



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ

**Διδακτορική Διατριβή**

Κρυσταλλογραφική μελέτη βιοδραστικών συμπλόκων  
του Ρουθηνίου με μοντέλα πρωτεϊνών

**Λυκούργος Δ. Χηνιάδης**

Επιβλέπων Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθανάσιος Παπακυριακού, Κύριος Ερευνητής ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

**ΑΘΗΝΑ 2021**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΚΗΣ

**Διδακτορική Διατριβή**

Κρυσταλλογραφική μελέτη βιοδραστικών συμπλόκων  
του Ρουθηνίου με μοντέλα πρωτεϊνών

Crystallographic study of bioactive Ruthenium complexes with model proteins

**Λυκούργος Δ. Χηνιάδης**

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Κωνσταντίνος Μπεθάνης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α (Επιβλέπων)

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής Γ.Π.Α. (μέλος Τ.Σ.Ε.)

Αθανάσιος Παπακυριακού, Κύριος Ερευνητής, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος (μέλος Τ.Σ.Ε.)

Πέτρος Γκιάστας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κωνσταντίνος Μεθενίτης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Ευστράτιος Στρατικός, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Εμμανουήλ-Ελευθέριος Σαρειδάκης, Κύριος Ερευνητής, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ενώσεις συναρμογής του Ru ελκύουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως εναλλακτικά αντικαρκινικά μεταλλοφάρμακα καθώς εμφανίζουν χαμηλότερη τοξικότητα και υψηλότερη εκλεκτικότητα έναντι συγκεκριμένων καρκινικών σειρών σε σχέση με τις ευρέως χρησιμοποιούμενες ενώσεις συναρμογής του Pt. Προηγούμενες μελέτες, εστιασμένες στη σύνθεση και βιολογική αξιολόγηση μεταλλοφαρμάκων Ru, έχουν αποδώσει τις ευνοϊκές ιδιότητες τους και το φαρμακολογικό τους προφίλ κυρίως στις αλληλεπιδράσεις τους με πρωτεΐνες καθώς το DNA δεν αποτελεί τον βασικό στόχο τους. Ως εκ τούτου, η διερεύνηση ερωτημάτων σχετικά με τον τρόπο πρόσδεσης, τις αλληλεπιδράσεις και την εκλεκτικότητα τους σε πρωτεϊνικές περιοχές πρόσδεσης αποτελούν κλειδιά για τη κατανόηση της δράσης τους ανοίγοντας νέους δρόμους στον σχεδιασμό ενώσεων συναρμογής του Ru με βέλτιστες φαρμακολογικές ιδιότητες.

Στην παρούσα διατριβή τα ερωτήματα αυτά διερευνήθηκαν με δομική μελέτη, μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, συμπλόκων μεταξύ ενώσεων συναρμογής Ru(II)/Ru(III) και πρωτεϊνικών στόχων. Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ενώσεις συναρμογής: Η Ένωση Συναρμογής-1 (ΕΣ-1) [RuII(1,4,7-trithiacyclononane) (ethane-1,2-diamine)Cl]<sup>+</sup>, η οποία αποτελεί ένωση συναρμογής τύπου «half-sandwich» του Ru(II) και η Ένωση Συναρμογής-2 (ΕΣ-2) [ImidazoleH]trans-[RuCl<sub>4</sub>(dmsο-S)(imidazole)], η ευρέως γνωστή ως NAMI-A ένωση συναρμογής του Ru(III), πολλά υποσχόμενο μεταλλοφάρμακο του Ru που έχει περάσει ήδη στις Φάσεις I/II κλινικών δοκιμών.

Ως πρωτεϊνικοί στόχοι για την ΕΣ-1 επιλέχθηκαν δύο ένζυμα: η Λυσοζύμη (hen egg-white lysozyme, HEWL), η οποία αποτελεί σύνηθες μοντέλο για τη διερεύνηση της πρόσδεσης μεταλλοφαρμάκων σε αυτήν, και η πρωτεΐνωση Κ (PK), η οποία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως μοντέλο πρωτεΐνης σε μελέτες μετάλλωσης, αναδεικνύοντας έναν πολύ καλό οδηγό για παρόμοιες έρευνες. Για την ΕΣ-2, η μελέτη έγινε με στόχο αποκλειστικά τη λυσοζύμη. Ο προσδιορισμός των κρυσταλλικών δομών επετεύχθη σε υψηλή (ατομική) διακρίσιμότητα και από την ανάλυσή τους προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα και συμπεράσματα.

Η ΕΣ-1 (RuTE) συναρμόζεται μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού με τα εκτεθειμένα στο διαλύτη αμινοξικά κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος των ενζύμων-στόχων (Asp101 στην HEWL, Asp200 και Asp260 στην PK), έπειτα από απελευθέρωση του χλωρίου υποκαταστάτη ενώ παραμένουν οι δύο

χηλικοί υποκαταστάτες της ένωσης. Οι κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές παρουσιάζουν για πρώτη φορά την πρόσδεση σε πρωτεΐνη μίας ένωσης τύπου «half sandwich» του Ru(II) με τη σφαίρα συναρμογής της σχεδόν ακέραια. Από τη δομική ανάλυση προκύπτουν σημαντικά συμπεράσματα για τις περιοχές και τον τρόπο πρόσδεσης του RuTE σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών και για τον ρόλο των υποκαταστατών του Ru(II) τόσο στην εκλεκτικότητα του RuTE σε σχέση με το ηλεκτροστατικό δυναμικό των ενζύμων-στόχων όσο και στην σταθεροποίηση των συμπλόκων μέσω δεσμών υδρογόνου, υδροφοβικών και αρωματικών αλληλεπιδράσεων.

Η ΕΣ-2 (NAMI-A) μελετήθηκε στο σύμπλοκό της με λυσοζύμη, μέσω της ανάλυσης 4 δομών που προσδιορίστηκαν από κρυστάλλους λυσοζύμης εμβαπτισμένους σε NAMI-A για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και συγκεκριμένα για 1.5, 8.0, 26 και 98 ώρες αντίδρασης. Οι 3 πρώτες δομές αποκαλύπτουν για πρώτη φορά την αρχική, μη ομοιοπολική, αλληλεπίδραση ακέραιου NAMI-A με τη λυσοζύμη, ακολουθούμενη από μία σταδιακή ανταλλαγή όλων των υποκαταστατών του Ru εκτός του ιμιδαζολίου μέχρι τις 26 ώρες. Στα σύμπλοκα αυτά, εμφανίζονται 3 θέσεις πρόσδεσης του NAMI-A στη HEWL, με το ιμιδαζόλιο να καθορίζει τη σταθεροποίησή τους. Στην τελική ένωση προσθήκης του Ru στις 98 ώρες, ένα ιόν Ru βρίσκεται συναρμοσμένο στην ιστιδίνη-15 της λυσοζύμης. Η δομή του συμπλόκου στις 98 ώρες βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες όμοιες κρυσταλλογραφικές μελέτες. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν έναν μηχανισμό δύο βημάτων στην πρωτεϊνική ρουθηνίωση και φανερώνουν τον ρόλο των υποκαταστατών στο βήμα της αναγνώρισης κατά τη διαδικασία αυτή.

**Επιστημονική περιοχή:** Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ σε πρωτεΐνες

**Λέξεις-κλειδιά:** Αντικαρκινικές ενώσεις του ρουθηνίου, Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, Λυσοζύμη (Hen Egg-White Lysozyme), Πρωτεϊνάση Κ, Πρωτεϊνική ρουθηνίωση, Θέση αναγνώρισης, Ανταλλαγή υποκαταστατών, Βιοενεργές ενώσεις, Μοντέλα πρωτεϊνών.

## Crystallographic study of bioactive Ruthenium complexes with model proteins

Department of Biotechnology  
Laboratory of Physics

### ABSTRACT

The Ru *coordination* compounds attract particular interest as alternative anticancer metallodrugs due to their lower toxicity and higher specificity against specific cancer lines compared to the widely used *coordination* compounds of Pt. Their pharmacological profile has been ascribed to their interactions with proteins, as several previous studies have provided evidence that DNA is not the primary target. In this regard, the investigation of their binding with target proteins, by a detailed structural analysis of the binding mode geometrical features and interactions which reveal the specificity for the protein binding sites, is crucial for the understanding of their action and the design of novel *coordination* compounds of Ru with optimal pharmacological properties.

In the present thesis, high-resolution X-ray crystal structures of complexes of Ru(II) and Ru(III) *coordination* compounds with protein targets are presented and extensively analyzed. The examined compounds were the “half sandwich”-type Ru(II) coordination compound  $[\text{Ru}^{\text{II}}(1,4,7\text{-trithiacyclononane})(\text{ethane-1,2-diamine})\text{Cl}]^+$  (RuTE) and the antimetastatic metallodrug imidazolium *trans*-[tetrachloride(*S*-dimethyl sufoxide) (1*H*-imidazole) ruthenate(III)] (NAMI-A, a widely known promising metallodrug of Ru(III) already in Phase I/II clinical trials). The protein targets were two enzymes: the Hen Egg White Lysozyme (HEWL) and the Proteinase K (PK). HEWL is an ordinary model system of protein metalation studies and it was used as a target for both RuTE and NAMI-A, whereas PK was used here for the first time as such, forming a complex with RuTE.

The determination of high (atomic) resolution crystal structures by X-ray crystallography and their analysis revealed the following:

RuTE is coordinated by a covalent bond to the solvent exposed residues of Aspartic acid of the enzyme-targets (Asp101 in HEWL, Asp200 and Asp260 in PK), followed by a release of a chloride ligand while retaining the two chelating ligands of the compound. The crystal structures show for the first time the binding of a “half-sandwich” type compound of Ru(II) to a protein, that maintains its coordination sphere almost intact. From the structural analysis, several significant conclusions were derived considering the binding mode of RuTE with protein residues in specific binding sites and the stabilization of the complexes via hydrogen bonds, hydrophobic and aromatic interactions.

The complex formed between NAMI-A and HEWL was studied by analyzing a series of near atomic-resolution X-ray crystal structures determined by crystals obtained at four time points of soaking HEWL crystals with excess NAMI-A (1.5, 8.0, 26 and 98 h). These structures elucidate a series of binding events starting from the noncovalent interaction of intact NAMI-A ions with HEWL (1.5 h), followed by the stepwise exchange of all Ru ligands except for 1H-imidazole (26 h) to the final “ruthenated” protein comprising one aquated Ru ion coordinated to histidine-15 of HEWL (98 h). The structural data clearly support a two-step mechanism of protein ruthenation, illustrating the ligand-mediated recognition step of the process.

**Scientific area:** Protein Crystallography

**Keywords:** Ruthenium anticancer compounds, X-ray crystallography, Hen Egg-White Lysozyme, Proteinase K, Protein ruthenation, Protein recognition, Ligand exchange, Bioactive compounds, Protein models

## 1. Συντμήσεις–Ξενόγλωσσοι όροι

RuTE-Cl:  $[\text{Ru}^{\text{II}}([\text{9}]aneS_3)(en)Cl]^+$

HEWL: Λυσοζύμη (hen egg-white lysozyme)

PK: Πρωτεΐνάση K

RAPTA-C:  $[\text{Ru}^{\text{II}}(n^6\text{-}p\text{-cymene})Cl_2(1,3,5\text{-triaz-7-phosphadamantane})]$

RAED:  $[\text{Ru}^{\text{II}}(n^6\text{-arene})(en)X]^+$  (*en* = ethane-1,2-diamine, X = halide)

NCS: Μη κρυσταλλογραφική συμμετρία (Non-crystallographic symmetry)

NAMI-A:  $(\text{ImH})[trans\text{-RuCl}_4(\text{dmsO-S})(\text{Im})]$

Im: ιμιδαζόλιο

S-dmsO: διμεθυλοσουλφοξείδιο

HSA: Αλβουμίνη (human serum albumin)

hCAII: Καρβονική Ανυδράση του ανθρώπου (human carbonic anhydrase)

HuHf: ανθρώπινη φερριτίνη (human H-chain ferritin)

apoLf: Λακτοφερρίνη (apo-lactoferrin)

EDO: 1,2-αιθανοδιόλη

Περιεχόμενα	
1. Περίληψη .....	ii
Λέξεις-κλειδιά.....	iii
Abstract.....	ii
2. Συντμήσεις–Ξενόγλωσσοι όροι.....	iv
3. Ευχαριστίες .....	vii
Σκοπός της διατριβής .....	1
Κεφάλαιο 1.....	2
Μεταλλοφάρμακα του Ρουθηνίου.....	2
Βιοανόργανες ενώσεις του Ru(II) με φαρμακολογικό ενδιαφέρον .....	4
Βιοανόργανες ενώσεις του Ru(III) με φαρμακολογικό ενδιαφέρον .....	13
Κεφάλαιο 2.....	20
Κρυσταλλογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της δομής βιολογικών μακρομορίων .....	20
Μοριακή αντικατάσταση.....	20
Η επιλογή του μοντέλου .....	21
Ερμηνεία των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας.....	23
Η βελτιστοποίηση του μοντέλου .....	24
Βελτιστοποίηση στον αντίστροφο χώρο: Η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων.....	26
Κρυσταλλογραφική συνάρτηση-στόχος της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum-likelihood).....	28
Βελτιστοποίηση δομής στον ορθό χώρο: Σύνθεση διαφορικών Fourier .....	28
Εύρεση και προσδιορισμός εναλλακτικών διαμορφώσεων.....	30
Ανώμαλη σκέδαση ακτίνων-X.....	31
Διάγραμμα Ramachandran.....	33
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	34
Κεφάλαιο 3 .....	34
Η δομή της Λυσοζύμης (Hen Egg White Lysozyme-HEWL).....	34
με την ένωση συναρμογής.....	34
[Ru <sup>II</sup> ([9]aneS <sub>3</sub> )(en)Cl][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ] (RuTE-Cl) .....	34
3.1 Κρυστάλλωση .....	34
3.2 Επαλληλία δομών της HEWL .....	37
3.3 Διάγραμμα Ramachandran.....	39
3.4 Αποτελέσματα .....	39
3.5 Συζήτηση .....	41
Κεφάλαιο 4.....	46
Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της Πρωτεΐνης K.....	46
με την ένωση συναρμογής.....	46



[Ru <sup>II</sup> ([9]aneS <sub>3</sub> )(en)Cl][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ] (RuTE-Cl) .....	46
4.1 Εισαγωγή .....	46
4.2 Κρυστάλλωση, συλλογή δεδομένων και ανάλυση .....	47
4.3 Επαλληλία των δομών PK .....	49
4.4 Διάγραμμα Ramachandran.....	51
4.5 Αποτελέσματα .....	52
4.6 Συμπεράσματα για τη δομή PK-RuTE.....	57
4.7 Συμπεράσματα από τις δομές HEWL/RuTE και PK/RuTE.....	58
<b>Κεφάλαιο 5.....</b>	<b>60</b>
<b>Οι κρυσταλλικές δομές της Λυσοζύμης με το NAMI-A .....</b>	<b>60</b>
<b>(([ImH]trans-[RuCl<sub>4</sub>(dmsO-S)(Im)]); Im = ιμιδαζόλιο) .....</b>	<b>60</b>
<b>σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα.....</b>	<b>60</b>
5.1 Εισαγωγή .....	60
5.2 Κρυστάλλωση .....	63
5.3 Συλλογή δεδομένων-Ανάλυση .....	64
5.4 Αποτελέσματα .....	65
5.5 Επαλληλία των δομών .....	67
5.6 Διαγράμματα Ramachandran.....	69
5.7 Τα μη-ομοιοπολικά σύμπλοκα του NAMI-A με την Λυσοζύμη.....	71
5.8 Σταδιακή υδρόλυση των υποκαταστατών του NAMI-A .....	76
5.9 Ο μηχανισμός υδρόλυσης του NAMI-A σε υδατικό διάλυμα .....	80
<b>5.9 Κρυσταλλογραφικές πληροφορίες και ανάλυση των προσδεδωμένων NAMI-A στα</b>	
<b>σύμπλοκα 7BCU (1.5h), 7BCX (8h) και 7BD0 (26h).....</b>	<b>81</b>
5.10 Η ένωση προσθήκης (adduct) του NAMI-A με τη Λυσοζύμη .....	88
5.11 Η θέση ρουθηνίου .....	90
5.10 Συζήτηση .....	94
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>100</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α' .....</b>	<b>114</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β' .....</b>	<b>119</b>

## 2. Ευχαριστίες

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά ένα μέρος της στο Εργαστήριο Φυσικής στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Αθανάσιου Χούντα και του Επίκουρου Καθηγητή Κωνσταντίνου Μπεθάνη και κατά ένα μέρος στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» υπό την επίβλεψη του Κύριου Ερευνητή Δρ. Αθανάσιου Παπακυριακού. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω όλους.

Αρχικά τον Καθηγητή Αθανάσιο Χούντα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διδακτορική διατριβή ως υπότροφος στο Εργαστήριο Φυσικής, και για τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές του. Τον Δρ. Κωνσταντίνο Μπεθάνη για τις επιστημονικές συζητήσεις και για την καθοδήγησή του σε καίρια ζητήματα της παρούσας διατριβής. Τον Καθηγητή Ηλία Ηλιόπουλο για την αποδοχή και εγγραφή μου στο Τμήμα Βιοτεχνολογίας του ΓΠΑ και για τον καταλυτικό-καθοριστικό ρόλο του στην ολοκλήρωση της διδακτορικής διατριβής μου. Την Δρ. Αρετή Κοκκίνου, την Δρ. Φραντζέσκα Τσορτέκη, την Δρ. Αθηνά Ανδρέου για την πολύτιμη βοήθειά τους σε όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τον Δρ. Αθανάσιο Παπακυριακού για την καθοδήγησή του, τις εξαιρετικές και τις μοναδικές συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής και για την δυνατότητα που μου έδωσε να εργαστώ ως υπότροφος στο Εργαστήριο Βιομοριακού Σχεδιασμού στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών στο ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος». Ήταν μία εξαιρετική συνεργασία σε όλα τα επίπεδα και στάδια στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Δημήτρη και Κωνσταντινιά και τον αδερφό μου Φαίδων για την συμπαράστασή τους και την ενθάρρυνσή τους στην εκπόνηση της διατριβής. Η συμβολή τους ήταν καταλυτική στην συνέχιση και κυρίως στην ολοκλήρωση της. Τους ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Δρ. Πέτρο Γκιάστα για την συνεχή ενασχόλησή του και για την απεριόριστη βοήθειά του στα πειράματα και σε όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ερευνητή του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Δρ. Ιωάννη Μπράτσο για την συνεχή συνεργασία και την βοήθεια του σε όλα τα στάδια της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

## Σκοπός της διατριβής

Το πολύ μεγάλο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι ενώσεις συναρμογής του Ru ως πιθανοί, εναλλακτικοί των συμπλόκων Pt, αντικαρκινικοί παράγοντες, έχει οδηγήσει πλήθος ερευνητικών προσπαθειών για τη σύνθεση και τη βιολογική αξιολόγηση τους. Σχετικές βιοχημικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι η δράση των ενώσεων συναρμογής του Ru(II)/Ru(III) οφείλεται κυρίως στις αλληλεπιδράσεις τους με πρωτεΐνες καθώς το DNA δεν αποτελεί τον βασικό στόχο τους. Η παρούσα διατριβή επιχειρεί να εξετάσει λεπτομερώς τέτοιες αλληλεπιδράσεις και να απαντήσει σε κρίσιμα ερωτήματα που αφορούν στο μηχανισμό πρόσδεσης συμπλοκών Ru σε πρωτεϊνικές περιοχές και το ρόλο των υποκατάστατων του Ru στον τρόπο και την εκλεκτικότητα της πρόσδεσης. Για το σκοπό αυτό διενεργήθηκε δομική ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, συμπλόκων σε πρωτεϊνικούς στόχους των ενώσεων συναρμογής του Ru(II)  $[Ru^{II}(1,4,7\text{-trithiacyclononane})(\text{ethane-1,2-diamine})Cl]Cl$ , τύπου «half-sandwich» και του Ru(III)  $[ImidazoleH]trans-[RuCl_4(\text{dmsO-S})(\text{imidazole})]$ , ευρέως γνωστό ως NAMI-A, από τα λίγα μεταλλοφάρμακα του Ru που έχουν φτάσει σε κλινικές μελέτες.

Ως πρωτεϊνικοί στόχοι για την ένωση συναρμογής του Ru(II) (RuTE)) επιλέχθηκαν η λυσοζύμη (HEWL), η οποία αποτελεί σύνθετο μοντέλο για τη διερεύνηση της πρόσδεσης μεταλλοφαρμάκων σε αυτήν, και η πρωτεΐνη K, η οποία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως μοντέλο πρωτεΐνης σε μελέτες μετάλλωσης ανοίγοντας δρόμο για παρόμοιες έρευνες. Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων προσδιορίστηκαν με υψηλή (ατομική) ευκρίνεια και η ανάλυση τους προσφέρει πολύτιμα συμπεράσματα για τις περιοχές και τον τρόπο πρόσδεσης αυτού του συμπλόκου σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνών.

Επιπλέον, τέσσερα διαφορετικά «χρονικά στιγμιότυπα» (στις 1.5, 8.0, 26 και 98 ώρες αντίδρασης) ελήφθησαν για του συμπλόκου μεταξύ της ένωσης συναρμογής του Ru(III) (NAMI-A) και της λυσοζύμης. Οι υψηλής ανάλυσης κρυσταλλικές δομές που προσδιορίστηκαν, αποκαλύπτουν λεπτομερώς για πρώτη φορά τα βήματα της πρωτεϊνικής ρουθηνώσεως, το μηχανισμό υδρόλυσης του συμπλόκου και τον ρόλο των υποκατάστατων του Ru(III) κατά τη διαδικασία αυτή.

# Κεφάλαιο 1

## Μεταλλοφάρμακα του Ρουθηνίου

Είναι γνωστή η αποτελεσματικότητα διαφόρων ενώσεων συναρμογής μετάλλων για τη θεραπεία πληθώρας ανθρωπίνων ασθενειών <sup>1-3</sup>. Η ένωση συναρμογής του Pt(II), cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], που είναι γνωστή ως cis-platin είναι σήμερα ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος χημειοθεραπευτικός παράγοντας <sup>4</sup>. Αυτή η ένωση εμφανίζει σημαντική δραστηριότητα ενάντια σε πολλούς στερεούς όγκους, όπως στο λέμφωμα, στο μελάνωμα και στο νευροβλάστωμα<sup>5</sup>. Η κυτταροτοξικότητα αυτού του φαρμάκου και των φαρμάκων δεύτερης γενιάς, όπως είναι το carboplatin και το oxaliplatin, φαίνεται να οφείλεται στο σχηματισμό συμπλόκων με το DNA στο σημείο της διπλής έλικας που σχετίζεται με τη μεταγραφή, οδηγώντας σε κυτταρική απόπτωση. Ένας καθοριστικός ρόλος αυτής της διαδικασίας σχετίζεται με τη δημιουργία τμημάτων Pt που σχηματίζονται με την υδρόλυση <sup>6</sup>.

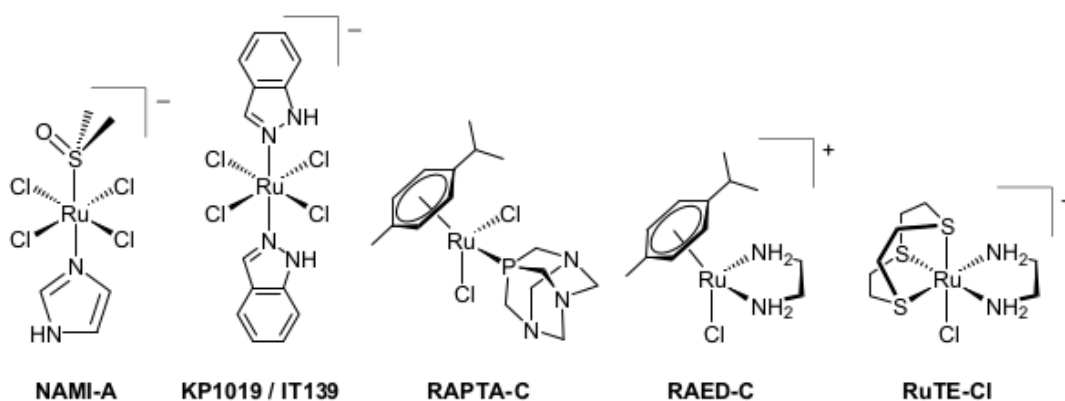
Επίσης, ιδιαίτερης σημασίας είναι το μικρό μέγεθος και η τετραγωνική γεωμετρία των τμημάτων Pt(II) τα οποία διακρίνονται για την χαμηλή διάκριση στα τμήματα σύνδεσης στο DNA, με τις σχηματιζόμενες ενώσεις προσθήκης που έχουν ως θέση μετάλλωσης τις βάσεις γουανίνης που είναι εκτεθειμένες στο διαλύτη (solvent accessible) <sup>7,8</sup>. Έτσι, αν και τα cisplatin, carboplatin και oxaliplatin, όπως και άλλα σύμπλοκα του Pt(II) που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια, έχουν σημαντική αντικαρκινική δράση, η χρήση τους υπόκειται σε περιορισμούς εξαιτίας της μεγάλης τοξικότητας και της αντοχής τους. Η επιτυχία των φαρμάκων που βασίζονται σε Pt από την μία μεριά και οι περιορισμοί τους από την άλλη οδήγησε στο σχεδιασμό, τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό νέων χημειοθεραπευτικών παραγόντων βασισμένων σε εναλλακτικά μεταλλικές ενώσεις συναρμογής, όπως αυτά των Au, Os, Ir και Ru<sup>9-12</sup>. Ανάμεσα στα μη-Pt κυτταροτοξικές ενώσεις συναρμογής που δοκιμάστηκαν ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, εκείνα που βασίζονται στο ρουθίνιο είναι ιδιαίτερα υποσχόμενες <sup>13</sup>, αφού:

- (1) Επιδεικνύουν παρόμοια διαδικασία ανταλλαγής υποκαταστατών με αυτές του Pt
- (2) Έχουν ένα μεταλλικό κέντρο που μπορεί να έχει διαφορετική κατάσταση οξειδωσης υπό φυσιολογικές συνθήκες (το Ru μπορεί να έχει οξειδωτικές καταστάσεις +2, +3 ακόμα και +4), ώστε να μπορούν να μετατραπούν σε Ru<sup>+2</sup> (ενεργό τμήμα) στο αναγωγικό περιβάλλον των κυττάρων όγκων.
- (3) Εμφανίζουν υψηλό βαθμό εκλεκτικότητας θέσης (site selectivity) λόγω της οκταεδρικής σφαίρας τους.

(4) Εξαιτίας της ομοιότητάς του Ru με τον Fe, οι ενώσεις του Ru μπορούν να μεταφερθούν με πρωτεΐνες μεταφορείς του Fe, όπως είναι η τρανσφερρίνη και έτσι να συγκεντρωθούν στους καρκινικούς όγκους.

Αυτές οι ευνοϊκές ιδιότητες έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερη γενική τοξικότητα και υψηλότερη εκλεκτικότητα σε σχέση με τα φάρμακα του Pt έναντι συγκεκριμένων καρκινικών σειρών <sup>14</sup> επιτρέποντας έτσι, τη χορήγηση μεγαλύτερων δόσεων <sup>15</sup>.

Η επιτυχία αρχικών *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων που έγιναν με ενώσεις συναρμογής του Ru έχουν οδηγήσει στην αξιολόγηση με κλινικές δοκιμές δύο ενώσεων συναρμογής του Ru, που περιέχουν ετεροκυκλικές ενώσεις συναρμοσμένες στο μεταλλικό κέντρο (Εικόνα 1.1): (i) την ένωση ινδαζόλιο *trans*-[τετραχλωροbis(1H-ινδαζόλιο) Ru(III)] (KP1019) <sup>9,16</sup> όπως και το μετά νατρίου άλας του NKP1339 <sup>17,18</sup> και (ii) το αντιμεταστατατικό ιμιδαζόλιο *trans*-[τετραχλωριδο(S-διμεθυλσουλφοξειδίο)(1H-ιμιδαζόλιο) Ru(III)] (NAMI-A) <sup>11,19</sup>. Οι ενώσεις αυτές παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν από την ομάδα του Keppler στη Βιέννη και από τους Mestroni, Alessio και Sava στην Τεργέστη, αντίστοιχα. Αν και η κυτταροτοξικότητά τους είναι περίπου 10 φορές μικρότερη από το cisplatin σε *in vitro* συνθήκες, δείχνουν εξαιρετική αντικαρκινική δράση σε *in vivo* συνθήκες <sup>16</sup>. Ο μηχανισμός δράση που είναι υπεύθυνος για την κυτταροτοξικότητα αυτών των ενώσεων και οι στόχοι στο κύτταρο δεν είναι γνωστοί.



**Εικόνα 1.1:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των κυριότερων μεταλλοφαρμάκων του Ru(II) και του Ru(III). Το NAMI-A και το KP1019 ανήκουν στην κατηγορία του Ru(III) και τα RAPTA-C, το RAED-C και το RuTE-Cl ανήκουν στην κατηγορία του Ru(II).

Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι το 98% του συνολικού Ru βρίσκεται στο πλάσμα του αίματος σε πρωτεϊνική σύνδεση <sup>11,17</sup> και ότι τα φάρμακα του Ru μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αρκετούς πρωτεϊνικούς στόχους <sup>18,19</sup>. Τέτοιοι είναι: η θειομεταφοράση

της γλουταθειόνης (GST P1-1) (η οποία εμπλέκεται στον μηχανισμό αποτοξικοποίησης)<sup>20</sup>, πρωτεΐνες μεταφορείς όπως η τρανσερρίνη (transferrin) και η αλβουμίνη (Human serum albumin), και πρωτεΐνες/ένζυμα που εμπλέκονται σε διαφορετικά κυτταρικά μονοπάτια, όπως είναι οι ιντεγκρίνες (integrins) και οι matrix metallo-proteinase MMP-2 και MMP-9, που έχουν αναγνωρισθεί ως πιθανοί τελικοί στόχοι<sup>21-25</sup>. Εντούτοις, δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι το DNA είναι πιθανό να εμπλέκεται κατά κάποιο τρόπο στο μηχανισμό δράσης αυτών των φαρμάκων. Πράγματι, αντικαρκινικοί παράγοντες του Ru συνδέονται τόσο με το DNA όσο και με ιστόνες στο νουκλεόσωμα (nucleosome core particles, NCP), τα οποία είναι σημαντικά συστατικά της χρωματίνης<sup>8,26</sup>.

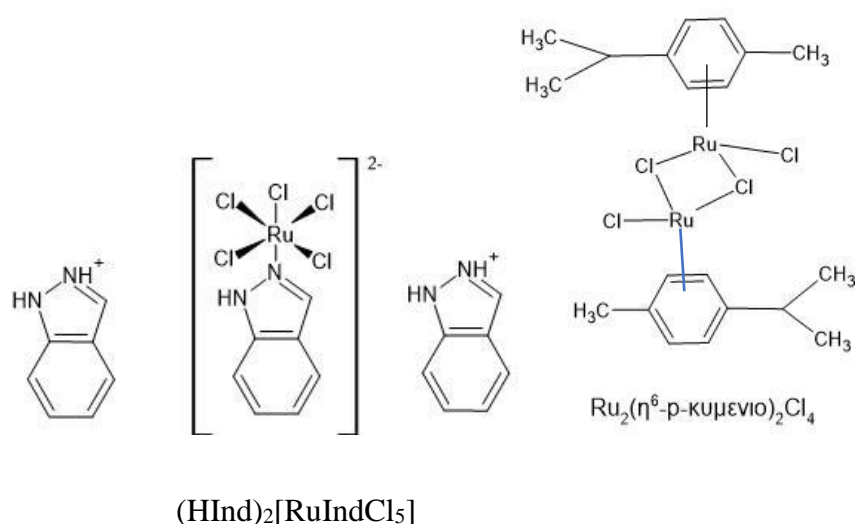
Πρόσφατα, η κρυσταλλογραφία ακτίνων-X σε συνδυασμό με μια πληθώρα φασματοσκοπικών και φασματομετρικών μετρήσεων έχουν χρησιμοποιηθεί για να αποκαλύψουν λεπτομέρειες στην αλληλεπίδραση των αντικαρκινικών ενώσεων συναρμογής του Ru με πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα με σκοπό την απόκτηση πληροφορίας στον τρόπο δράσης αυτών των πιθανών φαρμάκων. Οι πρώτες κρυσταλλογραφικές μελέτες ενώσεων προσθήκης (adducts) αντικαρκινικών φαρμάκων του Ru σε πρωτεΐνες, πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μοντέλα πρωτεϊνών όπως είναι η καρβονική ανυδράση (human carbonic anhydrase II) και η λυσοζύμη (Hen egg-white lysozyme), αλλά τελευταία έχουν δοκιμαστεί και συστήματα με φυσιολογική λειτουργία όπως είναι η Αλβουμίνη<sup>27,28</sup>.

Όλες αυτές οι μελέτες έχουν επιτρέψει την αναγνώριση θέσεων ρουθηνίωσης και τον τρόπο πρόσδεσης των κυτταροτοξικών φαρμάκων βασιζόμενων στο Ru σε αυτά τα βιολογικά μακρομόρια. Γενικά, η οι δομικές πληροφορίες που αποκτήθηκαν από αυτές τις κρυσταλλικές δομές, πρόσθεσαν σημαντική γνώση σχετικά με τον τρόπο πρόσδεσης και την εκλεκτικότητα των φαρμάκων του Ru στις πρωτεΐνες, δια φωτίζοντας τον μηχανισμό δράσης τους, πολλά από τα μέρη του οποίου, όμως, παραμένουν ακόμα άγνωστα και τελούν υπό διερεύνηση.

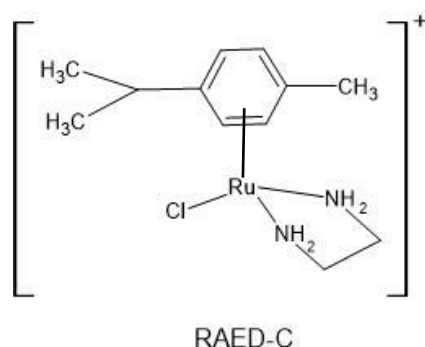
## **Βιοανόργανες ενώσεις του Ru(II) με φαρμακολογικό ενδιαφέρον**

Οι ενώσεις συναρμογής του Ru(II), που εμφανίζονται ως τα πιο ελπιδοφόρα πιθανά αντικαρκινικά φάρμακα, είναι αυτές του Ru(II)(η<sup>6</sup>-αρενίου) (RA). Έχουν γενικό τύπο Ru(II)[(η<sup>6</sup>-αρενιο)(χηλικόX)]<sup>+</sup>, όπου ο χηλικός υποκαταστάτης μπορεί να είναι N-N-, N-O-, O-O- ή άλλος δισηχιδής υποκαταστάτης και όπου X=Cl<sup>-</sup>, SR<sup>-</sup>, SOR<sup>-</sup>, SO<sub>2</sub>R<sup>-</sup>, pyg ή or [(η<sup>6</sup>-αρενιο)Ru(L)Cl<sub>2</sub>], με L=μονοσηχιδή φωσφίνη ή αμίνη<sup>29</sup>. Σε αυτά τα σύμπλοκα (piano-stool) ο

εγκλεισμός ενός π-δεσμικού υδροφοβικού αρενίου υποκαταστάτη μπορεί να διευκολύνει τη διάχυση μέσα από τις λιπιδικές μεμβράνες και τις μεμβρανικές πρωτεΐνες του κυττάρου<sup>30</sup> και την εκλεκτικότητα έναντι βιολογικών στόχων<sup>31</sup>, ενώ η αλλαγή των εναπομενουσών υποκαταστατών μπορεί να επιτρέψει την ρύθμιση χημικών και φυσικών ιδιοτήτων που επηρεάζουν τη ταχύτητα της αντίδρασης με βιομοριακούς στόχους<sup>31,32</sup> ώστε να εξερευνηθούν πολλές φαρμακολογικές εφαρμογές. Παραδείγματα αυτής της οικογένειας ενώσεων φαίνονται στην Εικόνα 1.2. Οι ενώσεις συναρμογής Ru(II)(η<sup>6</sup>-αρενίου) half-sandwich έχουν μελετηθεί στην αντίδρασή τους με μοντέλα DNA και πρωτεΐνες<sup>33,34</sup>.



**Εικόνα 1.2:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής του (HInd)<sub>2</sub>[RuIndCl<sub>5</sub>]<sup>2-</sup> και του Ru<sub>2</sub>(η<sup>6</sup>-p-κυμενιο)<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>.

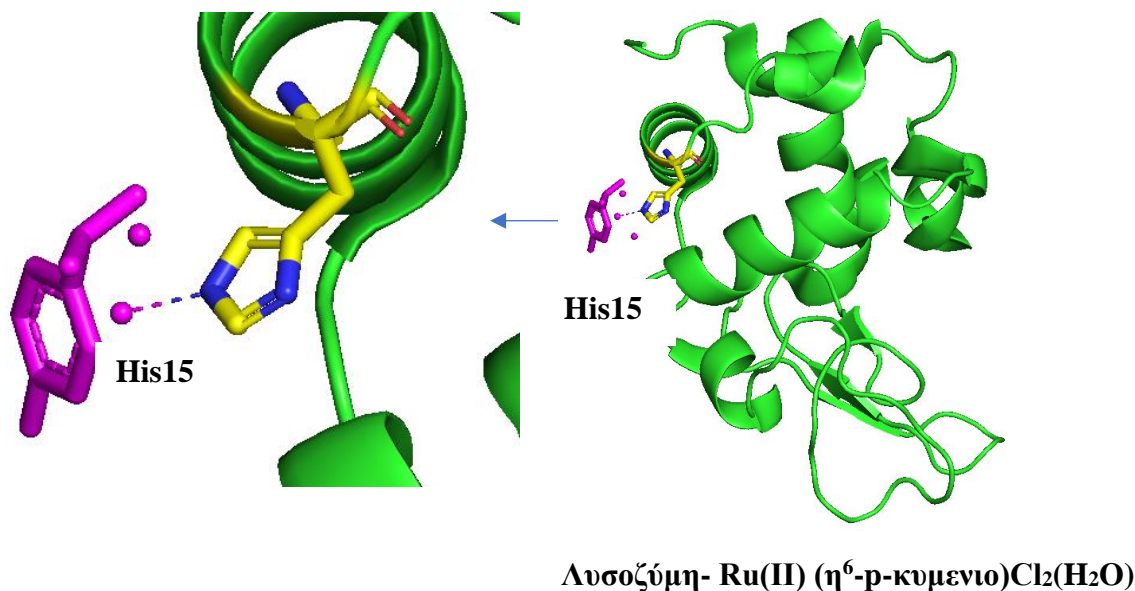


**Εικόνα 1.3:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής του RAED-C

Μία συστηματική μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των RAED ή RAED-C και της ανθρώπινης τρανσφερρίνης έχει δείξει ότι οι ενώσεις συναρμογής του Ru συναρμόζονται με

τις His242, His273, His578 και His606 σε αντίθεση με το cisplatin που προσδένει τα κατάλοιπα Met256, Tyr136, Tyr317, εκτός των His273 and His578 <sup>35</sup>.

Από την κρυσταλλογραφική ανάλυση των δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X από κρυστάλλους λυσοζύμης που είχαν εμβαπτιστεί σε διάλυμα που περιείχε μικρούς κρυστάλλους Ru(II) ( $\eta^6$ -p-κυμενιο)Cl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O) <sup>36</sup>, συμπλόκου μεταξύ της half-sandwich ένωσης συναρμογής του Ru, με πρωτεΐνη. Η δομική ανάλυση του μοντέλου αυτού δείχνει ότι το Ru(II) προσδένεται στην His15 (πλευρική αλυσίδα) με πλήρη κατάληψη (Εικόνα 1.4) ενώ το τμήμα του συμπλόκου του Ru, που βελτιστοποιείται με B-factors μέσα σε ένα εύρος 24.2-32.9 Å<sup>2</sup>, επιλεκτικά προσδένεται στο N<sub>ε2</sub> άτομο της πλευρικής αλυσίδας της His15 με μία απόσταση Ru-N στα 2.2 Å και Ru-C απόσταση στα 2.3 και 2.4 Å. Οι υποκαταστάτες του Cl συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου με μόρια νερού. Η ρουθηνίωση δεν μεταβάλλει στη συνολική δομή της λυσοζύμης: τα RMSD των C<sup>α</sup> της προσδιορισθείσας δομής σε σχέση με αυτά της ελεύθερης-υποκαταστατών δομή της λυσοζύμης (κωδικός PDB: 193L) είναι 0.22 Å. Η συναρμογή του κέντρου του Ru στην ένωση προσθήκης είναι παρόμοια με αυτή του συμπλόκου του [ $\eta^6$ -p-κυμένιου)Ru(L-His-μεθυλεστέρα)Cl]Cl για το οποίο Ru-N είναι 2.063 Å και Ru-C είναι 2.159-2.171 Å <sup>37</sup>.



**Εικόνα 1.4:** Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Λυσοζύμης- Ru(II) ( $\eta^6$ -p-κυμενιο)Cl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O). Η His15 αποτελεί το κύριο αμινοξικό κατάλοιπο πρόσδεσης.

Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν κρυσταλλογραφικά στην αντίδραση μεταξύ της ίδιας πρωτεΐνης και του Ru<sub>2</sub>( $\eta^6$ -βενζολιο)<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> (PDB κωδικός: 3W6A). Επίσης σε αυτή τη δομή, το τμήμα του Ru προσδένεται στο N<sub>ε2</sub> άτομο της His15 (πλευρική ομάδα) και η απόσταση Ru-



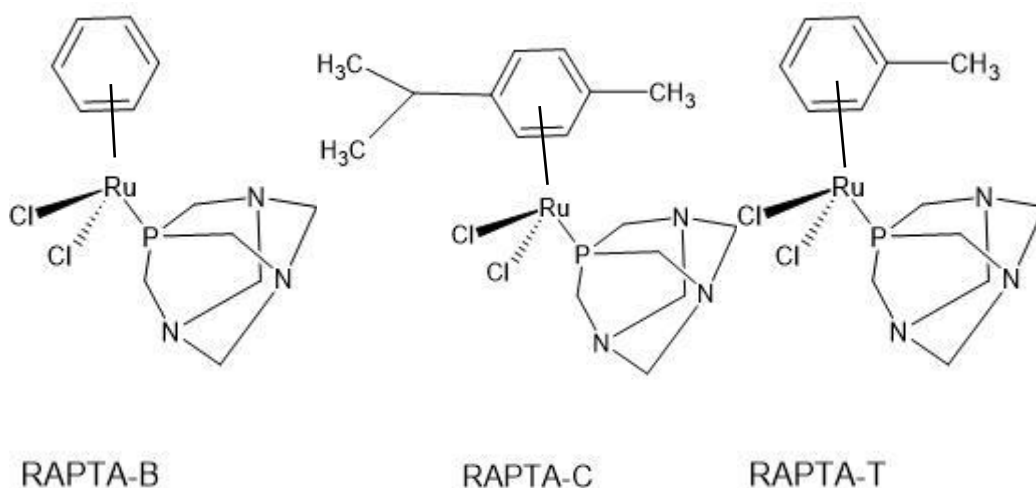
$N_{e2}$  είναι 2.4 Å. Η σύγκριση των δύο αυτών δομών αποκαλύπτει ενδιαφέρουσες λεπτομέρειες: και τα δύο μοντέλα εμφανίζουν ένα αρένιο ως υποκαταστάτη του κέντρου του Ru προσδεδεμένο στην πλευρική αλυσίδα της His15. Παρ' όλα αυτά, ο προσανατολισμός του αρενίου σε σχέση με τα γειτονικά πρωτεϊνικά κατάλοιπα είναι διαφορετικός, και προτείνει μία σημαντική μεταβλητότητα του τμήματος του Ru, που προσδέεται στην ίδια θέση αναγνώρισης.

Μία ακόμη κρυσταλλική δομή που έχει προσδιορισθεί στο παρελθόν, είναι αυτή της ένωσης προσθήκης από την αντίδραση μεταξύ της τύπου half-sandwich ένωσης συναρμογής του Ru(II) ( $\eta^6$ -p-κυμενιο) $Cl_2(H_2O)$  και της άπο-Φερριτίνης. Η δομή αυτή αποκαλύπτει ότι το Ru(II) ( $\eta^6$ -p-κυμενιο) $_2Cl_4$  προσδέεται στον πυρήνα του ναοκλωβού της άπο-Φερριτίνης<sup>38</sup>. Σύμφωνα με δεδομένα φασματοσκοπίας UV-vis και φασματομετρίας μάζας (ICP-OES, inductive coupled plasma-optical emission spectrometry), η ένωση προσθήκης περιέχει 3-4 θέσεις πρόσδεσης σε κάθε υπομονάδα. Η κρυσταλλική δομή, βελτιστοποιημένη σε διακριτική ανάλυση 1.73 Å, επιβεβαιώνει ότι τουλάχιστον 3 θέσεις ρουθηνίωσης εμφανίζονται σε κάθε μονομερές άπο-Φερριτίνης. Στις δύο από τις τρεις θέσεις, στο  $N_{e2}$  της His114 και στο άτομο SG της Cys126 και Cys48 δεν υπάρχει κοντά p-κυμένιο ενώ στην τρίτη θέση ρουθηνίωσης, το κέντρο του Ru συναρμόζεται με His49, Glu53 και His173, και διατηρεί το p-κυμένιο υποκαταστάτη. Εδώ, το Ru έχει βαθμό κατάληψης 0.3 και B-factor 52.5 Å<sup>2</sup>, με αποστάσεις Ru- $N_{e2}$  στα 2.1 Å και Ru-O στα 2.3 Å. Ο ρόλος των His καταλοίπων στην πρόσδεση του Ru(II) ( $\eta^6$ -p-κυμενιο) τμήματος αξιολογήθηκε με πειράματα μετάλλαξης στην πρωτεΐνη. Πράγματι, η μετάλλαξη His49Ala της Φερριτίνης είναι δυνατόν να προσδέσει δύο άτομα Ru ανά υπομονάδα, κοντά στην His114 και His173, επιβεβαιώνοντας τον ρόλο των πλευρικών αλυσίδων στην αναγνώριση ενός τμήματος (fragment) του Ru. Ενδιαφέρον εμφανίζει ότι αυτές οι θέσεις πρόσδεσης είναι κοινές για το Pd, Rh, Au<sup>39-41</sup>, αλλά είναι διαφορετικές από αυτές από του Pt (και πιο συγκεκριμένα του cis-platin) (His132)<sup>42</sup>.

Μία νέα ένωση συναρμογής, η RA που περιέχει χηλικούς υποκαταστάτες O,S και p-κυμένιο και συντέθηκε από το εργαστήριο του Weigand (Πανεπιστήμιο της Jena, Γερμανία) αντέδρασε με το ένζυμο RNase και η ένωση προσθήκης προσδιορίστηκε επιλύθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X<sup>43</sup>. Η ένωση αυτή εμφανίζει κυτταροτοξικότητα και για τον λόγο αυτό ερευνήθηκε περαιτέρω και χαρακτηρίστηκε δομικά το σύμπλοκό της με την RNase. Σε αυτή τη δομή επίσης, η πρόσδεση του συμπλόκου RA στην RNase A δεν άλλαξε

την συνολική διαμόρφωση του ενζύμου. Τα C<sup>α</sup> RMSD μεταξύ της δομής της RNase A στο σύμπλοκό της με το RA και αυτής της ελεύθερης υποκαταστάτη πρωτεΐνης είναι στο εύρος 0.3-0.4 Å. Σε αντίθεση με τα ευρήματα στην περίπτωση της πρόσδεσης Pt στην RNase A<sup>1</sup>, το RA δεν προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και έτσι η RNase A διατηρεί τη ριβονουκλεοτική δράση της. Οι θέσεις πρόσδεσης του Ru βρίσκονται κοντά στην πλευρική αλυσίδα της His105 και στα δύο μόρια RNase A στην ασύμμετρη μονάδα. Η επισκόπηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στους χάρτες αποκαλύπτει απρόσμενα και ιδιαίτερα αποτελέσματα σε αυτή τη θέση πρόσδεσης: το κέντρο του Ru προσδέεται στην ιμιδαζολική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας της His αποκτώντας οκταεδρική διάταξη και γεωμετρία. Επιπρόσθετα, τα τμήματα του RA που προσδέονται στα δύο μόρια που υπάρχουν στην ασύμμετρη μονάδα είναι σχετικά διαφοροποιημένα: Στην πρώτη αλυσίδα (chain A), τρία μόρια νερού και ο χηλικός υποκαταστάτης O,S συναρμολογούνται στο μέταλλο. Στην δεύτερη αλυσίδα (chain B), δύο μόρια DMSO, ο χηλικός υποκαταστάτης O,S και ένα μόριο νερού συμπληρώνουν την σφαίρα συναρμογής. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ξεκάθαρα ότι, τουλάχιστον υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, το η<sup>6</sup>-p-κυμένιο και τα χλώρια (υποκαταστάτες) χάνονται από το κέντρο του Ru, το οποίο και υφίσταται αλλαγή στη σφαίρα συναρμογής του και στη γεωμετρία της σφαίρας συναρμογής με την πρόσδεση σε πρωτεΐνες.

Η απώλεια του αρενίου είναι ασυνήθιστη για το RA, αλλά έχει παρατηρηθεί με φασματομετρία μάζας (electrospray mass spectrometry) για την ένωση προσθήκης μεταξύ της ubiquitin και του (Ru(II)(η<sup>6</sup>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CF<sub>3</sub>)(PTA)Cl<sub>2</sub>), μία ένωση συναρμογής του Ru, τύπου RA, που ανήκει σε μία ειδική κατηγορία Ru(II)(η<sup>6</sup>-αρενίου) που περιέχουν έναν μονοσχιδή υποκαταστάτη (minicage ligand) τον 1,3,5-τριαζα-7-φωσφοαδαμαντάνιο (PTA)<sup>44</sup>. Αυτές οι ενώσεις συναρμογής του Ru, γνωστές και ως RAPTAs (Εικόνα 1.5), συντέθηκαν για πρώτη φορά στο εργαστήριο του P. Dyson όπου και ερευνήθηκε η in vitro και in vivo ενεργότητά τους<sup>45-48</sup>. Σε αυτές τις ενώσεις, η παρουσία του PTA υποκαταστάτη εξασφαλίζει υψηλή διαλυτότητα σε υδατικό μέσο και επίσης εξασφαλίζεται αρκετή λιποφιλικότητα για τον διαπερασμό της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Το PTA ως υποκαταστάτης θεωρείται μη-τοξικό, ασφαλές μόριο. Τα τελευταία χρόνια, πολλές ενώσεις τύπου RAPTA έχουν μελετηθεί<sup>45,47,49,50</sup>, αλλά τα πρωτότυπα της σειράς, όπως είναι για παράδειγμα το [Ru(η<sup>6</sup>-p-κυμένιο)Cl<sub>2</sub>(PTA)] (RAPTA-C) και τα ανάλογά του RAPTA-B [Ru(η<sup>6</sup>-βενζολιο)Cl<sub>2</sub>(PTA)] και RAPTA-T [Ru(η<sup>6</sup>-τολουόλιο)Cl<sub>2</sub>(PTA)] αποτελούν τους πιο ελπιδοφόρους αντικαρκινικούς παράγοντες μέχρι στιγμής<sup>50</sup>.

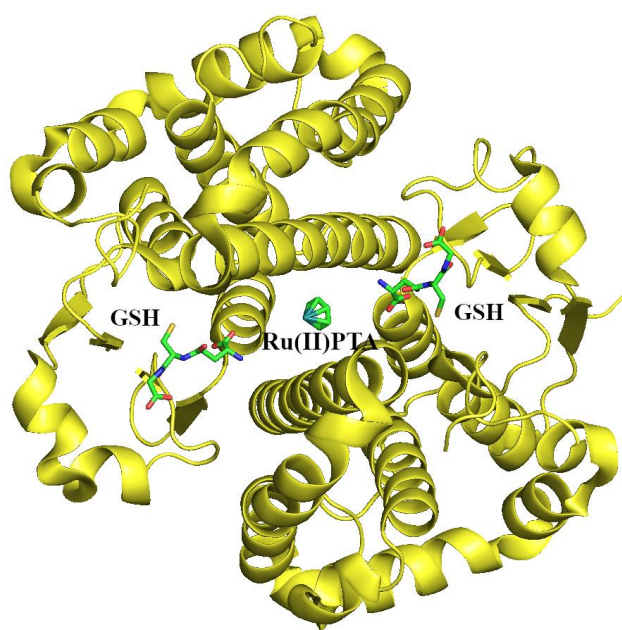


**Εικόνα 1.5:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής αναλόγων της ένωσης RAPTA με αξονικό υποκαταστάτη είτε βενζόλιο (RAPTA-B), είτε p-κυμένιο (RAPTA-C), είτε τολουόλιο (RAPTA-T)

Οι ενώσεις RAPTA χαρακτηρίζονται από διαφορετικές χημικές και βιολογικές ιδιότητες. Εμφανίζουν μέτρια ως εξαιρετική αντιμεταστατική και αντιαγγειογενική (anti-angiogenic) δράση και είναι ενεργές έναντι διαφόρων αντικαρκινικών κυτταρικών σειρών. Φαίνεται ότι οι ενώσεις RAPTA μπορούν να προσδένονται στο DNA<sup>47,51,52</sup> και σε πρωτεΐνες<sup>47,53,54</sup> και είναι ακόμα λιγότερο τοξικές από το NAMI-A<sup>55</sup>, μία ένωση συναρμογής του Ru(III) η οποία αναφέρεται αναλυτικότερα στο επόμενο κεφάλαιο.

Με τη βοήθεια της φασματομετρίας μάζας (electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS) έχουν αναλυθεί αντιδράσεις των ενώσεων RAPTA και μοντέλα πρωτεϊνών (λυσοζύμη, κυτόχρωμα c, ubiquitin, RNase A)<sup>53,54</sup>. Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων αποκάλυψαν ότι τόσο το τμήμα ένωσης Ru(II)(η<sup>6</sup>-p-κυμένιο) όσο και το τμήμα ένωσης Ru(II)(η<sup>6</sup>-p-κυμένιο)(PTA) μπορούν να προσδεθούν στη λυσοζύμη και στην RNase A. Παρόμοια δεδομένα ελήφθησαν από την αντίδρασή τους με το κυτόχρωμα c και την Ουβικουιτίνη (Ubiquitin): Σχηματίζονται Ru(η<sup>6</sup>-αρένιο)-πρωτεϊνικές ενώσεις προσθήκης, αν και οι κινητικές αντίδρασης μπορεί να είναι εξαιρετικά διαφορετικές<sup>47</sup> και μικρότερα παράγωγα όπως είναι το RuCl μπορεί να βρεθούν σε διάφορες θέσεις στην πρωτεΐνη. Μία μελέτη για την ενεργότητα των ενώσεων cis- και trans-[Ru(II)Br<sub>2</sub>(PTA)<sub>4</sub>], cis- και trans-[Ru(II)Cl<sub>2</sub>(PTA)<sub>4</sub>], και trans-[Ru(II)Cl<sub>4</sub>(PTA)<sub>4</sub>]Cl, που εκπονήθηκε πρόσφατα<sup>54</sup>, αποκάλυψε ότι η ποσότητα των σχηματισμένων ενώσεων προσθήκης μεταλλοφαρμάκου-πρωτεΐνης είναι περιορισμένη. Παρ' όλα αυτά, τα μονο-μεταλλωμένα προϊόντα σχηματίζονται και

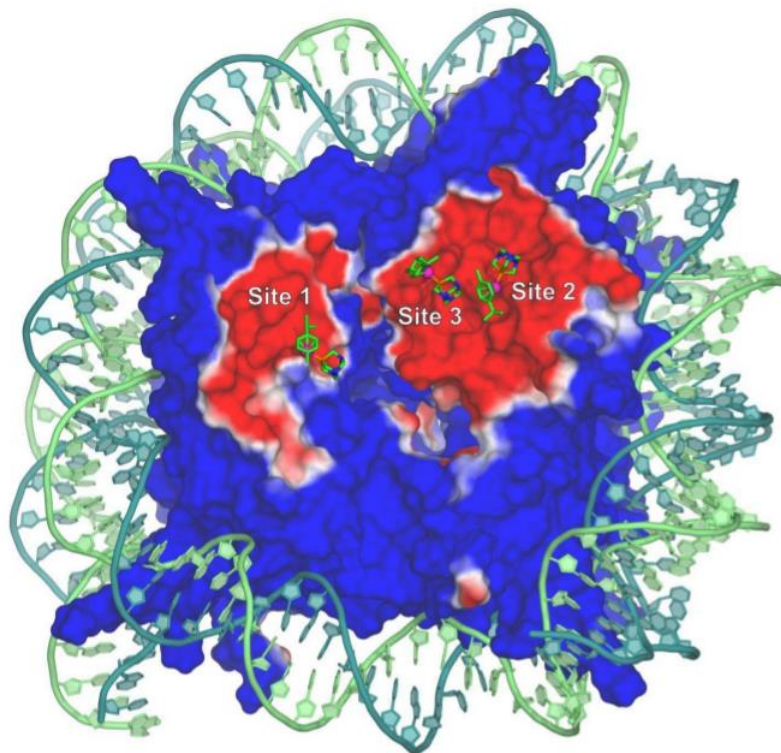
εμφανίζονται διάφορα μεταλλικά τμήματα με μία πληθώρα PTA υποκαταστατών:  $[\text{Ru}(\text{PTA})]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{PTA})_2]^{2+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{PTA})_3]^{2+}$ ,  $[\text{RuCl}(\text{PTA})_2]^{+}$ ,  $[\text{RuBr}(\text{PTA})_4]^{+}$  or  $[\text{RuBr}(\text{PTA})_3]$  στην περίπτωση των cis- και trans- $[\text{Ru}(\text{II})\text{Br}_2(\text{PTA})_4]$ , και cis- και trans- $[\text{Ru}(\text{II})\text{Cl}_2(\text{PTA})_4]$ . Η ενεργότητα των RAPTA ενώσεων με πρωτεΐνες έχει μελετηθεί επίσης συνδυάζοντας φασματοσκοπικές/κρυσταλλογραφικές μελέτες για την παρακολούθηση της σχηματισμένης ένωσης προσθήκης μεταξύ μίας ένωσης τύπου RAPTA που περιέχει αιθακρυνικό οξύ ως χηλικό υποκαταστάτη και της Θειομεταφοράσης του Γλουταθειίου (GST P1-1)<sup>56</sup>. Κατά τον σχηματισμό της ένωσης προσθήκης, το RAPTA προσδένεται αρχικά στην πρωτεΐνη χάνοντας ένα ιόν χλωρίου, και έπειτα ακολουθεί δεύτερη απώλεια του αιθακρυνικού υποκαταστάτη αφήνοντας το Ru απογυμνωμένο. Δομικά δεδομένα που συλλέχθηκαν για αυτή την ένωση προσθήκης, χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικούς κρυστάλλους έδειξε ότι το κέντρο του Ru προσδένεται στην μεσεπιφάνεια του διμερούς (κρυσταλλογραφικά συμμετρικού μακρομορίου). Το Ru συναρμόζεται στις θειολο ομάδες της Cys που ανήκουν στις δύο υπομονάδες διατηρώντας τον υποκατάστατη PTA. Σε αυτή τη δομή, το τμήμα του αρενίου σχηματίζει van der Waals αλληλεπιδράσεις με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων Asp98 και Glu97 και των δύο μακρομορίων του διμερούς.



**Εικόνα 1.6:** Η θειομεταφοράση του γλουταθειίου (GST P1-1) (διμερές, (A) και (B) με προσδεδεμένο το υπόστρωμα (GSH) και το αδαμαντάνιο στην μεσεπιφάνεια και στο κέντρο του διμερούς

Οι ενώσεις RA είναι ικανές να προσδένονται στο νουκλεόσωμα (Nucleosome core particle, NCP), που σχηματίζεται από 145 ζεύγη βάσεων DNA γύρω από ένα οκταμερές των ιστονών

(πρωτεϊνών) H2A, H2B, H3 και H4. Αυτό συνιστά το βασικό συστατικό του χρωμοσωμικού DNA που καλύπτεται από Ιστόνες. Η προσδεση φαρμάκων στις Ιστόνες είναι ιδιαίτερα σημαντική, αφού αυτή μπορεί να επηρεάσει την γονιδιακή έκφραση, ανοίγοντας νέες προοπτικές στις επιγενετικές καρκινικές θεραπείες<sup>57</sup>. Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για να αποκαλύψουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του νουκλεοσώματος και των ενώσεων RA είναι πολύ σημαντικές και ενδιαφέρουσες αφού επιτρέπουν την αποκάλυψη της ενεργότητας των μεταλλοφαρμάκων με την παρουσία τόσο DNA όσο και πρωτεϊνών. Από τον προσδιορισμό της δομής των ενώσεων προσθήκης του RAED-C και του RAPTA-C προέκυψαν τρεις θέσεις πρόσδεσης για το RAPTA-C (θέσεις 1-3). Το RAED-C στοχευμένα προσδέεται στο DNA, με μία μόνο θέση πρόσδεσης στο επίπεδο των Ιστονών<sup>57</sup>. Η διαφορετική ενεργότητα των δύο αυτών ενώσεων με το νουκλεοσωμα μπορεί να ερμηνεύσει τη διαφοροποιημένη δράση και κυτταροτοξικότητά τους. Το RAED-C είναι πολύ πιο κυτταροτοξικό, πιθανά επειδή προκαλεί παραμορφώσεις και κενά. Το RAPTA-C έχει την ιδιότητα να στοχεύει κυρίως πρωτεΐνες και αυτό μπορεί να αποτελεί την αιτία των διαφορετικών θεραπευτικών ιδιοτήτων του σε σύγκριση με το RAED-C<sup>58</sup>. Η πρόσδεση του RAPTA-C συμβαίνει επίσης στην περιοχή του νουκλεοσώματος που είναι πλούσια σε αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα (Glu56, Glu61, Glu64, Asp90, Glu91, Glu92, Glu102, Glu110)<sup>59,60</sup>. Στην πρώτη θέση πρόσδεσης, το Ru προσδέεται στην πλευρική αλυσίδα της Lys59, κοντά στο Glu63. Στην τρίτη θέση πρόσδεσης, το Ru συναρμόζεται στην πλευρική αλυσίδα της His106, κοντά στο Glu102. Αυτά τα κατάλοιπα δεν βρίσκονται μακριά από τη δεύτερη θέση πρόσδεσης, η οποία είναι κοινή με το RAED-C. Εδώ το Ru είναι συναρμοσμένο με τις πλευρικές αλυσίδες Glu61 και Glu64. Σε όλες αυτές τις θέσεις το κέντρο του Ru συγκρατεί τόσο το p-κυμένιο όσο και τον υποκαταστάτη PTA, ενώ απελευθερώνει το ιόν χλωρίου. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η όξινη περιοχή του νουκλεοσώματος παίζει έναν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του, όπως είναι οι συμπυκνώσεις της χρωματίνης<sup>61,62</sup>, η αναγνώριση πυρηνικών παραγόντων και μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις της Ιστόνης.



**Εικόνα 1.7:** Εντοπισμός τριών θέσεων ρουθινώσης στην ένωση προσθήκης του νουκλεοσώματος και του RAPTA-C (PDB ID: 3MNN). Το υπολογισμένο ηλεκτροστατικό δυναμικό στο χωροπληρωτικό μοντέλο του πρωτεϊνικού πυρήνα των ιστονών με το τμήμα του DNA (145-ζεύγη βάσεων) να φαίνονται με πράσινο χρώμα. Η θέση πρόσδεσης του RAPTA-C (πράσινες ράβδοι) βρίσκεται στην αρνητικά φορτισμένη περιοχή της μεσεπιφάνειας των ιστονών H2A και H2B.

Ενώ το RAPTA-C προσδένεται κατά προτίμηση σε πρωτεΐνες Ιστόνες, το RAED-C κυρίως προσδένεται σε επίπεδο νουκλεοσώματος. Πιο συγκεκριμένα, προσδένεται στα άτομα N7 της γουανίνης, όπως κάνει και με απογυμνωμένο DNA<sup>63</sup>. Η πρόσδεση του RAED-C στο νουκλεόσωμα είναι διαφορετική από αυτή του cis-platin που προσδένεται μόνο σε επιφανειακά προσβάσιμες γουανίνες<sup>63,64</sup>.

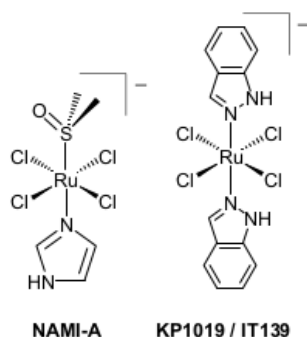
Επίσης, έχουν προσδιοριστεί οι δομές των ενώσεων προσθήκης μεταξύ του νουκλεοσώματος (NCP) και τριών άλλων ενώσεων RA, του χλωριδο Ru(II)(η<sup>6</sup>-p-κυμενιο)(N-φθοροφαινυλ-2-πυριдиноκαρβοθειοαμίδιο), του χλωριδο Ru(II)(η<sup>6</sup>-p-κυμενιο)(N-φαινυλ-2-πυριдиноκαρβοθειοαμίδιο) και χλωριδο Ru(II)(η<sup>6</sup>-THA)(αιθυλενοδιαμίνη)(PF<sub>6</sub>), με THA = 5,8,9,10-τετραϋδροανθρακένιο). Στις δομές των ενώσεων προσθήκης μεταξύ του NCP και των δύο πρώτων ενώσεων συναρμογής, το Ru προσδένεται στις πλευρικές αλυσίδες της His79, η οποία βρίσκεται σε μία περιοχή στην μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο μισών του

νουκλεοσώματος. Το τμήμα του Ru που προσδένεται στο νουκλεόσωμα δεν περιέχει τον υποκαταστάτη καρβοθειοαμίδιο που βρίσκεται κοντά στο μέταλλο. Έτσι ένα τμήμα Ru(II) η6-p-κυμένιο προσδένεται στο νουκλεόσωμα<sup>65</sup>.

Οι ίδιες θέσεις πρόσδεσης (His79 και His106) παρατηρήθηκαν στη δομή της ένωσης προσθήκης που σχηματίστηκε από την αντίδραση μεταξύ του νουκλεοσώματος και του θειομορφολινο-υποκατεστημένου [(η6-p-κυμένιο)Ru(II)(3-υδροξυ-2-πυριδονη)Cl], που πρόσφατα κατατέθηκε στην Protein Data Bank (PDB κωδικός: 4XUJ, διακριτική ικανότητα = 3.18 Å). Αυτή η ένωση συναρμογής του Ρουθηνίου ανήκει σε μία ευρεία οικογένεια ενώσεων των υδροξυ(θειο)πυρ(ιδ)ονη υποκατεστημένων του Ru(II)<sup>66</sup>. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, ότι οι διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης του p-κυμένιου και του βενζολίου αυτής της ένωσης στο σύμπλοκο της με τη λυσοζύμη, στις His79 και His106 (πλευρικές αλυσίδες), μπορούν να παρατηρηθούν και στο σύμπλοκό της με το νουκλεόσωμα, με διαφορετικό όμως προσανατολισμό. Οι παρατηρούμενες διαφορές στους προσανατολισμούς στην ίδια θέση πρόσδεσης οφείλεται στην υψηλή μεταβλητότητα στον τρόπο πρόσδεσης. Τα συμπεράσματα αυτά επιβεβαιώνουν για μία ακόμη φορά το ότι η πρόσδεση ενός μεταλλοφαρμάκου σε πρωτεΐνες χαρακτηρίζεται από σημαντική ελευθερία διαμορφώσεων. Αυτό περιορίζει το ορθολογικό (rational) σχεδιασμό (μεταλλο)φαρμάκων.

## Βιοανόργανες ενώσεις του Ru(III) με φαρμακολογικό ενδιαφέρον

Οι δύο ενώσεις συναρμογής του Ru(III), NAMI-A και KP1019, οι οποίες έχουν προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές ως αντικαρκινικά φάρμακα, έχουν οκταεδρική γεωμετρία. Μοιράζονται 4 ιόντα χλωρίου στο επίπεδο και διαφοροποιούνται ως προς τους αξονικούς υποκαταστάτες.



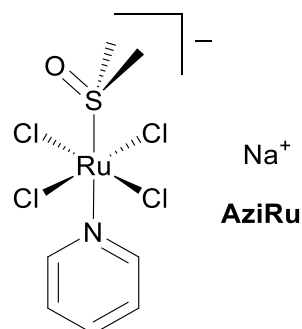
**Εικόνα 1.8:** Σχηματική αναπαράσταση των δύο μεταλλοφαρμάκων του Ru(III) που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές ως αντικαρκινικά. Οι δομικές διαφορές τους εντοπίζονται στους αξονικούς υποκαταστάτες μιδαζόλιο (NAMI-A) σε 1H-ινδαζόλιο (KP1019) και S-dmsο σε 1H-ινδαζόλιο.

Αν και έχουν παρόμοια δομή, το NAMI-A και το KP1019 εμφανίζουν εντελώς διαφορετική βιολογική δράση, η οποία οφείλεται πιθανόν στους διαφορετικούς τελικούς στόχους (πρωτεΐνες). Το NAMI-A, σε υδατικά ή σε όξινα ρυθμιστικά διαλύματα (pH 5.7), έχει βρεθεί να προσδένεται μόνο ασθενώς στο DNA<sup>60</sup> και σε μοντέλα DNA<sup>67</sup>, ενώ προσδένεται ισχυρά σε αρκετές πρωτεΐνες (ιντεγκρίνες, τρανσφερρίνη, αλβουμίνη, καρβονική ανυδράση, matrix metallo proteinases-MMPs) και τη λυσοζύμη<sup>21,22,53</sup>. Αντίθετα, το KP1019 αντιδρά ταχέως με το DNA. Η ένωση αυτή μπορεί να ξετυλίξει και να κάμψει τη διπλή έλικα, όπως φαίνεται από ανάλυση ηλεκτροφόρησης<sup>9</sup>.

Το NAMI-A έχει εξεταστεί σε διάφορα *in vivo* πειράματα και πειραματικά μοντέλα και εμφανίζει σημαντική ελάττωση της μετάστασης καρκινωμάτων<sup>25,68</sup> αλλά δεν δρα πάνω στον πρωταρχικό καρκινικό όγκο. Εξαιτίας του ότι το NAMI-A αναστέλλει τον σχηματισμό της μετάστασης (angiogenesis) σε αρκετά μοντέλα ζώων, έχει υποτεθεί ότι ο μηχανισμός δράσης του βασίζεται στην πρόσδεση του σε πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην κυτταρική διαίρεση<sup>22,69</sup>. Το KP1019 δρα σε καρκινικούς όγκους και δεν εμποδίζει την μετάσταση<sup>10</sup>. Πολλά ερωτήματα πάνω στον μηχανισμό δράσης του KP1019 παραμένουν αναπάντητα, είναι πλέον όμως φανερός ο τρόπος που το KP1019 μεταφέρεται στο κύτταρο και ποια είναι η ενδοκυτταρική του τύχη: το KP1019 σχηματίζει δια-αλυσιδικές αλληλεπιδράσεις (interstrand crosslinks), επομένως μπορεί να αλλοιώσει το DNA, αλλά μπορεί να προσδένεται και σε πρωτεΐνες *in vivo*, όπως είναι η τρανσφερρίνη<sup>70</sup> και η τοποϊσομεράση II<sup>71</sup>. Είναι πιθανόν αυτό το φάρμακο να έχει ευρείς στόχους. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, χρησιμοποιώντας αυτές τις δύο ενώσεις συναρμογής του Ru(III), οδήγησαν στην ανάπτυξη μίας σειράς αναλόγων ενώσεων, στις οποίες το NAMI-A και το KP1019 χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία, και αναφέρονται στο εξής ως παράγωγα του NAMI-A και ενώσεις KP (Kps). Ενδιαφέρον αποτελεί η περίπτωση του trans-[τετραχλωρο(S-διμεθυλ σουλφοξείδιο)(πυριδίνη)Ρουθίνιο(III)] (AziRu) (Εικόνα 1.9), ένα παράγωγο του NAMI-A που διαφέρει από το εκμαγείο ως προς την αντικατάσταση του ιμιδαζολίου με πυριδίνη. Η ένωση AziRu συντέθηκε ταυτόχρονα από δύο εργαστήρια, στο Πανεπιστήμιο της Νάπολης Federic II, Ιταλία<sup>72,73</sup> και στο Πανεπιστήμιο Simon Fraser, Καναδά<sup>74</sup>. Σε πειράματα *in vitro* εμφανίζει αντικαρκινική-αντιπολλαπλασιαστική δράση, πιθανώς εξαιτίας του υψηλότερου υδροφοβικού χαρακτήρα της πυριδίνης σε σύγκριση με το ιμιδαζόλιο<sup>72-74</sup>. Βασισμένοι σε αυτά τα πρωταρχικά κυτταροτοξικά δεδομένα, το AziRu χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση αρκετών πυρηνολιπιδικών ενώσεων συναρμογής του Ru(III), που εμφανίζουν εξαιρετική

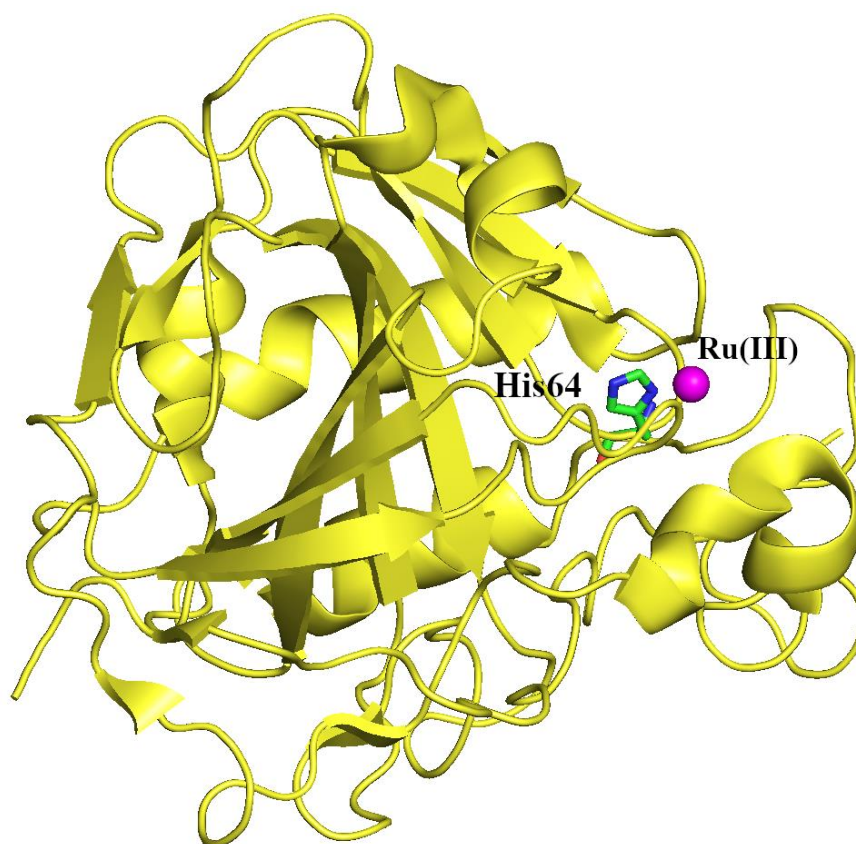


κυτταροτοξική δράση, με τιμές  $IC_{50}$  στην περιοχή χαμηλής μικρομοριακής (micromolar) συγκέντρωσης<sup>72,73,75,76</sup>.



**Εικόνα 1.9:** Σχηματική αναπαράσταση της βιοανόργανης ένωσης του Ru(III), AziRu, με πυριδινικό δακτύλιο και S-dmsο ως αξονικούς υποκαταστάτες στην ένωση.

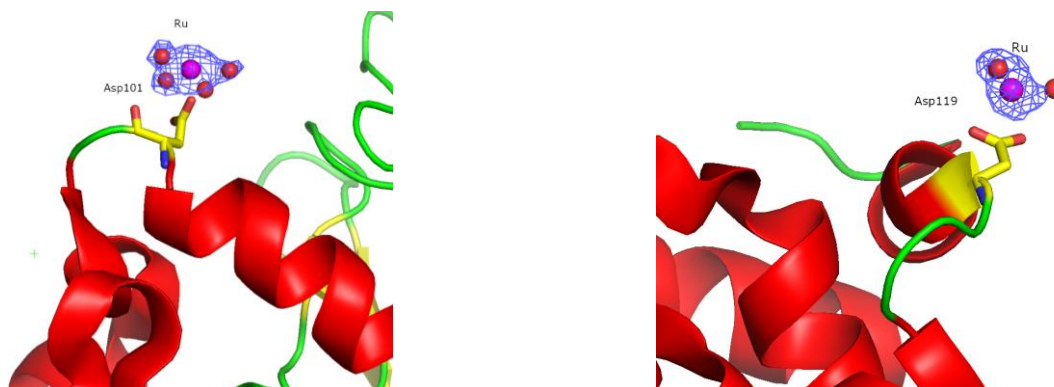
Στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου του NAMI-A με την καρβονική ανυδράση (CA), από τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρόσδεσης του μεταλλοφαρμακου στην πρωτεΐνη, υποδεικνύεται ότι σε αυτήν την περίπτωση το NAMI-A λειτουργεί ως προφάρμακο, απελευθερώνοντας σταδιακά όλους του υποκαταστάτες του Ru<sup>53</sup>.



**Εικόνα 1.10:** Το Ru(III) από την αντίδραση του NAMI-A με την καρβονική ανυδράση (CA), προσδέεται στην His64 με βαθμό κατάληψης 80%.

Το απογυμνωμένο κέντρο του Ru, το οποίο πιθανότατα παραμένει σε οξειδωτική κατάσταση +3, προσδένεται στο ένζυμο CA με βαθμό κατάληψης 0.8. Πιο συγκεκριμένα, το Ru προσδένεται στην πλευρική αλυσίδα της His64 (απόσταση N<sup>δ1</sup>-Ru στα 1.9 Å) και με δύο μόρια νερού (αποστάσεις Ru-O στα 2.4 Å και 2.9 Å, αντίστοιχα). Το RMSD των ατόμων C<sup>α</sup> της CA στο σύμπλοκο (κωδικός PDB: 1CA2)<sup>77</sup> είναι μόλις 0.33 Å.

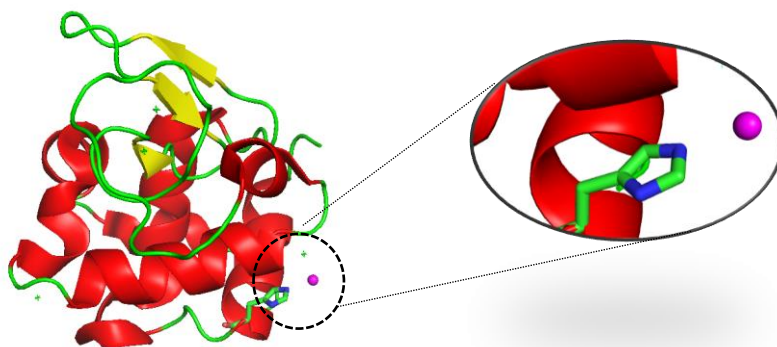
Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν από την ανάλυση της δομής της ένωση προσθήκης του NAMI-A με τη λυσοζύμη, που προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ<sup>78</sup>. Το NAMI-A αποικοδομείται πλήρως και το απογυμνωμένο ιόν Ru προσδένεται σε δύο θέσεις στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, στις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων Asp101, Asp119. Η ρουθηνίωση έχει ισχυρή επίδραση στη συνολική δομή της πρωτεΐνης και σε αυτήν την περίπτωση επίσης. Το RMSD των C<sup>α</sup> ατόμων της λυσοζύμης στη δομή αυτή, σε σύγκριση με την δομή της μη-συμπλοκοποιημένης λυσοζύμης (κωδικός PDB: 193L)<sup>79</sup> είναι 1.18 Å. Οι αποστάσεις Ru-O είναι στα 2.3 Å και στα 2.4 Å για τη θέση πρόσδεσης του Ru στο Asp101 και στο Asp119, αντίστοιχα. Το ιόν του Ru βελτιστοποιήθηκε με βαθμό κατάληψης 0.4 και πολύ υψηλούς θερμικούς παράγοντες (B-factors) περίπου 60 Å<sup>2</sup> και στις δύο θέσεις. Η σφαίρα συναρμογής τους συμπληρώνεται με μόρια νερού σε αποστάσεις 1.8-2.6 Å από το Ru.



**Εικόνα 1.11:** Το απογυμνωμένο Ru(III) από το μεταλλοφάρμακο NAMI-A προσδένεται στη Λυσοζύμη στα Asp101 και Asp119, με βαθμό κατάληψης 40% και στις δύο θέσεις.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση της δομής της ένωσης προσθήκης του NAMI-A σε λυσοζύμη (NAMI-A/λυσοζύμη) με την αντίστοιχη ένωση προσθήκης του AziRu σε λυσοζύμη (AziRu/λυσοζύμη)<sup>80</sup>, από την οποία προκύπτουν σημαντικές διαφορές. Σε αντίθεση με το NAMI-A, το AziRu προσδένεται στην His15 (πλευρική αλυσίδα), αν και με

χαμηλό βαθμό κατάληψης (0.3) και θερμικούς παράγοντες (B-factors) περίπου  $40 \text{ \AA}^2$  και βρίσκεται σε απόσταση  $2.4 \text{ \AA}$  από το  $N_{\epsilon 2}$  άτομο της His15. Επίσης, είναι προσδεδεμένα 5 μόρια νερού σε αποστάσεις με εύρος  $2.5\text{-}2.7 \text{ \AA}$ . Η His15 αποτελεί το προτιμητέο κατάλοιπο για πρόσδεση τόσο του cis-platin<sup>81</sup>, του carboplatin<sup>81</sup> και αρκετών ακόμα ενώσεων του Pt<sup>82</sup>, του Au<sup>83</sup> και ενώσεων του Ru, συμπεριλαμβανομένων του  $Ru_2(\eta^6\text{-βενζολίου})_2Cl_4$  και  $Ru(\eta^6\text{-p-κυμενίου})Cl_2(H_2O)$ .



**Εικόνα 1.12:** Το απογυμνωμένο Ru(III) από την ένωση AziRu προσδένεται στη Λυσοζύμη στην His15, με κατάληψη 30%.

Τα δομικά δεδομένα που ελήφθησαν από κρυσταλλογραφικές μελέτες για την ένωση προσθήκης AziRu/λυσοζύμη, υποστηρίχτηκαν πειραματικά και από μικροσκοπία Raman<sup>84</sup>. Τα φάσματα Raman που συλλέχθηκαν μεταξύ  $250$  και  $1350 \text{ cm}^{-1}$  χρησιμοποιώντας κρυστάλλους λυσοζύμης που εμβάπτιστηκαν σε διάλυμα AziRu επέτρεψαν την παρακολούθηση σε διάφορα χρονικά διαστήματα τη διαδικασία αντικατάστασης των υποκαταστατών του Ru (*in crystallo*). Τα φάσματα των κρυστάλλων λυσοζύμης παρουσία AziRu συλλέχθηκαν σε διάφορους χρόνους εμβάπτισης, κατά τους οποίους οι αρχικοί άχρωμοι κρύσταλλοι λυσοζύμης αποκτούσαν χρώμα που μεταβαλλόταν χρονικά σε κίτρινο, πράσινο και τελικά μαύρο. Τα φάσματα της ελεύθερης λυσοζύμης και της σκόνης AziRu χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα. Έπειτα από 10 λεπτά εμβάπτισης (κίτρινος κρύσταλλος), τα φάσματα Raman είναι το άθροισμα των φασμάτων λυσοζύμης και AziRu, ενδεικτικό του ότι το AziRu διαχέεται μέσα στον κρύσταλλο χωρίς να έχει προλάβει να αντιδράσει με τη λυσοζύμη. Έπειτα από μερικές ώρες (πράσινος κρύσταλλος), παρατηρείται μείωση στην ένταση της κορυφής Raman Ru-Cl στα  $312 \text{ cm}^{-1}$ , ταυτόχρονα με αύξηση της έντασης στις κορυφές στα  $420$  και  $508 \text{ cm}^{-1}$ , που αντιστοιχούν στο δεσμό Ru-OH<sub>2</sub><sup>85</sup>. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι πραγματοποιείται μια διαδικασία ανταλλαγής υποκαταστατών, με τα ιόντα Cl<sup>-</sup> να αντικαθίστανται με μόρια H<sub>2</sub>O. Τελικά, έπειτα από μία εβδομάδα (μαύρος

κρύσταλλος), η αύξηση στην κορυφή  $759\text{ cm}^{-1}$  φανερώνει το σχηματισμό ολιγομερών Ru-O-Ru ή πολυπυρηνικών συστάδων (clusters), τα οποία είναι απόντα στην προσδιορισμένη κρυσταλλική δομή της ένωσης προσθήκης με περίθλαση ακτίνων-X από τους μαύρους κρυστάλλους, αλλά παρατηρούνται συχνά σε υδατικά διαλύματα AziRu που έχουν αφεθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα<sup>74</sup>. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι εμφανίζονται κορυφές στα  $689$  και  $1019\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδονται στον υποκαταστάτη της πυριδίνης, επίσης έπειτα από μεγάλο διάστημα επώασης. Οι κορυφές της έκτασης του δεσμού Ru-N, στα  $300\text{ cm}^{-1}$  για το AziRu και η αναμενόμενη κορυφή γύρω στα  $270\text{ cm}^{-1}$  για τον δεσμό Ru-N(His)<sup>85</sup> δεν παρατηρούνται, αφού επικαλύπτονται από άλλες κορυφές του διαλύτη. Η έκταση του δεσμού Ru-S, που αναμένεται στα  $1134\text{ cm}^{-1}$ , επίσης απουσιάζει<sup>85</sup>. Αυτό δείχνει μία γρήγορη αντικατάσταση του υποκαταστάτη DMSO από μόριο του διαλύτη.

Από τη σύγκριση των δομών της NAMI-A/λυσοζύμης και της AziRu/λυσοζύμης προκύπτει ότι οι δύο ενώσεις συναρμογής του Ru μοιράζονται μία γενική τάση να αποκολλούν όλους τους υποκαταστάτες τους από το κέντρο του Ru(III) κατά την πρόσδεσή τους σε πρωτεΐνες. Παρόλ' αυτά, αν και δομικά είναι παρόμοιες, σχηματίζουν πολύ διαφορετικές ενώσεις προσθήκης, οι οποίες χαρακτηρίζονται από διακριτές θέσεις μετάλλωσης (His15 για το AziRu και Asp101 και Asp119 για το NAMI-A). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι υποκαταστάτες του Ru έχουν κυρίαρχο ρόλο στον προσδιορισμό της θέσης πρόσδεσης, ακόμα και αν χάνονται στην ένωση προσθήκης. Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με τα συμπεράσματα που ελήφθησαν συγκρίνοντας τις δομές των ενώσεων προσθήκης του cisplatin, του carboplatin<sup>86</sup>, και του oxaliplatin<sup>87</sup> με τη λυσοζύμη<sup>42,88</sup>. Με βάση αυτά τα συμπεράσματα, πρέπει να σημειώσουμε ότι αυτά τα φάρμακα του Pt επίσης χάνουν κάποιους από τους υποκαταστάτες τους όταν προσδένονται σε πρωτεΐνες<sup>87,88</sup>. Παρομοίως, το NAMI-A και το AziRu έχουν διαφορετική ενεργότητα με μοντέλα DNA, είτε με πρόσδεση απογυμνωμένου Ru<sup>3+</sup> είτε με τμήμα Ru(Im)<sup>3+</sup> (Im=Ιμιδαζόλιο) να προσδένεται αντίστοιχα στην βάση της γουανίνης της ολιγονουκλεϊκής δομής.

Το AziRu έχει επίσης μελετηθεί και στην αντίδρασή του με την RNase A. Όπως και στην περίπτωση της AziRu/λυσοζύμης, η δομική μελέτη της ένωσης προσθήκης AziRu/RNase A συνοδεύεται επίσης από μελέτη μικροσκοπίας Raman<sup>84</sup>. Σε αυτή την πρωτεΐνη-στόχο, όπως και στην περίπτωση της λυσοζύμης, όλες οι κυστεΐνες δημιουργούν δισουλφιδικούς δεσμούς και έτσι δεν είναι διαθέσιμες για πρόσδεση του μετάλλου. Σε αντίθεση, οι μεθειονίνες, οι ιστιδίνες και τα κατάλοιπα που περιέχουν καρβοξυλικά οξέα είναι πλήρως προσβάσιμα στην σύνδεση του μετάλλου. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν σε διακριτική

ανάλυση 1.65 Å (κωδικός PDB: 4L55) φανερώνουν ότι η συνολική διαμόρφωση της RNase A δεν επηρεάζεται με την πρόσδεση του AziRu και στα δύο μόρια στην ασύμμετρη μονάδα<sup>84</sup>. Τα C<sup>α</sup> RMSD μεταξύ της ελεύθερης υποκαταστάτη RNase A δομής (κωδικός PDB: 1JVT) και της προσδεμένης με το AziRu είναι στο εύρος 0.40-0.60 Å. Όπως παρατηρήθηκε και στις ενώσεις προσθήκης NAMI-A/καρβονική ανυδράση, NAMI-A/λυσοζύμη και AziRu/λυσοζύμη, το απογυμνωμένο Ru(III), δηλαδή χωρίς τους υποκαταστάτες του, προσδένεται στην πρωτεΐνη. Έτσι, τα ιόντα Cl<sup>-</sup>, DMSO και ιμιδαζόλιο/πυριδίνη έχουν αντικατασταθεί από μόρια νερού στο κέντρο του Ru. Πιο συγκεκριμένα, το μέταλλο προσδένεται στις πλευρικές αλυσίδες των His105 και His119 στα δύο μόρια RNase A που βρίσκονται στην ασύμμετρη μονάδα, αντίστοιχα, με τις αποστάσεις μεταξύ των N<sub>ε2</sub> ατόμων των πλευρικών αλυσίδων των His105, His119 και των ατόμων των Ru να είναι 2.0 Å. Τα ιόντα Ru βελτιστοποιήθηκαν με βαθμό κατάληψης 0.5 και B-factors στα 32.7 Å<sup>2</sup> και 47.1 Å<sup>2</sup>, αντίστοιχα. Η σφαίρα συναρμογής τους συμπληρώνεται με μόρια νερού, τα οποία απέχουν 2.3 Å από το μεταλλικό κέντρο. Οι θέσεις πρόσδεσης του Ru βρίσκονται σε συμφωνία με αυτές που παρατηρήθηκαν στην ένωση προσθήκης oxaliplatin/RNase A<sup>89</sup>, αλλά είναι διαφορετικές από αυτές στις ενώσεις προσθήκης των συμπλόκων A-cisplatin και carboplatin με την RNase όπου το Ru προσδένεται επιλεκτικά στην πλευρική αλυσίδα της Met29<sup>87,90,91</sup>. Η πρόσδεση του AziRu στην RNase A επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με τιτλοδότησή του AziRu για την παρακολούθηση της απώλειας της καταλυτικής ενεργότητας<sup>84</sup>. Συμπερασματικά, τα δομικά δεδομένα που συλλέχθηκαν σε ενώσεις προσθήκης του NAMI-A και του AziRu<sup>84</sup> φανερώνουν ότι αυτές οι ενώσεις συναρμογής του Ru(III) έχουν την τάση να αποκολλούν τους υποκαταστάτες τους και να συναρμόζονται σε πρωτεϊνικά κατάλοιπα εκτεθειμένα στο διαλύτη, καταλαμβάνοντας μερικώς αυτές τις θέσεις (βαθμός κατάληψης < 1.0).

Πειραματικές αποδείξεις σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ ενώσεων συναρμογής του Ru(III) και άλλων πρωτεϊνών, για παράδειγμα της αλβουμίνης, έχουν ληφθεί από φασματοσκοπία ENDOR (electron-nuclear double resonance) και φασματοσκοπία απορρόφησης ακτίνων-X<sup>21</sup>. Για να μελετηθούν οι δεσμοί συναρμογής με τις πρωτεΐνες σε αυτά τα σύμπλοκα, συντέθηκαν ανάλογα του AziRu και χαρακτηρίστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, στο εργαστήριο του Δρ. Walsby συντέθηκε μία σειρά ενώσεων με αυξημένο υδροφοβικό χαρακτήρα, στοχεύοντας μη-ομοιοπολικά την αλβουμίνη<sup>74</sup>.

Ανακεφαλαιώνοντας, μπορούμε να πούμε ότι τα δεδομένα από τις μελέτες της δράσης των ενώσεων συναρμογής του Ru(III), NAMI-A και AziRu, που έχουν φτάσει πλέον σε κλινικές

δοκιμές, καταδεικνύουν ότι η ενεργότητα των υδρολυμένων προϊόντων και των ενδιάμεσων τμημάτων (species) αυτών των ενώσεων παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση τους. Το NAMI-A, σε υδατικό διάλυμα και σε ψευδο-φυσιολογικές συνθήκες (pH 7.4 και [Cl<sup>-</sup>] 0.1 M, 37°C), υφίσταται μία διαδικασία πολλαπλής ανταλλαγής υποκαταστατών που περιλαμβάνει την απώλεια Cl<sup>-</sup>, DMSO ακόμα και του υποκαταστάτη του ιμιδαζολίου και στο τέλος της αντίδρασης υδρόλυσης σχηματίζεται μόνο το ιόν Ru. Το AziRu υφίσταται παρόμοιες αντιδράσεις υδρόλυσης.

## Κεφάλαιο 2

### Κρυσταλλογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της δομής βιολογικών μακρομορίων

#### Μοριακή αντικατάσταση

Ο όρος “μοριακή αντικατάσταση” (molecular replacement, MR) χρησιμοποιείται γενικά για να περιγράψει τη χρήση ενός γνωστού μοριακού μοντέλου για την επίλυση κρυσταλλικών δομών ομόλογων μορίων. Η MR επιτρέπει την επίλυση του κρυσταλλογραφικού προβλήματος των φάσεων παρέχοντας αρχικές εκτιμήσεις φάσεων για τη νέα δομή από μία προηγούμενα γνωστή δομή, σε αντίθεση με τις δύο άλλες κύριες μεθόδους για την επίλυση του προβλήματος των φάσεων: τις πειραματικές μεθόδους, οι οποίες υπολογίζουν τις φάσεις από ισόμορφες ή ανώμαλες διαφορές, και τις άμεσες μεθόδους (direct methods), οι οποίες χρησιμοποιούν μαθηματικές σχέσεις μεταξύ τριπλετών ανακλάσεων για τον προσδιορισμό των φάσεων από ένα αρχικό, τυχαίο ή μη, σύνολο.

Με δεδομένη την συνεχόμενη αύξηση κατατεθειμένων δομών στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών δομών (Protein Data Bank – PDB), η MR αποτελεί την πιο συνήθη μέθοδο για την επίλυση μακρομοριακών δομών αφού προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα ως προς την ταχύτητα επίλυσης, το χαμηλό κόστος και την υψηλή αυτοματοποίηση που προσφέρουν τα νέα λογισμικά. Περίπου το 70% των κατατεθειμένων μακρομοριακών δομών στη PDB έχει προσδιορισθεί με MR.

Πρακτικά, η MR είναι μια απλή μέθοδος. Τα δεδομένα εισόδου της μεθόδου αποτελούν το αρχικό μοντέλο, το οποίο υποθέτουμε ότι δομικά πλησιάζει στην άγνωστη δομή και το σύνολο των μετρούμενων εντάσεων περίθλασης. Η μέθοδος παράγει όλους τους πιθανούς προσανατολισμούς και θέσεις του μοντέλου στη μοναδιαία κυψελίδα της υπό προσδιορισμό κρυσταλλικής δομής (δομή-στόχος) και υπολογίζει τις προβλεπόμενες (predicted) εντάσεις

περίθλασης για αυτές και το πόσο καλά ταιριάζουν με τις παρατηρούμενες ανακλάσεις (observed). Από τη βέλτιστη θέση και προσανατολισμό του αρχικού μοντέλου, υπολογίζονται οι αρχικές φάσεις, οι οποίες με τις πειραματικά παρατηρούμενες εντάσεις δίνουν τον αρχικό χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας για την υπό επίλυση κρυσταλλική δομή. Αυτός ο χάρτης είναι ενδεικτικός για την επιτυχή ή όχι επιλογή του αρχικού μοντέλου, τον ορθό προσδιορισμό της κρυσταλλογραφικής συμμετρίας ομάδας χώρου κλπ. Στη συνέχεια, το πρόβλημα MR γίνεται ένα πρόβλημα κρυσταλλογραφικής βελτιστοποίησης της δομής, με ανοικοδόμηση του μοντέλου και βελτιστοποίηση των φάσεων από διαδοχικούς διαφορικούς Fourier χάρτες.

Οι βασικές παράμετροι για την επιτυχία της μεθόδου MR είναι:

- (i) Η επιλογή του κατάλληλου αρχικού μοντέλου και στη συνέχεια η βελτιστοποίησή του.
- (ii) Η βαθμολόγηση (score) κάθε προσανατολισμού (orientation) και θέσης ώστε να βρεθεί το καλύτερο ταίριασμα στη δομή στόχο: διαφορετικές συναρτήσεις στόχου (target functions) θα έχουν διαφορετικούς βαθμούς διαφοροποίησης μεταξύ της επίλυσης και του θορύβου
- (iii) Η στρατηγική για την διερεύνηση των περιστροφών (rotations) και των μετατοπίσεων (translations) για την αναζήτηση των λύσεων
- (iv) Η χρησιμοποίηση κατάλληλων υπολογιστικών μεθόδων για αποτελεσματικότερους-ταχύτερους υπολογισμούς.

Αυτές οι τέσσερις παράμετροι της MR είναι ανεξάρτητες. Μία αποτυχία στην MR μπορεί να προκύπτει από μικρές αποκλίσεις στις επιλογές σε κάποια από αυτές τις παραμέτρους. Είναι φανερό ότι ένα ακατάλληλο αρχικό μοντέλο, μία χαμηλής ποιότητας συνάρτηση-στόχος ή ο λάθος προσδιορισμός της κρυσταλλογραφικής ομάδας χώρου μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία εύρεσης λύσης. Αλλά και οι αργοί υπολογισμοί μπορεί να εμποδίσουν την εύρεση δομικής λύσης επειδή περιορίζουν τον αριθμό των δοκιμών MR που μπορούν να πραγματοποιηθούν. Δίχως κάποια υπολογιστικά τεχνάσματα που επιταχύνουν τις αναζητήσεις MR, αυτές οι αναζητήσεις μπορούν να χρειαστούν πολύ μακρύ χρονικό διάστημα, ακόμα και με την υπάρχουσα τεχνολογία υπολογιστών.

## **Η επιλογή του μοντέλου**

Η επιλογή και προετοιμασία ενός κατάλληλου αρχικού μοντέλου αποτελεί το κρίσιμότερο στάδιο στην μοριακή αντικατάσταση (MR). Κι αυτό διότι, με ένα επιτυχημένο αρχικό

μοντέλο μοντελοποιείται ένα μεγάλο ποσοστό της υπό προσδιορισμό δομής με ικανοποιητική ακρίβεια. Τα επιτυχημένα αρχικά μοντέλα έχουν χαμηλό RMSD από τη δομή στόχο (target) και υψηλή συμπληρωματικότητα (completeness). Όταν η MR αποτυγχάνει, είναι σχεδόν πάντοτε επειδή το μοντέλο δεν ταιριάζει με την άγνωστη δομή αρκετά καλά.

Γενικά, χαμηλές RMSD μεταξύ δύο δομών υποδεικνύει και μεγάλη ομολογία στην αλληλουχία. Μία πιθανή δομή αρχικού μοντέλου αναγνωρίζεται έτσι από αναζητήσεις σε συγκριτικά ομόλογες αλληλουχίες. Είναι προτιμητέο να απαλείφονται οι περιοχές της δομής του αρχικού μοντέλου που εμφανίζουν μεγάλη διαφοροποίηση ως προς την αλληλουχία της δομής στόχου διότι οι διαφορές αυτές προσθέτουν θόρυβο στην αναζήτηση λύσης<sup>92</sup>. Για το ίδιο λόγο συνήθως απαλείφονται C $\gamma$  άτομα<sup>93</sup> και αλανίνη. Εφόσον ο προσδιορισμός των θερμικών παραγόντων (B factors) των ατόμων επηρεάζεται από τη θερμική και στατιστική αποδιάταξη των ατόμων, οι τιμές τους βελτιστοποιούνται ώστε να είναι μικρές για την υδροφοβική περιοχή και μεγαλύτερες για τα επιφανειακά κατάλοιπα που έρχονται σε επαφή με το διαλύτη (surface-exposed residues), βελτιστοποιώντας έτσι και το μοντέλο<sup>94</sup> βλ. *MOLREP* ,<http://www.ccp4.ac.uk/dist/html/molrep.html>). Για πιθανά πολλαπλά αρχικά μοντέλα, η αναζήτηση πρέπει να επαναλαμβάνεται με κάθε μοντέλο ή εναλλακτικά με όλα τα μοντέλα ομαδοποιημένα ως ένα (όπως στο Phaser)<sup>95</sup>. Αξίζει να σημειωθεί ότι εάν κάποιο αρχικό μοντέλο είναι εξαιρετικά «φτωχό», η αναζήτηση MR είναι αρκετά δύσκολή και καταναλώνει σημαντικό υπολογιστικό χρόνο χωρίς να οδηγεί σε κάποια επίλυση ιδιαίτερης χρησιμότητας. Δυστυχώς, πρωτεΐνες με παρόμοιες αλληλουχίες δεν έχουν πάντα παρόμοιες τριτοταγείς δομές. Ακόμα και σε περιπτώσεις με ίδια αλληλουχία, η πρόσδεση ενός υποκαταστάτη ή ακόμα και η διαφορετική διεύθυνση των μακρομορίων στον κρύσταλλο μπορεί να οδηγήσει κάποιες ομάδες σε κινήσεις άκαμπτου σώματος (rigid body) που επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή του μακρομορίου, όπως για παράδειγμα κινήσεις μεντεσέ (hinge motions) μεταξύ των δομικών περιοχών. Πολλές πρωτεΐνες μπορούν να υποστούν μία αλλαγή στη διαμόρφωση τους, που επανατοποθετεί τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής (για παράδειγμα η οικογένεια πρωτεϊνών σερπινών). Αν και η περίπτωση επανατοποθέτησης είναι εξαιρετικά δύσκολο να προβλεφθεί, οι πιθανές αλλαγές στη διαμόρφωση λόγω κινήσεων άκαμπτου σώματος κάποιων περιοχών μπορούν να εντοπιστούν από την παρουσία διάφορων περιοχών τύπου μεντεσέ (hinge regions) στη δομή. Οι δομές που εμφανίζουν τέτοιες περιοχές πρέπει είτε να χωριστούν σε διαφορετικές περιοχές, οι οποίες χρησιμοποιούνται ανεξάρτητα ως μοντέλα MR (επιτρέποντας την αλλαγή στον προσανατολισμό και στη θέση μεταξύ των περιοχών), είτε να μοντελοποιηθεί από την αρχή η



αλλαγή στη διαμόρφωση τους, για παράδειγμα υπολογισμένη με normal modes<sup>96,97</sup>. Στην πρώτη περίπτωση απαιτούνται λιγότερες αναζητήσεις και επομένως μικρότερος υπολογιστικός χρόνος, ενώ στην άλλη επιτυγχάνεται μεγαλύτερη πληρότητα του μοντέλου αφού ο δειγματισμός είναι υψηλότερος.

## Ερμηνεία των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Σε ένα χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, υψηλής ανάλυσης (ατομική ευκρίνεια  $< 1.4 \text{ \AA}$ ), οι ατομικές θέσεις αποδίδονται στις καλά διαχωρισμένες, διακριτές, κορυφές του χάρτη. Από τα σχετικά ύψη των κορυφών και τη γεωμετρία αποδίδεται το σωστό είδος ατόμου σε κάθε θέση και στη συνέχεια, εφαρμόζοντας χημικούς περιορισμούς, όπως είναι λογικά μήκη δεσμών και γωνίες στην κατανομή των ατόμων, προκύπτει η δομή του μορίου. Αυτό συμβαίνει κατά κανόνα στις δομές μικρών μορίων, από την κρυσταλλογραφική ανάλυση των οποίων λαμβάνονται χάρτες ατομικής ευκρίνειας που οδηγούν σε ξεκάθαρο προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής.

Στην περίπτωση πρωτεϊνικών δομών, η ανάλυση των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας που λαμβάνονται από τα πειράματα περίθλασης ακτίνων-X, είναι συνήθως χαμηλότερη από την ατομική ευκρίνεια ( $> 1.5 \text{ \AA}$ ). Ωστόσο, υπάρχει η χημική και δομική πληροφορία που μας επιτρέπει τη συσχέτιση της κατανομής ηλεκτρονιακής πυκνότητας και επομένως τον προσδιορισμό της δομής. Ο αντικειμενικός στόχος είναι να φτάσουμε σε ένα τρισδιάστατο μοντέλο που συντίθεται από μία γνωστή αλληλουχία αμινοξέων που συνδέονται μεταξύ τους σε μία συνεχόμενη αλυσίδα, η οποία με την σειρά της είναι οργανωμένη σε αναγνωρίσιμα στοιχεία δευτεροταγούς δομής, όπως είναι οι  $\alpha$ -έλικες και οι  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες, τα οποία είναι ενωμένα μαζί και διευθετημένα σε ένα τοπολογικά λογικό μοτίβο. Στην πραγματικότητα η ποσότητα της δομικής πληροφορίας σχετικά με τα μακρομόρια είναι πολύ μεγάλη<sup>98</sup> έτσι ώστε η ποσότητα και η ποιότητα των χημικών και φυσικών περιορισμών που είναι διαθέσιμες στον προσδιορισμό της δομής μιας καινούριας προσδιοριζόμενης δομής να πλησιάζει αυτές των συμβατικών μικρών μορίων.

Οι πειραματικά προσδιοριζόμενοι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας δεν είναι ποτέ τέλει εξαιτίας των λαθών στα δεδομένα και στις φάσεις, και ως αποτέλεσμα ακόμα και τα καλύτερα μοντέλα συχνά παρουσιάζουν σφάλματα στις ατομικές θέσεις και στις διέδρες γωνίες, ακατάλληλα διαμορφωμερή για πλευρικές αλυσίδες ή μη αποδεκτές επαφές μεταξύ ατόμων ή χημικών ομάδων. Όταν η ποιότητα ενός χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας είναι

οριακή ή φτωχή, σημαντικά σφάλματα στην ερμηνεία του χάρτη μπορεί να επιφέρουν ένα θεμελιωδώς λανθασμένο μοντέλο. Ακόμα κι όταν ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας είναι καλός και οδηγεί σε ένα ικανοποιητικό μοντέλο, αυτό δεν σημαίνει ότι το μοντέλο αυτό είναι ελεύθερο σφαλμάτων. Ξεκινώντας από το αρχικό μοντέλο για μία πρωτεΐνη, αυτό συνήθως συνοδεύεται από rms σφάλμα στις ατομικές θέσεις της τάξης του 1 Å ή περισσότερο, και έναν δείκτη αξιοπιστίας, παράγοντα R (R-factor) που δεν πρέπει να ξεπερνά το 0.50 περίπου. Για να ελαχιστοποιηθούν τα σφάλματα, απαιτείται βελτιστοποίηση της δομής. Αυτή επιτυγχάνεται με διαδοχικούς επαναληπτικούς κύκλους χειροκίνητης ανοικοδόμησης του μοντέλου και υπολογιστικής βελτιστοποίησης των παραμέτρων της δομής. Το βέλτιστο μοντέλο επιτυγχάνεται όταν έχουν εξαντληθεί όλα τα μέσα για περαιτέρω βελτίωσή του.

## Η βελτιστοποίηση του μοντέλου

Υπάρχουν αρκετά κριτήρια στερεοχημείας που χρησιμοποιούνται για την βελτίωση ενός μοντέλου, όπως είναι τα μήκη δεσμών μεταξύ των ατόμων και οι γωνίες δεσμών που βρίσκονται πλησιέστερα στις κανονικές τιμές και στη βέλτιστη στερεοχημεία<sup>99</sup>. Τα κριτήρια στερεοχημείας είναι σημαντικά και θα πρέπει να παρακολουθούνται και να καθοδηγούν τη βελτιστοποίηση της δομής, ωστόσο η διαδικασία της βελτιστοποίησης στηρίζεται στην ελαχιστοποίηση συναρτήσεων, όπως ο R-factor, που συσχετίζουν τις παραμέτρους της δομής (ατομικές θέσεις και θερμικούς παράγοντες) με τα πειραματικά δεδομένα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X. Ο συσχετισμός αυτός γίνεται μέσω του ελέγχου σύγκλισης των πειραματικά προσδιορισμένων μέτρων των παραγόντων δομής  $F_{\text{obs}}$  (όπως προκύπτουν από τις συλλεχθέντες εντάσεις περίθλασης ακτίνων-X από τον μονοκρύσταλλο) και των παραγόντων δομής που υπολογίζονται από τις παραμέτρους του εκάστοτε μοντέλου  $F_{\text{calc}}$ <sup>100-103</sup>. Η βελτιστοποίηση βασίζεται στη μεγιστοποίηση της συμφωνίας μεταξύ των  $F_{\text{obs}}$  και  $F_{\text{calc}}$  ή αλλιώς στην ελαχιστοποίηση των διαφορών  $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  συνολικά, το οποίο είναι ισοδύναμο με την τιμή του R-factor και αποτυπώνει μια ενδεικτική τιμή για το πόσο καλά συμφωνεί το μοντέλο μας με την πραγματική δομή.

Ο όρος βελτιστοποίηση σημαίνει ακριβώς την ελαχιστοποίηση των μικρών σφαλμάτων και αποτελεί ένα στάδιο που έπεται της αρχικής επίλυσης στον προσδιορισμό της δομής. Το αρχικό μοντέλο πρέπει να έχει μία καλή προσέγγιση με την υπό προσδιορισμό δομή αφού αν διαφέρει σημαντικά από αυτήν, είτε συνολικά είτε τοπικά, η βελτιστοποίηση δεν θα

καταφέρει ποτέ να συμπληρώσει τη δομή ή να διορθώσει μεγάλα σφάλματα και να φέρει ως αποτέλεσμα τη σωστή τελική δομή. Για αυτό είναι σημαντικό να γίνεται προσεκτική, από πλευράς στερεοχημείας, οικοδόμηση του μοντέλου σε κάθε βήμα<sup>103,104</sup> δεδομένου ότι η βελτιστοποίηση δεν είναι ικανή να βρίσκει τη σωστή λύση ή να διορθώνει μεγάλα προβλήματα. Στην πράξη, η βελτιστοποίηση επιτυγχάνεται με διαδοχικά βήματα που εναλλάσσονται στον ορθό και στον αντίστροφο χώρο. Κάθε σωστό βήμα βελτιστοποίησης στον αντίστροφο χώρο θα πρέπει να επιφέρει απτά αποτελέσματα στην εικόνα του μοντέλου και της διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας στον ορθό χώρο και αντίστροφα. Έτσι ελαχιστοποιώντας μαθηματικά τον R-factor στον αντίστροφο χώρο, ελαχιστοποιείται η διαφορά μεταξύ της πειραματικά προσδιορισμένης ηλεκτρονιακής πυκνότητας και της ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκε από το μοντέλο, γεγονός που αποτυπώνεται στους διαφορικούς χάρτες Fourier στον ορθό χώρο.

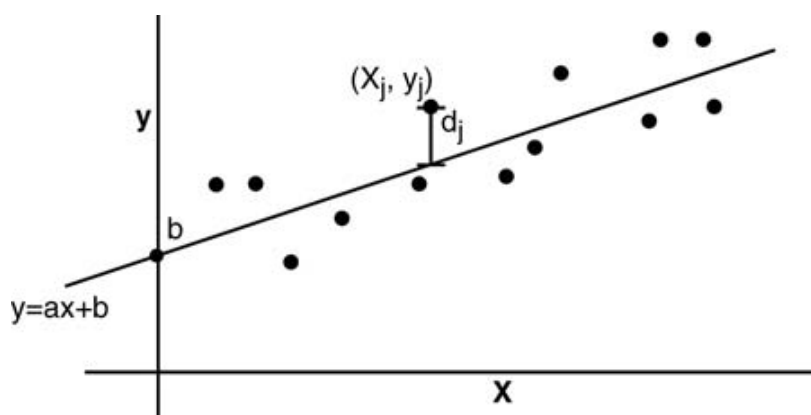
Η ελαχιστοποίηση του R-factor (και του R-free)<sup>105</sup> στον αντίστροφο χώρο γίνεται υπολογιστικά, ενώ η βελτιστοποίηση του μοντέλου στον ορθό χώρο, σύμφωνα με τους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, γίνεται χειροκίνητα από τον ερευνητή σε κατάλληλο γραφικό περιβάλλον. Ο έλεγχος και η βελτιστοποίηση της δομής στον ορθό χώρο, μετά από τη βελτιστοποίηση της στον αντίστροφο χώρο, παίζουν πολύτιμο ρόλο στην συνολική διαδικασία. Η σωστή ανοικοδόμηση του μοντέλου στον ορθό χώρο, αναμένεται με τη σειρά της να οδηγήσει σε βελτιωμένους δείκτες (R-factor και R-free) στον αντίστροφο χώρο και περαιτέρω σύγκλιση τους προς το ολικό ελάχιστο.

Η ελαχιστοποίηση των παραγόντων R προϋποθέτει την ελαχιστοποίηση του αθροίσματος των διαφορών  $|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|$  για το σύνολο των ανεξάρτητων παρατηρούμενων ανακλάσεων, το πλήθος των οποίων μπορεί να ποικίλει από μερικές χιλιάδες για μία μικρή πρωτεΐνη ως μερικά εκατομμύρια για έναν ιικό κρύσταλλο. Οι  $F_{\text{obs}}$ , που προκύπτουν από τις πειραματικά προσδιορισμένες εντάσεις περίθλασης, δεν μπορούν να αλλάξουν. Μόνο οι  $F_{\text{calc}}$  μπορούν να αλλάξουν. Οι  $F_{\text{calc}}$ , είναι συναρτήσεις των ατομικών συντεταγμένων  $x_j$ ,  $y_j$ ,  $z_j$ , των παραγόντων σκέδασης αυτών των ατόμων σε συγκεκριμένες θέσεις  $f_j$ , και των θερμικών παραγόντων των ατόμων,  $B_j$ . Οι παράμετροι αυτοί ορίζουν το μοντέλο και οποιαδήποτε αλλαγή τους, ακόμα και για ένα μόνο άτομο, επηρεάζει τις  $F_{\text{calc}}$ . Έτσι, με προσεκτική αλλαγή αυτών των παραμέτρων, οι  $F_{\text{calc}}$  μπορεί να προσεγγίζουν τις τιμές των  $F_{\text{obs}}$ , με τις διαφορές να ελαττώνονται συνολικά και τον παράγοντα R να μειώνεται. Ένας χαμηλότερος παράγοντας R σημαίνει και πιο ακριβές μοντέλο.

## Βελτιστοποίηση στον αντίστροφο χώρο: Η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων

Οι πιο συνηθισμένες και πιο ισχυρές μέθοδοι για την ελαχιστοποίηση του παράγοντα  $R$  πάνω σε ένα σετ παραγόντων δομής  $F_{hkl}$  βασίζονται όλες στη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Αν και η εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων σε κρυσταλλογραφικά προβλήματα είναι υπολογιστικά ιδιαίτερα επίπονη, η βασική ιδέα της μεθόδου δεν είναι άλλη παρά το βέλτιστο ταίριασμα μίας ευθείας γραμμής σε ένα σετ πειραματικά μετρούμενων σημείων σε μία γραφική παράσταση <sup>106</sup>. Η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων έχει αποδειχτεί εξαιρετικά ισχυρή στην επεξεργασία δεδομένων στην κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Απαιτείται, όμως, σωστή και προσεκτική εφαρμογή της μεθόδου, ώστε να αποφεύγονται bias λύσεις που προκύπτουν από overfitting (χαμηλός λόγος δεδομένων/παραμέτρων) <sup>107</sup>.

Η θεμελιώδης ιδέα της μεθόδου, όπως αυτή εφαρμόζεται στη βελτιστοποίηση των δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ από μονοκρύσταλλο, είναι παρόμοια με αυτή που χρησιμοποιείται για το ταίριασμα μίας ευθείας γραμμής, η οποία μπορεί να περιγραφεί μαθηματικά από την έκφραση  $y = ax + b$  σε ένα σετ σημείων που ληφθήκαν πειραματικά. Ο Lagrange έδειξε ότι η “βέλτιστη” ευθεία που μπορεί να σχεδιαστεί ανάμεσα στο σετ αυτών των σημείων, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1, είναι αυτή στην οποία ελαχιστοποιείται το άθροισμα όλων των τετραγώνων των αποστάσεων από τα σημεία στην ευθεία. Για δεδομένα που δεν εμφανίζουν σφάλματα, όταν οι δύο μεταβλητές  $x$  και  $y$  έχουν γραμμική συσχέτιση, τα παρατηρούμενα σημεία  $(x_j, y_j)$  συμπίπτουν όλα σε μία ευθεία γραμμή. Οι παράμετροι που χρειάζεται να προσδιοριστούν για τη βέλτιστη ευθεία της Εικόνας 2.1, είναι τα  $a$  και  $b$ .



**Εικόνα 2.1:** Η βέλτιστη ευθεία γραμμή, η οποία αποτελεί τη γραμμική σχέση  $y = ax + b$ , για ένα σετ σημείων που ληφθήκαν πειραματικά, προκύπτει από την ελαχιστοποίηση των αποστάσεων  $d$  (μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων).

Στο κρυσταλλογραφικό πρόβλημα, όπως προαναφέρθηκε οι παράμετροι είναι οι συντεταγμένες ατομικής θέσης,  $x_j$ ,  $y_j$ ,  $z_j$ , οι ατομικοί θερμικοί παράγοντες  $B_j$  και ο βαθμός κατάληψης κάθε τομικής θέσης για το σύνολο  $N$  του πλήθους των ατόμων της δομής ( $j = 1, \dots, N$ ). Οι παράμετροι αυτοί βρίσκονται στην  $F_{calc}$  και η βελτιστοποίηση τους προκύπτει από την ελαχιστοποίηση του αθροίσματος των τετραγώνων:

$$D = \sum_{hkl} w_{hkl} (F_{obs} - F_{calc})^2$$

Η ελαχιστοποίηση γίνεται με μηδενισμό των μερικών παραγώγων της  $D$  ως προς κάθε παράμετρο ξεχωριστά. Έτσι, ξεκινώντας από ένα σύνολο τέτοιων αρχικών παραμέτρων, που αντιστοιχούν στο αρχικό μοντέλο, εκτελούνται επαναληπτικοί κύκλοι με στόχο την ελαχιστοποίηση της  $D$ . Οι υπολογισμοί αυτοί είναι ιδιαίτερα κοπιώδεις και γίνονται με υπολογιστικά προγράμματα. Παρ' όλα αυτά, η έκταση των αθροισμάτων των μετατοπίσεων περιορίζεται από αυτό που καλείται “ακτίνα της σύγκλισης” της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων.

Αν π.χ. οι αρχικές τιμές για τα  $x_j$ ,  $y_j$ ,  $z_j$  είναι αρκετά μακριά από τις σωστές τιμές, δηλαδή το μοντέλο έχει σοβαρά σφάλματα, η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων μπορεί να μην έχει την ισχύ για να τις μετακινήσει κατά μεγάλες αποστάσεις. Έτσι τα άτομα μπορεί να μην λάβουν τις πραγματικές τους θέσεις. Δεύτερον, η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων προσπαθεί να ελαχιστοποιήσει τις διαφορές  $|F_{obs} - F_{calc}|^2$ , αλλά υπάρχουν πολλοί συνδυασμοί ατομικών συντεταγμένων που δίνουν το ίδιο ελάχιστο για αυτές τις διαφορές, όπως και το πραγματικό ελάχιστο. Αυτά καλούνται λανθασμένα ελάχιστα. Δεν είναι σπάνιο να “βρεθεί” ένα από αυτά τα τοπικά ελάχιστα και να κλειδώσει κάποιος σε αυτό. Όταν αυτό συμβαίνει, υπάρχει μικρή πιθανότητα να ξεφύγει η λύση και να αναζητηθεί αλλού ένα ακόμα πιο βαθύ ελάχιστο. Αυτό μετατρέπει τη βελτιστοποίηση σε μια πιο περίπλοκη διαδικασία από ότι θα αναμέναμε.

Θα πρέπει εδώ να αναφέρουμε ότι ο αριθμός των όρων που αθροίζονται είναι ανάλογος του αριθμού των  $F_{obs}$  που διαθέτουμε. Έτσι όσο υψηλότερη είναι η ανάλυση (resolution) στην οποία εκτείνονται τα δεδομένα, και επομένως υπάρχουν περισσότερες  $F_{obs}$ , τόσο πιο ισχυρή είναι η μέθοδος. Επιπρόσθετα, σε δεδομένα υψηλής ανάλυσης, οι διαφορές μεταξύ των  $F_{obs}$  και των  $F_{calc}$  γίνονται αυξημένα ευαίσθητες σε μικρές μετατοπίσεις στις συντεταγμένες θέσης και γι' αυτό τα δεδομένα αυτά οδηγούν σε πιο ακριβείς θέσεις των ατόμων.

## Κρυσταλλογραφική συνάρτηση-στόχος της Μέγιστης Πιθανοφάνειας (Maximum-likelihood)

Όπως προαναφέρθηκε, το αρχικό μοντέλο που χρησιμοποιείται για τη μέθοδο MR είναι ελλιπές και ανοικοδομείται σταδιακά κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης. Η ποιότητα του αρχικού μοντέλου μπορεί να εκτιμηθεί από την πιθανότητα να αναπαραχθούν οι πειραματικές τιμές των παραγόντων δομής έπειτα από τυχαία διόρθωση των ατομικών παραμέτρων και από την προσθήκη των ατόμων που λείπουν. Η μεγιστοποίηση της πιθανότητας αυτής, με την τροποποίηση των παραμέτρων του ελλιπούς μοντέλου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση του<sup>108</sup>. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται στα μαθηματικά ως μεγιστοποίηση της πιθανοφάνειας (Maximum-Likelihood, ML). Τα βήματα που ακολουθούνται στην κρυσταλλογραφία για τον προσδιορισμό, με αυτήν τη μέθοδο, των ατομικών θέσεων που λείπουν από το αρχικό μοντέλο, είναι σε γενικές γραμμές τα ακόλουθα: Θεωρούμε τις θέσεις αυτές ως τυχαία διανύσματα που κατανέμονται ενιαία στην μοναδιαία κυψελίδα. Οι νέες αυτές παράμετροι  $x_i$ ,  $y_i$ ,  $z_i$ , μαζί με τους θερμικούς τους παράγοντες  $B_i$ , συνοδεύονται από τυχαία σφάλματα  $s_A$ . Οι παράγοντες δομής που υπολογίζονται από αυτό, το τυχαία συμπληρωμένο μοντέλο, είναι πολύ πιθανό να προσεγγίζουν τις πειραματικές τιμές εάν οι νέες ατομικές θέσεις είναι κοντά στις σωστές, ενώ είναι απίθανο να βελτιώνονται ως προς τις πειραματικές τιμές εάν οι υποθέσεις για τις νέες ατομικές θέσεις είναι εντελώς λάθος.

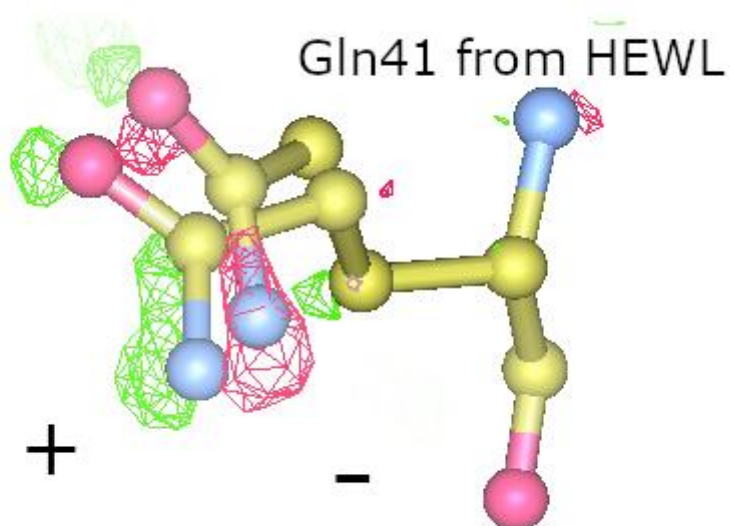
Στην μακρομοριακή κρυσταλλογραφία, η μέγιστη πιθανοφάνεια (ML) προτάθηκε πρώτα για να εκτιμήσουμε την ποιότητα των φάσεων των παραγόντων δομής και να υπολογίσουμε κατάλληλα βάρη (weights) για σύνθεση κατά Fourier από τους Lunin<sup>109</sup>, Bricogne<sup>110,111</sup> και τον Read<sup>112</sup>. Η χρησιμοποίηση της προσέγγισης της ML στην μακρομοριακή βελτιστοποίηση μοντέλου κατέστη λοιπόν δυνατή.

## Βελτιστοποίηση δομής στον ορθό χώρο: Σύνθεση διαφορικών Fourier

Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων  $x_i$ ,  $y_i$ ,  $z_i$  και  $B_i$  με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων πραγματοποιείται στον αντίστροφο χώρο, αφού, όπως προαναφέρθηκε, ελαχιστοποιεί τα  $|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|^2$  για όλα τα  $hkl$ . Στον ορθό χώρο, η βελτιστοποίηση των  $x_i$ ,  $y_i$ ,  $z_i$  πραγματοποιείται με ελαχιστοποίηση των διαφορών μεταξύ της ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τις  $F_{\text{obs}}$  (πειραματική  $\rho(x, y, z)$ ), και της ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τις  $F_{\text{calc}}$  ( $\rho(x, y, z)$  του μοντέλου).

$$\rho(x, y, z)_{expt} - \rho(x, y, z)_{model} = \sum_{hkl} (F_{obs} - F_{calc})_{hkl} \cos 2\pi(hx + ky + lz + \varphi_{calc-hkl})$$

όπου  $\varphi_{calc-hkl}$  για κάθε διαφορά υπολογίζεται από τις συντεταγμένες του μοντέλου<sup>102,106</sup>. Ο διαφορικός χάρτης Fourier που υπολογίζεται από αυτήν την εξίσωση πρέπει να είναι κοντά στο μηδέν στις περιοχές που το μοντέλο αντιστοιχεί στην σωστή δομή.



**Εικόνα 2.2:** Διαφορικός χάρτης Fourier  $F_o - F_c$ , όπου οι  $F_c$  έχουν υπολογιστεί από ένα μοντέλο που περιλαμβάνει μία πλευρική αλυσίδα Γλουταμίνης σε λάθος θέση. Η περιοχή αρνητικής διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας (κόκκινο χρώμα) υποδεικνύει τη θέση που λανθασμένα καταλαμβάνει η πλευρική αλυσίδα, ενώ η θετική πυκνότητα (πράσινο χρώμα) τη θέση όπου πρέπει να μετατοπιστεί η πλευρική αλυσίδα.

Ας εξετάσουμε, ως παράδειγμα, την περίπτωση που ερμηνεύοντας τον χάρτη της πρωτογενούς ηλεκτρονιακής πυκνότητας και κτίζοντας το μοριακό μοντέλο, είχαμε τοποθετήσει λάθος μία πλευρική αλυσίδα της Γλουταμίνης, όπως στην πάνω εικόνα. Σε αυτήν την περίπτωση ο διαφορικός χάρτης Fourier που αναπαρίσταται από κατάλληλα προγράμματα γραφικών εμφανίζει μία περιοχή αρνητικής πυκνότητας στη θέση της

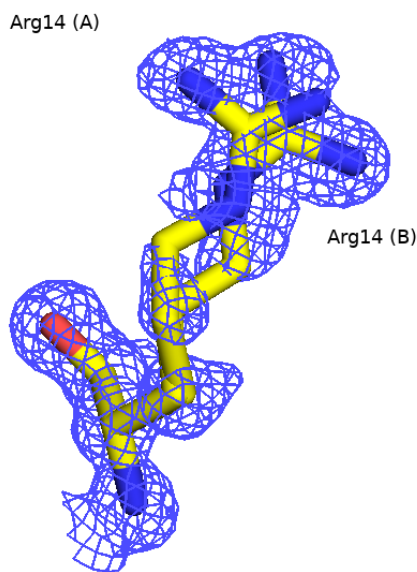
πλευρικής αλυσίδας της Γλουταμίνης ( $\Delta\rho = \rho(x, y, z)_{\text{πειραματική}} - \rho(x, y, z)_{\text{μοντέλου}} < 0$ ) και περιοχές θετικής πυκνότητας ( $\Delta\rho > 0$ ) στο σχήμα της πλευρικής αλυσίδας που αποκαλύπτουν τη σωστή, κοντινή περιοχή. Η μετακίνηση της πλευρικής αλυσίδας, από την αρνητική πυκνότητα, εντός της θετικής πυκνότητας, γίνεται χειροκίνητα (manual rebuild) με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων αναπαράστασης και χειρισμού της δομής.

Η εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων στον αντίστροφο χώρο, δεν καταφέρνει σε αυτό το παράδειγμα, να μετακινήσει τα άτομα της πλευρικής αλυσίδας της Γλουταμίνης στη σωστή τους θέση και να αποφέρει το ίδιο αποτέλεσμα. Οι αλλαγές που έγιναν χειροκίνητα, είναι μεγάλης έκτασης και υπερβαίνουν τη λεγόμενη “ακτίνα της σύγκλισης” της μεθόδου. Από την άλλη μεριά, τα βήματα βελτιστοποίησης στον αντίστροφο χώρο βελτιώνουν τους χάρτες διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας στον ορθό χώρο και κάνουν διευκολύνουν την ερμηνεία και τη χρήση τους για την ανοικοδόμηση των μοντέλων της δομής. Έτσι, η βελτιστοποίηση της δομής γίνεται, όπως προαναφέρθηκε, με εναλλαγή του χειρισμού της στον ορθό χώρο και στον αντίστροφο χώρο. Στο τέλος της διαδικασίας βελτιστοποίησης επιτυγχάνονται οι χαμηλότεροι δυνατοί δείκτες R-factor και  $R_{\text{free}}$  και καθαροί διαφορικοί χάρτες Fourier.

## **Εύρεση και προσδιορισμός εναλλακτικών διαμορφώσεων**

Στις περιπτώσεις που τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα είναι υψηλής (ατομικής) ευκρίνειας, όπως στις δομές που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή, η βελτιστοποίηση του μοντέλου της κρυσταλλικής δομής περιλαμβάνει την εύρεση και τον προσδιορισμό εναλλακτικών διαμορφώσεων για ορισμένα αμινοξικά κατάλοιπα. Οι εναλλακτικές διαμορφώσεις μπορεί να ανιχνευτούν όχι μόνο για τις πλευρικές αλυσίδες, αλλά επίσης και για τμήματα της κύριας αλυσίδας, και εκφράζονται με συμπληρωματικούς, κλασματικούς, βαθμούς κατάληψης των ατομικών θέσεων. Η μοντελοποίηση των εναλλακτικών διαμορφώσεων αυξάνει την ακρίβεια των υπολογισμένων παραγόντων δομής και έχει ως αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας και τη συμφωνία τους με το μοντέλο σε όλη την μοναδιαία κυψελίδα. Η εμφάνιση εναλλακτικών διαμορφώσεων σχετίζεται με τη θερμική κίνηση αλλά και αρκετές φορές με τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η ανίχνευση των καταλοίπων που είναι παρόντα σε εναλλακτικές διαμορφώσεις είναι χρονοβόρα και απαιτεί οπτική αναγνώριση των χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας από έναν έμπειρο κρυσταλλογράφο.





**Εικόνα 2.3:** Παρουσιάζονται οι δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις (A) και (B), για την Arg14 της Λυσοζύμης στη δομή PDB: 7BCU.

### **Ανώμαλη σκέδαση ακτίνων-Χ**

Μία τεχνική για τον προσδιορισμό των φάσεων, που επίσης εξαρτάται σε παρατηρούμενες μικρές αλλαγές στην σκεδαζόμενη ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, από βαρέα κυρίως άτομα, είναι η ανώμαλη σκέδαση ακτίνων-Χ. Όταν η σκεδαζόμενη ακτινοβολία έχει την ίδια συχνότητα με την προσπίπτουσα ακτινοβολία λέμε ότι έχουμε σκέδαση συνοχής (coherence scattering) στην οποία οφείλονται τα φαινόμενα περίθλασης. Όταν, όμως η ενέργεια των φωτονίων της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι κοντινή με την ενέργεια μετάπτωσης των ατομικών ηλεκτρονίων σκέδασης, η ένταση της σκέδασης ελατώνεται επειδή μικρή ενέργεια απορροφάται για την μετάπτωση. Αυτό το φαινόμενο καλείται ανώμαλη σκέδαση. Η ενέργεια μετάπτωσης είναι η ενέργεια που απαιτείται για να μετακινηθεί ένα ηλεκτρόνιο εκτός από το τροχιακό του ατόμου, είτε για να το αποβάλλει εντελώς από το άτομο είτε για να το μεταφέρει σε ένα μη κατελειμμένο τροχιακό υψηλότερης ενέργειας. Ο παράγοντας ατομικής απορρόφησης αλλάζει απότομα σε κάποιο μήκος κύματος που ονομάζεται «άκρη απορρόφησης» (absorption edge) (Εικόνα 2.4). Η ανώμαλη σκέδαση εμφανίζεται κοντά στις άκρες απορρόφησης. Εφόσον μερική προσπίπτουσα ακτινοβολία χρησιμοποιείται για να δημιουργηθούν μεταπτώσεις στα

ηλεκτρόνια των ατόμων, ή συνολική σκέδαση συνοχής σε αυτά τα μήκη κύματος ελατώνεται. Έτσι, ο παράγοντας ατομικής σκέδασης σε κάθε μήκος κύματος μπορεί να γραφτεί ως εξής:

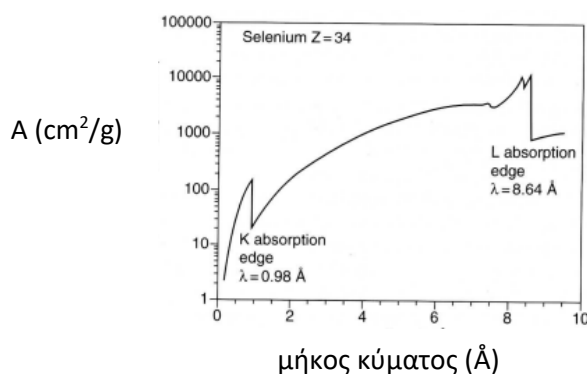
$$f(\lambda) = f_0 - \delta f'(\lambda) + i f''(\lambda), \quad (1)$$

όπου  $f_0$  είναι ο κανονικός παράγοντας ατομικής σκέδασης μακριά από την άκρη απορρόφησης,  $\delta f'(\lambda)$  είναι το ποσό που ελατώνεται ο κανονικός παράγοντας σκέδασης σε μήκος κύματος  $\lambda$ , και  $f''(\lambda)$  είναι το ποσό της «ανώμαλης σκέδασης», το συστατικό της «εκτός φάσης» σκέδασης, στο συγκεκριμένο μήκος κύματος  $\lambda$ .

Για συντόμευση, το πραγματικό μέρος του παράγοντα ατομικής σκέδασης γράφεται  $f'$ , και η (1) μπορεί να γραφεί ως:

$$f = f' + i f'', \quad (2)$$

Πρακτικά, σε μήκη κύματος ακτίνων-X που χρησιμοποιούνται για πειράματα περίθλασης (μικρότερα του 1.6 Å), τα άτομα που είναι ελαφρύτερα από τον φώσφορο και το θείο συμπεριφέρονται ως κανονικοί σκεδαστές επειδή δεν έχουν ηλεκτρονικές μεταπτώσεις σε αυτά τα μήκη κύματος. Σε μήκη κύματος πολύ κοντά στην ενέργεια μίας ηλεκτρονικής μετάπτωσης, η ανώμαλη σκέδαση μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό των φάσεων.



**Εικόνα 2.4:** Φάσμα απορρόφησης ακτίνων-X του Σεληνίου (Se) σε ένα εύρος μηκών κύματος. Η Κ άκρη απορρόφησης στα 0.98 Å είναι κατάλληλη για κρυσταλλογραφική μελέτη. Δεδομένα από το Brookhaven National Laboratory ([physics.nist.gov/PhysRefData](http://physics.nist.gov/PhysRefData)).

## Διάγραμμα Ramachandran

Τα μήκη δεσμών, οι γωνίες δεσμών, και οι γωνίες στρέψης (δίεδρες) είναι πολυσυζητημένες έννοιες στην γεωμετρική περιγραφή της πρωτεϊνικής δομής και είναι απαραίτητες για την κρυσταλλογραφική επίλυση μιας πρωτεϊνικής δομής. Ως μήκος δεσμού  $d_{AB}$  ορίζεται η απόσταση μεταξύ των κέντρων δύο ατόμων A και B. Μεταξύ τριών ατόμων A, B και Γ, η γωνία δεσμού  $\gamma_{AB}$  μπορεί να μετρηθεί και μεταξύ τεσσάρων συνεχόμενων ατόμων, ορίζεται η γωνία στρέψης  $\tau_{AB\Gamma\Delta}$ . Η γωνία στρέψης είναι ισοδύναμη με την δίεδρη γωνία μεταξύ των επιπέδων ABΓ και ΒΓΔ και υπολογίζεται μέσω της γωνίας των κανονικών διανυσμάτων αυτών των επιπέδων. Αν ιδωθεί από την διεύθυνση του επιπέδου ABΓ κατά μήκος του άξονα ΒΓ, μία στρέψη προς τα δεξιά (σύμφωνα με τους δείκτες του ρολογιού), αυτή ορίζεται ως θετική (0 ως  $180^\circ$ ), και προς τα αριστερά ως αρνητική (0 ως  $-180^\circ$ ). Οι γωνίες στρέψης της κύριας αλυσίδας ορίζουν την διαμόρφωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Ένα δισδιάστατο διάγραμμα των ζευγών των γωνιών στρέψης  $\phi$  και  $\psi$  για κάθε αμινοξύ δείχνει συγκεκριμένες προτιμήσεις περιοχών που συναθροίζονται. Μία τέτοια αναπαράσταση των ζευγών των γωνιών στρέψης  $\phi$  και  $\psi$  ονομάζεται διάγραμμα Ramachandran.

Το διάγραμμα Ramachandran αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της δομής επειδή αποκαλύπτει με εύκολο τρόπο τη γεωμετρία της κύριας αλυσίδας της πρωτεΐνης.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Κεφάλαιο 3

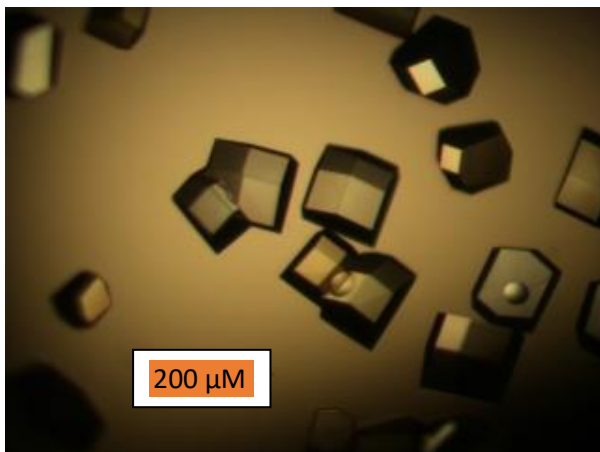
#### Η δομή της Λυσοζύμης (Hen Egg White Lysozyme-HEWL) με την ένωση συναρμογής [Ru<sup>II</sup>([9]aneS<sub>3</sub>)(en)Cl][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] (RuTE-Cl)

#### 3.1 Κρυστάλλωση

Η ένωση συναρμογής [Ru<sup>II</sup>([9]aneS<sub>3</sub>)(en)Cl][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] (RuTE-Cl) συντέθηκε όπως περιγράφεται στην βιβλιογραφία <sup>113</sup>. Η HEWL (L7651) αγοράστηκε από την Sigma και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Οι κρύσταλλοι της HEWL αναπτύχθηκαν με την μέθοδο της διάχυσης των ατμών και πιο συγκεκριμένα με την μέθοδο της καθήμενης σταγόνας σε θερμοκρασία δωματίου, σε πιάτα 96-θέσεων (Molecular Dimensions, UK). Η λυοφυλιωμένη σκόνη της HEWL διαλύθηκε σε νερό σε τελική συγκέντρωση 20 mg/mL, και 2 μL του διαλύματος της πρωτεΐνης αναμίχθηκε με ίσα μέρη του διαλύματος από το πηγάδι (reservoir) που περιέχει 0.8-1.5M διαλύματος χλωριούχου νατρίου και 0.1M διαλύματος οξικού νατρίου ρυθμισμένο σε pH = 4.5. Τετραγωνικοί κρύσταλλοι εμφανίστηκαν την ίδια μέρα και αναπτύχθηκαν σε πλήρες μέγεθος μέσα σε 3 μέρες.

Η εμφάνιση των κρυστάλλων της HEWL στο RuTE-Cl πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη μικρών ιχνοποσοτήτων στις σταγόνες των κρυστάλλων <sup>114</sup>. Ένας σημαντικός χρωματισμός των κρυστάλλων παρατηρήθηκε, από άχρωμοι σε κίτρινοι, μέσα σε 10 λεπτά έπειτα από την προσθήκη του RuTE-Cl στο ένζυμο. Έπειτα από 1 ώρα από την προσθήκη του RuTE-Cl, ένας μονοκρύσταλλος τοποθετήθηκε σε βρόγχο silicone loop (Hampton Research, USA) και κρυο-προστατεύτηκε με ταχεία εμφάνιση σε ένα διάλυμα που περιείχε τον κατακρημνιστή και 20% (v/v) 1,2-αιθανοδιόλη. Ακόλουθα, ο κρύσταλλος πάγωσε ακαριαία σε υγρό άζωτο και στάλθηκε μέσα σε ένα ειδικό δοχείο Taylor-Wharton CX100 στις εγκαταστάσεις του συγχρότρου Petra III, DESY, Hamburg, Germany.



**Εικόνα 3.1:** Κρύσταλλοι της Λυσοζύμης

Η δομή του συμπλόκου της HEWL-RuTE επιλύθηκε με την μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης με το πρόγραμμα PHASER<sup>115</sup> χρησιμοποιώντας ως δομή πρότυπο (search model) την ελεύθερης υποκαταστατών δομή της HEWL (PDB ID 193L)<sup>79</sup>. Η δομή βελτιστοποιήθηκε με το πρόγραμμα PHENIX<sup>116</sup> χρησιμοποιώντας βελτιστοποίηση θέσης (positional refinement) και εφαρμόζοντας βελτιστοποίηση TLS στα τελικά στάδια. Η θεμελίωση του μοντέλου και η βελτιστοποίηση στον ορθό χώρο πραγματοποιήθηκαν με το COOT<sup>117</sup>, ενώ οι γεωμετρικοί περιορισμοί για το RuTE-Cl (CCDC κώδικας πρόσβασης: 265999)<sup>113</sup> ελήφθησαν χρησιμοποιώντας την εφαρμογή eLBOW του προγράμματος PHENIX. Το όριο για την υψηλότερη διακριτική ικανότητα των κρυσταλλογραφικών δεδομένων από την περίθλαση των ακτίνων-X στον μονοκρύσταλλο, καθορίστηκε βάσει της απαίτησης *redundancy* > 2.0. Η συνολική γεωμετρία του βελτιστοποιημένου μοντέλου ήταν εξαιρετική, με το 100% των καταλοίπων να βρίσκονται μέσα στα όρια των Ramachandran ευνοϊκών ή επιτρεπόμενων περιοχών, και εμφάνισε τιμή του MolProbity<sup>118</sup> στο 1.56 για το σύμπλοκο HEWL-RuTE. Το PyMOL<sup>119</sup> και το VMD<sup>120</sup> χρησιμοποιήθηκαν για την δομική ανάλυση και για τη δημιουργία των εικόνων.

**Πίνακας 3.1:** Η αναλυτική πορεία επίλυσης-βελτιστοποίησης της δομής HEWL/RuTE.

Είδος βελτιστοποίησης		R <sub>factor</sub>	R <sub>free</sub>
Άκαμπτο σώμα (rigid body) (Phenix)	3 κύκλοι	32.47	35.03
Ανοικοδόμηση μοντέλου (COOT)			
Βελτιστοποίηση θέσης (Phenix)	3 κύκλοι	31.49	34.52
Ανοικοδόμηση μοντέλου (COOT)			
Βελτιστοποίηση θερμικών παραγόντων (Phenix)	3 κύκλοι	31.08	34.09
Προσθήκη δομικών μορίων νερού (Phenix) και συνδυαστική	3 κύκλοι	24.98	26.01

βελτιστοποίηση θέσης-θερμικών παραγόντων			
Προσθήκη υποκαταστατών (Phenix) και συνδυαστική βελτιστοποίηση θέσης-θερμικών παραγόντων TLS	3 κύκλοι	22.36	24.44
Βελτιστοποίηση αριθμού κατάληψης	3 κύκλοι	22.08	24.14

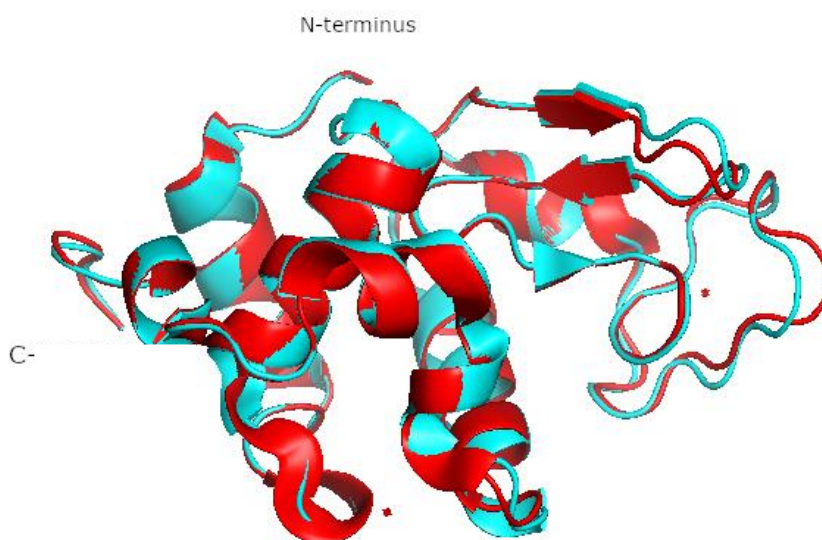
**Πίνακας 3.2:** Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων και στατιστικά βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο  $\{\text{Ru}^{\text{II}}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\}^{2+}$  (RuTE) με την HEWL. *RMSD* είναι η τετραγωνική ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης και οι τιμές στις παρενθέσεις είναι οι τιμές για τον φλοιό της υψηλότερης διακριτικής ικανότητας.

<b>HEWL–RuTE</b>	
<i>Συλλογή δεδομένων</i>	
Ομάδα χώρου	<i>P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2</i>
Διαστάσεις κυψελίδας (Å)	
<i>a</i>	79.27
<i>b</i>	79.27
<i>c</i>	35.91
Διακριτική ικανότητα (Å)	35.45–1.395 (1.445–1.395)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	2.074 (18.11)
<i>CC</i> <sub>1/2</sub>	0.999 (0.939)
Μέση <i>I</i> / $\sigma(I)$	15.0 (3.7)
Πληρότητα (%)	98.44 (95.35)
Πλεονασμός (Redundancy)	2.0 (2.0)
<i>Βελτιστοποίηση δομής</i>	
Διακριτική ικανότητα (Å)	35.45–1.395
Wilson <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )	18.63
Πλήθος μοναδικών ανακλάσεων	23111
Πλήθος TLS ομάδων	10
<i>R</i> <sub>work</sub> (%)	22.08
<i>R</i> <sub>free</sub> (%)	24.14
Συνολικός αριθμός ατόμων	1149
Πρωτεϊνικά άτομα	1006

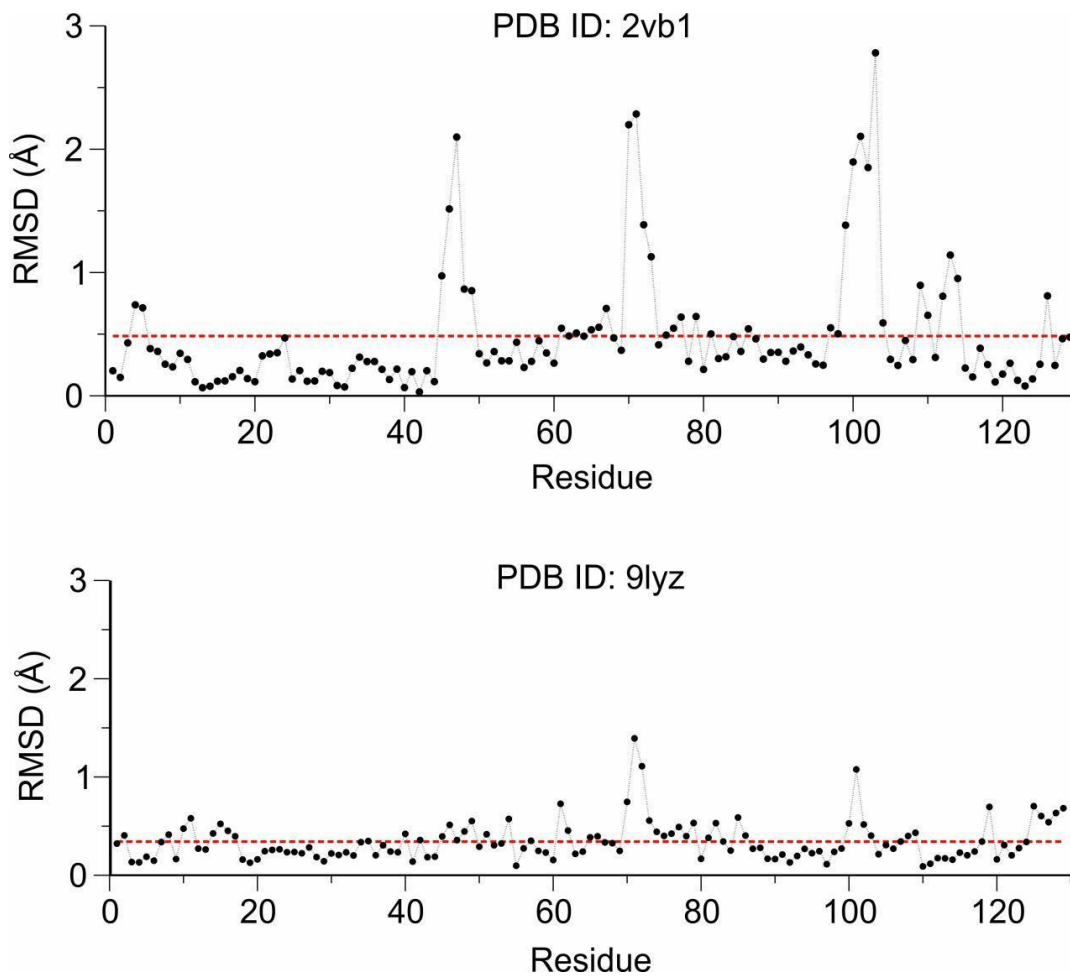
Μόρια διαλύτη	117
Μόρια ένωσης Ru(II)	1
<i>Μέσοι B-factors</i> ( $\text{\AA}^2$ )	
Συνολικά	29.1
Πρωτεΐνη	28.1
Διαλύτης	36.3
Ένωση συναρμογής	30.9
$RMSD_{\text{bonds}}$ ( $\text{\AA}$ )	0.020
$RMSD_{\text{angles}}$ ( $^\circ$ )	2.09
<i>PDB ID</i>	6TVL

### 3.2 Επαλληλία δομών της HEWL

Στην Εικόνα 3.2 φαίνεται (αναπαράσταση cartoon) η δομή της Λυσοζύμης (γαλάζιο), όπως προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά στο σύμπλοκο της με το RuTE (PDB ID: 6TVL), σε υπέρθεση με την κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη σε υπερ-υψηλή διακριτική ικανότητα ( $0.65 \text{ \AA}$ , PDB ID: 2VB1) δομή της ελεύθερης Λυσοζύμης (κόκκινο).



**Εικόνα 3.2:** Υπέρθεση της κρυσταλλικής δομής της ελεύθερης υποκαταστάτη (2vb1) Λυσοζύμης (κόκκινο) με την δεσμευμένη με την ένωση συναρμογής του Ru(II) (RuTE) (γαλάζιο).



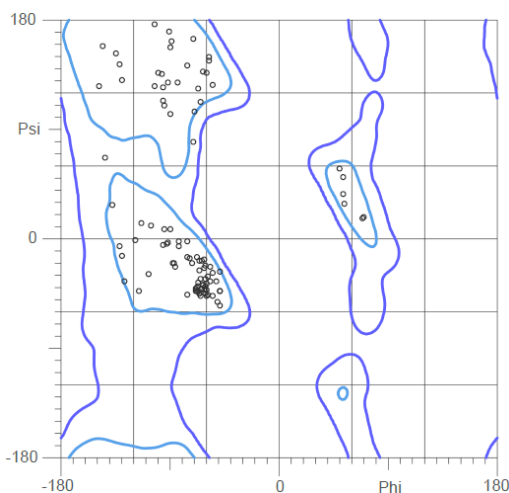
**Εικόνα 3.3:** Αποκλίσεις θέσης RMSD των  $C\alpha$  ατόμων που υπολογίστηκαν από την υπέρθεση της κρυσταλλικής δομής HEWL-RuTE (PDB ID: 6TVL) με την υπερυψηλής διακριτικής ικανότητας δομής της ελεύθερης υποκαταστάτη HEWL (PDB ID: 2VB1) (επάνω διάγραμμα), και επίσης της δομής της HEWL με προσδεμένο έναν τρισακχαρίτη (PDB ID: 9LYZ) (κάτω διάγραμμα).

Από την εικόνα 3.3 παρατηρούμε την απόκλιση θέσης για άτομα  $C\alpha$ . Γενικά οι αποκλίσεις θέσης τόσο για την υπερυψηλής διακριτικής ικανότητας δομή όσο και για την προσδεμένη με έναν τρισακχαρίτη είναι μικρές (0.4 – 0.5 Å).



### 3.3 Διάγραμμα Ramachandran

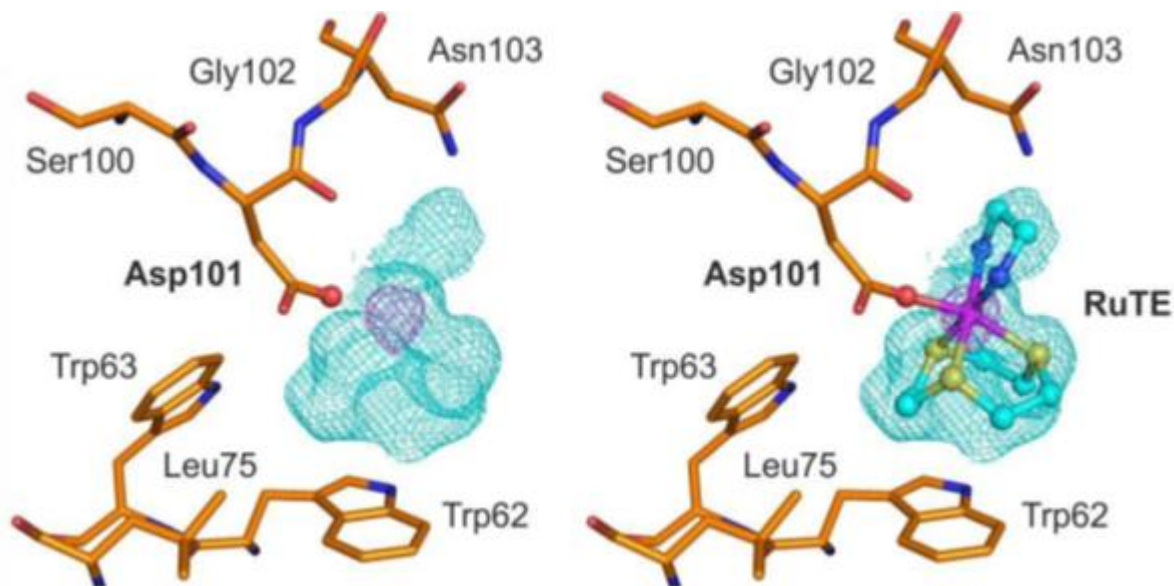
Για την κρυσταλλική δομή 6TVL σχεδόν όλα τα κατάλοιπα είναι σε ευνοϊκές θέσεις στο διάγραμμα Ramachandran, ενώ 1 κατάλοιπο είναι σε λιγότερο ευνοϊκή θέση, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 3.4.



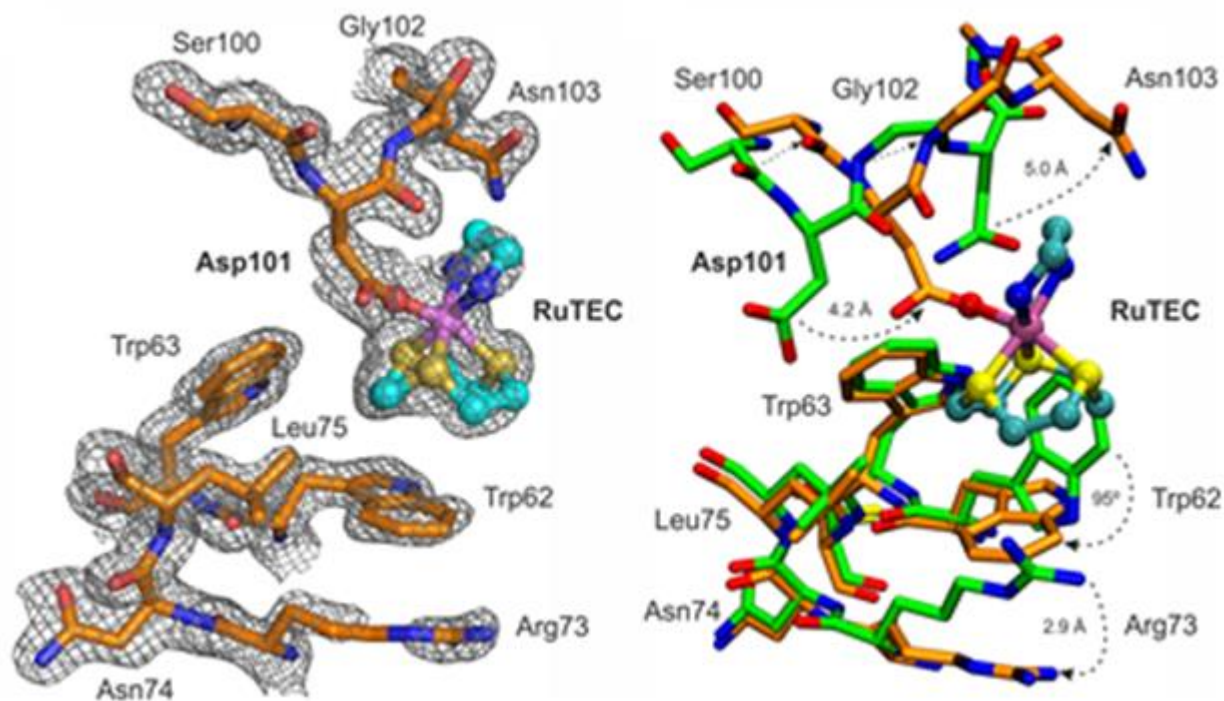
**Εικόνα 3.4:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 6TVL. Όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (99.21% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.49 με όριο το 2.

### 3.4 Αποτελέσματα

Η κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένη δομή του συμπλόκου αποκαλύπτει τις επαγόμενες από τον υποκαταστάτη (ligand-induced), αλλαγές στη διαμόρφωση της καταλυτικής περιοχής της HEWL, που απαιτούνται για να προσδέσουν το  $\{\text{Ru}^{\text{II}}([\text{9}]\text{aneS}_3)(\text{en})\}^{2+}$  τμήμα (RuTE). Αναδεικνύεται έτσι, η σημασία συγκεκριμένων αμινοξικών καταλοίπων της καταλυτικής περιοχής της HEWL, στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και υδροφοβικών/αρωματικών αλληλεπιδράσεων για την πρόσδεση του RuTE. Η σύγκριση με παρόμοια σύμπλοκα Ru(II)-πρωτεϊνών προτείνει έναν εμφανή ρόλο των υποκαταστατών στις ενώσεις συναρμογής Ru(II) για την πρόσδεση τους σε συγκεκριμένες θέσεις (site-specific), στις οποίες καθοδηγούνται από το ηλεκτροστατικό δυναμικό της επιφάνειας του ενζύμου.

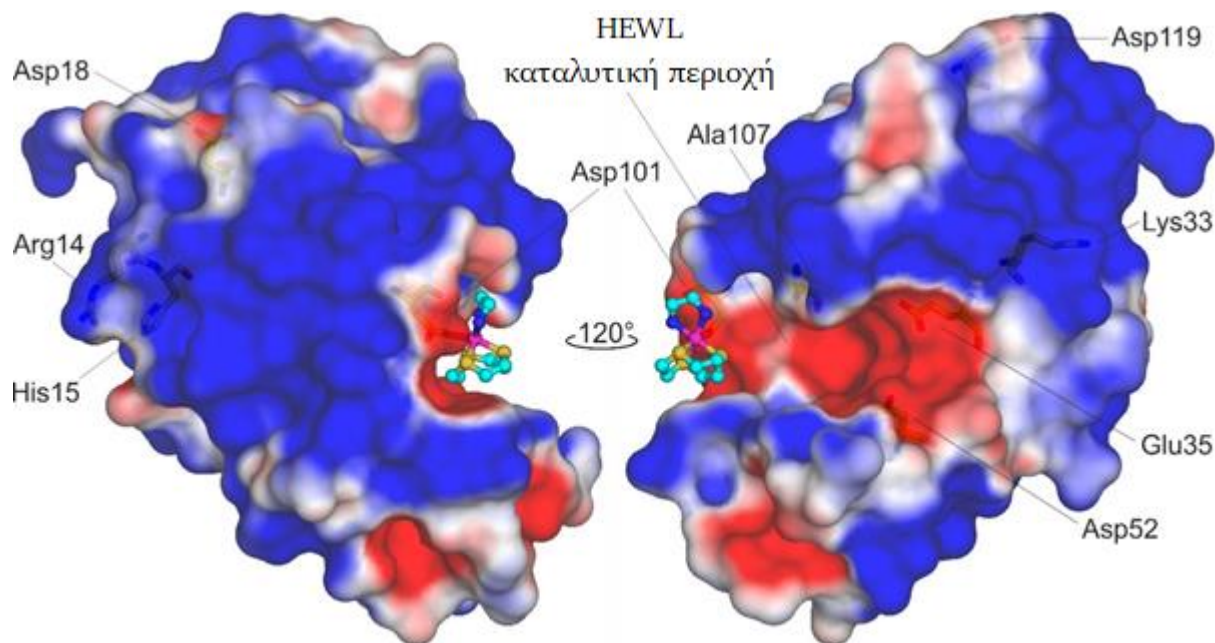


**Εικόνα 3.5:** α) Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του RuTE στην περιοχή του αμινοξικού καταλοίπου Asp101 (αριστερά) χωρίς το μοντέλο του φαρμάκου (αριστερά), και μετά την μοντελοποίηση του φαρμάκου (δεξιά) στον αρχικό (unbiased) διαφορικό χάρτη  $F_o - F_c$  (μπλε χρώμα) και στο διαφορικό χάρτη ανώμαλης σκέδασης (μωβ χρώμα). Οι θέσεις των βαρέων μετάλλων προκύπτουν με μεγάλη ακρίβεια περίπου ίσης με  $0.01 \text{ \AA}$ , με συνδυασμό των δύο χαρτών.



**Εικόνα 3.6:** (αριστερά) Χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας για το προσδεμένο RuTE και τα γειτονικά αμινοξέα και (δεξιά) σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης του RuTE στο κατάλοιπο Asp101 της HEWL (πράσινο) σε υπέρθεση με τη δομή ελεύθερη-υποκαταστάτη HEWL (πορτοκαλί).

Είναι εμφανείς οι μετατοπίσεις συγκεκριμένων καταλοίπων (Trp62 κατά 95°, Arg73 κατά 2.9 Å, Asp101 κατά 4.2 Å και Asn103 κατά 5.0 Å) για να επιτευχθεί η πρόσδεση του RuTE στην HEWL.



**Εικόνα 3.7:** Προσβάσιμη επιφάνεια στο διαλύτη (Solvent accessible surface, SAS) της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου HEWL-RuTE με υπολογισμένο το ηλεκτροστατικό δυναμικό. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο με το RuTE στο κατάλοιπο Asp101 και άλλες θέσεις μετάλλωσης του Ρουθηνίου φαίνονται στην εικόνα με βέλη, όπως επίσης και τα δύο όξινα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου HEWL (Glu35 και Asp52). Το RuTE προσδένεται στο τέλος του καταλυτικού καναλιού που έχει ως αρχή τα κατάλοιπα Glu35 και Asp52. Στην επιφάνεια είναι υπολογισμένο το ηλεκτροστατικό δυναμικό με αρνητικές τιμές των  $-1 kT/e$  με κόκκινο, ουδέτερο με λευκό, και  $+1 kT/e$  με μπλε.

### 3.5 Συζήτηση

Πρόσφατες μελέτες δύο ενώσεων συναρμογής του Ru(II)-αρενίου έδειξαν ότι το RAPTA-C και το RAED-C (Εικόνες 1.3 και 1.5) στοχεύουν την χρωματίνη με διαφορετική εκλεκτικότητα<sup>121,122</sup> Ενώ το RAPTA-C πρωταρχικά συνδέεται με τις πρωτεΐνες ιστόνες, το RAED-C στοχεύει το τμήμα πρόσδεσης του DNA στην χρωματίνη, ενώ μοιράζονται μία κοινή θέση πρόσδεσης στις ιστόνες. Η διαφορετική εκλεκτικότητα των RAPTA-C και

RAED-C κυρίως αποδόθηκε σε στερικούς περιορισμούς του ογκώδους υποκαταστάτη φωσφοαδαμαντάνιου του RAPTA-C, και επίσης αυτός είναι ο λόγος που σχετίστηκε με τις διακριτές διαφορές στην κυτοτοξικότητα των ενώσεων. Ενώ το RAED-C εμφανίζει υψηλή κυτοτοξικότητα σε πρωταρχικούς όγκους συγκρινόμενης με αυτή του cisplatin, το RAPTA-C εμφανίζει χαμηλή κυτοτοξικότητα σε αυτούς τους όγκους αλλά εμφανίζει αντι-μεταστατικές ιδιότητες<sup>58,123</sup>. Γι' αυτό έχει προταθεί ότι ενώσεις συναρμογής με τροποποιήσεις στην δομή του υποκαταστάτη ή στην ικανότητα για συναρμογή του Ru(II) μπορούν να ρυθμίσουν την στοχευτική ενεργότητα σε DNA/πρωτεΐνες και έτσι να ρυθμιστεί το κυτοτοξικό δυναμικό τους.

Από την παρούσα δομική διερεύνηση διευκρινίζεται ο ρόλος των υποκαταστατών στην ένωση συναρμογής του Ru(II), RuTE-Cl, στην οποία το τμήμα του αρενίου στις RAED έχει αντικατασταθεί από τον υποκαταστάτη [9]aneS<sub>3</sub>, για την πρόσδεσή της στην Λυσοζύμη αφενός και στην Πρωτεΐνωση K αφετέρου. Η δομή που προέκυψε από τον εμβαπτισμό των κρυστάλλων της Λυσοζύμης με RuTE-Cl, έδειξε ένα μόνο RuTE-Cl συνδεδεμένο στην πλευρική αλυσίδα του Asp101. Με την υδρόλυση του υποκαταστάτη χλωρίου, το θετικά φορτισμένο τμήμα (+2e) του RuTE προσδένεται στην καρβοξυλική ομάδα του Asp101. Η πρόσδεση του RuTE προσφέρει ως ενδιάμεσο μία αλλαγή διαμόρφωσης στο καταλυτικό κέντρο αυτό, παρόμοια με αυτή που παρατηρείται κατά την πρόσδεση του υποστρώματος στην Λυσοζύμη. Ο υποκαταστάτης αιθυλενοδιαμίνη (en, ethylenediamine) προσδένεται με μία μετατόπιση στην πλευρική αλυσίδα της Asn103, ενώ ο υποκαταστάτης [9]aneS<sub>3</sub> «πακετάρεται» κάτω από τον ινδολικό δακτύλιο της Trp63 και την Leu75. Μία ενδεδειγμένη εξέταση του ηλεκτροστατικού δυναμικού επιφάνειας της HEWL δείχνει ότι αν και συνολικά το ένζυμο συνίσταται από μία θετικά φορτισμένη επιφάνεια, η θέση του RuTE βρίσκεται στο όξινο Asp101, το οποίο αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου που συμπεριλαμβάνει επίσης και το κατάλοιπα Glu35 και Asp52.

Από τη συγκριτική μελέτη με σχετικές δομές συμπλόκων ένωσης συναρμογής Ru(II)/HEWL, προκύπτουν οι ακόλουθες παρατηρήσεις-συμπεράσματα:

Στο σύμπλοκο Ru(II)-αρενίου/HEWL (πρώτη κρυσταλλική δομή συμπλόκου ένωσης συναρμογής Ru(II)/HEWL που παρουσιάστηκε) το ουδέτερο τμήμα [Ru<sup>II</sup>(η<sup>6</sup>-p-cymene)Cl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)] σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το N<sup>ε1</sup> της His15, την μοναδική Ιστιδίνη της Λυσοζύμης<sup>124</sup>. Σε αυτή τη θέση, το ουδέτερο τμήμα του Ru(II) προσδένεται σε μία θετικά φορτισμένη περιοχή, με το αρένιο να εμφανίζει αλληλεπιδράσεις με τις πλευρικές αλυσίδες των Arg14 και Asp87. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, παρόλ'αυτά, η ανάλυση με

φασματομετρία μάζης ICP-MS έδειξε περισσότερα από μία θέσεις πρόσδεσης στην HEWL<sup>124</sup>.

Μια πιο πρόσφατη κρυσταλλογραφική μελέτη μετάλλωσης της HEWL από διπυρηνικά οργανομεταλλικές ενώσεις συναρμογής του τύπου  $[M(\eta^6\text{-p-κυμένιο})X_2]_2$  [ $M = \text{Ru(II)}$  ή  $\text{Os(II)}$ ,  $X = \text{αλογόνο}$ ], αποκάλυψε μια επιλεκτική αλληλεπίδραση των ουδέτερα φορτισμένων  $\{M(\eta^6\text{-p-κυμένιο})Cl_2\}$  τμήματος με την His15<sup>125</sup>. Ενδιαφέρον αποτελεί το ότι βρέθηκε μια δεύτερη θέση πρόσδεσης, όπου το φορτισμένο τμήμα  $\{(\eta^6\text{-p-κυμένιο}) Ru(\mu\text{-}Cl_2) Ru\}^{3+}$  προσδέθηκε στο Asp101 που γεφυρώνει τα δύο κέντρα Ru. Αν και αυτή η θέση πρόσδεσης που προτάθηκε είναι ασθενέστερη, αφού η ένωση συναρμογής βελτιστοποιήθηκε με 0,5 πληρότητα, η παρατήρηση της παρέχει την ένδειξη ότι το φορτίο των θραυσμάτων Ru μπορεί να διαμορφώσει την εκλεκτικότητα στη θέση πρόσδεσης και μετάλλωσης.

Σε μία μεταγενέστερη μελέτη, η ίδια ομάδα παρουσίασε την πρώτη κρυσταλλογραφική δομή του συμπλόκου Ru-καρβενίου με την HEWL χρησιμοποιώντας το  $[Ru^{II}(\eta^6\text{-p-κυμένιο})(dmb)Cl_2]$  ( $dmb = 1,3\text{-διμεθυλβενζιμιδαζολ-2-υλιδένιο}$ ) όπου τρεις διακριτές θέσεις πρόσδεσης αναγνωρίστηκαν<sup>126</sup>. Στην πρώτη θέση πρόσδεσης, το  $\{RuCl_2(dmb)(OH_x)\}$  συναρμόστηκε τόσο στις πλευρικές αλυσίδες της Arg14 όσο και της His15, ενώ στη δεύτερη θέση πρόσδεσης, σχηματίστηκε ένα σύμπλοκο του  $\{RuCl_2(dmb)(OH_x)_2\}$  με την πλευρική αλυσίδα της Lys33 (αμινομάδα). Μία τρίτη θέση πρόσδεσης προσδιορίστηκε με το τμήμα  $\{RuCl(OH_x)_4\}$  εμφανίζοντας ασθενείς αλληλεπιδράσεις με την Ala107<sup>125</sup>. Επειδή το συνολικό φορτίο των συμπλόκων του Ru δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια (το μεταλλικό κέντρο έχει δείξει ότι οξειδώνεται με την ανταλλαγή του αρενίου, όπως επίσης και η φύση των συναρμοσμένων  $H_2O$  ή  $OH^-$  δεν έχει προσδιοριστεί), δεν μπορεί να γίνει συσχέτιση μεταξύ του φορτίου και της εκλεκτικότητας. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ξεκάθαρα ότι διαφορετικά τμήματα μορίου στοχεύουν διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης.

Ομοίως, τα σύμπλοκα της HEWL με τις ενώσεις που απελευθερώνουν μονοξείδιο του άνθρακα έχουν δείξει ότι προσδένονται σε πολλαπλές θέσεις στο ένζυμο, με την His15 να διακατέχει την κυρίαρχη θέση πρόσδεσης. Πιο συγκεκριμένα, η εμβάπτιση (soaking) της HEWL με το  $fac\text{-}[Ru^{II}(CO)_3Cl(\kappa^2\text{-}H_2NCH_2CO_2)]$  είχε ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό τριών συμπλόκων του τμήματος  $cis\text{-}\{Ru^{II}(CO)_2(H_2O)_3\}^{2+}$  να προσδέεται στα κατάλοιπα His15, Asp18, και Asp52, με αριθμούς κατάληψης 0.8, 0.5 και 0.4, αντίστοιχα<sup>127</sup>.

Σε μία επακόλουθη μελέτη, η αντίδραση της HEWL με μία σειρά καρβονυλικών ενώσεων συναρμογής του Ru του γενικού μοριακού τύπου  $fac\text{-}[Ru^{II}(CO)_3Cl_2L]$  ( $L = \text{ουδέτερος μονοσχιδής υποκαταστάτης}$ ) αποκάλυψε πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης του Ρουθηνίου, ακόμα

εμφανίζοντας την His15 ως πρωταρχική θέση πρόσδεσης (με αριθμούς κατάληψης 0,7-1,0), και με τα Asp18, Asp52, Asp101, και Asp119 να αναγνωρίζοντας ως δευτερεύουσες θέσεις. (αριθμοί κατάληψης 0,4-0,7) <sup>128</sup>. Μία πιο πρόσφατη κρυσταλλογραφική μελέτη των Ru(II) καρβόνυλο ενώσεις του ίδιου γενικού τύπου, όπου L = N<sub>3</sub>-ιμιδαζόλιο ή N<sub>3</sub>-μεθυλιμιδαζόλιο <sup>129</sup> έδειξε ότι κατά την διάσπαση του υποκαταστάτη του αζολίου, των δύο χλωρίων και ενός από τα δύο μόρια του μονοξειδίου του άνθρακα (CO), οι ενώσεις προσδένονται στην HEWL στα κατάλοιπα His ή Asp (His15, Asp18, Asn46 και Asp52, Asp119 και Arg125, ή το καρβοξυ-τελικό άκρο της Leu129) <sup>130</sup>. Για όλα τα σύμπλοκα της HEWL, η His15 αναγνωρίστηκε ως η θέση πρόσδεσης του Ρουθηνίου με τον μεγαλύτερο αριθμό κατάληψης, ακολουθούμενο από το Asp18. Από την άλλη μεριά, η αντίδραση με την ένωση συναρμογής μικτού αριθμού οξειδωσης διρουθηνίου (II, III) [Ru<sub>2</sub>(μ-O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl] με την HEWL αποκάλυψε δύο θέσης πρόσδεσης του τμήματος {Ru<sub>2</sub>(μ-O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>}<sup>3+</sup> στα κατάλοιπα Asp101 και Asp119, συνδέοντας τα δύο μεταλλικά κέντρα <sup>131</sup>.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, μαζί με την εξέταση των θέσεων πρόσδεσης του Ρουθηνίου στην επιφάνεια ηλεκτροστατικού δυναμικού της HEWL (Εικόνα 3.7), προτείνουν ότι τα ουδέτερα τμήματα των ενώσεων του Ρουθηνίου όπως είναι το {Ru II (η<sup>6</sup>-p-cymene)Cl<sub>2</sub>}, προτιμούν την συναρμογή από το ετεροκυκλικό άτομο αζώτου της His, το οποίο βρίσκεται σε μία θετικά φορτισμένη περιοχή. Από την άλλη μεριά, τα θετικά φορτισμένα τμήματα, όπως είναι το RuTE και οι οργανομεταλλικές ενώσεις συναρμογής διρουθηνίου, εμφανίζουν μία προτίμηση για τα άτομα δότες του οξυγόνου των ασπαρτικών οξέων που βρίσκονται σε μια αρνητικά φορτισμένη περιοχή στην επιφάνεια της HEWL. Σε περιπτώσεις όπου έχουμε θετικά φορτισμένα Ru(II) τμήματα και αυτά είναι συναρμοσμένα στην His15, όπως συμβαίνει με τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα με τις ενώσεις {Ru<sup>II</sup>(CO)<sub>x</sub> }, εμφανίζονται εναλλακτικές θέσεις πρόσδεσης με το Ρουθίνιο στα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα του ασπαρτικού οξέος (Εικόνα 3.7). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το RuTE εμφανίζει μία ισχυρή προτίμηση για το Asp101 στις συνθήκες μελέτης του, από μία πληθώρα πιθανών θέσεων πρόσδεσης του Ρουθηνίου.

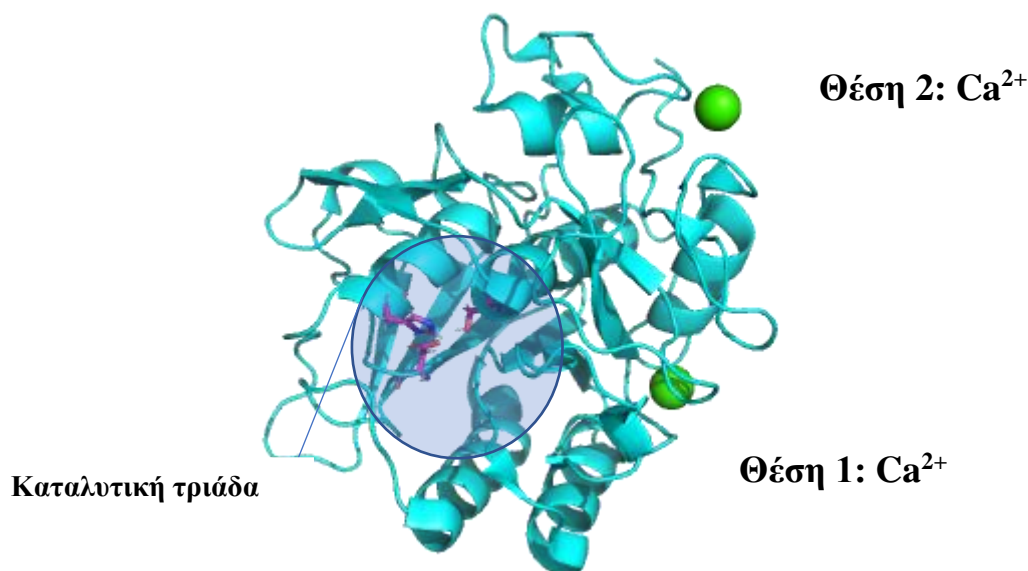


## Κεφάλαιο 4

### Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της Πρωτεΐνης K με την ένωση συναρμογής [Ru<sup>II</sup>([9]aneS<sub>3</sub>)(en)Cl][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>] (RuTE-Cl)

#### 4.1 Εισαγωγή

Η Πρωτεΐνη K από τον μύκητα *Tritirachium album* Limber (EC 3.4.21.64) αποτελεί μία κοινής και ευρείας χρήσης πρωτεάση που ανήκει στην οικογένεια πεπτιδασών subtilisin S8<sup>132</sup>. Έχει δύο θέσεις πρόσδεσης κατιόντων ασβεστίου (Ca<sup>2+</sup>) τα οποία δεν εμπλέκονται απευθείας στον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου, είναι όμως απαραίτητα για τη σταθεροποίηση και την καταλυτική αποδοτικότητα του ενζύμου. Η Πρωτεΐνη K είναι κατάλληλη για την μελέτη της μετάλλωσης πρωτεϊνών, λαμβάνοντας υπόψη την σταθερότητά της υπό διάφορες συνθήκες και την εύκολη προετοιμασία κρυστάλλων υψηλής ποιότητας για συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων υψηλής διακριτικής ικανότητας. Η δομή του συμπλόκου της Πρωτεΐνης K με το RuTE αποτελεί και την μοναδική μέχρι στιγμής δομή συμπλόκου του Ρουθηνίου με το ένζυμο αυτό.



**Εικόνα 4.1:** Η θέση των δύο Ca<sup>2+</sup> στην Πρωτεΐνη K και η καταλυτική τριάδα της.

Η Πρωτεΐνη K (PK) προσδένει δύο ιόντα Ca<sup>2+</sup>: Ένα ισχυρά (*Ca 1*) και ένα ασθενώς (*Ca 2*) συνδεδεμένο. Αφαίρεση των κατιόντων Ca<sup>2+</sup> μειώνει την σταθερότητα της PK (θερμική



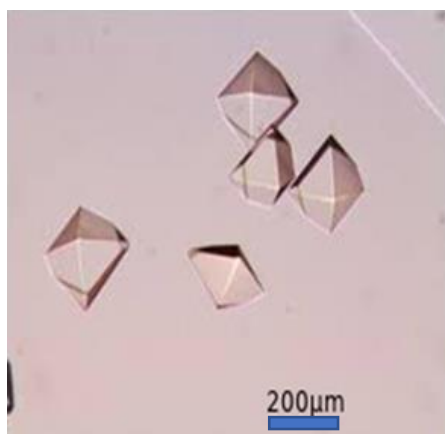
αποικοδόμηση) και η πρωτεολυτική ενεργότητα μειώνεται κατά 80%. Το ένζυμο είναι σταθερό σε ένα εύρος pH, θ, συγκέντρωσης άλατος και κρυσταλλώνει εύκολα.

## 4.2 Κρυστάλλωση, συλλογή δεδομένων και ανάλυση

Η ένωση συναρμογής  $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{[9]aneS}_3)(\text{en})\text{Cl}][\text{CF}_3\text{SO}_3]$  (RuTE-Cl) συντέθηκε όπως περιγράφεται στην βιβλιογραφία <sup>113</sup>. Η PK αγοράστηκε από την Sigma και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Οι κρύσταλλοι της PK αναπτύχθηκαν με την μέθοδο της διάχυσης των ατμών και πιο συγκεκριμένα με την μέθοδο της καθήμενης σταγόνας σε θερμοκρασία δωματίου, σε πιάτα 96-θέσεων (Molecular Dimensions, UK). Η λυοφυλιωμένη σκόνη της PK διαλύθηκε σε νερό σε τελική συγκέντρωση 10 mg/mL, 2 μL του διαλύματος της πρωτεΐνης αναμίχθηκαν με ίσα μέρη διαλύματος 1.0 M νιτρικό νάτριο και 0.1 M κιτρικό νάτριο (ρυθμιστικό) με το pH ρυθμισμένο σε pH = 6.5. Τετραγωνικοί κρύσταλλοι εμφανίστηκαν την ίδια μέρα και αναπτύχθηκαν σε πλήρες μέγεθος μέσα σε 7 μέρες.

Η εμφάνιση των κρυστάλλων της PK με το RuTE-Cl πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη μικρών ιχνοποσοτήτων στις σταγόνες των κρυστάλλων <sup>114</sup>. Ένας σημαντικός χρωματισμός των κρυστάλλων παρατηρήθηκε, από άχρωμοι σε κίτρινοι, μέσα σε 10 λεπτά έπειτα από την προσθήκη του RuTE-Cl στο ένζυμο. Έπειτα από 1 ώρα από την προσθήκη του RuTE-Cl, ένας μονοκρύσταλλος τοποθετήθηκε σε silicon loop (Hampton Research, USA) και κρυοπροστατεύτηκε με ταχεία εμφάνιση σε ένα διάλυμα που περιείχε τον κατακρημιστή και 20% (v/v) 1,2-αιθανοδιόλη. Ακόλουθα, ο κρύσταλλος πάγωσε ακαριαία σε υγρό άζωτο και στάλθηκε μέσα σε ένα ειδικό δοχείο Taylor-Wharton CX100 στις εγκαταστάσεις του συγχρότρου.



Εικόνα 4.2: Κρύσταλλοι της PK

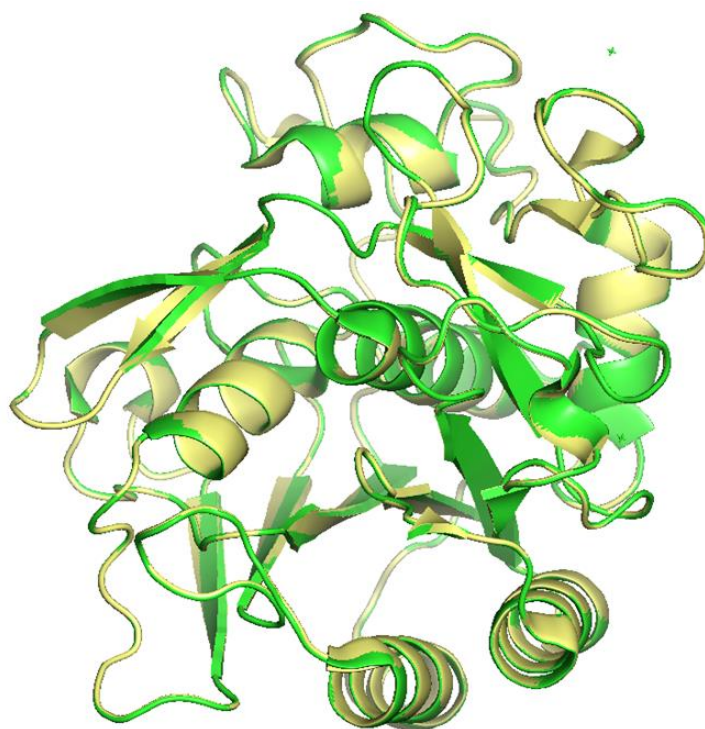
Η δομή του συμπλόκου της PK-RuTE επιλύθηκε με την μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης με το πρόγραμμα PHASER <sup>115</sup> χρησιμοποιώντας ως δομή πρότυπο (search model) την δομή ελεύθερης υποκαταστατών PK (PDB ID 2ID8) <sup>133</sup>. Η δομή βελτιστοποιήθηκε με το πρόγραμμα PHENIX <sup>116</sup> χρησιμοποιώντας βελτιστοποίηση θέσης (positional refinement) και εφαρμόζοντας βελτιστοποίηση TLS στα τελικά στάδια. Η θεμελίωση του μοντέλου και η βελτιστοποίηση στον ορθό χώρο πραγματοποιήθηκαν με το COOT <sup>117</sup>, ενώ οι γεωμετρικοί περιορισμοί για το RuTE-Cl (CCDC κώδικας: 265999) <sup>113</sup> ελήφθησαν χρησιμοποιώντας την εφαρμογή eLBOW του προγράμματος PHENIX. Το όριο για την υψηλότερη διακριτική ικανότητα των κρυσταλλογραφικών δεδομένων από την περίθλαση των ακτίνων-X στον μονοκρύσταλλο, καθορίστηκε βάσει της απαίτησης *redundancy* > 1.9. Η συνολική γεωμετρία του βελτιστοποιημένου μοντέλου ήταν εξαιρετική, με το 100% των καταλοίπων να βρίσκονται μέσα στα όρια των Ramachandran ευνοϊκών ή επιτρεπόμενων περιοχών, και εμφάνισε τιμή του MolProbity <sup>118</sup> στο 1.24 για το σύμπλοκο PK-RuTE. Το PyMOL <sup>119</sup> και το VMD <sup>120</sup> χρησιμοποιήθηκαν για την δομική ανάλυση και για τη δημιουργία των εικόνων.

**Πίνακας 4.1:** Η πορεία της βελτιστοποίησης του συμπλόκου PK-RuTE

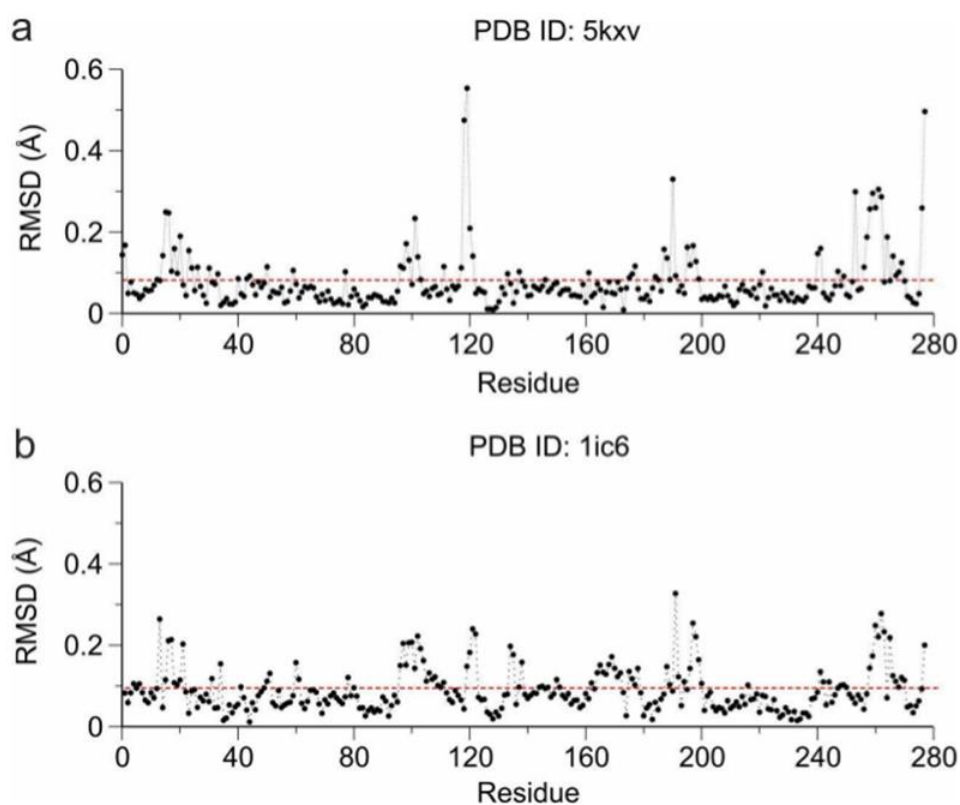
Είδος βελτιστοποίησης		R <sub>factor</sub>	R <sub>free</sub>
Άκαμπτο σώμα (rigid body) (Phenix)	3 κύκλοι	31.08	33.42
Ανοικοδόμηση μοντέλου (COOT)			
Βελτιστοποίηση θέσης (Phenix)	3 κύκλοι	30.05	32.16
Ανοικοδόμηση μοντέλου (COOT)			
Βελτιστοποίηση θερμικών παραγόντων (Phenix)	3 κύκλοι	29.84	31.82
Προσθήκη δομικών μορίων νερού (Phenix) και συνδυαστική βελτιστοποίηση θέσης-θερμικών παραγόντων	3 κύκλοι	20.12	21.98
Προσθήκη υποκαταστατών (Phenix) και συνδυαστική βελτιστοποίηση θέσης-θερμικών παραγόντων TLS	3 κύκλοι	16.23	18.42
Βελτιστοποίηση αριθμού κατάληψης	3 κύκλοι	15.19	16.83

### 4.3 Επαλληλία των δομών PK

Υπέρθωση της κρυσταλλικής δομής PK-RuTE (PDB ID: 6TXG) πραγματοποιήθηκε και με τις δύο κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένες δομές της PK ελεύθερης υποκαταστάτη, που βρέθηκαν κατατεθειμένες στην PDB με ID:5KXV (κρυσταλλική δομή προσδιορισμένη σε υπερυψηλή διακριτική ικανότητα) και ID:1IC6. Από τις υπερθέσεις αυτές δεν προκύπτουν σημαντικές αποκλίσεις θέσης για τα άτομα C<sup>α</sup>. Οι μικρές αποκλίσεις (< 0.1 Å) οφείλονται στις τυχαίες ελικώσεις και στις διαφορετικές διαμορφώσεις τους.



**Εικόνα 4.3:** Υπέρθωση της κρυσταλλικής δομής της PK, όπως προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά ελεύθερη υποκαταστάτη (PDB ID: 1IC6) (πράσινο) και στο σύμπλοκο της με την ένωση συναρμογής RuTE (PDB ID: 6TXG) (κίτρινο).



**Εικόνα 4.4:** RMSD διαγράμματα των C<sup>α</sup> ατόμων της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου PK-RuTE (PDB ID: 6TXG) με (a) την ελεύθερη υποκαταστάτη υπερυψηλής διακριτικής ικανότητας δομή της PK (PDB ID: 5KXV) και (b) την ελεύθερη υποκαταστάτη δομή της PK (PDB ID: 1IC6).

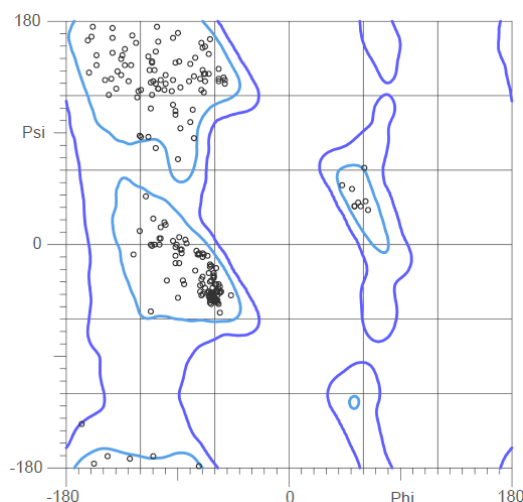
**Πίνακας 4.2:** Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων και στατιστικά βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο {Ru<sup>II</sup>([9]aneS3)(en)}<sup>2+</sup> (RuTE) με την PK. *RMSD* είναι η τετραγωνική ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης και οι τιμές στις παρενθέσεις είναι οι τιμές για τον φλοιό της υψηλότερης διακριτικής ικανότητας.

	<b>PK-RuTE</b>
<i>Συλλογή δεδομένων</i>	
Ομάδα χώρου	<i>P</i> 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Διαστάσεις κυψελίδας (Å)	
<i>a</i>	67.71
<i>b</i>	67.71
<i>c</i>	107.31
Διακριτική ικανότητα (Å)	57.26–1.372 (1.421–1.372)
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	1.091 (5.39)
<i>CC</i> <sub>1/2</sub>	1 (0.992)

Μέση $I/\sigma(I)$	34.9 (10.9)
Πληρότητα (%)	99.90 (99.98)
Πλεονασμός (Redundancy)	2.0 (1.9)
<i>Βελτιστοποίηση δομής</i>	
Διακριτική ικανότητα (Å)	57.26–1.372
Wilson $B$ -factor (Å <sup>2</sup> )	10.86
Πλήθος μοναδικών ανακλάσεων	51,755
Πλήθος TLS ομάδων	7
$R_{\text{work}}$ (%)	15.19
$R_{\text{free}}$ (%)	16.83
Συνολικός αριθμός ατόμων	2,378
Πρωτεϊνικά άτομα	2,053
Μόρια διαλύτη	267
Μόρια ένωσης Ru(II)	2
<i>Μέσοι <math>B</math>-factors (Å<sup>2</sup>)</i>	
Συνολικά	14.9
Πρωτεΐνη	13.2
Διαλύτης	25.5
Ένωση συναρμογής	22.6
$RMSD_{\text{bonds}}$ (Å)	0.005
$RMSD_{\text{angles}}$ (°)	0.81
<i>PDB ID</i>	6TXG

#### 4.4 Διάγραμμα Ramachandran

Για την κρυσταλλική δομή 6TXG σχεδόν όλα τα κατάλοιπα είναι σε ευνοϊκές θέσεις στο διάγραμμα Ramachandran, ενώ 1 κατάλοιπο είναι σε λιγότερο ευνοϊκή θέση, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 4.5.



**Εικόνα 4.5:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 6TXG. Όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (99.21% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.43 με όριο το 2.

#### 4.5 Αποτελέσματα

Η δομή του συμπλόκου της PK με το RuTE προσδιορίστηκε από δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X σε μονοκρύσταλλο της PK κατόπιν εμβάπτισής του για 1 ώρα σε περίσσεια RuTE-Cl. Η δομή επιλύθηκε στα 1.37 Å με μέση τιμή B factor στα 15 Å<sup>2</sup> για όλα τα άτομα της (13 Å<sup>2</sup> στα πρωτεϊνικά άτομα μόνο) και είναι σχεδόν όμοια (RMSDs για τα C<sup>α</sup> άτομα < 0.1 Å), με ατομικής ευκρίνειας κρυσταλλικές δομές της PK ελεύθερης υποκαταστάτη, που ανιχνεύονται στη βιβλιογραφία (PDB IDs: 1IC6<sup>134</sup> και 5KXV<sup>135</sup>).

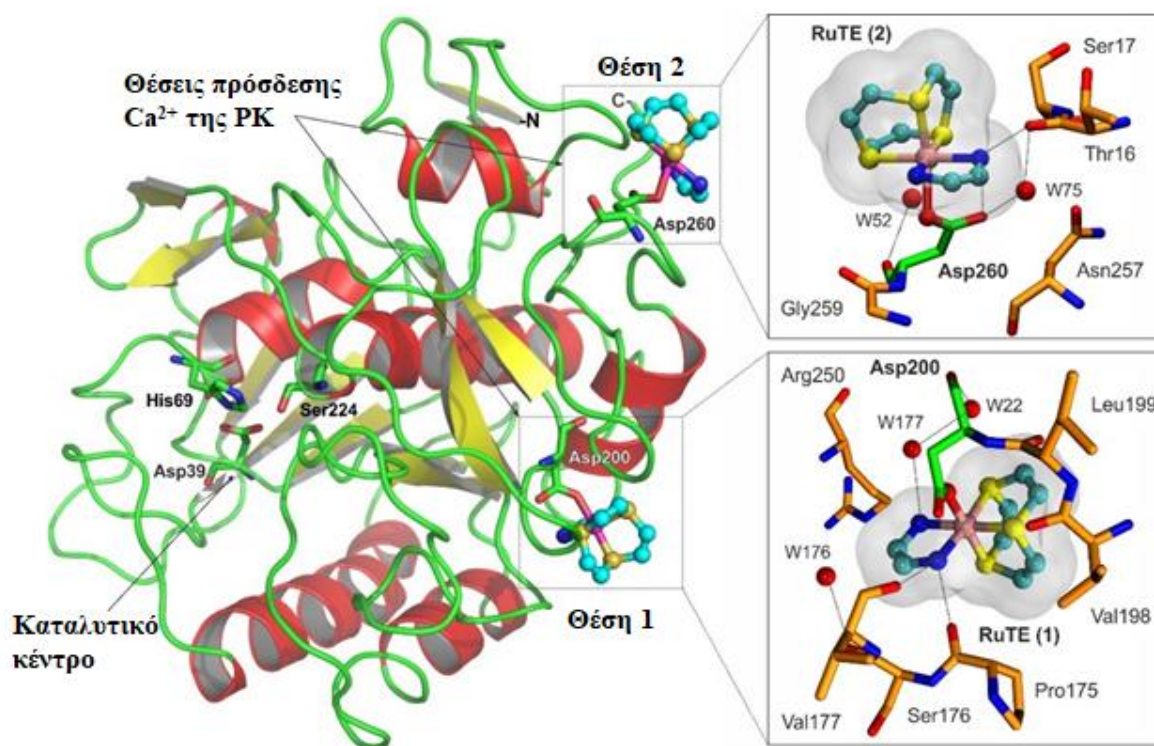
Το μεγαλύτερο μέρος της υπολειπόμενης ηλεκτρονιακής πυκνότητας (residual electron density) στους διαφορικούς χάρτες Fo-Fc, που βρέθηκε στις δύο θέσεις πρόσδεσης των Ca<sup>2+</sup>, αποδόθηκε σε δύο τμήματα RuTE που προσδέονται στο Asp200 στη θέση πρόσδεσης 1 (βαθμός κατάληψης 0.54 και μέση τιμή B factor = 21 Å<sup>2</sup>) και στο Asp260 στη θέση πρόσδεσης 2 (0.39 βαθμός κατάληψης και μέση τιμή Bfactor = 24 Å<sup>2</sup>), όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.6. Διαδοχικοί διαφορικοί χάρτες Fo-Fc, αποκάλυψαν επιπλέον υπολειπόμενη ηλεκτρονιακή πυκνότητα, η οποία αποδόθηκε σε ένα κατιόν Ca<sup>2+</sup> και δύο μόρια νερού στη θέση πρόσδεσης 1 (βαθμός κατάληψης 0.46) και σε ένα κατιόν Na<sup>+</sup> και τρία μόρια νερού στη θέση πρόσδεσης 2 (βαθμός κατάληψης 0.61).

Η θέση πρόσδεσης 2, είναι γνωστό ότι είναι μία θέση ασθενούς πρόσδεσης ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$ , και η απόδοση της υπολειπόμενης ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε αυτήν, ως κατιόν  $\text{Na}^+$ , έγινε με βάση την γεωμετρία συναρμογής<sup>136</sup>. Το RuTE στη θέση πρόσδεσης 2 συναρμόζεται με το  $\text{O}^{\delta 1}$  του Asp260 σε μήκος δεσμού Ru–O στα 2.25 Å, όπως προσδιορίστηκε έπειτα από βελτιστοποίηση του μοντέλου χωρίς περιορισμούς, ενώ το άτομο  $\text{O}^{\delta 2}$  του Asp260 βρέθηκε σε απόσταση 2.60 Å από μία αμινομάδα ( $-\text{NH}_2$ ) (Εικόνες 4.6, 4.7b και 4.8a). Η ίδια αμινομάδα σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την καρβονυλομάδα της κύριας αλυσίδας της Thr16, ενώ το άλλο άτομο αζώτου της αιθυλενοδιαμίνης (en) βρίσκεται σε απόσταση 3.6 Å από την καρβονυλομάδα της Lys258. Το τμήμα [9]aneS3 στη θέση πρόσδεσης 2 βρίσκεται κυρίως εκτεθειμένο στον διαλύτη. Ως αποτέλεσμα, ενώ τα άτομα θείου του υποκαταστάτη [9]aneS3 εντοπίζονται εξαιρετικά σε γεωμετρικά ιδανικές θέσεις, οι θέσεις γέφυρας της ομάδας της αιθυλενοδιαμίνης εντοπίζονται ασθενώς στον αρχικό (unbiased) διαφορικό χάρτη  $F_o-F_c$  (Εικόνα 4.7).

Το RuTE στη θέση πρόσδεσης 1 προσδένεται στην καρβοξυλομάδα του Asp200, με το μήκος δεσμού Ru–O στα 2.0 Å και την ισημερινή γωνία O–Ru–S στις 176°. Μία από τις αμινομάδες  $\text{NH}_2$  της αιθυλενοδιαμίνης (en) σταθεροποιείται από δύο δεσμούς υδρογόνου με τις καρβονυλομάδες της κύριας αλυσίδας της Pro175 και της Val177, ενώ η άλλη αμινομάδα σταθεροποιείται με ένα δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο διαλύτη (νερού) μόνο. (Εικόνες 4.6). Ο υποκαταστάτης [9]aneS3 του RuTE στη θέση πρόσδεσης 1 εμφανίζει μόνο μερικές επαφές με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων Pro175 και Val269 (στα 4.1–4.6 Å). Επίσης, οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις αυτές είναι αρκετές έτσι ώστε ο υποκαταστάτης να επιλυθεί στο διαφορικό  $F_o-F_c$  χάρτη. (Εικόνα 4.7a).

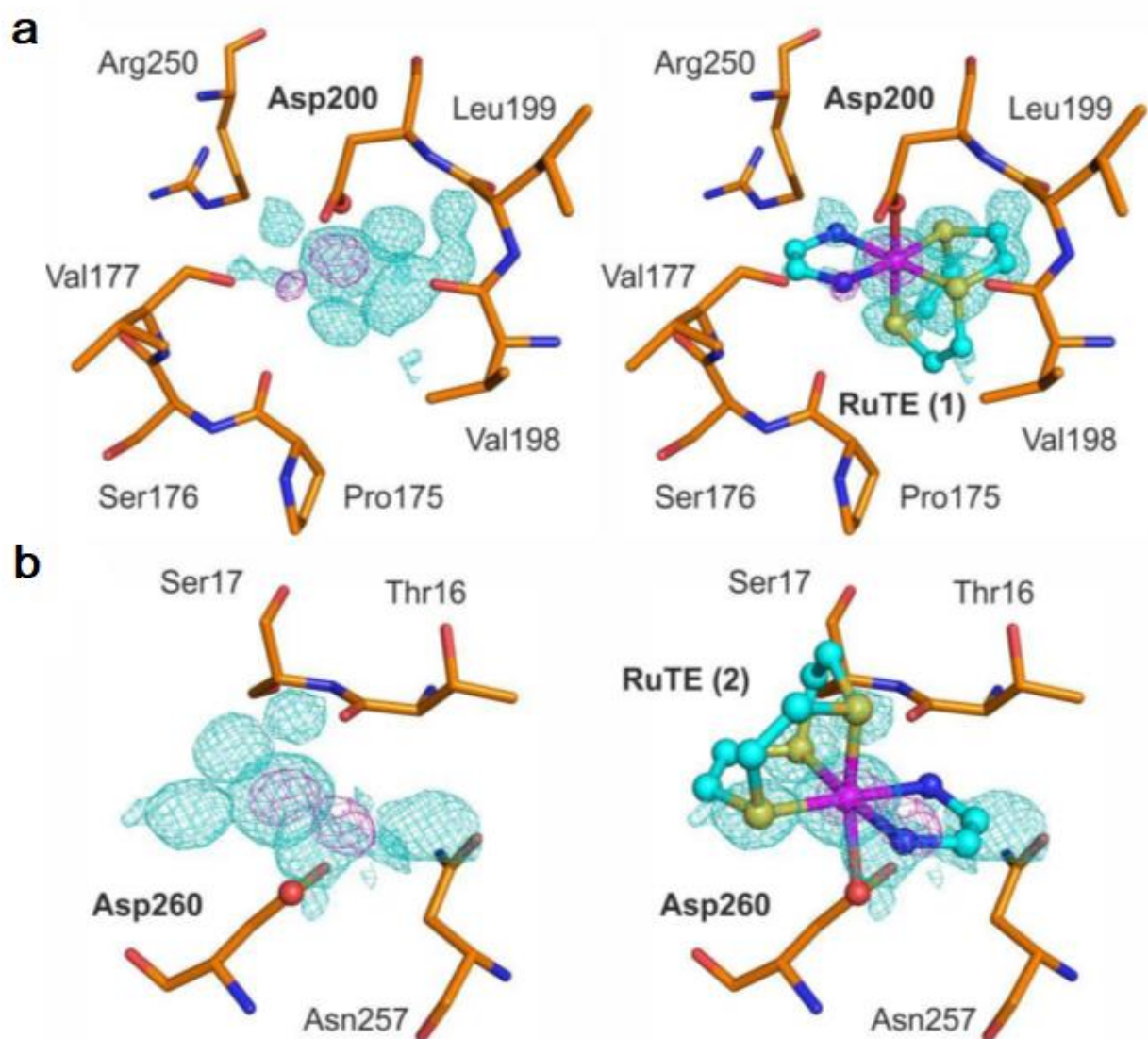
Τα μήκη δεσμών Ru–O στα σύμπλοκα με την πρωτεΐνη PK προσδιορίστηκαν χωρίς να χρησιμοποιηθούν κάποιοι περιορισμοί και βρέθηκαν μέσα στο τυπικό εύρος (2.05 Å στο RuTE στην θέση πρόσδεσης 1 και 2.25 Å στη θέση πρόσδεσης 2). Οι δύο ενώσεις συναρμογής RuTE προσδένονται στην PK χωρίς να προκαλούν κάποια σημαντική αλλαγή διαμόρφωσης στην πρόσδεση των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  (Εικόνα 4.8d). Στη θέση πρόσδεσης 1, η πλευρική αλυσίδα του Asp200 που προσδένεται στο Ru(II) βρίσκεται στην ίδια θέση όπως στο ελεύθερο-υποκαταστάτη ένζυμο, ενώ η θέση του  $\text{Ca}^{2+}$  καταλαμβάνεται από ένα από τα άτομα αζώτου N της αιθυλενοδιαμίνης (en). Εναλλακτικά, αποδίδονται θέσεις ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και δύο μορίων νερού με συμπληρωματικό βαθμό κατάληψης 0.46 (υπενθυμίζεται ότι ο βαθμός κατάληψης του RuTE στη θέση πρόσδεσης 1 είναι 0.54). Ομοίως, η πρόσδεση του RuTE στη θέση 2 μεσολαβεί στην ελαφριά κίνηση του καταλοίπου Asp260 και στην

αντικατάσταση των τεσσάρων μορίων νερού με το άτομο N<sub>1</sub> της αιθυλενοδιαμίνης (en) που βρίσκεται κοντά στη θέση του κατιόντος ασβεστίου. Παρόλ' αυτά, ο εναλλακτικός, συμπληρωματικός βαθμός κατάληψης της θέσης 2 (0.61) αποδόθηκε σε ένα ιόν Na<sup>+</sup>, το οποίο είναι συναρμοσμένο με τρία μόρια νερού σε διάταξη τριγωνικής πυραμίδας. Αυτές οι παρατηρήσεις βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, οι οποίες έδειξαν ότι το ένα ιόν Ca<sup>2+</sup> προσδένεται ισχυρά ( $pK\ 7.6 \times 10^{-8}\ M^{-1}$ ) και το άλλο προσδένεται μόνο ασθενώς και μπορεί να αντικατασταθεί με ένα ιόν νατρίου σε συνθήκες έλλειψης ασβεστίου<sup>137</sup>. Η απομάκρυνση των ιόντων ασβεστίου Ca<sup>2+</sup> για παράδειγμα με την προσθήκη EDTA επιφέρει μείωση ~80% στην ενεργότητα της PK μέσα σε χρονικό διάστημα 3 ωρών, το οποίο επιφέρει επίσης μικρές δομικές αλλαγές στο ένζυμο και ιδιότητες ενυδάτωσής του.

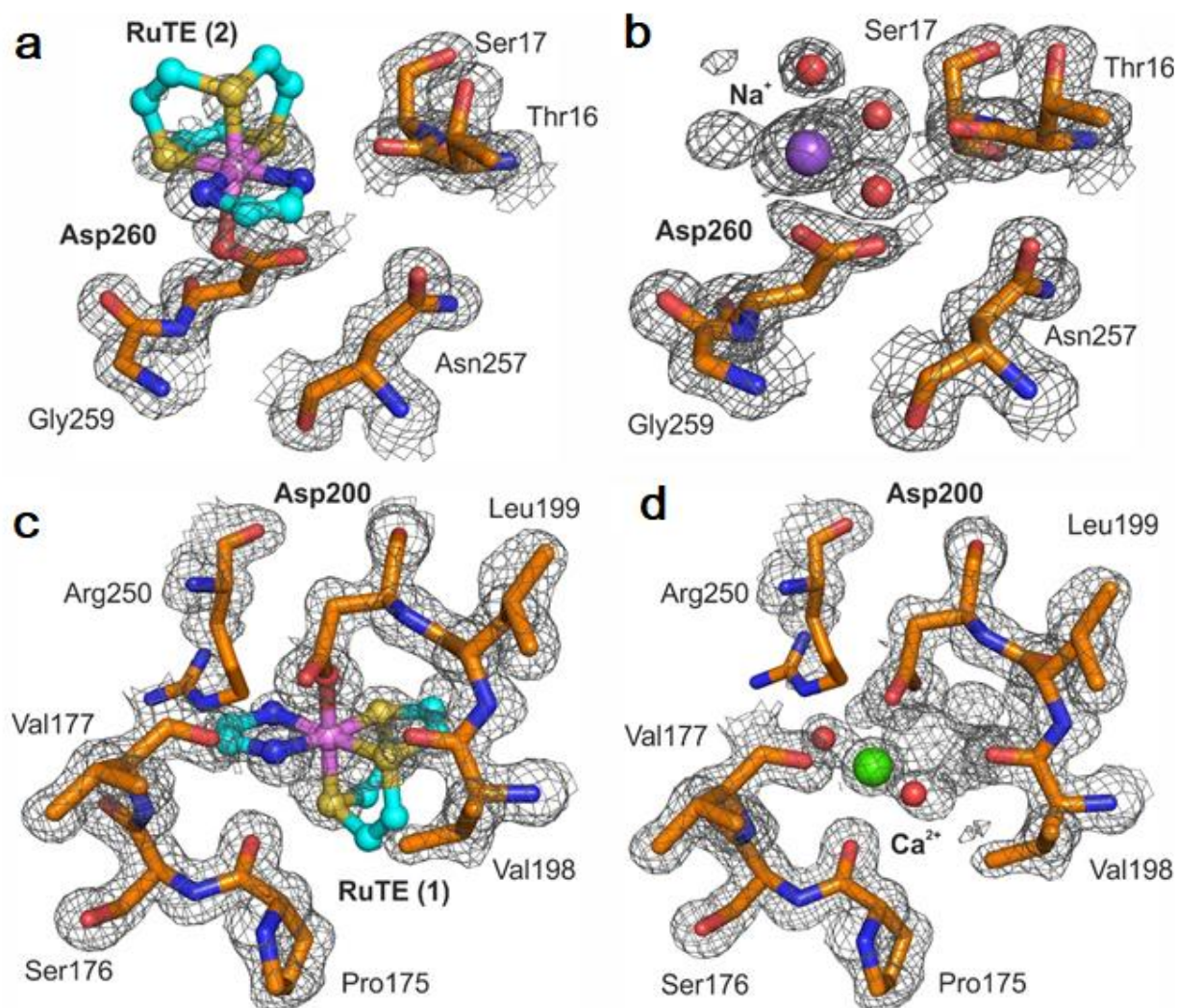


**Εικόνα 4.6:** Αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της PK με τα προσδεδεμένα RuTE τμήματα στις δύο θέσεις ασβεστίου του ενζύμου. Τα κατάλοιπα συναρμογής Asp200 και Asp260, όπως επίσης και η καταλυτική τριάδα φαίνονται στην εικόνα. Επίσης, φαίνονται οι δύο θέσεις πρόσδεσης σε μεγενθυμένη εικόνα, με τους δεσμούς υδρογόνου να απεικονίζονται με διακεκομμένες γραμμές.





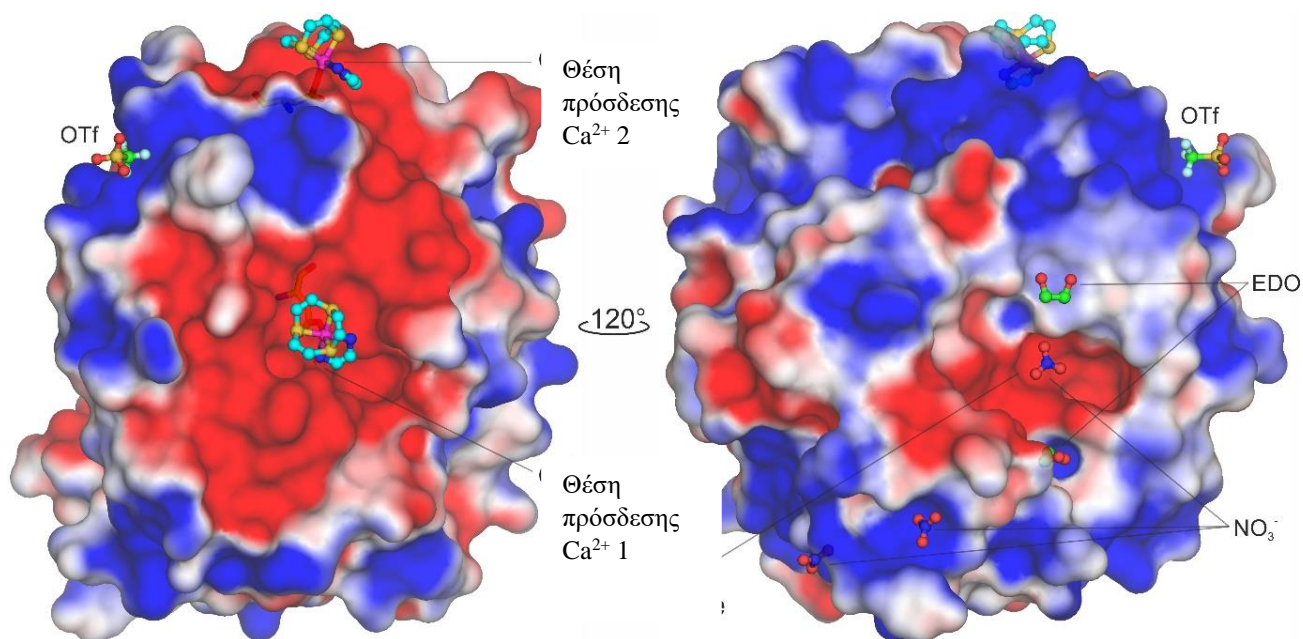
**Εικόνα 4.7:** (a) Η ηλεκτρονική πυκνότητα του RuTE στην περιοχή του αμινοξικού καταλοίπου Asp200 (αριστερά) χωρίς το μοντέλο του φαρμάκου και (δεξιά) μετά την μοντελοποίηση του φαρμάκου στον αρχικό (unbiased) διαφορικό χάρτη  $F_o - F_c$  (μπλε χρώμα) και στο διαφορικό χάρτη ανώμαλης σκέδασης (μωβ χρώμα). (b) (Αριστερά) Η ηλεκτρονική πυκνότητα του RuTE στην περιοχή του αμινοξικού κατάλοιπου Asp260 και (δεξιά) η μοντελοποίηση του RuTE. Οι θέσεις των βαρέων μετάλλων (Ru) προκύπτουν με μεγάλη ακρίβεια (περίπου ίση με 0.01 Å), από τον συνδυασμό των δύο χαρτών.



**Εικόνα 4.8:** (a) Αρχικός χάρτης (unbiased) ηλεκτρονιακής πυκνότητας του RuTE προσδεμένου στο Asp260 στη θέση πρόσδεσης (επίσης) των Ca<sup>2+</sup> (θέση 2) με αριθμό κατάληψης 0.4 και τα γειτονικά κατάλοιπα σχεδιασμένα με κατώτερη στάθμη περιγράμματος (contour level) 1σ. (b) Η υπολειπόμενη πυκνότητα στη θέση 2 αποδόθηκε σε ένα κατιόν Na<sup>+</sup> συναρμοσμένο με τρία μόρια νερού. (c) Αρχική (unbiased) ηλεκτρονιακή πυκνότητα του RuTE προσδεμένου στο Asp200 στη θέση πρόσδεσης (επίσης) των Ca<sup>2+</sup> (θέση 1) με αριθμό κατάληψης 0.5 και τα γειτονικά κατάλοιπα σχεδιασμένα σε 1σ. (d) Η υπολειπόμενη πυκνότητα κοντά στη θέση 1 αποδόθηκε σε ένα κατιόν Ca<sup>2+</sup> συναρμοσμένο με δύο μόρια νερού.

## 4.6 Συμπεράσματα για τη δομή PK-RuTE

Οι παρατηρήσεις-αποτελέσματα του συμπλόκου HEWL/RuTE υποστηρίζονται με την επίλυση μιας δεύτερης δομής ενός μη-σχετιζόμενου ενζύμου, της Πρωτεΐνης K με το RuTEC (Εικόνα 4.8), στην οποία οι θέσεις πρόσδεσης του Ρουθηνίου συμπίπτουν με τις θέσεις συναρμογής του ασβεστίου στο ένζυμο αυτό. Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι τα δύο τμήματα RuTE συναρμόζονται στις καρβοξυλικές ομάδες των Asp200 και Asp260, χωρίς να προκαλούν κάποια σημαντική αλλαγή διαμόρφωσης της PK. Τα δύο RuTE σύμπλοκα σταθεροποιούνται περαιτέρω από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των υποκαταστατών της αιθυλενοδιαμίνης και των ατόμων της κύριας αλυσίδας των γειτονικών καταλοίπων (Εικόνα 4.6).



**Εικόνα 4.9:** Η προσβάσιμη επιφάνεια στο διαλύτη (Solvent accessible surface, SAS) της κρυσταλλικής δομής της PK-RuTE στην οποία έχει υπολογιστεί το ηλεκτροστατικό δυναμικό. Τα δύο σύμπλοκα RuTE, ένα αντισταθμιστικό ιόν triflate (OTf), δύο 1,2-αιθανοδιόλες (αιθυλενογλυκόλες) (EDO) και τρία ιόντα νιτρικών φαίνονται ως ράβδοι (ball-and-sticks). Επίσης υπάρχει επισήμανση για τις δύο θέσεις πρόσδεσης του Ca<sup>2+</sup> όπως και για το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στην επιφάνεια είναι υπολογισμένο το ηλεκτροστατικό δυναμικό με αρνητικές τιμές των  $-1 kT/e$  με κόκκινο, ουδέτερο με λευκό, και  $+1 kT/e$  με μπλε.

Η εξέταση του ηλεκτροστατικού δυναμικού επιφάνειας της PK αποκαλύπτει ότι οι δύο θέσεις πρόσδεσης  $\text{Ca}^{2+}$  είναι περιοχές αρνητικά φορτισμένου ηλεκτροστατικού δυναμικού (Εικόνα 4.9). Πιο συγκεκριμένα, η πολύ καλά ορισμένη θέση πρόσδεσης 1 όπου η ένωση συναρμογής RuTE αναγνωρίστηκε, εμφανίζει επίσης το υψηλότερο αρνητικά φορτισμένο δυναμικό.

Ενώ δεν μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση με άλλες δομές ακτίνων-X, αφού αυτή είναι η πρώτη κρυσταλλική δομή ενός συμπλόκου PK/Ρουθηνίου, οι παρατηρήσεις όμως βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τις κρυσταλλογραφικές μελέτες των συμπλόκων Ru(II)-αρενίου με το σωματίο του πυρήνα του πρωτεασώματος<sup>121,122</sup>. Μολονότι εμφανίζουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς το DNA και τις πρωτεΐνες η οποία έχει αποδοθεί στις στερικές απαιτήσεις των ογκοδέστερων υποκαταστατών, τα RAPTA-C και RAED-C (Εικόνες 1.3 και 1.5) έχει δειχθεί ότι μοιράζονται μία μονάχα κοινή θέση πρόσδεσης στις ιστόνες και τις πρωτεΐνες τους. Σε αυτή τη θέση πρόσδεσης (που φαίνεται στην εικόνα 1.7 ως θέση πρόσδεσης 2), τα θετικά φορτισμένα τμήμα του Ru-αρενίου συναρμόζονται από τις καρβοξυλομάδες των Glu καταλοίπων μέσα σε μία υψηλά όξινη περιοχή που σχηματίζεται από το διμερές των ιστονών H2A-H2B. Αν και οι συναρμοσμένοι υποκαταστάτες στα RAPTA-C και RAED-C είναι διαφορετικοί στις αλληλεπιδράσεις με την χρωματίνη, παρόλ' αυτά οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις φαίνεται ως η κινητήριοις δύναμη των θετικά φορτισμένων τμημάτων σε περιοχές αρνητικά φορτισμένου δυναμικού., όπως στην περίπτωση του συμπλόκου PK-RuTE που παρουσιάζεται πιο πάνω.

#### **4.7 Συμπεράσματα από τις δομές HEWL/RuTE και PK/RuTE**

Ενώ οι προηγούμενες μελέτες έχουν ερευνήσει την πρωτεϊνική ρουθηνίωση με οργανομεταλλικές ενώσεις του Ru(II) που φέρουν το αρένιο ως υποκαταστάτη, η παρούσα μελέτη επικεντρώνεται σε μία ένωση συναρμογής ανάλογη του RAED, που ονομάζεται  $[\text{RuII}([\text{9}]ane\text{S3})(en)\text{Cl}]^+$  (RuTE-Cl), έχοντας έναν μετωπιαίο υποκαταστάτη τύπου στέμματος θειοαιθέρα στη θέση του αρενίου. Έτσι, παρέχονται για πρώτη φορά δομική πληροφορία για την πρωτεϊνική ένωση προσθήκης που σχηματίζεται από αυτή την ένωση τύπου “half-

sandwich” του Ru(II) με δύο πρωτεΐνες μοντέλα δηλαδή τη Λυσοζύμη και την Πρωτεΐνάση K.

Αυτές οι κρυσταλλικές δομές είναι επίσης τα πρώτα παραδείγματα ενώσεων προσθήκης μεταξύ των πρωτεϊνών και των ενώσεων συναρμογής του Ru(II) που διατηρούν τη σφαίρα συναρμογής τους σχεδόν ακέραια. Τυπικά, το Ru έχει βρεθεί ως ένα «απογυμνωμένο» ιόν όταν χρησιμοποιήθηκαν ενώσεις όπως είναι το NAMI-A και το KP1019.

Στη Λυσοζύμη, το RuTE συναρμόζεται ομοιοπολικά από το Asp101 στην άκρη της καταλυτικής περιοχής του ενζύμου, ενώ στην ένωση προσθήκης με την Πρωτεΐνάση K το RuTE συναρμόζεται στις δύο θέσεις του ασβεστίου του ενζύμου. Στην περίπτωση της Λυσοζύμης, εμφανίζονται αλλαγές στη διαμόρφωση ενώ η πρόσδεση στην PK πραγματοποιείται χωρίς να εμφανίζονται αλλαγές στη διαμόρφωση. Η ένωση προσθήκης HEWL-RuTE σταθεροποιείται κυρίως μέσω υδροφοβικών/αρωματικών αλληλεπιδράσεων του υποκαταστάτη [9]aneS<sub>3</sub>, ενώ στην ένωση προσθήκης του PK-RuTE εμφανίζονται αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου της αιθυλενοδιαμίνης (en) με κατάλοιπα της κύριας αλυσίδας.

Η ανάλυση της μελέτης αυτής προτείνει ότι αν και οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις αποτελούν τις κύριες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποκαταστατών και των πρωτεϊνικών κατάλοιπων, σε πλήρη συμφωνία με αρκετές δομικές μελέτες ενώσεων προσθήκης πρωτεϊνών-ρουθηνίου, το συνολικό φορτίο του συμπλόκου, όπως διαμορφώνεται από τους υποκαταστάτες συναρμογής, αποτελεί την κινητήριο δύναμη σε ευνοϊκές ηλεκτροστατικά περιοχές της πρωτεϊνικής επιφάνειας.

## Κεφάλαιο 5

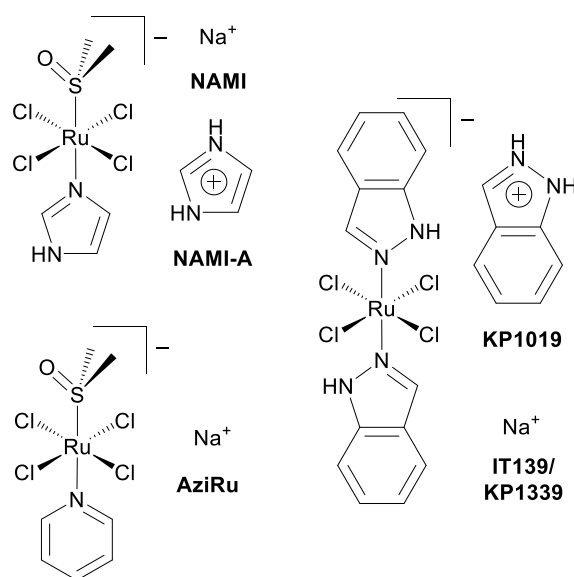
### Οι κρυσταλλικές δομές της Λυσοζύμης με το NAMI-A ([ImH]trans-[RuCl<sub>4</sub>(dmsο-S)(Im)]); Im = ιμιδαζόλιο) σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα

#### 5.1 Εισαγωγή

Ο ακριβής μηχανισμός της δράσης και οι βιολογικοί στόχοι των ενώσεων συναρμογής του Ρουθηνίου, ακόμα και των πιο ενδεδειγμένων μελετημένων όπως το NAMI-A και το KP1019, είναι άγνωστοι. Παρόλ' αυτά είναι κοινά αποδεκτό ότι η πλειοψηφία των ενώσεων συναρμογής του Ρουθηνίου, παρόμοια με το cisplatin και των αναλόγων του, είναι πρόδρομα φάρμακα (prodrugs) που ενεργοποιούνται με την ενυδάτωση (λειτουργικές ενώσεις) δηλαδή με την αντικατάσταση ενός ή περισσοτέρων υποκαταστατών με μόρια νερού, πιθανόν ακολουθούμενη από αναγωγή/οξειδωση. Τα ενεργά τμήματα της ένωσης συναρμογής είναι λοιπόν οι ενυδατωμένοι μεταβολίτες που προφανώς αλληλεπιδρούν στους βιολογικούς στόχους. Αρχικές μελέτες προτείνουν ότι οι αλληλεπιδράσεις με το DNA ήταν υπεύθυνες για την αντικαρκινική δράση των συμπλόκων του Ρουθηνίου. Πρόσφατα όμως, αρκετές μελέτες αποδείξαν ότι το DNA δεν είναι απαραίτητα ο πρωταρχικός και/ή ο μοναδικός στόχος, αλλά ότι αλληλεπιδράσεις με ενδο- και έξω-κυτταρικές πρωτεΐνες παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στο παρατηρούμενο φαρμακολογικό προφίλ. Έτσι, η χαμηλή κυτοτοξικότητα και η αντιμεταστατική δράση του NAMI-A έχει αποδοθεί στις αλληλεπιδράσεις του με τις πρωτεΐνες, εξαιτίας της κινητικής γρήγορης ανταλλαγής υποκαταστατών που περιορίζει τον εγκλεισμό του από τα κύτταρα.

Μέχρι σήμερα μόνο δύο ενώσεις συναρμογής του Ru(III) έχουν φτάσει σε κλινικές δοκιμές ως αντικαρκινικοί παράγοντες, το KP1019 ([IndH]trans-[RuCl<sub>4</sub>(Ind)<sub>2</sub>]; Ind = Ινδόλιο), που τώρα αντικαταστάθηκε από το μετά νατρίου άλας του [Na]trans-[RuCl<sub>4</sub>(Ind)<sub>2</sub>] (IT139 or KP1339), και το NAMI-A ([ImH]trans-[RuCl<sub>4</sub>(dmsο-S)(Im)]); Im = ιμιδαζόλιο, Εικόνα 5.1)<sup>11,17,138,139</sup> Ανεξάρτητα από τις δομικές ομοιότητές τους, αυτές οι δύο ενώσεις συναρμογής έχουν πολύ διακριτά αντικαρκινικά προφίλ. Ενώ και τα δύο έχουν μέτρια γενική κυτοτοξικότητα, το NAMI-A αναστέλλει κυρίως την μετάσταση<sup>140</sup> ενώ το KP1019/IT139

εμφανίζει κυτοτοξικότητα έναντι ανθεκτικών σε Λευκόχρυσο πρωτογενείς όγκους <sup>141</sup>. Αυτή η διαφορετική φαρμακολογική συμπεριφορά, ταυτόχρονα με το αξιοσημείωτο αντιμεταστατικό προφίλ του NAMI-A, έχει ενεργοποιήσει τους ερευνητές να ερευνήσουν και εμβαθύνουν τους μηχανισμούς δράσης αυτών των ενώσεων. Και οι δύο ενώσεις συναρμογής τυπικά θεωρούνται ως «προφάρμακα» που ενεργοποιούνται με την υδρόλυση δηλαδή με την αντικατάσταση ενός τουλάχιστον υποκαταστάτη με μόριο(α) νερού και πιθανή οξείδωση/αναγωγή του μεταλλικού ιόντος, σε αντίθεση με τα εφαρμοσμένα φάρμακα του Λευκοχρύσου. Αυτά τα ενυδατωμένα ενδιάμεσα είναι τα ενεργά τμήματα που τελικά αλληλεπιδρούν ομοιοπολικά στον βιολογικό στόχο(ους) (λειτουργικές ενώσεις συναρμογής)<sup>142</sup>. Οι βιολογικοί στόχοι και ο ακριβής μηχανισμός δράσης αυτών των υπο έρευνα ενώσεων παραμένει μέχρι σήμερα άγνωστος, αλλά υπάρχουν αποδείξεις ότι η φαρμακολογική τους δράση περιλαμβάνει συνδυαστικούς μηχανισμούς που προφανώς δεν περιλαμβάνουν το DNA, σε αντίθεση με τα φάρμακα του Λευκοχρύσου (platinum drugs). <sup>143</sup>



**Εικόνα 5.1.** Σχηματικές αναπαραστάσεις των δομών των αντικαρκινικών ενώσεων συναρμογής του Ru(III) του NAMI-A, AziRu και KP1019 ή IT139 (KP1339).

Εξαιτίας των γρήγορων κινητικών αναταλλαγής, το NAMI-A και τα ενυδατωμένα ενδιάμεσα αλληλεπιδρούν με εξωκυττάρειες πρωτεΐνες, ή πρωτεΐνες στην κυτταρική επιφάνεια <sup>144</sup>. Οι αλληλεπιδράσεις τους σε ατομικό επίπεδο και ο γενικός τρόπος της πρόσδεσης του Ru «πρωτεϊνική ρουθηνίωση», έχουν προσδιοριστεί κυρίως με κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων-X <sup>145,146</sup>. Πιο συγκεκριμένα, οι κρυσταλλικές δομές των adducts που σχηματίζονται

από την αλληλεπίδραση του NAMI-A με πρωτεΐνες μοντέλα όπως είναι η Λυσοζύμη (hen egg-white lysozyme),<sup>78</sup> η καρβονική ανυδράση (hCAII)<sup>53</sup> και η φερριτίνη (HuHf)<sup>147</sup> έχουν αποκαλύψει ένα «απογυμνωμένο» ιόν Ρουθηνίου συναρμοσμένο στην πρωτεΐνη. Αυτές οι δομικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο μηχανισμός της πρωτεϊνικής ρουθηνίωσης περιλαμβάνει πλήρη αποικοδόμηση του NAMI-A και συναρμογή του απογυμνωμένου ιόντος του Ρουθηνίου σε πλευρικές αλυσίδες της πρωτεΐνης. Έτσι, έχει προταθεί ότι το NAMI-A συμπεριφέρεται ως το «απόλυτο προφάρμακο» που χάνει όλους τους αρχικούς υποκαταστάτες του κατά την διάρκεια της κρυστάλλωσης<sup>148</sup>. Λαμβάνοντας υπόψη επίσης και τα αποτελέσματα από διάφορες φασματοσκοπικές μελέτες<sup>149</sup> μία πιο πλήρης εικόνα της συνολικής διαδικασίας μπορεί να σχηματιστεί, όπως ξεκάθαρα έχει προταθεί από τον Alessio στο μοντέλο «multi-stage rocket»<sup>142,148</sup>. Στα πρώιμα στάδια, οι πλήρεις υποκαταστατών ενώσεις συναρμογής του Ru(III) (ή τα μερικώς ενυδατωμένα τμήματα) αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες με έναν μη-ομοιοπολικό τρόπο. Ακόλουθα, με την ανταλλαγή των υποκαταστατών το μέταλλο συναρμόζεται σε επιλεκτικές θέσεις στην πρωτεΐνη, κυρίως δεσμεύοντας μία ομάδα ιμιδαζολίου από την Ιστιδίνη (His) ή μία καρβοξυλομάδα από όξινα (Asp ή Glu) κατάλοιπα.

Παρόλ' αυτά, το γεγονός ότι δομικά όμοιες ενώσεις στοχεύουν διαφορετικά κατάλοιπα πρωτεϊνών υποδεικνύει ότι οι «θέσεις ρουθηνίωσης» εξαρτώνται σε έστω και ελάχιστες διαφορές στη δομή και τις ιδιότητες των υποκαταστατών του Ru, αν και απουσιάζουν από το τελικό προϊόν. Με αυτό το σκεπτικό, οι μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται στα αρχικά στάδια της διαδικασίας πρόσδεσης μπορεί να παίζουν έναν σημαντικό ρόλο, υπογραμμίζοντας ότι οι υποκαταστάτες είναι σημαντικοί για την διαδικασία αναγνώρισης πρωτεΐνης-μεταλλοφαρμάκου (protein-metallodrug recognition process)<sup>150</sup>. Με σκοπό να αναδείξουμε τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις του NAMI-A με πρωτεΐνες και να ρίξουμε φως στο ρόλο που παίζουν οι υποκαταστάτες στην κατεύθυνση της ένωσης συναρμογής στη θέση ρουθηνίωσης, εκτελέσαμε μία κρυσταλλογραφική μελέτη ακτίνων-Χ των adducts που σχηματίζονται μεταξύ του NAMI-A και της Λυσοζύμης σε διάφορους χρόνους. Επιλέξαμε τη Λυσοζύμη επειδή κρυσταλλώνει εύκολα και σε διάφορες συνθήκες, και λόγω του ότι είναι ανθεκτική σε αλλαγές στη διαμόρφωση και το πιο σημαντικό λόγω του ότι έχει εφαρμοστεί-χρησιμοποιηθεί σε μία πληθώρα μελετών των αντικαρκινικών ενώσεων του Ru<sup>36,151-156</sup>, συμπεριλαμβανομένου και του NAMI-A<sup>78</sup>. Εδώ, παρουσιάζουμε



την πρώτη δομή ακτίνων-Χ της φαρμακευτικά σχετικής ένωσης συναρμογής του Ru(III) NAMI-A με όλους τους αρχικούς υποκαταστάτες της, οι οποίοι είναι μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένοι στην πρωτεΐνη, και αναδεικνύουμε την βήμα προς βήμα διαδικασία υδρόλυσης μέσα από μία σειρά δομών ακτίνων-Χ, ξεκινώντας από την αρχική μορφή (ολόκληρη μορφή του NAMI-A) προς την τελική θέση ρουθηνίωσης έπειτα από ανταλλαγή όλων των υποκαταστατών.

## 5.2 Κρυστάλλωση

Η ένωση συναρμογής  $\text{RuCl}_4(\text{Im})(\text{DMSO})\cdot[\text{Im}]^+$  (NAMI-A) συντέθηκε όπως περιγράφεται στην βιβλιογραφία <sup>157,158</sup>. Η Λυσοζύμη (HEWL) (L7651) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό (καθαρότητα > 90%). Οι κρύσταλλοι της HEWL αναπτύχθηκαν με την μέθοδο της διάχυσης των ατμών και συγκεκριμένα με την μέθοδο της καθημερινής σταγόνας, σε θερμοκρασία δωματίου (room-temperature), σε πιάτα κρυστάλλωσης με 96-θέσεις (Molecular Dimensions, UK), Η λυσοφυλιωμένη σκόνη της Λυσοζύμης αναμίχθηκε με 150mM διαλύματος νιτρικού νατρίου και νερό μέχρις τελικής συγκέντρωσης 20mg/mL, και 2μL του διαλύματος πρωτεΐνης αναμίχθηκαν με ίσα μέρη του διαλύματος του πηγαδιού (reservoir solution) που περιέχει 0.8-1.5 M χλωριούχου νατρίου και 100 mM οξικού νατρίου σε pH = 4.6. Τετραγωνικοί κρύσταλλοι εμφανιστήκαν μέσα στην ίδια μέρα και η πλήρης ανάπτυξή τους πραγματοποιήθηκε μέσα σε 3 μέρες.

Η εμφάνιση των κρυστάλλων Λυσοζύμης με το NAMI-A πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη μικρών ιχνοποσοτήτων στις σταγόνες των κρυστάλλων <sup>145</sup>. Παρατηρήθηκε ένας σημαντικός χρωματισμός των κρυστάλλων από άχρωμους σε κόκκινους μέσα στα 10 πρώτα λεπτά έπειτα από την προσθήκη του NAMI-A στο ένζυμο. Έπειτα από την προσθήκη του NAMI-A, οι κρύσταλλοι συγκεντρώθηκαν με βρόγχους silicone loops (Hampton Research, USA) σε χρονικά διαστήματα 1.5 ωρών (πορτοκαλί χρώμα), 8 ωρών (κόκκινο χρώμα), 26 ωρών (κόκκινο χρώμα) και 98 ωρών (μαύρος κρύσταλλος). Ακολούθησε κρυοπροστασία με ταχεία εμφάνιση των εκάστοτε κρυστάλλων σε ένα διάλυμα που περιέχει τον καταβυθιστή και 20% (v/v) 1,2-αιθανοδιόλη. Ακολούθως, οι κρύσταλλοι παγώσαν ακαριαία σε υγρό

άζωτο και μεταφέρθηκαν μέσω ενός ξηρού δοχείου Taylor–Wharton CX100 στις εγκαταστάσεις του συγχρότρου.

### 5.3 Συλλογή δεδομένων-Ανάλυση

Η συλλογή δεδομένων πραγματοποιήθηκε στην δέσμη EMBL P13 στο DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg, Germany) η οποία περιέχει έναν ανιχνευτή PILATUS 6M. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα συλλέχθηκαν με γωνιόμετρο τύπου MD3. Τα δεδομένα ολοκληρώθηκαν με το XDS<sup>159</sup> και ταξινομήθηκαν (scaled) χρησιμοποιώντας το AIMLESS ως μέρος του προγράμματος CCP4i version 7.0.073<sup>160</sup> για όλα τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα σε τέσσερα χρονικά διαστήματα. Τα κριτήρια για την λήψη των σετ δεδομένων ορίστηκαν σε ολοκλήρωση (completeness) μεγαλύτερη του 80%, σε I/σI μεγαλύτερο του 1.9 και σε CC<sub>1/2</sub> μεγαλύτερο του 80%, όλα για τον φλοιό υψηλότερης διακριτικής ικανότητας (highest resolution shell). Της οι δομές των συμπλόκων HEWL/NAMI-A επιλύθηκαν με την μέθοδο της μοριακής αντικατάστασης με το PHASER<sup>95</sup> χρησιμοποιώντας την ελεύθερη υποκαταστάτη δομή της HEWL (PDB ID: 193L) ως το καλύτερο μοντέλο, βασισμένο στην καλύτερη τιμή LLG και της αρχικές τιμές R/R<sub>free</sub> ανάμεσα στα μοντέλα που δοκιμάστηκαν, Η δομή βελτιστοποιήθηκε με τη συνάρτηση μέγιστης πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood) με το PHENIX<sup>116</sup> χρησιμοποιώντας βελτιστοποίηση θέσης με υποκαταστάτες του NAMI-A ως ιμιδάζολιο, διμεθυλσουλφοξείδιο (S-dmsο) και ιόντα χλωρίου ή μόρια νερού, και της εφαρμόζοντας ανισοτροπική βελτιστοποίηση των θερμικών παραγόντων (B factor) στα τελευταία στάδια. Η θεμελίωση της δομής του μοντέλου και η βελτιστοποίηση στον ορθό χώρο πραγματοποιήθηκε με το COOT<sup>117</sup>. Η συνολική γεωμετρία του βελτιστοποιημένων μοντέλων ήταν πολύ καλή, με 100% των καταλοίπων να κείτονται μέσα της επιτρεπόμενες ή ευνοϊκές περιοχές του διαγράμματος Ramachandran, ενώ εμφανίζουν τιμές από το πρόγραμμα MolProbity 1.16, 1.78, 1.14, 1.32 για τα σύμπλοκα HEWL–NAMI-A της 1.5 ώρες, 8 ώρες, 26 ώρες, and 98 ώρες, αντίστοιχα<sup>161</sup>.

Το ηλεκτροστατικό δυναμικό των πρωτεϊνών υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα APBS<sup>162</sup> και χαρτογράφησε την επιφάνεια της HEWL με εύρος από –5 kT/e (κόκκινο) το +5 kT/e (μπλε) χρησιμοποιώντας το PyMOL. Για τον υπολογισμό προστέθηκαν στην HEWL τα άτομα υδρογόνου και τα ατομικά φορτία χρησιμοποιώντας το H++<sup>163</sup>.

## 5.4 Αποτελέσματα

Στον ακόλουθο **Πίνακα 5.1**, δίνονται οι λεπτομέρειες των πειραμάτων κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ για τις δομές συμπλόκων NAMI-A/HEWL και της βελτιστοποίησης τους. Οι τιμές στην παρένθεση αναφέρονται στον εξωτερικό φλοιό διακριτικής ικανότητας.

**Πίνακας 5.1**

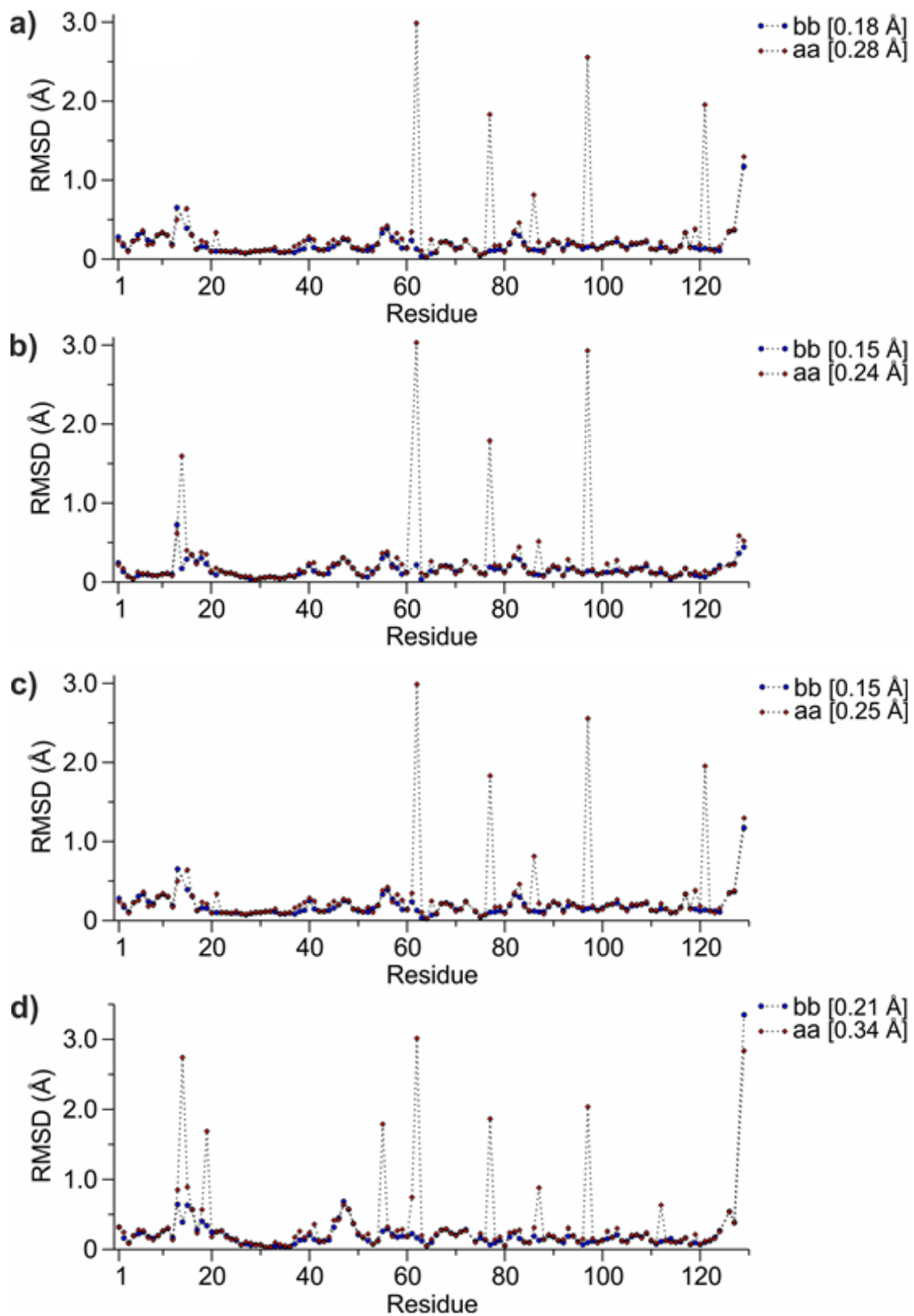
Χρόνος εμπάππισης κρυστάλλων HEWL σε NAMI-A (h)	1.5	8.0	26	98
Κωδικός PDB	7BCU	7BCX	7BD0	7BDM
<b>Συλλογή δεδομένων</b>				
Διακριτική ικανότητα (Å)	31.02 - 0.98 (1.015 - 0.98)	27.07 - 1.06 (1.098 - 1.06)	31.09 - 1.06 (1.098 - 1.06)	31.18 - 1.07 (1.108 - 1.07)
Κρυσταλλογραφική Ομάδα χώρου	P 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P 4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Μήκος κύματος ακτινοβολίας (Å)	0.98			
Συγχροτρονική ακτινοβολία	P13 EMBL Beamline Macromolecular Crystallography I - MX1 Beamline, PETRA III, Deutsches Elektronen-Synchrotron (DESY), Hamburg, Germany			
<b>Μοναδιαία Κυψελίδα</b>				
<i>a</i> (Å)	77.419	78.211	78.298	79.022
<i>b</i> (Å)	77.419	78.211	78.298	79.022
<i>c</i> (Å)	37.643	37.507	37.571	37.567
$\alpha$ (°)	90	90	90	90
$\beta$ (°)	90	90	90	90
$\gamma$ (°)	90	90	90	90
Συνολικές ανακλάσεις	1,508,985 (68,228)	1,302,962 (104,891)	1,306,678 (102,966)	795,681 (44,967)
Ανεξάρτητες ανακλάσεις	65,524 (6,106)	53,232 (4,334)	53,401 (4,834)	49,248 (4,759)
Πολλαπλότητα	23.0 (11.2)	24.5 (20.0)	24.5 (19.7)	16.2 (8.8)
Πληρότητα (%)	99.28 (93.92)	98.26 (82.60)	99.20 (91.94)	90.60 (88.86)
Μέσο <i>I</i> / $\sigma(I)$	28.13 (3.16)	26.55 (2.26)	21.00 (1.91)	33.21 (9.51)
Wilson <i>B</i> -factor (Å <sup>2</sup> )	7.53	13.61	13.81	16.03

$R_{merge}$	0.06844 (0.6783)	0.0643 (1.145)	0.08709 (1.334)	0.07443 (0.5491)
$R_{meas}$	0.06995 (0.711)	0.0659 (1.175)	0.08927 (1.369)	0.07635 (0.5827)
$R_{rim}$	0.01419 (0.208)	0.014 (0.2595)	0.019 (0.3041)	0.01645 (0.1918)
$CC_{\frac{1}{2}}$	0.999 (0.9)	0.998 (0.872)	0.996 (0.835)	0.947 (0.711)
$CC^*$	1 (0.973)	0.999 (0.965)	0.999 (0.954)	0.934 (0.677)
<b>Στατιστική Μοριακής Αντικατάστασης</b>				
LLG	8,195	12,764	13,496	13,200
TFZ-score	80.9	93.4	94.9	91.1
<b>Στατιστική Βελτιστοποίησης</b>				
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη βελτιστοποίηση	65,523 (6,106)	52,314 (4,335)	53,002 (4,834)	47,940 (4,620)
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον $R_{free}$	3,136 (291)	2,670 (217)	2,542 (241)	2,477 (233)
$R_{work}$	0.1269 (0.1912)	0.1611 (0.2276)	0.1637 (0.2285)	0.1697 (0.3447)
$R_{free}$	0.1445 (0.1956)	0.1847 (0.2569)	0.1829 (0.2524)	0.2010 (0.3429)
$CC_{work}$	0.971 (0.777)	0.959 (0.768)	0.952 (0.742)	0.947 (0.711)
$CC_{free}$	0.968 (0.771)	0.951 (0.730)	0.952 (0.748)	0.934 (0.677)
Πλήθος Πρωτεϊνικών καταλοίπων	129	129	129	129
Συνολικό πλήθος ατόμων	1,287	1,206	1,175	1,160
Πλήθος Πρωτεϊνικών ατόμων	1,037	1,004	992	1,019
Πλήθος Ετεροατόμων	56	46	44	13
Πλήθος ατόμων διαλύτη	194	156	139	128
Molprobability score	1.64	1.50	1.27	1.19
Clashscore	3.74	11.30	3.54	5.93
RMSD από ιδανικές αποστάσεις δεσμών (Å)	0.005	0.004	0.005	0.007
RMSD από ιδανικές γωνίες (°)	0.86	0.75	0.86	0.95
<b>Στατιστική Ramachandran</b>				

Πρωτεϊνικά κατάλοιπα σε ευνοϊκές περιοχές (%)	99.21	99.21	98.43	99.21
Πρωτεϊνικά κατάλοιπα σε επιτρεπόμενες περιοχές (%)	0.79	0.79	1.57	0.79
Ακραίες τιμές (Outliers)	0	0	0	0
<b>Μέσος B-factor (Å<sup>2</sup>)</b>				
Για όλη τη δομή	12.6	20.7	22.3	22.6
Για την πρωτεΐνη	9.8	17.8	20.2	20.4
Για τον προσδέτη	14.6	28.7	35.0	51.8
Για τον διαλύτη	26.9	37.0	33.2	36.7

## 5.5 Επαλληλία των δομών

Η δομική ομοιότητα των πρωτεϊνικών δομών ελέγχθηκε με τον υπολογισμό της ρίζας της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (εφεξής RMSD, Root-mean-square deviation) για τις θέσεις, τόσο της κύριας αλυσίδας (bb, backbone) όσο και όλων των ατόμων (aa, all-atoms), μεταξύ ζεύγους δομών όταν βρίσκονται σε επαλληλία. Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται το RMSD των aa και bb μεταξύ των ακολούθων ζεύγων δομών σε επαλληλία (οι δομές αναφέρονται με τον κωδικό PDB): 7BCU - 1IEE (δομή της Λυσοζύμης ελεύθερης υποκαταστάτη), 7BCU-7BCX, 7BCU-7BD0 και 7BCU-7BDM. Οι δομές που μελετώνται έχουν κωδικούς PDB, 7BCU (1.5h), 7BCX (8.0h), 7BD0 (26h) και 7BDM (98h).

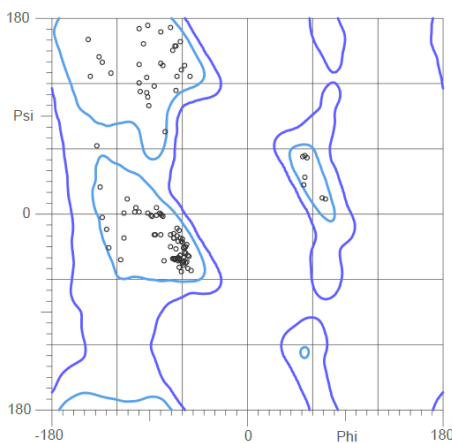


**Εικόνα 5.2:** Διαγράμματα RMSD ανά κατάλοιπο Λυσοζύμης για την κύρια αλυσίδα (backbone, bb, με μπλε) και για όλα τα άτομα (all-atoms, aa, κόκκινο) από την σύγκριση ατομικών θέσεων για τα ζεύγη δομών σε επαλληλία (αναφέρονται με τους κωδικούς PDB): (a) 7BCU - 1IEE, (b) 7BCX -

7BCU, (c) 7BD0 - 7BCU και (d) 7BDM - 7BCU. Οι τιμές στις παρενθέσεις είναι οι μέσες τιμές RMSD, αντίστοιχα.

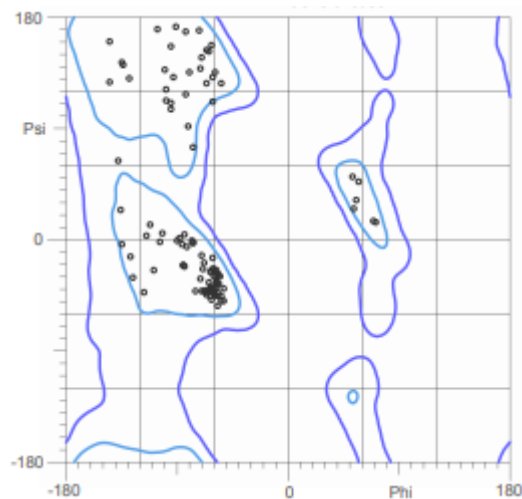
## 5.6 Διαγράμματα Ramachandran

Στην κρυσταλλική δομή 7BCU, που προσδιορίστηκε από κρυσταλλους HEWL εμβάπτισμένους σε NAMI-A για 1.5 h, σχεδόν όλα τα κατάλοιπα είναι σε ευνοϊκές θέσεις στο διάγραμμα Ramachandran, ενώ 1 κατάλοιπο είναι σε λιγότερο ευνοϊκή θέση (Εικόνα 5.3).



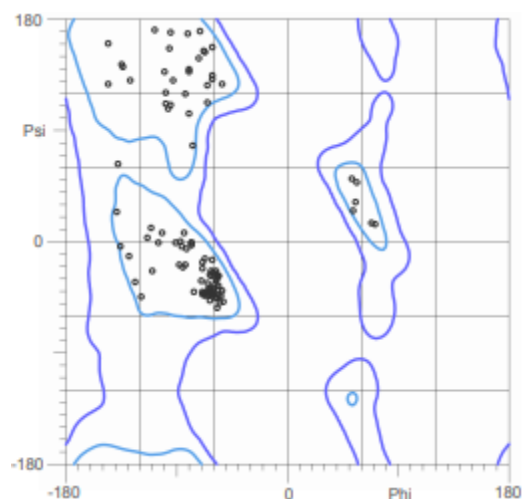
**Εικόνα 5.3:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 7BCU. Όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (99.21% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.01 με όριο το 2.

Στην κρυσταλλική δομή 7BCX (χρόνος εμβάπτισης 8h) σχεδόν όλα τα κατάλοιπα είναι σε ευνοϊκές θέσεις, ενώ 2 κατάλοιπα είναι σε λιγότερο ευνοϊκές θέσεις, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της Εικόνας 5.4.



**Εικόνα 5.4:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 7BCX. Σχεδόν όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (99.21% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.27 με όριο το 2.

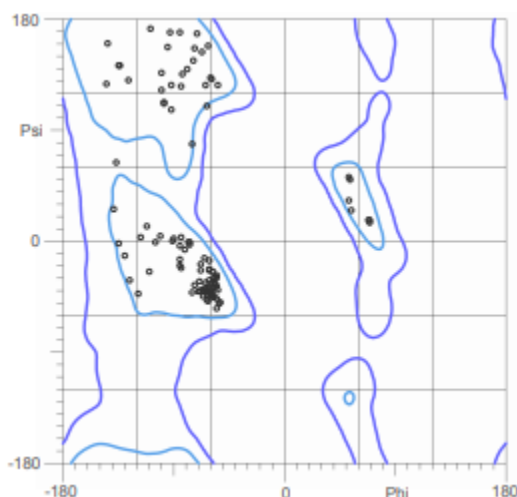
Στην κρυσταλλική δομή 7BD0 (χρόνος εμφάνισης 26h), σχεδόν όλα τα κατάλοιπα είναι σε ευνοϊκές θέσεις στο διάγραμμα Ramachandran, ενώ 1 κατάλοιπο βρίσκεται σε λιγότερο ευνοϊκή θέση (Εικόνα 5.5).



**Εικόνα 5.5:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 7BD0. Όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (98.43% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.41 με όριο το 2.



Τέλος, στην κρυσταλλική δομή 7BDM (χρόνος εμβάπτισης 98h), σχεδόν όλα τα κατάλοιπα είναι σε ευνοϊκές θέσεις στο διάγραμμα Ramachandran, ενώ 1 κατάλοιπο είναι σε λιγότερο ευνοϊκή θέση, όπως φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα της Εικόνας 5.6.



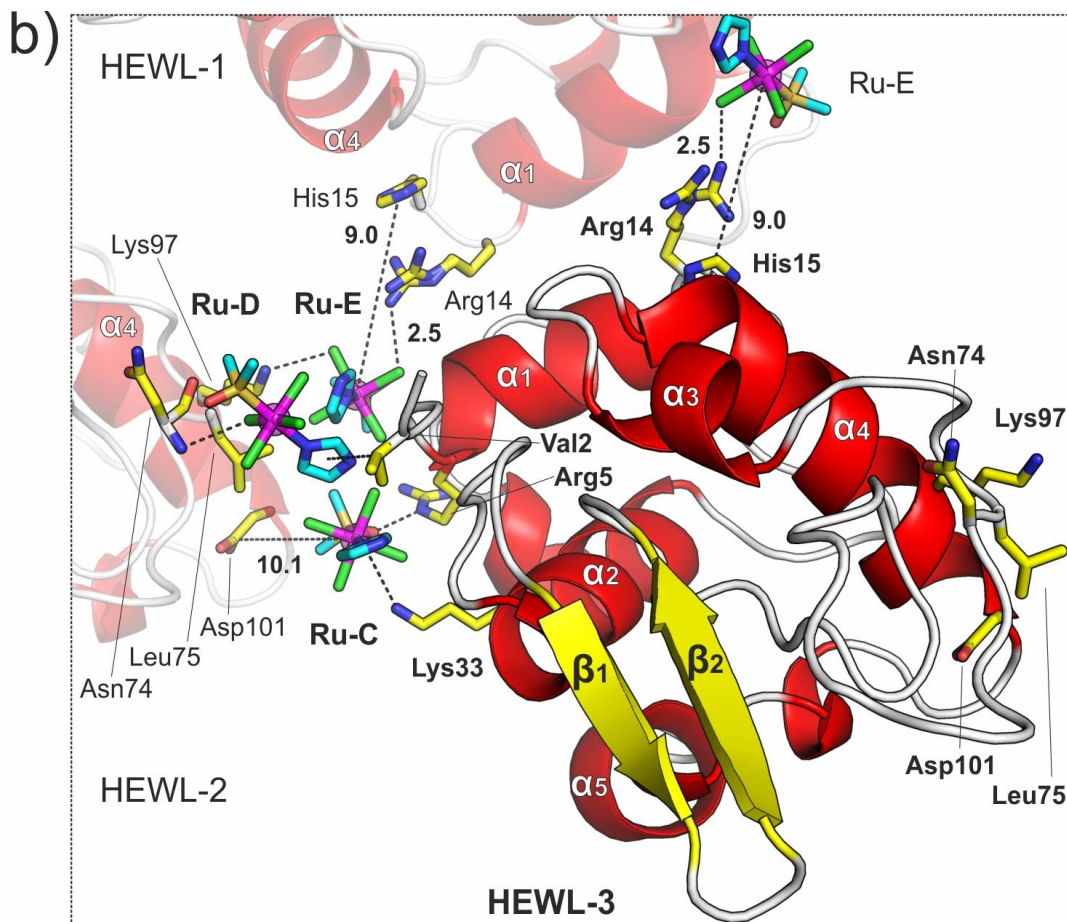
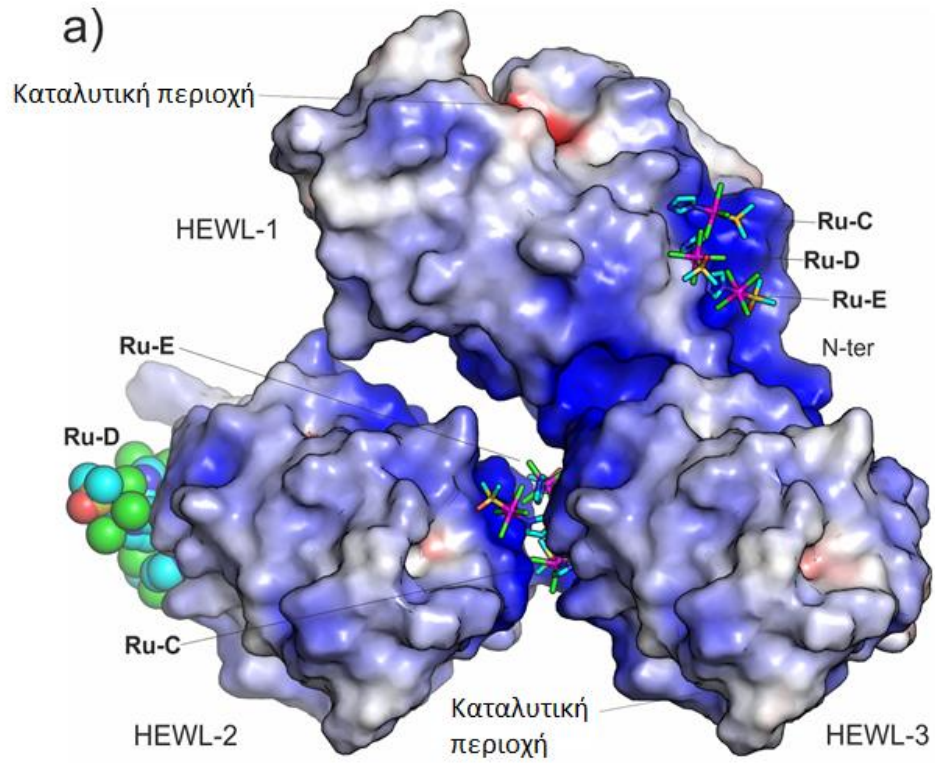
**Εικόνα 5.6:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 7BDM. Όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (99.21% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.37 με όριο το 2.

## 5.7 Τα μη-ομοιοπολικά σύμπλοκα του NAMI-A με την Λυσοζύμη

Το χρώμα των αρχικά άχρωμων, τετραγωνικών κρυστάλλων της Λυσοζύμης, έγινε πορτοκαλί μετά την εμβάπτισή τους σε περίσσεια NAMI-A για 1.5 ώρα. Επιλέχθηκαν και πάγωσαν ακαριαία (flash-frozen) καλής ποιότητας κρύσταλλοι και επιλύθηκε η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου σε διακριτική ικανότητα 0.98 Å, με τελικούς δείκτες αξιοπιστίας R-factor = 12.7% για 65,523 ανακλάσεις και  $R_{\text{free}} = 14.5\%$  για 3,136 ανακλάσεις. Η δομή κατατέθηκε στην Πρωτεϊνική βάση δεδομένων (PDB) με κωδικό **7BCU** (Πίνακας 5.2). Η ποιότητα του χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας ήταν γενικά άριστη και προσδιορίστηκαν οι θέσεις σχεδόν όλων των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων, εκτός των Arg73 και Arg128. Το βελτιστοποιημένο πρωτεϊνικό μοντέλο εμφανίζει μέση τιμή θερμοκινετικού παράγοντα (B factor) 9.8 Å<sup>2</sup>. Για έντεκα (11) αμινοξέα αναγνωρίστηκαν εναλλακτικές διαμορφώσεις (alternative conformations) των πλευρικών αλυσίδων (Lys1, Arg14, Asp48, Asn77, Ile78, Pro79, Ser81, Ser85, Ser86, Asn103 and Arg112). Η δομή εμφάνισε ελάχιστες διαφορές σε

σύγκριση με δομές της ελεύθερης υποκαταστάτη Λυσοζύμης (HEWL) που έχουν παρουσιαστεί σε προηγούμενες εργασίες. Ειδικότερα, οι RMSD τιμές που υπολογίζονται από τη σύγκριση των ατομικών θέσεων της 7BCU με την δομή Λυσοζύμης ελεύθερης υποκαταστάτη, που προσδιορίστηκε σε διακριτική ικανότητα 0.94 Å από τετραγωνικούς κρυστάλλους (PDB ID: 1EEE), είναι 0.16 Å για τα άτομα της κύριας αλυσίδας και 0.33 Å για όλα τα άτομα, με πιο ενδεικτικές διαφορές στις πλευρικές αλυσίδες των Arg14, Asn21, Arg61 and Asp101.

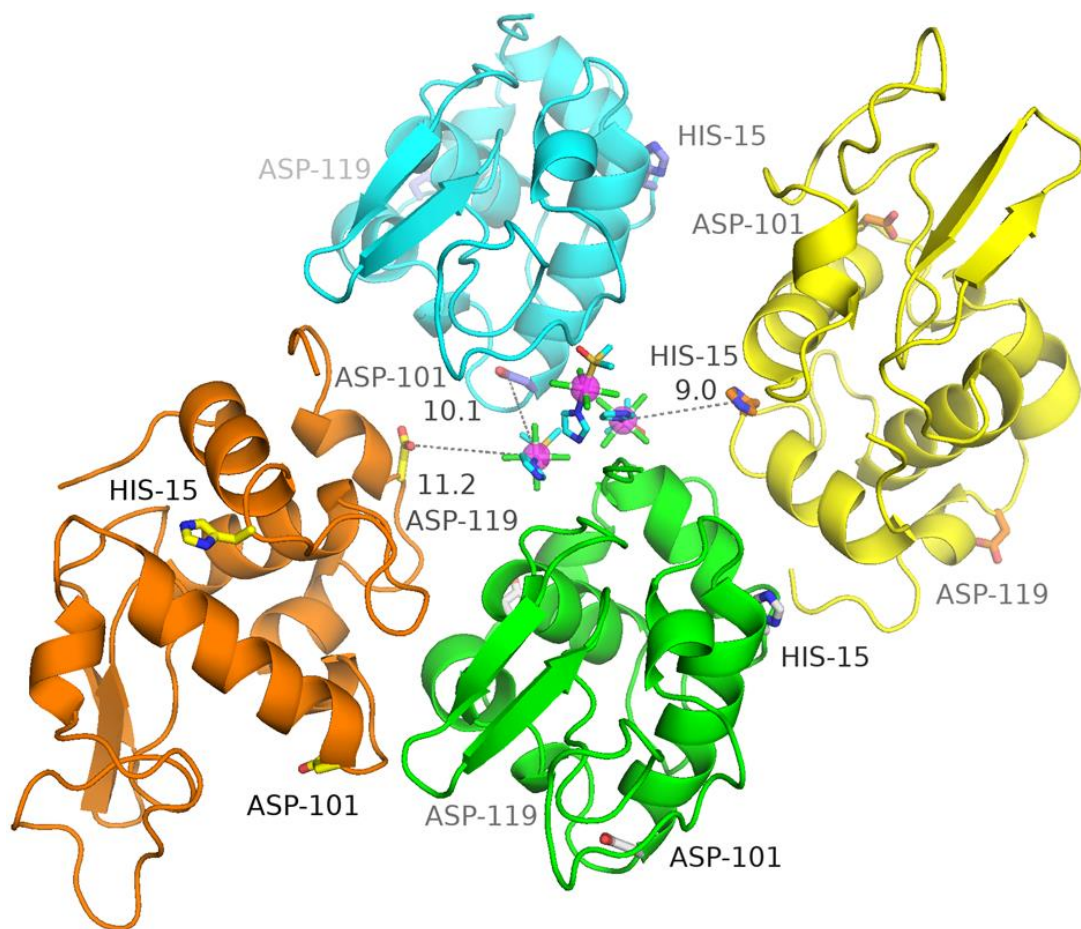
Μετά την επίλυση με τη μέθοδο μοριακής αντικατάστασης, καθαρή υπολειπόμενη ηλεκτρονιακή πυκνότητα για τα τρία μόρια του NAMI-A ανιχνεύθηκε στον χάρτη διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $F_o - F_c$ , στο N-τελικό άκρο της Λυσοζύμης (εφεξής θα αναφέρονται ως Ru-C, Ru-D, και Ru-E, όπως ονομάζονται στο PDB ID: 7BCU στις αλυσίδες (chains) με ονομασία C, D, E). Τα τρία κέντρα του Ρουθηνίου (Ru(III)) ταυτοποιήθηκαν ξεκάθαρα, από σήματα στο διαφορικό χάρτη ανώμαλης σκέδασης, σε ύψος κορυφής 18.4-18.9 σ. Επίσης, από τον διαφορικό χάρτη ανώμαλης σκέδασης, ταυτοποιήθηκαν και τα τέσσερα ισημερινά ιόντα χλωρίου και ο αξονικός υποκαταστάτης του θείου στο S-dmsο. Κατά τη βελτιστοποίηση του NAMI-A χωρίς στερικούς περιορισμούς, οι ενώσεις εμφάνισαν αριθμό κατάληψης 73% με μικρές τιμές θερμικών παραγόντων (B-factors) της τάξης των 7.6-8.2 Å<sup>2</sup>. Οι γεωμετρίες των NAMI-A (L-Ru-L γωνίες), είναι ελάχιστα παρεκκλίνουσες, λιγότερο των 4 μοιρών από τις ορθές γωνίες και 6 μοιρών από τις ευθείες γωνίες για τους trans υποκαταστάτες. Τα μήκη δεσμών βρέθηκαν στο τυπικό εύρος για Ru-N (2.10–2.13 Å), Ru-S (2.27–2.32 Å) and Ru-Cl (2.33–2.39 Å). Η παρουσία 3 ανιόντων NAMI-A ανά μόριο Λυσοζύμης οφείλεται πιθανά στην περίσσεια της ένωσης συναρμογής, υπό τις συνθήκες εμβάπτισης που εφαρμόστηκαν, και που είναι μακριά από τις σχετικές βιολογικά συνθήκες.



**Εικόνα 5.7:** Το σύμπλοκο της HEWL με το NAMI-A έπειτα από εμβάπτιση διάρκειας 1.5 ωρών (PDB ID: 7BCU). **a)** Απεικόνιση επιφάνειας τριών συμμετρικών στον κρύσταλλο μορίων HEWL, το καθένα προσδεμένο με τρία ανιόντα NAMI-A (επισημασμένα ως Ru-C, Ru-D, Ru-E). Η επιφάνεια είναι χρωματισμένη αντίστοιχα με το ηλεκτροστατικό δυναμικό με αρνητικές τιμές των  $-5 kT/e$  με κόκκινο, ουδέτερο με λευκό, και  $+5 kT/e$  με μπλε. Τα χρώματα των ατόμων είναι γαλάζιο για τον Άνθρακα, μπλε για το Άζωτο, κόκκινο για το Οξυγόνο, κίτρινο για το Θείο, πράσινο για το Χλώριο και μωβ για το Ρουθήνιο. **b)** Απεικόνιση των τριών ενώσεων NAMI-A προσδεμένων στην HEWL. Τα ένζυμα φαίνονται με απεικόνιση κορδέλας (ribbon representation), τα NAMI-A ως ραβδιά με μία μωβ σφαίρα να απεικονίζει το Ru(III) και τα αλληλεπιδρόντα κατάλοιπα να εμφανίζονται με κίτρινες ράβδους. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τις επιλεγμένες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και οι αποστάσεις από τις κοινές θέσεις His15 και Asp101 δίνονται σε Å. Η Arg14, ένα κοινά ευέλικτο κατάλοιπο, εμφανίζεται σε δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις.

Το ηλεκτροστατικό δυναμικό στην επιφάνεια της HEWL είναι σε μεγάλο βαθμό θετικό, εκτός από το ενεργό κέντρο και την γύρω περιοχή που περιέχει τα καταλυτικά όξινα κατάλοιπα. Τα τρία ανιόντα NAMI-A συγκεντρώθηκαν και διευθετήθηκαν μαζί στο θετικά φορτισμένο N-τελικό άκρο της HEWL και αλληλεπιδρούν εξίσου με τις θετικά φορτισμένες περιοχές του N-τελικού άκρου δύο συμμετρικών στον κρύσταλλο μακρομορίων (Εικόνα 5.7a). Οι υποκαταστάτες των τριών Ιμιδαζολίων έχουν μία διευθέτηση περίπου σχήματος T (T-shaped arrangement) με τις αποστάσεις των αρωματικών δακτυλίων στα 4.5 Å (Εικόνα 5.7b).

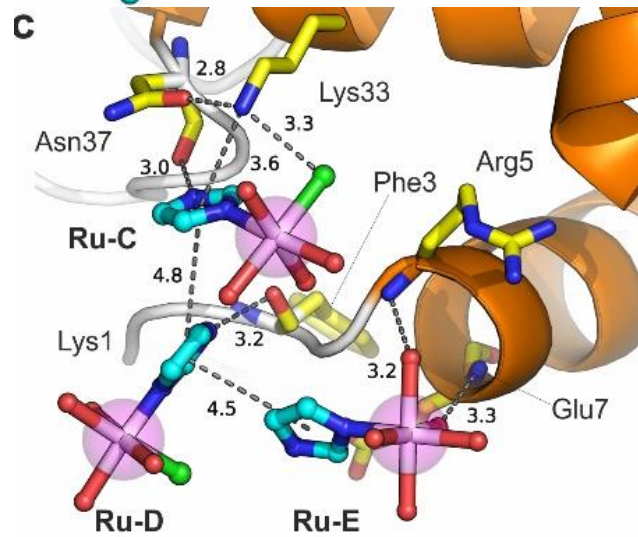
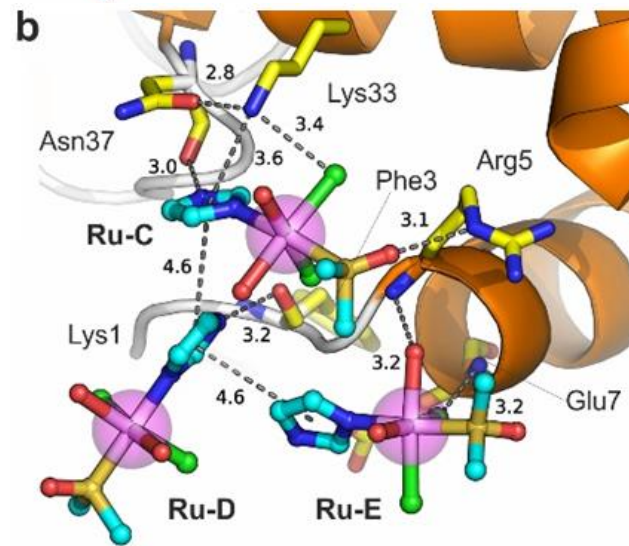
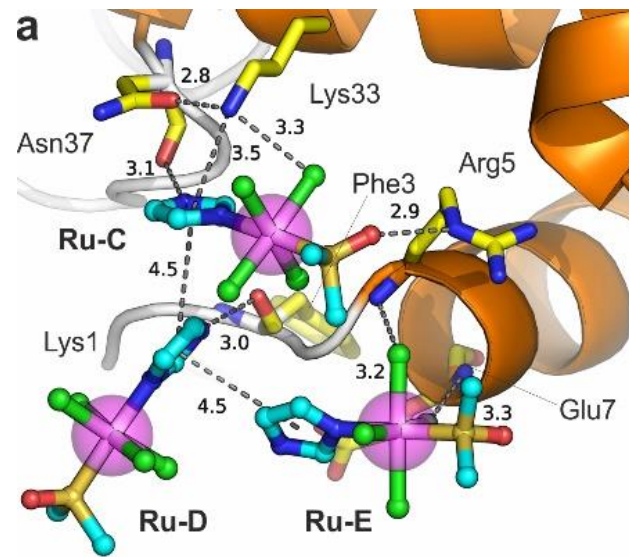
Πιο συγκεκριμένα, το Ru-C σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου με την Arg5, Lys33 και Asn37 και επίσης εμφανίζει κατιόν-π αλληλεπιδράσεις (3.5 Å) με την πλευρική αλυσίδα της Lys33. Το Ru-D σχηματίζει έναν μόνο δεσμό υδρογόνου με την κύρια αλυσίδα και πιο συγκεκριμένα με την καρβονυλομάδα της Phe3 και άλλον ένα δεσμό αλογόνου Cl $\cdots$ H-N με την κύρια αλυσίδα της Asn74 από ένα συμμετρικό στον κρύσταλλο μακρομόριο. Το Ru-E σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με τις αμιδικές ομάδες της κύριας αλυσίδας των Arg5 και Glu7, και επίσης έναν δεσμό υδρογόνου Cl $\cdots$ H-N με τις πλευρικές αλυσίδες της Lys97 από ένα συμμετρικό πάλι μακρομόριο. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε αυτή τη θέση, το μεταλλικό κέντρο βρίσκεται 9.0 Å από την His15 μίας συμμετρικής Λυσοζύμης, που αποτελεί την πιο κοινή θέση πρόσδεσης του Ρουθηνίου στη Λυσοζύμη. Επίσης, το Ru-C βρίσκεται 10.1 Å και 11.2 Å από την καρβοξυλομάδα του Asp101 και του Asp119, αντίστοιχα, δύο κατάλοιπα που έχει δειχτεί, σε προηγούμενη εργασία από τον Merlino <sup>78</sup>, ότι αποτελούν τη θέση πρόσδεσης του Ρουθηνίου του NAMI-A στη Λυσοζύμη.



**Εικόνα 5.8:** Σχηματική αναπαράσταση 4 συμμετρικών κρυσταλλογραφικά μορίων Λυσοζύμης (HEWL) με τα 3 προσδεμένα ιόντα NAMI-A στις 1.5 ώρες εμβάπτισης (soaking). (PDB ID: 7BCU) Οι αποστάσεις μεταξύ των κέντρων του Ru και των πιθανών κοντινών θέσεων ρουθηνίου (His15, Asp101, Asp119) φαίνονται με διακεκομμένες γραμμές και δίνονται σε Å.

## 5.8 Σταδιακή υδρόλυση των υποκαταστατών του NAMI-A

Η επώαση των κρυστάλλων της Λυσοζύμης σε περίσσεια του NAMI-A, για 8 και 26 ώρες είχε ως αποτέλεσμα τον χρωματισμό τους με κόκκινο χρώμα. Οι κρυσταλλικές δομές που προσδιορίστηκαν από αυτούς τους κρυστάλλους κατατέθηκαν στη PDB με κωδικούς (PDB ID) **7BCX** (8 h) και **7BD0** (26 h). Στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, εμφανίστηκε καθαρή πυκνότητα για τις τρεις οκταεδρικές ενώσεις συναρμογής στις ίδιες θέσεις πρόσδεσης που προσδιορίστηκαν στη δομή 7BCU (δομή από κρύσταλλο μετά από 1.5 ώρες εμφάνισης). Και οι δύο δομές (7BCX και 7BD0) επιλύθηκαν στα 1.06 Å και βελτιστοποιήθηκαν σε τελικές τιμές κρυσταλλογραφικών R-factors 16.1% ( $R_{\text{free}} = 18.5\%$ ) και 16.4% ( $R_{\text{free}} = 18.3\%$ ) αντίστοιχα. Αν και τα άτομα της Λυσοζύμης εμφάνισαν λίγο υψηλότερες μέσες τιμές θερμικών παραγόντων (B values) (17.8-20.2 Å<sup>2</sup>) σε σύγκριση με το πρώτο μοντέλο (10.3 Å<sup>2</sup>), οι δομές παρέμειναν σχεδόν παρόμοιες, όπως φαίνεται από τις χαμηλές τιμές ατομικού RMSD της τάξης του 0.15 Å για την κύρια αλυσίδα και 0.23–0.24 Å για όλα τα άτομα. Και για τις δύο δομές, δεν παρατηρήθηκε καθαρή ηλεκτρονική πυκνότητα για τέσσερα κατάλοιπα και πιο συγκεκριμένα για τις πλευρικές αλυσίδες των Arg61, Arg14, Arg73, Arg125 και Arg128. Πιο συγκεκριμένα για την Arg14 ενώ δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις (alternative conformations) παρατηρήθηκαν στην περίπτωση της 7BCX, δεν παρατηρήθηκε κάποια ηλεκτρονική πυκνότητα για την πλευρική αλυσίδα της στην περίπτωση της 7BD0. Επιπλέον, τα υποκατεστημένα NAMI-A που επιλύθηκαν (vide supra) συγκρατούν στις ίδιες θέσεις τους υποκαταστάτες των νερών, ιμιδαζολίου και εν μέρει DMSO, εμφανίζοντας π-π αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τριών δακτυλίων ιμιδαζολίου ως υποκαταστάτες. Οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις αναλυτικά φαίνονται στην εικόνα 5.9:

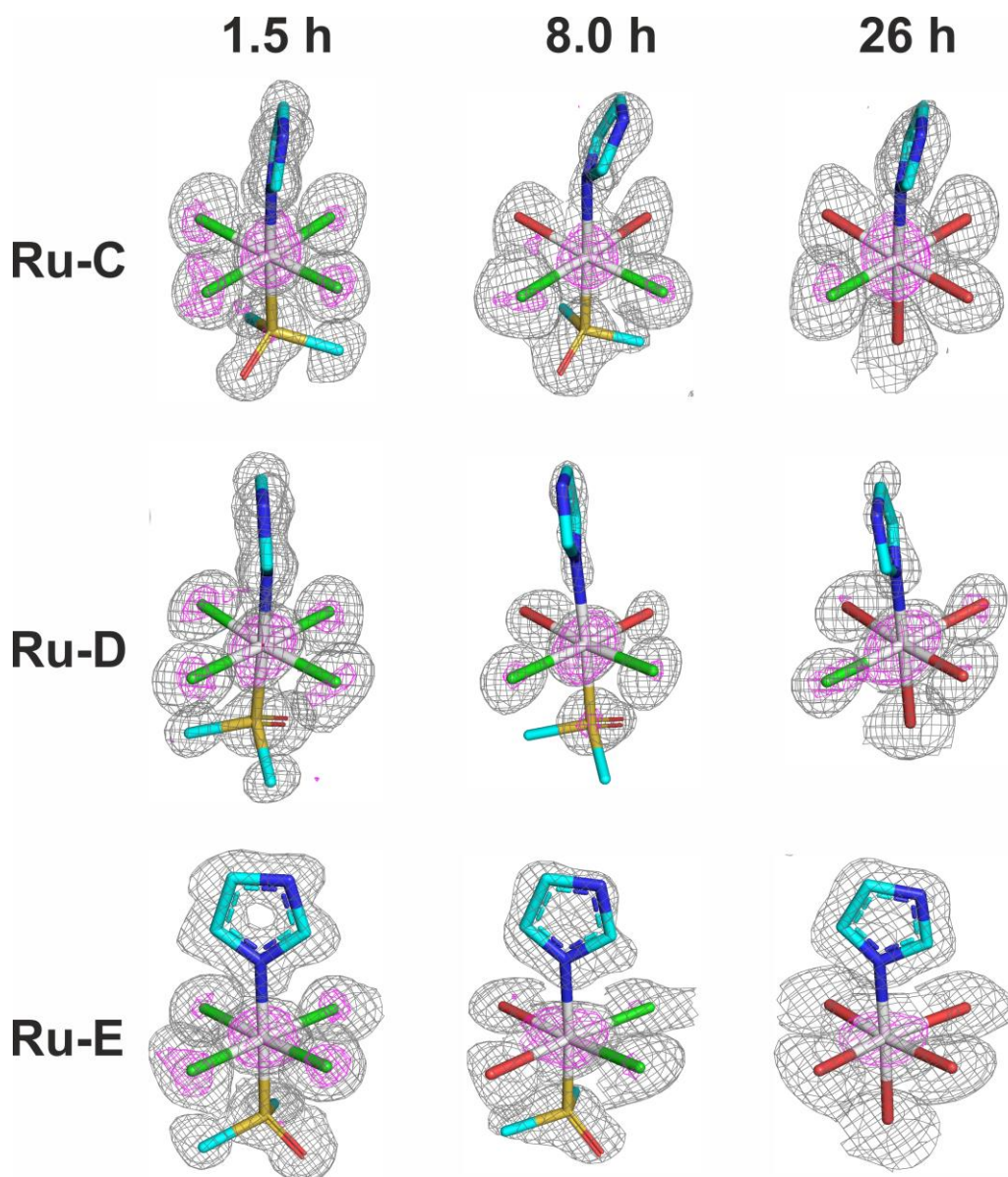


**Εικόνα 5.9:** Πρόσδεση του NAMI-A στη Λυσοζύμη από τις τρεις κρυσταλλικές δομές που προσδιορίστηκαν (a) 7BCU (1.5 h), (b) 7BCX (8 h) και (c) 7BD0 (26 h). Για το NAMI-A, τα άτομα του άνθρακα είναι κυανά και για την Λυσοζύμη είναι κίτρινα. Οι δεσμοί υδρογόνου και αλογόνου, όπως και οι αρωματικές αλληλεπιδράσεις, είναι επισημασμένες με διακεκομμένες γραμμές, συμπεριλαμβανομένων και των αλληλεπιδράσεων με τα συμμετρικά μακρομόρια.

Αν και η ηλεκτρονική πυκνότητα ήταν πολύ καλά ορισμένη για τον υποκαταστάτη του ιμιδαζολίου των τριών NAMI-A τμημάτων στις δομές που επιλύθηκαν μετά από soaking για 8 και για 26 ώρες, δεν παρατηρήσαμε επαρκή ηλεκτρονική πυκνότητα για να αποδώσουμε τον υποκαταστάτη dmsο σε κάποιο από τις τρεις ενώσεις στις 26 ώρες. Στην πραγματικότητα, κάποιος θα μπορούσε να ισχυριστεί ότι ακόμα και για το Ru-D στη δομή των 8 ωρών, ο υποκαταστάτης dmsο εμφανίζει ασθενή πυκνότητα για να γίνει μοντελοποίηση. Γι' αυτό το λόγο, εφαρμόστηκε χαρτογράφηση ανώμαλης σκέδασης (anomalous scattering mapping) για να προσδιοριστεί η ακριβής θέση του Ru και για το αν το Ru κρατάει τους υποκαταστάτες του στη διάρκεια του χρόνου. Αναλυτικά, θεωρήσαμε ότι η απουσία των παρατηρούμενων κορυφών στο χάρτη ανώμαλης σκέδασης υποδεικνύει την απουσία των βαρέων ατόμων, όπως είναι το αξονικό θείο S (dmsο) ή τα ισημερινά χλώρια Cl<sup>-</sup> του NAMI-A, ενώ η παρουσία έστω και χαμηλού ύψους κορυφής υποδεικνύει την παρουσία του S ή του Cl<sup>-</sup> στον αντίστοιχο βαθμό κατάληψης του συμπλόκου. Με αυτό τον τρόπο, μοντελοποιήσαμε τρία τμήματα (υδρολυμένα) του NAMI-A {Ru(Im)(dmsο)Cl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>} στη δομή των 8 ωρών, και τρία τμήματα {Ru(Im)(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>X}, όπου X=Cl για Ru-C και Ru-D, και H<sub>2</sub>O για Ru-E (Εικόνα 5.10).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα αποτελέσματα, αυτά υποδεικνύουν ότι ο μηχανισμός υδρόλυσης του NAMI-A υπό αυτές τις συνθήκες ξεκινάει από τα ισημερινούς υποκαταστάτες των χλωρίων και ακολουθεί η υδρόλυση του dmsο υποκαταστάτη κατά τη διάρκεια της πρώτης μέρας. Η αντίθεση ανάμεσα στους χαμηλότερους ρυθμούς υδρόλυσης που παρατηρήθηκαν σε διάλυμα με φασματοσκοπικές μελέτες παρατηρείται λόγω της υψηλής τοπικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης/NAMI-A, τις όξινες συνθήκες (pH 4.6) και την υψηλή συγκέντρωση άλατος (1.5 M NaCl) στο ρυθμιστικό διάλυμα.

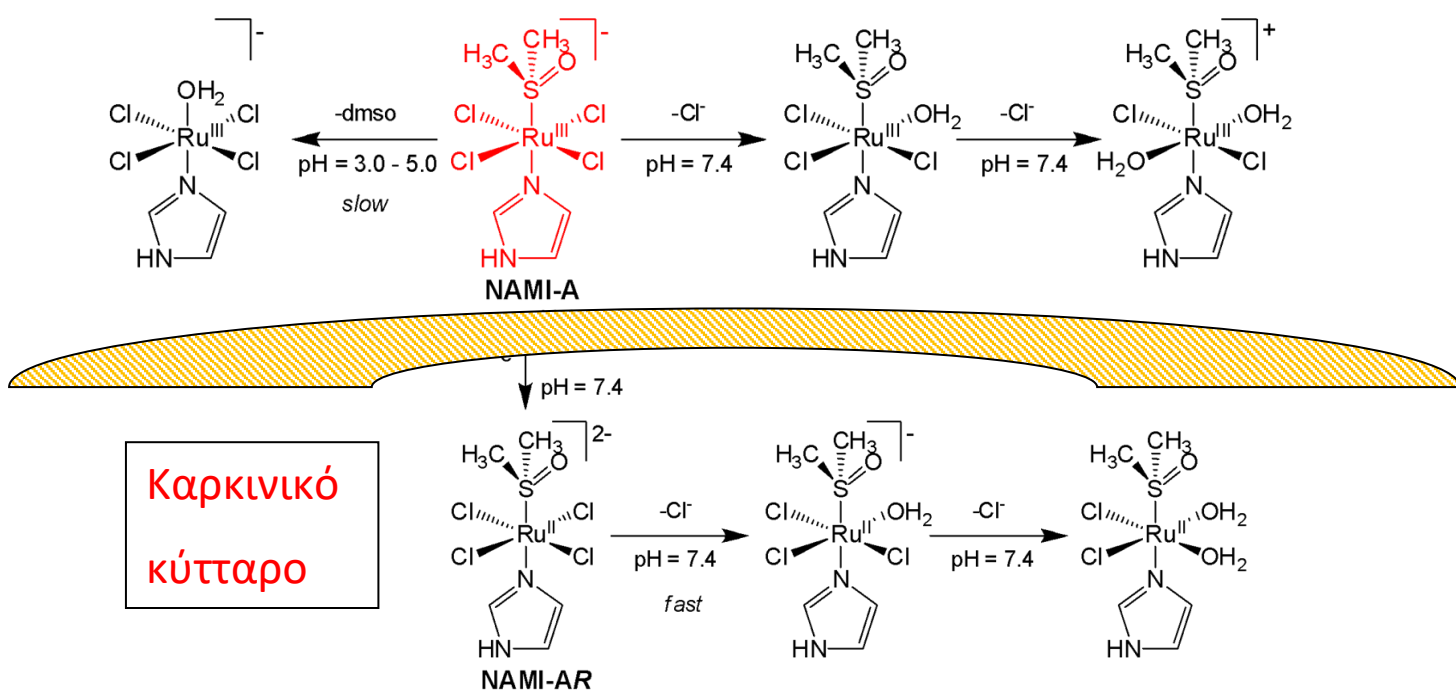




**Εικόνα 5.10:** Αναπαράσταση των τριών NAMI-A τμημάτων που αναγνωρίστηκαν σε σύμπλοκο με τη Λυσοζύμη σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία, φανερώνοντας την unbiased (αρχική) ηλεκτρονική πυκνότητα σε 1.0 σ (με γκρι) μαζί με την ηλεκτρονική πυκνότητα ανώμαλης σκέδασης σε 3.0 σ (με μωβ). Τα κέντρα του Ru είναι χρωματισμένα με λευκό χρώμα και οι ενώσεις συναρμογής είναι προσανατολισμένες στην ίδια θέση και στα τρία χρονικά διαστήματα, ως δυνατόν, για διευκρίνιση των ηλεκτρονικών πυκνοτήτων.

## 5.9 Ο μηχανισμός υδρόλυσης του NAMI-A σε υδατικό διάλυμα

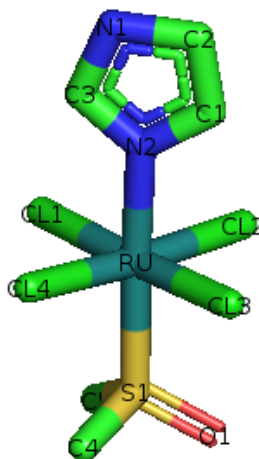
Η παρουσία του S-dmsο στη σφαίρα συναρμογής του NAMI-A επίσης επηρεάζει την χημική συμπεριφορά του σε υδατικό διάλυμα, όπου εμπλέκεται σε μία σειρά υδρολυτικών διαδικασιών της οποίας η φύση είναι ισχυρά εξαρτώμενη από το pH (βλ. παρακάτω Εικόνα 5.11) <sup>164</sup>. Στους 37.0 °C και σε φυσιολογικό pH = 7.4 (ρυθμιστικό φωσφορικών), η ένωση είναι σίγουρα μη αδρανής, αφού λαμβάνει χώρα σταδιακή υδρόλυση των δύο χλωρίων μέσα σε λίγα λεπτά. Το πρώτο υδρολυτικό στάδιο καταλύεται από τα τμήματα των συμπλόκων του Ru(III) και η ταχύτητα του ενισχύεται σημαντικά με την παρουσία ιχνοποσοτήτων βιολογικών αναγωγικών μέσων, όπως είναι το ασκορβικό οξύ και η κυστεΐνη. Η δεύτερη υδρολυτική διαδικασία συνοδεύεται από την μερική αποδέσμευση του S-dmsο. Η υδρόλυση του NAMI-A in vitro οδηγεί στον σχηματισμό πολυμερικών πολύ-όξο ενώσεων ή υδροξο-γεφυρωμένων ενώσεων (σκούρο χρώμα), ενώ in vivo αυτό το φαινόμενο δεν εμφανίζεται εξαιτίας των βιο-υποκαταστατών που επιτυχημένα ανταγωνίζονται με τα OH<sup>-</sup> για συναρμογή <sup>165</sup>. Σε αντίθεση, το NAMI-A είναι σημαντικά αδρανές σε θερμοκρασία δωματίου και σε ελαφρώς όξινο pH (συνθήκες παροχής του στον άνθρωπο): η υδρόλυση των χλωρίων καταστέλλεται και μόνο αντικατάσταση του S-dmsο με μόριο νερού παρατηρείται <sup>166</sup>.



Εικόνα 5.11: Η υδρόλυση του NAMI-A σε υδατικό διάλυμα ουδέτερου και όξινου pH.

## 5.9 Κρυσταλλογραφικές πληροφορίες και ανάλυση των προσδεδεμένων NAMI-A στα σύμπλοκα 7BCU (1.5h), 7BCX (8h) και 7BD0 (26h)

Αρχικά, δίνεται η κρυσταλλική δομή του αντικαρκινικού φαρμάκου NAMI-A, μη συμπλοκοποιημένου (uncomplexed), όπως ευρέθη κατατεθειμένη από το 2019 στην κρυσταλλογραφική βάση δεδομένων μικρών μορίων CCDC με κωδικό 1939411 (Εικόνα 5.12). Στον ακόλουθο Πίνακα 5.12, δίνεται η αναλυτική περιγραφή των γεωμετρικών χαρακτηριστικών του NAMI-A (αποστάσεις των ατόμων των υποκαταστατών και γωνίες γύρω από το μεταλλικό κέντρο του Ru(III)) όπως προκύπτουν από αυτήν την κρυσταλλική δομή.



**Εικόνα 5.12:** Κρυσταλλική δομή του NAMI-A (uncomplexed) από CCDC (κωδικός: 1939411)

**Πίνακας 5.2** Γεωμετρικά χαρακτηριστικά του NAMI-A (uncomplexed) από CCDC (κωδικός: 1939411)

Δεσμός	Απόσταση (Å)	Γωνία	(°)
Ru-Cl(1)	2.3	Cl(1)-Ru-Cl(2)	89.2
Ru-Cl(2)	2.4	Cl(1)-Ru-Cl(3)	179.1
Ru-Cl(3)	2.4	Cl(1)-Ru-Cl(4)	89.9
Ru-Cl(4)	2.4	Cl(2)-Ru-Cl(3)	90.1
Ru-S(dmsο)	2.3	Cl(2)-Ru-Cl(4)	177.0
Ru-N(Im)	2.1	Cl(3)-Ru-Cl(4)	90.7
		S-Ru-Cl(1)	91.8

S-Ru-Cl(2)	91.6
S-Ru-Cl(3)	88.8
S-Ru-Cl(4)	91.2
N-Ru-Cl(1)	88.7
N-Ru-Cl(2)	89.6
N-Ru-Cl(3)	90.8
N-Ru-Cl(4)	87.6
S-Ru-N	178.7

Στη συνέχεια παρατίθενται οι αναλυτικοί Πίνακες 5.3, 5.4 και 5.5, στους οποίους δίνονται αναλυτικές κρυσταλλογραφικές πληροφορίες για τα τμήματα NAMI-A, όπως προσδιορίστηκαν προσδεδεμένα στη Λυσοζύμη, στα σύμπλοκα 7BCU (1.5h), 7BCX (8h) και 7BD0 (26h) αντίστοιχα (Εικόνα 5.9), καθώς και η γεωμετρική ανάλυση που αφορά στις αλληλεπιδράσεις τους με κατάλοιπα της Λυσοζύμης. Οι αριθμοί στην παρένθεση υποδεικνύουν το αντίστοιχο όνομα ατόμου για κάθε αλυσίδα όπως καταγράφονται στα αντίστοιχα PDB. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν τα κατάλοιπα από κρυσταλλογραφικά συμμετρικό μακρομόριο. Στους Πίνακες 5.6, 5.7 και 5.8, δίνονται αναλυτικά τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά αυτών των τμημάτων NAMI-A.

**Πίνακας 5.3:** Κρυσταλλογραφικές πληροφορίες για τα τμήματα NAMI-A στο σύμπλοκο 7BCU (1.5 h) και τις αλληλεπιδράσεις τους με κατάλοιπα της Λυσοζύμης

NAMI-A/HEWL μετά από εμβάπτιση για 1.5 h (δομή PDB ID: 7BCU)							
NAMI-A	Κατάληψη	Μέση τιμή B	Anomalous ( $\sigma$ ) <sup>†</sup> Unbiased / Refined		HEWL Κατάλοιπο (άτομο)	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
Ru	0.73	8.2	18.9	30.2			
Im		8.5			Asn37(C=O)	3.11	159.0
dmsO		10.5	5.6	8.0	Arg5(N <sup>ε</sup> H)	2.90	153.4
Cl <sup>(3)</sup>		9.1	5.6	9.4			
Cl <sup>(4)</sup>		7.8	6.6	10.2	Arg5(NH)	3.45	132.5
Cl <sup>(5)</sup>		8.6	6.0	9.8	Lys33(N <sup>ζ</sup> H)	3.31	161.7
Cl <sup>(6)</sup>		9.5	4.7	9.1	Lys33(N <sup>ζ</sup> H)	3.55	112.4
Ru	0.73	7.6	18.4	31.5			
Im		7.7			Phe3(C=O)	3.00	154.3
dmsO		9.0	5.4	9.4			
Cl <sup>(3)</sup>		10.1	5.7	9.0			
Cl <sup>(4)</sup>		9.5	4.6	8.9			
Cl <sup>(5)</sup>		8.3	5.5	9.8	*Asn74(NH)	3.45	149.2
Cl <sup>(6)</sup>		9.7	4.7	8.7			

Ru	0.75	8.1	18.4	31.6			
Im		9.6					
dmsO		9.7	6.2	9.3			
Cl <sup>(3)</sup>		9.9	5.3	8.8	*Lys97(N <sup>ζ</sup> H)	3.22	138.2
Cl <sup>(4)</sup>		9.7	5.1	8.8	*Arg14(NH <sub>2</sub> ) *Lys97(N <sup>ζ</sup> H)	3.18 3.36	141.4 131.7
Cl <sup>(5)</sup>		8.2	6.8	10.5	Glu7(NH) *Arg14(NH <sub>2</sub> )	3.28 2.41	135.4 140.6
Cl <sup>(6)</sup>		9.7	5.2	9.0	Arg5(NH)	3.20	128.1

**Πίνακας 5.4:** Κρυσταλλογραφικές πληροφορίες για τα τμήματα NAMI-A στο σύμπλοκο 7BCX (8 h) και τις αλληλεπιδράσεις τους με κατάλοιπα της Λυσοζύμης

NAMI-A/HEWL μετά από εμβάπτιση για 8 h (δομή PDB ID: 7BCX)							
NAMI-A	Κατάληψη	Μέση τιμή B	Anomalous ( $\sigma$ ) <sup>†</sup> Unbiased / Refined		HEWL Κατάλοιπο (άτομο)	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
Ru	0.72	28.8	7.6	13.2			
Im		27.3			Asn37(C=O)	3.00	159.7
dmsO		52.8	2.5	2.7	Arg5(N <sup>ε</sup> H)	3.10	170.1
O <sup>(4)</sup>		17.5					
O <sup>(5)</sup>		18.3			Lys33(N <sup>ζ</sup> H)	3.68	108.8
Cl <sup>(6)</sup>		31.2	3.2	4.5	Arg5(NH)	3.46	133.5
Cl <sup>(7)</sup>		24.9	3.7	5.2	Lys33(N <sup>ζ</sup> H)	3.36	165.8
Ru	0.34	14.2	6.0	12.0			
Im		17.8			Phe3(C=O)	3.24	144.8
dmsO		16.8	1.8	3.8			
O <sup>(3)</sup>		15.3					
O <sup>(4)</sup>		7.8			*Asn74(NH)	3.40	150.7
Cl <sup>(5)</sup>		18.2	2.6	3.6			
Cl <sup>(6)</sup>		16.0		3.7			
Ru	0.54	22.7	7.0	13.0			
Im		21.0					
dmsO		31.5	2.1	3.5			
O <sup>(3)</sup>		18.0			Arg5(NH)	3.20	124.2
O <sup>(4)</sup>		15.9					
Cl <sup>(5)</sup>		36.3	1.9	2.7	*Arg14(NH <sub>2</sub> )	3.35	128.0
Cl <sup>(6)</sup>		26.0	3.0	4.4	Glu7(NH) *Arg14(NH <sub>2</sub> )	3.25 2.82	136.4 110.7

**Πίνακας 5.5:** Κρυσταλλογραφικές πληροφορίες για τα τμήματα NAMI-A στο σύμπλοκο 7BD0 (26 h) και τις αλληλεπιδράσεις τους με κατάλοιπα της Λυσοζύμης

NAMI-A/HEWL μετά από εμβάπτιση για 26 h (δομή PDB ID: 7BD0)								
ID	NAMI-A	Κατάληψη	Μέση τιμή B	Anomalous ( $\sigma$ ) <sup>†</sup> Unbiased / Refined		HEWL Κατάλοιπο (άτομο)	Απόσταση (Å)	Γωνία (°)
C	Ru	0.82	30.5	9.8	15.6			
	Im		32.2			Asn37(C=O)	2.98	164.3
	O <sup>(2)</sup>		24.7					
	Cl <sup>(4)</sup>		27.6	3.5	5.6	Lys33(N <sup>ζ</sup> H)	3.27	170.9
	O <sup>(5)</sup>		21.9			Lys33(N <sup>ζ</sup> H)	3.51	108.8

	O <sup>(6)</sup>		19.0			*Arg73(N <sup>ε</sup> H)	2.49	101.6
	O <sup>(7)</sup>		14.6			Arg5(NH)	3.39	137.0
D	Ru	0.43	15.6	8.2	15.5			
	Im		28.5			Phe3(C=O)	3.17	147.3
	O <sup>(2)</sup>		10.3					
	O <sup>(4)</sup>		9.0			*Asn74(NH)	3.42	150.6
	Cl <sup>(5)</sup>		17.4	2.0	4.6			
	O <sup>(6)</sup>		12.3					
	O <sup>(7)</sup>		10.6					
E	Ru	0.64	24.0	9.2	15.8			
	Im		22.0					
	O <sup>(2)</sup>		17.9					
	O <sup>(4)</sup>		18.2					
	O <sup>(5)</sup>		17.3			Glu7(NH)	3.25	131.9
	O <sup>(6)</sup>		16.0			Arg5(NH)	3.22	121.2
	O <sup>(7)</sup>		18.4					

**Πίνακας 5.6:** Γεωμετρικά χαρακτηριστικά των προσδεμένων NAMI-A στο σύμπλοκο 7BCU (1.5h)

Ru-C		Ru-D		Ru-E	
Δεσμός	Απόσταση (Å)	Δεσμός	Απόσταση (Å)	Δεσμός	Απόσταση (Å)
Ru-Cl(4)	2.33	Ru-Cl(3)	2.35	Ru-Cl(3)	2.37
Ru-Cl(5)	2.37	Ru-Cl(6)	2.39	Ru-Cl(5)	2.38
Ru-Cl(6)	2.36	Ru-Cl(5)	2.35	Ru-Cl(6)	2.34
Ru-Cl(3)	2.34	Ru-Cl(4)	2.36	Ru-Cl(4)	2.37
Ru-N(Im)	2.13	Ru-N(Im)	2.10	Ru-N(Im)	2.12
Ru-S(dmso)	2.32	Ru-S(dmso)	2.27	Ru-S(dmso)	2.29
Γωνία	(°)	Γωνία	(°)	Γωνία	(°)
Cl(4)-Ru-Cl(5)	90.5	Cl(5)-Ru-Cl(6)	87.6	Cl(4)-Ru-Cl(5)	90.1
Cl(5)-Ru-Cl(6)	88.0	Cl(3)-Ru-Cl(6)	87.7	Cl(5)-Ru-Cl(6)	86.6
Cl(3)-Ru-Cl(6)	90.1	Cl(3)-Ru-Cl(4)	91.9	Cl(3)-Ru-Cl(6)	91.1
Cl(4)-Ru-Cl(6)	176.1	Cl(3)-Ru-Cl(5)	174.5	Cl(4)-Ru-Cl(6)	176.7
Cl(3)-Ru-Cl(5)	177.9	Cl(4)-Ru-Cl(6)	177.4	Cl(3)-Ru-Cl(5)	175.4
Cl(3)-Ru-Cl(4)	91.4	Cl(4)-Ru-Cl(5)	92.7	Cl(3)-Ru-Cl(4)	92.2

Cl(4)-Ru-N(Im)	87.3	Cl(5)-Ru-N(Im)	88.5	Cl(4)-Ru-N(Im)	89.8
Cl(2)-Ru-N(Im)	89.0	Cl(6)-Ru-N(Im)	88.8	Cl(5)-Ru-N(Im)	87.0
Cl(3)-Ru-N(Im)	90.2	Cl(3)-Ru-N(Im)	88.5	Cl(6)-Ru-N(Im)	90.0
Cl(4)-Ru-N(Im)	89.2	Cl(4)-Ru-N(Im)	88.6	Cl(3)-Ru-N(Im)	89.0
Cl(1)-Ru-S(dmso)	90.4	Cl(5)-Ru-S(dmso)	90.5	Cl(4)-Ru-S(dmso)	90.9
Cl(5)-Ru-S(dmso)	91.7	Cl(6)-Ru-S(dmso)	93.0	Cl(5)-Ru-S(dmso)	94.8
Cl(6)-Ru-S(dmso)	93.3	Cl(3)-Ru-S(dmso)	92.6	Cl(6)-Ru-S(dmso)	89.4
Cl(3)-Ru-S(dmso)	89.2	Cl(4)-Ru-S(dmso)	89.6	Cl(3)-Ru-S(dmso)	89.2
N(Im)-Ru-S(dmso)	177.5	N(Im)-Ru-S(dmso)	177.9	N(Im)-Ru-S(dmso)	178.1

**Πίνακας 5.7:** Γεωμετρικά χαρακτηριστικά των προσδεμένων NAMI-A στο σύμπλοκο 7BCX (8h)

Ru-C		Ru-D		Ru-E	
Δεσμός	Απόσταση (Å)	Δεσμός	Απόσταση (Å)	Δεσμός	Απόσταση (Å)
Ru-Cl(6)	2.31	Ru-O(3)	2.40	Ru-Cl(5)	2.46
Ru-Cl(7)	2.53	Ru-O(4)	2.36	Ru-Cl(6)	2.51
Ru-O(5)	2.13	Ru-Cl(5)	2.39	Ru-O(3)	2.32
Ru-O(4)	2.37	Ru-Cl(6)	2.39	Ru-O(4)	2.35
Ru-N(Im)	2.17	Ru-N(Im)	2.16	Ru-N(Im)	2.13
Ru-S(dmso)	2.55	Ru-S(dmso)	2.29	Ru-S(dmso)	2.36
Γωνία	(°)	Γωνία	(°)	Γωνία	(°)
Cl(6)-Ru-Cl(7)	90.0	O(3)-Ru-O(4)	87.1	Cl(5)-Ru-Cl(6)	85.7
Cl(7)-Ru-O(5)	89.4	O(3)-Ru-Cl(5)	89.3	Cl(6)-Ru-O(3)	84.7
O(5)-Ru-O(4)	90.7	Cl(5)-Ru-Cl(6)	91.4	O(3)-Ru-O(4)	95.4
Cl(6)-Ru-O(5)	179.3	O(4)-Ru-Cl(5)	175.4	Cl(5)-Ru-O(3)	170.3
Cl(7)-Ru-O(4)	177.2	O(3)-Ru-Cl(6)	177.2	Cl(6)-Ru-O(4)	174.0
Cl(6)-Ru-O(4)	89.9	O(4)-Ru-Cl(6)	92.1	Cl(5)-Ru-O(4)	94.3
Cl(6)-Ru-N(Im)	93.5	O(4)-Ru-N(Im)	86.8	Cl(5)-Ru-N(Im)	91.1

Cl(7)-Ru-N(lm)	91.6	O(3)-Ru-N(lm)	87.4	Cl(6)-Ru-N(lm)	85.7
O(5)-Ru-N(lm)	86.8	Cl(5)-Ru-N(lm)	90.1	O(3)-Ru-N(lm)	89.4
O(4)-Ru-N(lm)	91.2	Cl(6)-Ru-N(lm)	90.0	O(4)-Ru-N(lm)	88.3
Cl(6)-Ru-S(dmsO)	83.2	O(4)-Ru-S(dmsO)	91.9	Cl(5)-Ru-S(dmsO)	93.0
Cl(7)-Ru-S(dmsO)	91.2	O(3)-Ru-S(dmsO)	92.3	Cl(6)-Ru-S(dmsO)	96.4
O(5)-Ru-S(dmsO)	96.5	Cl(5)-Ru-S(dmsO)	91.1	O(3)-Ru-S(dmsO)	86.9
O(4)-Ru-S(dmsO)	86.0	Cl(6)-Ru-S(dmsO)	90.4	O(4)-Ru-S(dmsO)	89.6
N(lm)-Ru-S(dmsO)	175.6	N(lm)-Ru-S(dmsO)	178.7	N(lm)-Ru-S(dmsO)	175.5

**Πίνακας 5.8:** Γεωμετρικά χαρακτηριστικά των προσδεδωμένων NAMI-A στο σύμπλοκο 7BD0 (26h)

Ru-C		Ru-D		Ru-E	
Δεσμός	Απόσταση (Å)	Δεσμός	Απόσταση (Å)	Δεσμός	Απόσταση (Å)
Ru-O(5)	2.25	Ru-Cl(5)	2.37	Ru-O(4)	2.37
Ru-Cl(4)	2.46	Ru-O(4)	2.36	Ru-O(5)	2.39
Ru-O(6)	2.39	Ru-O(6)	2.35	Ru-O(6)	2.34
Ru-O(7)	2.36	Ru-O(7)	2.40	Ru-O(7)	2.35
Ru-N(lm)	2.14	Ru-N(lm)	2.09	Ru-N(lm)	2.13
Ru-O(2)	2.38	Ru-O(2)	2.25	Ru-O(2)	2.34
Γωνία	(°)	Γωνία	(°)	Γωνία	(°)
O(1)-Ru-Cl(4)	90.4	O(4)-Ru-O(7)	88.2	O(7)-Ru-O(5)	90.7
Cl(4)-Ru-O(5)	87.5	O(7)-Ru-O(6)	89.1	O(5)-Ru-O(6)	86.3
O(5)-Ru-O(6)	92.5	O(6)-Ru-Cl(5)	90.8	O(6)-Ru-O(4)	91.6
O(7)-Ru-O(5)	175.9	O(4)-Ru-O(6)	176.8	O(7)-Ru-O(6)	176.9
Cl(4)-Ru-O(6)	178.7	O(7)-Ru-Cl(5)	178.1	O(5)-Ru-O(4)	175.7
O(7)-Ru-O(6)	89.5	O(4)-Ru-Cl(5)	91.9	O(7)-Ru-O(4)	91.4
O(7)-Ru-N(lm)	94.1	O(4)-Ru-N(lm)	90.1	O(7)-Ru-N(lm)	92.5



Cl(4)-Ru-N(lm)	87.8	O(7)-Ru-N(lm)	91.6	O(5)-Ru-N(lm)	88.6
O(5)-Ru-N(lm)	82.3	O(6)-Ru-N(lm)	88.3	O(6)-Ru-N(lm)	87.3
O(6)-Ru-N(lm)	91.0	Cl(5)-Ru-N(lm)	86.5	O(4)-Ru-N(lm)	87.6
O(7)-Ru-O(2)	86.8	O(4)-Ru-O(2)	89.5	O(7)-Ru-O(2)	88.2
Cl(4)-Ru-O(2)	88.8	O(7)-Ru-O(2)	92.7	O(5)-Ru-O(2)	93.2
O(5)-Ru-O(2)	96.7	O(6)-Ru-O(2)	92.2	O(6)-Ru-O(2)	92.1
O(6)-Ru-O(2)	92.4	Cl(5)-Ru-O(2)	89.2	O(4)-Ru-O(2)	90.7
N(lm)-Ru-O(2)	176.5	N(lm)-Ru-O(2)	175.7	N(lm)-Ru-O(2)	178.2

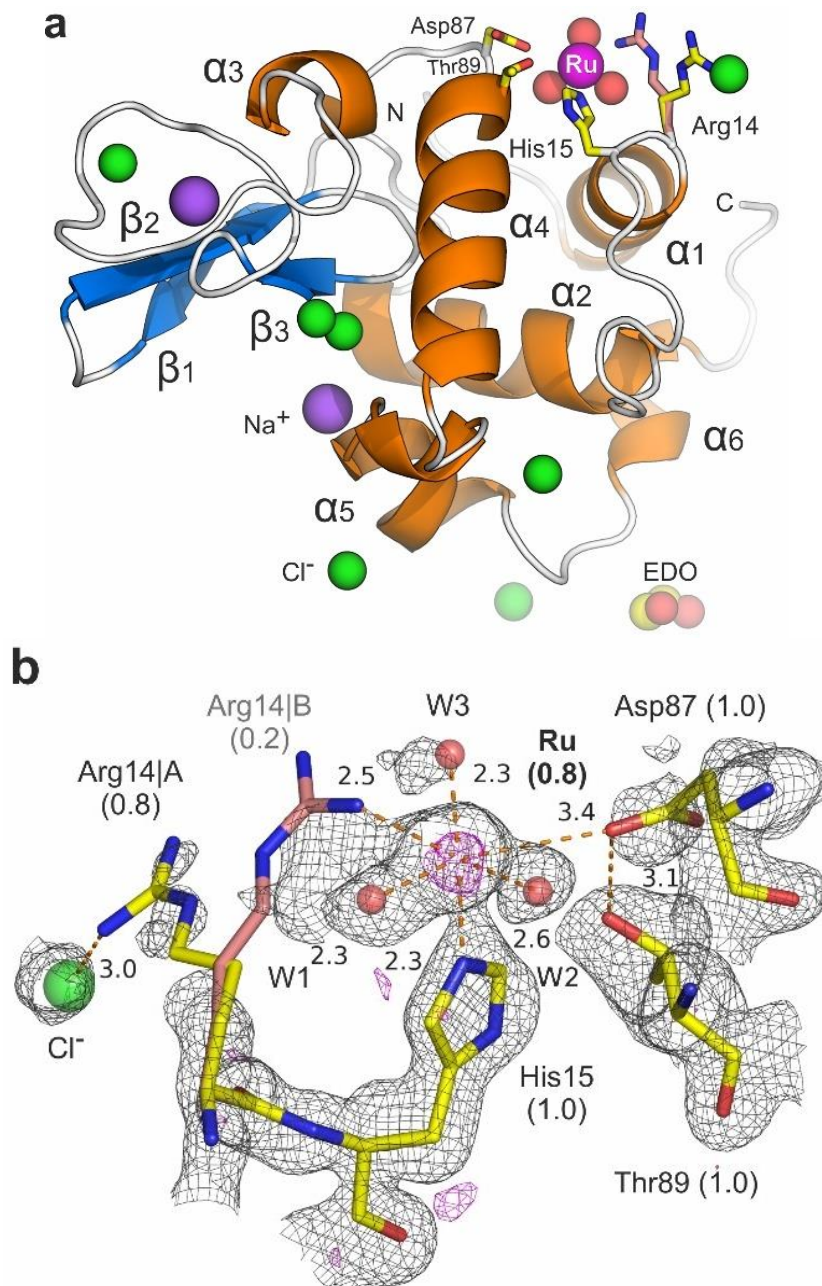
## 5.10 Η ένωση προσθήκης (adduct) του NAMI-A με τη Λυσοζύμη

Οι κρύσταλλοι Λυσοζύμης που μετατράπηκαν σε μαύρους κρυστάλλους μετά από 98 ώρες εμφύπτισης τους σε περίσσεια NAMI-A, περιθλάσαν τις ακτίνες-X σε διακριτική ικανότητα 1.07 Å. Η τελική βελτιστοποιημένη δομή που κατατέθηκε στην PDB με ID: **7BDM**, εμφανίζει δείκτες αξιοπιστίας  $R = 17.0\%$  και  $R_{\text{free}} = 20\%$ , ενώ δεν παρουσιάζει κανένα κατάλοιπο σε μη-ευνοϊκές περιοχές του διαγράμματος Ramachandran. Ο μεσός θερμικός παράγοντας B factor για όλα τα πρωτεϊνικά άτομα προσδιορίστηκε στα 20.4 Å<sup>2</sup>, ενώ μόνο για την πλευρική αλυσίδα της Arg125 δεν παρατηρήθηκε ηλεκτρονιακή πυκνότητα και δεν μοντελοποιήθηκε. Η μέση RMSD ως προς τη δομή 7BCU (1.5h), ήταν 0.21 Å για την κύρια αλυσίδα και 0.34 Å για τα άτομα της πλευρικής αλυσίδας της Λυσοζύμης, με τις μεγαλύτερες διαφορές (>1.0 Å) να εμφανίζονται για τα άτομα των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων Arg14, Asn19, Ile55, Asn77, Lys97 and Leu129.

Η πολύ καλά καθορισμένη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στα 2.35 Å μακριά από το άτομο N<sup>ε2</sup> της His15, μελετήθηκε περαιτέρω με χαρτογράφηση ανώμαλης σκέδασης, η οποία υπέδειξε την παρουσία του Ru με μία κορυφή στα 8.4 σ. Επίσης, προσδιορίστηκαν τρία επιπλέον μόρια νερού γύρω από το μεταλλικό ιόν (W1-W3 στην Εικόνα 5.13), αποκαλύπτοντας μία ιδιαίτερα παραμορφωμένη οκταεδρική διάταξη για το Ru, παρόμοια με αυτήν που είχε παρατηρηθεί στην κρυσταλλική δομή του συμπλόκου hCAII-NAMI-A<sup>53</sup> και άλλες προηγούμενες, παρόμοιες, κρυσταλλογραφικές μελέτες<sup>147,151</sup>.

Όπως και στις προηγούμενες δομές (7BCU (1.5h), 7BCX (8h) και 7BD0 (26h)), το γειτονικό κατάλοιπο Arg14 εμφάνισε χαμηλή πυκνότητα για τα άτομα της πλευρικής αλυσίδας μετά το C<sup>γ</sup>. Παρόλ' αυτά, μοντελοποιήθηκαν δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις του, με ταίριασμα του γουανιδινικού τμήματός του στην υπολειπόμενη πυκνότητα. Στο, τελικό, βελτιστοποιημένο χωρίς περιορισμούς (unrestrained refined), μοντέλο της 7BDM (98h), ο βαθμός κατάληψης του Ru είναι 79%, της His15 και των νερών W1-W3 στο 100%, ενώ οι εναλλακτικές διαμορφώσεις A και B της Arg14 συγκλίνουν σε βαθμό κατάληψης 79% και 21% αντίστοιχα (Εικόνα 5.13β). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η Arg14(B) μπορεί να θεωρηθεί ως συναρμοσμένη στο κέντρο του Ru με δεσμό Ru-N μήκους 2.49 Å. Σε αυτή την περίπτωση, η γουανιδινική ομάδα θα πρέπει να είναι αποπρωτονιωμένη στην ουδέτερή της μορφή, γεγονός απίθανο στις όξινες συνθήκες του κρυσταλλικού μέσου (pH 4.6), δεδομένου της σχετικά υψηλής τιμής του pKa 12.5 για την γουανιδινική ομάδα της L-Arg (29). Το πιο πιθανό είναι ότι η διαμόρφωση της Arg14(B) εμφανίζεται στα μακρομόρια της Λυσοζύμης στα οποία δεν

είναι συναρμοσμένο το Ru στην His15 (που αντιστοιχεί σε κατάληψη περίπου 20%), ενώ η απομακρυσμένη πλευρική αλυσίδα Arg14(A) εμφανίζεται στα Ru adducts (με βαθμό κατάληψης περίπου 80%).



**Εικόνα 5.13:** (a) Αναπαράσταση “κορδέλας” (ribbon) για τη δομή 7BDM (98h) της ρουθηνιωμένης Λυσοζύμης (adduct) που λήφθηκε έπειτα από εμφόση 98 ωρών σε περίσσεια NAMI-A. Φαίνεται το Ru προσδεμένο στην His15, τρία συναρμοσμένα μόρια διαλύτη (νερού) και τα περιβαλλόμενα κατάλοιπα. Οι μωβ/πράσινες σφαίρες αναπαριστούν ιόντα  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  αντίστοιχα, ενώ τα σφαιρίδια EDO την 1,2-αιθανοδιόλη. Οι δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις της Arg14 σημειώνονται με διαφορετικό χρώμα. (b) Απεικόνιση της θέσης ρουθηνίωσης. Ο αρχικός (unbiased) χάρτης ηλεκτρονιακής

πυκνότητας είναι σχεδιασμένος σε 1σ (γκρι) και ο χάρτης ανώμαλης σκέδασης του μετάλλου σχεδιασμένος στα 3σ (μωβ). Οι τιμές στις παρενθέσεις δείχνουν τον βαθμό κατάληψης, όπως προσδιορίστηκε έπειτα από τη βελτιστοποίηση, ενώ επιλεγμένες αποστάσεις (σε Å) σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές.

Το Asp87, αν και αποτελεί πιθανή θέση ρουθηνίωσης, βρέθηκε σχετικά μακριά από το μεταλλικό κέντρο (Εικόνα 5.13), με χαμηλή ηλεκτρονιακή πυκνότητα και υψηλούς θερμικούς παράγοντες (μέση B τιμή = 31.7 Å<sup>2</sup>). Σε αντίθεση, η His15 εντοπίστηκε σε μία καλά διακρινόμενη πυκνότητα με πλήρη κατάληψη και μέση B τιμή στα 24.0 Å<sup>2</sup> (Πίνακας 5.9). Η υψηλή ευελιξία που εμφανίζει η πλευρική αλυσίδα της Arg14 και η χαμηλή τάση της να δρα σαν βάση κατά Lewis, που μπορεί να συναρμοστεί σε μέταλλα, δεν μας επιτρέπει να την προτείνουμε ως υποκαταστάτη του Ru. Συμπερασματικά, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι η His15 είναι η μοναδική θέση ρουθηνίωσης της Λυσοζύμης μετά από 98 ώρες.

**Πίνακας 5.9:** Κρυσταλλογραφικές πληροφορίες και γεωμετρικά χαρακτηριστικά για τη ρουθηνίωση της Λυσοζύμης, όπως αποκαλύπτεται από τη δομή 7BDM (98 h)

\* Το ύψος του ανώμαλου σήματος του σχετικού βαρέως μετάλλου έχει υπολογιστεί με το ANODE<sup>167</sup> (και δίνεται σε σ). Έχει χρησιμοποιηθεί ο αρχικός (unbiased) και ο

NAMI-A/HEWL μετά από εμβάπτιση για 98 h (δομή PDB ID: 7BDM)							
ID	NAMI-A	Κατάληψη	Μέσος B factor	Ανώμαλο (σ) * Αρχικός Βελτ.		Ατόμα αλλ/δρουν με το Μέταλλο	Απόσταση (Å)
C	Ru	0.79	45.4	6.4	9.3		
	O <sup>(2)</sup>	0.79	23.2	-	-	Ru-O <sup>(2)</sup>	2.27
	O <sup>(3)</sup>	0.79	24.3	-	-	Ru-O <sup>(3)</sup>	2.59
	O <sup>(5)</sup>	0.79	38.6	-	-	Ru-O <sup>(5)</sup>	2.26
A	His15	1.00	24.0	-	-	Ru-N <sup>ε2</sup>	2.35
	Arg14 A	0.79	29.7	-	-	Ru...N <sup>ε</sup>	6.24 <sup>#</sup>
	Arg14 B	0.21	25.3	-	-	Ru...N <sup>η1</sup>	2.49 <sup>#</sup>
	Asp87	1.00	31.7	-	-	Ru...O <sup>δ1</sup>	3.36 <sup>#</sup>

βελτιστοποιημένος χάρτης.

<sup>#</sup> Απόσταση από το Ru, αλλά δεν θεωρείται ως υποκαταστάτης.

## 5.11 Η θέση ρουθηνίωσης

Η πρωτεϊνική ρουθηνίωση είναι η διαδικασία σχηματισμού ενώσεων προσθήκης έπειτα από αντίδραση των ενώσεων συναρμογής του Ru με τις πρωτεΐνες. Γενικά, η μελέτη της

πρωτεϊνικής μετάλλωσης είναι σημαντική, τόσο στον προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης και της τοξικότητας των μεταλλοφαρμάκων όσο και στον σχεδιασμό τεχνητών μεταλλοενζύμων για συστήματα-μεταφοράς μεταλλοφαρμάκων με πρωτεϊνική βάση. Οι πρόσφατες εξελίξεις στις δομικές μελέτες δίνουν την δυνατότητα λεπτομερούς ανάλυσης των δομών των ενώσεων προσθήκης (adducts) Pt, Au, Ru, Re, Pd, Ir, Os, Rh και Pt-As σε πρωτεΐνες. Οι μεταλλικές ενώσεις συναρμογής μπορούν (i) να προσδεθούν στις πρωτεΐνες μέσω μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων ή μέσω συναρμογής σε επιλεκτικά κατάλοιπα και τις πλευρικές αλυσίδες τους με ταυτόχρονη απελευθέρωση των αποχωρούσων ομάδων, (ii) να οξειδώνονται/ανάγονται κατά την πρωτεϊνική πρόσδεση, κάτι το οποίο είναι πιθανό να οδηγεί σε αλλαγές στη σφαίρα συναρμογής του μετάλλου, (iii) να προσδένονται σε διαφορετικές «θέσεις αναγνώρισης», με προτίμηση σε επιλεκτικές πλευρικές αλυσίδες που ορίζονται από σκληρές (hard) και μαλακές (soft) οξέα και βάσεις, με τον αριθμό και τον τύπο πρόσδεσης να αλλάζουν με το χρόνο, και (iv) να έχουν ένα συγκεκριμένο βαθμό ευελιξίας και ενεργότητας στην τελική ένωση προσθήκης (adduct) με πρωτεΐνες<sup>146</sup>.

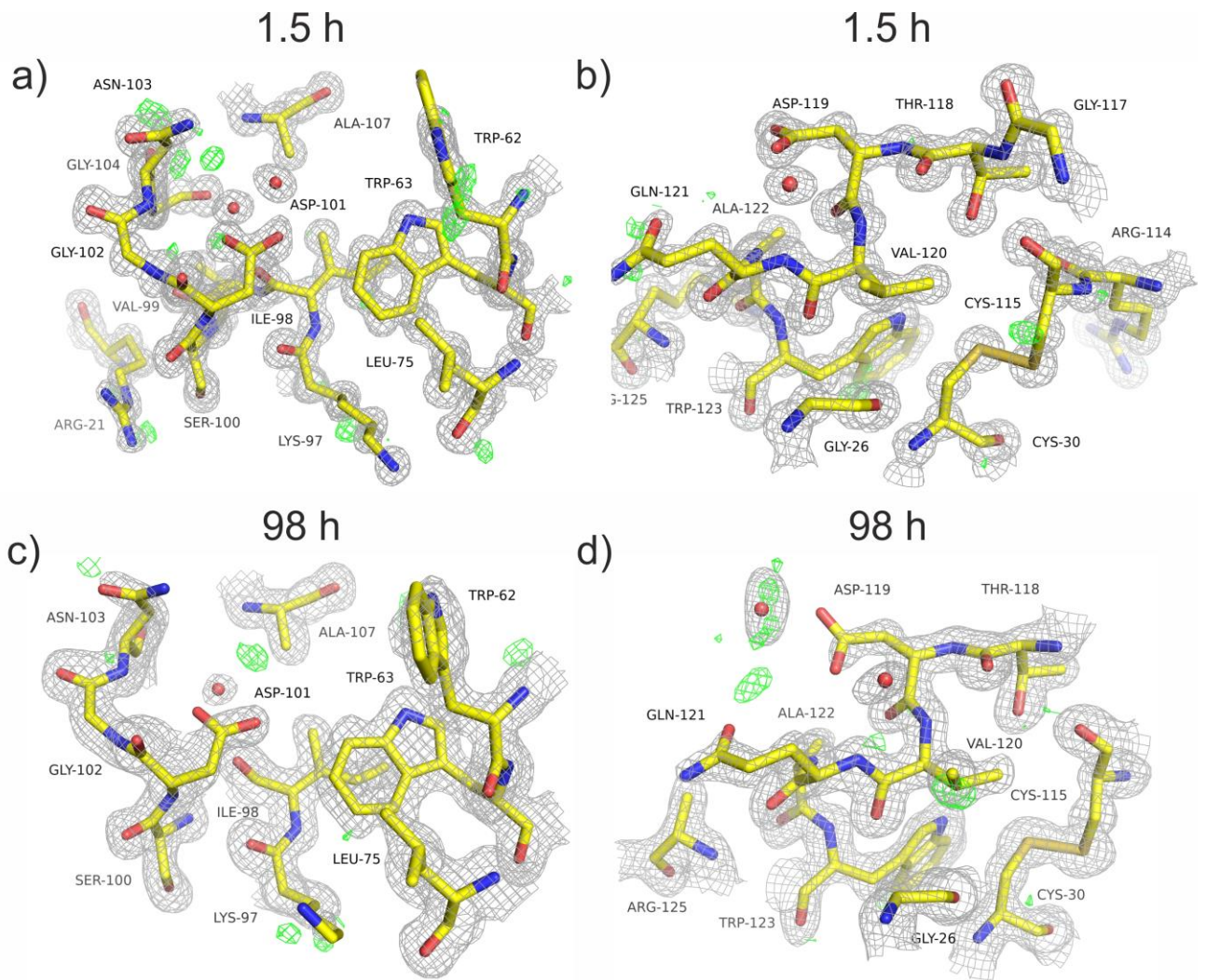
Στην περίπτωση της δομής 7BDM (98h), οι αποστάσεις και οι γωνίες των ατόμων οξυγόνου των μορίων νερού από το Ru στη **θέση ρουθηνίωσης** της Λυσοζύμης, δίνονται στον ακόλουθο Πίνακα 5.10. Οι αποστάσεις Ru-O παρατηρούνται σε ένα εύρος 2.28-2.56 Å, ενώ η απόσταση μεταξύ Ru-N<sup>e2</sup> είναι στα 2.33 Å. Η ένωση προσθήκης εμφανίζει παραμορφωμένη (distorted) οκταεδρική διάταξη με την κατάληψη θέσεων στη σφαίρα συναρμογής από τρία μόρια νερού (W1, W2, W3) εκτός από το N του ιμιδαζολικού δακτυλίου της His15 της Λυσοζύμης (πλευρική αλυσίδα).

**Πίνακας 5.10:** Οι αποστάσεις και οι γωνίες της ένωσης προσθήκης (adduct) του NAMI-A στη Λυσοζύμη (His15), όπως προσδιορίστηκαν από τη δομή 7BDM (98h).

Δεσμός	Απόσταση
Ru-O(2) (Å)	2.28

<b>Δεσμός</b>	<b>Απόσταση</b>
Ru-O(3) (Å)	2.56
Ru-O(5) (Å)	2.28
Ru-N <sup>ε2</sup> (His15) (Å)	2.33

<b>Ένωση προσθήκης</b>	<b>Γωνίες (°)</b>
O(W1)-Ru-O(W2)	86.90
O(W2)-Ru-O(W3)	94.05
O(W1)-Ru-O(W3)	87.83
O(W1)-Ru-N(His15)	89.79
O(W2)-Ru-N(His15)	93.78
O(W3)-Ru-N(His15)	171.69



**Εικόνα 5.14:** Αρχικοί  $2F_o - F_c$  χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας σχεδιασμένοι σε  $1.0 \sigma$  (γκρι) και αρχικοί  $F_o - F_c$  διαφορικοί χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας (πράσινο) σχεδιασμένοι σε  $3.0 \sigma$  απεικονίζουν τις πιθανές θέσεις ρουθινίωσης στα Asp101 (a, c) και Asp119 (b, d) από τις δομές 7BCU στις 1.5 ώρες και 7BDM στις 98 ώρες.

## 5.10 Συζήτηση

Μέχρι τώρα, από την εξέταση των ρυθμών υδρόλυσης των ενώσεων συναρμογής του Ru(III) με φαρμακευτικό ενδιαφέρον, NAMI-A και AziRu, εθεωρείτο ότι σε υδατικά διαλύματα υπήρχε ταχεία απώλεια των υποκαταστατών αυτών των ενώσεων και έτσι το Ru αλληλεπιδρούσε «ελεύθερο υποκαταστατών» («ligand-free») με την πρωτεΐνη. Στην παρούσα εργασία, αποδεικνύεται από τη δομική μελέτη κρυστάλλων Λυσοζύμης που εμβλαπτίστηκαν σε περίσσεια NAMI-A για 1.5 ώρα (δομή με PDB ID: 7BCU), για πρώτη φορά, η μη-ομοιοπολική πρόσδεση τριών NAMI-A μορίων στη Λυσοζύμη, μέσω αρωματικών αλληλεπιδράσεων (aromatic stacking) των υποκαταστατών του ιμιδαζολίου και διαμοριακών δεσμών υδρογόνου με πρωτεϊνικά κατάλοιπα. Η επακόλουθη υδρόλυση των υποκαταστατών χλωρίου και dmsο, μεταξύ των 8 και των 26 ωρών, όπως αποκαλύφθηκε από τις δομές 7BCX (8h) και 7BD0 (26h), δεν μεταβάλλει την κατάσταση πρόσδεσης των τμημάτων NAMI-A σε σχέση με τα ακέραια NAMI-A μόρια που βρέθηκαν στις 1.5 ώρες. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι τα γεγονότα της αρχικής μοριακής αναγνώρισης μεταξύ των ακέραιων ανιόντων NAMI-A και της Λυσοζύμης μπορούν να αντικατασταθούν αρκετά καλά με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μερικώς υδρολυμένων τμημάτων NAMI-A και της πρωτεΐνης. Σε αυτό το σημείο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η υψηλή συγκέντρωση άλατος στο διάλυμα της κρυστάλλωσης, μπορεί να επηρεάζει τον ρυθμό ανταλλαγής των ισημερινά συναρμοσμένων υποκαταστατών χλωρίου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική διαφοροποίηση του από τους ρυθμούς υδρόλυσης που παρατηρούνται στο διάλυμα. Επιπρόσθετα, αν και κάθε υποκαταστάτης του Ru προσδιορίστηκε στις κρυσταλλικές δομές ανεξάρτητα, τόσο από την παρατηρούμενη υπολειπόμενη ηλεκτρονιακή πυκνότητα στους διαφορικούς χάρτες όσο και από τα σήματα ανώμαλης σκέδασης στους αρχικούς χάρτες, δεν αποκλείεται η παρερμηνεία υδατικών τμημάτων (μορίων νερού) (aqua species) ή των υποκαταστατών χλωρίου, ειδικά για τις θέσεις πρόσδεσης με χαμηλή κατάληψη όπως είναι αυτή του Ru-D για τις 8 και 26 ώρες. Αν και οι δομές που προκύπτουν από την κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, εκφράζουν το μέσο όρο, χρονικά και χωρικά, των δομών στο διάλυμα, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δομικές μελέτες της παρούσας διατριβής, βρίσκονται σε συμφωνία με αντίστοιχα αποτελέσματα φασματοσκοπικών μεθόδων, τα οποία υποδεικνύουν την παρουσία του υποκαταστάτη του ιμιδαζολίου του NAMI-A μέχρι και 24



ώρες, και την αλληλεπίδρασή του με την πρωτεΐνη στόχο. Πιο συγκεκριμένα, σε παλαιότερη ESI-MS (φασματομετρία μάζας) μελέτη του συμπλόκου NAMI-A/HEWL, έχει παρατηρηθεί, εκτός της κορυφής που αντιστοιχεί στην μη-συμπλοκοποιημένη πρωτεΐνη, μία ακόμη κορυφή που ταιριάζει σε αυτή της Λυσοζύμης προσδεδεμένης με το ακέραιο NAMI-A μονοανιονικό τμήμα, το οποίο συντηρείται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου <sup>151</sup>. Η παρατήρηση αυτή βρίσκεται σε συμφωνία με παρόμοια αποτελέσματα που προκύπτουν από τα φάσματα πρωτονίου NMR (<sup>1</sup>H NMR) του NAMI-A παρουσία ισομοριακών ποσοτήτων Λυσοζύμης σε μία περίοδο 24 ωρών στους 25 °C. Στην ίδια μελέτη εντούτοις, παρατηρείται στην περίπτωση ενώσεων προσθήκης (adducts) NAMI-A και κυτοχρώματος-c αλόγου έπειτα από 24 ώρες επώασης, σημαντικά υψηλότερος ρυθμός υδρόλυσης του NAMI-A. Η παρατήρηση αυτή στηρίχθηκε στην εμφάνιση κορυφής στο φάσμα μάζας (ESI-MS) που αποδόθηκε σε ένα τμήμα του NAMI-A με αντικατάσταση των χλωρίων με μόρια νερού (aquated NAMI-A) προσδεδεμένο στην πρωτεΐνη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι σε μία μεταγενέστερη έρευνα των ενώσεων προσθήκης που σχηματίζονται μεταξύ του NAMI-A και της ανθρώπινης καρβονικής ανυδράσης II (hCAII), παρατηρήθηκε η πιθανότητα μη-ομοιοπολικής σύνδεσης μεταξύ του ακέραιου ανιόντος NAMI και της πρωτεΐνης <sup>53</sup>. Η παρουσία κορυφών χαμηλής έντασης, που παρατηρήθηκαν έπειτα από 24 ώρες επώασης, αποδόθηκαν σε ένα τμήμα {Ru(Im)} και στο «απογυμνωμένο» Ru που προσδέεται στην hCAII. Συνδυαστικά, αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν σε παρόμοια συμπεράσματα, σύμφωνα με τα οποία, ακέραια ιόντα NAMI-A σχηματίζουν μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες μέσα στις πρώτες ώρες της επώασης, ενώ το τελικό προϊόν (adduct) ρουθηνίου σχηματίζεται μετά από χρονικό διάστημα που εξαρτάται από την πρωτεΐνη και τις συνθήκες που εφαρμόζονται.

Μία προηγούμενη δομική μελέτη με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X της ένωσης προσθήκης που σχηματίζεται μεταξύ του NAMI-A και της Λυσοζύμης παρουσίασε δύο ιόντα Ρουθηνίου συναρμοσμένα στις καρβοξυλομάδες δύο ασπαρτικών οξέων, Asp101 και Asp119, και αυτή είναι η μοναδική περίπτωση όπου το NAMI-A έχει δείχτει ότι στοχεύει όξινα κατάλοιπα <sup>78</sup>. Αυτή η δομή προέκυψε μέσω συγκρυστάλλωσης της Λυσοζύμης με 10-πλάσια μοριακή περίσσεια του NAMI-A και κάτω από παρόμοιες συνθήκες με αυτές της παρούσας μελέτης (δηλαδή 1.0 M NaCl και 50 mM οξικό νάτριο σε pH 4.5). Παρόλ' αυτά οι συγγραφείς δεν αναφέρουν τον χρόνο επώασης πριν τις δοκιμές κρυστάλλωσης, ούτε και τον χρόνο που χρειάστηκε για την κρυστάλλωση (PDB ID: 4NY5, ομάδα χώρου ίδια, P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2). Το τελικό

μοντέλο αυτής της δομής βελτιστοποιήθηκε στα 1.85 Å και τα δύο Ru προσδιορίστηκαν με βαθμό κατάληψης 0.4. Από την άλλη πλευρά, παρά την προσεκτική παρατήρηση του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της δομής που επιλύθηκε στα 1.07 Å από κρυστάλλους Λυσοζύμης που επωάστηκαν για 98 ώρες (PDB ID: 7BDM) στην παρούσα διατριβή, δεν αποκαλύφθηκε πυκνότητα γύρω από τις δύο θέσεις των Asp101 και Asp119 που θα μπορούσε να αποδοθεί σε ένα μεταλλικό ιόν, αλλά μόνο μόρια διαλύτη. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από την χαρτογράφηση ανώμαλης σκέδασης, όπου δεν εμφανίστηκε σε αυτή την περιοχή των ασπαρτικών οξέων σήμα με ύψος κορυφής > 4.0 σ.

Αν και μια ανασκόπηση στη βιβλιογραφία δείχνει ότι το Ru μπορεί να συναρμοστεί σε διάφορες θέσης πρόσδεσης,<sup>53,146,147</sup> το NAMI-A δείχνει να στοχεύει κυρίως κατάλοιπα ιστιδίνης. Συγκεκριμένα, η κρυσταλλική δομή ακτίνων-X που επιλύθηκε με εμβάπτιση του NAMI-A σε κρυστάλλους hCAII για δύο εβδομάδες, αποκάλυψε ένα ιόν Ru (με κατάληψη 0.8) προσδεμένο στο N<sup>δ1</sup> της εκτεθειμένης στο διαλύτη His64 (PDB ID: 3MIJ, δομή σε διακριτική ικανότητα 1.80 Å). Πρόσφατα, η κρυσταλλική δομή ακτίνων-X της ανθρώπινης φερριτίνης (HuHf), επιλύθηκε στα 1.58 Å (PDB ID: 6FTV) και έδειξε ότι η ομάδα του ιμιδαζολίου της His105 ήταν ο κύριος στόχος του Ru. Αν και η His105 υιοθετεί δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις, τα κέντρα του Ru βελτιστοποιήθηκαν για κάθε υπομονάδα της HuHf με βαθμό κατάληψης 0.25 και 0.35, αντίστοιχα. Η σφαίρα συναρμογής του Ru συμπληρώνεται με 5 και 3 μόρια νερού για τις δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις της ρουθηνιωμένης Ιστιδίνης (His 105). Οι κρύσταλλοι της ένωσης προσθήκης ελήφθησαν με την εμβάπτιση του NAMI-A με κρυστάλλους της HuHf για 5 μέρες (σε 2.0 M MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M bicine σε pH 9.0 – βασικό pH σε αυτή την περίπτωση).

Αντίστοιχες δομικές μελέτες για ενώσεις προσθήκης μεταξύ του AziRu, ενός αναλόγου του NAMI-A έχοντας ως υποκαταστάτη μία πυριδίνη αντί ιμιδαζολίου (Εικόνα 5.1), και της Λυσοζύμης, έδειξαν ότι η His15 ήταν η κύρια θέση ρουθηνίωσης<sup>84,156,168</sup>. Οι μελέτες αυτές βασίστηκαν στον προσδιορισμό δύο δομών με περίθλαση ακτίνων-X από πράσινους κρυστάλλους, που ελήφθησαν μετά από εμβάπτιση κρυστάλλων λυσοζύμης σε περίσσεια AziRu για «μερικές ώρες», και από μαύρους κρυστάλλους που προέκυψαν είτε με εμβάπτιση είτε με συγκρυστάλλωση έπειτα από «μερικές ημέρες» (σε 2.4 M NaCl, 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικών σε pH 4.5). Στους πράσινους κρυστάλλους, το Ru προσδιορίστηκε με κατάληψη 0.3, συναρμοσμένο με το N<sup>ε2</sup> της His15, το O<sup>δ1</sup> της Asp87, ένα ιόν χλωρίου (Cl<sup>-</sup>)

και 3 μόρια νερού. Στους μαύρους κρυστάλλους, το Ru βρέθηκε με κατάληψη 0.5, ενώ το ιόν χλωρίου (Cl<sup>-</sup>) είχε αντικατασταθεί από ένα τέταρτο μόριο νερού στη σφαίρα συναρμογής. Και στις δύο αυτές κρυσταλλικές δομές, η His15 μοντελοποιήθηκε σε καθαρή ηλεκτρονιακή πυκνότητα με πλήρη κατάληψη, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες του Asp87 εμφάνισαν εναλλακτικές διαμορφώσεις με καταλήψεις 0.3/0.7 και 0.5/0.5 για τους πράσινους και μαύρους κρυστάλλους, αντίστοιχα. (PDB ID: 4J1A βελτιστοποιημένη σε διακριτική ικανότητα 1.70 Å και 4J1B βελτιστοποιημένη σε διακριτική ικανότητα 1.66 Å). Παρόμοια με ότι παρατηρήθηκε στη δομή 7BDM (98h) της παρούσας διατριβής, η Arg14 επίσης εμφάνισε δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις, με καταλήψεις 0.7/0.3 και 0.5/0.5 στους πράσινους και μαύρους κρυστάλλους, αντίστοιχα. Ούτε σε αυτές τις δομές όμως, δεν θεωρήθηκε η Arg14 ως υποκαταστάτης του Ru, παρόλο που το μήκος δεσμού Ru-N ήταν 2.1 Å στην υψηλής κατάληψης (0.7) διαμόρφωσή της στην περίπτωση των πράσινων κρυστάλλων, και ακόμη μικρότερο στα 1.6 Å σε μία από τις δύο (ίσης κατάληψης) διαμορφώσεις της στους μαύρους κρυστάλλους <sup>156</sup>.

Η μόνη περίπτωση που στη βιβλιογραφία παρουσιάζεται μια ένωση προσθήκης (adduct) με έναν προσδεδεμένο υποκαταστάτη, είναι από τις δομές με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X της από-λακτοφερρίνης (apo Lf) με τρεις ενώσεις συναρμογής, HIm[Ru(III)(Im)<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>], HInd[Ru(III)(Ind)<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>] και (HInd)<sub>2</sub>[Ru(III)(Ind)Cl<sub>5</sub>] <sup>169</sup>. Σε αυτές τις δομές, όλες οι θέσεις πρόσδεσης αναγνωρίστηκαν ως ιστιδίνες της apoLf, με την His253 να είναι η κύρια και «υψηλής συγγένειας» θέση για όλες τις ενώσεις συναρμογής, οι οποίες προσδιορίστηκαν ως ακέραιες ενώσεις χωρίς απώλεια ούτε ενός ινδαζολίου. Στις «χαμηλής συγγένειας» θέσεις της apoLf (εκτεθειμένες στο διαλύτη His590 και His654), η ηλεκτρονιακή πυκνότητα δεν ήταν ξεκάθαρη για την απόδοση κάποιου από τους ετεροκυκλικούς υποκαταστάτες.

Τέλος, σε μία πρόσφατη δημοσίευση, παρουσιάστηκε η κρυσταλλική δομή της ένωσης προσθήκης του KP1019 σε ανθρώπινη αλβουμίνη του ορού με μυριστικό οξύ (PDB ID: 5IFO, δομή προσδιορισμένη στα 3.20 Å) <sup>27</sup>. Η δομή αποκάλυψε δύο «απογυμνωμένα» ιόντα Ρουθηνίου προσδεδεμένα στην His146 του υποτομέα Ι της Αλβουμίνης (site I) και στην His242 στον υδροφοβικό πυρήνα του υποτομέα ΙΙΑ (site II). Και στις δύο θέσεις ρουθηνίωσης, δεν ανιχνεύεται κάποιος άλλος υποκαταστάτης, αλλά οι συγγραφείς αποδώσαν την πλευρική αλυσίδα της Lys199 (αμίνη) ως υποκαταστάτη στη θέση ΙΙ (site II) Ru-His242 με μήκος δεσμού Ru-N στα 2.7 Å). Η παραμορφωμένη (distorted) οκταεδρική γεωμετρία και των δύο ενώσεων προσθήκης του Ru συμπληρώθηκε με μόρια νερού. Παρόλ' αυτά οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι κάποιοι υποκαταστάτες του Ru θα μπορούσαν να είναι ανιόντα

χλωρίου (Cl<sup>-</sup>) (τουλάχιστον ένα ιόν στη θέση II (site II)), ειδικά στις ισημερινές θέσεις των κέντρων Ru. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι κανένα τμήμα NAMI-A δεν βρέθηκε συναρμοσμένο σε κάποια από τις υπόλοιπες 10 εκτεθειμένες στο διαλύτη ιστιδίνες στην Αλβουμίνη. Η απουσία κάποιας ηλεκτρονιακής πυκνότητας για τον ογκώδη υποκαταστάτη ινδαζόλιο του KP1019 στις δύο θέσεις ρουθινίωσης, αποδόθηκε στον παρατεταμένο χρόνο εμφάνισης (το λιγότερο για 8-24 ώρες) στο διάλυμα<sup>170,171</sup>. Έτσι, προτάθηκε ότι οι υποκαταστάτες του ινδαζολίου λειτουργούν ως στοιχεία αναγνώρισης, μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, των δύο θέσεων πρόσδεσης του φαρμάκου στην Αλβουμίνη, αναδεικνύοντας τον ιδιαίτερο ρόλο των υποκαταστατών του Ru ως τμήματα αναγνώρισης της θέσης πρόσδεσης<sup>27</sup>

Τα ευρήματα από τις κρυσταλλικές δομές που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή, των συμπλόκων NAMI-A/HEWL που ελήφθησαν μετά από 4 διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1.5h, 8h, 26h και 98h) εμφάνισης κρυστάλλων Λυσοζύμης σε περίσσεια NAMI-A, παρέχουν μια στέρεα βάση για την υποστήριξη ενός μηχανισμού δύο βημάτων της πρωτεϊνικής ρουθινίωσης. Στο πρώτο βήμα, ακέραια ανιοντικές ενώσεις συναρμογής του NAMI-A καταλαμβάνουν και πληρώνουν μία θετικά φορτισμένη περιοχή μεταξύ γειτονικών μακρομορίων Λυσοζύμης, τη «θέση αναγνώρισης». Οι περισσότερες από τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις διατηρούνται κατά τη διάρκεια της φάσης υδρόλυσης, αφού με τον χαμηλό ρυθμό υδρόλυσης των αξονικών υποκαταστατών ινδαζολίου διατηρούνται οι αρωματικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δακτυλίων τους. Στο δεύτερο βήμα και έπειτα από ανταλλαγή του υποκαταστάτη του ινδαζολίου, του «κύριου υποκαταστάτη», ένα μόνο ιόν Ru συναρμόζεται στην υψηλά ευνοϊκή περιοχή της His15, και πιο συγκεκριμένα συναρμόζεται με τον ινδαζολικό δακτύλιο της His15, στη «θέση ρουθινίωσης». Αν και η Λυσοζύμη μπορεί να μην αποτελεί το ιδανικό μοντέλο για να αποδοθεί η φάση της θέσης αναγνώρισης, λαμβάνοντας υπόψη ότι το NAMI-A αλληλεπιδρά με θέσεις εκτεθειμένες στο διαλύτη και ότι η τελική θέση ρουθινίωσης είναι μόνο το κατάλοιπο της Ιστιδίνης της Λυσοζύμης, τα δομικά δεδομένα αυτής της μελέτης παρέχουν παρέχουν μία πλήρη εικόνα του προτεινόμενου μηχανισμού ρουθινίωσης.



## Βιβλιογραφία

- (1) Sava, G.; Bergamo, A.; Dyson, P. J. Metal-Based Antitumour Drugs in the Post-Genomic Era: What Comes Next? *Dalton Trans.* **2011**, 40 (36), 9069. <https://doi.org/10.1039/c1dt10522a>.
- (2) Hartinger, C. G.; Metzler-Nolte, N.; Dyson, P. J. Challenges and Opportunities in the Development of Organometallic Anticancer Drugs. *Organometallics* **2012**, 31 (16), 5677–5685. <https://doi.org/10.1021/om300373t>.
- (3) Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. Bioorganometallic Chemistry--from Teaching Paradigms to Medicinal Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (2), 391–401. <https://doi.org/10.1039/b707077m>.
- (4) Jung, Y.; Lippard, S. J. Direct Cellular Responses to Platinum-Induced DNA Damage. *Chem. Rev.* **2007**, 107 (5), 1387–1407. <https://doi.org/10.1021/cr068207j>.
- (5) Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7 (8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>.
- (6) Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Pérez, José. M. Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (3), 645–662. <https://doi.org/10.1021/cr020010d>.
- (7) Timerbaev, A. R.; Hartinger, C. G.; Aleksenko, S. S.; Keppler, B. K. Interactions of Antitumor Metallo-drugs with Serum Proteins: Advances in Characterization Using Modern Analytical Methodology. *Chem. Rev.* **2006**, 106 (6), 2224–2248. <https://doi.org/10.1021/cr040704h>.
- (8) Wu, B.; Davey, G. E.; Nazarov, A. A.; Dyson, P. J.; Davey, C. A. Specific DNA Structural Attributes Modulate Platinum Anticancer Drug Site Selection and Cross-Link Generation. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39 (18), 8200–8212. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr491>.
- (9) Hartinger, C. G.; Zorbas-Seifried, S.; Jakupec, M. A.; Kynast, B.; Zorbas, H.; Keppler, B. K. From Bench to Bedside – Preclinical and Early Clinical Development of the Anticancer Agent Indazolium Trans-[Tetrachlorobis(1H-Indazole)Ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100 (5–6), 891–904. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.02.013>.
- (10) Hartinger, C. G., Jakupec, M. A., Zorbas-Seifried, S., Groessler, M., Egger, A., Berger, W., Keppler, B. K. (2008). KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent - Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients. *Chemistry & Biodiversity*, 5(10), 2140–2155. [Doi:10.1002/Cbdv.200890195](https://doi.org/10.1002/Cbdv.200890195).
- (11) Rademaker-Lakhai, J. M.; van den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium-Trans-DMSO-Imidazole-Tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2004**, 10 (11), 3717–3727. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0746>.
- (12) Alessio, E. Synthesis and Reactivity of Ru-, Os-, Rh-, and Ir-Halide–Sulfoxide Complexes. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (9), 4203–4242. <https://doi.org/10.1021/cr0307291>.
- (13) Palermo, G.; Magistrato, A.; Riedel, T.; von Erlach, T.; Davey, C. A.; Dyson, P. J.; Rothlisberger, U. Fighting Cancer with Transition Metal Complexes: From Naked DNA to Protein and Chromatin Targeting Strategies. *ChemMedChem* **2016**, 11 (12), 1199–1210. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500478>.
- (14) Ang, W. H.; Casini, A.; Sava, G.; Dyson, P. J. Organometallic Ruthenium-Based Antitumor Compounds with Novel Modes of Action. *J. Organomet. Chem.* **2011**, 696 (5), 989–998. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2010.11.009>.
- (15) Chua, E. Y. D.; Davey, G. E.; Chin, C. F.; Droge, P.; Ang, W. H.; Davey, C. A. Stereochemical Control of Nucleosome Targeting by Platinum-Intercalator Antitumor Agents. *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43 (11), 5284–5296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv356>.

- (16) Aird, R. E.; Cummings, J.; Ritchie, A. A.; Muir, M.; Morris, R. E.; Chen, H.; Sadler, P. J.; Jodrell, D. I. In Vitro and in Vivo Activity and Cross Resistance Profiles of Novel Ruthenium (II) Organometallic Arene Complexes in Human Ovarian Cancer. *Br. J. Cancer* **2002**, *86* (10), 1652–1657. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600290>.
- (17) Lentz, F.; Drescher, A.; Lindauer, A.; Henke, M.; Hilger, R. A.; Hartinger, C. G.; Scheulen, M. E.; Dittrich, C.; Keppler, B. K.; Jaehde, U.; Central European Society for Anticancer Drug Research-EWIV. Pharmacokinetics of a Novel Anticancer Ruthenium Complex (KP1019, FFC14A) in a Phase I Dose-Escalation Study. *Anticancer. Drugs* **2009**, *20* (2), 97–103. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328322fbc5>.
- (18) Heffeter, P.; Böck, K.; Atil, B.; Reza Hoda, M. A.; Körner, W.; Bartel, C.; Jungwirth, U.; Keppler, B. K.; Micksche, M.; Berger, W.; Koellensperger, G. Intracellular Protein Binding Patterns of the Anticancer Ruthenium Drugs KP1019 and KP1339. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15* (5), 737–748. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0642-1>.
- (19) Wolters, D. A.; Stefanopoulou, M.; Dyson, P. J.; Groessl, M. Combination of Metallomics and Proteomics to Study the Effects of the Metallodrug RAPTA-T on Human Cancer Cells. *Metallomics* **2012**, *4* (11), 1185. <https://doi.org/10.1039/c2mt20070h>.
- (20) Parker, L. J.; Italiano, L. C.; Morton, C. J.; Hancock, N. C.; Ascher, D. B.; Aitken, J. B.; Harris, H. H.; Campomanes, P.; Rothlisberger, U.; De Luca, A.; Lo Bello, M.; Ang, W. H.; Dyson, P. J.; Parker, M. W. Studies of Glutathione Transferase P1-1 Bound to a Platinum(IV)-Based Anticancer Compound Reveal the Molecular Basis of Its Activation. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (28), 7806–7816. <https://doi.org/10.1002/chem.201100586>.
- (21) Messori, L.; Orioli, P.; Vullo, D.; Alessio, E.; Iengo, E. A Spectroscopic Study of the Reaction of NAMI, a Novel Ruthenium(III)Anti-Neoplastic Complex, with Bovine Serum Albumin. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (4), 1206–1213. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01121.x>.
- (22) Bergamo, A.; Messori, L.; Piccioli, F.; Cocchietto, M.; Sava, G. Biological Role of Adduct Formation of the Ruthenium(III) Complex NAMI-A with Serum Albumin and Serum Transferrin. *Invest. New Drugs* **2003**, *21* (4), 401–411. <https://doi.org/10.1023/A:1026243000320>.
- (23) Frausin, F.; Scarcia, V.; Cocchietto, M.; Furlani, A.; Serli, B.; Alessio, E.; Sava, G. Free Exchange across Cells, and Echinatin-Sensitive Membrane Target for the Metastasis Inhibitor NAMI-A (Imidazolium *Trans*-Imidazole Dimethyl Sulfoxide Tetrachlororuthenate) on KB Tumor Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *313* (1), 227–233. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.078352>.
- (24) Ravera, M.; Baracco, S.; Cassino, C.; Colangelo, D.; Bagni, G.; Sava, G.; Osella, D. Electrochemical Measurements Confirm the Preferential Bonding of the Antimetastatic Complex [ImH][RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(Im)] (NAMI-A) with Proteins and the Weak Interaction with Nucleobases. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98* (6), 984–990. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.02.015>.
- (25) Sava, G.; Zorzet, S.; Turrin, C.; Vita, F.; Soranzo, M.; Zabucchi, G.; Cocchietto, M.; Bergamo, A.; DiGiovine, S.; Pezzoni, G.; Sartor, L.; Garbisa, S. Dual Action of NAMI-A in Inhibition of Solid Tumor Metastasis: Selective Targeting of Metastatic Cells and Binding to Collagen. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2003**, *9* (5), 1898–1905.
- (26) Adhireksan, Z.; Davey, G. E.; Campomanes, P.; Groessl, M.; Clavel, C. M.; Yu, H.; Nazarov, A. A.; Yeo, C. H. F.; Ang, W. H.; Dröge, P.; Rothlisberger, U.; Dyson, P. J.; Davey, C. A. Ligand Substitutions between Ruthenium-Cymene Compounds Can Control Protein versus DNA Targeting and Anticancer Activity. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3462. <https://doi.org/10.1038/ncomms4462>.
- (27) Bijelic, A.; Theiner, S.; Keppler, B. K.; Rompel, A. X-Ray Structure Analysis of Imidazolium *Trans*-[Tetrachlorobis(1 *H*-Indazole)Ruthenate(III)] (KP1019) Bound to Human Serum Albumin Reveals Two Ruthenium Binding Sites and Provides Insights into the Drug Binding Mechanism. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (12), 5894–5903. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00600>.

- (28) Zhang, Y.; Ho, A.; Yue, J.; Kong, L.; Zhou, Z.; Wu, X.; Yang, F.; Liang, H. Structural Basis and Anticancer Properties of Ruthenium-Based Drug Complexed with Human Serum Albumin. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.071>.
- (29) Smith, G. S.; Therrien, B. Targeted and Multifunctional Arene Ruthenium Chemotherapeutics. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (41), 10793. <https://doi.org/10.1039/c1dt11007a>.
- (30) Kandioller, W.; Hartinger, C. G.; Nazarov, A. A.; Bartel, C.; Skocic, M.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Keppler, B. K. Maltol-Derived Ruthenium-Cymene Complexes with Tumor Inhibiting Properties: The Impact of Ligand-Metal Bond Stability on Anticancer Activity In Vitro. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15* (45), 12283–12291. <https://doi.org/10.1002/chem.200901939>.
- (31) Nazarov, A. A.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. Opening the Lid on Piano-Stool Complexes: An Account of Ruthenium(II)–Arene Complexes with Medicinal Applications. *J. Organomet. Chem.* **2014**, *751*, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2013.09.016>.
- (32) Stebler-Roethlisberger, M.; Hummel, W.; Pittet, P. A.; Buergi, H. B.; Ludi, A.; Merbach, A. E. Triaqua(Benzene)Ruthenium(II) and Triaqua(Benzene)Osmium(II): Synthesis, Molecular Structure, and Water-Exchange Kinetics. *Inorg. Chem.* **1988**, *27* (8), 1358–1363. <https://doi.org/10.1021/ic00281a009>.
- (33) Chen, H.; Parkinson, J. A.; Parsons, S.; Coxall, R. A.; Gould, R. O.; Sadler, P. J. Organometallic Ruthenium(II) Diamine Anticancer Complexes: Arene-Nucleobase Stacking and Stereospecific Hydrogen-Bonding in Guanine Adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (12), 3064–3082. <https://doi.org/10.1021/ja017482e>.
- (34) Gupta, R. K.; Kumar, A.; Paitandi, R. P.; Singh, R. S.; Mukhopadhyay, S.; Verma, S. P.; Das, P.; Pandey, D. S. Heteroleptic Arene Ru(II) Dipyrrinato Complexes: DNA, Protein Binding and Anti-Cancer Activity against the ACHN Cancer Cell Line. *Dalton Trans.* **2016**, *45* (16), 7163–7177. <https://doi.org/10.1039/C6DT00446F>.
- (35) Guo, W.; Zheng, W.; Luo, Q.; Li, X.; Zhao, Y.; Xiong, S.; Wang, F. Transferrin Serves As a Mediator to Deliver Organometallic Ruthenium(II) Anticancer Complexes into Cells. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (9), 5328–5338. <https://doi.org/10.1021/ic4002626>.
- (36) McNae, I. W.; Fishburne, K.; Habtemariam, A.; Hunter, T. M.; Melchart, M.; Wang, F.; Walkinshaw, M. D.; Sadler, P. J. Half-Sandwich Arene Ruthenium(II)–Enzyme Complex. *Chem Commun* **2004**, No. 16, 1786–1787. <https://doi.org/10.1039/B408141B>.
- (37) Sheldrick, W. S.; Heeb, S. Synthesis and Structural Characterization of H6-Arene-Ruthenium(II) Complexes of Alanine and Guanine Derivatives. *Inorganica Chim. Acta* **1990**, *168* (1), 93–100. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)88022-6](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)88022-6).
- (38) Takezawa, Y.; Böckmann, P.; Sugi, N.; Wang, Z.; Abe, S.; Murakami, T.; Hikage, T.; Erker, G.; Watanabe, Y.; Kitagawa, S.; Ueno, T. Incorporation of Organometallic Ru Complexes into Apo-Ferritin Cage. *Dalton Trans. Camb. Engl.* **2011**, *40* (10), 2190–2195. <https://doi.org/10.1039/c0dt00955e>.
- (39) Ueno, T.; Abe, M.; Hirata, K.; Abe, S.; Suzuki, M.; Shimizu, N.; Yamamoto, M.; Takata, M.; Watanabe, Y. Process of Accumulation of Metal Ions on the Interior Surface of Apo-Ferritin: Crystal Structures of a Series of Apo-Ferritins Containing Variable Quantities of Pd(II) Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (14), 5094–5100. <https://doi.org/10.1021/ja806688s>.
- (40) Abe, S.; Niemeyer, J.; Abe, M.; Takezawa, Y.; Ueno, T.; Hikage, T.; Erker, G.; Watanabe, Y. Control of the Coordination Structure of Organometallic Palladium Complexes in an Apo-Ferritin Cage. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (32), 10512–10514. <https://doi.org/10.1021/ja802463a>.
- (41) Ferraro, G.; Monti, D. M.; Amoresano, A.; Pontillo, N.; Petruk, G.; Pane, F.; Cinellu, M. A.; Merlino, A. Gold-Based Drug Encapsulation within a Ferritin Nanocage: X-Ray Structure and Biological Evaluation as a Potential Anticancer Agent of the Auoxo<sup>3</sup>-Loaded Protein. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (61), 9518–9521. <https://doi.org/10.1039/C6CC02516A>.



- (42) Pontillo, N.; Pane, F.; Messori, L.; Amoresano, A.; Merlino, A. Cisplatin Encapsulation within a Ferritin Nanocage: A High-Resolution Crystallographic Study. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (22), 4136–4139. <https://doi.org/10.1039/C5CC10365G>.
- (43) Hildebrandt, J.; Görls, H.; Häfner, N.; Ferraro, G.; Dürst, M.; Runnebaum, I. B.; Weigand, W.; Merlino, A. Unusual Mode of Protein Binding by a Cytotoxic  $\pi$ -Arene Ruthenium(II) Piano-Stool Compound Containing an O,S-Chelating Ligand. *Dalton Trans.* **2016**, 45 (31), 12283–12287. <https://doi.org/10.1039/C6DT02380K>.
- (44) Egger, A. E.; Hartinger, C. G.; Renfrew, A. K.; Dyson, P. J. Metabolization of [Ru(H6-C6H5CF3)(Pta)Cl2]: A Cytotoxic RAPTA-Type Complex with a Strongly Electron Withdrawing Arene Ligand. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, 15 (6), 919–927. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0654-x>.
- (45) Scolaro, C.; Geldbach, T. J.; Rochat, S.; Dorcier, A.; Gossens, C.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Tavernelli, I.; Sava, G.; Rothlisberger, U.; Dyson, P. J. Influence of Hydrogen-Bonding Substituents on the Cytotoxicity of RAPTA Compounds. *Organometallics* **2006**, 25 (3), 756–765. <https://doi.org/10.1021/om0508841>.
- (46) Scolaro, C.; Bergamo, A.; Brescacin, L.; Delfino, R.; Cocchietto, M.; Laurenczy, G.; Geldbach, T. J.; Sava, G.; Dyson, P. J. In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)–Arene PTA Complexes. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (12), 4161–4171. <https://doi.org/10.1021/jm050015d>.
- (47) Scolaro, C.; Chaplin, A. B.; Hartinger, C. G.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Keppler, B. K.; Sava, G.; Dyson, P. J. Tuning the Hydrophobicity of Ruthenium(II)–Arene (RAPTA) Drugs to Modify Uptake, Biomolecular Interactions and Efficacy. *Dalton Trans.* **2007**, No. 43, 5065. <https://doi.org/10.1039/b705449a>.
- (48) Dyson, P. J.; Sava, G. Metal-Based Antitumour Drugs in the Post Genomic Era. *Dalton Trans.* **2006**, No. 16, 1929. <https://doi.org/10.1039/b601840h>.
- (49) Ang, W. H.; Daldini, E.; Scolaro, C.; Scopelliti, R.; Juillerat-Jeannerat, L.; Dyson, P. J. Development of Organometallic Ruthenium–Arene Anticancer Drugs That Resist Hydrolysis. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (22), 9006–9013. <https://doi.org/10.1021/ic061008y>.
- (50) Dorcier, A.; Dyson, P. J.; Gossens, C.; Rothlisberger, U.; Scopelliti, R.; Tavernelli, I. Binding of Organometallic Ruthenium(II) and Osmium(II) Complexes to an Oligonucleotide: A Combined Mass Spectrometric and Theoretical Study<sup>†</sup>. *Organometallics* **2005**, 24 (9), 2114–2123. <https://doi.org/10.1021/om049022a>.
- (51) Romerosa, A.; Campos-Malpartida, T.; Lidrissi, C.; Saoud, M.; Serrano-Ruiz, M.; Peruzzini, M.; Garrido-Cárdenas, J. A.; García-Maroto, F. Synthesis, Characterization, and DNA Binding of New Water-Soluble Cyclopentadienyl Ruthenium(II) Complexes Incorporating Phosphines. *Inorg. Chem.* **2006**, 45 (3), 1289–1298. <https://doi.org/10.1021/ic051053q>.
- (52) Romerosa, A.; Saoud, M.; Campos-Malpartida, T.; Lidrissi, C.; Serrano-Ruiz, M.; Peruzzini, M.; Garrido, J. A.; García-Maroto, F. DNA Interactions Mediated by Cyclopentadienylruthenium(II) Complexes Containing Water-Soluble Phosphanes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 2007 (18), 2803–2812. <https://doi.org/10.1002/ejic.200601177>.
- (53) Casini, A.; Temperini, C.; Gabbiani, C.; Supuran, C. T.; Messori, L. The X-Ray Structure of the Adduct between NAMI-A and Carbonic Anhydrase Provides Insights into the Reactivity of This Metallo-drug with Proteins. *ChemMedChem* **2010**, 5 (12), 1989–1994. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000331>.
- (54) Battistin, F.; Scaletti, F.; Balducci, G.; Pillozzi, S.; Arcangeli, A.; Messori, L.; Alessio, E. Water-Soluble Ru(II)- and Ru(III)-Halide-PTA Complexes (PTA = 1,3,5-Triaza-7-Phosphaadamantane): Chemical and Biological Properties. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 160, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.02.009>.
- (55) Bergamo, A.; Gaiddon, C.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H.; Sava, G. Approaching Tumour Therapy beyond Platinum Drugs. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, 106 (1), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.09.030>.

- (56) Ang, W. H.; Parker, L. J.; De Luca, A.; Juillerat-Jeanneret, L.; Morton, C. J.; Lo Bello, M.; Parker, M. W.; Dyson, P. J. Rational Design of an Organometallic Glutathione Transferase Inhibitor. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2009**, *48* (21), 3854–3857. <https://doi.org/10.1002/anie.200900185>.
- (57) Wu, B.; Ong, M. S.; Groessl, M.; Adhireksan, Z.; Hartinger, C. G.; Dyson, P. J.; Davey, C. A. A Ruthenium Antimetastasis Agent Forms Specific Histone Protein Adducts in the Nucleosome Core. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (13), 3562–3566. <https://doi.org/10.1002/chem.201100298>.
- (58) Scolaro C, Bergamo A, Brescacin L, Delfino R, Cocchietto M, Laurency G, Geldbach TJ, Sava G, Dyson PJ (2005) In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)-Arene PTA Complexes. *J Med Chem* **48**(12):4161–4171.
- (59) Luger, K.; Mäder, A. W.; Richmond, R. K.; Sargent, D. F.; Richmond, T. J. Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution. *Nature* **1997**, *389* (6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>.
- (60) Bacac, M.; Hotze, A. C. G.; Schilden, K. van der; Haasnoot, J. G.; Pacor, S.; Alessio, E.; Sava, G.; Reedijk, J. The Hydrolysis of the Anti-Cancer Ruthenium Complex NAMI-A Affects Its DNA Binding and Antimetastatic Activity: An NMR Evaluation. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98* (2), 402–412. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2003.12.003>.
- (61) Kilpin, K. J.; Crot, S.; Riedel, T.; Kitchen, J. A.; Dyson, P. J. Ruthenium(II) and Osmium(II) 1,2,3-Triazolylidene Organometallics: A Preliminary Investigation into the Biological Activity of ‘Click’ Carbene Complexes. *Dalton Trans* **2014**, *43* (3), 1443–1448. <https://doi.org/10.1039/C3DT52584H>.
- (62) Dubarle-Offner, J.; Clavel, C. M.; Gontard, G.; Dyson, P. J.; Amouri, H. Selenoquinones Stabilized by Ruthenium(II) Arene Complexes: Synthesis, Structure, and Cytotoxicity. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20* (19), 5795–5801. <https://doi.org/10.1002/chem.201304991>.
- (63) Davey, G. E.; Davey, C. A. Chromatin - a New, Old Drug Target? *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *72* (3), 165–170. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00697.x>.
- (64) Novakova, O.; Chen, H.; Vrana, O.; Rodger, A.; Sadler, P. J.; Brabec, V. DNA Interactions of Monofunctional Organometallic Ruthenium(II) Antitumor Complexes in Cell-Free Media. *Biochemistry* **2003**, *42* (39), 11544–11554. <https://doi.org/10.1021/bi034933u>.
- (65) Meier, S. M.; Hanif, M.; Adhireksan, Z.; Pichler, V.; Novak, M.; Jirkovsky, E.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Davey, C. A.; Keppler, B. K.; Hartinger, C. G. Novel Metal(II) Arene 2-Pyridinecarbothioamides: A Rationale to Orally Active Organometallic Anticancer Agents. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (4), 1837. <https://doi.org/10.1039/c3sc22294b>.
- (66) Enyedy, É. A.; Sija, É.; Jakusch, T.; Hartinger, C. G.; Kandioller, W.; Keppler, B. K.; Kiss, T. Solution Equilibria of Anticancer Ruthenium(II)-(H6-p-Cymene)-Hydroxy(Thio)Pyr(Im)One Complexes: Impact of Sulfur vs. Oxygen Donor Systems on the Speciation and Bioactivity. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *127*, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.05.002>.
- (67) Musumeci, D.; Rozza, L.; Merlino, A.; Paduano, L.; Marzo, T.; Massai, L.; Messori, L.; Montesarchio, D. Interaction of Anticancer Ru(III) Complexes with Single Stranded and Duplex DNA Model Systems. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (31), 13914–13925. <https://doi.org/10.1039/C5DT01105A>.
- (68) Sava, G.; Bergamo, A.; Zorzet, S.; Gava, B.; Casarsa, C.; Cocchietto, M.; Furlani, A.; Scarcia, V.; Serli, B.; Iengo, E.; Alessio, E.; Mestroni, G. Influence of Chemical Stability on the Activity of the Antimetastasis Ruthenium Compound NAMI-A. *Eur. J. Cancer* **2002**, *38* (3), 427–435. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00389-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00389-6).
- (69) Liu, M.; Lim, Z. J.; Gwee, Y. Y.; Levina, A.; Lay, P. A. Characterization of a Ruthenium(III)/NAMI-A Adduct with Bovine Serum Albumin That Exhibits a High Anti-Metastatic Activity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (9), 1661–1664. <https://doi.org/10.1002/anie.200906079>.

- (70) Kratz, F.; Hartmann, M.; Keppler, B.; Messori, L. The Binding Properties of Two Antitumor Ruthenium(III) Complexes to Apotransferrin. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (4), 2581–2588. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41984-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41984-3).
- (71) Vashisht Gopal, Y. N.; Konuru, N.; Kondapi, A. K. Topoisomerase II Antagonism and Anticancer Activity of Coordinated Derivatives of [RuCl<sub>2</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>)(DmsO)]. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *401* (1), 53–62. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00037-1).
- (72) Simeone, L.; Mangiapia, G.; Vitiello, G.; Irace, C.; Colonna, A.; Ortona, O.; Montesarchio, D.; Paduano, L. Cholesterol-Based Nucleolipid-Ruthenium Complex Stabilized by Lipid Aggregates for Antineoplastic Therapy. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (4), 758–770. <https://doi.org/10.1021/bc200565v>.
- (73) Mangiapia, G.; D'Errico, G.; Simeone, L.; Irace, C.; Radulescu, A.; Di Pascale, A.; Colonna, A.; Montesarchio, D.; Paduano, L. Ruthenium-Based Complex Nanocarriers for Cancer Therapy. *Biomaterials* **2012**, *33* (14), 3770–3782. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.057>.
- (74) Webb, M. I.; Chard, R. A.; Al-Jobory, Y. M.; Jones, M. R.; Wong, E. W. Y.; Walsby, C. J. Pyridine Analogues of the Antimetastatic Ru(III) Complex NAMI-A Targeting Non-Covalent Interactions with Albumin. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (2), 954–966. <https://doi.org/10.1021/ic202029e>.
- (75) Mangiapia, G.; Vitiello, G.; Irace, C.; Santamaria, R.; Colonna, A.; Angelico, R.; Radulescu, A.; D'Errico, G.; Montesarchio, D.; Paduano, L. Anticancer Cationic Ruthenium Nanovectors: From Rational Molecular Design to Cellular Uptake and Bioactivity. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (8), 2549–2560. <https://doi.org/10.1021/bm400104b>.
- (76) Montesarchio, D.; Mangiapia, G.; Vitiello, G.; Musumeci, D.; Irace, C.; Santamaria, R.; D'Errico, G.; Paduano, L. A New Design for Nucleolipid-Based Ru(III) Complexes as Anticancer Agents. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (48), 16697. <https://doi.org/10.1039/c3dt52320a>.
- (77) Eriksson, A. E.; Jones, T. A.; Liljas, A. Refined Structure of Human Carbonic Anhydrase II at 2.0 Å Resolution. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1988**, *4* (4), 274–282. <https://doi.org/10.1002/prot.340040406>.
- (78) Messori, L.; Merlino, A. Ruthenium Metalation of Proteins: The X-Ray Structure of the Complex Formed between NAMI-A and Hen Egg White Lysozyme. *Dalton Trans.* **2014**, *43* (16), 6128. <https://doi.org/10.1039/c3dt53582g>.
- (79) Vaney, M. C.; Maignan, S.; Riès-Kautt, M.; Ducruix, A. High-Resolution Structure (1.33 Å) of a HEW Lysozyme Tetragonal Crystal Grown in the APCF Apparatus. Data and Structural Comparison with a Crystal Grown under Microgravity from SpaceHab-01 Mission. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1996**, *52* (3), 505–517. <https://doi.org/10.1107/S090744499501674X>.
- (80) Vergara, A.; D'Errico, G.; Montesarchio, D.; Mangiapia, G.; Paduano, L.; Merlino, A. Interaction of Anticancer Ruthenium Compounds with Proteins: High-Resolution X-Ray Structures and Raman Microscopy Studies of the Adduct between Hen Egg White Lysozyme and AziRu. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (8), 4157–4159. <https://doi.org/10.1021/ic4004142>.
- (81) Tanley, S. W. M.; Schreurs, A. M. M.; Kroon-Batenburg, L. M. J.; Meredith, J.; Prendergast, R.; Walsh, D.; Bryant, P.; Levy, C.; Helliwell, J. R. Structural Studies of the Effect That Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Has on Cisplatin and Carboplatin Binding to Histidine in a Protein. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68* (5), 601–612. <https://doi.org/10.1107/S0907444912006907>.
- (82) Mügge, C.; Marzo, T.; Massai, L.; Hildebrandt, J.; Ferraro, G.; Rivera-Fuentes, P.; Metzler-Nolte, N.; Merlino, A.; Messori, L.; Weigand, W. Platinum(II) Complexes with O,S Bidentate Ligands: Biophysical Characterization, Antiproliferative Activity, and Crystallographic Evidence of Protein Binding. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (17), 8560–8570. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b01238>.

- (83) Messori, L.; Cinellu, M. A.; Merlino, A. Protein Recognition of Gold-Based Drugs: 3D Structure of the Complex Formed When Lysozyme Reacts with Aubipy<sup>c</sup>. *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5* (10), 1110–1113. <https://doi.org/10.1021/ml500231b>.
- (84) Vergara, A.; Russo Krauss, I.; Montesarchio, D.; Paduano, L.; Merlino, A. Investigating the Ruthenium Metalation of Proteins: X-Ray Structure and Raman Microspectroscopy of the Complex between RNase A and AziRu. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (19), 10714–10716. <https://doi.org/10.1021/ic401494v>.
- (85) Trávníček, Z.; Matiková-Mařarová, M.; Novotná, R.; Vančo, J.; Štěpánková, K.; Suchý, P. In Vitro and in Vivo Biological Activity Screening of Ru(III) Complexes Involving 6-Benzylaminopurine Derivatives with Higher pro-Apoptotic Activity than NAMI-A. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (7), 937–948. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.04.002>.
- (86) Tanley, S. W. M.; Schreurs, A. M. M.; Kroon-Batenburg, L. M. J.; Helliwell, J. R. Re-Refinement of 4g4a: Room-Temperature X-Ray Diffraction Study of Cisplatin and Its Binding to His15 of HEWL after 14 Months Chemical Exposure in the Presence of DMSO. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **2016**, *72* (3), 253–254. <https://doi.org/10.1107/S2053230X16000856>.
- (87) Messori, L.; Marzo, T.; Merlino, A. The X-Ray Structure of the Complex Formed in the Reaction between Oxaliplatin and Lysozyme. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (61), 8360. <https://doi.org/10.1039/c4cc02254h>.
- (88) Messori, L.; Merlino, A. Cisplatin Binding to Proteins: A Structural Perspective. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *315*, 67–89. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.01.010>.
- (89) Messori, L.; Marzo, T.; Merlino, A. Interactions of Carboplatin and Oxaliplatin with Proteins: Insights from X-Ray Structures and Mass Spectrometry Studies of Their Ribonuclease A Adducts. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *153*, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.07.011>.
- (90) Picone, D.; Donnarumma, F.; Ferraro, G.; Russo Krauss, I.; Fagagnini, A.; Gotte, G.; Merlino, A. Platinated Oligomers of Bovine Pancreatic Ribonuclease: Structure and Stability. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *146*, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.02.011>.
- (91) Messori, L.; Merlino, A. Cisplatin Binding to Proteins: Molecular Structure of the Ribonuclease A Adduct. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (8), 3929–3931. <https://doi.org/10.1021/ic500360f>.
- (92) Vagin, A.; Teplyakov, A. *MOLREP*: An Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30* (6), 1022–1025. <https://doi.org/10.1107/S0021889897006766>.
- (93) Schwarzenbacher, R.; Godzik, A.; Grzechnik, S. K.; Jaroszewski, L. The Importance of Alignment Accuracy for Molecular Replacement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (7), 1229–1236. <https://doi.org/10.1107/S0907444904010145>.
- (94) Lebedev, A. A.; Vagin, A. A.; Murshudov, G. N. Model Preparation in *MOLREP* and Examples of Model Improvement Using X-Ray Data. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2008**, *64* (1), 33–39. <https://doi.org/10.1107/S0907444907049839>.
- (95) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. *Phaser* Crystallographic Software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40* (4), 658–674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>.
- (96) Suhre, K.; Sanejouand, Y.-H. ElNemo: A Normal Mode Web Server for Protein Movement Analysis and the Generation of Templates for Molecular Replacement. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (Web Server issue), W610–614. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh368>.
- (97) Delarue, M. Dealing with Structural Variability in Molecular Replacement and Crystallographic Refinement through Normal-Mode Analysis. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2008**, *64* (1), 40–48. <https://doi.org/10.1107/S0907444907053516>.
- (98) Wlodawer, A.; Minor, W.; Dauter, Z.; Jaskolski, M. Protein Crystallography for Non-Crystallographers, or How to Get the Best (but Not More) from Published Macromolecular Structures: Protein Crystallography for Non-Crystallographers. *FEBS J.* **2008**, *275* (1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06178.x>.

- (99) Engh, R. A.; Huber, R. Accurate Bond and Angle Parameters for X-Ray Protein Structure Refinement. *Acta Crystallogr. A* **1991**, *47* (4), 392–400. <https://doi.org/10.1107/S0108767391001071>.
- (100) Afonine, P. V.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Urzhumtsev, A.; Adams, P. D. Automatic Multiple-Zone Rigid-Body Refinement with a Large Convergence Radius. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42* (4), 607–615. <https://doi.org/10.1107/S0021889809023528>.
- (101) Booth, A. D. Booth AD. An Expression for Following the Process of Refinement in X-Ray Structure Analysis Using Fourier Series. *Philos Mag.* 1945;36:609–615.
- (102) Diamond, R. Diamond R. On the Relationship between X-Ray and Energy Refinement. In: Machin PA, Campbell JW, Elder M, Editors. *Refinement of Protein Structures. Proceedings of the Daresbury Study Weekend; 1980 Nov 15–16; Daresbury. SERC Daresbury Laboratory, Warrington, England; 1981.* p. 47–50. In *Refinement of protein structures*.
- (103) Hendrickson, W. A. Stereochemically Restrained Refinement of Macromolecular Structures. *Methods Enzymol.* **1985**, *115*, 252–270. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(85\)15021-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(85)15021-4).
- (104) Hendrickson, W. A. *Hendrickson WA, Konnert JH. Incorporation of Stereochemical Information into Crystallographic Refinement. In: Diamond R, Ramaseshan S, Venkatesan K, Editors. Computing in Crystallography. Bangalore: The Indian Academy of Sciences; 1980.*
- (105) Brünger, A. T. Free R Value: A Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. *Nature* **1992**, *355* (6359), 472–475. <https://doi.org/10.1038/355472a0>.
- (106) Scheringer, C. Least-Squares Refinement with the Minimum Number of Parameters for Structures Containing Rigid-Body Groups of Atoms. *Acta Crystallogr.* **1963**, *16* (6), 546–550. <https://doi.org/10.1107/S0365110X63001444>.
- (107) Sussman, J. L.; Holbrook, S. R.; Church, G. M.; Kim, S.-H. A Structure-Factor Least-Squares Refinement Procedure for Macromolecular Structures Using Constrained *and* Restrained Parameters. *Acta Crystallogr. Sect. A* **1977**, *33* (5), 800–804. <https://doi.org/10.1107/S0567739477001958>.
- (108) Tronrud, Dale. E. Introduction to Macromolecular Refinement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (12), 2156–2168. <https://doi.org/10.1107/S090744490402356X>.
- (109) Urzhumtsev, A. G.; Lunin, V. Y. Introduction to Crystallographic Refinement of Macromolecular Atomic Models. *Crystallogr. Rev.* **2019**, *25* (3), 164–262. <https://doi.org/10.1080/0889311X.2019.1631817>.
- (110) Blanc, E.; Roversi, P.; Vornrhein, C.; Flensburg, C.; Lea, S. M.; Bricogne, G. Refinement of Severely Incomplete Structures with Maximum Likelihood in *BUSTER–TNT*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (12), 2210–2221. <https://doi.org/10.1107/S0907444904016427>.
- (111) de La Fortelle, E.; Bricogne, G. [27] Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for Multiple Isomorphous Replacement and Multiwavelength Anomalous Diffraction Methods. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1997; Vol. 276, pp 472–494. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)76073-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)76073-7).
- (112) Read, R. J. Pushing the Boundaries of Molecular Replacement with Maximum Likelihood. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2001**, *57* (10), 1373–1382. <https://doi.org/10.1107/S0907444901012471>.
- (113) Serli B, Zangrando E, Gianferrara T, Scolaro C, Dyson PJ, Bergamo A, Alessio E (2005) Is the Aromatic Fragment of Piano-Stool Ruthenium Compounds an Essential Feature for Anticancer Activity? The Development of New Rull-[ 9]AneS3 Analogues. *Eur J Inorg Chem* 17:3423–3434.
- (114) Russo Krauss I, Ferraro G, Pica A, Márquez JA, Helliwell JR, Merlino A (2017) Principles and Methods Used to Grow and Optimize Crystals of Protein-Metallodrug Adducts, to Determine Metal Binding Sites and to Assign Metal Ligands. *Metallomics* 9(11):1534–1547.
- (115) McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ (2007) Phaser Crystallographic Software. *J Appl Crystallogr* 40(4):658–674.

- (116) Afonine, P. V.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P. H.; Adams, P. D. Towards Automated Crystallographic Structure Refinement with *Phenix.Refine*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68* (4), 352–367. <https://doi.org/10.1107/S0907444912001308>.
- (117) Emsley, P.; Cowtan, K. *Coot* : Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (12), 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>.
- (118) Chen VB, Arendall Iii WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC (2010) Mol-Probity: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *66*(1):12–21.
- (119) PyMOL The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
- (120) Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., “VMD - Visual Molecular Dynamics”, *J. Molec. Graphics*, 1996, Vol. 14, Pp. 33-38.
- (121) Adhireksan Z, Davey GE, Campomanes P, Groessl M, Clavel CM, Yu H, Nazarov AA, Yeo CHF, Ang WH, Dröge P, Rothlisberger U, Dyson PJ, Davey CA (2014) Ligand Substitutions between Ruthenium–Cymene Compounds Can Control Protein versus DNA Targeting and Anticancer Activity. *Nat Commun* *5*(1):3462.
- (122) Wu B, Ong MS, Groessl M, Adhireksan Z, Hartinger CG, Dyson PJ, Davey CA (2011) A Ruthenium Antimetastasis Agent Forms Specific Histone Protein Adducts in the Nucleosome Core. *Chem Eur J* *17*(13):3562–3566.
- (123) Nowak-Sliwinska, P.; van Beijnum, J. R.; Casini, A.; Nazarov, A. A.; Wagnières, G.; van den Bergh, H.; Dyson, P. J.; Griffioen, A. W. Organometallic Ruthenium(II) Arene Compounds with Antiangiogenic Activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (11), 3895–3902. <https://doi.org/10.1021/jm2002074>.
- (124) McNae IW, Fishburne K, Habtemariam A, Hunter TM, Melchart M, Wang F, Walkinshaw MD, Sadler PJ (2004) Half-Sandwich Arene Ruthenium(II)-Enzyme Complex. *Chem Commun* *10*(16):1786–1787.
- (125) Sullivan MP, Groessl M, Meier SM, Kingston RL, Goldstone DC, Hartinger CG (2017) The Metalation of Hen Egg White Lysozyme Impacts Protein Stability as Shown by Ion Mobility Mass Spectrometry, Differential Scanning Calorimetry, and X-Ray Crystallography. *Chem Commun* *53*(30):4246–4249.
- (126) Sullivan MP, Nieuwoudt MK, Bowmaker GA, Lam NYS, Truong D, Goldstone DC, Hartinger CG (2018) Unexpected Arene Ligand Exchange Results in the Oxidation of an Organoruthenium Anticancer Agent: The First X-Ray Structure of a Protein-Ru(Carbene) Adduct. *Chem Commun* *54*(48):6120–6123.
- (127) Santos-Silva T, Mukhopadhyay A, Seixas JD, Bernardes GJL, Romão CC, Romão MJ (2011) CORM-3 Reactivity toward Proteins: The Crystal Structure of a Ru(II) Dicarboxyl-Lysozyme Complex. *J Am Chem Soc* *133*(5):1192–1195.
- (128) Seixas JD, Santos MFA, Mukhopadhyay A, Coelho AC, Reis PM, Veiros LF, Marques AR, Penacho N, Gonçalves AML, Romão MJ, Bernardes GJL, Santos-Silva T, Romão CC (2015) A Contribution to the Rational Design of Ru(CO)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>L Complexes for in Vivo Delivery of CO. *Dalton Trans* *44*(11):5058–5075.
- (129) Tamasi G, Merlino A, Scaletti F, Heffeter P, Legin AA, Jakupec MA, Berger W, Messori L, Keppler BK, Cini R (2017) {Ru(CO) X}-Core Complexes with Benzimidazole Ligands: Synthesis, X-Ray Structure and Evaluation of Anticancer Activity in Vivo. *Dalton Trans* *46*(9):3025–3040.
- (130) Pontillo N, Ferraro G, Messori L, Tamasi G, Merlino A (2017) Ru- Based CO Releasing Molecules with Azole Ligands: Interaction with Proteins and the CO Release Mechanism Disclosed by X-Ray Crystallography. *Dalton Trans* *46*(29):9621–9629.
- (131) Messori L, Marzo T, Sanches RNF, Hanif Ur R, De Oliveira SD, Merlino A (2014) Unusual Structural Features in the Lysozyme Derivative of the Tetrakis(Acetato)Chloridodiruthenium(II, III) Complex. *Angew Chem Int Ed* *53*(24):6172–6175.

- (132) Bajorath J, Hinrichs W, Saenger W (1988) The Enzymatic Activity of Proteinase K Is Controlled by Calcium. *Eur J Biochem* 176(2):441–447.
- (133) Wang J, Dauter M, Dauter Z (2006) What Can Be Done with a Good Crystal and an Accurate Beamline? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62(12):1475–1483.
- (134) Betzel C, Gourinath S, Kumar P, Kaur P, Perbandt M, Eschenburg S, Singh TP (2001) Structure of a Serine Protease Proteinase K from *Tritirachium Album* Limber at 0.98 Å Resolution. *Biochemistry* 40(10):3080–3088.
- (135) Masuda T, Suzuki M, Inoue S, Song C, Nakane T, Nango E, Tanaka R, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Yabashi M, Mikami B, Nureki O, Numata K, Iwata S, Sugahara M (2017) Atomic Resolution Structure of Serine Protease Proteinase K at Ambient Temperature. *Sci Rep* 7:45604.
- (136) Zheng H, Cooper DR, Porebski PJ, Shabalin IG, Handing KB, Minor W (2017) CheckMyMetal: A Macromolecular Metal-Binding Validation Tool. *Acta Crystallogr Sect D Struct Biol* 73:223–233.
- (137) Muller A, Hinrichs W, Wolf WM, Saenger W (1994) Crystal Structure of Calcium-Free Proteinase K at 1.5-Å Resolution. *J Biol Chem* 269(37):23108–23111.
- (138) Burris, H. A.; Bakewell, S.; Bendell, J. C.; Infante, J.; Jones, S. F.; Spigel, D. R.; Weiss, G. J.; Ramanathan, R. K.; Ogden, A.; Von Hoff, D. Safety and Activity of IT-139, a Ruthenium-Based Compound, in Patients with Advanced Solid Tumours: A First-in-Human, Open-Label, Dose-Escalation Phase I Study with Expansion Cohort. *ESMO Open* **2016**, 1 (6), e000154. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000154>.
- (139) Leijen, S.; Burgers, S. A.; Baas, P.; Pluim, D.; Tibben, M.; van Werkhoven, E.; Alessio, E.; Sava, G.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. Phase I/II Study with Ruthenium Compound NAMI-A and Gemcitabine in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer after First Line Therapy. *Invest. New Drugs* **2015**, 33 (1), 201–214. <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0179-1>.
- (140) Alessio, E.; Messori, L. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry. *Molecules* **2019**, 24 (10), 1995. <https://doi.org/10.3390/molecules24101995>.
- (141) Bergamo, A.; Sava, G. Linking the Future of Anticancer Metal-Complexes to the Therapy of Tumour Metastases. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (24), 8818–8835. <https://doi.org/10.1039/C5CS00134J>.
- (142) Gianferrara, T.; Bratsos, I.; Alessio, E. A Categorization of Metal Anticancer Compounds Based on Their Mode of Action. *Dalton Trans.* **2009**, No. 37, 7588. <https://doi.org/10.1039/b905798f>.
- (143) Khalaila, I.; Bergamo, A.; Bussy, F.; Sava, G.; Dyson, P. The Role of Cisplatin and NAMI-A Plasma-Protein Interactions in Relation to Combination Therapy. *Int. J. Oncol.* **2006**. <https://doi.org/10.3892/ijo.29.1.261>.
- (144) Pelillo, C.; Mollica, H.; Eble, J. A.; Grosche, J.; Herzog, L.; Codan, B.; Sava, G.; Bergamo, A. Inhibition of Adhesion, Migration and of A5β1 Integrin in the HCT-116 Colorectal Cancer Cells Treated with the Ruthenium Drug NAMI-A. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 160, 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.02.025>.
- (145) Merlino, A. Interactions between Proteins and Ru Compounds of Medicinal Interest: A Structural Perspective. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 326, 111–134. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.08.001>.
- (146) Merlino, A. Recent Advances in Protein Metalation: Structural Studies. *Chem. Commun.* **2021**, 57 (11), 1295–1307. <https://doi.org/10.1039/DOCC08053E>.
- (147) Ciambellotti, S.; Pratesi, A.; Severi, M.; Ferraro, G.; Alessio, E.; Merlino, A.; Messori, L. The NAMI A – Human Ferritin System: A Biophysical Characterization. *Dalton Trans.* **2018**, 47 (33), 11429–11437. <https://doi.org/10.1039/C8DT00860D>.

- (148) Alessio, E. Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective: Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 2017 (12), 1549–1560. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600986>.
- (149) Messori, L.; Merlino, A. Protein Metalation by Metal-Based Drugs: X-Ray Crystallography and Mass Spectrometry Studies. *Chem Commun* **2017**, 53 (85), 11622–11633. <https://doi.org/10.1039/C7CC06442J>.
- (150) Riccardi, L.; Genna, V.; De Vivo, M. Metal–Ligand Interactions in Drug Design. *Nat. Rev. Chem.* **2018**, 2 (7), 100–112. <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0018-6>.
- (151) Casini, A.; Mastrobuoni, G.; Ang, W. H.; Gabbiani, C.; Pieraccini, G.; Moneti, G.; Dyson, P. J.; Messori, L. ESI–MS Characterisation of Protein Adducts of Anticancer Ruthenium(II)-Arene PTA (RAPTA) Complexes. *ChemMedChem* **2007**, 2 (5), 631–635. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600258>.
- (152) Tamasi, G.; Merlino, A.; Scaletti, F.; Heffeter, P.; Legin, A. A.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Messori, L.; Keppler, B. K.; Cini, R. {Ru(CO)<sub>x</sub>}–Core Complexes with Benzimidazole Ligands: Synthesis, X-Ray Structure and Evaluation of Anticancer Activity in Vivo. *Dalton Trans.* **2017**, 46 (9), 3025–3040. <https://doi.org/10.1039/C6DT04295C>.
- (153) Messori, L.; Marzo, T.; Sanches, R. N. F.; Hanif-Ur-Rehman; de Oliveira Silva, D.; Merlino, A. Unusual Structural Features in the Lysozyme Derivative of the Tetrakis(Acetano)Chloridodiruthenium(II,III) Complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53 (24), 6172–6175. <https://doi.org/10.1002/anie.201403337>.
- (154) Santos, M. F. A.; Seixas, J. D.; Coelho, A. C.; Mukhopadhyay, A.; Reis, P. M.; Romão, M. J.; Romão, C. C.; Santos-Silva, T. New Insights into the Chemistry of Fac-[Ru(CO)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> Fragments in Biologically Relevant Conditions: The CO Releasing Activity of [Ru(CO)<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>(1,3-Thiazole)], and the X-Ray Crystal Structure of Its Adduct with Lysozyme. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, 117, 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.06.018>.
- (155) Santos-Silva, T.; Mukhopadhyay, A.; Seixas, J. D.; Bernardes, G. J. L.; Romão, C. C.; Romão, M. J. CORM-3 Reactivity toward Proteins: The Crystal Structure of a Ru(II) Dicarbonyl–Lysozyme Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (5), 1192–1195. <https://doi.org/10.1021/ja108820s>.
- (156) Casini, A.; Mastrobuoni, G.; Terenghi, M.; Gabbiani, C.; Monzani, E.; Moneti, G.; Casella, L.; Messori, L. Ruthenium Anticancer Drugs and Proteins: A Study of the Interactions of the Ruthenium(III) Complex Imidazolium Trans-[Tetrachloro(Dimethyl Sulfoxide)(Imidazole)Ruthenate(III)] with Hen Egg White Lysozyme and Horse Heart Cytochrome c. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, 12 (8), 1107–1117. <https://doi.org/10.1007/s00775-007-0280-4>.
- (157) Alessio, E.; Balducci, G.; Lutman, A.; Mestroni, G.; Calligaris, M.; Attia, W. M. Synthesis and Characterization of Two New Classes of Ruthenium(III)-Sulfoxide Complexes with Nitrogen Donor Ligands (L): Na[Trans-RuCl<sub>4</sub>(R<sub>2</sub>SO)(L)] and Mer, Cis-RuCl<sub>3</sub>(R<sub>2</sub>SO)(R<sub>2</sub>SO)(L). The Crystal Structure of Na[Trans-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(NH<sub>3</sub>)] · 2DMSO, Na[Trans-RuCl<sub>4</sub>(DMSO)(Im)] · H<sub>2</sub>O, Me<sub>2</sub>CO (Im = Imidazole) and Mer, Cis-RuCl<sub>3</sub>(DMSO)(DMSO)(NH<sub>3</sub>). *Inorganica Chim. Acta* **1993**, 203 (2), 205–217. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)81659-X](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)81659-X).
- (158) Mestroni, G.; Alessio, E.; Sava, G. NEW SALTS OF ANIONIC COMPLEXES OF RU(III), AS ANTIMETASTATIC AND ANTINEOPLASTIC AGENTS. WO/1998/000431 1998.
- (159) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, 66 (2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>.
- (160) Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, 50 (5), 760–763. <https://doi.org/10.1107/S0907444994003112>.



- (161) Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *MolProbity* : All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (1), 12–21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.
- (162) Jurrus, E.; Engel, D.; Star, K.; Monson, K.; Brandi, J.; Felberg, L. E.; Brookes, D. H.; Wilson, L.; Chen, J.; Liles, K.; Chun, M.; Li, P.; Gohara, D. W.; Dolinsky, T.; Konecny, R.; Koes, D. R.; Nielsen, J. E.; Head-Gordon, T.; Geng, W.; Krasny, R.; Wei, G.; Holst, M. J.; McCammon, J. A.; Baker, N. A. Improvements to the APBS Biomolecular Solvation Software Suite. *Protein Sci.* **2018**, *27* (1), 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>.
- (163) Anandakrishnan, R.; Aguilar, B.; Onufriev, A. V. H++ 3.0: Automating PK Prediction and the Preparation of Biomolecular Structures for Atomistic Molecular Modeling and Simulations. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (W1), W537–W541. <https://doi.org/10.1093/nar/gks375>.
- (164) G. Sava, E. Alessio, A. Bergamo, G. Mestroni, in 'Topics in Biological Inorganic Chemistry, Volume 1: Metallopharmaceuticals', Eds. M. J. Clarke, P. J. Sadler, Springer, Berlin, 1999, p. 143.
- (165) E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, G. Sava, in 'Metal Ions in Biological Systems, Volume 42: Metal Ions and Their Complexes in Medication and in Cancer Diagnosis and Therapy', Eds. A. Sigel, H. Sigel, M. Dekker, New York, 2004, p. 323.
- (166) Bratsos, I.; Jedner, S.; Gianferrara, T.; Alessio, E. Ruthenium Anticancer Compounds: Challenges and Expectations. *Chim. Int. J. Chem.* **2007**, *61* (11), 692–697. <https://doi.org/10.2533/chimia.2007.692>.
- (167) Thorn, A.; Sheldrick, G. M. ANODE : Anomalous and Heavy-Atom Density Calculation. *J. Appl. Crystallogr.* **2011**, *44* (6), 1285–1287. <https://doi.org/10.1107/S0021889811041768>.
- (168) Caterino, M.; Herrmann, M.; Merlino, A.; Riccardi, C.; Montesarchio, D.; Mroginski, M. A.; Musumeci, D.; Ruffo, F.; Paduano, L.; Hildebrandt, P.; Kozuch, J.; Vergara, A. On the PH-Modulated Ru-Based Prodrug Activation Mechanism. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (2), 1216–1223. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b02667>.
- (169) Bernhard K. Keppler; Smith, C. A.; Sutherland-Smith, A. J.; Kratz, F.; Baker, E. N.; Keppler, B. H. Binding of Ruthenium(III) Anti-Tumor Drugs to Human Lactoferrin Probed by High Resolution X-Ray Crystallographic Structure Analyses. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1* (5), 424–431. <https://doi.org/10.1007/s007750050074>.
- (170) Webb, M. I.; Wu, B.; Jang, T.; Chard, R. A.; Wong, E. W. Y.; Wong, M. Q.; Yapp, D. T. T.; Walsby, C. J. Increasing the Bioavailability of Ru<sup>III</sup> Anticancer Complexes through Hydrophobic Albumin Interactions. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19* (50), 17031–17042. <https://doi.org/10.1002/chem.201302671>.
- (171) Webb, M. I.; Walsby, C. J. EPR as a Probe of the Intracellular Speciation of Ruthenium(III) Anticancer Compounds. *Metallomics* **2013**, *5* (12), 1624. <https://doi.org/10.1039/c3mt00090g>.

## Δημοσιεύσεις της διδακτορικής διατριβής

1. **Lykourgos Chiniadis**, Petros Giastas, Ioannis Bratsos and Athanasios Papakyriakou (2021) Insights into the protein ruthenation mechanism by antimetastatic metalldrugs: High-resolution X-ray structures of the adduct formed between hen egg-white lysozyme and NAMI-A at various time points. *Inorganic Chemistry* 60, 14, 10729–10737
2. **Lykourgos Chiniadis**, Ioannis Bratsos, Kostas Bethanis, Michael Karpusas, Petros Giastas and Athanasios Papakyriakou (2020) High-resolution crystal structures of a “half sandwich”-type Ru(II) coordination compound bound to hen egg-white lysozyme and proteinase K. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 25, 635–645

## Δημοσιεύσεις εκτός πλαισίου της διδακτορικής διατριβής

1. Ioannis Temponeras, **Lykourgos Chiniadis**, Athanasios Papakyriakou and Efstratios Stratikos, (2021), Discovery of selective inhibitor leads by targeting an allosteric site in insulin-regulated aminopeptidase. *Pharmaceuticals*, 14(6), 584.
2. Michael Karpusas, Irine Axarli, **Lykourgos Chiniadis**, Athanasios Papakyriakou, Kostas Bethanis, Katholiki Scopelitou, Yannis D. Clonis, Nikolaos E. Labrou, (2013), The Interaction of the Chemotherapeutic Drug Chlorambucil with human Glutathione S-transferase A1-1: Kinetic and Structural Analysis, PLoS ONE, 8(2):e563375.

## Ανακοινώσεις σε συνέδρια

1. Lykourgos Chiniadis, Petros Giastas, Elias Eliopoulos, Ioannis Bratsos and Athanasios Papakyriakou, Unraveling the protein ruthenation by antimetastatic metalldrugs: High-resolution X-ray structures of the adduct formed between hen egg-white lysozyme and NAMI-A at various time intervals. Athens Conference on Advances in Chemistry (ACAC 2020), National and Kapodistrian University of Athens, March 10–14, 2021.
2. Ioannis Temponeras, Lykourgos Chiniadis, Athanasios Papakyriakou and Efstratios Stratikos, Discovery of selective inhibitor leads by targeting an allosteric site in insulin-regulated aminopeptidase. 6<sup>th</sup> International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (2020), November 1–30, 2020, DOI: 10.3390/ECMC2020-07443
3. Lykourgos Chiniadis, Petros Giastas, Ioannis Bratsos, Athanasios Papakyriakou. Crystal structures of Ru(II) and Ru(III) anticancer compounds binding to model proteins. 69<sup>o</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (HSBMB), Ξενοδοχείο Imperial, Λάρισα, 23-25 Νοεμβρίου 2018.
4. Lykourgos Chiniadis, Petros Giastas, Ioannis Bratsos, Athanasios Papakyriakou Crystal structures of Ru(II) and Ru(III) anticancer compounds binding to model proteins, Athens Conference on Advances in Chemistry (ACAC 2018), National and Kapodistrian University of Athens, October 30–November 2, 2018.

5. Λυκούργος Χηνιάδης, Πέτρος Γκιάστας, Ιωάννης Μπράτσος, Αθανάσιος Παπακυριακού. Κρυσταλλικές δομές συμπλόκων προτύπων πρωτεϊνών με αντικαρκινικά φάρμακα του Ρουθηνίου, 2<sup>η</sup> Εαρινή Συνάντηση των Νέων Ερευνητών της Ελληνικής Κρυσταλλογραφικής Εταιρίας, (HeCrA Junior), Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Λάρισα, 5–6 Μαΐου 2018.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α΄

**Εικόνα 1.1:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής των κυριότερων μεταλλοφαρμάκων του Ru(II) και του Ru(III). Το NAMI-A και το KP1019 ανήκουν στην κατηγορία του Ru(III) και τα RAPTA-C, το RAED-C και το RuTE-Cl ανήκουν στην κατηγορία του Ru(II).

**Εικόνα 1.2:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής του  $(\text{HInd})_2[\text{RuIndCl}_5]^{2-}$  και του  $\text{Ru}_2(\eta^6\text{-p-κυμενιο})_2\text{Cl}_4$ .

**Εικόνα 1.3:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής του RAED-C

**Εικόνα 1.4:** Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου Λυσοζύμης- Ru(II) ( $\eta^6\text{-p-κυμενιο})\text{Cl}_2(\text{H}_2\text{O})$ . Η His15 αποτελεί το κύριο αμινοξικό κατάλοιπο πρόσδεσης.

**Εικόνα 1.5:** Σχηματική αναπαράσταση της δομής αναλόγων της ένωσης RAPTA με αξονικό υποκαταστάτη είτε βενζόλιο (RAPTA-B), είτε p-κυμένιο (RAPTA-C), είτε τολουόλιο (RAPTA-T)

**Εικόνα 1.6:** Η θειομεταφοράση του γλουταθείου (GST P1-1) (διμερές, (A) και (B) με προσδεμένο το υπόστρωμα (GSH) και το αδαμαντάνιο στην μεσεπιφάνεια και στο κέντρο του διμερούς.

**Εικόνα 1.7:** Εντοπισμός τριών θέσεων ρουθινώσης στην ένωση προσθήκης του νουκλεοσώματος και του RAPTA-C (PDB ID: 3MNN). Το υπολογισμένο ηλεκτροστατικό δυναμικό στο χωροπληρωτικό μοντέλο του πρωτεϊνικού πυρήνα των ιστονών με το τμήμα του DNA (145-ζεύγη βάσεων) να φαίνονται με πράσινο χρώμα. Η θέση πρόσδεσης του RAPTA-C (πράσινες ράβδοι) βρίσκεται στην αρνητικά φορτισμένη περιοχή της μεσεπιφάνειας των ιστονών H2A και H2B.

**Εικόνα 1.8:** Σχηματική αναπαράσταση των δύο μεταλλοφαρμάκων του Ru(III) που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές ως αντικαρκινικά. Οι δομικές διαφορές τους εντοπίζονται στους αξονικούς υποκαταστάτες μιδαζόλιο (NAMI-A) σε 1H-ινδαζόλιο (KP1019) και S-dmsο σε 1H-ινδαζόλιο.

**Εικόνα 1.9:** Σχηματική αναπαράσταση της βιοανόργανης ένωσης του Ru(III), AziRu, με πυριδινικό δακτύλιο και S-dmsο ως αξονικούς υποκαταστάτες στην ένωση.

**Εικόνα 1.10:** Το Ru(III) από την αντίδραση του NAMI-A με την καρβονική ανυδράση (CA), προσδέεται στην His64 με καταληψιμότητα 80%.

**Εικόνα 1.11:** Το απογυμνωμένο Ru(III) από το μεταλλοφάρμακο NAMI-A προσδέεται στη Λυσοζύμη στα Asp101 και Asp119, με κατάληψη 40% και στις δύο περιπτώσεις.

**Εικόνα 1.12:** Το απογυμνωμένο Ru(III) από την ένωση AziRu προσδέεται στη Λυσοζύμη στην His15, με κατάληψη 30%.

**Εικόνα 2.1:** Η βέλτιστη ευθεία γραμμή, η οποία αποτελεί τη γραμμική σχέση  $y = ax + b$ , για ένα σετ σημείων που ληφθήκαν πειραματικά, προκύπτει από την ελαχιστοποίηση των αποστάσεων  $d$  (μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων).

**Εικόνα 2.2:** Διαφορικός χάρτης Fourier  $F_o - F_c$ , όπου οι  $F_c$  έχουν υπολογιστεί από ένα μοντέλο που περιλαμβάνει μία πλευρική αλυσίδα Γλουταμίνης σε λάθος θέση. Η περιοχή αρνητικής διαφορικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας (κόκκινο χρώμα) υποδεικνύει τη θέση που λανθασμένα καταλαμβάνει η πλευρική αλυσίδα, ενώ η θετική πυκνότητα (πράσινο χρώμα) τη θέση όπου πρέπει να μετατοπιστεί η πλευρική αλυσίδα.

**Εικόνα 2.3:** Παρουσιάζονται οι δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις (A) και (B), για την Arg14 της Λυσοζύμης στη δομή PDB: 7BCU.

**Εικόνα 2.4:** Φάσμα απορρόφησης ακτίνων-X του Σεληνίου (Se) σε ένα εύρος μηκών κύματος. Η Κ άκρη απορρόφησης στα 0.98 Å είναι κατάλληλη για κρυσταλλογραφική μελέτη. Δεδομένα από το Brookhaven National Laboratory ([physics.nist.gov/PhysRefData](http://physics.nist.gov/PhysRefData)).

**Εικόνα 3.1:** Κρύσταλλοι της Λυσοζύμης

**Εικόνα 3.2:** Υπέρθωση της κρυσταλλικής δομής της ελεύθερης υποκαταστάτη (2vb1) Λυσοζύμης (κόκκινο) με την δεσμευμένη με την ένωση συναρμογής του Ru(II) (RuTE) (γαλάζιο).

**Εικόνα 3.3:** Αποκλίσεις θέσης RMSD των Ca ατόμων που υπολογίστηκαν από την υπέρθεση της κρυσταλλικής δομής HEWL-RuTE (PDB ID: 6TVL) με την υπερυψηλής διακριτικής ικανότητας δομής της ελεύθερης υποκαταστάτη HEWL (PDB ID: 2VB1) (επάνω διάγραμμα), και επίσης της δομής της HEWL με προσδεμένο έναν τρισακχαρίτη (PDB ID: 9LYZ) (κάτω διάγραμμα).

**Εικόνα 3.4:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 6TVL. Όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (99.21% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.49 με όριο το 2.

**Εικόνα 3.5:** a) Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα του RuTE στην περιοχή του αμινοξικού καταλοίπου Asp101 (αριστερά) χωρίς το μοντέλο του φαρμάκου (αριστερά), και μετά την μοντελοποίηση του φαρμάκου (δεξιά) στον αρχικό (unbiased) διαφορικό χάρτη  $F_o - F_c$  (μπλε χρώμα) και στο διαφορικό χάρτη ανώμαλης σκέδασης (μωβ χρώμα). Οι θέσεις των βαρέων μετάλλων προκύπτουν με μεγάλη ακρίβεια περίπου ίσης με 0.01 Å, με συνδυασμό των δύο χαρτών.

**Εικόνα 3.6:** (αριστερά) Χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας για το προσδεμένο RuTE και τα γειτονικά αμινοξέα και (δεξιά) σχηματική αναπαράσταση της πρόσδεσης του RuTE στο κατάλοιπο Asp101 της HEWL (πράσινο) σε υπέρθεση με τη δομή ελεύθερη-υποκαταστάτη HEWL (πορτοκαλί). Είναι εμφανείς οι μετατοπίσεις συγκεκριμένων καταλοίπων (Trp62 κατά 95°, Arg73 κατά 2.9 Å, Asp101 κατά 4.2 Å και Asn103 κατά 5.0 Å) για να επιτευχθεί η πρόσδεση του RuTE στην HEWL.

**Εικόνα 3.7:** Προσβάσιμη επιφάνεια στο διαλύτη (Solvent accessible surface, SAS) της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου HEWL-RuTE με υπολογισμένο το ηλεκτροστατικό δυναμικό. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο με το RuTE στο κατάλοιπο Asp101 και άλλες θέσεις μετάλλωσης του

Ρουθηνίου φαίνονται στην εικόνα με βέλη, όπως επίσης και τα δύο όξινα κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου HEWL (Glu35 και Asp52). Το RuTE προσδέεται στο τέλος του καταλυτικού καναλιού που έχει ως αρχή τα κατάλοιπα Glu35 και Asp52. Στην επιφάνεια είναι υπολογισμένο το ηλεκτροστατικό δυναμικό με αρνητικές τιμές των  $-1 kT/e$  με κόκκινο, ουδέτερο με λευκό, και  $+1 kT/e$  με μπλε.

**Εικόνα 4.1:** Η θέση των δύο  $Ca^{2+}$  στην Πρωτεΐνωση K και η καταλυτική τριάδα της.

**Εικόνα 4.2:** Κρύσταλλοι της PK

**Εικόνα 4.3:** Υπέρθωση της κρυσταλλικής δομής της PK, όπως προσδιορίστηκε κρυσταλλογραφικά ελεύθερη υποκαταστάτη (PDB ID: 1IC6) (πράσινο) και στο σύμπλοκο της με την ένωση συναρμογής RuTE (PDB ID: 6TXG) (κίτρινο).

**Εικόνα 4.4:** RMSD διαγράμματα των  $C^\alpha$  ατόμων της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου PK-RuTE (PDB ID: 6TXG) με (a) την ελεύθερη υποκαταστάτη υπερυψηλής διακριτικής ικανότητας δομή της PK (PDB ID: 5KXV) και (b) την ελεύθερη υποκαταστάτη δομή της PK (PDB ID: 1IC6).

**Εικόνα 4.5:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 6TXG. Όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (99.21% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.43 με όριο το 2.

**Εικόνα 4.6:** Αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της PK με τα προσδεδωμένα RuTE τμήματα στις δύο θέσεις ασβεστίου του ενζύμου. Τα κατάλοιπα συναρμογής Asp200 και Asp260, όπως επίσης και η καταλυτική τριάδα φαίνονται στην εικόνα. Επίσης, φαίνονται οι δύο θέσεις πρόσδεσης σε μεγενθυμένη εικόνα, με τους δεσμούς υδρογόνου να απεικονίζονται με διακεκομμένες γραμμές.

**Εικόνα 4.7:** (a) Η ηλεκτρονική πυκνότητα του RuTE στην περιοχή του αμινοξικού καταλοίπου Asp200 (αριστερά) χωρίς το μοντέλο του φαρμάκου και (δεξιά) μετά την μοντελοποίηση του φαρμάκου στον αρχικό (unbiased) διαφορικό χάρτη  $F_o - F_c$  (μπλε χρώμα) και στο διαφορικό χάρτη ανώμαλης σκέδασης (μωβ χρώμα). (b) (Αριστερά) Η ηλεκτρονική πυκνότητα του RuTE στην περιοχή του αμινοξικού καταλοίπου Asp260 και (δεξιά) η μοντελοποίηση του RuTE. Οι θέσεις των βαρέων μετάλλων (Ru) προκύπτουν με μεγάλη ακρίβεια (περίπου ίση με 0.01 Å), από τον συνδυασμό των δύο χαρτών.

**Εικόνα 4.8:** (a) Αρχικός χάρτης (unbiased) ηλεκτρονικής πυκνότητας του RuTE προσδεδωμένου στο Asp260 στη θέση πρόσδεσης (επίσης) των  $Ca^{2+}$  (θέση 2) με αριθμό κατάληψης 0.4 και τα γειτονικά κατάλοιπα σχεδιασμένα με κατώτερη στάθμη περιγράμματος (contour level) 1σ. (b) Η υπολειπόμενη πυκνότητα στη θέση 2 αποδόθηκε σε ένα κατιόν  $Na^+$  συναρμοσμένο με τρία μόρια νερού. (c) Αρχική (unbiased) ηλεκτρονική πυκνότητα του RuTE προσδεδωμένου στο Asp200 στη θέση πρόσδεσης (επίσης) των  $Ca^{2+}$  (θέση 1) με αριθμό κατάληψης 0.5 και τα γειτονικά κατάλοιπα σχεδιασμένα σε 1σ. (d) Η υπολειπόμενη πυκνότητα κοντά στη θέση 1 αποδόθηκε σε ένα κατιόν  $Ca^{2+}$  συναρμοσμένο με δύο μόρια νερού.

**Εικόνα 4.9:** Η προσβάσιμη επιφάνεια στο διαλύτη (Solvent accessible surface, SAS) της κρυσταλλικής δομής της PK-RuTE στην οποία έχει υπολογιστεί το ηλεκτροστατικό δυναμικό. Τα δύο σύμπλοκα RuTE, ένα αντισταθμιστικό ιόν triflate ( $OTf^-$ ), δύο 1,2-αιθανοδιόλες (αιθυλενογλυκόλες)

(EDO) και τρία ιόντα νιτρικών φαίνονται ως ράβδοι (ball-and-sticks). Επίσης υπάρχει επισήμανση για τις δύο θέσεις πρόσδεσης του  $\text{Ca}^{2+}$  όπως και για το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στην επιφάνεια είναι υπολογισμένο το ηλεκτροστατικό δυναμικό με αρνητικές τιμές των  $-1 \text{ kT/e}$  με κόκκινο, ουδέτερο με λευκό, και  $+1 \text{ kT/e}$  με μπλε.

**Εικόνα 5.1:** Οι δομές των αντικαρκινικών ενώσεων συναρμογής του Ru(III) του NAMI-A, AziRu και KP1019 ή IT139 (KP1339).

**Εικόνα 5.2:** Διαγράμματα RMSD ανά κατάλοιπο Λυσοζύμης για την κύρια αλυσίδα (backbone, bb, με μπλε) και για όλα τα άτομα (all-atoms, aa, κόκκινο) από την σύγκριση ατομικών θέσεων για τα ζεύγη δομών σε επαλληλία (αναφέρονται με τους κωδικούς PDB): **(a)** 7BCU - 1IEE, **(b)** 7BCX - 7BCU, **(c)** 7BD0 - 7BCU και **(d)** 7BDM - 7BCU. Οι τιμές στις παρενθέσεις είναι οι μέσες τιμές RMSD, αντίστοιχα.

**Εικόνα 5.3:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 7BCU. Όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (99.21% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.01 με όριο το 2.

**Εικόνα 5.4:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 7BCX. Σχεδόν όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (99.21% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.27 με όριο το 2.

**Εικόνα 5.5:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 7BD0. Όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (98.43% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.41 με όριο το 2.

**Εικόνα 5.6:** Διάγραμμα Ramachandran για τη δομή με PDB ID: 7BDM. Όλα τα κατάλοιπα βρίσκονται σε ευνοϊκές θέσεις (99.21% με όριο 98%) και με Z-score κατανομής Ramachandran=0.37 με όριο το 2.

**Εικόνα 5.7:** Το σύμπλοκο της HEWL με το NAMI-A έπειτα από εμφύσηση διάρκειας 1.5 ωρών (PDB ID: 7BCU). **a)** Απεικόνιση επιφάνειας τριών συμμετρικών στον κρύσταλλο μορίων HEWL, το καθένα προσδεμένο με τρία ανιόντα NAMI-A (επισημασμένα ως Ru-C, Ru-D, Ru-E). Η επιφάνεια είναι χρωματισμένη αντίστοιχα με το ηλεκτροστατικό δυναμικό με αρνητικές τιμές των  $-5 \text{ kT/e}$  με κόκκινο, ουδέτερο με λευκό, και  $+5 \text{ kT/e}$  με μπλε. Τα χρώματα των ατόμων είναι γαλάζιο για τον Άνθρακα, μπλε για το Άζωτο, κόκκινο για το Οξυγόνο, κίτρινο για το Θείο, πράσινο για το Χλώριο και μωβ για το Ρουθήνιο. **b)** Απεικόνιση των τριών ενώσεων NAMI-A προσδεμένων στην HEWL. Τα ένζυμα φαίνονται με απεικόνιση κορδέλας (ribbon representation), τα NAMI-A ως ραβδιά με μία μωβ σφαίρα να απεικονίζει το Ru(III) και τα αλληλεπιδρόντα κατάλοιπα να εμφανίζονται με κίτρινες ράβδους. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τις επιλεγμένες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις και οι αποστάσεις από τις κοινές θέσεις His15 και Asp101 δίνονται σε Å. Η Arg14, ένα κοινό ευέλικτο κατάλοιπο, εμφανίζεται σε δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις.

**Εικόνα 5.8:** Σχηματική αναπαράσταση 4 συμμετρικών κρυσταλλογραφικά μορίων Λυσοζύμης (HEWL) με τα 3 προσδεσμένα ιόντα NAMI-A στις 1.5 ώρες εμβάπτισης (soaking). (PDB ID: 7BCU) Οι αποστάσεις μεταξύ των κέντρων του Ru και των πιθανών κοντινών θέσεων ρουθηνίωσης (His15, Asp101, Asp119) φαίνονται με διακεκομμένες γραμμές και δίνονται σε Å.

**Εικόνα 5.9:** Πρόσδεση του NAMI-A στη Λυσοζύμη από τις τρεις κρυσταλλικές δομές που προσδιορίστηκαν (a) 7BCU (1.5 h), (b) 7BCX (8 h) και (c) 7BD0 (26 h). Για το NAMI-A, τα άτομα του άνθρακα είναι κυανά και για την Λυσοζύμη είναι κίτρινα. Οι δεσμοί υδρογόνου και αλογόνου, όπως και οι αρωματικές αλληλεπιδράσεις, είναι επισημασμένες με διακεκομμένες γραμμές, συμπεριλαμβανομένων και των αλληλεπιδράσεων με τα συμμετρικά μακρομόρια.

**Εικόνα 5.10:** Αναπαράσταση των τριών NAMI-A τμημάτων που αναγνωρίστηκαν σε σύμπλοκο με τη Λυσοζύμη σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία, φανερώνοντας την unbiased (αρχική) ηλεκτρονική πυκνότητα σε 1.0 σ (με γκρι) μαζί με την ηλεκτρονική πυκνότητα ανώμαλης σκέδασης σε 3.0 σ (με μωβ). Τα κέντρα του Ru είναι χρωματισμένα με λευκό χρώμα και οι ενώσεις συναρμογής είναι προσανατολισμένες στην ίδια θέση και στα τρία χρονικά διαστήματα, ως δυνατόν, για διευκρίνιση των ηλεκτρονικών πυκνοτήτων.

**Εικόνα 5.11:** Η υδρόλυση του NAMI-A σε υδατικό διάλυμα ουδέτερου και όξινου pH.

**Εικόνα 5.12** Κρυσταλλική δομή του NAMI-A (uncomplexed) από CCDC (κωδικός: 1939411)

**Εικόνα 5.13:** (a) Αναπαράσταση “κορδέλας” (ribbon) για τη δομή 7BDM (98h) της ρουθηνιωμένης Λυσοζύμης (adduct) που λήφθηκε έπειτα από εμβάπτιση 98 ωρών σε περίσσεια NAMI-A. Φαίνεται το Ru προσδεμένο στην His15, τρία συναρμοσμένα μόρια διαλύτη (νερού) και τα περιβαλλόμενα κατάλοιπα. Οι μωβ/πράσινες σφαίρες αναπαριστούν ιόντα  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  αντίστοιχα, ενώ τα σφαιρίδια EDO την 1,2-αιθανοδιόλη. Οι δύο εναλλακτικές διαμορφώσεις της Arg14 σημειώνονται με διαφορετικό χρώμα. (b) Απεικόνιση της θέσης ρουθηνίωσης. Ο αρχικός (unbiased) χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας είναι σχεδιασμένος σε 1σ (γκρι) και ο χάρτης ανώμαλης σκέδασης του μετάλλου σεδιασμένος στα 3σ (μωβ). Οι τιμές στις παρενθέσεις δείχνουν τον βαθμό κατάληψης, όπως προσδιορίστηκε έπειτα από τη βελτιστοποίηση, ενώ επιλεγμένες αποστάσεις (σε Å) σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές.

**Εικόνα 5.14:** Αρχικοί  $2F_o - F_c$  χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας σχεδιασμένοι σε 1.0 σ (γκρι) και αρχικοί  $F_o - F_c$  διαφορικοί χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας (πράσινο) σχεδιασμένοι σε 3.0 σ απεικονίζουν τις πιθανές θέσεις ρουθηνίωσης στα Asp101 (a, c) και Asp119 (b, d) από τις δομές 7BCU στις 1.5 ώρες και 7BDM στις 98 ώρες.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β'

**Πίνακας 3.2:** Η αναλυτική πορεία επίλυσης-βελτιστοποίησης της δομής HEWL/RuTE.

**Πίνακας 3.3:** Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων και στατιστικά βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο  $\{\text{Ru}^{\text{II}}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\}^{2+}$  (RuTE) με την HEWL. *RMSD* είναι η τετραγωνική ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης και οι τιμές στις παρενθέσεις είναι οι τιμές για τον φλοιό της υψηλότερης διακριτικής ικανότητας.

**Πίνακας 4.1:** Η πορεία της βελτιστοποίησης του συμπλόκου PK-RuTE

**Πίνακας 4.2:** Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων και στατιστικά βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο  $\{\text{Ru}^{\text{II}}([\text{9}]\text{aneS3})(\text{en})\}^{2+}$  (RuTE) με την PK. *RMSD* είναι η τετραγωνική ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης και οι τιμές στις παρενθέσεις είναι οι τιμές για τον φλοιό της υψηλότερης διακριτικής ικανότητας.

**Πίνακας 5.2** Γεωμετρικά χαρακτηριστικά του NAMI-A (uncomplexed) από CCDC (κωδικός: 1939411)

**Πίνακας 5.3:** Κρυσταλλογραφικές πληροφορίες για τα τμήματα NAMI-A στο σύμπλοκο 7BCU (1.5 h) και τις αλληλεπιδράσεις τους με κατάλοιπα της Λυσοζύμης

**Πίνακας 5.4:** Κρυσταλλογραφικές πληροφορίες για τα τμήματα NAMI-A στο σύμπλοκο 7BCX (8 h) και τις αλληλεπιδράσεις τους με κατάλοιπα της Λυσοζύμης

**Πίνακας 5.5:** Κρυσταλλογραφικές πληροφορίες για τα τμήματα NAMI-A στο σύμπλοκο 7BD0 (26 h) και τις αλληλεπιδράσεις τους με κατάλοιπα της Λυσοζύμης

**Πίνακας 5.6:** Γεωμετρικά χαρακτηριστικά των προσδεδεμένων NAMI-A στο σύμπλοκο 7BCU (1.5h)

**Πίνακας 5.7:** Γεωμετρικά χαρακτηριστικά των προσδεδεμένων NAMI-A στο σύμπλοκο 7BCX (8h)

**Πίνακας 5.8:** Γεωμετρικά χαρακτηριστικά των προσδεδεμένων NAMI-A στο σύμπλοκο 7BD0 (26h)

**Πίνακας 5.9:** Κρυσταλλογραφικές πληροφορίες και γεωμετρικά χαρακτηριστικά για τη ρουθηνίωση της Λυσοζύμης, όπως αποκαλύπτεται από τη δομή 7BDM (98 h)

**Πίνακας 5.10:** Οι αποστάσεις και οι γωνίες της ένωσης προσθήκης (adduct) του NAMI-A στη Λυσοζύμη (His15), όπως προσδιορίστηκαν από τη δομή 7BDM (98h).

