
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Combinatii complexe ale ionilor metalelor esențiale cu liganzi heterociclici cu N și S. Sinteza, caracterizarea structurală și evaluarea activității biologice

Doctorand **Tamara Liana Topală**

Conducători științifici **Prof. Dr. Radu Oprean**

Prof. Dr. Gloria Alzuet Piña



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA



UNIVERSITAT
DĀ VALÈNCIA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Structura, stabilitatea și proprietățile ADN-ului	19
1.1. Structura ADN-ului	19
1.2. Interacțiunea ADN-ului cu ionii metalici	23
1.3. Tipuri de interacțiuni stabilite între ADN și complecși metalici	23
1.3.1. Interacțiuni de natură covalentă	24
1.3.2. Interacțiuni de natură non-covalentă	25
1.3.2.1. Interacțiuni prin intercalare și inserție	26
1.3.2.2. Interacțiuni la nivelul cavităților ADN-ului	28
1.3.2.3. Interacțiuni de natură electrostatică	30
1.4. Acțiunea speciilor reactive de oxigen asupra ADN-ului	30
2. Chimia coordinativă și biochimia cobaltului, nichelului, cuprului și zincului	33
3. Sulfonamide	37
4. Nucleaze naturale și chimice	39
4.1. Complecși metalici ca nucleaze chimice	40
4.1.1. Sistemele cupru-1,10-fenantrolină	40
4.1.2. Design-ul complecșilor metalelor tranziționale cu activitate nucleazică	41
4.1.3. Scindarea ADN-ului mediată de complecși metalici în urma foto-activării	43
5. Albumina serică bovină	45
5.1. Structura și funcțiile biologice ale albuminei serice bovine	45
5.2. Interacțiunea complecșilor metalici cu albumina serică bovină	47
CONTRIBUȚII PERSONALE	
1. Obiective	51
2. Sinteza și caracterizarea liganzilor de tip sulfonamide N-substituite	53
2.1. Materiale și metode	53
2.2. Sintează	53
2.3. Analiză elementală	55
2.4. Spectrometrie de masă	55

2.5. Spectroscopie IR	55
2.6. Spectroscopie RMN (^1H and ^{13}C)	56
3. Complecși ai cuprului(II), nichelului(II), cobaltului(II) și zincului(II) cu sulfonamide N-substituite. Sinteză și caracterizare.	59
3.1. Materiale și metode	59
3.2. Sinteză	59
3.2.1. Complecși ai <i>N</i> -(piridin-2-il)chinolin-8-sulfonamidei (HL1)	60
3.2.2. Complecși ai <i>N</i> -(piridin-2-ilmetil)chinolin-8-sulfonamidei (HL2)	60
3.2.3. Complecși ai <i>N</i> -(2-(piridin-2-il)etil)chinolin-8-sulfonamidei (HL3)	61
3.2.4. Complecși ai <i>N</i> -(chinolin-8-il)chinolin-8-sulfonamidei (HL4)	62
3.3. Analiză elementală	63
3.4. Spectrometrie de masă	64
3.5. Analiză cristalografică	65
3.5.1. $[\text{Cu}(\text{L}1)_2(\text{fen})]$	70
3.5.2. $[\text{Cu}(\text{L}2)\text{Cl}]_n$	73
3.5.3. $[\text{Cu}(\text{L}2)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$	75
3.5.4. $[\text{Ni}(\text{L}2)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})][\text{Ni}(\text{L}2)(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})]$	77
3.5.5. $[\text{Cu}(\text{L}3)\text{Cl}]$	80
3.5.6. $[\text{Cu}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$	82
3.5.7. $[\text{Ni}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$	83
3.5.8. $[\text{Co}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$	85
3.5.9. $[\text{Cu}(\text{L}4)(\text{TFAA})] \cdot \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$	88
3.5.10. $[\text{Cu}_2(\text{L}4)_2(\mu\text{-teref})]$	90
3.5.11. $[\text{Cu}(\text{L}4)_2]$	93
3.5.12. $[\text{Co}(\text{L}4)_2]$	94
3.6. Modalități de coordinare a ionilor metalici în seria liganzilor de tip sulfonamide <i>N</i> -substituite	96
3.7. Spectroscopie IR	97
3.8. Spectroscopie UV-Viz	100
3.8.1. Spectroscopie UV-Viz de reflexie difuză	102
3.8.2. Spectroscopie UV-Viz în soluție	103
4. Studiul interacțiunii ADN-complecși metalici	107
4.1. Studii de spectroscopie de fluorescență	107
4.1.1. Introducere	107
4.1.2. Obiectiv	108
4.1.3. Materiale și metode	108
4.1.4. Rezultate și discuții	109

4.2. Studii de denaturare termică a ADN-ului	114
4.2.1. Introducere	114
4.2.2. Obiectiv	115
4.2.3. Materiale și metode	115
4.2.4. Rezultate și discuții	116
5. Studii de activitate nucleazică	123
5.1. Evaluarea activității nucleazice a complexilor metalici	123
5.1.1. Introducere	123
5.1.2. Obiectiv	124
5.1.3. Materiale și metode	124
5.1.4. Rezultate și discuții	126
5.1.4.1. Evaluarea activității nucleazice a complexilor metalici în prezența agenților reducători (acid ascorbic și/sau H ₂ O ₂)	126
5.1.4.2. Evaluarea activității nucleazice a complexilor metalici în absența agenților reducători	131
5.1.4.3. Scindarea ADN-ului mediată de complexii metalici în urma foto-activării cu radiație UVA	132
5.2. Studiul mecanismului de scindare a ADN-ului mediată de complexii metalici	136
5.2.1. Introducere	136
5.2.2. Obiectiv	138
5.2.3. Materiale și metode	138
5.2.4. Studiul mecanismului scindării ADN-ului în prezența agenților reducători	139
5.2.5. Studiul mecanismului scindării ADN-ului în urma foto-activării cu radiație UVA	144
5.2.6. Mecanism propus pentru scindarea ADN-ului mediată de complexii metalici	145
5.2.6.1. Mecanismul scindării ADN-ului în prezența agenților reducători	146
5.2.6.2. Mecanismul scindării ADN-ului în urma foto-activării cu radiație UVA	148
6. Studiul interacțiunii albumină serică bovină-complecși metalici	149
6.1. Introducere	149
6.2. Obiectiv	150
6.3. Materiale și metode	150
6.4. Rezultate și discuții	150
7. Concluzii generale	159
8. Originalitatea tezei și contribuții inovatoare	163
REFERINȚE	165

Cuvinte-cheie: *complexi ai metalelor tranziționale, sulfonamide N-substituite, nucleaze chimice, interacțiune cu ADN-ul, mecanism oxidativ de degradare a ADN-ului, scindarea ADN-ului în urma iradierii cu lumină UVA, interacțiune cu albumina serică bovină*

Stadiul actual al cunoașterii

Odată cu identificarea ADN-ului ca principala țintă de acțiune pentru numeroase substanțe medicamentoase utilizate în prezent în terapie, inclusiv complexi metalici, mecanismul de interacțiune al acestora cu acidul nucleic a fost intens studiat. Substanțe cu masa moleculară mică și care au proprietatea de a interacționa cu ADN-ul pot modifica și/sau inhiba funcțiile acidului nucleic, perturbând sinteza de proteine, expresia genică sau replicarea, un pas critic în diviziunea celulară^{1, 2}. Proteinele plasmatică sunt responsabile de transportul, distribuția și excreția la nivelul organismului a unui număr extrem de mare de substanțe, atât endogene, cât și xenobiotice³. De aceea, evaluarea interacțiunii cu această clasă de proteine reprezintă un pas critic în dezvoltarea de noi molecule cu potențial terapeutic. Albumina serică bovină (ASB) este des utilizată ca model în astfel de studii, în special datorită similitudinii pe care aceasta o prezintă față de albumina de origine umană⁴.

Structura ADN-ului prezintă numeroase situsuri de legare, atât pentru substanțe endogene, cât și pentru xenobiotice. Legarea unor factori inhibitori sau activatori ai transcripției, polimerazelor, nucleazelor etc. este esențială pentru reglarea și desfășurarea normală a funcțiilor ADN-ului. În același timp, interacțiunea moleculei acidului nucleic cu diferite xenobiotice la nivelul unor situsuri specifice poate duce la degradarea reversibilă sau ireversibilă a ADN-ului⁵.

Molecula de ADN se caracterizează printr-o deosebită stabilitate față de procesele hidrolitice intracelulare, fenomen esențial pentru asigurarea integrității materialului genetic, dar ce reprezintă și o mare provocare în obținerea de nucleaze chimice eficiente. Nucleazele chimice au apărut din nevoia cercetătorilor de a crea molecule care să mimeze funcțiile îndeplinite de nucleazele naturale. Scindarea moleculei de ADN își găsește aplicații atât în biotehnologie, unde este necesară pentru studierea moleculei de acid nucleic, cât și în medicină, atât timp cât scindarea moleculei de ADN aduce după sine moartea celulei⁶. În ultimele decenii, studiile s-au îndreptat spre sinteza de complexi mono- și polinucleari ai metalelor tranziționale și ai lantanidelor, având proprietatea de a media scindarea moleculei de acid nucleic^{7, 8}. Mecanismele de degradare a ADN-ului inițiate de complexii metalici s-au dovedit a fi de natură hidrolitică și/sau oxidativă. Scindarea pe cale oxidativă a acidului nucleic a atras atenția cercetătorilor prin posibilitatea utilizării acestor complexi în tratamente antivirale, antibacteriene și antitumorale^{9, 10, 11}.

Terapia fotodiamică reprezintă una dintre cele mai promițătoare și studiate direcții de cercetare în tratamentul diferitelor tipuri de tumori. Deși majoritatea

compușilor luați în studiu sunt molecule organice, tot mai mulți compuși coordinativi se evidențiază ca potențiali agenți fotosensibilizanți^{12, 13}.

Cele mai multe domenii de cercetare referitoare la dezvoltarea de medicamente antineoplazice au în vedere obținerea de compuși cu eficiență și siguranță ridicate. Complecșii metalelor esențiale aduc avantajul de a fi mai bine tolerați de către organism și oferă posibilitatea obținerii unui profil farmacologic îmbunătățit. Ionii de Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} și Zn^{2+} sunt constituenți naturali ai unor numeroase structuri biologice, în special enzime, prezintă potențiale redox accesibile la nivel biologic și afinitate relativ mare față de bazele azotate din structura ADN-ului, ceea ce îi transformă în alternative viabile pentru sinteza de nucleaze chimice^{14, 15}.

Contribuții personale

Principalul obiectiv al studiilor efectuate a fost sinteza și caracterizarea structurală a unor noi sulfonamide *N*-substituie și a complecșilor binari sau ternari ai acestora cu ionii de Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} și Zn^{2+} . S-a urmărit investigarea afinității compușilor coordinativi față de ADN-ul dublu catenar și față de albumina serică bovină. S-a avut în vedere, de asemenea, evaluarea activității nucleazice a complecșilor, atât în prezența și în absența unor agenți reducători, cât și în urma foto-activării.

Sinteza și caracterizarea liganzilor de tip sulfonamide *N*-substituie

Sulfonamidele *N*-substituie prezintă o mare capacitate coordinativă față de ionii metalici, prin atomii de N și O din gruparea sulfonamică, dar și prin diferite grupări funcționale care pot fi grefate la nivelul substituenților.

Au fost sintetizate 4 noi sulfonamide *N*-substituie, derivați de 8-chinolinsulfonil: *N*-(piridin-2-il)chinolin-8-sulfonamida (HL1), *N*-(piridin-2-ilmetil)chinolin-8-sulfonamida (HL2), *N*-(2-(piridin-2-il)etil)chinolin-8-sulfonamida (HL3) și *N*-(chinolin-8-il)chinolin-8-sulfonamida (HL4). Metodele utilizate pentru caracterizarea structurală a sulfonamidelor au fost analiza elementală, spectrometria de masă, spectroscopia IR și spectroscopia RMN (^1H RMN și ^{13}C RMN).

Complecși ai cuprului(II), nichelului(II), cobaltului(II) și zincului(II) cu sulfonamide *N*-substituie. Sintează și caracterizare.

Din multitudinea de compuși obținuți, au fost aleși pentru studii aprofundate 14 complecși metalici. Analiza cristalografică prin difracție cu raze X a fost posibilă pentru toți complecșii, cu excepția compusului $[\text{Cu}_2(\text{L2})_2\text{SO}_4]$. În lucrarea de față sunt descrise structurile cristaline a 12 dintre compușii coordinativi sintetizați, unul dintre cristale fiind în curs de rezolvare ($[\text{Zn}(\text{L3})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$). Analiza cristalografică a furnizat informații foarte detaliate legate de structura complecșilor, a confirmat structura liganzilor și a permis desprinderea unor concluzii legate de modul de coordinare al acestora. Complecșii au fost caracterizați, de asemenea, prin analiză elementală, spectrometrie de masă și spectroscopie IR și UV-Viz.

Utilizând ligandul HL1 a fost obținut complexul ternar $[\text{Cu}(\text{L1})_2(\text{fen})]$, singurul ce conține ca și coligand molecula de 1,10-fenantrolină, cunoscută pentru proprietatea sa de a se intercala între perechi de baze adiacente din structura ADN-ului. Complexul prezintă o geometrie octaedrică distorsionată, ionul de Cu(II) fiind înconjurat de 6 atomi de azot: atomii de N sulfonamidici, cei piridinici și cei doi atomi de N aparținând moleculei de coligand.

Ligandul HL2, coordinând ionii metalici prin atomul de N sulfonamic, atomul de N piridinic și cel chinolinic, a generat 4 compuși coordinativi: complexul dinuclear $[\text{Cu}_2(\text{L2})_2\text{SO}_4]$, polimerul $[\text{Cu}(\text{L2})\text{Cl}]_n$, $[\text{Cu}(\text{L2})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$ și $[\text{Ni}(\text{L2})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})][\text{Ni}(\text{L2})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})]$. În complexul $[\text{Cu}(\text{L2})\text{Cl}]_n$, cu geometrie de octaedru distorsionat, unul dintre atomii de oxigen realizează legătura între unitățile monomerice prin coordinarea a doi ioni de Cu^{2+} vecini. Complexul $[\text{Cu}(\text{L2})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$, prezentând o geometrie de piramidă pătrată distorsionată, deschide seria compușilor de tip *metal-ligand-benzoat*. Complexul $[\text{Ni}(\text{L2})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})][\text{Ni}(\text{L2})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})]$ se distinge prin cele două unități cristalografic independente, ambele cu geometrie octaedrică, dar având coliganzi deferiți.

Ligandul HL3 este tridentat, ionii metalici fiind coordinați prin cei trei atomi de N din structură ($N_{\text{sulfonamic}}$, $N_{\text{chinolinic}}$ și $N_{\text{piridinic}}$). Utilizând acest ligand, au fost obținuți compușii din seria $[\text{M}(\text{L3})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$ ($\text{M} = \text{Co}^{2+}$, Ni^{2+} , Cu^{2+} și Zn^{2+}), toți prezentând geometrii de piramide pătrate (geometrie presupusă pentru complexul de Zn^{2+}). A fost obținut, de asemenea, complexul $[\text{Cu}(\text{L3})\text{Cl}]$, singurul cu geometrie plan pătrată puternic distorsionată.

În cazul tuturor complexelor obținuți cu ligandul HL4, sulfonamida deprotonată este tridentată și coordinează ionii metalici prin atomii de azot din structură ($N_{\text{sulfonamic}}$ și cei doi atomi de N chinolinici). Au fost sintetizați complecșii binari $[\text{Co}(\text{L4})_2]$ și $[\text{Cu}(\text{L4})_2]$, caracterizați de geometrii octaedrice și complexul dinuclear cu punte tereftalat $[\text{Cu}_2(\text{L4})_2(\mu\text{-teref})]$, în care ambii ioni Cu(II) se află într-o înconjurare de piramidă pătrată. S-a obținut, de asemenea, complexul $[\text{Cu}(\text{L4})(\text{TFAA})] \cdot \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$, ce conține două unități structurale distincte, cu aceeași geometrie de piramidă pătrată, dar diferențiindu-se prin lungimile legăturilor și valorile unghiurilor ce definesc poliedrul de coordinare.

Analiza cristalografică a scos în evidență prezența legăturilor intramoleculare și intermoleculare de tip $\pi\text{-}\pi$, stabilite între inelele aromatice din structurile liganzilor sulfonamidici și cele ale coliganzilor. Pentru majoritatea complecșilor, au fost identificate legături de tip *chinolină-chinolină*, *chinolină-fenantrolină* și/sau *chinolină-fenil*. În cazul compușilor $[\text{Cu}(\text{L1})_2(\text{fen})]$ și $[\text{Cu}_2(\text{L4})_2(\mu\text{-teref})]$, s-au remarcat și interacțiuni de tip *chelate-fenantrolină*, *chelate-chinolină*, și/sau *chelate-chelat* (ciclul chelat continând și ionul metalic central). La stabilizarea structurilor cristaline contribuie, de asemenea, legături intra- și intermoleculare de tip C-H... π și legături de hidrogen.

Caracterizarea complexelor metalice în soluție s-a realizat cu scopul de a identifica speciile responsabile de activitatea biologică. Rezultatele oferite de spectrometria de masă și spectroscopia UV-Viz indică menținerea speciei complexe în soluție (cu excepția compusului $[\text{Cu}(\text{L1})_2(\text{fen})]$, ce pierde o moleculă de ligand).

Studiul interacțiunii ADN-complecși metalici

O primă etapă în procesul de scindare a moleculei de ADN o reprezintă interacțiunea eficientă între compusul coordinativ și acidul nucleic. Mecanismele posibile de interacțiune ADN-complex sunt: *intercalare între perechi de baze azotate adiacente, interacțiuni cu cavitățile ADN-ului și interacțiuni de natură electrostatică stabilite cu grupările fosfat din scheletul dublului helix.*

Studii de spectroscopie de fluorescență

Studiile s-au bazat pe urmărirea stingerii fluorescenței aductului ADN-bromură de etidiu în prezența complexelor metalice.

Bromura de etidiu (EtBr) este un cunoscut agent de intercalare, ce prezintă fluorescență intensă doar fiind protejat între perechile de baze azotate ale ADN-ului. În prezența unui alt compus cu afinitate pentru molecula de acid nucleic, se poate observa o diminuare a fluorescenței aductului ADN-EtBr. Acest fenomen poate fi rezultatul unei competiții pentru situsurile de legare ale ADN-ului, înlocuirii moleculelor de EtBr intercalate în structura ADN-ului de către molecule de complex, al deformării dublului helix cu expunerea moleculei de EtBr la acțiunea O_2 sau a solventului sau a unui transfer electronic EtBr- Cu^{2+} .

În cazul tuturor complexelor metalice studiate s-a observat o diminuare moderată a intensității fluorescenței aductului ADN-EtBr, fenomen corelat cu o interacțiune limitată între compușii coordinativi și acidul nucleic. Valorile constantelor Stern-Volmer, ce caracterizează această stingere a fluorescenței în prezența complexelor metalice, se situează în intervalul $2 \times 10^3 - 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, fiind comparabile cu cele raportate în literatură pentru complecși cu structuri asemănătoare.

Studii de denaturare termică a ADN-ului

Denaturarea termică a ADN-ului (temperatura la care are loc tranziția de la structura dublu catenară la cea monocatenară) este influențată de către interacțiunea diversilor compuși cu molecula de acid nucleic. ΔT_m reprezintă variația „temperaturii de topire” a ADN-ului (temperatura la care 50% din ADN se găsește sub formă denaturată) și reflectă intensitatea interacțiunii ADN-complex. Studiile au constat în urmărirea absorbției ADN-ului dublu catenar (la 260 nm) în absența și în prezența complexelor, în intervalul de temperatură 25 - 75°C.

Rezultatele indică, în cazul tuturor complexelor, o creștere moderată a temperaturii de topire a ADN-ului, sugerând o interacțiune ADN-complex de intensitate modestă. Se disting complecșii de nichel, $[\text{Ni}(\text{L2})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})][\text{Ni}(\text{L2})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})]$ și $[\text{Ni}(\text{L3})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$, ce s-au

dovedit a fi cei mai eficienți în stabilizarea moleculei de ADN ($\Delta T_m \approx 14^\circ\text{C}$), în condițiile în care raportul de concentrații a fost $[\text{ADN}]:[\text{Complex}] = 2:1$.

Studii de activitate nucleazică

În vederea evaluării capacității complexelor de a media scindarea moleculei de ADN, s-a utilizat o separare electroforetică orizontală în gel de agaroză și plasmidul pUC18.

În prezența agenților reducători (acid ascorbic și/sau H_2O_2), complexii $[\text{Cu}(\text{L}1)_2(\text{fen})]$ și $[\text{Cu}_2(\text{L}2)_2\text{SO}_4]$ s-au dovedit a fi nucleaze chimice eficiente, iar complexii $[\text{Cu}(\text{L}2)\text{Cl}]_n$ și $[\text{Cu}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$ prezintă activitate moderată. În cazul celorlalți compuși, nu s-a observat clivarea ADN-ului în intervalul de concentrații studiat. Un comportament foarte interesant a fost observat în cazul complexelor $[\text{Cu}(\text{L}4)(\text{TFAA})] \cdot \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$ și $[\text{Cu}_2(\text{L}4)_2(\mu\text{-teref})]$, pentru care studiile indică un potențial de a proteja ADN-ul față de scindarea indusă de ionii liberi de Cu^{2+} .

Activitatea nucleazică în absența agenților reducători a fost evaluată pentru complexii de Co^{2+} , Ni^{2+} și Zn^{2+} , acești ioni fiind adesea asociați cu procese nucleolitice de natură hidrolitică^{16, 17}. În condițiile experimentale luate în lucru, acești compuși nu au dus la scindarea moleculei de ADN.

A fost evaluată, de asemenea, abilitatea complexelor de a induce clivarea moleculei de acid nucleic ca urmare a foto-activării cu lumină UVA (365 nm). Rezultatele indică faptul că doi dintre compuși, $[\text{Cu}(\text{L}1)_2(\text{fen})]$ și $[\text{Cu}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$, prezintă activitate nucleazică în aceste condiții. Complexii $[\text{Cu}(\text{L}4)(\text{TFAA})] \cdot \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$ și $[\text{Cu}_2(\text{L}4)_2(\mu\text{-teref})]$ prezintă, și în acest caz, o capacitate de a proteja ADN-ul față de procesele nucleolitice. În cazul celorlalți complecși nu a fost observată scindarea ADN-ului în condițiile experimentale luate în studiu.

Investigarea meccanismului prin care complexii își manifestă activitatea nucleazică evidențiază implicarea unor specii reactive de oxigen (SRO) generate într-un ciclu redox la care participă ionii de $\text{Cu}(\text{II})$, agentul reducător și oxigenul molecular (Fig. 1). Utilizând captatori specifici, s-au putut identifica SRO implicate în procesele de scindare mediate de complexii sudiați: *radicalul hidroxil*, *oxigenul singlet* sau *speciile de tip oxigen singlet* și *radicalul superoxid*. De asemenea, pentru complexii $[\text{Cu}(\text{L}1)_2(\text{fen})]$, $[\text{Cu}_2(\text{L}2)_2\text{SO}_4]$, $[\text{Cu}(\text{L}2)\text{Cl}]_n$ și $[\text{Cu}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$, a fost propusă o interacțiune la nivelul cavității mici a AND-ului.

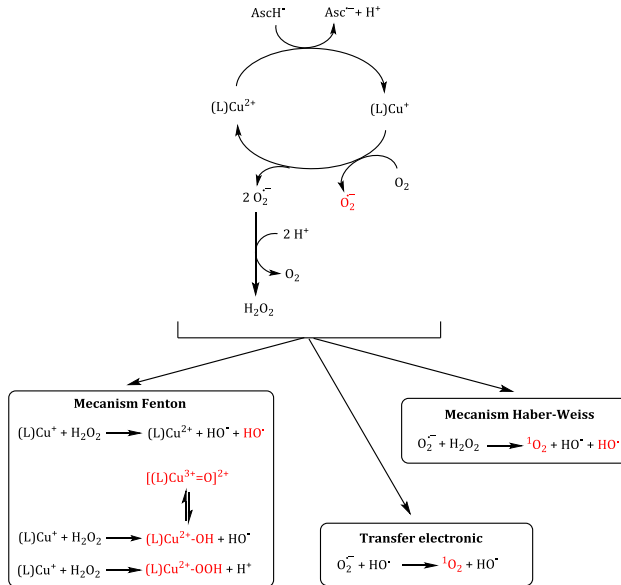


Fig. 1. Mecanism propus pentru scindarea pUC18 mediată de complexii metalici în prezența agenților reducători

În cazul scindării ADN-ului în urma foto-activării, s-a pus în evidență formarea de *radicali hidroxil* și *superoxid* printr-un mecanism de Tip I (Fig. 2).

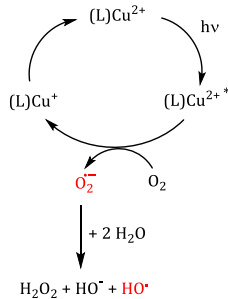


Fig. 2. Mecanism propus pentru scindarea pUC18 mediată de complexii metalici ca urmare a foto-activării cu lumină UVA

Studiul interacțiunii albumină serică bovină-complecși metalici

Experimentele s-au bazat pe urmărirea stingerii fluorescenței intrinseci a ASB în prezența unor concentrații crescânde de complecși. S-a observat o diminuare a intensității fluorescenței proteinei în cazul tuturor complexelor luate în studiu, fenomen relaționat cu o interacțiune ce are loc între cele două molecule. Valorile obținute pentru constanta de afinitate (K_b) se încadrează în intervalul optim precizat de literatură, cu excepția complexelor $[\text{Cu}_2(\text{L}2)_2\text{SO}_4]$ și $[\text{Zn}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$, ce prezintă o afinitate scăzută față de albumină. Legarea complexelor de proteină are loc suficient

de puternic încât substanța să poată fi transportată de către aceasta, dar, în același timp, suficient de slabă încât, odată ajunsă la țintă, substanța să poată fi eliberată.

Referințe (selectiv)

1. Garcia-Gimenez JL, Alzuet G, Gonzalez-Alvarez M, Castineiras A, Liu-Gonzalez M, Borrás J. A dinuclear copper(II) complex with adeninate bridge ligands and prominent DNA cleavage activity. Structural and spectroscopic characterization and magnetic properties. *Inorg Chem.* 2007;46(17):7178-7188.
2. Cristea AN. *Farmacologie generală*. București: Editura didactică și pedagogică, R. A.; 1999.
3. Peters TJ. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. San Diego: Academic Press; 1995.
4. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence and cyclic voltametry. *J Photochem Photobiol B.* 1996;124:1-19.
5. Nakamoto K, Tsuboi M, Strahan GD. *Drug-DNA interactions. Structures and spectra*. New York: John Wiley and Sons LTD; 2008.
6. Hadjiliadis N, Sletten E. *Metal Complex-DNA Interactions*: John Wiley & Sons; 2009.
7. Mancin F, Scrimin P, Tecilla P, Tonellato U. Artificial metallonucleases. *Chem Commun.* 2005 (20):2540-2548.
8. Cowan JA. Chemical nucleases. *Curr Opin Chem Biol.* 2001;5:634-642.
9. Jiang Q, Xiao N, Shi P, Zhu Y, Guo Z. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. *Coordination Chemistry Reviews.* 2007;251:1951-1972.
10. Xin Zhang C, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7:481-489.
11. Bakhtiar R, Ochiai EI. Pharmacological applications of inorganic complexes. *Gen Pharmacol.* 1999;32:525-540.
12. Armitage B. Photocleavage of Nucleic Acids. *Chem Rev.* 1998 1998/05/01;98(3):1171-1200.
13. Maity B, Gadadhar S, Goswami TK, Karande AA, Chakravarty AR. Photo-induced anticancer activity of polypyridyl platinum(II) complexes. *Eur J Med Chem.* 2012 Nov;57:250-258.
14. Ghizdavu L. *Chimie bioanorganica*. Cluj-Napoca: Poliam; 2000.
15. Cowan JA. *Inorganic Biochemistry. An Introduction*. Second ed. New York: Wiley - VCH, Inc.; 1997.
16. Liu C, Wang M, Zhang T, Sun H. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews.* 2004;248(1-2):147-168.
17. Desbouis D, Troitsky IP, Belousoff MJ, Spiccia L, Graham B. Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. *Coordination Chemistry Reviews.* 2012;256:897-937.

PH.D. THESIS ABSTRACT

Coordination compounds of essential metal ions with ligands containing N and S. Synthesis, structural characterization and evaluation of their biological activity

Ph.D. student **Tamara Liana Topală**

Thesis supervisors **Prof. Dr. Radu Oprean**
Prof. Dr. Gloria Alzuet Piña



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA



UNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW	
1. DNA structure, stability and chemistry	19
1.1. DNA structural features	19
1.2. DNA interactions with metal cations	23
1.3. Types of DNA-metal complex interactions	23
1.3.1. Covalent binding	24
1.3.2. Non-covalent binding	25
1.3.2.1. Intercalators and insertors	26
1.3.2.2. Groove binders	28
1.3.2.3. Electrostatic interactions with the sugar-phosphate DNA backbone	30
1.4. DNA damage induced by reactive oxygen species	30
2. Cobalt, nickel, copper and zinc coordination chemistry and biochemistry	33
3. Sulfonamides	37
4. Natural and chemical nucleases	39
4.1. Metal complexes as chemical nucleases	40
4.1.1. Copper-1,10-phenanthroline systems	40
4.1.2. The design of transition metal complexes with nuclease activity	41
4.1.3. Photoinduced DNA cleavage mediated by metal complexes	43
5. Bovine serum albumin	45
5.1. Bovine serum albumin structure and biological functions	45
5.2. Bovine serum albumin interactions with metal complexes	47
ORIGINAL RESEARCH AND CONTRIBUTIONS	
1. Objectives	51
2. Synthesis and characterization of the <i>N</i>-substituted sulfonamide ligands	53
2.1. Materials and experimental methods	53
2.2. Synthesis	53
2.3. Elemental analysis	55
2.4. Mass spectrometry	55
2.5. Infrared spectroscopy	55

2.6. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy	56
3. Copper(II), nickel(II), cobalt(II) and zinc(II) complexes with N-substituted sulfonamides. Synthesis and characterization.	59
3.1. Materials and experimental methods	59
3.2. Synthesis	59
3.2.1. <i>N</i> -(pyridin-2-yl)quinoline-8-sulfonamide (HL1) complexes	60
3.2.2. <i>N</i> -(pyridin-2-ylmethyl)quinoline-8-sulfonamide (HL2) complexes	60
3.2.3. <i>N</i> -(2-(pyridin-2-yl)ethyl)quinoline-8-sulfonamide (HL3) complexes	61
3.2.4. <i>N</i> -(quinolin-8-yl)quinoline-8-sulfonamide (HL4) complexes	62
3.3. Elemental analysis	63
3.4. Mass spectrometry	64
3.5. X-ray crystallography	65
3.5.1. $[\text{Cu}(\text{L1})_2(\text{phen})]$	70
3.5.2. $[\text{Cu}(\text{L2})\text{Cl}]_n$	73
3.5.3. $[\text{Cu}(\text{L2})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$	75
3.5.4. $[\text{Ni}(\text{L2})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})][\text{Ni}(\text{L2})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})]$	77
3.5.5. $[\text{Cu}(\text{L3})\text{Cl}]$	80
3.5.6. $[\text{Cu}(\text{L3})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$	82
3.5.7. $[\text{Ni}(\text{L3})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$	83
3.5.8. $[\text{Co}(\text{L3})(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$	85
3.5.9. $[\text{Cu}(\text{L4})(\text{TFAA})] \cdot \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$	88
3.5.10. $[\text{Cu}_2(\text{L4})_2(\mu\text{-tereph})]$	90
3.5.11. $[\text{Cu}(\text{L4})_2]$	93
3.5.12. $[\text{Co}(\text{L4})_2]$	95
3.6. Coordination modes of the synthesized sulfonamides	96
3.7. Infrared spectroscopy	97
3.8. UV-Vis spectroscopy	100
3.8.1. Diffuse reflectance spectroscopy	102
3.8.2. UV-Vis spectroscopy in solution	103
4. Study of the DNA – metal complexes interaction	107
4.1. Fluorescence spectroscopic studies	107
4.1.1. Introduction	107
4.1.2. Objective	108
4.1.3. Materials and experimental methods	108
4.1.4. Results and discussion	109
4.2. DNA thermal denaturation studies	114
4.2.1. Introduction	114
4.2.2. Objective	115

4.2.3. Materials and experimental methods	115
4.2.4. Results and discussion	116
5. Nuclease activity studies	123
5.1. Evaluation of the DNA cleavage mediated by the metal complexes	123
5.1.1. Introduction	123
5.1.2. Objectives	124
5.1.3. Materials and experimental methods	124
5.1.4. Results and discussion	126
5.1.4.1. Nuclease activity of the metal complexes in the presence of reducing agents (ascorbic acid and/or H ₂ O ₂)	126
5.1.4.2. Nuclease activity of the metal complexes in the absence of reducing agents	131
5.1.4.3. Photoinduced DNA cleavage mediated by the metal complexes	132
5.2. Study of the mechanism involved in the DNA cleavage mediated by the metal complexes	136
5.2.1. Introduction	136
5.2.2. Objectives	138
5.2.3. Materials and experimental methods	138
5.2.4. Mechanistic studies of the DNA cleavage in the presence of reducing agents	139
5.2.5. Mechanistic studies of the photoinduced DNA cleavage	144
5.2.6. Proposed mechanism for the DNA damage mediated by the metal complexes	145
5.2.6.1. Mechanism of DNA cleavage in the presence of reducing agents	146
5.2.6.2. Mechanism of DNA photocleavage	148
6. Study of the bovine serum albumin – metal complexes interaction	149
6.1. Introduction	149
6.2. Objective	150
6.3. Materials and experimental methods	150
6.4. Results and discussion	150
7. General conclusions	159
8. Thesis originality and innovative contributions	163
REFERENCES	165

Key-words: transition metal complexes, N-substituted sulfonamides, chemical nucleases, DNA interaction, oxidative mechanism of DNA cleavage, DNA damage upon UVA irradiation, bovine serum albumin interaction

Background and literature review

Since DNA was identified as one of the primary targets of many of the drugs that are currently in clinical use, including metal based anticancer drugs, the interaction mechanism of metal complexes with the nucleic acid has been intensely studied. Small molecules that bind to DNA can alter and/or inhibit its functions, disturbing gene expression, protein synthesis or interfere with replication, a major step in cell growth and division^{1, 2}. The investigation of the binding mechanism and binding amplitude of small molecules to serum albumins is crucial in understanding drug pharmacodynamics and pharmacokinetics, as the nature and strength of that interaction has a great influence on drug absorption, distribution, metabolism and excretion^{3, 4}.

DNA's structure shows a large number of potential binding sites, for both endogenous molecules and xenobiotics. The binding of transcription repressors and activator proteins, nucleases, polymerases etc. is essential to the regulation and normal functions of the nucleic acid molecule. On the other hand, the interaction with different xenobiotics may lead to reversible or permanent DNA damage⁵.

The DNA molecule is characterized by a remarkable stability towards the intracellular hydrolytic processes, an essential phenomenon for the preservation of the genetic material, but it also implies a challenge in the design of efficient chemical nucleases. Synthetic nucleases have been developed as a consequence of the need for molecules that could mimic the activity of natural nucleases. DNA scission has ample potential applications in molecular biology, biotechnology, and medicine⁶. Over the last decades, studies were oriented towards the synthesis of mono- and polynuclear transition metal complexes and lanthanide complexes, with the property of mediating DNA cleavage^{7, 8}. The possible mechanisms followed by metal complexes in damaging the nucleic acid are of oxidative and/or hydrolytic nature. Oxidative DNA scission leads to irreversible damage and implies that the complexes showing this property have antiviral, antibacterial and antitumor potential^{9, 10, 11}.

Photodynamic therapy is one of the most promising anticancer therapies under investigation. Although the majority of the compounds considered for this type of therapy are organic structures, metal complexes may also act as prospective photosensitizers^{12, 13}.

Most of the research areas regarding the development of new anticancer drugs are oriented towards obtaining compounds with high effectiveness and low toxicity. Essential metal complexes may have the advantage of being well-tolerated by the organism and may have an improved pharmacological profile. Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} and Zn^{2+} ions naturally occur in numerous biological structures, mostly enzymes, show biologically accessible redox potentials and a relatively high affinity for the DNA nucleobases. These features turn such metal complexes into structures of real therapeutic value^{14, 15}.

Personal contributions

The synthesis and thorough characterization of new *N*-substituted sulfonamides and their copper(II), nickel(II), cobalt(II) and zinc(II) complexes with the property of damaging the DNA molecule was the main goal of the present work. The affinity of the synthesized coordination compound for the double-stranded DNA and bovine serum albumin was investigated. The nuclease properties of the metal complexes were also studied, in the presence and in the absence of reducing agents, as well as upon photoactivation.

Synthesis and characterization of the *N*-substituted sulfonamide ligands

N-substituted sulfonamides are suitable candidates for metal complexes formation primarily due to the presence of N and O donor atoms in the sulfonamide moiety. According to specific needs, the functional groups of *N*-substituted sulfonamides may bear additional donor atoms increasing their potential as ligands for metal ions coordination.

Four new *N*-substituted sulfonamides were synthesized, quinolyl-8-sulfonyl derivatives: *N*-(pyridine-2-yl)quinoline-8-sulfonamide (HL1), *N*-(pyridin-2-ylmethyl)quinoline-8-sulfonamide (HL2), *N*-(2-(pyridin-2-yl)ethyl)quinoline-8-sulfonamide (HL3) and *N*-(quinolin-8-yl)quinoline-8-sulfonamide (HL4). The compounds were structurally characterized by elemental analysis, mass spectrometry, infrared spectroscopy and ¹H and ¹³C NMR spectroscopy.

Copper(II), nickel(II), cobalt(II) and zinc(II) complexes with *N*-substituted sulfonamides. Synthesis and characterization.

A large number of coordinative compounds were obtained, but fourteen binary or ternary complexes having Cu(II), Ni(II), Co(II) or Zn(II) as coordination centres were chosen for the more extensive studies. The complexes were structurally characterized by elemental analysis, mass spectrometry, infrared spectroscopy and UV-Vis spectroscopy. Except for [Cu₂(L2)₂SO₄], all complexes were obtained as monocrystals. The structure was elucidated by X-ray crystallography for all complexes, except [Zn(L3)(C₆H₅COO)], whose crystal structure is in the process of being solved. X-ray crystallography provided detailed data regarding the structure of the complexes, it confirmed the sulfonamide structures and showed their coordination modes.

Using the HL1 ligand, one Cu(II) complex was obtained, which also incorporated one 1,10-phenanthroline molecule, a known DNA intercalator, as coligand: [Cu(L1)₂(phen)]. The Cu(II) ion is surrounded by 6 nitrogen atoms, forming a distorted octahedral coordination polyhedron: the N_{sulfonamido}, N_{pyridyl} and the two N atoms belonging to the coligand.

Ligand HL2, coordinating the metal ions through the N_{sulfonamido}, N_{pyridyl} and N_{quinoline} atoms, generated 4 coordination compounds: the dinuclear [Cu₂(L2)₂SO₄], the polymer [Cu(L2)Cl]_n, and the [Cu(L2)(C₆H₅COO)] and [Ni(L2)(C₆H₅COO)(CH₃OH)]

[Ni(L2)(CH₃COO)(CH₃OH)] complexes. In complex [Cu(L2)Cl]_n, showing a distorted octahedral geometry, one of the oxygen atoms coordinates two neighbouring Cu(II) ions, creating a polymeric chain. Complex [Cu(L2)(C₆H₅COO)], a distorted square pyramid, opens the *metal-ligand-benzoate series*. Complex [Ni(L2)(C₆H₅COO)(CH₃OH)] [Ni(L2)(CH₃COO)(CH₃OH)] stands out through its two crystallographically independent units, both showing an octahedral geometry, but containing different coligands.

Ligand HL3 acts as tridentate, coordinating the metal ions through its three N atoms (N_{sulfonamido}, N_{pyridyl} and N_{quinoline}). Using this *N*-substituted sulfonamide, the [M(L3)(C₆H₅COO)] (M = Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺) series was obtained, all the complexes having square pyramidal geometries (supposed geometry for the Zn²⁺ complex) and complex [Cu(L3)Cl], the only one characterized by a severely distorted square planar coordination polyhedron.

In the case of all complexes obtained with the HL4 ligand, the deprotonated sulfonamide acts as tridentate and binds the metal ions through its nitrogen atoms. The obtained complexes were: the binary [Co(L4)₂] and [Cu(L4)₂], showing octahedral geometries and the dinuclear terephthalate-bridged [Cu₂(L4)₂(μ-tereph)], containing both Cu(II) ions in a square pyramidal environment. Complex [Cu(L4)(TFAA)]·¼H₂O was also obtained, incorporating two distinct structural units, showing the same square pyramidal geometry, but differing in bond lengths and angles characterizing the local environment.

X-ray analysis also provided data regarding π-π stacking interactions established between the aromatic moieties of the sulfonamides or of the coligands. The stacking interactions are mainly of *quinoline-quinoline* and *quinoline-phenyl* type. Moreover, complexes [Cu(L1)₂(phen)] and [Cu₂(L4)₂(μ-tereph)] show interesting π-π interactions involving *Cu-chelate* rings, formed with the 1,10-phenanthroline molecule or with the sulfonamide ligand. Intramolecular and intermolecular C-H...π and hydrogen bonds also contribute to the stabilization of the crystal structures.

The complexes were also characterized in solution. The data provided by mass spectrometry and UV-Vis spectroscopy indicated that the complex structures are maintained in solution (except complex [Cu(L1)₂(phen)], which loses a ligand molecule).

Study of the DNA – metal complexes interaction

A first step in the DNA cleavage process is represented by an efficient interaction between the metal complex and the nucleic acid. The possible interaction mechanisms are: *intercalation between adjacent nucleobases*, *groove binding* and *electrostatic interaction established with the sugar-phosphate DNA backbone*.

Fluorescence spectroscopic studies

The experiments were based on the study of the fluorescence quenching of the DNA-ethidium bromide adduct.

Ehtidium bromide (EtBr) is a known intercalator, fluorescent when protected between the DNA nucleobases. The presence of another species with affinity for DNA (i.e. a metal complex) in the close vicinity of the nucleic acid may result in a decrease in the emission intensity of the EtBr-DNA by replacing EtBr, by modifying the conformation of the DNA molecule and/or by accepting the excited state electron of the EtBr through a photoelectron transfer mechanism.

In all cases, the presence of the metal complexes resulted in the decrease of emission intensity characteristic to the DNA-EtBr adduct in a concentration-dependent manner, a phenomenon correlated with a DNA-metal complex interaction. The values of the Stern-Volmer constants, characterizing the fluorescence quenching, lie in the range of $2 \times 10^3 - 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, similar to the ones previously reported for transition metal complexes with ligands containing aromatic ligands.

DNA thermal denaturation studies

DNA thermal denaturation (the temperature at which the transition from double stranded to single stranded DNA occurs) is influenced by its interaction with different compounds. ΔT_m represents the variation of the DNA melting temperature (at which 50% of the nucleic acid is in the single stranded form) and is indicative of the strength of the DNA-complex interaction. The studies consisted in registering the absorbance of double stranded DNA (at 260 nm) in the absence and in the presence of the metal complexes, in the temperature range of 25 - 75°C.

In all cases, an increase in the melting temperature of CT-DNA is observed, as evidence of an interaction taking place between the metal complexes and the nucleic acid and the stabilization of the double helix. Most of the complexes show a mild stabilization of the DNA double helix, indicating a moderate interaction with the nucleic acid. The most efficient in stabilizing the DNA double helix proved to be the Ni(II) complexes, $[\text{Ni}(\text{L}2)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})]$ $[\text{Ni}(\text{L}2)(\text{CH}_3\text{COO})(\text{CH}_3\text{OH})]$ and $[\text{Ni}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$, both showing an increase in the melting temperature of DNA of approximately 14 °C, at a ratio of $[\text{DNA}] : [\text{Complex}] = 2 : 1$.

Nuclease activity studies

DNA cleavage experiments were carried out by means of horizontal agarose gel electrophoresis using pUC18 plasmid DNA.

In the presence of reducing agents (ascorbic acid and/or H_2O_2), complexes $[\text{Cu}(\text{L}1)_2(\text{phen})]$ and $[\text{Cu}_2(\text{L}2)_2\text{SO}_4]$ proved to be efficient chemical nucleases, while complexes $[\text{Cu}(\text{L}2)\text{Cl}]_n$ and $[\text{Cu}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$ showed a moderate activity.

The behavior of the Ni(II), Co(II) and Zn(II) complexes towards pUC18 was studied in the absence of reducing agents, as they are known for their ability to damage DNA following a hydrolytic mechanism^{16, 17}. In the experimental conditions employed, these complexes did not lead to DNA scission. Complexes $[\text{Cu}(\text{L}4)(\text{TFAA})] \cdot \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Cu}_2(\text{L}4)_2(\mu\text{-tereph})]$ showed a very interesting behavior was observed, as they seem to protect the nucleic acid from the oxidative damage induced by free Cu(II) ions.

The *photonuclease activity* (upon UVA irradiation) of the complexes was also investigated. The results suggest that compounds $[\text{Cu}(\text{L}1)_2(\text{phen})]$ and $[\text{Cu}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$ show intense photonucleolytic properties. Complexes $[\text{Cu}(\text{L}4)(\text{TFAA})] \cdot \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$ and $[\text{Cu}_2(\text{L}4)_2(\mu\text{-tereph})]$ showed, once again, the ability to protect DNA from the nucleolytic processes. In the case of the other complexes, no nuclease activity was observed.

The study of the *mechanism* through which the complexes exert their nuclease activity highlighted the involvement of reactive oxygen species (ROS) generated in a redox cycle implicating the Cu(II) ions, the reducing agent and molecular oxygen (Fig. 1). Using several ROS scavengers, the species involved in the DNA cleavage mediated by the metal complexes were identified: *the hydroxyl radical, singlet oxygen or singlet oxygen-like species and the superoxide radical*. For complexes $[\text{Cu}(\text{L}1)_2(\text{phen})]$, $[\text{Cu}_2(\text{L}2)_2\text{SO}_4]$, $[\text{Cu}(\text{L}2)\text{Cl}]_n$ and $[\text{Cu}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$, a minor groove binding was also proposed.

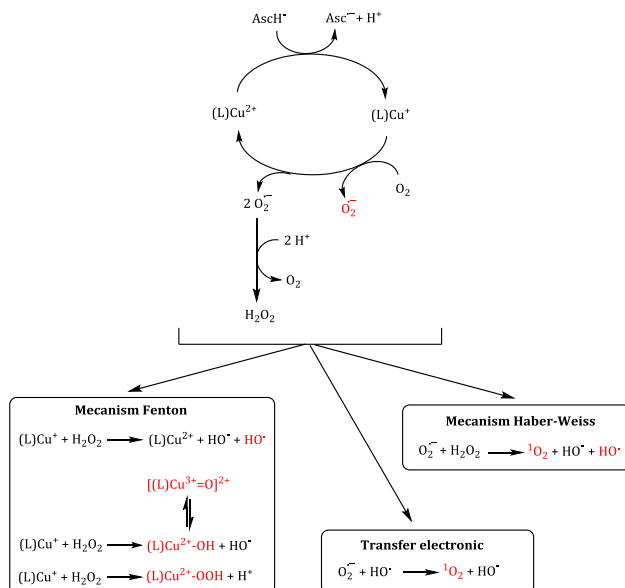


Fig. 1. Proposed general mechanism for the oxidative DNA cleavage mediated by Cu(II) complexes in the presence of ascorbate

In the case of the DNA damage inflicted as a result of photoactivation, the ROS implicated were the hydroxyl and the superoxide radicals, formed following a Type I mechanism (Fig. 2).

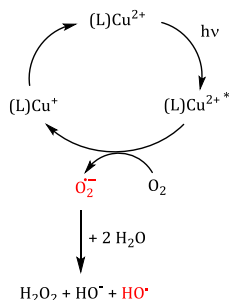


Fig. 2. Proposed general mechanism for the photoinduced DNA cleavage mediated by Cu(II) complexes

Study of the bovine serum albumin – metal complexes interaction

The experiments consisted in registering the intrinsic fluorescence quenching of BSA in the presence of increasing complex concentrations. In all cases, a concentration-dependent quenching of the fluorescence of the protein was observed, as a consequence of a protein-complex interaction between the two types of molecules. The values of the binding constant (K_b) lie in the optimum range, except in the case of complexes $[\text{Cu}_2(\text{L}2)_2\text{SO}_4]$ and $[\text{Zn}(\text{L}3)(\text{C}_6\text{H}_5\text{COO})]$, which showed a very low affinity for the protein. The binding constants of the complexes to serum albumin are generally high enough to ensure that a significant amount gets transported and distributed through the organism, but, at the same time, low enough so that the compound can be released once it reaches its target.

Selective references

1. Garcia-Gimenez JL, Alzuet G, Gonzalez-Alvarez M, Castineiras A, Liu-Gonzalez M, Borrás J. A dinuclear copper(II) complex with adeninate bridge ligands and prominent DNA cleavage activity. Structural and spectroscopic characterization and magnetic properties. *Inorg Chem.* 2007;46(17):7178-7188.
2. Cristea AN. *Farmacologie generală*. București: Editura didactică și pedagogică, R. A.; 1999.
3. Peters TJ. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. San Diego: Academic Press; 1995.
4. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence and cyclic voltametry. *J Photochem Photobiol B.* 1996;124:1-19.
5. Nakamoto K, Tsuboi M, Strahan GD. *Drug-DNA interactions. Structures and spectra*. New York: John Wiley and Sons LTD; 2008.
6. Hadjiliadis N, Sletten E. *Metal Complex-DNA Interactions*: John Wiley & Sons; 2009.
7. Mancin F, Scrimin P, Tecilla P, Tonellato U. Artificial metallonucleases. *Chem Commun.* 2005 (20):2540-2548.
8. Cowan JA. Chemical nucleases. *Curr Opin Chem Biol.* 2001;5:634-642.
9. Jiang Q, Xiao N, Shi P, Zhu Y, Guo Z. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. *Coordination Chemistry Reviews.* 2007;251:1951-1972.
10. Xin Zhang C, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7:481-489.

11. Bakhtiar R, Ochiai EI. Pharmacological applications of inorganic complexes. *Gen Pharmacol.* 1999;32:525-540.
12. Armitage B. Photocleavage of Nucleic Acids. *Chem Rev.* 1998 1998/05/01;98(3):1171-1200.
13. Maity B, Gadadhar S, Goswami TK, Karande AA, Chakravarty AR. Photo-induced anticancer activity of polypyridyl platinum(II) complexes. *Eur J Med Chem.* 2012 Nov;57:250-258.
14. Ghizdavu L. *Chimie bioanorganica.* Cluj-Napoca: Poliam; 2000.
15. Cowan JA. *Inorganic Biochemistry. An Introduction.* Second ed. New York: Wiley - VCH, Inc.; 1997.
16. Liu C, Wang M, Zhang T, Sun H. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews.* 2004;248(1-2):147-168.
17. Desbouis D, Troitsky IP, Belousoff MJ, Spiccia L, Graham B. Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. *Coordination Chemistry Reviews.* 2012;256:897-937.