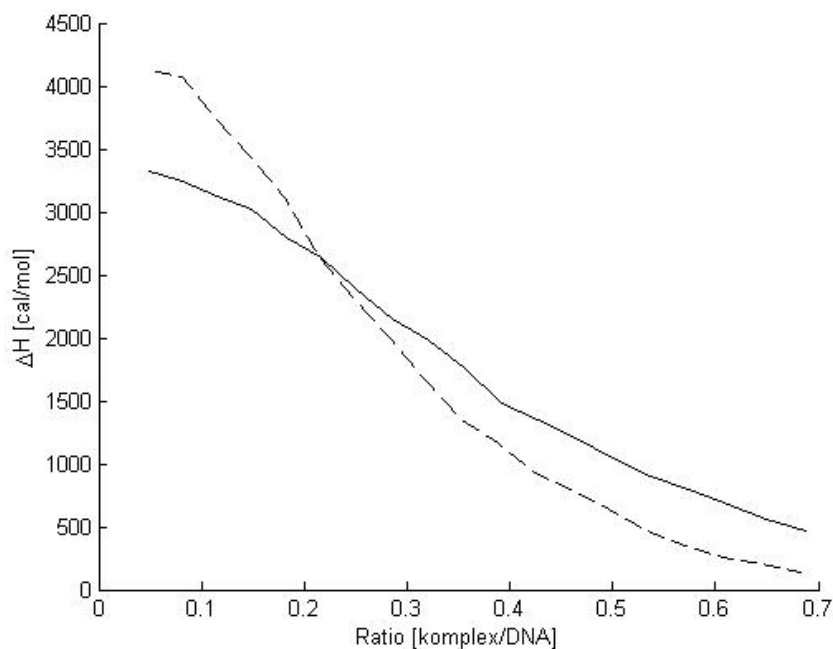
6 Resultat

Fluorescensanalys av Δ -(III) och Λ -(III) ses i Figur 11. Intensiteten för komplexens fluorescens ökar vid högre koncentration av DNA. Maximal intensitet nås vid 600 nm och signalen för Λ -(III) är betydligt starkare än för Δ -(III). Komplexens startkoncentrationer var $8 \mu\text{M}$ och uppnådde slutkoncentrationer på $5 \mu\text{M}$ för både Λ och Δ . Kurvorna ligger tätare vid högre förhållande $[\text{DNA-bp}]:[\text{komplex}]$ för att sedan konvergera då allt komplex har bundit till DNA. Detta uppstod då ctDNA nådde en koncentration av $34 \mu\text{M}$ bp för Λ och $36 \mu\text{M}$ bp för Δ . Slutgiltigt förhållande, $[\text{DNA-bp}]/[\text{komplex}]$, för Λ blev 6,8 respektive 7,2 för Δ .



Figur 11: Emissionsspektra av (III), Δ (till vänster) och Λ (till höger). Excitationsvåglängd: 440 nm samt emissionsband vid 600 nm. Streckade linjer visar emissionen för komplexen i buffert, heldragna linjer visar emissionen för komplex med stigande ctDNA-koncentration.

ITC-analyser visas i Figur 12. Då inbindningen sker endotermt uppmäts en positiv entalpi, ΔH , då det är den energi som tillförs lösningen. Komplex tillsattes dropvis till DNA och den frigjorda värmen uppmättes. För att utesluta påverkan av utspädningsvärmnet är denna uppmätt för sig och avdragen från resultatet.



Figur 12: ITC-mätningar för Δ (---) och Λ (—).

Fyra olika försök att syntetisera "Supermolekylen" beskrivs i Tabell 6.1. Inget av experimenten lyckades då absorbansspektrum visade på att ingen ftalocyanin fanns i produkten.

Tabell 6.1: Tabell över undersökta ftalocyanin-synteser.

Komplex	Metall	Mängd (Komplex:Metall)	Lösningsmedel	Genomförande	Referens
Λ - (III)Cl ₂	Zn(Ac) ₂ · 2(H ₂ O)	(12 μ mol:15 μ mol)	300 μ l 1-hexanol 134 μ l DBU ^a	Värmdes i xylene-bad (140°C) i 5 timmar	[23]
Λ - (III)Cl ₂	ZnCl ₂	(12 μ mol:9 μ mol)	40 μ l DMAE ^b med spår av DBU.	Värmdes på värmeplatta i 2 timmar.	[24]
Δ - (III)Cl ₂	ZnCl ₂	(28 μ mol:18 μ mol)	280 μ l DMAE med spår av DBU	Värmdes på värmeplatta i 3 timmar.	[24]
Λ - (III)Cl ₂	CuCl ₂	(35 μ mol:8 μ mol)	3 droppar DMF ^c	10 minuter i mikrovågsugn med effekt 600W	[25]

^a 1,8-Diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en

^b Dimetylaminoetanol

^c Dimetylformamid

7 | Diskussion

Resultat från absorptionsmätningar samt $^1\text{H-NMR}$ -spektrat visar att rätt komplex har erhållits (se Bilaga A). Detta konstaterades genom jämförelse med tidigare studie av Ambroise & Maya (2000) [12]. Vidare verifierar CD-spektrat att separationen av de två enantiomererna varit fullständig och fortsatta analyser har gjorts med komplexets rena former.

Vår studie har varit konsekvent inriktad på att använda rutenium som basmetall. Valet baseras på att det idag finns ett behov av att komplettera de cancerläkemedel som använder sig av platina. Dessa komplex finns redan som kommersiella produkter, men begränsas av problem som resistens, att möjliga dosmängder begränsas av biverkningar samt att ämnet är toxiskt [6, 26]. En annan metall än platina skulle kunna innebära andra koordinationsställen, fler varianter på oxidationstal och större möjlighet till variation av ligander. Rutenium ses som ett alternativ beroende på flera faktorer, exempelvis komplexstabilitet och dess fotokemiska förändringar beroende på omgivningen. En annan fördel är att rutenium har många likheter med järn då de tillhör samma grupp i periodiska systemet. Det finns således förhoppningar att kunna ersätta rutenium med järn i framtiden. Detta med anledning av att järn är ett kroppseget ämne samt att tillgängligheten av järn är större än för rutenium.

7.1 Interkalerade $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$?

$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ uppvisar fluorescens endast då dicnq-liganden befinner sig i vattenfri miljö [12]. Under fluorescensmätningar kunde detta endast ske genom att bilda en bindning med de hydrofoba delarna hos DNA. I Figur 11 framgår det att när en ökad mängd DNA finns tillgängligt lämnar komplexet vattenlösningen och hamnar fri från vatten tillsammans med DNA, vilket leder till en ökad fluorescens.

Inbindning kan ske på fler sätt än via interkalering. För det undersökta komplexet skulle ett sätt kunna vara en annan slags icke-kovalent bindning, då molekylens istället lägger sig i fåran. Detta undersöktes av Satyanarayana et al (1992) i en studie av den strukturellt liknande molekylens $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Att binda till DNA genom en icke-kovalent bindning gör dock inte komplexet helt skyddat från den yttre vattenmiljön. Detta skulle ge väldigt små skillnader i fluorescensspektrat vid tillsats av DNA. Vidare undersöker Satyanarayana et al (1992) hur $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ kan binda till DNA och kom fram till att en fenantrolingrupp inte kan interkalera i DNA [5]. Deras resultat talar ytterligare för att det är dicnq-liganden i vårt komplex som interkalerar och inte de två fenantrolinliganderna.

Ambroise & Maya (2000) undersöker tre ruteniumkomplex: $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$, $[\text{Ru}(\text{phen})(\text{dicnq})_2]^{2+}$ och $[\text{Ru}(\text{dicnq})_3]^{2+}$. Deras fluorescensresultat visar att de komplex med flera dicnq-ligander har lägre emissionsintensitet än $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$. Enligt denna studie tyder detta på att då en dicnq-ligand har interkalerat kommer resterande dicnq-ligander att utsläckas av vattenmolekyler. Vidare motiverar det att $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ är den optimala komplexkonfigurationen utav dessa tre vid analys av interaktion med DNA [12]. Dessa resultat och slutsatser stämmer väl överens med de i vår studie.

7.1.1 Fanns det skillnader mellan de två enantiomererna?

Resultat från fluorescensanalysen visar att Λ ger en mycket högre emission än Δ . Detta kan tyda på att Λ interkalerar bättre då den har en bättre passform i fåran. På så sätt blir Λ -enantiomeren mer skyddad från vattenmolekyler, som utsläcker fluorescens [27]. Liknande molekyler, exempelvis med liganden dppz som ses i Figur 13, uppvisar motsatta egenskaper. Då är det istället Δ som tenderar att ha högre emission än Λ [28].

Vid mätningar med LD erhålls vinkeln i förhållande till DNA-polymeren. Båda enantiomerer har negativa absorptionsband i motsvarande spektra. Detta tyder på att den del av molekylen som absorberar vid dessa våglängder har en rätvinklig position i förhållande till riktningen av DNA-helixen. Absorbans hos $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ finns i området 250-300 nm, där det i LD-mätningar återfinns ett negativt absorptionsband som kan ses både i Figur 9 och Figur 10. Det är därför troligt att $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ ligger vinkelrätt mot DNA-strängarna. Vid en närmare tolkning av LD-spektrat för Δ ses en extra topp vid 260 nm. Det beror antagligen på att sidogrupperna med fenantrolin påverkar vinkeln för hur dicnq kan lägga sig mellan basparen. Λ har inte detta bandet vilket kan bero på att fenantrolin-grupperna är vrida på ett annat sätt.

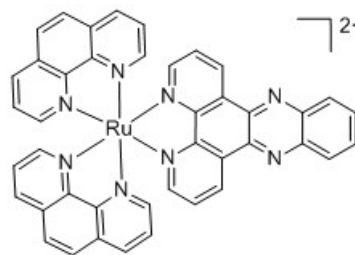
ITC-analyser visar den energi som uppmätts i kalorimetern när utspädningsvärmerna är borttagen. ITC-mätningarna visar att Δ verkar ha en högre mättningshastighet då dess graf har en skarpare lutning, se Figur 12. Om liganden dppz, som visas i Figur 13, används istället för dicnq uppstår en kurva som till en början är endoterm. Vid mätning av DNA-helixen med en större mängd komplex övergår reaktionen till att vara exoterm. Våra resultat saknar denna klassiska exoterma bindningsentalpi som dppz-komplexet uppvisar [28]. För att kunna dra slutsatser om vad detta beror på bör fler försök utföras, främst med lägre salthalter och olika referenstemperaturer.

Vid jämförelse av ITC-resultat och fluorescensanalys ses skillnader för hur Δ och Λ interkalerar med DNA. Då Λ har en starkare fluorescens tyder det på att Λ har en bättre bindningsaffinitet. Däremot visar ITC-analysen att de platser som Δ kan binda in till fylls fortare, då lutningen i grafen för Δ är skarpare. Vi tror detta tyder på att Δ binder in snabbare medan Λ binder in långsammare fast med högre bindningsaffinitet.

7.2 Försök med ftalocyanin

Ett flertal experiment för att syntetisera en ftalocyanin genomfördes med metoder som varit lyckade i tidigare studier [23, 24, 25]. Liganderna i dessa studier har varit mycket mindre till storlek än komplexet $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$. Det krävs fyra stycken komplex där cyanogrupperna på dicnq-liganden bildar ftalocyaninen. Vissa svårigheter uppstår troligen då samtliga ska binda in till samma metalljon. Storleken på komplexet tror vi orsakar steriska hinder som därav försvårar syntesen. En annan faktor som skiljer dicnq-liganden från de molekyler som vanligen används för dessa synteser är pyrazingruppen med de två extra kväveatomerna bredvid cyanogrupperna. Det är oklart om detta på något sätt påverkade denna syntes.

Ytterligare en faktor som vi tror har påverkat syntesförsöken är komplexets laddning. Därmed kommer repellerande krafter att uppstå mellan komplexen då de försöker binda till metalljonen. Då även metalljonen (Zn^{2+} , Cu^{2+}) har en positiv laddning försvåras syntesen ytterligare.



Figur 13: Struktur för $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dppz}]^{2+}$ där dppz är en förkortning för dipyrrodo[3,2-a:2',3'-c]fenazin.

De recept som vi försökte efterlikna hade små mängder av de reagens som skulle bilda ftalocyaninen [23, 24, 25]. Dessa mängder räckte för en lyckad syntes i försöken som utfördes i artiklarna, dock fungerade det ej i vårt fall. En högre koncentration av reagens, en högre temperatur samt ett högre tryck under syntesen skulle kunna vara faktorer som kan bidra till en lyckad syntes. Tillgänglig mängd av $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicyq}]^{2+}$ försvårade möjligheten att få rätt förhållande mellan reagensen.

Om fortsatta studier skall utföras på liknande ruteniumkomplex tror vi att en något mindre laddad metalljon eller komplex kan vara fördelaktigt. En mindre positiv ftalocyanin kan dock ha svårare att interagera med DNA som är negativt laddat. Detta faktum gör också ftalocyaninen svårslöslig i vatten vilket försvårar dess användning som läkemedel i kroppen.

7.3 Experimentell del

Vid framställning av de komplex som undersökts var utbyten ofta låga (exempel 26% och 30% för enantiomererna av $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicyq}]^{2+}$). Detta beror på att vi har valt att prioritera en hög renhet och inte försökt optimera utbyten. Därmed har extra sköljningar gjorts som har minskat utbytet. Denna förlust försökte dock motverkas vid ett flertal tillfällen genom att rullindusta filtratet.

I syntesförsöken av ftalocyanin fick syntesen anpassas efter tillgängliga kemikalier. Vi hade inte tillgång till vattenfria kemikalier som ursprungligen användes i några av recepten. En komplikation som uppstod var det framställda ruteniumkomplexets statiska karaktär, vilket gjorde det svårhanterligt.

8 | Slutsats

Projektet har fått fram ny intressant fakta inför framtida forskning kring $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$. En framgångsrik syntes av komplexet samt en lyckad separation av enantiomererna genomfördes och kunde styrkas med analyserna avsedda för detta. Övriga analyser har därmed genomförts med rena enantiomerer. Ett spännande resultat är att vid interaktionen med DNA fås olika spektra och entalpikurvor för vardera enantiomerer.

Fluorescens- samt LD-resultatet stödjer att det är dicnq-liganden och inte fenantrolinliganderna som interkalerar mellan basparen. Vidare indikerar fluorescensanalysen att fler Λ - än Δ -enheter kan binda till DNA. I tidigare studier av liknande föreningar har det varit tvärtom, vilket gör vårt resultat anmärkningsvärt. Resultatet från ITC-analysen visar att Δ binder in förare än Λ , men ytterligare kinetikstudier bör genomföras. Det skulle vara spännande att vidare undersöka om enantiomerernas olika inbindningssätt till DNA påverkas av temperaturförändringar och salthalter. Alla resultat tyder på att framtida forskning av komplexet bör göras med separerade enantiomerer.

Det har inte fungerat att syntetisera en ftalocyanin med fyra stycken av vårt ruteniumkomplex som subenheter med de syntesvägar som vi har testat. Komplexets storlek och laddning kan vara två orsaker till detta. Fortsatta försök skulle exempelvis kunna utföras med större mängder, mindre laddade ruteniumkomplex eller andra typer av syntesvägar som är mer anpassade för större molekyler.

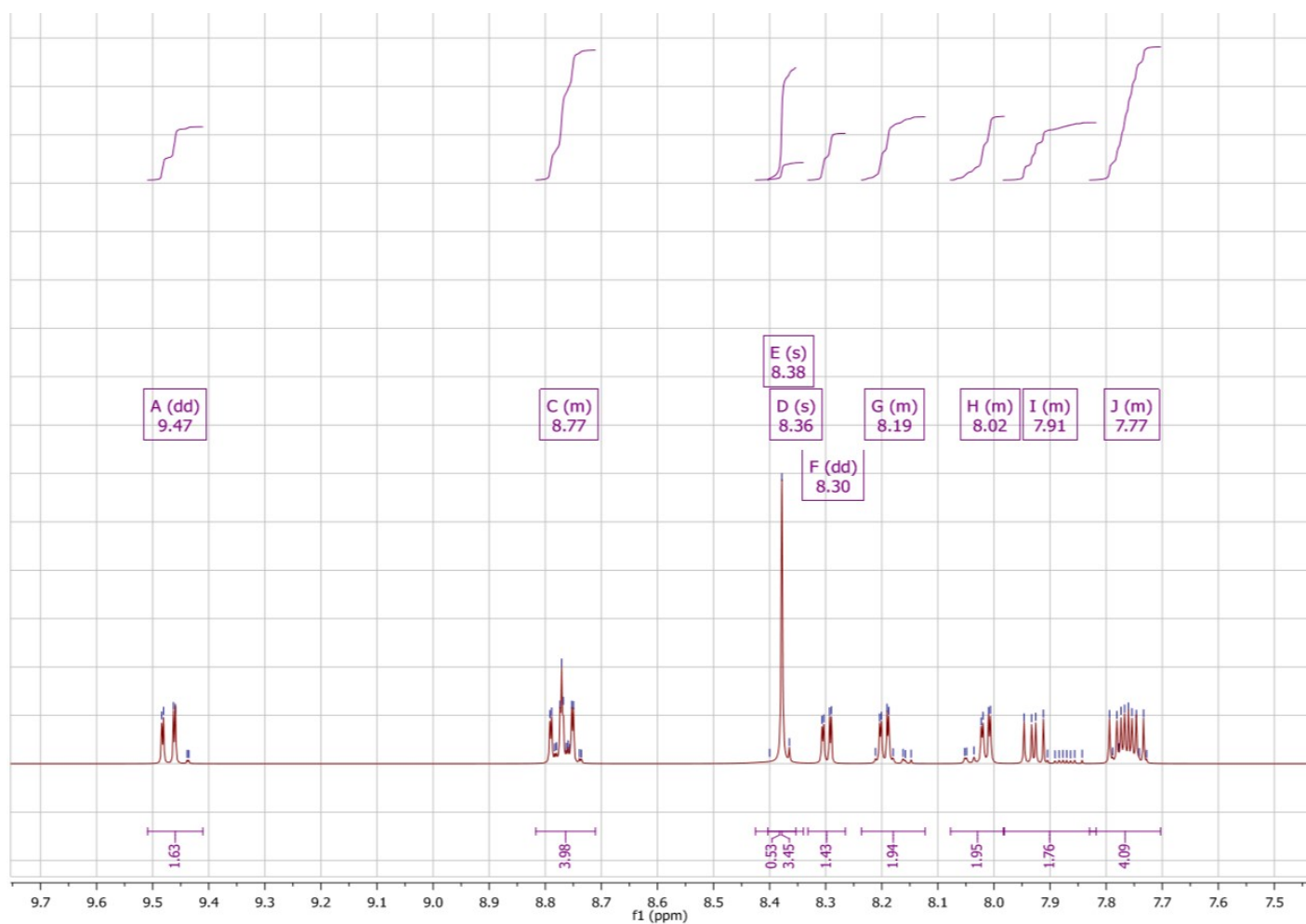
För att kunna använda $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{dicnq}]^{2+}$ eller liknande komplex som läkemedel kommer det att krävas mycket mer omfattande undersökningar. De resultat som erhållits i denna studie motiverar till mer forskning inom detta område.

Litteraturförteckning

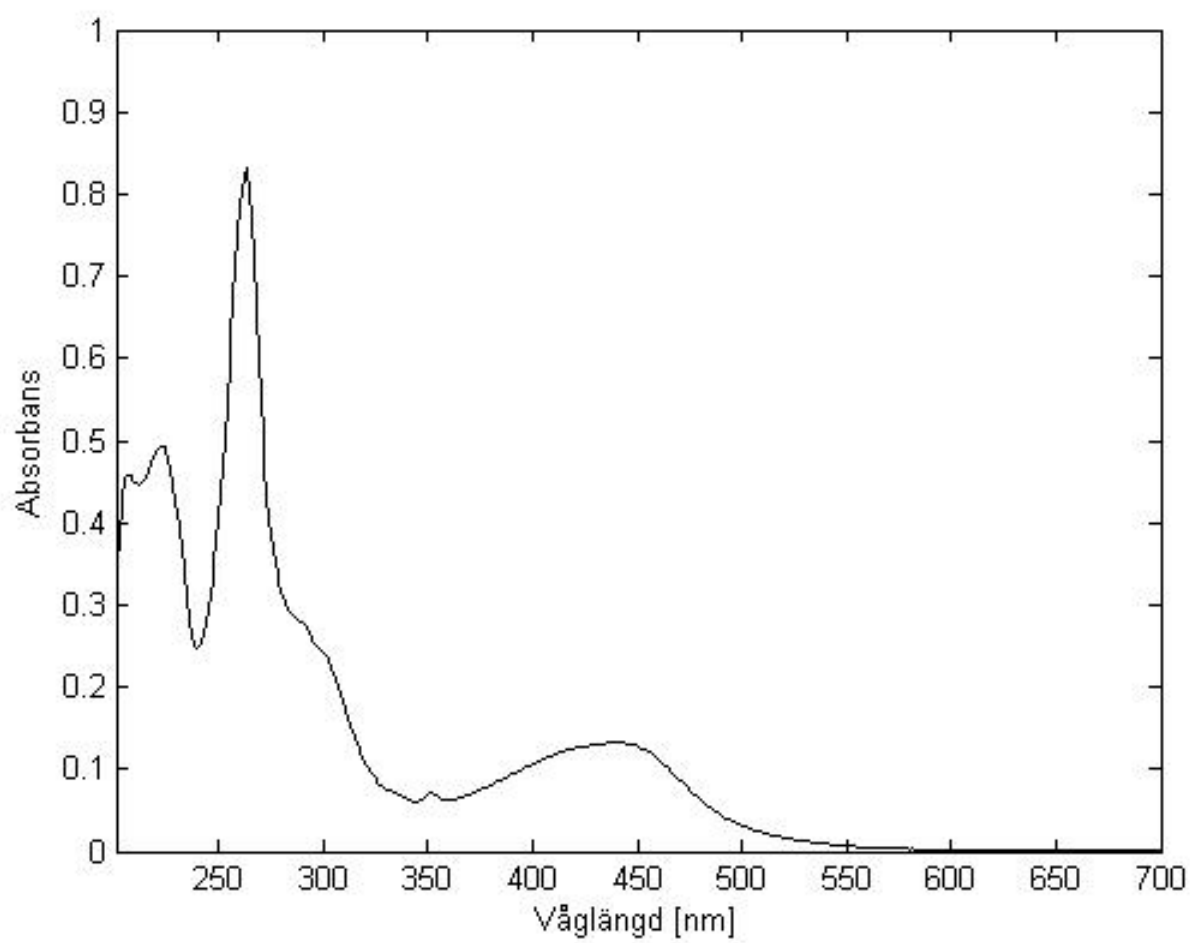
- [1] NobelMediaAB. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962;[Internet; hämtad 19-May-2015]. Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1962/index.html.
- [2] Winters T. Gene targeted agents: new opportunities for rational drug development. *Current opinion in molecular therapeutics*. 2000;2(6):670–681.
- [3] Latchman DS. How can we use our growing understanding of gene transcription to discover effective new medicines? *Current opinion in biotechnology*. 1997;8(6):713–717.
- [4] Sinden RR. *DNA structure and function*. Elsevier; 2012.
- [5] Satyanarayana S, Dabrowiak JC, Chaires JB. Neither DELTA- nor LAMBDA-tris (phenanthroline) ruthenium (II) binds to DNA by classical intercalation. *Biochemistry*. 1992;31(39):9319–9324.
- [6] Richards AD, Rodger A. Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure. *Chemical Society Reviews*. 2007;36(3):471–483.
- [7] Nordell P, Westerlund F, Wilhelmsson LM, Nordén B, Lincoln P. Kinetic Recognition of AT-Rich DNA by Ruthenium Complexes. *Angewandte Chemie*. 2007;119(13):2253–2256.
- [8] Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, et al. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science*. 2001;292(5522):1728–1731.
- [9] Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer’s disease. *Human molecular genetics*. 2010;p. 160.
- [10] Litten W. The most poisonous mushrooms. *Scientific American*. 1975;232(3):90.
- [11] Eichhorn GL, Shin YA. Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity. *Journal of the American Chemical Society*. 1968;90(26):7323–7328.
- [12] Ambrose A, Maiya BG. Ruthenium (II) complexes of 6, 7-dicyanodipyridoquinoxaline: synthesis, luminescence studies, and DNA interaction. *Inorganic chemistry*. 2000;39(19):4264–4272.
- [13] Andersson J. *Structural Requirements for Selective DNA Binding-Studies on Mono-and Binuclear Ruthenium Complexes*. Chalmers University of Technology; 2012.
- [14] Barton JK, Goldberg JM, Kumar CV, Turro NJ. Binding modes and base specificity of tris (phenanthroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity. *Journal of the American Chemical Society*. 1986;108(8):2081–2088.
- [15] Spikes JD. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochemistry and photobiology*. 1986;43(6):691–699.

-
- [16] Tarstedt M, Wennberg AM. Fotodynamisk terapi ger nya behandlings-möjligheter vid ytlig hudtumör. 2007;.
- [17] Radojević VN Miroslav Bashkin. Practical Environmental Analysis. 2nd ed. Royal Society of Chemistry; 2006.
- [18] Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P. Organic Chemistry. Oxford University Press; 2001.
- [19] Rodger A, Nordén B. Circular Dichroism & Linear Dichroism. Oxford University Press; 1997.
- [20] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. Garland Science; 1997.
- [21] Giordano PJ, Bock CR, Wrighton MS. Excited state proton transfer of ruthenium (II) complexes of 4, 7-dihydroxy-1, 10-phenanthroline. Increased acidity in the excited state. Journal of the American Chemical Society. 1978;100(22):6960–6965.
- [22] Hiort C, Lincoln P, Norden B. DNA binding of DELTA.-and LAMBDA.-[Ru (phen) 2DPPZ] 2+. Journal of the American Chemical Society. 1993;115(9):3448–3454.
- [23] Yan X, Fan H, Gu H, Zhang J, Huang X, Zhang R, et al. Synthesis of an octathienyl-fused phthalocyanine as a donor material for organic solar cells. Dyes and Pigments. 2015;114(0):124 – 128.
- [24] Pinar S, Yildiz SZ, Murat T, Mevlude C. Preparation of aldehyde substituted phthalocyanines with improved yield and their use for Schiff base metal complex formation. Journal of Organometallic Chemistry. 2014;769(0):38 – 45.
- [25] Burczyk A, Loupy A, Bogdal D, Petit A. Improvement in the synthesis of metallophthalocyanines using microwave irradiation. Tetrahedron. 2005;61(1):179 – 188.
- [26] Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review). Oncology reports. 2003;10(6):1663–1682.
- [27] Barton JK, Danishefsky A, Goldberg J. Tris(phenanthroline)ruthenium(II): stereoselectivity in binding to DNA. Journal of the American Chemical Society. 1984;106(7):2172–2176.
- [28] Andersson J, Fornander L, Abrahamsson M, Tuite E, Nordell P, Lincoln P. Ligand-Ligand Interactions in DNA Binding - a Calorimetric Study of Ru-dppz Enantiomers; 2012. [Manuscript].

Bilaga A



Figur 8.1: ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) 9.47 (2H, dd, Ar), 8.77 (4H, m, Ar), 8.38 (1H, s, Ar), 8.36 (3H, s, Ar), 8.30 (2H, dd, Ar), 8.19 (2H, m, Ar), 8.02 (2H, m, Ar), 7.91 (2H, m, Ar), 7.77 (4H, m, Ar). Komplexet mättes som ett löst PF_6 -salt.



Figur 8.2: Absorbansspektra för (III) ($7,5\mu M$).